

Karakterisasi Molekuler *Bovine Herpesvirus Type 1* Isolat Indonesia

MUHARAM SAEPULLOH¹, I.W.T. WIBAWAN², D. SAJUTHI² dan S. SETIYANINGSIH²

¹Balai Besar Penelitian Veteriner, PO Box 151 Bogor
e-mail:m.saepulloh@diginet.id

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

(Diterima dewan redaksi 15 Januari 2009)

ABSTRACT

SAEPULLOH, M., I.W.T. WIBAWAN, D. SAJUTHI and S. SETIYANINGSIH. 2009. Molecular characterization of Bovine herpesvirus type 1 Indonesian isolates. *JITV* 14(1): 66-74.

Different subtypes of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) have been associated with different clinical conditions of cattle. For that reason subtypes differentiation has become an essential tool for understanding the pathogenesis and epidemiology of BHV-1 infections. In search for a genomic region that would allow a clear distinction between BHV-1.1 and BHV-1.2 of glycoprotein D (gD) genes of 8 Indonesian isolates were amplified and sequenced. The amino acid sequence alignments revealed that the levels of genomic similarity ranging from 98.8 to 100% among BHV-1 Indonesian isolates and its results were also similar between BHV-1 Indonesia isolates and BHV-1.1 reference, and 98.4 to 98.8% between BHV-1 Indonesian isolates and BHV-1.2 reference. The isolates could be clearly separated into BHV-1.1 and BHV-1.2 after phylogenetic analysis. The results showed that the Indonesian isolates were characterized as BHV-1.1 as agent caused respiratory tract infections in cattle or infectious bovine rhinotracheitis (IBR) disease. The results suggest that the phylogenetic analysis performed here can be used as a potential molecular epidemiological tool for herpesviruses.

Key Words: BHV-1.1, BHV-1.2, Glycoprotein D, Phylogenetic Analysis, IBR

ABSTRAK

SAEPULLOH, M., I.W.T. WIBAWAN, D. SAJUTHI dan S. SETIYANINGSIH. 2009. Karakterisasi molekuler *Bovine herpesvirus type 1* isolat Indonesia. *JITV* 14(1): 66-74.

Perbedaan sub tipe *bovine herpesvirus 1* (BHV-1) seringkali dihubungkan dengan adanya gejala klinis yang ditimbulkan oleh penyakit tersebut pada ternak sapi. Dalam hal ini perbedaan sub tipe akan menjadi penting manakala diperlukan dalam kajian patogenesis dan epidemiologi infeksi BHV-1. Telah berhasil dibedakan antara gen glikoprotein D (gD) BHV-1.1 dan BHV-1.2 setelah melalui proses amplifikasi dan sekuensing terhadap 8 isolat BHV-1 asal Indonesia. Hasil penjejarian terhadap urutan asam amino menunjukkan bahwa kesamaan genome antar BHV-1 isolat Indonesia mencapai 98,8 hingga 100%, dan ini sama dengan persentase kesamaan asam amino antar BHV-1 isolat Indonesia dengan BHV-1.1 rujukan. Sementara itu, untuk BHV-1 isolat Indonesia dengan BHV-1.2 rujukan memiliki persamaan asam amino antara 98,4 hingga 98,8%. Selanjutnya, isolat-isolat tersebut dapat dikelompokkan ke dalam BHV-1.1 dan BHV-1.2 setelah dilakukan analisis *phylogenetic*. Hasil analisis *phylogenetic* menunjukkan bahwa semua BHV-1 isolat Indonesia termasuk ke dalam kelompok BHV-1.1 yang merupakan agen penyebab infeksi saluran pernafasan pada sapi atau biasa dikenal sebagai penyakit *infectious bovine rhinotracheitis* (IBR). Hasil tersebut diharapkan dapat dijadikan dalam kajian epidemiologi molekuler untuk kelompok *herpesvirus*.

Kata Kunci: BHV-1.1, BHV-1.2, Glikoprotein D, Analisis *Phylogenetic*, IBR

PENDAHULUAN

Bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) termasuk kedalam famili *herpesviridae*, subfamili *Alphaherpesvirinae*, dan genus *Varicellovirus* (ICTV, 2002). Berdasarkan sifat antigenik dan genomik, BHV-1 dibedakan menjadi sub tipe 1 (BHV-1.1) dan 2 (BHV-1.2) (MILLER *et al.*, 1991; ROIZMAN *et al.*, 1992). Kedua sub tipe tersebut dapat menimbulkan penyakit dengan gejala klinis yang berbeda pada ternak sapi (ENGELS *et al.*, 1992). *Bovine herpesvirus type 1.1* (BHV-1.1) dapat menyebabkan infeksi saluran

pernafasan yang lebih dikenal sebagai *Infectious Bovine Rhinotracheitis* (IBR). Sedangkan sub tipe BHV-1.2 seringkali berhubungan dengan penyakit penyebab gangguan genital yang biasa dikenal sebagai *Infectious Pustular Vulvovaginitis* (IPV) pada sapi betina atau *Infectious Pustular Balanopostitis* (IPB) pada sapi jantan. Kemudian, varian BHV-1.2 lebih lanjut dapat dibedakan sebagai BHV-1.2a dan BHV-1.2b dimana BHV-1.2a seringkali berhubungan dengan penyakit penyebab keguguran pada sapi (MILLER *et al.*, 1991). Secara epidemiologi penyakit, keduanya (BHV-1.2a dan BHV-1.2b) merupakan galur yang berbeda

dalam manifestasi gejala klinis, akan tetapi hingga saat ini perbedaan genetik kedua galur tersebut masih belum jelas (SPILKI *et al.*, 2004). Kedua sub tipe (BHV-1.1 dan BHV-1.2) memiliki kemampuan dalam menimbulkan gangguan pernafasan maupun gangguan genital pada sapi, sehingga diduga bahwa masing-masing genotipe dapat beradaptasi, baik pada saluran pernafasan (BHV-1.1) maupun saluran genital (BHV-1.2) (RIJSEWIJK *et al.*, 1999; SPILKI *et al.*, 2004).

Berbagai macam metodologi imunologis untuk pendeteksian secara rutin terhadap BHV-1 telah banyak dikembangkan. Akan tetapi seringkali ditemukan berbagai masalah yang menyangkut reaksi silang (*cross reaction*) dengan kelompok *Alphaherpesvirus* yang memiliki hubungan kekerabatan yang sangat dekat dengan ruminansia. Terdapat 4 kelompok herpesvirus yang dapat menyebabkan reaksi silang secara serologis dengan BHV-1 dan ini dapat mengganggu program eradikasi dan pengendalian penyakit IBR. Kelompok virus tersebut adalah *Bovine herpesvirus-5* (BHV-5), *Caprine herpesvirus-1* (CapHV-1), *Cervine herpesvirus-1* (CerHV-1), dan *Rangiferine herpesvirus-1* (RanHV-1) (SCHWYZER dan ACKERMANN, 1996; ROS dan BELAK, 1999). Selain itu, mengingat kedua sub tipe (BHV-1.1 dan BHV-1.2) tersebut memiliki persentase kesamaan yang sangat tinggi baik asam amino maupun nukleotidanya, maka keduanya sangat sulit dibedakan dengan uji serologik, *Polymerase Chain Reaction* (PCR), *Random Amplified Polymorphic* (RAPD), dan bahkan *Restriction Enzyme Analysis* (REA) (AFONSO *et al.*, 2007; ESTEVES *et al.*, 2008). Uji REA dan RAPD hanya dapat membedakan tipe *herpesvirus* (BHV-1, BHV-5, CapHV-1, CerHV-1, dan RanHV-1), sedangkan dengan uji serologik sama sekali tidak dapat

membedakan tipe *herpesvirus* tersebut (SANTURDE *et al.*, 1996).

Berdasarkan pemeriksaan sampel usap mukosa nasal, vagina, semen dan *pheripheral blood leucocyte* (PBL) asal sapi bibit telah berhasil dideteksi penyebab penyakit IBR (BHV-1) dari beberapa daerah di Indonesia (SAEPULLOH *et al.*, 2008). Akan tetapi, untuk mengetahui bahwa isolat-isolat lapang tersebut termasuk ke dalam BH-1.1 atau BHV-1.2 diperlukan kajian lebih lanjut yaitu dengan melakukan karakterisasi molekuler. Dengan diketahuinya karakteristik isolat-isolat BHV-1 diharapkan akan mempermudah penanggulangan dan penanganan terhadap penyakit IBR di Indonesia. Selanjutnya, isolat virus yang telah terkarakterisasi dapat dijadikan sebagai sumber kekayaan plasma nutfah genetik (*genetic resources*) yang pada gilirannya dapat dijadikan sebagai bahan biologik, baik untuk pengembangan vaksin IBR maupun untuk bahan diagnostik lainnya.

Tujuan penelitian ini adalah untuk karakterisasi BHV-1 isolat Indonesia yang dibandingkan dengan BHV-1.1 rujukan serta BHV-1 yang telah terdeposit di *GenBank* melalui amplifikasi DNA, sekuensing dan analisis hubungan kekerabatan terhadap gen gD BHV-1.

MATERI DAN METODOLOGI

Virus dan Isolat

Galur virus dan isolat yang digunakan untuk karakterisasi molekuler dalam penelitian ini tercantum dalam Tabel 1. Semua virus telah ditumbuhkan dan beradaptasi dengan baik pada sel lestari *Madin Darby Bovine Kidney* (MDBK).

Tabel 1. Galur virus dan isolat yang digunakan untuk karakterisasi molekuler

Virus / Isolat	Asal
BHV-1.1 Colorado 1 (Cooper 1)	Paru-paru, ATCC No.VR-864, USA
BHV-1	Usap mukosa vagina, galur V-155, Australia
Isolat N0027/Jabar/2006	Usap mukosa hidung sapi FH, Indonesia
Isolat N30560/Jabar/2006	Usap mukosa hidung sapi FH, Indonesia
Isolat N30567/Jabar/2007	Usap mukosa hidung sapi FH, Indonesia
Isolat N60521T/Jabar/2007	Usap mukosa hidung sapi Simmental, Indonesia
Isolat N307185/Jabar/2007	Usap mukosa hidung sapi FH, Indonesia
Isolat SF1047486/Jatim/2007	Semen sapi PO, Indonesia
Isolat SF107559/Jatim/2007	Semen sapi PO, Indonesia
Isolat V305172/Jabar/2007	Usap mukosa vagina sapi FH, Indonesia

Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA virus yang dipropagasi pada sel lestarsi MDBK dikerjakan berdasarkan prosedur FRANCO *et al.* (2002) sebagai berikut: setelah virus/isolat IBR diinfeksi pada sel MDBK selama 36 jam atau setelah timbul CPE (*Cytophatic Effect*) 90-100%, maka supernatan disentrifugasi 5.000 x g selama 20 menit untuk menghilangkan sel lestarsi MDBK. Kemudian sentrifugasi dilanjutkan pada 100.000 x g selama 2 jam pada suhu 4°C. Pellet virus kemudian diresuspensikan dengan penambahan TE (Tris 10mM, EDTA 1 mM, pH 7,4) dan diberi perlakuan dengan penambahan *sodium dodecyl sulphate* 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, diendapkan dengan ethanol, dan akhirnya diresuspensikan dengan menggunakan TE pH 7,4 dan disimpan pada suhu 4°C atau -20°C sampai sampel siap dilakukan analisa dengan PCR.

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 yaitu 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 gen gD BHV-1 berturut turut menghasilkan fragmen 468bp dan 325bp.

Campuran reaksi PCR (*PCR Mix*) terdiri dari 5 µl 10 x DNA *polymerase buffer* (Sigma), 2 µl 10 mM campuran dNTP (Sigma), 1 µl 5 mM masing-masing primer (Invitrogen), dan 2,5 µl *thermo-stable RED Taq™ DNA Polymerase* (Sigma), dan 5 µL DNA (10 pg/µl). Campuran reaksi tersebut kemudian ditambah dengan air deionisasi (dH2O) sehingga menjadi total volume 50µl. Proses amplifikasi DNA untuk primer eksternal 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 µl produk PCR pertama diambil dan diamplifikasi dengan primer internal dengan proses amplifikasi DNA sama dengan yang digunakan untuk primer eksternal kecuali suhu pelekatan dinaikkan menjadi 65°C. Proses amplifikasi menggunakan GeneAmp®PCR System 9700 (*Applied Biosystem*, ABI).

Analisis Produk PCR

Produk PCR dianalisis dengan 2% agarose gel (Invitrogen) yang mengandung *Ethidium Bromide* (EtBr). Elektroporesis dilakukan pada voltage konstan yaitu pada 100 volt dalam TBE (Tris-Borate-EDTA) buffer selama 1 jam. Hasil PCR dinyatakan positif apabila terlihat adanya produk yang spesifik dari primer yang digunakan.

Pemurnian DNA dan Sekuensing

Sebanyak 50 µl masing-masing produk PCR dimurnikan dengan menggunakan *QIAquick PCR Purification kit* (Qiagen, Cat No. 28104) sesuai dengan prosedur dari pembuat kit. Sampel DNA yang telah murni selanjutnya disekuensing dengan menggunakan mesin sequencer ABI PRISM model 3130, proses sekuensing menggunakan *BigDye terminator v3.1. cycle sequencing kit* (Part No. 4337455, *Applied Biosystem*, USA) berdasarkan rekomendasi dari pembuat kit. Primer yang digunakan adalah sepasang primer gD internal (*forward* dan *reverse*) dengan konsentrasi 5-10 pmol/µl. Sedangkan konsentrasi DNA yang dibutuhkan untuk sekuensing adalah 3-10 ng/µl dengan total volume 20 µl.

Analisis Sekuen DNA dan *Phylogenetic Tree*

Analisis sekuen DNA dan translasi asam amino dilakukan dengan menggunakan *software BioEdit Version 7.0.5* (HALL, 1999). Pensejajaran (*alignment*) sekuen menggunakan *software the ClustalW version 1.83* (THOMPSON *et al.*, 1994). Kesamaan (homologi) sekuen antara isolat BHV-1 dianalisis dengan menggunakan *The Basic Alignment Search Tools* (BLAST) dari *The National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Sementara itu, analisis hubungan kekerabatan antar sekuen dilakukan dengan program *Molecular Evolutionary Genetic Analysis* (MEGA) version 3.1. (KUMAR *et al.*, 2004) dimana design konstruksi pohon kekerabatan (*phylogenetic tree*) menggunakan *neighbor-joining (NJ) tree* berdasarkan parameter Kimura-2 dengan 2000 replikasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pemurnian produk PCR

Pemurnian terhadap produk PCR dari ke 10 sampel yang terdiri dari 6 sampel isolat berasal dari Jawa Barat (N0027/Jabar/06; N30560/Jabar/06; N307185/Jabar/07; N50621T/Jabar/07; N30567/Jabar/06; dan V305172/Jabar/07), 2 sampel isolat berasal dari Jawa Timur (SF1027485/Jatim/07 dan SF1029972/Jatim/07) dan 2

sampel kontrol positif IBR (BHV-1.1 Strain Colorado dan BHV-1 V-155) ditampilkan seperti pada Gambar 1. Hasil pemurnian produk PCR menunjukkan bahwa pemurnian terhadap 8 isolat dan 2 kontrol positif diperoleh target yang spesifik pada 325 bp tanpa adanya hibridisasi-silang (*cross-hybridization*) dengan target lain.

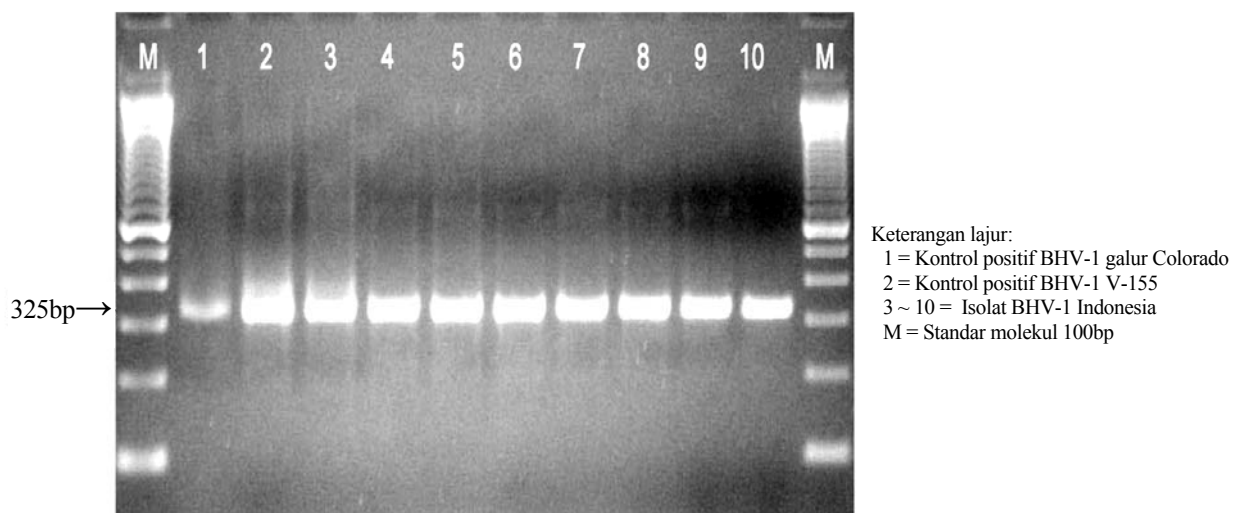
Sekuensing dan analisa sekuen

Bedasarkan hasil sekuensing yang dilanjutkan dengan analisis sekuen asam amino (pengejajaran, *alignment*) (Gambar 2) terhadap 8 isolat dan 2 kontrol positif serta pembandingan BHV-1 yang terdeposit di *GenBank* [BHV-1.1 Jura gD (nomor akses AF78730); BHV-1.2 K22 gD (nomor akses AF078731); HSBGIVBHV-1 gIV gene (nomor akses M59846.1); dan BHV1CGEN BHV-1.1 (nomor akses AJ004801.1)] menunjukkan bahwa mulai dari posisi asam amino ke-1 hingga ke-78 memiliki kesamaan asam amino. Perbedaan mulai terjadi pada posisi asam amino ke-79 yaitu semua isolat BHV-1 asal Indonesia berbeda dengan BHV-1.2 K22 gD, dimana isolat Indonesia memiliki asam amino Triptofan (W) sedangkan BHV-1.2 memiliki asam amino Arginin (R). Selanjutnya perbedaan terjadi lagi pada asam amino posisi ke-84 yaitu BHV-1.2, BHV-1.1 Jura gD, BHV-1 V-155, BHV1CGEN, HSBGIV BHV-1 dan isolat Indonesia (N30560/Jabar/2006, N307185/Jabar/2007, N60521T/Jabar/2007, N30567/Jabar/2007, dan N0027/Jabar/2006) memiliki asam amino Glisin (G), sedangkan BHV-1.1 galur Colorado dan isolat Indonesia asal semen segar (SF104786/Jatim/2007 dan SF107559/

Jatim/2007) dan asal usap mukosa vagina (V3055172/Jabar/2007) memiliki asam amino Asam aspartat (D).

Dari hasil pengejajaran terhadap sekuen asam amino tersebut di atas, masih belum dapat disimpulkan bahwa isolat Indonesia termasuk ke dalam kelompok BHV-1.1. Hal ini mengingat ada beberapa isolat asal Indonesia (N30560/Jabar/2006, N307185/Jabar/2007, N60521T/Jabar/2007, N30567/Jabar/2007, dan N0027/Jabar/2006) pada asam amino posisi ke-84 memiliki asam amino Glisin seperti halnya yang dimiliki BHV-1.2. Akan tetapi disini tampak adanya perbedaan antar isolat Indonesia yaitu kelompok isolat asal usap mukosa nasal (N30560/Jabar/2006, N307185/Jabar/2007, N60521T/Jabar/2007, N30567/Jabar/2007, dan N0027/Jabar/2006) yang memiliki asam amino Glisin (G) dengan kelompok isolat asal genital (SF104786/ Jatim/2007, SF107559/Jatim/2007 dan V3055172/Jabar/2007) memiliki asam amino Asam aspartat (D).

Adanya perbedaan asam amino Triptofan (W) yang dimiliki BHV-1.1 dengan asam amino Arginin (A) pada BHV-1.2 pernah pula dilaporkan oleh ROS dan BELAK (1999) yaitu antar isolat BHV-1.1 asal Swedia yang memiliki asam amino Arginin (R) ditempati oleh asam amino Triptofan (W) yang dimiliki BHV-1.2 K22 gD pada posisi ke-152 dari total sekuen asam amino 180. Sementara itu, perbedaan asam amino Glisin (G) (BHV-1.1) dengan asam amino asam aspartat (D) (BHV-1.2) pernah pula dilaporkan oleh EL-KHOLY and ABDELRAHMAN (2006) yaitu isolat BHV-1.1 galur Abu-Hammad memiliki asam amino Glisin (G) pada posisi



Gambar 1. Hasil pemurnian produk *n*PCR untuk bahan sekuensing

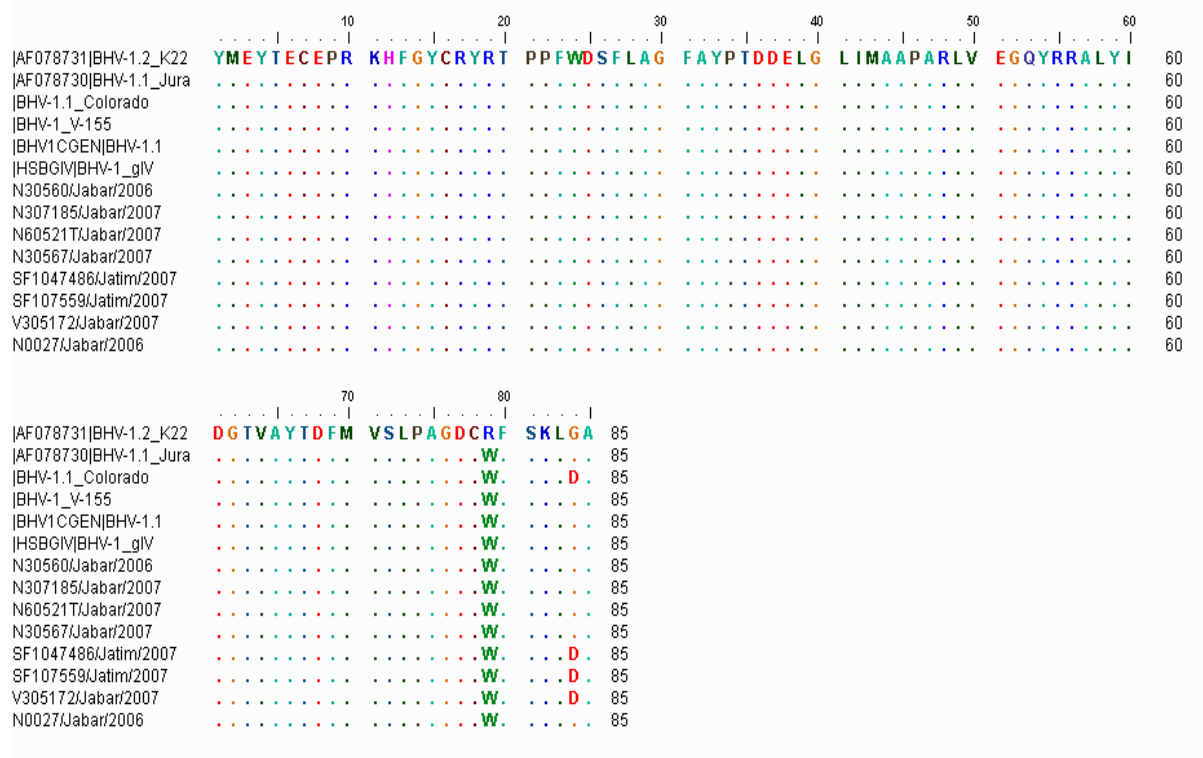
ke-204 dari total sekuen asam amino 393, sedangkan pada posisi tersebut BHV-1.2 ditempati oleh asam amino Asam aspartat (D). Terjadinya perubahan/perbedaan asam amino tersebut tentunya akan mengakibatkan perubahan struktur dan fungsi glikoprotein D itu sendiri yang pada gilirannya dapat berpengaruh terhadap patogenisitas virus tersebut. Perbedaan protein yang terkandung dalam gD akan mempengaruhi ikatan (*binding*) gD BHV-1 terhadap reseptor seluler spesifik dalam hal ini adalah *heparan sulfate sugar moiety* (LI *et al.*, 1995). Reseptor tersebut sebagai target yang potensial untuk interaksi gD yang dapat menyebabkan terjadinya perbedaan subtipe *bovine herpesvirus* (CAMPADELLI-FUME *et al.*, 2000).

Glikoprotein D merupakan glikoprotein utama dan *essential* bagi BHV-1 yang berperan dalam interaksi antara virus dengan sel inang yaitu membantu proses masuknya virus ke sel inang, penyebaran virus dari sel ke sel, dan fusi *virion envelope* dengan membran plasma (MEYER *et al.*, 1998; MUYLKEYN *et al.*, 2007). Selain itu, lokasi glikoprotein D (gD) yang strategis, yaitu berada pada *virion envelope* dan permukaan sel yang terinfeksi menjadikan gen gD merupakan target penting untuk respon tanggap kebal inang dan memiliki

sifat imunogenisitas yang sangat tinggi (BARANOWSKI *et al.*, 1996). *Bovine herpesvirus* tidak akan hidup (*survive*) apabila gen yang menyandi gD dihilangkan, sedangkan apabila gen yang menyandi glikoprotein *non-essential* (gC, gE, gI, gG dan gM) dihilangkan, maka hanya terjadi sedikit perubahan pada proses siklus replikasi virus (SCHWYER dan ACKERMANN, 1996). Oleh karena itu, gen gD seringkali digunakan untuk kajian karakterisasi BHV-1 dan pembuatan vaksin sub-unit BHV-1.

Kesamaan nukleotida dan asam amino

Hasil kesamaan (homologi) sekuen nukleotida dan asam amino isolat BHV-1 Indonesia, keduanya memiliki tingkat homologi yang sama yaitu antara 98,8 sampai 100% (Tabel 2). Demikian pula homologi sekuen nukleotida antara isolat Indonesia dengan BHV-1 (BHV-1.1 Colorado; BHV-1.1 Jura gD; BHV1CGEN BHV-1.1; BHV-1 V-155; dan BHV-1 gIV) memiliki tingkat homologi yang tinggi yaitu 98,8% sampai 100%. Akan tetapi tidak demikian halnya dengan tingkat homologi sekuen nukleotida antara isolat



Gambar 2. Hasil pensejajaran 85 sekuen asam amino antar isolat BHV-1 Indonesia dengan subtipe BHV-1.1 dan BHV-1.2 rujukan

Pensejajaran (*alignment*) menggunakan *ClustalW* program BioEdit versi 7.0.5
 Tanda titik (•) menunjukkan sekuen asam amino yang sama dengan sekuen asam amino BHV-1.2 (sekuen paling atas)

Indonesia dengan BHV-1.2 yaitu antara 98,4 sampai 98,8%, sedangkan untuk homologi sekuen asam amino yaitu berkisar antara 97,6 sampai 98,8%. Hasil analisis homologi sekuen tersebut menunjukkan bahwa isolat Indonesia lebih dekat kesamaan asam amino dan nukleotidanya terhadap BHV-1.1 dibandingkan dengan BHV-1.2.

Untuk mengetahui isolat Indonesia termasuk ke dalam kelompok BHV-1.1 atau BHV-1.2, maka uji lanjut dengan analisis *phylogenetic* mutlak diperlukan yaitu dengan melakukan analisis statistik melalui *bootstraps* lebih dari 50% dengan 2000 replikasi. ESTEVES *et al.* (2008) melaporkan bahwa untuk membedakan BHV-1.1 dengan BHV-1.2 tidak mungkin dapat dilakukan bila menggunakan *bootstraps* kurang dari 50% dan replikasi kurang dari 2000. Lain halnya dengan membedakan tipe *Bovine herpesvirus* (BHV-1 dan BHV-5) yaitu cukup diperlukan *bootstraps* 50% dengan 500 replikasi. Hal tersebut dikarenakan sub tipe BHV-1.1 dan BHV-1.2 sangat dekat sekali hubungan kekerabatannya, serta kedua sub tipe tersebut memiliki tingkat homologi yang tinggi yaitu mencapai 100% (asam amino) dan 99,6% (nukleotida) (ROS dan BELAK, 1999). Sementara itu, kesamaan asam amino antara BHV-1 dengan BHV-5 (agen penyebab ensefalitis pada sapi) hanya 85% (ENGELS *et al.*, 1986; TIKKO *et al.*, 1990; ABDELMAGID *et al.*, 1995). Oleh karena itu cukup dipahami apabila sub tipe BHV-1 (BHV-1.1 dan BHV-1.2) tidak dapat dibedakan bila hanya menggunakan teknik PCR dan REA. Karakterisasi BHV-1.1 dan BHV-1.2 dengan REA hanya akan diperoleh patern restriksi yang sama (ESTEVES *et al.*, 2008). Analisis enzim restriksi (REA) dengan menggunakan enzim endonuklease *Taq I* telah dilakukan pula terhadap 21 isolat BHV-1 asal Indonesia (Jawa Barat, Jawa Tengah dan Jawa Timur) yang disertai kontrol positif BHV-1 rujukan (BHV-1.1 galur Colorado dan BHV-1 V-155) menunjukkan bahwa semua isolat memiliki patern restriksi yang sama yaitu terpotong menjadi 2 fragmen, 231bp dan 67bp. (SAEPULLOH, *unpublished data*).

Analisis phylogenetic tree

Hasil analisis *phylogenetic tree* terhadap asam amino (Gambar 3) menunjukkan bahwa semua isolat Indonesia sangat berhubungan dekat dengan BHV-1.1 rujukan (BHV-1.1 Jura gD, HSBGIV BHV-1 gIV, BHV1CGEN BHV-1.1, BHV-1.1 Colorado; dan BHV-1 V-155 Australia). Sementara itu, isolat BHV-1 Indonesia dengan BHV-1.2 rujukan (BHV-1.2 K22 gD) sangat jauh hubungannya yang dibuktikan dengan tidak termasuk ke dalam kelompok yang sama (di luar

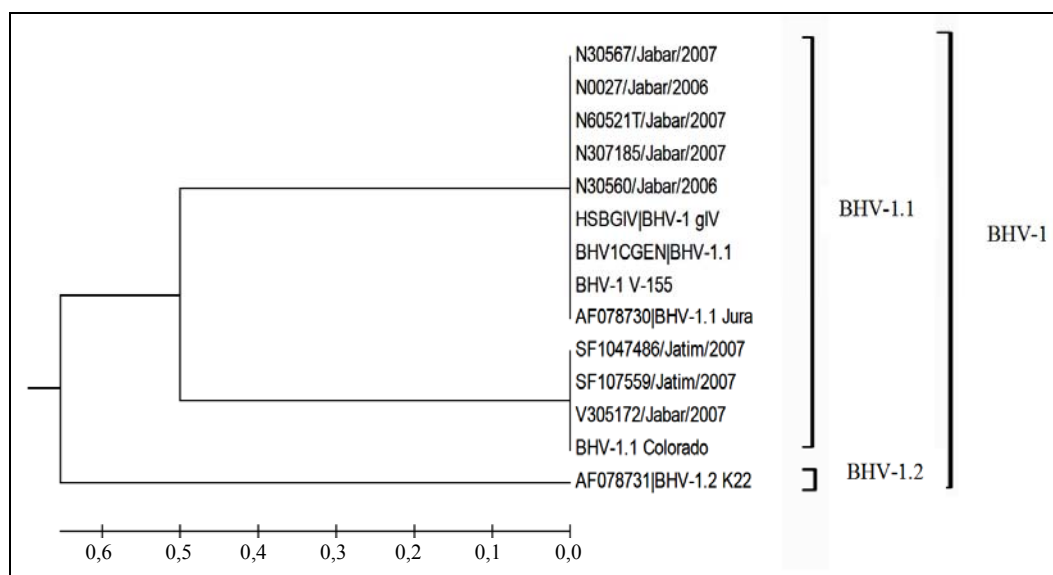
kelompok BHV-1.1). Analisis *phylogenetic tree* tersebut mendukung hasil analisis kesamaan asam amino di atas. Dengan demikian isolat BHV-1 Indonesia termasuk ke dalam sub tipe BHV-1.1 (penyebab gangguan pernafasan/IBR), bukan sub tipe BHV-1.2 (penyebab gangguan genital, IPB/IPV) dimana BHV-1.2 berada pada *cluster* tersendiri.

Bovine herpesvirus subtype 1.1 merupakan virus yang bersifat neurotropis yang dapat menetap pada *trigeminal ganglion* (CHOWDHURY *et al.*, 2000). Sementara itu, BHV-1.2 telah terbukti dapat menimbulkan gangguan pada saluran genital (VOGEL *et al.*, 2004). Akhir-akhir ini kedua sub tipe virus tersebut (BHV-1.1 dan BHV-1.2) seringkali berhubungan dengan penyakit penyebab gangguan saluran pernafasan (D'ACRE *et al.*, 2002). Berdasarkan hasil infeksi buatan pada hewan coba menunjukkan bahwa BHV-1.2 dapat menimbulkan penyakit gangguan pernafasan yang parah (SPILKI *et al.*, 2004). Oleh karena itu, untuk mengetahui kedua sub tipe BHV tersebut tidak cukup hanya dengan melihat gejala klinisnya saja, akan tetapi perlu dilakukan karakterisasi molekuler untuk menentukan karakteristik kedua sub tipe virus tersebut. Berdasarkan observasi di lapang, semua isolat virus yang dikarakterisasi, berasal dari ternak sapi yang menunjukkan gejala klinis gangguan pernafasan (SAEPULLOH, *unpublish data*). Dengan demikian, terdapat kesesuaian antara gejala klinis pada ternak sapi dengan hasil karakterisasi molekuler, yaitu semua isolat virus yang diperoleh termasuk ke dalam sub tipe BHV-1.1 sebagai agen penyebab penyakit gangguan saluran pernafasan/IBR.

Tidak termasuknya isolat asal sampel semen cair (Jawa Timur) dan usap mukosa vagina (Jawa Barat) ke dalam sub tipe BHV-1.2 menunjukkan bahwa kemungkinan ternak-ternak tersebut memang terinfeksi oleh virus BHV-1.1 yang kemudian disekresikan dan bereplikasi pada mukosa genital. Menurut EDWARDS *et al.* (1991) bahwa pada hewan coba yang diinfeksi BHV-1.2 akan memperlihatkan klinis gangguan pernafasan dan akan mampu menyebarkan virus ke ternak sehat. Demikian pula sebaliknya bahwa BHV-1.1 seringkali berhasil diisolasi dari kasus gangguan pernafasan, aborsi dan lesi pada genital (ENGELS *et al.*, 1992). Lebih lanjut, RIJSEWIJK *et al.* (1999) menyatakan bahwa sangat sulit membedakan secara tepat (*exact*) sifat biologi dari kedua genotipe BHV-1 (BHV-1.1 dan BHV-1.2), karena keduanya dapat menginfeksi baik pada saluran pernafasan maupun genital. BHV-1.1 diduga lebih mudah beradaptasi pada saluran pernafasan dibandingkan dengan BHV-1.2 (EDWARDS *et al.*, 1991).

Tabel 2. Homologi sekuen nukleotida dan asam amino (%) diantara BHV-1 yang dibandingkan

		% Kesamaan nukleotida															
% Kesamaan asam amino		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		Virus
	1	■	98,8	98,8	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	98,8	98,8	98,8	100,0	1	AF078730 BHV-1.1 Jura gD
	2	98,8	■	98,4	98,8	98,8	98,8	98,8	98,8	98,8	98,8	98,4	98,4	98,4	98,8	2	AF078731 BHV-1.2 K22 gD
	3	98,8	97,6	■	98,8	98,8	98,8	98,8	98,8	98,8	98,8	100,0	100,0	100,0	98,8	3	BHV-1.1. Colorado
	4	100,0	98,8	98,8	■	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	98,8	98,8	98,8	100,0	4	BHV-1. V-155
	5	100,0	98,8	98,8	100,0	■	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	98,8	98,8	98,8	100,0	5	BHV1CGEN BHV-1.1
	6	100,0	98,8	98,8	100,0	100,0	■	100,0	100,0	100,0	100,0	98,8	98,8	98,8	100,0	6	HSBGIV BHV-1 gIV gene
	7	100,0	98,8	98,8	100,0	100,0	100,0	■	100,0	100,0	100,0	98,8	98,8	98,8	100,0	7	N30560/Jabar/2006
	8	100,0	98,8	98,8	100,0	100,0	100,0	100,0	■	100,0	100,0	98,8	98,8	98,8	100,0	8	N307185/Jabar/2007
	9	100,0	98,8	98,8	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	■	100,0	98,8	98,8	98,8	100,0	9	N60521T/Jabar/2007
	10	100,0	98,8	98,8	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	■	98,8	98,8	98,8	100,0	10	N30567/Jabar/2007
	11	98,8	97,6	100,0	98,8	98,8	98,8	98,8	98,8	98,8	98,8	■	100,0	100,0	98,8	11	SF1047486/Jatim/2007
	12	98,8	97,6	100,0	98,8	98,8	98,8	98,8	98,8	98,8	98,8	100,0	■	100,0	98,8	12	SF107559/Jatim/2007
	13	98,8	97,6	100,0	98,8	98,8	98,8	98,8	98,8	98,8	98,8	100,0	100,0	■	98,8	13	V305172/Jabar/2007
	14	100,0	98,8	98,8	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	98,8	98,8	98,8	■	14	N0027/Jabar/2006



Gambar 3. Analisis *Phylogenetic tree* terhadap urutan asam amino pada fragmen gen gD BHV-1

BHV-1 isolat Indonesia (N30567/Jabar/2007; 0027/Jabar/ 2006 N60521T/Jabar/2007 N307185/Jabar/2007;N30560/Jabar/2006;SF107559/Jatim/2007; SF107559/Jatim/2007 V305172/Jabar/2007) BHV-1 rujukan dari *GenBank*: BHV1CGEN BHV-1.1 (nomor akses AJ004801.1), BHV-1.1 Jura gD (nomor akses AF078730), HSBGIV BHV-1 gIV gene (nomor akses. M59846.1) BHV-1.2 K22 gD (nomor akses AF078731).BHV-1.1 rujukan yang digunakan di Laboratorium: BHV-1.1 galur Colorado (USA) dan BHV-1 V-155 (Aust.). Metode *NJ tree* berdasarkan parameter Kimura-2 dengan *bootstrap* 2000 replikasi

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil karakterisasi molekuler di atas maka isolat BHV-1 yang berasal dari Jawa Barat dan Jawa Timur termasuk ke dalam kelompok subtipe BHV-1.1 yaitu sebagai agen penyebab penyakit IBR dan bukan termasuk ke dalam subtipe BHV-1.2

(penyebab gangguan genital). Oleh karena itu, kemungkinan besar penyebaran penyakit IBR yang ada di Jawa Barat dan Jawa Timur disebabkan oleh BHV-1.1. Untuk mengetahui kajian epidemiologi molekuler virus lebih lanjut, diperlukan karakterisasi molekuler terhadap beberapa isolat virus yang berasal dari daerah lain di Indonesia.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Ir. Endang Romjali, M.Sc., PhD., 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, Agus Winarsongko dan Mansur atas bantuan teknis baik di Lapangan maupun di Laboratorium. Penelitian ini dibiayai oleh Proyek APBN Tahun Anggaran 2008, Badan Litbang Pertanian, Departemen Pertanian

DAFTAR PUSTAKA

- ABDELMAGID, O.Y., H.C. MINOCHA, J.L. COLLINS and S.I. CHOWDHURY. 1995. Fine mapping of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) glycoprotein D (gD) neutralizing epitopes by type-specific monoclonal antibodies and sequence comparison with BHV-5 gD. *Virology*. 206: 242-253.
- AFONSO, D.A.F., L.S. ORTEGA, R.A.F. REDONDO, G.D.S. TRINDADE and E.F.B. STANCIOLI. 2007. Characterization of field bovine herpesvirus sampling using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *J. Virol. Methods*. 140: 200-205.
- BARANOWSKI, E., G. KEIL, J. LYAKU, F.A. RIJSEWIJK, P. VAN OIRSCHOT, P. PASTORET and E. THIRY. 1996. Structural and functional analysis of bovine herpesvirus 1 minor glycoprotein. *Vet. Microbiol.* 53: 91-101.
- CAMPADELL-FUME, G., F. COCCHI, L. MENOTTI and M. LOPEZ. 2000. The novel receptors that mediate the entry of herpes simplex viruses and animal alphaherpesviruses into cells. *Rev. Med. Virol.* 10: 305-319.
- CHOWDHURY, S.I., B.J. LEE, A. OZKUL and M.L. WEISS. 2000. Bovine herpesvirus 5 glycoprotein E is important for neuroinvasiveness and neurovirulence in the olfactory pathway of the rabbit. *J. Virol.* 74: 2094-2106.
- D'ACRE, R.C., R.S. ALMEIDA, T.C. SILVA, A.C. FRANCO, F. SPILKI, P.M. ROEHE and C.W. ARMS. 2002. Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesvirus type 1 and 5. *Vet. Microbiol.* 88: 315-324.
- EDWARDS, S., R.H. NEWMAN and H. WHITE. 1991. The virulence of British isolates of bovine herpesvirus 1 in relationship to viral genotype, *Br. Vet. J.* 147: 216-231.
- EL-KHOLY, A.A. and K.A. ABDELRAHMAN. 2006. Genetic characterization of the Egyptian vaccinal strain Abu-Hammad of bovine herpesvirus-1. *Rev. Sci. Off. Int. Epiz.* 25: 1081-1095
- ENGELS, M., C. GLULIANI, P. WILD, T.M. BECK, E. LOEPFLE and R. WYLER. 1986. The genome of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) exhibiting a neuropathogenic potential compared to known BHV-1 strains by restriction site mapping and cross-hybridization. *Vir. Res.* 6: 57-73
- ENGELS, M., M. PALATINI, A.E. METZLER, U. PROBST, U. KIHM and M. ACKERMAN. 1992. Interactions of bovine and caprine herpesviruses with the natural and foreign hosts. *Vet. Microbiol.* 33: 69-78.
- ESTEVEZ, P.A., O.A. DELLAGOSTIN, L.S. PINTO, A.D. SILVA, F.R. SPILKI, J.R. CIACCI-ZANELLA, S.O.H. UBNER, R. PUENTES, J. MAISONNAVE, A.C. FRANCO, F.A.M. RIJSEWIJK, H.B.C.R. BATISTA, T.F. TEIXEIRA, D. DEZEN, A.P. OLIVEIRA, C. DAVID, C.W. ARNS and P.M. ROEHE. 2008. Phylogenetic comparison of the carboxy-terminal region of glycoprotein C (gC) of bovine herpesviruses (BoHV) 1.1, 1.2 and 5 from South America (SA). *Vir. Res.* 131: 16-22.
- FRANCO A.C., R. SPILKI F, P.A. ESTEVES, M. LIMA, R. WEIBLEN, E.F. FLORES, F.A.M. RIJSEWIJK and P.M. ROEHE. 2002. A Brazilian glykoprotein E-negative bovine herpesvirus type 1.2a (BHV-1.2a) mutant is attenuated for cattle and induces protection against wild-type virus challenge. *Pesq. Vet. Bras.* 22: 135-140.
- HALL, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic. Acids Symp. Ser.* 41: 95-98.
- INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. 2002. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm>. Accessed on 9 July 2004.
- KUMAR, S., K. TAMURA and M. NEI. 2004. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.* 5: 150-163.
- LI, Y., S. VAN DRUNEN LITTLE-VAN DEN HURK, L.A. BABIUK and X. LIANG. 1995. Characterization of cell-binding properties of bovine herpesvirus 1 glycoprotein B, C, and D: Identification of a dual cell-binding function of gB. *J. Virol.* 69: 4758-4768.
- MILLER, J.M., C.A. WHETSTONE and M.J. VAN DER MAATEN. 1991. Abortifacient property of bovine herpesvirus type 1 isolates that represent three subtypes determined by restriction endonuclease analysis of viral DNA. *Am. J. Vet. Res.* 52: 458-461.
- 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.
- RIJSEWIJK, F.A., M.J. KAASHOEK, J.P. LANGEVELD, R. MELOEN, J. JUDEK, K. BIENKOWSKA-SZEWczyk, M.A. MARIS-VELDHUIS and J.T. VAN OIRSCHOT. 1999. Epitope on glycoprotein C of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) that allow differentiation between BHV-1.1 and BHV-1.2 strains. *J. Gen. Virol.* 80: 1477-1483.
- ROIZMAN, B., R.C. DESROSIERS, B. FLECKENSTEIN, C. LOPEZ, A.C. MINSON and M.J. STUDDERT. 1992. The family herpesviridae: an up date. *Arch. Virol.* 123: 425-448.
- ROS, C. and S. BELAK. 1999. Studies of genetic relationships between bovine, caprine, cervine, and ruminant alphaherpesviruses and improved molecular methods for virus detection and identification. *J. Clin. Microbiol.* 37: 1247-1253.

- 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.
- TIKOO, S.K., D.R. FITZPATRICK, L.A. BABIUK and T.J. ZAMB. 1990. Molecular cloning, sequencing, and expression of functional bovine herpesvirus 1 glycoprotein IV in transfected bovine cells. *J. Virol.* 64: 5132-5142.
- SAEPULLOH, M., R.M. ABDUL ADJID, I.W.T. WIBAWAN dan DARMINTO. 2008. Pengembangan nested PCR untuk deteksi bovine herpesvirus 1 (BHV-1) pada sediaan usap mukosa hidung dan semen asal sapi. *JITV*. 13: 155-164.
- SANTURDE, G., N. DA SILVA, R. VILLARES, E. TABARES, A. SOLANA, J. M. BAUTISTA and J. M. CASTRO. 1996. Rapid and high sensitivity test for direct detection of bovine herpesvirus-1 genome in clinical samples. *Vet. Microbiol.* 49: 81-92.
- SPIPKI, E.R., P.A. ESTEVES, M. LIMA, A.C. FRANCO, C. CHIMINAZZO, E.F. FLORES, R. WEIBLEN, D. DRIEMEIER and P.M. ROEHE. 2004. Comparative pathogenicity of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) subtypes 1 (BHV-1.1) and 2a (BHV-1.2a). *Pesq. Vet. Bras.* 24: 43-49.
- SCHWYZER, M. and M. ACKERMANN. 1996. Molecular virology of ruminant herpesvirus. *Vet. Microbiol.* 53: 67-77.
- THOMPSON, J.D., D.G. HIGGINS and T.J. GIBSON. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nuc. Acids Res.* 22: 4673-4680.
- VOGEL, F.S.F., E.F. FLORES and R. WEIBLEN. 2004. Intrapreputal infection of young bulls with bovine herpesvirus type 1.2: acute balanoposthitis, latent infection and detection of viral DNA in regional neural and non-neural tissues 50 days after experimental reactivation. *Vet. Microbiol.* 98: 185-196.