

Penelitian

## **Analisis Fragmen Gen VP-2 Virus *Infectious Bursal Diseases* yang Diisolasi dari Peternakan Ayam Komersial**

(Analyses of VP-2 Gene Fragment of *Infectious Bursal Diseases* Viruses Isolated from Commercial Poultry Farm)

**Michael Haryadi Wibowo<sup>1\*</sup>, Dito Anggoro<sup>1</sup>, Sarwo Edy Wibowo<sup>2</sup>, Purnama Edy Santosa<sup>3</sup>, Surya Amanu<sup>1</sup>, Widya Asmara<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Departemen Mikrobiologi FKH UGM, <sup>2</sup>Mahasiswa Pasca Sarjana Sain Veteriner FKH UGM,

<sup>3</sup>Fakultas Pertanian, Jurusan Peternakan, Universitas Lampung.

\*Penulis untuk korespondensi: mhwibowo@ugm.ac.id

Diterima 3 Oktober 2016, Disetujui 20 Desember 2016

### **ABSTRAK**

*Infectious Bursal Disease* (IBD) adalah penyakit virus yang bersifat akut dan infeksius serta menyerang pada unggas muda yang berumur kurang dari 4 bulan. Sejauh ini data molekuler virus IBD isolat Indonesia sangat minim, oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi dan mengarakterisasi gen VP-2 virus IBD yang telah ada di Indonesia. Sampel penelitian diperoleh dari kasus terdiagnosis IBD yang terjadi di peternakan ayam komersial pedaging dan petelur. Sampel Bursa Fabricius dipersiapkan untuk dilakukan isolasi menggunakan telur ayam berembrio SPF. Membran korioalantois dipanen dan dilakukan identifikasi dengan metode RT-PCR dengan gen target VP-2. Hasil amplifikasi selanjutnya dilakukan pengurutan DNA. Data nukleotida hasil pengurutan DNA dianalisis dengan program MEGA 6, meliputi pesejajaran, prediksi asam amino, dan konstruksi pohon kekerabatan antara virus yang diteliti dengan beberapa virus yang telah dipublikasi di Genbank terutama virus IBD yang bersirkulasi di Indonesia. Hasil penelitian ini diperoleh data bahwa ayam yang terdiagnosis penyakit IBD dapat ditentukan penyebabnya sebagai virus IBD. Hasil analisis pengurutan penanda patogenisitas molekuler menunjukkan virus yang virulen. Analisis pohon kekerabatan dua isolat IBD SR/Lay-WNO-DIY dan IBD Potrow/Lay-SLM-DIY termasuk dalam kelompok virus IBD tipe klasik, sedangkan lima virus lainnya, yaitu IBD Yanti/Lay-SLM-DIY, IBD Lampung/Bro/IL, IBD Fung/Lay-SLM-DIY-BF1, IBD Fung/Lay-SLM-DIY-BF2, dan IBD Fung/Lay-SLM-DIY-BF3 termasuk dalam kelompok vvIBD strain Indonesia.

**Kata kunci:** ayam komersial, gen VP-2, isolat lapang, IBD klasik, virulen

### **ABSTRACT**

*Infectious Bursal Disease* (IBD) is an acute contagious viral disease of young birds, less than 4 months. The aim of the research was to identify and characterize VP-2 gene fragment of IBD virus in Indonesia, since molecular data of that virus is very limited. Samples was obtained from suspected IBD infection taken form commercial farming system both layer and broiler farm. Bursa of Fabricius is processed to be inoculated into embryonated chicken egg SPF of 11-days. Chorioallantoic membrane was harvested and identified using reverse trancriptation-polymerase chain reaction (RT-PCR) with the VP-2 gene as a target of amplification. Amplicon product were than sent to be sequenced and the result was analysed using MEGA 6.0 program. Analysis were include segment analysis and editing, multiple alignment, amino acid prediction, and phylogenetic tree among selected IBD virus, including: reference very virulent, classical, and Indonesian strain. The data obtained from this research was concluded that samples obtained from spusedcted IBDv infection could be isolated and confirmed as IBDv infection. Further molecular analysis of pathogenicity marker indicated that the virus belong to virulent IBDv strain. Phylogenetic analysis showed that IBD SR/Lay-WNO-DIY/2013 and IBD Potrowngsan/Lay-SLM-DIY/2013 belong to IBDv classical strain, mean while the virus of IBD Yanti/Lay-SLM-DIY, IBD Lampung/Bro/IL, IBD Fung/Lay-SLM-DIY-BF1, IBD Fung/Lay-SLM-DIY-BF2, and IBD Fung/Lay-SLM-DIY-BF3 belong to the vvIBD Indonesia strain.

**Keywords:** classical strain IBD, field isolate, poultry, virulent strain, VP-2 gene

## PENDAHULUAN

*Infectious Bursal Diseases* (IBD) yang juga dikenal sebagai penyakit Gumboro, merupakan penyakit infeksi yang menyerang ayam muda dan dicirikan mempunyai target sel B limfosit pada Bursa Fabricius, sehingga dapat menyebabkan immunosupresi, (van den Berg, 2000). Kondisi demikian menyebabkan ayam menjadi lebih peka terhadap berbagai penyakit, oleh karena itu karakter immunosupresi ini dianggap sebagai faktor penting dan utama yang merugikan pada industri perunggasan.

Virus IBD merupakan anggota genus *Avibirna* virus, dan termasuk dalam keluarga *Birnaviridae*. Genom virus terdiri atas dua segmen ds-RNA linear, yang dikenal sebagai segmen A dan B. Segmen A mempunyai panjang 3,2 kb dan mempunyai dua open reading frame (ORF), yaitu ORF kecil yang mengkode VP-5 dan ORF besar yang mengkode gen structural VP-2, VP-3 dan VP-4. Segmen B mengkode VP-1, yang merupakan enzim RNA polimerase (Nagarajan & Kibenge, 1997; van den Berg, 2000). Protein VP-2 terbagi menjadi tiga domain utama, yaitu basal, shell dan domain yang menonjol. Bagian basal dan shell dibentuk oleh asam amino yang bersifat lestari pada ujung terminal N dan C protein VP-2. Bagian penonjolan dibentuk oleh bagian yang bersifat hipervariabel pada protein VP-2 (Bayliss et al., 1990). Peran VP-2 diketahui sebagai faktor virulensi virus, variasi antigenik, dan berperan dalam kemampuan virus untuk beradaptasi pada pertumbuhan dikultur jaringan (Mahgoub, 2012). Protein VP-2 dianggap penting karena mempunyai tapak antigenik yang bertanggung jawab dalam menstimulasi antibodi netralisasi sehingga dapat menimbulkan antibodi yang bersifat immuno-protektif (van den Berg, 2000). Pada protein VP-2 tersebut, setidaknya terdapat dua epitope netralisasi (Mahgoub, 2012).

Penyakit IBD dilaporkan secara resmi oleh Casgrove terjadi pada peternakan ayam pedaging di kota Gumboro, Delaware, USA pada tahun 1962. Penyakit tersebut menyebar ke beberapa daerah di USA (Lasher & Davis, 1997), serta mencapai Eropa pada tahun 1971 (Faragher, 1972). Pada tahun 1995 organisasi kesehatan hewan dunia, mendeklarasikan bahwa sebanyak 65 negara di dunia telah mengalami wabah IBDv (Etaradossi, 1995). Menurut Parede et al., (2003) penyakit IBD di Indonesia telah dilaporkan terjadi secara subklinis dengan mortalitas yang rendah pada tahun 1991. Pada tahun tersebut juga dilaporkan sejumlah kasus penyakit IBD secara akut dengan kematian tinggi, yaitu bahwa mortalitas ayam pedaging mencapai

lebih dari 25%, sedangkan ayam petelur lebih dari 60%. Menurut pengalaman penulis pada tahun 1992 sampai 2005 kasus IBDV telah meluas ke berbagai daerah padat peternakan unggas di Indonesia. Unggas yang terserang meliputi ayam bibit, petelur komersial, pedaging, serta ayam pejantan. Pada awalnya kasus gumboro banyak dilaporkan pada ayam petelur komersial pada periode *pullet*, yang berumur 3 sampai 4 bulan, namun dalam perkembangannya umur ayam yang terserang semakin maju di usia 3 minggu. Kematian ayam yang tidak divaksinasi mencapai 60% dari populasi, namun dengan program vaksinasi aktif-inaktif kasus IBD dapat dikendalikan tetapi masih terjadi kematian ayam sekitar 5 sampai 10%. Data lapangan tersebut bersesuaian dengan data yang disampaikan oleh Parede et al. (2003).

Usaha pengendalian penyakit Gumboro dilakukan dengan program vaksinasi aktif dan inaktif pada ayam bibit dan komersial (Parede et al., 2003). Program vaksinasi tersebut didukung oleh pelaksanaan biosekuriti yang baik serta tatalaksana pemeliharaan yang memadai. Langkah pengendalian tersebut terbukti mampu menekan morbiditas dan mortalitas penyakit IBD di Indonesia, tetapi tidak dapat dipungkiri bahwa penyakit IBD masih banyak ditemukan di lapangan sampai saat ini.

Beberapa penelitian yang telah dilakukan tentang virus IBD isolat Indonesia, lebih banyak tentang isolasi dan identifikasi virus, karakter patogenisitas mikroskopik pada Bursa Fabricius, dan tingkat proteksi vaksin serta uji Elisa dengan antigen protein VP-2. Sejauh ini data genetik virus IBD yang menyebabkan penyakit Gumboro di Indonesia sudah dilaporkan oleh beberapa peneliti, (Mahardika, 2005; Parede et al., 2003; Rudd et al., 2002), namun demikian masih sangat terbatas jumlahnya serta sejauh ini belum ada data informasi genetik terbaru virus IBD yang bersirkulasi di lapangan. Oleh karena itu penelitian ini bertujuan memperoleh data molekuler gen VP-2 virus IBD isolat Indonesia yang diperoleh dari peternakan ayam komersial asal Daerah Istimewa Yogyakarta dan Lampung. Data molekuler tersebut bermanfaat untuk mengetahui strain virus IBD yang bersirkulasi di lapangan dalam kerangka pengendalian penyakit IBD di Indonesia.

## BAHAN DAN METODE

### Sampel

Sampel terdiagnosis penyakit gumboro diperoleh dari peternakan ayam petelur yang berlokasi

di Propinsi Daerah Istimewa Yogyakarta dan sampel ayam pedaging yang diperoleh dari Propinsi Lampung. Semua sampel yang berasal dari ayam petelur yang telah divaksin sebanyak 2 sampai 3 kali, sedangkan pada ayam pedaging tidak divaksin IBD. Informasi yang diperoleh rerata kematian yang terjadi pada pullet ayam petelur berkisar 3 sampai 7,5%, sedangkan kematian pada ayam pedaging mencapai 12%. Data sampel secara detail dimuat pada Tabel -1.

### Preparasi Sampel

Sampel Bursa Fabricius (IBD-Yanti/Lay-SLM-DIY; IBD-SR/Lay-WNO; dan IBD-Potrow/Lay) digerus dan dipersiapkan untuk diinokulasi pada telur ayam berembrio yang tidak mengandung antibodi terhadap penyakit IBD. Membran korioalantois dipanen dan selanjutnya dipersiapkan dalam proses ekstraksi RNA, sedangkan sampel Bursa Fabricius kode IBD-Lampung/Bro/I,2,3,4,5-L dan IBD-Fung/Lay-SLM-DIY-BF-1,2,3., karena keterbatasan telur ayam berembrio tidak dipropagasi, tetapi digerus dan diproses untuk dilakukan ekstraksi RNA.

### Ekstraksi RNA dan Amplifikasi

Ekstraksi RNA dilakukan dari gerusan membran korioalantois dan Bursa Fabricius, sedangkan virus kontrol positif virus IBD diperoleh dari pengenceran virus vaksin IBD (produksi Sanbio Laboratoris). Isolasi RNA virus IBD dilakukan dengan menggunakan *micro-to Midi RNA isolation kit* (Invitrogen, USA) sesuai dengan prosedur standar yang disarankan oleh Invitrogen. Secara prinsip, 0,2 ml suspensi isolat virus IBD dan virus kontrol IBD dalam PBS ditambahkan ke dalam 0,2 ml larutan pelisis yang mengandung 0,002 ml  $\beta$ -mercaptoethanol. Campuran tersebut, kemudian disentrifugasi pada 12,000 xg selama 2 menit suhu 25 °C (*refrigerated microcentrifuge*, model 5804R, Eppendorf, Hamburg, Germany). Selanjutnya supernatan dipindahkan ke dalam tabung bersih dan ditambah dengan 0,2 ml etanol absolut, kemudian dimasukkan ke dalam RNA *spin cartridge*, dan disentrifugasi pada 12,000 xg selama 15 menit 25 °C. *Cartridge* dicuci 1 x dengan 0,7 ml *wash buffer I* dan 1 x dengan 0,5 *wash buffer II*. *Cartridge* tersebut kemudian dipindahkan ke dalam RNA *recovery tube*. RNA diperoleh dengan melakukan elusi *cartridge* tersebut dengan 0,03 ml RNase-free water dengan cara disentrifugasi dengan kecepatan 12.000xg selama 2 menit 25 °C. Suspensi RNA yang diperoleh, kemudian dipakai untuk *template* pada reaksi RT-PCR.

Amplifikasi dilakukan dengan metode *reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR). Reaksi dilakukan dengan kit *Superscript III-one-step-RT-PCR with platinum Taq* (Invitrogen) menggunakan *Gene-Amp PCR System 2400* (Applied Biosystem, USA). Amplifikasi gen VP2 dilakukan dengan primer spesifik, yaitu *forward* primer adalah: 5'-ggc cca gag tct aca cca taa-3' dan *reverse* primer adalah: 5'-ccg gat tat gtc ttt gaa gcc-3', dengan produk ampikon sebesar 735 bp (Sapats and Ignjatovic, 2002). Produk PCR divisualisasi dengan metode elektroforesis menggunakan gel agarose 2% dan pewarnaan dengan *gel red*. Pita DNA yang teramplifikasi diamati dalam perangkat *gel doc* untuk selanjutnya didokumentasi.

### Pengurutan dan Analisis Urutan DNA

Hasil amplifikasi berupa produk PCR, selanjutnya dikirim ke laboratorium yang mempunyai fasilitas pengurutan (*sequencing*) DNA. Pengurutan dilakukan dengan primer yang sama dengan primer amplifikasi. Hasil pengurutan berupa urutan nukleotida, selanjutnya dianalisis dengan software bioinformatik *Mega 5,0*, yang meliputi: *pesejajaran*, *prediksi asam amino*, *homologi*, dan *konstruksi pohon kekerabatan*. Hubungan kekerabatan antara virus yang diteliti dengan virus IBD yang data urutannya telah dideposisi di *Genbank*, antara lain: virus IBD standar virulen, virus IBD klasik, virus vaksin, dan khususnya virus IBD Indonesia. Data isolat virus IBD dari *Genbank* yang digunakan dalam analisis dimuat dalam Tabel-2.

## HASIL

Hasil kultur pada telur ayam berembrio diperoleh lesi *pock* pada membran korio alantois yang bersifat indikatif pertumbuhan virus IBD. Konfirmasi pertumbuhan virus IBD dilakukan dengan metode RT-PCR yang menggunakan primer spesifik gen VP-2 menunjukkan bahwa semua sampel kultur pada telur ayam berembrio positif teramplifikasi pita DNA sesuai target amplifikasi. Satu diantara lima sampel Bursa Fabricius yang diperoleh dari ayam pedaging di Propinsi Lampung, (kode IBD-Lampung/Bro/IL) dan 3 sampel Bursa Fabricius kode IBD-Fung/Lay-SLM-DIY-BF-1, 2,3 menunjukkan hasil positif terdeteksi virus IBD. Pita DNA hasil amplifikasi teramati cukup bagus, tebal, bersih, dan tidak teramati ekstra pita DNA (Gambar 1).

Analisis hasil urutan fragmen gen VP-2 pada po-

Tabel 1 Daftar asal sampel Bursa Fabrisius ayam komersial yang digunakan dalam penelitian ini

No	Kode sampel	Perubahan patologi makroskopis	Jumlah kematian	Status vaksinasi IBD
1	Yanti/Lay-SLM-DIY/2011	Hemoragi paha, Bursa bengkak, udematososa, perdarahan	7,5%	Vaksin IBD 2 kali
2	SR/Lay-WNO-DIY/2013	Hemoragi paha, Bursa bengkak, udematososa, perdarahan	3%	Vaksinasi 3 kali
3	Potrowngsan/Lay-SLM-DIY/2013	Hemoragi paha, Bursa bengkak, udematososa, perdarahan	4%	Vaksinasi 2 kali
4	Lampung/Bro-1L/2015	Bursa Fabrisius udematous, bengkak.	12%	Tidak vaksin
5	Lampung/Bro-2L/2015	Bursa Fabrisius normal.	Kematian meningkat	Tidak Vaksin
6	Lampung/Bro-3L/2015	Bursa Fabrisius normal.	Kematian meningkat	Tidak vaksin
7	Lampung/Bro-4L/2015	Bursa Fabrisius normal.	Kematian meningkat	Tidak vaksin
8	Lampung/Bro-5L/2015	Bursa Fabrisius normal.	Kematian meningkat	Tidak vaksin
9	Fung/Lay-SLM-DIY-BF1/2015	Hemoragi paha, Bursa bengkak, udematososa, perdarahan.	5%	Vaksinasi 2 kali
10	Fung/Lay-SLM-DIY-BF2/2015	Hemoragi paha, Bursa bengkak, udematososa, perdarahan.	5%	Vaksinasi 2 kali
11	Fung/Lay-SLM-DIY-BF3/2015	Hemoragi paha, Bursa bengkak, udematososa, perdarahan.	5%	Vaksinasi 2 kali

sisi HVR dilakukan dengan pesejajaran berganda nukleotida hasil pengurutan DNA, prediksi amino, homologi, dan konstruksi pohon kekerabatan dengan data nukleotida virus IBD terpilih yang telah dideposisi pada Genbank, seperti tercantum pada Tabel 2. Hasil pesejajaran isolat yang diteliti dengan virus IBD terpilih (Gambar 2) didapatkan hasil sebagai berikut: fragmen PBC adalah bagian hidrofilik A merupakan asam amino nomer 219 sampai 224, isolat yang diteliti: Lampung/Bro-1L/2015 dan Fung/Lay-SLM-DIY-BF1/2015 mempunyai asam amino yang sesuai dengan isolat vvIBD virus referensi, maupun virus IBD yang telah dilaporkan di Indonesia, yaitu: QYQAGG. Sedangkan tiga isolat lainnya Yanti/Lay-SLM-DIY dan Potrowangsan/Lay-SLM-DIY tidak diketahui dengan pasti karena data urutan DNA dalam penelitian ini tidak konfidens, sehingga penomoran dimulai dari nomor 229, 249, dan 229. Posisi PDE yang berada pada asam amino nomor 249 sampai 254 menunjukkan semua isolat yang diteliti bersifat lestari, sesuai dengan virus vvIBD referensi, yaitu: QTSVQG. Posisi asam amino nomor 283 sampai 287 yang merupakan fragmen PFG, bersifat lestari dan sesuai virus vvIBD referensi, yaitu: TAGTD, sedangkan daerah hidrofobik B merupakan fargmen PHI posisi asam amino nomer 316 sampai 325 adalah: KSGGQAGDQM pada semua virus IBD yang diteliti bersifat lestari. Fragmen yang

diketahui sebagai serine-rich position merupakan downstream hidrofilik B adalah SWSASGSL juga diketahui bersifat lestari.

Residu asam amino penting yang dilaporkan sebagai marker virulensi virus vvIBD adalah posisi 222, 242, 256, 294, dan 299. Hasil pesejajaran isolat IBD yang diteliti diketahui bahwa lima isolat pada umumnya mempunyai urutan asam amino nomer 222(A), 242 (I), 256 (I), 294 (I), dan 199 (S), kecuali posisi 222 isolat virus IBD (Potrowangsan/Lay-SLM-DIY, SR/Lay-WNO-DIY, dan Yanti/Lay-SLM-DIY tidak teridentifikasi karena data urutan DNA tidak konfidens). Sedangkan dua isolat, yaitu: Potrowangsan/Lay-SLM-DIY dan SR/Lay-WNO-DIY teridentifikasi asam amino nomor 256 (V), 292 (I), dan 299 (N). Asam amino residu 242 adalah (V) untuk isolat Potrowangsan/Lay-SLM-DIY, sedangkan untuk isolat SR/Lay-WNO-DIY residu 242 tidak teridentifikasi, karena keterbatasan hasil urutan DNA.

Hasil analisis menunjukkan bahwa virus IBD SR/Lay WNO-DIY/2013 dan IBD Potrow/Lay SLM-DIY/2013 menunjukkan data urutan DNA yang berdekatan dengan virus IBD-Ind13 yang telah dikarakterisasi sebagai IBD strain klasik. Kedua virus tersebut dalam analisis pohon kekerabatan membentuk kluster bersama-sama dengan virus vaksin tipe klasik dan virus lapangan yang telah dikarakterisasi sebagai virus IBD tipe klasik. Lima

Tabel 2 Data virus IBD yang telah dideposisi di *genebank* dan digunakan dalam analisis pada penelitian ini

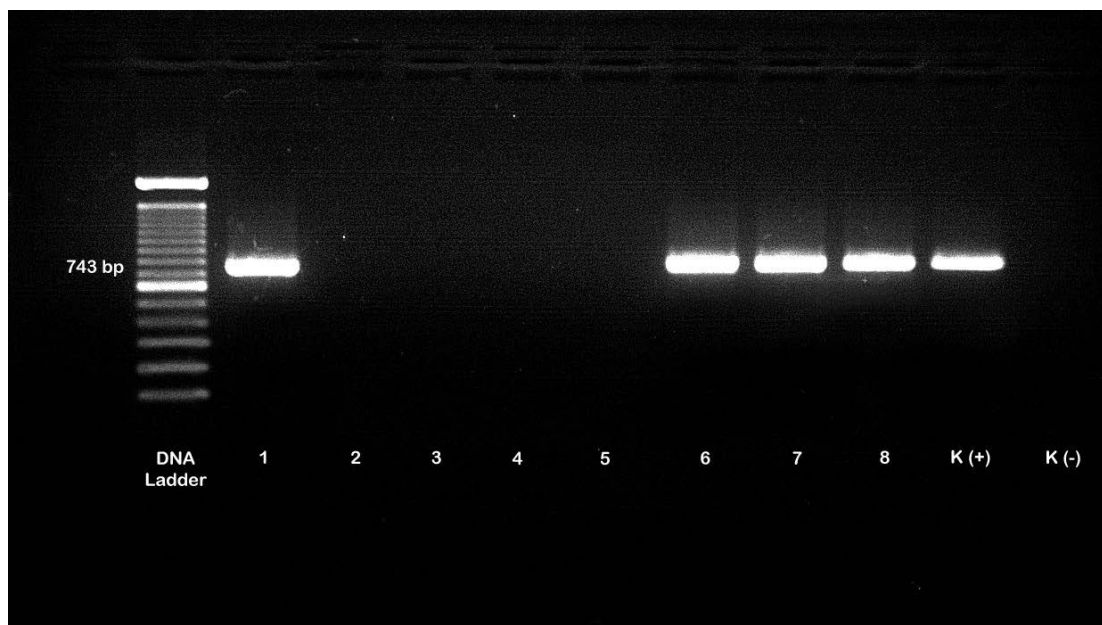
No.	Nomer akses genebank	Kode/stain	Keterangan
1	Z.25480	UK 661/JY86	vvIBD Reference strain
2	AF.159212	N10	vvIBD
3	AJ.249520	JKI/97	vvIBD
4	AI.076288	D11-2	vvIBD
5	AJ.249578	HR1/96	vvIBD
6	D.16679	Lukert	Classical strain
7	D.00499	SCT	Classical strain
8	D.16828	GBF-1	Classical strain
9	D.00869	52/70	Classical strain
10	AF.508741	IBD-Ind4	Indonesian vvIBD like strain
11	AF.508742	IBD-Ind5	Indonesian vvIBD
12	AF.508744	IBD-Ind7	Indonesian vvIBD
13	AJ.249518	HR1/96	vvIBD
14	AF.508739	IBD-Ind2	Indonesian vvIBD
15	AF.508747	IBD-Ind10	Indonesian vvIBD
16	AF.508750	IBD-Ind14	Indonesian vvIBD like strain
17	AF.508738	IBD-Ind1	Indonesian vvIBD
18	AF.508748	IBD-Ind11	Indonesian vvIBD like strain
19	AF.076228	D11-2	vvIBD
20	Y.14962	D78	Classical cell culture adapted strain
21	AJ.586966	228E	Vaccine strain
22	D.00869	52/70	Classical strain
23	D.16679	Lukert BP	Classical cell culture adapted strain
24	D.16828	GBF-1	Classical strain
25	D.00499	IBD STC	Classical strain
26	AF.508749	IBD-Ind13	Indonesian classical strain
27	AJ.878908	IBD 002/73	Australian strain

isolat virus lainnya mempunyai kedekatan urutan DNA dengan virus yang diklasifikasikan sebagai virus IBD virulen atau vvIBD (IBD-Ind1) dan Indonesian vvIBD like strain (IBD-Ind11). Hasil konstruksi pohon kekerabatan kelima virus tersebut membentuk kluster bersama sama dengan virus referensi vvIBD dan virus IBD yang telah dikarakterisasi sebagai vvIBD dan vvIBD like strain. Hasil analisis pohon kekerabatan virus IBD yang diteliti dengan virus IBD terpilih dapat dicermati pada Gambar 3.

## PEMBAHASAN

Konfirmasi diagnostik dengan mengamplifikasi genom virus IBD, telah banyak dilakukan oleh para peneliti (Ashraf *et al.*, 2007; Chao *et al.*, 1998;

Kataria *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 1994; Sapats & Ignjatovic, 2002). Pada penelitian ini konfirmasi diagnostik dilakukan dengan mengamplifikasi fragmen gen VP-2 virus IBD dari kasus terdiagnosis penyakit IBD dengan primer spesifik (Sapats and Ignjatovic, 2002). Pada umumnya identifikasi virus IBD banyak difokuskan pada amplifikasi gen VP2, meskipun Lin *et al.* (1994) mengembangkan teknik multipleks PCR untuk membedakan serotipe virus IBD dengan mengamplifikasi tidak hanya gen VP-2 tetapi juga gen VP-4. Sejauh ini protein VP-2 dianggap penting karena mempunyai tapak antigenik yang bertanggung jawab dalam menstimulasi antibodi netralisasi sehingga dapat menimbulkan antibodi yang bersifat imuno-protektif (van den Berg, 2000) serta berperan penting dalam determinasi serotipe virus



Gambar 1 Hasil elektroforesis RT-PCR fragmen VP-2 gene virus IBD, teramati pita DNA pada posisi 740 bp. Lubang 1 kode IBD-Lampung/Bro/1L, Lubang 6 kode IBD-Fung/Lay-SLM-DIY-BF1, lubang 7 kode IBD-Fung/Lay-SLM-DIY-BF2, dan lubang 8 kode IBD-Fung/Lay-SLM-DIY-BF3 menunjukkan hasil positif. Lubang K (+) adalah kontrol positif, dan K (-) adalah kontrol negatif. Lubang 2, 3, 4, dan 5 berturut-turut sampel kode IBD-Lampung/Bro/2-L, 3-L, 4-L, dan 5-L menunjukkan hasil negatif.

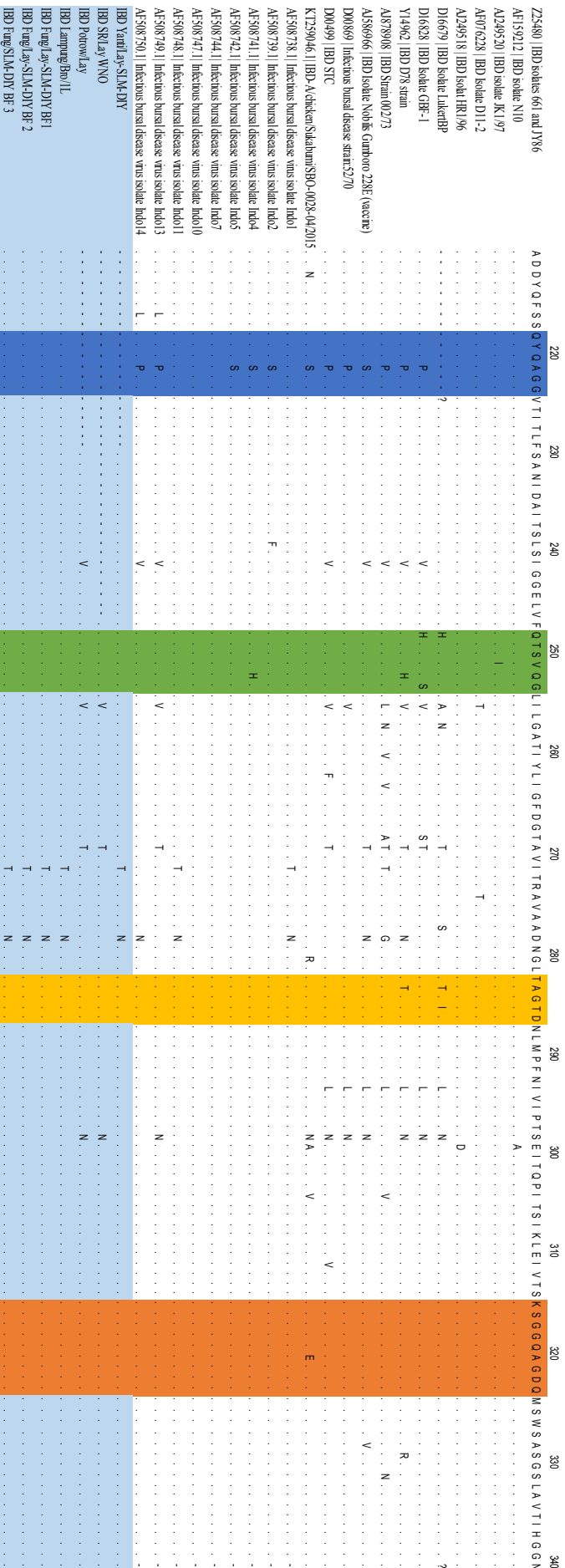
IBD (Becht et al., 1988). Teknis diagnosis molekuler tersebut dewasa ini, juga menjadi pilihan karena kemampuan deteksi sangat akurat, sensitif, cepat, dan dapat digunakan menggantikan diagnosis mikrobiologi *in vivo* dan *in vitro* (Lin et al., 1994; Barlic-Maganja et al., 2002). Di samping itu, teknis molekuler juga dapat diaplikasikan untuk mendeteksi virus IBD yang diekstraksi dari berbagai organ dan leukosit oleh Barlic-Maganja et al. (2002).

Dari sebelas sampel yang diperiksa tujuh sampel positif teridentifikasi sebagai virus IBD dan 4 sampel menunjukkan hasil negatif. Sampel positif pada umumnya memang menunjukkan perubahan patologi makroskopis yang spesifik yaitu: kebengkakan dan atau udem pada Bursa Fabricius. Di samping itu, ditemukan lesi perdarahan titik pada otot paha dan dada, yang juga indikatif sebagai lesi penyakit IBD. Lesi tersebut sesuai dengan laporan Wahywardani et al. (2011), dan van der Berg et al. (2000). Empat sampel yang menunjukkan hasil negatif, memang sesuai dengan data kasusnya bahwa ke empat sampel tersebut tidak ditemukan lesi khas penyakit IBD, meskipun dilaporkan ada peningkatan kematian ayam.

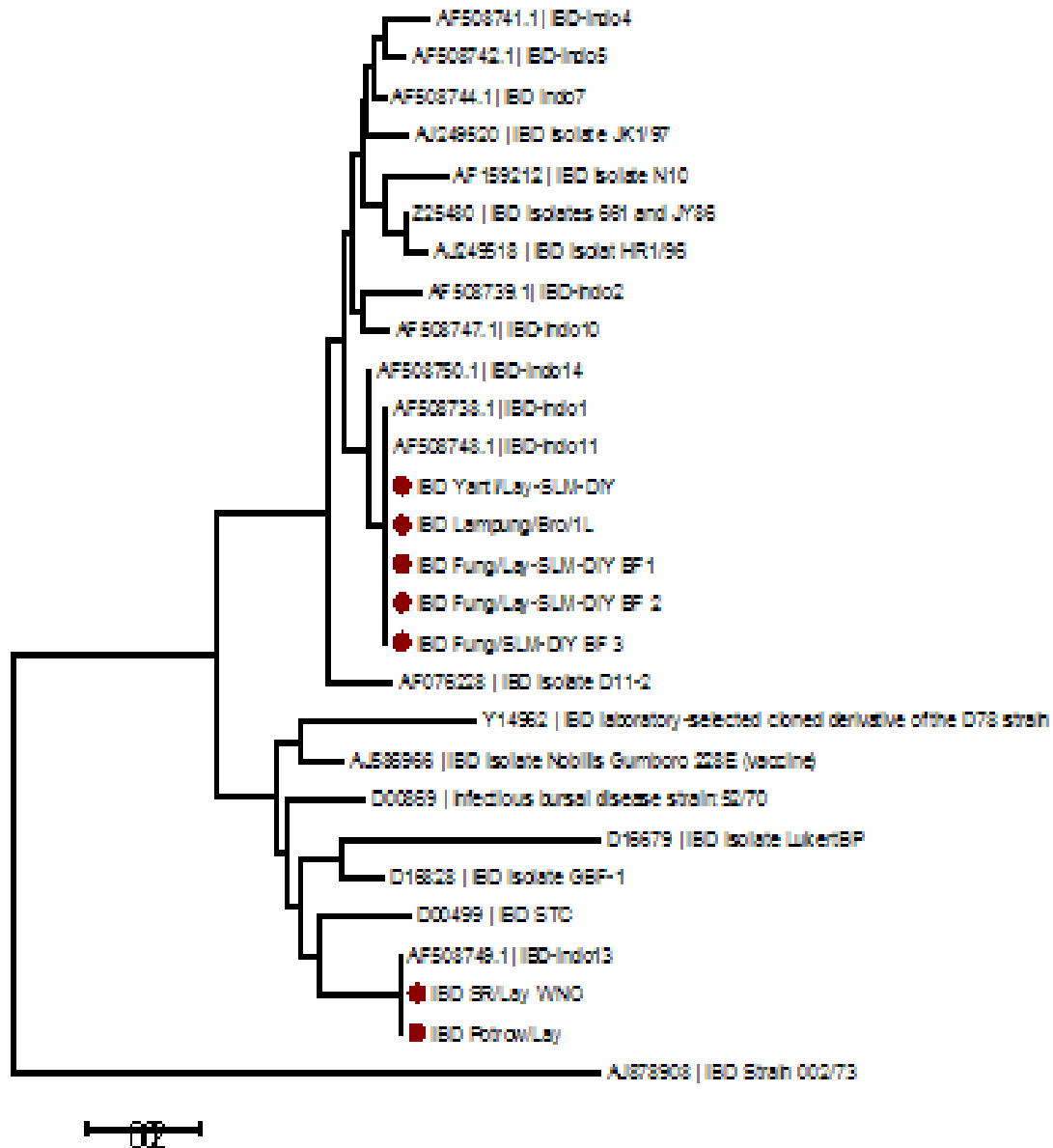
Hasil pesejajaran gen VP-2 tujuh isolat virus IBD dengan virus referensi *very virulent* IBD (vvIBD) UK 661, virus yang dilaporkan sebagai virus vvIBD, virus strain klasik, serta virus vaksin yang telah dipublikasi di Genbank menunjukkan bahwa daerah hidrofilik

A atau loop P<sub>BC</sub>, P<sub>DE</sub>, P<sub>FG</sub>, dan hidrofilik B atau loop P<sub>HI</sub> masing-masing mempunyai asam amino yang bersifat lestari. Loops hidrofilik A dan B dilaporkan merupakan daerah yang mempunyai peran antibodi netralisasi (Mahgoub, 2012). Menurut Nagarajan & Kibenge, (1997) di samping daerah hidropilik A dan B tersebut, loop P<sub>DE</sub> dikenali sebagai hidrofilik C, sedangkan loop P<sub>FG</sub> dikenal sebagai daerah hidrofilik D. Pada umumnya perubahan asam amino pada kedua daerah tersebut yang teramati pada beberapa strain virus IBD berhubungan dengan karakter antigenik dan variasi virulensi virus IBD (Nagarajan & Kibenge, 1997). Hasil analisis *downstream* dari daerah hidrofilik B dari virus yang diteliti menunjukkan adanya urutan DNA yang merupakan *serine-rich* heptapeptida, yaitu asam amino SWSASGSL. Konfigurasi asam amino tersebut dapat ditemukan pada virus vvIBD, klasik, dan varian strain yang pada umumnya mempunyai 4 residu serin pada daerah tersebut (Ji-Yong et al., 2005). Lebih lanjut dijelaskan bahwa konfigurasi tersebut diperkirakan mempunyai peran dalam virulensi virus IBD.

Sejauh ini telah dilaporkan terdapat empat residu asam amino yang dikenali sebagai marker patogenisitas virus IBD, yaitu 222(A), 242(I), 256(I), 294(I), dan 299(N) yang pada umumnya dilaporkan bersifat lestari diantara virus vvIBD (Kim et al., 2010). Lebih lanjut Kim et al. (2010) menyatakan bahwa asam amino tersebut jika ditempati oleh



Gambar 2. Hasil *multiple alignment* fragmen gen VP-2 HPR posisi asam amino 320 sampai 340 penomeran menurut Mahgoub (2012). Warna biru adalah bagian hidrofilik A ( $P_B$ ) asam amino 219-224, warna hijau adalah  $P_{DE}$  dengan asam amino 249-254, warna kuning adalah PFC dengan asam amino nomor 283-287, dan warna coklat adalah bagian hidrofilik B ( $P_{HI}$ ) dengan asam amino nomor 316-325. Isolat yang diteliti diblok berwarna biru muda.



Gambar 3 Pohon kekerabatan fragmen gen VP-2 virus IBD, dikonstruksi dengan Neighbor-Joining tree program MEGA-6 dengan bootstrap 1000 kali, serta dirunut dari virus IBD 002/73 yang merupakan virus Australian strain. Virus yang diteliti dengan tanda warna merah.

222(P), 242(V), 256(V), dan 299(N) merupakan ciri virus IBD strain klasik. Hasil pesejajaran menunjukkan bahwa lima isolat yang diteliti IBD Yanti/Lay-SLM-DIY, IBD Lampung/Bro/IL, IBD Fung/Lay-SLM-DIY-BF1, IBD Fung/Lay-SLM-DIY-BF2, dan IBD Fung/Lay-SLM-DIY-BF3 mempunyai ciri marker patogenisitas molekuler sebagai virus vvIBD, sedangkan dua virus IBD SR/Lay-WNO-DIY dan IBD Potrow/Lay-SLM-DIY mempunyai ciri sebagai virus IBD tipe klasik. Di samping itu, telah dilaporkan pula bahwa asam amino posisi 253(H) dan 284 (T) merupakan asam amino khas yang biasanya dilaporkan dari strain vaksin IBD yang telah diatenuasikan (Mohamed et al., 2016). Hasil pesejajaran menunjukkan

bahwa asam amino posisi 253 semua isolat yang diteliti konsisten ditempati oleh -Q (glutamat), sedangkan asam amino 284 adalah A (alanin). Berdasarkan konsensus tersebut maka isolat yang diteliti tidak terindikasi sebagai virus vaksin. Posisi asam amino nomor 279 dua isolat SR/Lay-WNO-DIY dan Potrow/Lay-SLM-DIY mempunyai asam amino-D (Aspartat), sedangkan 5 isolat sisanya 279 diisi oleh N (Asparagin). Mutasi D-279-N yang terdapat pada beberapa isolat yang diteliti menunjukkan hasil yang sama yang telah dilaporkan oleh Parede et al. (2003), yang mengklasifikasikan isolat dengan mutasi tersebut sebagai *Indonesian vvIBD like strain*. Menurut Brandt et al. (2001) asam amino po-



sisi (Q) 253, (D)279, dan (A)284 tersebut bertanggung jawab dalam tropisme virus IBD strain virulen.

Hasil analisis pohon kekerabatan menunjukkan bahwa isolat virus IBD yang diteliti membentuk dua kluster yang berbeda ketika dirunut dari virus IBD tipe Australia (strain 002/73) sebagai out grup. Virus IBD SR/Lay-WNO-DIY dan IBD Potrow/Lay-SLN-DIY membentuk kluster yang berbeda dengan lima virus yang diteliti lainnya. Kedua virus tersebut sangat berdekatan dengan virus IBD-Indo 13 yang dikarakterisasi sebagai virus IBD tipe klasik (Parede *et al.*, 2003) serta berkelompok dengan virus yang tergolong tipe klasik lainnya. Lima virus lainnya yaitu IBD Yanti/Lay-SLM-DIY, IBD Lampung/Bro/IL, IBD Fung/Lay-SLM-DIY-BF1, BF2 dan BF3, membentuk kluster bersama sama dengan virus yang dilaporkan sebagai virus vvIBD. Kelima virus yang diteliti ini menunjukkan kedekatan genetik dengan virus IBD Indo-1 yang keduanya telah dikarakterisasi sebagai Indonesia vvIBD dan berdekatan juga dengan IBD Indo-11 yang dikarakterisasi sebagai Indonesia vvIBD like strain (Parede *et al.*, 2003). Homologi diantara fragmen gen VP-2 antara Indo-1 dan Indo-11 dengan kelima isolat yang telah diketahui sebagai vvIBD adalah sangat tinggi, yaitu mencapai 100%, sedangkan jika dibandingkan dengan 2 isolat yang termasuk virus IBD klasik mempunyai homologi sebesar 94%. Perbandingan kelima isolat vvIBD strain Indonesia dalam penelitian ini dengan virus vaksin strain Lukert menunjukkan homologi 87%, jika dibandingkan dengan strain Gumboro 228E mempunyai homologi 89 %, sedangkan homologi dengan strain D78 adalah 91%. Data beberapa isolat dalam penelitian ini diketahui berasal dari peternakan ayam komersial yang divaksinasi, namun tidak ada informasi strain vaksin yang digunakan, sehingga tidak diketahui jarak genetik antara virus yang diisolasi dengan bibit vaksin.

Sampel Bursa Fabricius terdiagnosis penyakit IBD yang dikoleksi dari peternakan ayam komersial dapat diidentifikasi dan ditentukan penyebabnya sebagai virus IBD berdasarkan hasil amplifikasi fragmen gen VP-2. Hasil analisis urutan DNA penanda patogenesis molekuler menunjukkan virus IBD virulen. Analisis pohon kekerabatan 2 isolat IBD SR/Lay-WNO-DIY dan IBD Potrow/Lay-SLN-DIY termasuk dalam kelompok virus IBD tipe klasik, sedangkan lima virus lainnya, yaitu: IBD Yanti/Lay-SLM-DIY; IBD Lampung/Bro/IL; IBD Fung/Lay-SLM-DIY-BF1, IBD Fung/Lay-SLM-DIY-BF2, dan IBD Fung/Lay-SLM-DIY-BF3 termasuk dalam kelompok virus vvIBD strain Indonesia.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Dekan FKH UGM yang telah mengalokasikan dana penelitian melalui Hibah Pengembangan Bagian FKH UGM tahun 2016 dengan kontrak: 1690 /J01.1.22/ HK4/2016.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ashraf S, Tang Y, Saif M. 2007. Development of differential RT-PCR assays and molecular characterization of the complete VP1 gene of five strains of very virulent infectious bursal disease virus. *Avian Disease* 51(4): 935-941.
- Barlic-Maganja D, Zorman-Rojs O, Grom J. 2002. Detection of infectious bursal disease virus in different lymphoid organ by single-step reverse transcriptase polymerase chain reaction and microplate hybridization assay. *The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 14: 243-246.
- Bayliss CD, Spies U, Shaw K, Peters RW, Papagiorgiou A, Muller H, Bournsnel EG. 1990. Comparison of the sequences of segment a of four infectious bursal disease virus strains and identification of a variable region in VP-2. *Journal of General Virology* 71: 1303-1312.
- Becht H, Muller H, Muller HIS. 1998. Comparative studies of structural and antigenic properties of two serotype of infectious bursal disease virus. *Journal of General Virology* 69: 631-640.
- Brandt M, Yao K, Liu M, Heckert RA, Vakharia VV. 2001. Molecular determination of virulence, cell tropism, and pathogenic phenotype of infectious bursal disease virus. *Journal of Virology* 75(24): 11974-11982.
- Cao YC, Young WS, Law M. 1998. Molecular characterization of seven chinese isolates of infectious bursal diseases virus: classical, very virulent and variant strain. *Avian Disease* 42: 340-351.
- Etarradossi N. 1995. Progress in the diagnosis and prophylaxis of infectious bursal disease in poultry. *Comprehensive Report on Technical Items Presented to the International Committee or to Regional Commission* p75-82.
- Faragher JT. 1972. Infectious bursal disease of chicken. *The Veterinary Bulletin* 42: 361-369.
- Ji-Young Z, Ju-Xiu Y, Wei-Cheng Y, Qing-Xin C, Xiao-Juan Z, Jun-Qin G. 2005. Antigenic and molecular characterization of infectious bursal disease virus in china from layer chicken flocks. *Progress in Biochemistry and Biophysics* 32(1): 37-44.

- Kataria RS, Tiwari AK, Nanthakumar T, Goswani PP. 2001. One-step RT-PCR for the detection of infectious bursal disease virus in clinical samples. *Veterinary Research Communications* 25(5): 429-436.
- Kim HR, Kwon YK, Bae YC, Oem JK, Lee OS. 2010. Genetic characteristics of virion protein 2 genes of infectious bursal disease viruses isolated from commercial chickens with clinical disease in South Korea. *Poultry Science* 89: 1642-1646
- Lasher HN, Davis VS. 1997. History of infectious bursal disease in the USA. The first of two decades. *Avian Disease* 41: 11-19.
- Lin TL, Wu CC, Rosenberger JK, Saif YM, 1994. Rapid differentiation of infectious bursal disease virus serotypes by polymerase chain reaction. *The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 6: 100-102.
- Mahardika IGNK, Parede L. 2008. Analisis filogenik sekuen nukleotida bagian hipervariabel protein VP2 virus gumboro isolat Indonesia. *Jurnal Veteriner* 9(2): 60-64
- Mahgoub HA. 2012. An overview of infection bursal disease. *Archives of Virology* 157: 2047-2057
- Mohamed MA, Elzanaty KES, Bakhit BM, Safwat MM. 2014. Genetic characterization of infectious bursal disease viruses associated with gumboro outbreaks in commercial broilers from Asyut Province, Egypt. *ISRN Veterinary Science*. 1-9.
- Nagarajan MM, Kibenge FSB. 1997. Infection bursal disease virus: a review of molecular basis for variation in antigenicity and virulence. *The Canadian Journal of Veterinary Research* 61: 81-88
- Parede LH, Sapat S, Gould G, Rudd M, Lowther S, Ignjatovic J. 2003. Characterization on infection bursal disease virus isolates from Indonesia indicates the existence of very virulent strains with unique genetic changes. *Avian Pathology* 32(5): 511-518
- Rudd MF, Heine HG, Sapats SI, Parede L, Ignjatovic J. 2002. Characterization of an Indonesian very virulent strains of infectious bursal disease virus. *Archives of Virology* 147: 1303-1322.
- Sapats SI, Ignjatovic J. 2002. Restriction fragment length polymorphism analysis of the VP2 gene of Australian strains of infectious bursal disease virus. *Avian Pathology* 31: 559-566
- van den Berg TP. 2000. Acute infectious bursal disease in poultry: a review. *Avian Pathology* 29: 175-194.
- van der Berg TP, Eterradossi N, Toquin D, Meulemans G. 2000. Infectious bursal disease (gumboro disease). *Revue Scientifique et Technique* 19 (2): 527-543.
- Wahyuwardani S, Agungpriyono DR, Parede L, Manalu W. 2011. Penyakit gumboro: etiologi, epidemiologi, patologi, diagnosis dan pengendaliannya. *Wartazoa* 21(3): 114-124.