

## Kemampuan Primer General CK4/CK2 Virus Infectious Bronchitis (IBV) untuk Mengamplifikasi Genom IBV Isolat Lapangan Indonesia

N.L.P. I. Dharmayanti<sup>✉1)</sup>, W. Asmara<sup>2)</sup>, W.T. Artama<sup>2)</sup>, R. Indriani<sup>1)</sup>, & Darminto<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Balai Penelitian Veteriner, Bogor

<sup>2)</sup> Pusat Antar Universitas Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

### ABSTRACT

**Capability of general primer CK4/CK2 infectious bronchitis virus (IBV) to amplify of genomic IBV field isolates in Indonesia.** Avian infectious bronchitis virus (IBV), the prototype of coronaviridae, is highly contagious, economically important pathogen of the chickens. Comparative sequence analysis of IBV S1 gene revealed regions that were conserved among serotypes. Two of conserved region were used to develop degenerate general primer CK4/CK2 for amplifying IBV genomic RNA by RT-PCR. The aims of this study to demonstrated ability of general primer CK4/CK2 for amplified S1 gene IBV field isolates in Indonesia. The result of this is study suggest that only three IBV field isolates that can be amplified by primer CK4/CK2 that are I-14, I-37 and I-269.

**Key words:** Capability, general primer CK4/CK2, infectious bronchitis virus, field isolates

### PENDAHULUAN

*Infectious Bronchitis* virus (IBV) adalah prototipe *Coronaviridae* yang sangat kontagius dan patogen pada ayam. Kerugian ekonomi yang disebabkan karena pada ayam petelur dapat menyebabkan penurunan produksi dan kualitas telur. Kematian dapat juga terjadi pada ayam muda yang terinfeksi pada saluran pernapasan ataupun ginjal (Cavanagh & Naqi, 1997).

Virus IB mempunyai genom RNA *positive single strand* dengan panjang genom sekitar 27.6 Kb (Boursnell *et al.*, 1987). Genom virus ini mengandung informasi untuk empat protein struktural yaitu *spike glycoprotein*, *membrane glycoprotein*, *small membrane*

*glycoprotein* dan *nucleocapsid*. *Spike glycoprotein* dikaitkan dengan *virus neutralisasi*, *serotype specificity* dan *cell attachment* dan dipisahkan pada saat post translasi menjadi subunit N terminal S-1 dan C terminal S-2 (Koch *et al.*, 1990; Niesters *et al.*, 1989).

Analisis perbandingan sekuen gen S1 menyatakan adanya daerah yang *conserved* diantara banyak serotipe. Dua daerah yang *conserved* ini digunakan untuk mengembangkan *degenerate general primer* untuk mengamplifikasi genom RNA dengan RT-PCR (Keeler *et al.*, 1998) yaitu primer CK2 dan CK4 yang mengikat daerah S1 yang mempunyai arti diagnostik dan daerah hipervariabel dari serotipe yaitu HVR-1 dan HVR-2 yang mengandung sekuen yang dikaitkan

✉ Jl. R.E.Martadinata No. 30, Bogor 16114

dengan serotipe IBV spesifik (Binns *et al.*, 1986; Kingham *et al.*, 2000) seperti *serotype specific neutralization epitops* (Koch *et al.*, 1990; Kant *et al.*, 1992; Cavanagh *et al.*, 1992).

Primer ini merupakan *general primer* yang disusun berdasarkan adanya daerah *conserved* yaitu HGGAY (CK4) pada posisi asam amino ke 43 atau nukleotida ke 127 dan CQYNTG (CK2) pada posisi 229 atau pada nukleotida ke 708 (Keeler *et al.*, 1998; Kingham *et al.*, 2000). Primer CK4 (*forward*) dengan total panjang 23 basa dengan sekuen TCAAAGCTTCANGGNGGNGCNTA dan primer CK2 (*reverse*) total panjang 25 basa dengan sekuen CTCGAATTCCNGTRTRTRTAYTGRCA. Primer ini telah digunakan untuk mengamplifikasi sekitar 500 sampel lapangan (Kingham *et al.*, 2000). Berdasarkan latar belakang di atas penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah primer general IBV dapat digunakan untuk mengamplifikasi virus IB isolat lapangan Indonesia.

## BAHAN DAN CARA KERJA

### Virus

Pada penelitian ini digunakan sepuluh virus *Infectious Bronchitis* isolat lapangan Indonesia yaitu I-2, I-3, I-5, I-7, I-9, I-14, I-24, I-25, I-269 dan I-37 yang telah dibedakan dengan uji serum netralisasi (Darminto, 1992; Indriani & Darminto, 2000).

### Titrisasi virus IB

Titrisasi virus dilakukan dari stok virus IB pada telur ayam berembrio non SPF (*specific pathogen free*) umur 9 hari dengan dosis 0,1 ml setiap telur dengan pengenceran  $10^{-1}$  -  $10^{-10}$ , dengan 5

kali ulangan masing-masing pengenceran. Telur diinkubasi selama 7 hari. Setelah inkubasi selama 7 hari semua telur dibunuh dengan cara dimasukkan ke dalam  $4^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam. Setelah 24 jam, dilakukan penghitungan terhadap embrio-embrio yang menciri infeksi IB seperti kerdil, hemoragi, bulu jarang, kaki keriting dan penimbunan asam urat serta embrio-embrio yang negatif. Data yang diperoleh digunakan untuk penentuan  $\text{EID}_{50}$  (Burllesom *et al.*, 1992).

### Propagasi virus IB pada telur SPF

Telur SPF berembrio umur 9 hari (10 butir telur untuk setiap isolat) dari stok diencerkan 1000 kali dan diinjeksikan kedalam cairan allantois sebanyak 0,2 ml masing-masing telur. Telur diinkubasi selama 48 jam dan setelah 48 jam, semua embrio dibunuh dengan memasukkan pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam. Cairan allantois dipanen setelah 24 jam dan digunakan untuk pembuatan virus pekat dengan cara melakukan ultrasentrifugasi dengan kecepatan 93.000 g selama 2 jam.

### Isolasi RNA virus IB

Isolasi RNA virus ini dilakukan dengan kit *Quick Prep Total RNA Extraction Kit* (Amersham Pharmacia). Hasil isolasi RNA dielektroforesis dalam agarose gel 1% (Promega, *analytical grade*) yang mengandung ethidium bromide 0,4  $\mu\text{g/ml}$  dengan menggunakan 1 x *sodium phosphat buffer*.

### Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Hasil isolasi RNA diamplifikasi dengan menggunakan *Ready to go RT-PCR beads* (Amersham Pharmacia) dengan mesin *thermal cycler* (Perkin Elmer 2400). dan selanjutnya dilakukan optimasi

program PCR. Hasil PCR dicek dengan menggunakan agarose 1% (Promega, *analytical grade*).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Titirasi virus *Infectious Bronchitis*

Kejadian serologi IB di Indonesia telah dilaporkan oleh Noguchi, *et al*

(1972); Ronohardjo (1980). Tetapi tidak ada laporan mengenai serotipe virus penyebab IB tersebut. Darminto *et al* (1988) melaporkan terdapat enam isolat yang diperoleh dalam penelitiannya sedangkan Indriani dan Darminto (2000) memperoleh sepuluh isolat virus IB yang diperoleh dari berbagai daerah di Jawa. Hasil perhitungan EID<sub>50</sub> dari masing-masing isolat dapat dilihat pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Hasil perhitungan EID<sub>50</sub> dari 10 virus IB isolat lapang

	Isolat Virus	EID <sub>50</sub> /ml
1	I-2	10 <sup>7.48</sup>
2	I-3	10 <sup>6.25</sup>
3	I-5	10 <sup>6.65</sup>
4	I-7	10 <sup>7.75</sup>
5	I-9	10 <sup>4.73</sup>
6	I-14	10 <sup>6.61</sup>
7	I-24	10 <sup>6.39</sup>
8	I-25	10 <sup>5.67</sup>
9	I-37	10 <sup>6.85</sup>
10	I-269	10 <sup>5.57</sup>

Pada penelitian ini virus *infectious bronchitis* diinokulasikan pada kantong korioallantois embrio umur 9 – 11 hari dan akan menghasilkan karakteristik lesi khas IBV pada hari ketujuh paska inokulasi. Pada Gambar 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 dapat dilihat karakteristik lesi yang ditimbulkan oleh adanya infeksi IBV I-2, I-3, I-5, I-7, I-9, I-14, I-24, I-25, I-37 dan I-269, yaitu bulu jarang, kaki keriting, kerdil dan hemoragi. Hasil ini menunjukkan bahwa kesepuluh isolat lapang dapat menyebabkan lesi yang menciri khas infeksi virus IB pada pasase kesepuluh untuk isolat I-2, I-3, I-5, I-7, I-9, I-14, I-24 dan I-25, pasase ke-22 untuk isolat I-37 dan pasase ke-18 pada isolat I-269. Pada embrio yang diinfeksi isolat I-2 (Gambar 2) embrio tampak kerdil dan hemoragi, kaki tampak keriting,

pertumbuhan bulu tidak normal. Keadaan serupa juga terjadi pada isolat I-5 (Gambar 4), I-7 (Gambar 5), I-37 (Gambar 10) dan I-269 (Gambar 11). Pada embrio yang diinfeksi dengan isolat I-3, (Gambar 3), I-9 (Gambar 6), I-14 (Gambar 7), I-24 (Gambar 8) dan I-25 (Gambar 9), kaki embrio keriting, pertumbuhan bulu jarang, embrio tampak perdarahan dan kerdil walaupun tidak separah isolat I-2, I-5, I-7, I-37 dan I-269. Ini membuktikan bahwa kesepuluh isolat virus yang digunakan penelitian ini mencirikan virus IB.

### RT-PCR gen S1 virus *Infectious Bronchitis*

Optimasi program RT-PCR telah dilakukan pada berbagai kondisi suhu dan menghasilkan optimasi sebagai berikut

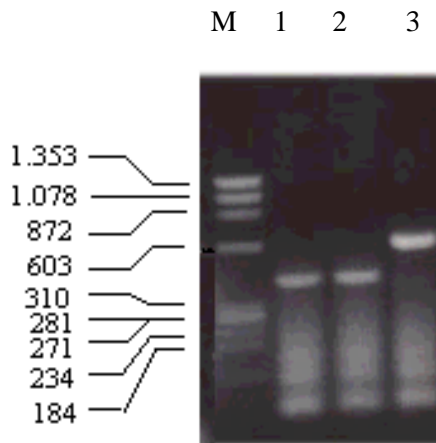
pada isolat I-14 dan I-37 reaksi RT pada suhu 42°C selama 30 menit, 95°C selama 4 menit; reaksi PCR : denaturasi, 94°C selama 30 detik; annealing, 50°C selama 1 menit; ekstensi, 72°C selama 1 menit; final ekstensi, 72°C selama 15 menit dengan siklus PCR sebanyak 35 kali. Untuk isolat I-269 optimasinya sama dengan optimasi isolat I-37 dan I-14, hanya berbeda pada suhu annealing yaitu pada suhu 48°C. Hasil RT-PCR menunjukkan bahwa isolat

I-2, I-3, I-5, I-7, I-9, I-24, I-25 tidak dapat teramplifikasi dengan menggunakan primer CK4 dan CK2, meskipun telah dicoba dengan berbagai kondisi optimasi sedangkan isolat I-14, I-37 dan I-269 yang dapat teramplifikasi dan menghasilkan produk PCR seperti pada Tabel 2 dan gambar 12. Pada isolat I-14, I-37 dan I-269, menghasilkan pita 400 bp (isolat I-14 dan I-269) dan 600 bp (isolat I-37).

**Tabel 2.** Hasil amplifikasi fragmen gen S1 (bp) virus IB isolat lapang

No	Isolat Virus	Ukuran Produk PCR (bp)
1	I-2	-
2	I-3	-
3	I-5	-
4	I-7	-
5	I-9	-
6	I-24	-
7	I-25	-
8	I-14	400
9	I-37	600
10	I-269	400

Keterangan : - = tidak terdeteksi



**Gambar 1.** Produk RT-PCR virus IB dengan primer CK4 dan CK2. RNA dipurifikasi dari isolat lapang I-14 (pita nomor1), I-269 (pita nomor 2) dan I-37 (pita nomor 3). Posisi *Molecular weight standart* ( $\phi$  X174) disebelah kiri.

## Kemampuan Primer Geberal CK4/CK2

Tidak teramplifikasinya fragmen gen S-1 ketujuh isolat ini mungkin dapat disebabkan oleh beberapa hal diantaranya mungkin pada daerah primer pada gen S1 virus IB isolat lapang terjadi mutasi baik itu hilang, penyisipan ataupun penggantian basa sehingga mungkin tidak mempunyai sekuen yang sama dengan primer terutama pada ujung 3'. Ketidaksesuaian sekuen ini menyebabkan tidak terjadinya annealing, sehingga pada beberapa optimasi RT-PCR yang digunakan tidak menghasilkan suatu fragmen hasil amplifikasi. Sehingga harus dilakukan modifikasi penyusunan primer yang dapat digunakan untuk mengamplifikasi dan mendeteksi virus IB isolat lapang.

## KESIMPULAN

Pada penelitian ini menunjukkan bahwa virus IB isolat lapang Indonesia tidak semuanya dapat diamplifikasi dan dideteksi dengan menggunakan primer general IBV CK2/CK4. Dari sepuluh isolat lapang virus IB Indonesia hanya tiga isolat yang dapat dideteksi dengan primer general IBV CK2/CK4 yaitu isolat I-14, I-37 dan I-269. Ini berarti diperlukan modifikasi penyusunan primer yang dapat digunakan untuk mendeteksi virus IB isolat lapang Indonesia.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Diucapkan terima kasih kepada Bapak Nana Suryana Laboratorium virologi Balitvet, Bapak Toni dan ibu Eka Laboratorium Rekayasa Genetika, Bioteknologi Universitas Gadjah Mada atas bantuan teknisnya.



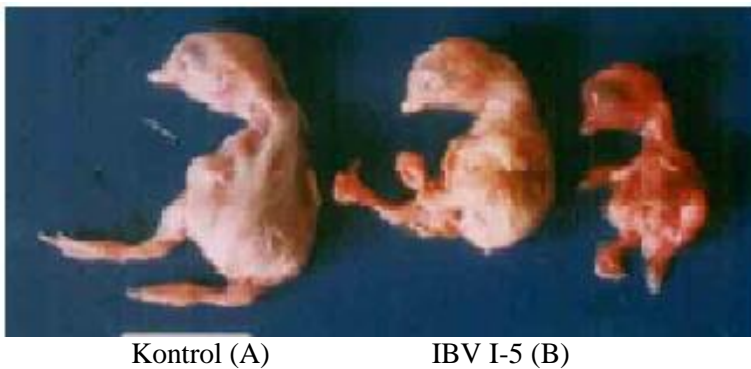
Kontrol (A)

IBV I-2 (B)

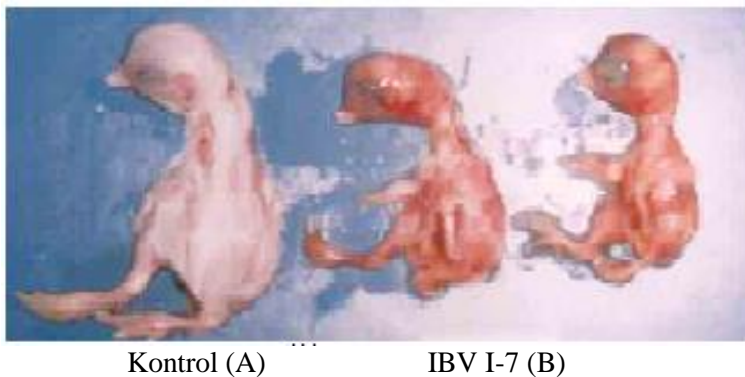
**Gambar 2.** Embrio ayam yang diinfeksi dengan isolat lapang IBV I-2 (A) Embrio normal (B) Embrio tampak kerdil, kaki keriting, bulu jarang, hemoragi akibat infeksi IBV I-2



**Gambar 3.** Embrio ayam yang diinfeksi dengan isolat lapang IBV I-3 (A) Embrio normal (B) Embrio tampak kerdil, kaki keriting, bulu jarang, hemoragi akibat infeksi IBV I-3



**Gambar 4.** Embrio ayam yang diinfeksi dengan isolat lapang IBV I-5 (A) Embrio normal (B) Embrio tampak kerdil, kaki keriting, bulu jarang, hemoragi akibat infeksi IBV I-5



**Gambar 5.** Embrio ayam yang diinfeksi dengan isolat lapang IBV I-7 (A) Embrio normal (B) Embrio tampak kerdil, kaki keriting, bulu jarang, hemoragi akibat infeksi IBV I-7



Kontrol (A)

IBV I-9 (B)

**Gambar 6.** Embrio ayam yang diinfeksi dengan isolat lapang IBV I-9 (A) Embrio normal (B) Embrio tampak kerdil , kaki keriting, bulu jarang, hemoragi akibat infeksi IBV I-9



Kontrol (A)

IBV I-14 (B)

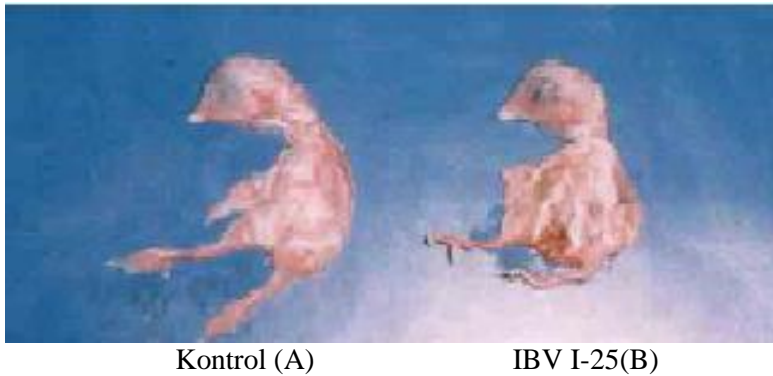
**Gambar 7.** Embrio ayam yang diinfeksi dengan isolat lapang IBV I-14 (A) Embrio normal (B) Embrio tampak kerdil, kaki keriting, bulu jarang, hemoragi akibat infeksi IBV I-14



Kontrol (A)

IBV I-24(B)

**Gambar 8.** Embrio ayam yang diinfeksi dengan isolat lapang IBV I-24 (A) Embrio normal (B) Embrio tampak kerdil , kaki keriting, bulu jarang, hemoragi akibat infeksi IBV I-24



**Gambar 9.** Embrio ayam yang diinfeksi dengan isolat lapang IBV I-25 (A) Embrio normal (B) Embrio tampak kerdil, kaki keriting, bulu jarang, hemoragi akibat infeksi IBV I-25



**Gambar 10.** Embrio ayam yang diinfeksi dengan isolat lapang IBV I-3 (A) Embrio normal (B) Embrio tampak kerdil, kaki keriting, bulu jarang, hemoragi akibat infeksi IBV I-37



**Gambar 11.** Embrio ayam yang diinfeksi dengan isolat lapang IBV I-269 (A) Embrio normal (B) Embrio tampak kerdil, kaki keriting, bulu jarang, hemoragi akibat infeksi IBV I-269



## DAFTAR PUSTAKA

- Binns, M.M., E.G. Bournsnel, F.M.Tomley & T.D.K .Brown. 1986. Comparison of spike precursor sequences of coronanavirus IBV strains M41 & 6/82 with that of Beaudette. *J.Gen.Virol.* 67: 2825 - 2831.
- Bournsnel, M.E.G., T.D.K.Brown, I.J.Foulds, P.F.green, F.M.Tomley & M.M. Binns. 1987. Completion of the sequence of the genome of the coronavirus avian infectious bronchitis virus. *J.Gen.Virol.* 68: 55-77.
- Butcher, G.D; Shapiro, D.P, Miles, R.D; & Jacob, J.P. 1998. Classical & variant avian infectious bronchitis virus strains. <http://edis.ifas.ufl.edu>
- Burlesom, F.G., T.M. Chambers, D.L. Wiedbrauk. 1992. *Virology : A Laboratory manual.* Academic Press, Inc. California. 40 - 57
- Cavanagh, D., P.J. Davis, J.K. Cook, D. Li, A. Kant, & G. Koch. 1992. Location of the amino acid differences in the S1 spike glycoprotein subunit of closely related serotypes of infectious bronchitis virus. *Avian Dis.* 21 : 33-43.
- Darminto, 1992. Serotyping of infectious bronchitis viral isolates. *Penyakit Hewan.* 24 (44): 76 - 81.
- Indriani, R dan Darminto. 2000. Variasi serotipe isolat virus infectious bronchitis yang berasal dari beberapa daerah di pulau Jawa. *J.Ilmu Ternak Vet.* 5 (4): 234 - 240.
- Kant, A., G. Koch, D.J.Van Roozelaar, J.G.Kusters, J.G.Poelwijk & B.A.M. van der Zeijst. 1992. Location of antigenic sites defined by neutralizing monoclonal antibodies on the S1 avian infectious bronchitis virus glycopolypeptide. *J.Gen.Virol.* 7: 591 - 596.
- Keeler, C.L., K.L. Reed, R.W. Nix, & J.G. Gelb. 1998. Serotype identification of avian infectious bronchitis virus by RT-PCR of peplomer (S-1) gene. *Avian Dis.* 42: 275-284.
- Kingham, B.F., C.L. Keeler, W.A. Nix, B.S. Ladman, & J. Gelb. 2000. Identification of avian infectious bronchitis virus by direct automated cycle sequencing of the S1-gen. *Avian Dis.* 44: 325 - 335.
- Koch. G., L.Hartog, A. Kant & D.J.van Roozelaar. 1990. Antigenic domain on the peplomer protein of avian infectious bronchitis virus : correlation with biological functions. *J.Gen.Virol.* 71 : 1929 - 1935.
- Niesters, H., P.N. Bleumink, A .Osterhaus, M.C .Horzinek & B.A.M. van der Zeijst. 1989. Epitopes on the peplomer protein of infectious bronchitis coronavirus M41 as defined by monoclonal antibodies. *Virology.* 161: 511-519.
- Naguchi, I., Y. Kato, & T. Tagizima. 1972. Final Report on preliminary investigation on poultry diseases in Indonesia, Jakarta.
- Ronohardjo, P. 1980. Infectious bronchitis pada ayam di Indonesia II. Penyebaran penyakit pada ayam trah dan ayam kampung. *Bulletin LPPH* 20 : 77-82.