

Pengembangan *Nested PCR* untuk Deteksi *Bovine herpesvirus-1* (BHV-1) pada Sediaan Usap Mukosa Hidung dan Semen asal Sapi

MUHARAM SAEPULOH¹, R.M. ABDUL ADJID¹, I. WAYAN T. WIBAWAN² dan DARMINTO¹

¹Balai Besar Penelitian Veteriner, PO Box 151 Bogor
e-mail:m.saeppulloh@digil.net.id

²Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor
Jl. Agatis Kampus IPB Darmaga Bogor-16680

(Diterima dewan redaksi 23 Februari 2008)

ABSTRACT

SAEPULLOH, M., R.M. ABDUL ADJID, I.W.T. WIBAWAN and DARMINTO. 2008. Development of a nested PCR for detection of *Bovine herpesvirus-1* (BHV-1) in bovine nasal secretion and semen. *JITV* 13(2): 155-164.

A nested polymerase chain reaction (nPCR) assay for detection of *Bovine herpesvirus-1* (BHV-1) in bovine semen and nasal secretions was successfully developed. The nested Polymerase Chain Reaction was based on external and internal primers from the viral gD glycoprotein gene. This nPCR assay was 1000-fold more sensitive than using PCR external primer. The nested PCR has a detection limit as low as 5 ag/μl pure BHV-1 DNA and 10^{0.75} TCID₅₀/500 μL BHV-1 infected cells. On the other hand, PCR using external primer had detection limit of about 5 fg/μl pure BHV-1 DNA. Specificity studies showed that nPCR could only detect BHV-1, whereas BHV-4, PRV, PI-3 and BRSV can not be detected. In addition, nPCR was also capable in detecting BHV-1 in nasal secretion samples from animal without clinical signs. A total of 405 samples consisted of 381 nasal secretion and 24 fresh semen samples have been tested with the nPCR. The result revealed that from 381 nasal secretion samples tested, 14 samples showed to be positive (3.68%), consisting of 13 out of 294 (4.42%) nasal secretion samples collected from Pangalengan West Java, and 1 out of 87 (1.54%) samples collected from Bogor. Furthermore, 2 out of 11 (18.18%) extended semen samples collected from Bogor and 2 out of 13 (15.38%) fresh semen samples collected from Pasuruan also showed to be positive. In addition, the nPCR was faster and easier to perform than the standard viral isolation test. It is concluded that, the nPCR can be used as test of choice for routine diagnosis of BHV-1.

Key Words: Nested PCR, BHV-1, Semen, Glycoprotein D Gene, TCID₅₀

ABSTRAK

SAEPULLOH, M., R.M. ABDUL ADJID, I.W.T. WIBAWAN dan DARMINTO. 2008. Pengembangan *nested PCR* untuk deteksi *Bovine herpesvirus-1* (BHV-1) pada sampel usap mukosa nasal dan semen asal sapi. *JITV* 13(2): 155-164.

Telah berhasil dikembangkan *nested Polymerase chain reaction* (nPCR) untuk mendeteksi keberadaan BHV-1 pada sediaan usap mukosa sapi dan semen. *Nested PCR* memanfaatkan primer eksternal dan internal yang berasal dari gen glikoprotein D (gD) dan hasilnya menunjukkan bahwa nPCR memiliki tingkat sensitivitas 1000 kali lebih tinggi dibandingkan dengan PCR yang hanya menggunakan primer eksternal. Sementara itu, limit deteksinya dapat mencapai hingga 5 ag/μl pada sampel DNA BHV-1 murni dan 10^{0.75} TCID₅₀/0,5 ml pada BHV-1 yang diinfeksi ke sel MDBK. Sedangkan dengan PCR biasa yang menggunakan primer eksternal hanya memiliki limit deteksi hingga 5 fg/μl pada DNA BHV-1 murni. Berdasarkan uji spesivitas, nPCR hanya mampu mendeteksi virus yang termasuk kelompok BHV-1, sedangkan kelompok virus BHV-4, PRV, PI-3 dan BRSV tidak dapat terdeteksi. Selanjutnya, nPCR yang dikembangkan ini telah berhasil mendeteksi BHV-1 pada sampel usap mukosa asal sapi yang secara klinis normal. Sebanyak 405 sampel yang terdiri dari 381 sediaan usap mukosa hidung dan 24 semen telah diuji dengan nPCR. Hasil menunjukkan bahwa dari 381 sediaan usap mukosa hidung terdeteksi positif 14 sampel (3,68%) yaitu 4,42% (13/294) dari Pangalengan dan 1,54% (1/87) dari Bogor. Sementara itu, untuk sampel semen beku (*extended semen*) hanya terdeteksi 18,18% (2/11) berasal dari Bogor dan 15,38% (2/13) semen cair (*fresh semen*) asal Pasuruan terdeteksi positif BHV-1 dengan nPCR. *Nested PCR* yang dikembangkan ini memiliki tingkat sensitivitas yang tinggi, cepat dan mudah pengerjaannya dibandingkan dengan isolasi virus yang merupakan metode standar. Oleh karena itu, nPCR merupakan uji yang paling sensitif untuk mendeteksi BHV-1 pada sediaan usap mukosa dan semen sapi, sehingga akan sangat ideal digunakan untuk diagnosa rutin.

Kata Kunci: Nested PCR, BHV-1, Semen, Gen Glikoprotein D, TCID₅₀

PENDAHULUAN

Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR) merupakan penyakit yang sangat infeksius dan disebabkan oleh *Bovine herpesvirus-1* (BHV-1). Virus ini dapat menimbulkan gejala klinis seperti infeksi pustular vulvovaginalis pada sapi betina atau balanoposthitis pada sapi jantan, konjungtivitis, ensefalitis dan infeksi sistemik lainnya (KAHRS, 1977; STRAUB, 1991). Infeksi pada sapi dewasa dapat menyebabkan penurunan produksi susu, menurunnya tingkat fertilitas, dan keguguran (MILLER, 1991).

Berdasarkan gejala klinisnya, BHV-1 terbagi menjadi 2 subtipe, yaitu subtipe 1 yang berhubungan dengan galur yang dapat menyebabkan penyakit gangguan pemapasan (*infectious bovine rhinotracheitis*, IBR), sedangkan subtipe 2 adalah galur yang dapat menyebabkan penyakit genital seperti *infectious pustular vulvovaginalis* (IPV) dan *infectious pustular balanoposthitis* (IPB) (RADOSTITS *et al.*, 2000). Sebagaimana umumnya *Alpha herpesvirus*, BHV-1 menyebabkan infeksi laten (VAN OIRSCHOT *et al.*, 1993). Setelah infeksi, BHV-1 akan menyebar dari infeksi lokal ke sistem syaraf melalui sel syaraf tepi mencapai ganglia trigeminal dan lumbosakral dan menetap dalam keadaan laten (ACKERMANN dan WYLER, 1984). Selain sistem syaraf, limfoglandula dan mukosa hidung juga dinyatakan sebagai tempat virus laten (ENGELS dan ACKERMANN, 1996). Hewan yang terinfeksi secara laten bertindak sebagai pembawa virus (*carrier*) dan merupakan sumber penyebaran penyakit (ROLA *et al.*, 2003). Reaktivasi infeksi akan terjadi pada saat transportasi, cuaca yang dingin, populasi ternak yang padat, pemberian obat *corticosteroid*, infeksi sekunder oleh mikroorganisma yang patogen atau ternak dalam keadaan tercekam. Virus yang telah terreaktivasi disebarkan melalui *axon* dan dibawa kembali ke syaraf tepi dan menyebar ke tempat semula dimana pertama kali virus masuk (THIRY *et al.*, 1987). Reaktivasi virus menyebabkan virus terdedah (*shedding*), tetapi kondisi ternak tetap tidak menunjukkan gejala klinis (BITSCH, 1978). Secara umum, BHV-1 disekresikan dalam konsentrasi yang jauh lebih tinggi pada saat fase infeksi awal dibandingkan fase akhir ketika terjadi *shedding* (BITSCH, 1973). Virus disekresikan melalui sekreta hidung dan mata, cairan plasenta ternak sapi yang keguguran serta semen (ROLA *et al.*, 2005). Tanggap kebal lokal terlampau lemah untuk mencegah virus *shedding* secara menyeluruh, tergantung kepada waktu infeksi dan reaktivasi. Oleh karena itu, dalam kondisi ini mungkin diperlukan vaksinasi terhadap hewan untuk mencegah terjadinya transmisi virus.

Peranan infeksi laten sangat penting terutama bagi sapi pejantan bibit, karena sapi tersebut dapat mengeluarkan virus yang bereplikasi pada mukosa

hidung, mata dan alat genital baik jantan maupun betina. Semen pada umumnya lebih sering terkontaminasi oleh virus yang berasal dari mukosa penis atau praeputium pada saat ejakulasi dibandingkan dengan virus yang diproduksi pada testis, epididimis atau glandula asesoris genital lainnya (SNOWDOWN, 1965). Dengan menggunakan semen yang berasal dari sapi pejantan yang terinfeksi BHV-1 untuk inseminasi buatan, maka akan beresiko terjadinya penularan BHV-1 kepada sapi betina (PHILPOTT, 1993). Untuk mengeliminasi masalah ini, maka harus menggunakan semen yang bebas BHV-1.

Berdasarkan OIE (2004) untuk mendeteksi BHV-1 digunakan metode isolasi virus yang menggunakan sel lestari *Madin Darby Bovine Kidney* (MDBK) sebagai *gold standard* pengujian. Sedangkan untuk deteksi DNA pada kejadian infeksi laten digunakan teknik PCR. Sementara itu, untuk uji serologis digunakan teknik serum netralisasi (SN), dan *Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay* (ELISA). Untuk mengisolasi virus dari sampel semen dengan metode isolasi virus, selain memerlukan waktu yang lama juga seringkali semen toksik terhadap sel kultur, sehingga diperlukan pengenceran semen sebelum dilakukan pengujian untuk menghilangkan toksisitas dan faktor penghambat (*inhibitory factor*) lainnya (XIA *et al.*, 1995) yang akan meningkatkan sensitivitas isolasi virus. Selain itu, pengenceran sampel dapat mengakibatkan hasil negatif palsu (*false negative*) ketika konsentrasi virus rendah. Menurut DEKA *et al.* (2005) bahwa dengan teknik PCR sapi yang sehat dan yang memiliki sero-negatif terhadap BHV-1 dapat terdeteksi positif agen virus penyebab penyakit IBR pada sampel semen. Dengan demikian, pejantan bibit yang memiliki status sero-negatif pada serumnya, masih bisa menyebarkan virus melalui semen.

Tujuan penelitian ini adalah pengembangan teknik *nested Polymerase Chain Reaction* (nPCR) untuk mendeteksi agen virus penyebab penyakit IBR pada ternak bibit dan semen.

MATERI DAN METODE

Virus

Virus IBR (*Bovine herpesvirus-1*, BHV-1) yang digunakan sebagai kontrol positif berasal dari galur Colorado dan diperoleh dari *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville Maryland, USA). Virus IBR tersebut telah beradaptasi dan tumbuh pada sel *Madin Darby Bovine Kidney* (MDBK). Sedangkan untuk uji spesivitas digunakan *Bovine herpesvirus type 4* (BHV-4) (UK Strain), *Suid herpesvirus type 1* (*Pseudorabies*, PRV), *Para Influenza type 3* (PI-3), *Bovine Respiratory Syncytial Virus* (BRSV), serta isolat

BHV-1 (SF1027485/Jatim/07; SF1029972/Jatim/07; N30718/Jabar/07; dan V305172/ Jabar/07).

Koleksi dan perlakuan sampel

Sebanyak 405 sampel dari berbagai jenis sapi yang terdiri dari sampel usap mukosa hidung (294 sampel dari Pengalengan Jawa Barat dikoleksi bulan Desember 2007, dan 87 sampel dari Bogor dikoleksi bulan oktober 2007), 13 sampel semen cair asal Pasuruan dikoleksi bulan Desember 2007, 11 sampel semen beku (5 sampel dari KPBS Pengalengan dikoleksi bulan Desember 2007 dan 6 sampel dari Bogor dikoleksi bulan Oktober 2007). Sampel usap mukosa hidung diambil menggunakan kapas bertangkai (*cotton swab*) steril yang kemudian sampel dimasukkan ke dalam media transpor (media DMEM yang dilengkapi dengan 10.000 IU/ml Penisilin, 10.000 µg/ml Streptomisin, 250 µg/ml Fungison dan 2% *foetal bovine serum*). Sementara itu, sampel semen cair diambil secara langsung pada saat pengkoleksian semen. Semua sampel disimpan pada suhu 4°C sebelum sampai ke laboratorium.

Di laboratorium, sampel usap mukosa hidung dikocok dengan vortek untuk melepaskan virus yang menempel pada kapas bertangkai dan kemudian dibiarkan pada suhu ruang selama 30 menit. Kapas bertangkai dibuang, kemudian sampel disentrifugasi 1.500 x g selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan dibuang dan endapannya kemudian dibuat suspensi 10% dengan penambahan media transpor. Suspensi tersebut siap diekstraksi DNA untuk PCR atau disimpan pada suhu -80°C sebelum dilakukan pengujian. Sementara itu, untuk sampel semen cair dan beku dapat langsung disimpan pada suhu -80°C setelah sampai di laboratorium.

Ekstraksi DNA

Perlakuan ekstraksi sampel semen berdasarkan metode ROLA *et al.* (2003) yaitu 200 µl plasma semen dimasukkan ke dalam *ependorf* 1,5 ml kemudian ditambahkan 2 µl Proteinase K (25 mg/ml) (Sigma) dan 25 µl 10% *Sodium dodecyl sulphate* (SDS) (Sigma). Campuran semen-proteinase-K diaduk hingga homogen kemudian diinkubasikan pada suhu 50°C selama 2-3 jam. Ditambahkan ke dalam campuran tersebut larutan Fenol : Kloroform : Isoamil alkohol (25 : 24 : 1) (Sigma) dengan perbandingan sama banyak dan dikocok hingga homogen kemudian disentrifugasi 12.000 x g selama 5 menit. Fase bagian atas diambil dan dipindahkan kedalam tabung *ependorf* 1,5 ml steril, kemudian ditambahkan sebanyak 2,5 bagian alkohol 96% dan 1/10 bagian 3 M Natrium asetat pH 5,2 (Sigma). Setelah tabung dikocok, kemudian diinkubasikan selama semalam pada suhu -20°C atau -70°C selama 60 menit. Kemudian disentrifugasi pada

12.000 x g suhu 4°C selama 15 menit. Supernatan dibuang dan DNA yang berupa endapan dicuci dengan 500 µl alkohol 70% (dingin), sentrifugasi 12.000 x g suhu 4°C selama 15 menit. Alkohol dibuang dan endapan (DNA) dikeringkan di udara terbuka dan dilarutkan dengan dH₂O sebanyak 50 µl. Konsentrasi DNA diukur dengan Spektrofotometer (NanoDrop, ND 1000) dan kemudian diatur konsentrasinya menjadi 10 ng/µl. Bila tidak segera digunakan untuk reaksi PCR, maka DNA dapat disimpan pada suhu -20°C atau untuk waktu yang lama disimpan di -70°C.

Ekstraksi DNA virus IBR galur colorado yang ditumbuhkan pada sel MDBK dikerjakan berdasarkan prosedur FRANCO *et al.* (2002) sebagai berikut: setelah virus IBR diinfeksi pada sel MDBK selama 36 jam atau setelah timbul CPE 90-100%, maka supernatan disentrifugasi 5.000 x g selama 20 menit untuk mengendapkan sel. Kemudian supernatan dipisahkan dengan sentrifugasi pada 100.000 x g selama 2 jam pada suhu 4°C. Pellet virus kemudian diresuspensikan dengan penambahan TE pH 7,4 (Tris 10mM dan EDTA 1 mM) dan diberi perlakuan dengan penambahan SDS dan proteinase-K (konsentrasi akhir masing-masing 1% dan 100 µg/ml) selama 1 jam pada suhu 37°C. Selanjutnya virus DNA di ekstraksi dengan menggunakan Fenol : Kloroform : Isoamil alkohol (25:24:1) (Sigma), diendapkan dengan alkohol, dan akhirnya diresuspensikan dengan menggunakan TE pH 7,4. Konsentrasi DNA diukur dengan menggunakan spektrofotometer (NanoDrop, ND 1000) dan DNA disimpan pada suhu -20°C sampai sampel siap di uji dengan PCR.

Primer dan Amplifikasi DNA.

Primer yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 2 pasang primer glikoprotein D (gD) yang memiliki proses amplifikasi DNA yang berbeda untuk masing-masing primer, yaitu:

Primer eksternal dan internal gD BHV-1

Penggunaan primer ini berdasarkan prosedur ROLA *et al.* (2005) yaitu primer gD BHV-1 Eksternal: gD1 (Lokasi 351-368) 5'-GCT GTG GGA AGC GGT ACG-3', dan gD2 (lokasi 817-796) 5'-GTC GAC TAT GGC CTT GTG TGC-3', primer internal :gDN1 (lokasi 394-422) 5'-ACG GTC ATA TGG TAC AAG ATC GAG AGC G-3', dan gDN2 (lokasi 716-696) 5'-CCA AAG GTG TAC CCG CGA GCC-3'. Primer eksternal dan internal gena gD BHV-1 berturut turut menghasilkan fragmen 468bp dan 325bp.

Campuran reaksi PCR (*PCR Mix*) terdiri dari 5 µl 10x DNA polymerase buffer (Sigma), 2 µl 10 mM campuran dNTP (Sigma), 1 µl 5 mM masing-masing

primer (Invitrogen), dan 2,5 μ l *thermo-stable* RED Taq™ DNA Polymerase (Sigma), dan 5 μ L DNA (10 pg/ μ l). Campuran reaksi tersebut kemudian ditambah dengan air deionisasi (dH₂O) sehingga menjadi total volume 50 μ l. Proses amplikasi DNA untuk primer eksternal dan internal menggunakan dua metode, yaitu sebagai berikut:

1. **Metode-1:** sesuai dengan prosedur ROLA *et al.* (2005) dimana amplifikasi primer eksternal dan internal adalah sama, yaitu: masing-masing siklus terdiri dari denaturasi 95°C selama 1 menit, pelekatan (*annealing*) primer pada suhu 60°C selama 1 menit dan elongasi pada suhu 72°C selama 1 menit. Total siklus 35 putaran, dan diakhiri dengan elongasi terakhir pada suhu 72°C selama 10 menit. Pada saat proses amplifikasi dengan primer internal, maka 1 μ l produk PCR pertama diambil dan diamplifikasi dengan primer internal. Proses amplifikasi menggunakan GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystem).
2. **Metode-2:** merupakan hasil modifikasi metode-1 yang disesuaikan dengan keadaan primer yang digunakan, terutama dengan melihat sifat *melting temperatur* (*T_m*) dari kedua pasangan primer tersebut. Mengingat primer eksternal memiliki *T_m* pada suhu 63°C dan *T_m* primer internal pada suhu 70°C, sehingga memungkinkan suhu pelekatan (*annealing temperatur*, *T_a*) pada amplifikasi pertama dengan primer eksternal pada suhu 60°C dan modifikasi dilakukan pada saat amplifikasi kedua dengan primer internal yaitu pada suhu 65°C. Sementara itu, total siklus untuk masing-masing primer sama dengan metode-1.

Analisa produk PCR

Produk PCR dianalisa dengan 2% agarose gel (invitrogen) yang mengandung *Ethidium Bromide* (EtBr 1%). Elektroforesis dilakukan pada voltase konstan yaitu 100 volt dalam TBE buffer (Invitrogen) selama 1 jam. Hasil PCR dinyatakan positif apabila terlihat adanya produk yang spesifik dari primer gD yang menghasilkan fragmen 468bp (eksternal primer) dan 325 bp (internal primer).

Perbandingan sensitivitas PCR metode 1 dan 2

Untuk menentukan tingkat sensitivitas PCR dalam mendeteksi virus IBR, maka pengujian dilakukan terhadap perlakuan pengenceran kandungan DNA virus IBR rujukan galur Colorado yang telah diekstraksi seperti di atas, kemudian ditetapkan konsentrasinya dengan menggunakan Spektrofotometer (NanoDrop, ND 1000). Konsentrasi DNA diatur menjadi 500 pg/ μ l, sehingga diperoleh konsentrasi akhir

dalam reaksi PCR sebesar 50 pg/ μ l. DNA virus ini kemudian dijadikan enceran secara seri dengan kelipatan 10 mulai dari 50 pg/ μ l (piko gram/ μ l) sampai dengan 0,005 ag/ μ l (alto gram/ μ l). Selain itu, dilakukan pula pengenceran secara seri kelipatan 10 terhadap virus referen IBR galur Colorado yang telah diketahui titernya, yaitu mulai dari 10^{7,75} TCID₅₀/500 μ l hingga 10^{0,0075} TCID₅₀/500 μ l. Selanjutnya, terhadap setiap enceran virus/DNA diuji dengan *nPCR* menggunakan primer eksternal dan internal pada metode 1 dan 2.

Spesivitas PCR

Untuk mengetahui tingkat spesivitas metode *nPCR*, maka dilakukan pendeteksian terhadap sejumlah virus baik yang termasuk kedalam kelompok *herpesvirus* yaitu BHV-4 dan PRV maupun kelompok virus yang dapat menyebabkan penyakit gangguan pernapasan pada sapi yaitu PI-3 dan BRVS. Sebagai kontrol positif maka disertakan virus BHV-1 rujukan (galur Colorado dan V-155) serta isolat BHV-1 (SF1027485/Jatim/07; SF1029972/Jatim/07; N30718/Jabar/07; dan V305172/Jabar/07) yang telah dikarakterisasi dan termasuk kedalam kelompok BHV-1 (SAEPULLOH, *unpublished data*).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sensitivitas PCR

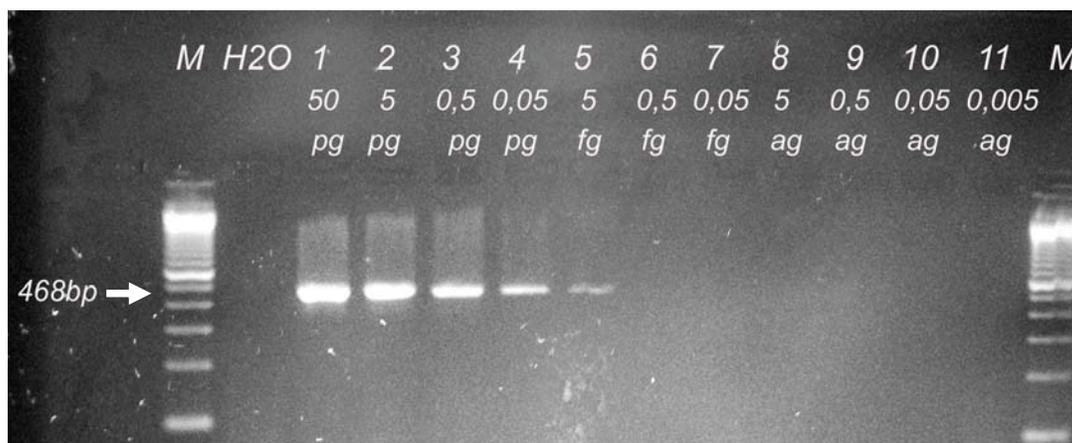
Nested PCR metode-1

Hasil uji PCR menggunakan metode 1 dalam mendeteksi virus IBR galur Colorado ditampilkan pada Gambar 1. Pada metode ini, digunakan dua pasang primer, yaitu sepasang primer eksternal (gD1/gD2) dan sepasang primer internal (gDN1/gDN2). Primer eksternal menghasilkan produk PCR 468bp, sedangkan pasangan primer eksternal menghasilkan produk PCR 325bp.

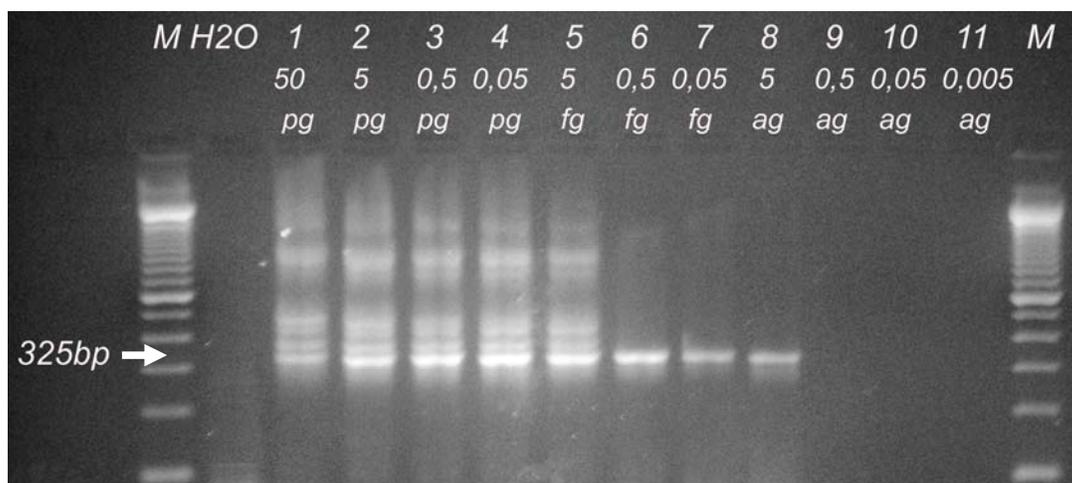
Dari Gambar 1 menunjukkan bahwa tingkat sensitivitas PCR menggunakan pasangan primer eksternal hanya memiliki kemampuan mendeteksi DNA virus IBR galur Colorado hingga 5 fg/ μ l. Sementara itu dengan menggunakan primer internal, mampu mendeteksi hingga 5 ag/ μ l. Dengan demikian tingkat sensitivitas primer internal 1000 kali lebih tinggi dibandingkan dengan hanya menggunakan primer eksternal. Hal tersebut cukup dimengerti, mengingat sebelum digunakan primer internal, maka DNA diamplifikasi terlebih dahulu dengan menggunakan primer eksternal, kemudian produk PCR dari primer eksternal diamplifikasi kembali dengan menggunakan primer internal atau lebih dikenal sebagai *nested PCR* (*nPCR*). Pemakaian *nPCR* ini sangat bermanfaat

manakala konsentrasi virus dalam sampel tidak mencukupi untuk dideteksi dengan PCR yang menggunakan primer eksternal saja. Dengan primer eksternal, DNA akan diamplifikasi, walaupun secara visualisasi dengan elektroforesis tidak akan tampak karena konsentrasi DNA hasil amplifikasi pertama (primer eksternal) tidak mencukupi untuk dideteksi dengan agarose (elektroforesis). Oleh karena itu diperlukan re-amplifikasi DNA dengan menggunakan primer internal yang menghasilkan pelipat gandaan jumlah DNA. Dengan demikian, maka pada sampel yang mengandung virus IBR dan dengan konsentrasi sedikit dapat terdeteksi dengan *n*PCR.

Dari hasil *n*PCR diperoleh pita tambahan pada 600 – 800 bp yang merupakan produk yang non spesifik terutama apabila konsentrasi DNA ≥ 5 fg/ μ l. Hasil tersebut tidak akan mengganggu interpretasi hasil dan bahkan dapat dijadikan sebagai acuan apabila konsentrasi DNA ≥ 5 fg/ μ l dan akan dihasilkan pita seperti yang ditampilkan pada gambar 1.B (Lajur 1-5). Konsentrasi DNA yang optimal agar diperoleh hasil pita tunggal yaitu apabila dalam sampel terkandung 0,5 fg/ μ l (konsentrasi akhir dalam reaksi PCR) atau 5 fg/ μ l (konsentrasi DNA pada sampel awal). Diperolehnya tambahan pita 600 – 800 bp atau pita di luar target primer (325bp) yang merupakan produk non-spesifik



Gambar 1A. Sensitivitas PCR metode-1 dengan menggunakan primer eksternal gD1/gD2



Gambar 1B. Sensitivitas PCR metode-1 dengan menggunakan primer internal gDN1/gDN2

Keterangan: (A) PCR dengan menggunakan primer eksternal memiliki kemampuan mendeteksi DNA virus IBR hingga 5 fg/ μ l
 (B) *Nested* PCR dengan menggunakan primer eksternal dan internal mampu mendeteksi DNA virus IBR hingga 5 ag/ μ l

juga pernah dilaporkan oleh WIEDMANN *et al.* (1993) pada nested PCR yakni bila konsentrasi DNA diatas 5 fg/ μ l. Akan tetapi, apabila konsentrasi diatur menjadi 0,5 fg/ μ l (konsentrasi akhir) maka pita tidak akan terdeteksi pada amplifikasi pertama dengan menggunakan primer eksternal dan pita hanya akan muncul pada nPCR saja. Oleh karena itu, uji sensitivitas PCR ini sangat penting dilakukan sebelum melakukan pengujian terhadap sampel lapang. Hal ini penting karena akan menjadi suatu acuan bahwa terdapatnya tambahan pita diluar target, bukan berarti sampel tersebut negatif, selama pita spesifik (325 bp) yang merupakan target primer internal tervisualisasikan.

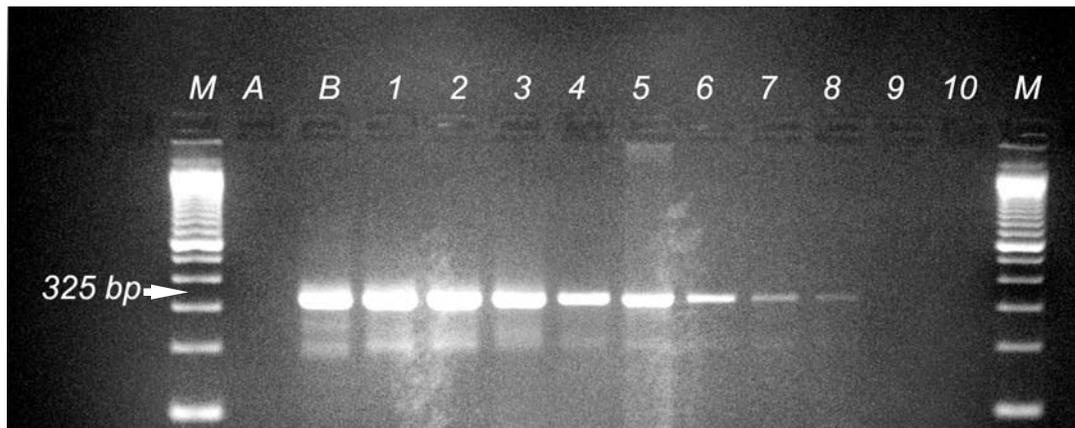
Nested PCR metode-2

Dengan memanfaatkan prinsip perbedaan *melting temperatur* (T_m) dari kedua pasangan primer tersebut, maka pasangan primer pertama (gD1/gD2 eksternal) memiliki T_m pada suhu 63°C dan pasangan primer kedua (gDN1/gDN2 internal) sekitar suhu 70°C. Perbedaan ini memungkinkan dapat meningkatkan suhu pelekatan primer (*annealing temperature*) setelah 35 putaran pertama pada suhu 60°C dan suhu 65°C untuk 35 putaran berikutnya. Hasil uji sensitivitas dengan menggunakan nPCR metode-2 ditampilkan pada Gambar 2.

Spesivitas PCR

Hasil uji spesivitas menunjukkan bahwa primer gD yang digunakan dalam nPCR adalah spesifik hanya dapat mendeteksi virus BHV-1 rujukan (BHV-1.1 galur Colorado dan BHV-1.2 galur V-155) dan isolat BHV-1 (SF1027485/Jatim/07; SF1029972/ Jatim/07; N307185/ Jabar/07; dan V305172/Jabar/ 07) dan tidak terjadi hibridisasi silang (*Cross-hybridization*) dengan virus kelompok *herpes* (BHV-4 dan PRV) juga dengan kelompok virus penyebab gangguan pernapasan pada sapi (PI-3 dan BRSV) (Gambar 3). Hasil tersebut mendukung penelitian terdahulu yang dilakukan oleh ZHOU *et al.* (1999) bahwa gD primer spesifik bagi semua kelompok BHV-1 (BHV-1.1 dan BHV-1.2) dan merupakan *conserved* untuk semua galur virus yang termasuk kedalam BHV-1.

Pemakaian nPCR telah banyak digunakan dalam mendeteksi *herpesvirus* diantaranya: pendeteksian agen penyebab MCF pada sampel usapan mukosa hidung (WIYONO *et al.*, 1994; 1995) yang menggunakan sepasang primer eksternal (755/556) dan sepasang primer internal (555/556), pendeteksian agen penyebab BHV-1 pada sampel semen (WIEDMAN *et al.*, 1993), pendeteksian BHV-1 dari kasus outbreak IBR (ROLA *et al.*, 2005) dan pendeteksian BHV-1 berasal dari semen yang terinfeksi secara alami (ROLA *et al.*, 2003). Sementara itu, nPCR untuk mendeteksi agen virus penyebab penyakit IBR merupakan metode yang baru pertama kali diaplikasikan di Indonesia.

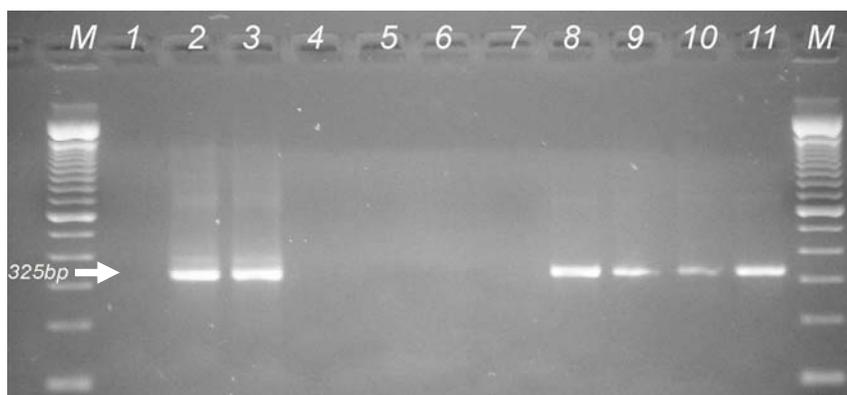


Gambar 2. Sensitivitas PCR metode-2 menggunakan titer virus (TCID₅₀/0,5 ml)

Keterangan:

1. $10^{7,75}$	6. $10^{2,75}$
2. $10^{6,75}$	7. $10^{1,75}$
3. $10^{5,75}$	8. $10^{0,75}$
4. $10^{4,75}$	9. $10^{-0,25}$
5. $10^{3,75}$	10. $10^{-1,25}$

M) standar molekul 100bp
 A) kontrol negatif (dH₂O)
 B) kontrol positif IBR galur Colorado



Gambar 3. Uji spesivitas *nPCR*

**Keterangan:
lajur**

- | | |
|---------------------------|------------------------------|
| 1) kontrol negatif (dH2O) | 7) BRSV |
| 2) BHV-1.1 galur Colorado | 8) isolat SF1027485/Jatim/07 |
| 3) BHV-1.2 galur V-155 | 9) isolat SF1029972/Jatim/07 |
| 4) BHV-4 | 10) isolat N30718/Jabar/07 |
| 5) PRV | 11) isolat V305172/Jabar/07 |
| 6) PI-3 | |
| M) standar molekul 100 bp | |

Aplikasi *nested* PCR metode-2 untuk deteksi agen virus penyebab IBR pada sampel usap mukosa hidung dan semen

Dari 381 sampel usap mukosa hidung, terdeteksi positif IBR sebanyak 14 sampel (3,68%) yaitu terdiri dari 4,42% (13/294) dari Bandung dan 1,54% (1/87) dari Bogor. Sementara itu, dari 25 semen (semen cair dan beku) terdeteksi positif IBR 4 sampel (16,00%), yaitu 18,18% (2/11) semen beku (*extended semen*) berasal dari Bogor dan Bandung, sedangkan untuk sampel semen cair (*fresh semen*) terdeteksi 14,29% (2/14) asal sapi PO dari Pasuruan. Sampel yang terdeteksi positif BHV-1 dengan *nPCR* metode-2 disajikan pada Tabel 1 dan 2 serta Gambar 4.

Dari 294 sampel usap mukosa hidung sapi asal Bandung, terdapat 31 sampel asal sapi perah yang pernah divaksinasi dengan vaksin inaktif pada tahun 2005 yaitu di lokasi Desa Wanasuka Kecamatan Pengalengan. Dari ke-31 ekor sapi tersebut hanya 1 ekor terdeteksi positif PCR. Sementara itu, dari lokasi lainnya (Desa Margamulya, Desa Tribaktimulya dan Desa Margamukti) sebanyak 281 sampel usap mukosa hidung asal sapi perah yang belum pernah divaksinasi dan terdeteksi positif 12 sampel dengan *nPCR*.

Sementara itu, dari 87 sampel asal Bogor, sebanyak 27 ekor pernah divaksinasi dengan vaksin *Combine* IBR Inaktif (BVD, PI3 dan IBR) produk Fort Dodge (*Triangle 4*) sebelum sapi tersebut dikirim ke Indonesia dari Australia. Ke-27 ekor sapi tersebut semuanya negatif BHV-1 dengan uji *nPCR* walaupun berdasarkan

uji serologik 96,29% (26/27) menunjukkan sero-positif dengan uji serum neutralisasi (SAEPULLOH, *unpublished data*). Sedangkan sisanya yaitu 60 ekor belum pernah divaksinasi dan terdeteksi 1 ekor positif BHV-1 dengan *nPCR*.

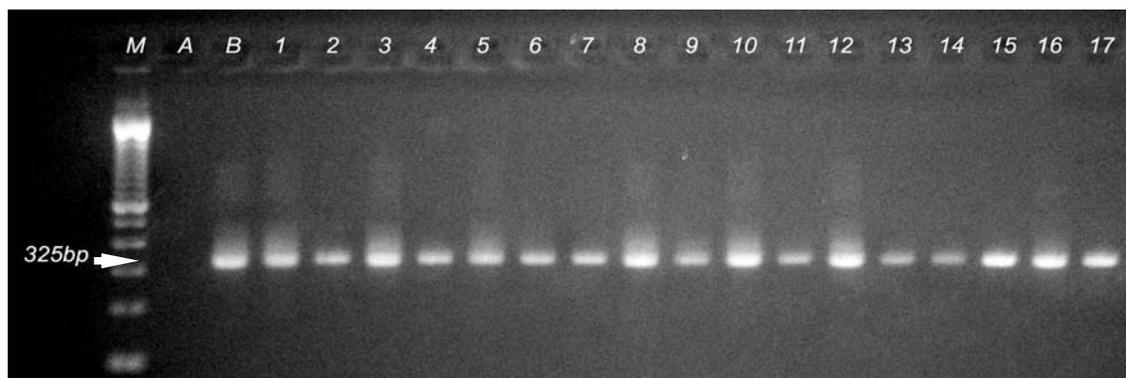
Tidak terdeteksinya BHV-1 (IBR) pada hewan yang telah divaksinasi di Desa Wanasuka kemungkinan karena: (1) vaksin yang digunakan adalah vaksin inaktif; (2) vaksinasi terhadap hewan tersebut telah lama dilakukan, yaitu sekitar tahun 2005 sehingga tidak terjadi ekskresi virus dan mungkin saja virus telah menetap dalam keadaan laten. Sebagaimana dilaporkan SMITS *et al.* (2000) bahwa ekskresi virus pada hewan yang diinfeksi secara buatan akan terdeteksi dengan PCR mulai hari ke-2 hingga ke-37 pasca infeksi (p.i) dan hari berikutnya akan diperoleh hasil PCR negatif. Akan tetapi bila diberi perlakuan dengan *dexamethazone* setelah hasil negatif (38 hari p.i) maka terjadi reaktivasi virus dan tersekresikan sehingga dapat terdeteksi positif dengan PCR hingga 104 hari p.i.; (3) vaksinasi dengan vaksin inaktif akan mencegah terjadinya ekskresi virus, akan tetapi virus asal vaksin tersebut tetap akan mengakibatkan infeksi laten yang menetap di trigeminal ganglia. Hal tersebut sebagaimana dilaporkan MUYLKENS *et al.* (2007) bahwa pemakaian vaksin inaktif dapat menghambat re-ekskresi virus pada saat terjadinya reaktivasi dari infeksi laten dibandingkan dengan pemakaian vaksin hidup. Oleh karena itu, vaksinasi harus dilakukan setiap 6 bulan sekali dalam rangka untuk menurunkan resiko

Tabel 1. Hasil pemeriksaan PCR terhadap sediaan usap mukosa hidung asal hewan yang secara klinis normal

Asal sampel	Jenis sampel	Jenis hewan	Jumlah sampel	Hasil uji PCR	
				Positif	Negatif
Bandung	Usap mukosa hidung	FH	294	13	281
Bogor	Usap mukosa hidung	FH	65	1	64
		Angus	3	0	3
		Limousin	7	0	7
		Simmental	11	0	11
		Brangus	1	0	1
Total			381	14	367
				(3,68%)	

Tabel 2. Hasil pemeriksaan PCR terhadap semen cair dan beku asal hewan yang secara klinis normal

Asal sampel	Jenis sampel	Jenis hewan	Jumlah sampel	Hasil uji PCR	
				Positif	Negatif
Bandung	Semen beku	FH	5	0	5
Bogor	Semen beku	FH	2	2	0
		Simmental	1	0	1
		Limousin	1	0	1
		Sapi Bali	1	0	1
		Angus	1	0	1
Pasuruan	Semen cair	PO	14	2	12
Total			25	4	21
				(16,00%)	



Gambar 4. Hasil deteksi BHV-1 (IBR) pada sampel usap mukosa dan semen

Keterangan: 1) sampai 14) usap mukosa hidung dan 15) sampai 17) semen

Lajur M) standar molekul 100bp; A) kontrol negatif (dH₂O)

B) Kontrol positif (virus IBR galur Colorado)

terhadap re-ekskresi virus; dan (4) tidak ada korelasi antara status antibodi dengan sekresi virus. Hal tersebut telah dibuktikan oleh ROLA *et al.* (2005) yang mengambil 24 sampel sera dan 24 sampel usap mukosa hidung asal sapi perah yang sama pada wabah penyakit IBR di Pulawy, Polandia. Dari sampel yang dikoleksi diperoleh 24 sampel positif antibodi, 1 positif dengan isolasi virus, dan 11 positif terdeteksi genom DNA virus pada usap mukosa hidung dengan PCR.

Demikian pula halnya dengan hewan asal Bogor yang pernah divaksinasi dengan vaksin IBR inaktif. Kemungkinan virus asal vaksin masih menetap dalam trigeminal ganglia sebagai infeksi laten, sehingga tidak ada virus yang tersekresikan. Virus baru akan terekskresi melalui sekreta hidung, vagina dan mata apabila hewan tersebut mendapat cekaman (*stress*), dan pada saat inilah kemungkinan besar virus akan terdeteksi positif dengan *nPCR*.

KESIMPULAN

Teknik PCR yang dikembangkan di BBalitvet dengan memanfaatkan primer gena Glikoprotein D (gD) yang merupakan *conserved* terhadap semua BHV-1, berhasil mendeteksi agen virus penyebab penyakit IBR yang berasal dari sediaan usap mukosa hidung asal sapi yang tidak menunjukkan gejala klinis/normal penyakit IBR. Disamping dapat mendeteksi virus IBR dalam sediaan usap mukosa hidung, pengembangan teknik PCR ini telah berhasil pula dalam mendeteksi BHV-1 pada semen beku (*extended semen*) maupun cair (*fresh semen*).

Dalam pendeteksian agen virus penyebab penyakit IBR tidak dapat digunakan metode PCR biasa (hanya menggunakan sepasang primer eksternal saja), akan tetapi harus dipadukan dengan pemakaian sepasang primer internal atau yang dikenal sebagai *nested PCR*. Kedua metode PCR yang telah dikembangkan tersebut dapat digunakan untuk pemeriksaan sampel secara rutin karena keduanya memiliki tingkat sensitivitas yang cukup tinggi bila dibandingkan dengan PCR biasa. Metode *nested PCR* merupakan metode yang lebih baik dan lebih sensitif bila dibandingkan dengan PCR biasa.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Ir. Endang Romjali, M.Sc., Ph.D., Drs. Lukman Affandhy, dan Drh. Dicky Dikman dari Loka Penelitian Sapi Potong Grati; serta Drh. Hasan Mardijono dan Drh. Maidaswar, M.Si dari Balai Embryo Ternak, Cipelang Bogor yang telah membantu kelancaran penelitian ini, serta teknisi Virologi saudara Pudji Kurniadi dan Mansur atas bantuan teknis baik di Lapang maupun di

Laboratorium. Penelitian ini dibiayai oleh Proyek APBN Tahun Anggaran 2007, Badan Litbang Pertanian, Departemen Pertanian.

DAFTAR PUSTAKA

- ACKERMANN, M. and R. WYLER. 1984. The DNA of an IPV strain of bovine herpesvirus 1 in sacral ganglia during latency after intravaginal infection. *Vet. Microbiol.* 9:53-63.
- BITSCH, V. 1973. Infectious bovine rhinotracheitis virus infection in bull, with special reference to preputial infection. *Appl. Microbiol.* 26: 337-343.
- BITSCH, V. 1978. Persistence of infection with infectious bovine rhinotracheitis virus in Danish cattle herds. *Nord. Vet. Med.* 30: 178-185.
- DEKA, D., N.K. RAMNEEK, MAITI and M.S. OBEROI. 2005. Detection of bovine herpesvirus-1 infection in breeding bull semen by virus isolation and polymerase chain reaction. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 24: 1085-1094.
- ENGELS, M. and M. ACKERMANN. 1996. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infection. *Vet. Microbiol.* 53: 3-15.
- KAHRS, R.F. 1977. Infectious Bovine Rhinotracheitis: a review and update. *J. Am. Vet. Assoc.* 171: 1055-1064.
- FRANCO, A.C., F.A.M. RIJSEWIJK, E.F. FLORES, R. WEIBLEN and P.M. ROEHE. 2002. Construction and characterization of a glycoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus type 1.2 galur isolated in Brazil. *Brazil J. Microbiol.* 33: 274-278.
- MILLER, J.M. 1991. The effect of IBR virus infections on reproductive function of cattle. *Vet. Med.* 86: 95-98.
- MUYLKENS, B., J. THIRY, P. KIRTEN, S. SCHYNTS and E. THIRY. 2007. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. *Vet. Res.* 38: 181-209.
- OIE. (Office International des Epizooties). 2004. Infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustula vulvovaginitis. *In: Manual of Diagnostic Test and Vaccine for terrestrial Animals.* Chapter 2.3.5.
- PHILPOTT, M. 1993. The dangers of disease transmission by artificial insemination and embryo transfer. *Br. Vet. J.* 149: 339-370.
- RADOSTITS, O.M., C.C. GAY, D.C. BLOOD and K.W. HINCHLIFF. 2000. *Veterinary Medicine: A textbook of the disease of cattle, sheep, pigs, goats and horses*, 9th. W.B. Saunders Company Ltd. Pp. 1173-1184.
- ROCHA, M.A., E.F. BARBOSA, S.E.F. GUIMARAES, E.D. NETO and A.M.G. GOUVEA. 1998. A high sensitivity-nested PCR assay for BHV-1 detection in semen of naturally infected bulls. *Vet. Microbiol.* 63: 1-11.
- ROLA, J., M.P. POLAK and J.F. ZMUDZINSKI. 2003. Amplification of DNA of BHV-1 isolated from semen

- of naturally infected bulls. *Bull. Vet. Inst. Pulawy.* 47: 71-75.
- ROLA, J., M. LARSKA and M.P. POLAK. 2005. Detection of bovine herpesvirus-1 from an outbreak of infectious bovine rhinotracheitis. *Bull. Vet. Inst. Pulawy.* 49: 267-271.
- SMITS, C.B., C. VAN MAANEN, R.D. GLAS, A.L.W. DE GEE, T. DIJKSTRAB, J.T. VAN OIRSCHOT and F.A.M. RIJSEWIJK. 2000. Comparison of three polymerase chain reaction methods for routine detection of bovine herpesvirus 1 DNA in fresh bull semen. *J. Virol. Methods.* 85: 65-73.
- SNOWDOWN, W.A. 1965. The IBR-IPV virus: reaction to infection and intermitent recovery of virus from experimentally infected cattle. *Aust. Vet. J.* 40: 277-289.
- STRAUB, O.C. 1991. BHV-1 infectious: relevance and spread in Europe. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 14:175-186
- THIRY, E., J. SALIKI, M. BUBLLOT and P.P. PASTORET. 1987. Reactivation of infectious bovine rhinotracheitis virus by transport. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 10: 59-63.
- VAN OIRSCHOT, J.T., P.J. STRAVER, J.A. VAN LIESHOUT, J. QUAK, F. WESTENBRINK and A.C. VAN EXSEL. 1993. A subclinical infection of bulls with bovine herpesvirus type 1 at an artificial insemination centre. *Vet. Rec.* 132: 32-35.
- WIEDMANN, M., R. BRANDON, P. WAGNER, E.J. DUBOVI and C.A. BATT. 1993. Detection of bovine herpesvirus-1 in bovine semen by a nested PCR assay. *J. Virol. Methods.*
- WIYONO, A., S.I.F. BAXTER, M. SAEPULLOH, SUDARISMAN, R. DAMAYANTI, P.W. DANIELS and H.W. REID. 1994. Diagnosis *malignant catarrhal fever* di Indonesia dengan menggunakan teknik reaksi berantai polimerase (PCR). Prosiding Seminar Nasional Teknologi Veteriner untuk meningkatkan Kesehatan Hewan dan Pengamanan Pangan Bahan Asal Ternak. Balai Penelitian Veteriner, Bogor 22-24 Maret 1994: 112-120.
- WIYONO, A., M. SAEPULLOH, R. DAMAYANTI dan SUDARISMAN. 1995. Teknik polymerase chain reaction untuk mendeteksi virus *malignant catarrhal fever* pada sediaan usap mukosa. Prosiding Seminar Nasional Teknologi Veteriner, Cisarua Bogor, 7-8 Nopember 1995: 963-969.
- XIA, J.Q., C.V. YASON and F.S.B. KIBENGE. 1995. Comparison of dot blot hybridization, polymerase chain reaction, and virus isolation for detection of bovine herpesvirus - 1 (BHV-1) in artificially infected bovine semen. *Can. J. Vet. Res. Sci.* 59: 102-109.
- ZHOU, J., J. LYAKU, R.A. FREDRICKSON and F.S.B. KIBENGE. 1999. Improved detection of bovine herpesvirus 1 in artificially infected bovine semen by protein amplification. *J. Virol. Methods.* 79: 181-189.