

# Pendekatan Molekuler untuk Identifikasi dan Karakterisasi Virus Marek Serotipe 1

Risza Hartawan dan NLPI Dharmayanti

Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl. RE Martadinata No. 30, Bogor 16114  
[rjoss.dvm@gmail.com](mailto:rjoss.dvm@gmail.com)

(Diterima 29 Desember 2014 – Direvisi 12 Februari 2015 – Disetujui 20 Februari 2015)

## ABSTRAK

Penyakit Marek merupakan salah satu penyakit pada peternakan ayam komersial yang mengakibatkan kerugian ekonomi sangat tinggi. Penyakit ini ditandai dengan sindrom kelumpuhan dan pembentukan tumor/neoplasia pada berbagai macam organ dan jaringan induk semang. Penyakit ini disebabkan oleh *Marek's disease virus* serotipe 1 (MDV-1). Meskipun penyakit ini sudah dapat dikendalikan dengan vaksinasi, namun munculnya beberapa kasus pada *flock* ayam yang sudah divaksinasi menunjukkan evolusi virus MDV-1 menjadi lebih patogen. Monitoring dinamika penyakit di lapangan sangat penting dilakukan untuk menentukan arah kebijakan pengendalian penyakit yang lebih efektif. Naskah ini menguraikan beberapa metode molekuler yang dikembangkan untuk identifikasi dan karakterisasi virus MDV-1. Identifikasi dan karakterisasi *strain* virus baru di lapang dapat dilakukan dengan ujiantang secara *in vivo* yang merupakan uji konvensional terutama untuk penentuan level patogenitas. Namun, uji ini membutuhkan beberapa tahap pengujian dengan waktu yang relatif lama. Pengembangan metode lain yang lebih praktis dan cepat dilakukan dengan menggunakan pendekatan biologi molekuler. Beberapa metode molekuler yang dikembangkan telah mencapai hasil yang memuaskan dan telah diterapkan baik untuk laboratorium dan kegiatan di lapang.

**Kata kunci:** *Marek's disease virus* serotipe 1, identifikasi, karakterisasi, molekuler

## ABSTRACT

### Identification and Characterization of Marek's Disease Virus Serotype 1 Using Molecular Approaches

Marek's disease is an important disease in the commercial poultry farm and causes significant economical loss. The disease is characterized by syndrome of paralysis and neoplastic formation in various organs and tissues in the host. The etiological agent is Marek's disease virus serotype 1 (MDV-1). Eventhough the outbreaks in the field are well controlled by vaccination, several cases in the vaccinated flocks indicating virus evolution into more pathogenic strains. Therefore, monitoring of the disease circumstance in the field is indispensable for guiding better policies in disease controlling program. This paper describes several molecular methods that have been developed for identification and characterization of MDV-1. The identification and characterization of newly found virus strain in the field can be done by *in vivo* challenge test which is a conventional method especially to determine pathogenicity. However, this method requires several stages with time consuming procedures. The development of alternative methods for identification and characterization of MDV-1 viruses has been conducted mainly using molecular biology approach. Several molecular methods give satisfying result and have been implemented in both laboratory and field condition.

**Key words:** Marek's disease virus serotype 1, identification, characterization, molecular

## PENDAHULUAN

Penyakit Marek merupakan salah satu penyakit neoplasia pada ayam yang ditandai dengan lesi proliferasi pada sel T *lymphoma* pada sistem syaraf perifer berbagai organ dan jaringan, termasuk jaringan iris dan kulit (Baigent & Davidson 2004). Agen penyebabnya adalah *Marek's disease virus* serotipe 1 (MDV-1) yang merupakan virus DNA dari genus *Mardivirus*, subfamili *Alphaherpesvirinae* (Davison 2010). Selain menginduksi pembentukan tumor pada berbagai organ dan jaringan, virus MDV-1 juga dapat menginduksi sindrom gejala penyakit lainnya, seperti

*transient paralysis, early mortality syndrome, cytolitic infection, arteriosclerosis* dan *persistent neurological disease* (Schat & Nair 2008). Penyakit ini pertama kali diidentifikasi oleh József Marek tahun 1907 dan telah menyebar luas ke berbagai wilayah di dunia yang mengakibatkan kerugian ekonomi yang sangat signifikan pada peternakan ayam komersial seperti layer dan broiler akibat kematian, proses afkir maupun tingkat produktivitas yang rendah (Biggs & Nair 2012). Kasus Marek di Indonesia sudah pernah dilaporkan dan penelitian penyakit ini masih terus dilakukan (Damayanti & Wiyono 2003; Hartawan & Dharmayanti 2013).

Penyebaran penyakit terjadi secara horizontal melalui inhalasi partikel virus yang infeksi ke dalam sistem pernafasan ayam. Sumber utama penularan adalah rontokan kulit dan keratin, terutama dari jaringan epitel folikel bulu (*feather follicle epithelium*, FFE) (Islam & Walkden-Brown 2007; Islam et al. 2008; 2013). Penularan penyakit dapat terjadi melalui kontak langsung dengan ayam yang terinfeksi maupun secara tidak langsung melalui bahan-bahan yang tercemar seperti peralatan kandang, sekam, debu dan patahan bulu. Infeksi virus MDV-1 akan selalu berulang kali terjadi (*persistent*) dalam jangka waktu yang relatif lama pada lingkungan yang terkontaminasi, karena partikel virus yang ada pada jaringan FFE sangat tahan pada kondisi lingkungan (Beasley et al. 1970).

Pengendalian penyakit Marek di peternakan ayam komersial dilakukan melalui program vaksinasi sejak tahap penetasan menggunakan beberapa macam tipe vaksin seperti *herpesvirus of turkey* (HVT), *Gallid Herpesvirus 3* (GaHV3) maupun MDV-1 atenuasi (Bublott & Sharma 2004). Meskipun kasus penyakit Marek dapat dikendalikan dengan program vaksinasi, namun laporan kejadian kasus masih sering terjadi di lapangan karena vaksinasi tidak 100% efektif mencegah infeksi virus di lapangan (Arulmozhi et al. 2011; Gong et al. 2013; Hassanin et al. 2013). Penerapan program vaksinasi juga diduga memicu terjadinya evolusi virus MDV-1 menjadi lebih patogen (Gimeno 2008).

Monitoring dinamika penyakit Marek di lapangan sangat penting untuk dilakukan dalam rangka mewaspadai munculnya patotipe baru yang dapat menyebabkan kegagalan program vaksinasi. Namun, penggunaan vaksin atenuasi MDV-1 *strain* CVI988 *Rispens* telah menyebabkan kesulitan diagnosis untuk membedakan antara *strain* vaksin dan *strain* lapang. Meskipun diferensiasi diantara kedua *strain* tersebut dapat dilakukan dengan uji patogenitas secara *in vivo*, namun memerlukan fasilitas laboratorium yang lengkap, waktu yang relatif lama dan biaya yang sangat besar (Witter et al. 2005; Schat & Nair 2008). Beberapa penelitian telah dilakukan dalam rangka mendapatkan metode identifikasi dan karakterisasi virus MDV-1 yang lebih ideal (Becker et al. 1992; Handberg et al. 2001; Islam et al. 2006; Angamuthu et al. 2012; Renz et al. 2013). Penulisan makalah ini bertujuan untuk membahas berbagai macam metode identifikasi dan karakterisasi virus MDV-1 yang telah dikembangkan, terutama dengan pendekatan biologi molekuler. Makalah ini diharapkan dapat memberikan wawasan untuk pengembangan metode uji identifikasi dan karakterisasi penyakit Marek yang lebih ideal, efektif dan efisien baik dalam rangka monitoring dinamika penyakit di lapangan maupun kegiatan penelitian penyakit di tingkat laboratorium.

## KARAKTER BIOLOGI MAREK'S DISEASE VIRUS

### Etiologi, taksonomi dan morfologi *Marek's disease virus*

Etiologi agen penyebab penyakit Marek adalah MDV-1 atau disebut juga *Gallid Herpesvirus 2* (GaHV2) yang bersifat *highly cell-associated* dari genus *Mardivirus*, subfamili *Alphaherpesvirinae* (Schat & Nair 2008). Dua serotipe lainnya dari genus *Mardivirus* yang juga bersirkulasi pada ayam, namun bersifat non-patogenik dan non-onkogenik yaitu *Marek's disease virus* serotipe 2 (MDV-2) atau disebut juga sebagai GaHV3 (Davison 2010), serotipe 3 yaitu HVT atau *Meleagird herpesvirus 1* (MeHV1) juga bersifat non-patogenik atau non-onkogenik baik pada ayam maupun kalkun (Davison 2010).

Morfologi virus MDV-1 dan dua serotipe lainnya memiliki karakteristik seperti khasnya kelompok *herpesvirus* (Kato & Hirai 1985). Penampakan *virion* pada jaringan kultur mempunyai nukleokapsid berbentuk *hexagonal* dengan diameter sekitar 85-100 nm dan diselubungi oleh bagian amplop berukuran sekitar 150-160 nm. Sementara itu, penampakan virus pada jaringan FFE terlihat mempunyai amplop yang berbentuk tidak beraturan (*amorphous*) dengan diameter yang lebih besar sekitar 273-400 nm (Calnek et al. 1970).

### Genom virus *Marek's disease virus* serotipe 1

Genom virus MDV-1 berbentuk *linear double-stranded* DNA dengan panjang keseluruhan sekitar 160-180 kbp. Struktur genom *Mardivirus* termasuk MDV-1, GaHV3 dan HVT dengan karakteristik tipe E *Alphaherpesvirus* dicirikan dengan dua *region* besar yaitu *unique long* ( $U_L$ ) dan *unique short* ( $U_S$ ) (Osterrieder & Vautherot 2004). Kedua bagian tersebut diapit dan dipisahkan oleh empat bagian *inverted repeat* yaitu *terminal repeat long* ( $T_{RL}$ ), *internal repeat long* ( $I_{RL}$ ), *internal repeat short* ( $I_{RS}$ ) dan *terminal repeat short* ( $T_{RS}$ ). Skema genomik virus MDV-1 disajikan pada Gambar 1.

Genom beberapa *strain* virus MDV-1 seperti Md5 (177874 bp), GA (174077 bp), BAC *clone* Md11 (178632 bp) dan BAC *clone* CVI988 (178311 bp) telah disekuensing secara keseluruhan dan dapat diakses melalui *database* NCBI *Genbank* (Lee et al. 2000a; Tulman et al. 2000; Spatz et al. 2007). Selain itu, sekuen beberapa gen *strain* virus MDV-1 baik *full-gene* maupun *partial* telah diidentifikasi dan didaftarkan ke *database* NCBI *Genbank*. Struktur dan sekuen genom dari beberapa *strain* virus MDV-1 mirip antara satu



UL: *Unique long region*; US: *Unique short region*; IRL: *Internal repeat long region*; IRS: *Internal repeat short region*; TRL: *Terminal repeat long region*; TRS: *Terminal repeat short region*

**Gambar 1.** Peta genomik virus MDV-1

**Sumber:** Osterrieder & Vautherot (2004) yang dimodifikasi

dengan yang lainnya dimana perbedaan umumnya terjadi pada panjang genom yang disebabkan oleh adanya perubahan jumlah *direct repeat* pada bagian *repeat region*. Contohnya *strain* vaksin CVI988 mempunyai 14 kopi segmen 132 bp *repeats region* (TRL dan IRL) sehingga memiliki genom yang lebih panjang dibandingkan dengan *strain* lainnya seperti *strain* patogenik Md5 yang hanya mempunyai dua kopi saja (Tulman et al. 2000).

Pada genom virus MDV-1 terdapat ratusan *open reading frame* (ORF) yang mengkode gen-gen yang berperan penting dalam karakter biologi. Menurut Schat & Nair (2008) gen-gen yang dikode oleh MDV-1 dapat dikategorikan menjadi tiga yaitu, (1) Gen-gen yang homolog terhadap *Herpes Simplex Virus 1* (HSV1); (2) Gen-gen yang memiliki kemiripan dengan kedua serotipe *Mardivirus* lainnya maupun non-avian *herpesvirus* lainnya; dan (3) Gen-gen unik yang menjadi ciri khas karakteristik virus MDV-1. Sebagai contoh, virus MDV-1 *strain very virulent* mempunyai panjang genom 177874 bp yang diprediksikan mengkode sekitar 103 protein baik yang telah diketahui maupun yang belum diketahui fungsinya. Pada bagian UL terdapat 55 gen yang homolog dengan gen HSV1. *Strain* Md5 seperti halnya HVT juga mengkode gen yang homolog dengan *intra cellular protein 4* (ICP4). Sementara itu, virus MDV-1 *strain GA (virulent)* bagian UL-nya mengkode 67 ORF dimana 55 diantaranya juga bersifat homolog terhadap HSV1. Terdapat gen lipase yang mirip dengan gen MDV-2 (GaHV3) maupun *Adenovirus*. Sedangkan, gen-gen unik yang menjadi ciri khas virus MDV-1 antara lain *latency associated transcript* (LAT), *oncoprotein Marek's EcoQ* (meq, R-LORF7), *virus-encoded interleukin-8* (vIL-8, R-LORF2), *viral lipase* (v-LIP, R-LORF2), *oncogenicity-associated phosphoproteins* pp38 (R-LORF14a) dan pp24 (R-LORF14), *telomerase* RNA (vTR), CxC *chemokine*, famili gen 1.8 kb, MDV-*encoded microRNA* dan beberapa gen unik lainnya (Tulman et al. 2000).

Virus MDV-1 *strain* vaksin CVI988 *Rispens* dengan panjang genom sekitar 178311 bp menunjukkan sembilan ORF yang berbeda dengan *strain* virus lapangan yang bersifat onkogenik (Spatz et al. 2007). Gen meq *strain* CVI988 juga mengalami penambahan

nukleotida sebanyak 178 bp. Beberapa gen mengalami pemendekan seperti *large tegument protein* (UL38), vIL-8 (ORF3.0/78.0) dan gen-gen yang belum diketahui fungsinya (ORF5.5/75.91). Beberapa perubahan genetik dan substitusi asam amino menunjukkan bahwa virus MDV-1 *strain* CVI988 telah mengalami seleksi purifikasi setelah melalui serial *pasase* secara *in vitro*. Virus MDV-1 termasuk dalam kelompok virus yang stabil secara genetik, namun kejadian mutasi berulang kali terjadi. Hal ini ditandai dengan adanya evolusi virus MDV-1 secara bertahap menjadi beberapa patotipe ataupun adanya perubahan karakter biologi setelah *pasase in vitro* dan *in vivo*. Rekombinasi genetik virus MDV-1 dengan serotipe lainnya jarang terjadi meskipun fakta adanya infeksi campuran di lapangan seringkali terjadi (Buscaglia 2013). Diduga rekombinasi gen virus MDV-1 dengan *Avian Retrovirus* seperti *Avian Leukosis Virus* (ALV) dan *Reticuloendotheliosis Virus* (REV) dapat terjadi secara spontan. Kasus kejadian insersi segmen *long terminal repeat* (LTR) provirus REV ke dalam genom virus MDV-1 telah dilaporkan terjadi di lapangan (Woźniakowski et al. 2011a).

### Patogenesis dan gejala klinis penyakit Marek

Perjalanan infeksi virus MDV-1 pada induk semang (ayam) dimulai ketika virus infeksi yang terkandung dalam partikel debu terinhalasi ke dalam sistem pernafasan (Islam & Walkden-Brown 2007; Islam et al. 2013). Secara umum, infeksi virus MDV-1 secara *in vivo* dibagi menjadi empat tahap (Schat & Nair 2008). Tahap pertama adalah infeksi sitolitik awal yang bersifat produktif dengan berbagai perubahan degeneratif. Virus MDV-1 akan bereplikasi pada jaringan paru-paru dan kemudian menyebar ke organ-organ *lymphoid* melalui aktivitas sel fagosit. Setelah 3-6 hari terjadi infeksi sitolitik pada limpa, bursa *fabricius* dan timus dengan target sel limfosit B dan T. Bursa *fabricius* dan timus mengalami atrofi ringan, sedangkan limpa mengalami pembengkakan (*splénomegali*) akibat peningkatan ekspresi sitokin. *Apoptosis* sel limfosit menyebabkan terjadinya kondisi immunosupresi. Tahap kedua adalah infeksi laten pada

sel limfosit T. Infeksi laten pada ayam yang secara genetik resisten dapat berlangsung seumur hidup, dimana virus dengan konsentrasi rendah masih dapat terdeteksi pada jaringan FFE. Tahap ketiga adalah infeksi sitolitik lanjutan pada organ *lymphoid* dan *visceral* seperti ginjal, pankreas, kelenjar adrenal, proventrikulus dan lain-lain. Terjadi kondisi immunosupresi yang bersifat permanen. Namun, tahap ini tidak selalu terjadi tergantung pada faktor status kekebalan induk semang dan virulensi virus. Tahap terakhir adalah infeksi yang bersifat proliferasif pada limfosit. Kematian pada umumnya terjadi setelah tiga minggu pasca-pembentukan tumor.

Gejala klinis penyakit Marek berkaitan dengan gangguan fungsi organ akibat pembentukan tumor. Gejala klinis penyakit pada umumnya terjadi pada periode *rearing* umur 12-30 minggu, tetapi dapat pula terjadi pada umur muda 3-4 minggu (Nair et al. 2008). Gejala yang mudah teramati adalah gangguan syaraf baik paresis maupun paralisis pada tungkai kaki sebagai akibat terbentuknya tumor pada sistem syaraf perifer terutama syaraf *brachialis* dan *sciatic* (Schat & Nair 2008). Karakteristik kelumpuhan yang terjadi ditandai dengan satu tungkai kaki menghadap ke depan dan tungkai kaki yang lainnya menghadap ke belakang. Pada beberapa kasus di lapangan, gejala tremor dan tortikolis dapat teramati. Gangguan pada *nervus vagus* menyebabkan kesulitan untuk makan dan menelan sehingga ayam menjadi kelaparan dan dehidrasi. Penyebaran penyakit pada mata menyebabkan terjadinya kebutaan yang ditandai dengan perubahan warna mata menjadi abu-abu, baik sebelah maupun keduanya. Gejala tidak spesifik yang terjadi antara lain penurunan berat badan, kepuatan, tidak mau makan dan diare. Kondisi depresi dan koma terjadi menjelang kematian. Pada saat nekropsis, perubahan patologi anatomi yang tampak berupa pembentukan tumor pada organ *visceral*, sistem syaraf dan folikel bulu pada kulit (Schat & Nair 2008).

## IDENTIFIKASI DAN KARAKTERISASI MAREK'S DISEASE VIRUS

### Teknik diagnosis penyakit Marek

Penyakit Marek tersebar luas di lapangan, namun hanya sedikit yang bermanifestasi menjadi wabah. Diagnosis penyakit Marek di lapangan cukup menyulitkan dan kompleks, dimana belum ada metode identifikasi penyakit yang menjadi "*gold standard*" (Schat & Nair 2008). Kesulitan diagnosis terjadi karena tidak adanya gejala patognomonis bentuk tumor yang ditimbulkan. Selain itu, terdapat beberapa virus penyebab tumor yang lainnya seperti ALV dan REV yang juga bersirkulasi pada peternakan ayam komersial (Buscaglia 2013). Menurut Schat & Nair (2008)

diagnosis penyakit Marek secara umum dibagi menjadi tiga kategori utama, yaitu (1) Sejarah peternakan, gejala klinis dan perubahan patologi anatomi; (2) Gambaran histologi, sitologi dan histokimia; dan (3) Kriteria virologi. Untuk kategori ketiga, pada prinsipnya adalah identifikasi keberadaan virus MDV-1 pada sampel yang diperiksa. Beberapa metode yang dapat digunakan adalah isolasi virus, deteksi antigen (FAT, immunohistokimia, AGPT dan ELISA), pemeriksaan mikroskop elektron dan deteksi material genetik (DNA *probes* dan PCR). Identifikasi keberadaan antibodi pada serum dapat dilakukan dengan AGPT, ELISA ataupun virus netralisasi, namun uji-uji tersebut tidak dapat membedakan antibodi terhadap tiga serotipe dari virus Marek yang ada di lapangan.

### Identifikasi dan karakterisasi patotipe virus MDV-1 secara *in vivo*

Faktor onkogenik pada virus Marek hanya terdapat pada serotipe 1 (MDV-1), dimana tingkat virulensinya dihubungkan dengan kemampuan virus untuk menimbulkan gejala penyakit pada ayam yang telah divaksinasi dengan beberapa tipe vaksin Marek. Terdapat empat klasifikasi patotipe yang berbeda dari virus MDV-1, yaitu mulai dari *mild* (m), *virulent* (v), *very virulent* (vv) sampai dengan *very virulent plus* (vv+) (Witter 1997; 1998). Beberapa contoh isolat virus MDV-1 berdasarkan klasifikasi patotipenya antara lain *strain* CVI988 dan CU2 untuk mMDV, *strain* JM, GA dan HPRS-6 untuk vMDV, *strain* Md5 dan RB-1B untuk vvMDV dan *strain* RK-1/625, 648A untuk vv+MDV.

Terdapat korelasi antara evolusi virus MDV-1 sebagai dampak *escape mutation* dengan penerapan program vaksinasi yang intensif pada peternakan ayam komersial (Witter 1997). Penerapan vaksin HVT diduga menyebabkan evolusi virus MDV-1 dari *strain virulent* menjadi *very virulent*. Demikian juga ketika vaksin *bivalent* HVT dan GaHV3 diterapkan, virus Marek yang di lapangan juga berevolusi menjadi *strain very virulent plus*. Muncul kekhawatiran akan terjadinya lagi evolusi virus MDV-1 dimasa mendatang yang mengakibatkan vaksin MDV-1 atenuasi *strain* CVI988 yang merupakan vaksin "*gold standard*" yang ada pada saat ini menjadi tidak efektif untuk mengendalikan kejadian penyakit Marek di lapangan.

Terdapat beberapa metode klasifikasi patotipe virus MDV-1, namun metode yang paling banyak diadopsi adalah metode yang dikembangkan oleh *Avian Disease and Oncology Laboratory* (ADOL) (Witter et al. 2005; Schat & Nair 2008). Metode ADOL tersebut didasarkan pada gejala lesio limpoproliferasif pada uji tantang secara *in vivo* pada ayam yang telah divaksinasi dengan beberapa tipe vaksin Marek. Metode ADOL

menggunakan ayam galur *line 15x7* namun penelitian lain dengan menggunakan galur ayam yang berbeda memberikan hasil yang relatif serupa (Buscaglia et al. 2004). Gimeno et al. (2002) memberikan pandangan untuk *neuropathotyping* sebagai kriteria tambahan terhadap metode uji ADOL yang telah ada. Sementara itu, Dudnikova et al. (2007) mendesain uji patotipe virus MDV-1 yang lebih sederhana dibandingkan dengan metode ADOL, namun masih memerlukan biaya yang sangat besar untuk menyediakan fasilitas laboratorium pendukung terutama *chicken isolator* dengan jumlah yang memadai untuk menampung jumlah ayam yang dibutuhkan. Selain itu, ayam yang digunakan juga harus bersifat *spesific pathogenic free* (SPF) untuk menjamin hasil penelitian tidak dikelirukan dengan penyakit unggas lainnya. Oleh karena itu, perlu dicari metode yang lebih ideal, murah dan praktis dalam menentukan patotipe virus MDV-1, sebagai contoh dengan mengadopsi metode-metode baru dengan pendekatan molekuler.

### Identifikasi dan karakterisasi patotipe virus MDV-1 secara molekuler

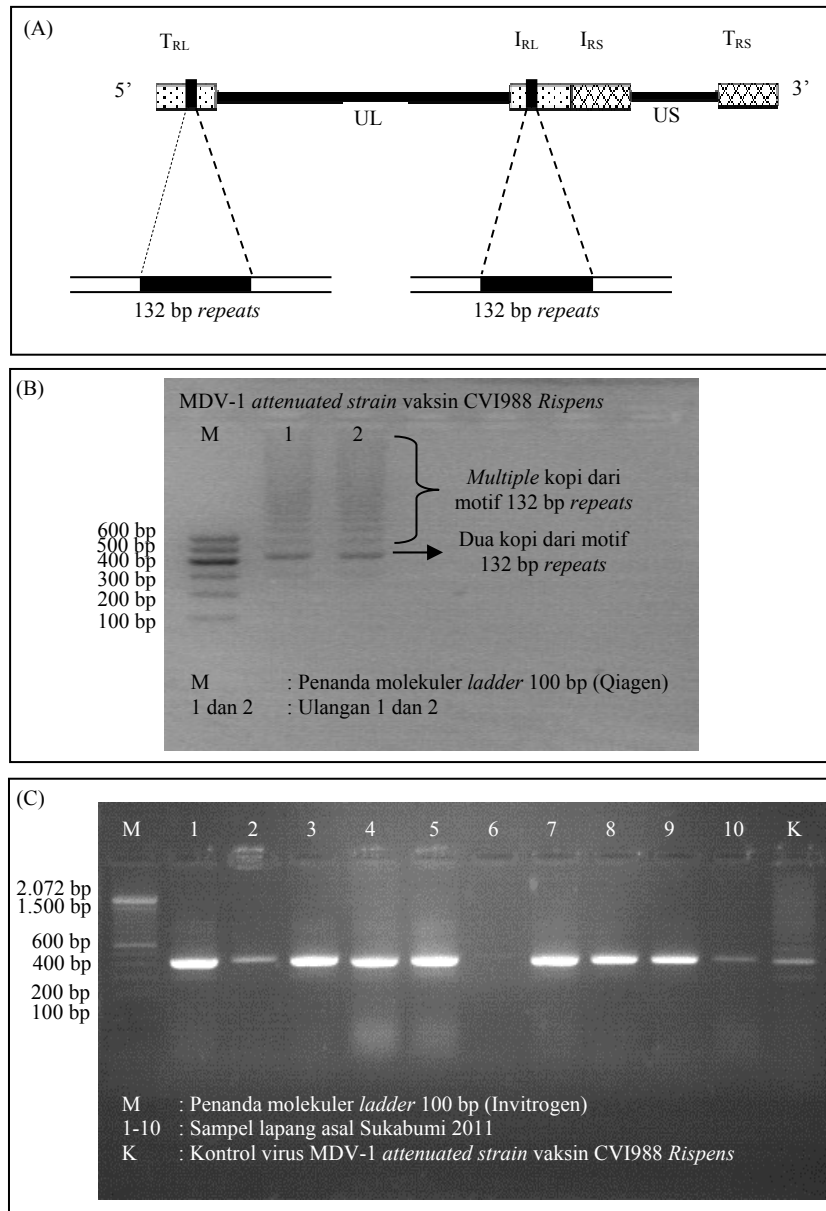
#### Identifikasi virus MDV-1 dengan *polymerase chain reaction*

Uji PCR merupakan suatu metode yang sangat sensitif dalam mengidentifikasi keberadaan suatu spesies dengan cara mengamplifikasi gen yang ditargetkan (Pestana et al. 2010; Stephenson 2010). Uji PCR juga bersifat akurat karena menggunakan set primer yang bersifat spesifik terhadap *marker* gen yang ditargetkan. Dengan adanya data sekuen gen-gen dari berbagai *strain* virus Marek pada *database Genbank* NCBI (2015) maka pengembangan uji PCR terhadap penyakit Marek dapat berkembang pesat untuk memenuhi kebutuhan diagnostik penyakit baik di tingkat lapangan maupun laboratorium. Selain itu, uji PCR dapat diterapkan untuk membedakan infeksi virus MDV-1 dengan infeksi penyakit tumor lainnya seperti ALV dan REV.

Uji identifikasi virus MDV-1 dengan metode PCR pertama kali dilakukan berdasarkan *marker* atenuasi 132 bp *repeats region* yang terletak pada terminal dan internal *repeat long region* virus MDV-1 (Becker et al. 1992). Peneliti lainnya juga menggunakan *marker* atenuasi ini untuk identifikasi virus MDV-1 terutama untuk diferensiasi dengan GaHV3, HVT, ALV dan REV (Davidson et al. 1995). Pada awalnya, motif 132 bp *repeats region* dijadikan sebagai *marker* atenuasi untuk membedakan *strain* lapang dan *strain* vaksin dimana pada serial *pasase* secara *in vitro* pada tingkat tinggi motif tersebut berkembang dari dua kopi menjadi *multiple* kopi, sehingga menghasilkan amplikon yang lebih panjang dan bertingkat (Silva 1992). Penggunaan

vaksin MDV-1 *live attenuated* yang sangat intensif pada peternakan komersial menjadi penting untuk suatu teknik diagnostik yang mampu membedakan infeksi virus MDV-1 *strain* lapang patogenik dengan residu *strain* vaksin yang kemungkinan juga bersirkulasi di lingkungan peternakan ayam komersial. Penggunaan *marker* ini dapat dilakukan pada tingkat laboratorium, namun ternyata sulit untuk diaplikasikan pada kondisi lapangan. Penelitian Young & Gravel (1996) membuktikan bahwa *multiple* motif 132 bp *repeats region* pada *strain* vaksin akan menjadi dua kopi kembali setelah melalui *pasase* secara *in vivo* pada ayam. Penelitian lainnya juga mengkonfirmasi bahwa multiplikasi *marker* 132 bp *repeats region* tersebut bukanlah suatu indikasi yang kuat sebagai *marker* atenuasi virus MDV-1 karena *strain* virus patogenik yang dihilangkan *marker* motif 132 bp *repeats region*-nya masih dapat diatenuasi melalui serial *pasase* secara *in vitro* pada tingkat tinggi (Silva et al. 2004; Niikura et al. 2006; Silva & Gimeno 2007). Contoh aplikasi uji PCR dengan *marker* motif 132 bp *repeats region* pada virus MDV-1 *strain* vaksin CVI988 sebagai kontrol virus dan sampel lapang asal Kabupaten Sukabumi tahun 2011 disajikan pada Gambar 2.

*Marker* atenuasi motif 132 bp *repeats region* masih digunakan dalam beberapa penelitian (Doosti & Golshan 2011; Kalyani et al. 2011), namun banyak beberapa penelitian lainnya telah menggunakan *marker* gen lain seperti *meq*, *ICP4*, *gB* dan lain-lainnya (Handberg et al. 2001; Jwander et al. 2012; Hassanin et al. 2013). Gen *meq* menjadi prioritas untuk identifikasi virus MDV-1 karena peran pentingnya dalam mengkode protein transaktivator dalam pembentukan sel tumor. Gen ini juga tidak dijumpai pada dua serotipe lainnya. Beberapa penelitian merancang uji PCR menggunakan gen *meq* sebagai target amplifikasi dan dapat diaplikasikan berbagai macam sampel seperti PBL, organ, bulu bahkan debu lingkungan kandang (Handberg et al. 2001; Baigent et al. 2005; Islam et al. 2006). Identifikasi untuk dua serotipe lainnya juga telah dapat dilakukan dengan gen spesifik DNA pol untuk GaHV3 dan *sorf 1* untuk HVT (Islam et al. 2006; Renz et al. 2006). Meskipun gen *meq* dapat dijadikan *marker* identifikasi virus MDV-1 dengan tepat untuk membedakan dengan serotipe lainnya, namun tidak dapat digunakan untuk membedakan antara *strain* vaksin MDV-1 *attenuated* dengan *strain* lapang. Lee et al. (2000b) menemukan bahwa gen *meq* pada *strain* vaksin CVI988 mempunyai insersi gen sepanjang 178 bp dibandingkan dengan beberapa *strain* patogenik. Perbedaan ukuran gen ini dapat dilihat jika gen *meq* diamplifikasi dengan ukuran yang cukup panjang. Hal ini memberikan harapan untuk dapat membedakan kedua *strain* tersebut secara cepat namun penemuan ini tidak dilanjutkan pada penelitian selanjutnya, kemungkinan karena aplikasi lapangan tidak



(A) Lokasi motif 132 bp repeats pada genom MDV-1; (B) Identifikasi motif 132 bp repeats pada virus MDV-1 attenuated strain vaksin CVI988 Rispens; (C) Identifikasi motif 132 bp pada sampel lapang asal peternakan ayam Kampung komersial asal Kabupaten Sukabumi tahun 2011

**Gambar 2.** Aplikasi uji PCR dengan marker 132 bp repeats pada kontrol virus MDV-1 strain vaksin CVI988 Rispens dan sampel lapang asal Sukabumi 2011

**Sumber:** Hartawan & Dharmayanti (2013) yang dimodifikasi

memberikan hasil yang konsisten, dimana beberapa strain patogenik ternyata mempunyai segmen gen meq yang sama panjangnya dengan strain vaksin CVI988.

#### Identifikasi virus MDV-1 dengan real-time polymerase chain reaction

Meskipun uji PCR sudah cukup sensitif untuk mendeteksi keberadaan virus MDV-1, namun dianggap

masih kurang sensitif untuk mendeteksi infeksi laten karena rendahnya konsentrasi virus pada sel induk semang (Schat & Nair 2008). Oleh karena itu, uji real-time PCR menjadi alternatif dalam pengembangan uji deteksi virus MDV-1 karena lebih sensitif, lebih cepat dan lebih aman meskipun biayanya relatif lebih mahal dibandingkan dengan PCR konvensional (Pestana et al. 2010). Pada prinsipnya, real-time PCR menggunakan fluorescent untuk mengidentifikasi dan/atau

mengkuantifikasi amplifikasi gen target. Terdapat berbagai macam *platform* seperti Taqman, Syber Green, Beacon ataupun Scorpion, namun metode Taqman menjadi pilihan utama karena relatif lebih mudah dan memungkinkan untuk *platform* multipleks (Islam et al. 2006; Davidson et al. 2013). Uji *real time* PCR telah menjadi protokol standar dan dapat diandalkan dalam identifikasi penyakit Marek terutama untuk studi epidemiologi yang melibatkan sampel dalam kuantitas besar.

Pada umumnya, uji *real-time* PCR pada penelitian penyakit Marek bukan hanya sekedar dilakukan untuk identifikasi virus secara kualitatif saja, namun telah ditingkatkan lebih lanjut hingga tahap *quantitative* PCR untuk menganalisis konsentrasi virus yang terkandung dalam suatu sampel (Islam et al. 2004; Abdul-Careem et al. 2006; Baigent et al. 2011; Walkden-Brown et al. 2013). Uji *quantitative* PCR juga dapat dimanfaatkan untuk mempelajari karakter biologi virus seperti interaksi antara *strain* vaksin dan *strain* patogenik (Baigent et al. 2007; Tan et al. 2007; Haq et al. 2012; Baigent et al. 2013). Lebih lanjut, Baigent et al. (2006) memberikan pandangannya untuk penggunaan *quantitative* PCR sebagai metode untuk mengevaluasi program vaksinasi di lapangan, dimana keberhasilan vaksinasi dapat dianalisis berdasarkan konsentrasi virus *strain* vaksin pada sampel FFE dengan menggunakan uji *quantitative* PCR yang telah dikembangkan.

#### **Identifikasi virus MDV-1 dengan high-resolution melting curve analysis**

Pendekatan lain untuk membedakan virus MDV-1 *strain* vaksin dengan *strain* lapang dapat dilakukan dengan genotiping menggunakan metode *high resolution melting curve analysis* (HRM) untuk membedakan *polymorphism* pada sekuen gen target (Wittwer et al. 2003; Liew et al. 2004; Vossen et al. 2009). Pada prinsipnya, ampikon yang terbentuk melalui proses PCR dianalisis suhu *melting*-nya melalui proses pemanasan secara bertahap, dimana proses pemisahan untaian ganda DNA menjadi dua untaian tunggal dimonitoring secara *real-time* dengan *fluorescent* yang spesifik. Plot suhu *melting* fragmen DNA dengan urutan sekuen yang sama akan menampilkan grafik yang sama dan sebaliknya pada fragmen DNA dengan urutan sekuen yang berbeda akan menghasilkan grafik yang berbeda. Metode HRM sangat sensitif sehingga mampu membedakan fragmen DNA dengan hanya satu perbedaan nukleotida saja (*single nucleotide polymorphism*, SNP). Oleh karena itu, dengan pemilihan target gen dan ukuran ampikon yang tepat pada *strain* virus MDV-1 maka uji HRM dapat digunakan untuk membedakan beberapa *strain* virus MDV-1. Renz et al. (2013) mendesain metode *real-time* PCR dan HRM yang dapat membedakan

virus MDV-1 *strain* vaksin CVI988 *Rispens* dengan beberapa *strain* lapang patogenik asal Australia dan *strain* Md5 sebagai standar *referens* dengan memanfaatkan *polymorphism* yang ada pada gen *meq*. Metode uji HRM ini mampu membedakan dengan baik antara isolat *strain* vaksin dengan beberapa *strain* virus yang bersifat patogenik. Selain biayanya yang relatif mahal dan sifatnya yang masih spesifik untuk *strain* asal Australia, kelemahan metode HRM yang dikembangkan ini masih belum mampu bekerja dengan baik pada kasus infeksi campuran. Hal ini berdampak dalam sulitnya diagnosis penyakit di lapangan mengingat infeksi campuran sangat mungkin terjadi.

#### **Identifikasi virus MDV-1 dengan loop-mediated isothermal amplification**

Metode uji PCR dan *real-time* PCR untuk identifikasi patogen penyakit telah berkembang pesat sehingga mampu memberikan hasil analisis yang akurat, baik sensitivitas maupun spesifitasnya. Namun, biaya yang diperlukan relatif mahal baik untuk *reagent* maupun peralatan penunjangnya. Salah satu inovasi yang dikembangkan oleh Eiken Chemical Co., Ltd. dalam menyederhanakan proses amplifikasi DNA adalah pengembangan metode *loop-mediated isothermal amplification* (LAMP) yang bersifat sederhana, lebih murah namun tetap mempunyai sensitivitas yang tinggi. Berbeda dengan metode PCR yang membutuhkan serangkaian perubahan suhu yang dikombinasikan dengan beberapa siklus temperatur yang tepat, metode LAMP mampu mengamplifikasi target gen pada suhu yang konstan (60-65°C) sehingga secara teknis tidak membutuhkan mesin *thermal cycler* yang harganya relatif mahal. Metode LAMP menggunakan empat set primer yang secara khusus mengenali enam *region* yang berbeda pada gen target dengan menggunakan sistem *strand displacement reaction* sehingga mampu mengamplifikasi gen target secara terus-menerus pada suhu yang konstan. Pada akhirnya akan didapatkan produk amplifikasi dalam jumlah yang sangat banyak yaitu 10<sup>9</sup>-10<sup>10</sup> kali dalam waktu 15-60 menit (Pestana et al. 2010). Analisis hasil uji LAMP dapat dilakukan dengan spektrofotometer, penggunaan pewarna *fluorescent* atau diintegrasikan dengan mesin *loopamp realtime turbidimeter* yang mampu untuk mengukur intensitas *fluorescent* yang dikorelasikan dengan konsentrasi ampikon DNA yang teramplifikasi. Beberapa penelitian dengan metode LAMP telah dilakukan dalam rangka mendapatkan uji identifikasi virus MDV-1 yang bersifat murah dan mudah diaplikasikan pada kondisi lapangan (Woźniakowski et al. 2011b; Angamuthu et al. 2012; Lawhale et al. 2014; Woźniakowski & Samorek-Salamonowicz 2014). Selanjutnya, Woźniakowski et al. (2013) mengembangkan uji LAMP untuk

membedakan tiga serotipe virus Marek, yaitu MDV-1, GaHV3 dan HVT. Meskipun pengembangan LAMP menjanjikan untuk kedepannya, namun terdapat beberapa kelemahan yang perlu dipertimbangkan. Uji LAMP kurang fleksibel untuk *platform* multipleks. Spesifitasnya juga agak rendah karena hanya mampu mengamplifikasi fragmen pendek DNA. Kelemahan terbesar LAMP adalah resiko kontaminasi ke lingkungan pada saat elektroforesis karena amplicon yang dihasilkan sangat banyak sehingga kurang cocok untuk aplikasi di laboratorium. Uji LAMP lebih sesuai untuk uji skrining penyakit di lapangan dengan kondisi peralatan yang terbatas.

### **Karakterisasi virus MDV-1 dengan metode sekuensing gen**

Sekuensing gen merupakan metode yang ideal dalam mempelajari karakter virus Marek terutama serotipe 1. Banyak penelitian yang melibatkan sekuensing gen virus MDV-1 terutama yang berhubungan dengan sifat onkogenik seperti meq, pp38 dan lain-lainnya. Meskipun metode sekuensing gen dapat membedakan *strain* vaksin dengan *strain* lapang, namun metode ini lebih ideal digunakan untuk kegiatan penelitian daripada uji diagnostik di lapangan. Studi komparasi genom virus *strain* vaksin CVI988 *Rispens* dengan *strain* onkogenik Md11 menunjukkan adanya perbedaan yang nyata pada beberapa gen diantara kedua *strain* yang berbeda sifat tersebut (Spatz et al. 2007). Permasalahannya adalah belum ada informasi yang akurat mengenai hubungan karakter molekuler virus MDV-1 dengan tingkat patogenitasnya secara *in vivo*. Virus MDV-1 mempunyai ukuran genom yang sangat panjang yang mengkode banyak sekali gen penting untuk aktivitas biologisnya (Morgan et al. 2008; Hicks & Liu 2013). Oleh karena banyaknya interaksi gen-gen yang terlibat, maka muncul kesulitan untuk menentukan *marker* yang ideal dalam mengkarakterisasi tingkat patogenitas virus secara molekuler.

Meskipun belum ada informasi yang jelas untuk menghubungkan karakter molekuler dengan tingkat virulensi virus, namun penggunaan sekuensing gen dalam mengkarakterisasi gen-gen virus MDV-1 menjadi tren dalam penelitian penyakit Marek saat ini. Renz et al. (2012) melakukan analisis terhadap *polymorphism* pada gen meq dari lima isolat virus asal Australia (Woodlands 1, MPF 57, 02LAR, FT158 dan 04CPE) dengan menggunakan *strain* Md5 sebagai *referens*. Hasil penelitian menunjukkan adanya insersi 178 bp dan beberapa *point* mutasi meskipun tidak berkorelasi dengan tingkat patogenitas. Analisis lebih lanjut, mengindikasikan bahwa jumlah pengulangan motif empat asam amino proline (PPPP) pada protein meq merupakan *marker* yang lebih baik dibandingkan

dengan insersi 178 bp untuk tingkat patogenitas virus. Isolat virus MDV-1 yang paling *virulent* diketahui mempunyai pengulangan motif PPPP yang paling sedikit, namun data tersebut belum dapat memberikan gambaran yang jelas mengenai karakter patogenitas virus.

Analisis molekuler oleh Woźniakowski et al. (2011a) menunjukkan bahwa sebagian dari 24 isolat virus MDV-1 *strain* patogenik asal Polandia mengalami mutasi berupa insersi 68 bp pada gen meq yang diduga menyebabkan terjadinya perubahan struktur pada protein yang dikodinya. Lebih lanjut, penelitian ini juga mendeteksi adanya *random* insersi gen LTR virus REV pada genom virus MDV-1. Meskipun perubahan karakter molekuler yang terjadi tidak dapat dihubungkan dengan tingkat virulensi, namun mutasi tersebut diduga berperan penting dalam peningkatan virulensi virus MDV-1 di lapangan.

Analisis molekuler gen meq, gI dan gE oleh Teng et al. (2011) pada beberapa *strain* lapang virus MDV-1 asal Cina antara tahun 1995-2008 menunjukkan perbedaan dengan *strain* vaksin CVI988 *Rispens*. Studi lain oleh Tian et al. (2011) pada 18 isolat virus MDV-1 asal Sichuan, Cina menunjukkan mutasi gen (delesi dan insersi) pada tiga gen yang dianalisis yaitu meq, pp38 dan vIL-8. Kemudian Yu et al. (2013) mengidentifikasi adanya perbedaan karakter molekuler gen meq diantara *strain* virus MDV-1 asal Henan, Cina dengan *strain* virulent asal Amerika Serikat. Demikian juga, Murata et al. (2013) mengidentifikasi mutasi pada gen meq pada isolat MDV-1 asal Jepang yang diduga berkaitan dengan proses transaktivasi. Kemudian, Hassanin et al. (2013) melakukan analisis sekuen gen meq, gL dan gC pada sampel asal peternakan petelur komersial di Mesir yang sudah divaksinasi. Hasil analisisnya secara molekuler pada gen meq menunjukkan tingkat homologi yang tinggi dengan virus *very virulent* asal Eropa dan Cina sedangkan untuk gen gL dan gC mempunyai similaritas yang tinggi terhadap *strain* klasik.

Sementara itu, Gong et al. (2013) melakukan karakterisasi secara *in vivo* dan juga secara molekuler terhadap isolat virus MDV-1 asal wabah pada peternakan ayam di Cina yang telah divaksinasi dengan HVT. Virus MDV-1 tersebut teridentifikasi sebagai *very virulent* dimana karakter gen meq dan vIL-8 nya mempunyai homologi yang tinggi terhadap virus *referens* MDV-1 asal Cina lainnya. Wajid et al. (2013) menduga beberapa sampel asal Iran terindikasi terinfeksi virus MDV-1 *highly virulent* berdasarkan analisis sekuen pada gen meq meskipun masih perlu dikonfirmasi dengan uji tantangan secara *in vivo*.

Metode sekuensing gen juga berkembang dari *first-generation sequencing* metode Sanger menjadi *next-generation sequencing* dengan peralatan dan metode yang baru dimana kapasitas gen yang



disekuensing menjadi jauh lebih panjang bahkan hingga keseluruhan genom. Pada virus MDV-1 yang memiliki ukuran genom yang besar tentu saja *next-generation sequencing* memberikan alternatif untuk melakukan karakterisasi keseluruhan genom virus secara cepat. Namun, virus Marek bersifat *highly cell-associated* sehingga virus lebih banyak berada di dalam sel induk semang. Akibatnya, pada saat ekstraksi material genetik, DNA virus akan selalu terkontaminasi dengan material genetik dari induk semangnya. *Next-generation sequencing* membutuhkan kondisi material genetik yang murni, sehingga kontaminasi material genetik dari yang lainnya akan menyebabkan kegagalan. Permasalahan kontaminasi DNA induk semang dapat diatasi jika isolat virus MDV-1 dapat dikloning ke dalam sistem *bacterial artificial chromosom* (BAC) yang merupakan vektor yang sesuai untuk kelompok *herpesvirus* (Brune et al. 2000; Hall et al. 2013). Ketika keseluruhan genom virus MDV-1 berhasil direkombinasikan ke BAC dalam bentuk *circular*, maka sistem MDV-BAC tersebut dapat ditransformasikan pada sel bakteri *Escherichia coli* yang sesuai (Schumacher et al. 2000; Petherbridge et al. 2004; Chattoo et al. 2006; Spatz et al. 2007; Reddy et al. 2013). Perbanyakkan genom MDV-BAC yang murni dapat dilakukan pada sistem bakteri, dimana kemungkinan besar metode *next-generation sequencing* dapat diaplikasikan. Sistem BAC juga memungkinkan untuk aplikasi mutagenesis pada genom virus, baik berupa delesi maupun insersi gen untuk keperluan penelitian karakter atau sifat gen tertentu (Sun et al. 2009; 2010; Mays et al. 2012; Schat et al. 2013).

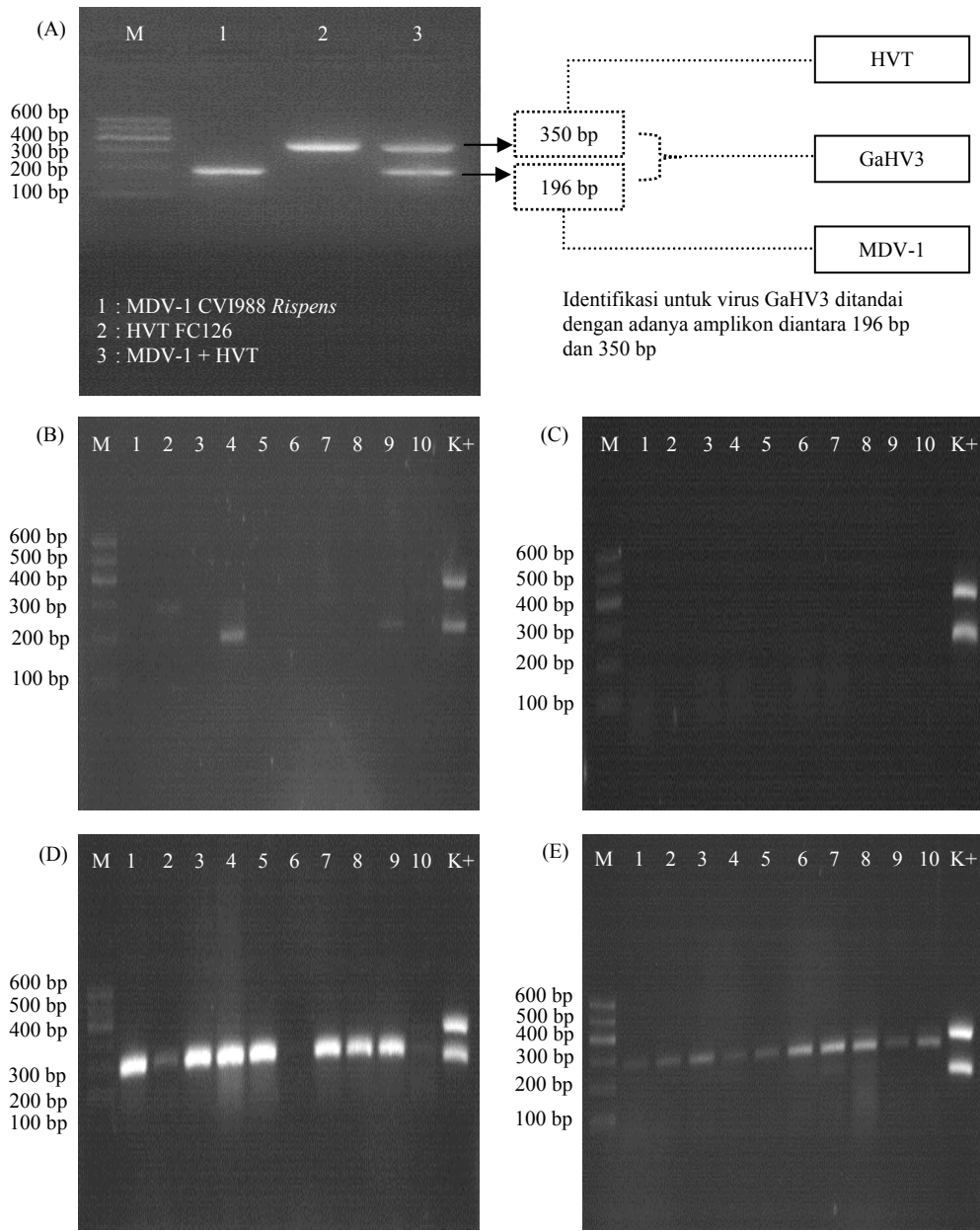
#### **Pemilihan uji molekuler untuk identifikasi dan karakterisasi virus MDV-1 yang ideal dan sesuai dengan kondisi lapang di Indonesia**

Setiap metode uji molekuler untuk identifikasi dan karakterisasi virus MDV-1 yang telah dibahas sebelumnya yaitu PCR, *real-time* PCR, HRM, LAMP dan sekuensing gen mempunyai kelebihan dan kelemahannya masing-masing, namun untuk keperluan studi epidemiologi penyakit dengan jumlah sampel yang relatif banyak maka uji *real-time* PCR merupakan metode yang paling ideal dibandingkan dengan metode yang lainnya karena sensitivitas dan spesifitasnya yang sangat baik sehingga mampu mendeteksi keberadaan virus Marek meskipun dalam konsentrasi yang rendah. Uji *real-time* PCR akan semakin memberikan manfaat lebih jika dikembangkan ke arah tahap kuantitatif (*quantitative* PCR). Namun, jika dana yang dialokasikan terbatas dan jumlah sampel yang dianalisis cenderung

tidak terlalu banyak, maka uji PCR konvensional sudah cukup baik untuk keperluan identifikasi virus Marek di lapangan (Hartawan & Dharmayanti 2013). Dalam rangka efisiensi, uji multipleks PCR untuk mendeteksi virus Marek serotipe 1, 2 dan 3 telah dikembangkan secara sekaligus dan diuji cobakan pada sampel dan kondisi lapang (Gambar 3). Uji PCR konvensional tetaplah penting untuk dikembangkan terutama jika studi akan dilanjutkan pada tahap sekuensing gen.

Uji molekuler dengan HRM hanya ideal dilakukan di tingkat laboratorium saja karena membutuhkan peralatan dan reagensia khusus yang harganya relatif sangat mahal. Perkembangan uji HRM untuk virus MDV-1 pada saat ini masih terbatas pada *strain* virus Marek asal Australia dan mengalami masalah jika terjadi infeksi campuran beberapa *strain* virus Marek. Sementara itu, penggunaan uji LAMP untuk identifikasi virus MDV-1 lebih sesuai untuk keperluan diagnostik di lapangan. Penggunaan uji LAMP di laboratorium dapat menyebabkan kontaminasi produk amplicon di lingkungan laboratorium yang akan sangat mengganggu penelitian selanjutnya. Amplicon produk LAMP sangat banyak dan sifatnya tidak spesifik maka kontaminasi akan mengganggu kegiatan penelitian penyakit lainnya karena laboratorium penelitian tidak hanya digunakan untuk satu jenis penyakit saja. Meskipun resiko kontaminasi pada uji LAMP dapat diminimalkan dengan penggunaan *loopamp realtime turbidimeter* yang mampu mengkuantifikasi amplicon produk LAMP secara *real time* tanpa harus membuka tabung untuk elektroforesis, namun bagi penulis uji PCR konvensional masih merupakan pilihan yang lebih baik karena lebih mudah untuk dimodifikasi sesuai dengan kebutuhan terutama jika akan diteruskan ke tahap karakterisasi molekuler dengan sekuensing.

Karakterisasi virus secara molekuler dengan sekuensing gen untuk virus MDV-1 sudah banyak dilakukan dan tidak terlalu sulit mengingat virus ini termasuk dalam kelompok virus DNA yang stabil secara genetik. Beberapa gen yang sering menjadi target sekuensing adalah gen yang berhubungan sifat onkogenik virus seperti *meq*, *cxc* chemokine, *pp24*, *pp38* ataupun beberapa gen seperti *gC*, *gD*, *gE*, *gH*, *gL*, *gL*, *vIL-8* dan lain-lainnya. Meskipun informasi genetik virus MDV-1 dapat diakses pada *database Genbank* NCBI (2015) dan peta genomik beserta fungsinya telah banyak dipublikasi, namun masih diperlukan analisis yang mendalam untuk pemilihan target gen yang akan disequensing sesuai dengan kondisi lapangan dan agenda penelitian. Sampai saat ini, belum ada informasi genetik virus MDV-1 asal Indonesia yang telah dipublikasi maupun didaftarkan ke genom *database* seperti *Genbank* NCBI (2015).



(A) Skenario dan optimasi uji multipleks PCR Marek 1, 2 dan 3 dengan kontrol virus MDV-1 dan HVT; (B) Uji multipleks PCR pada sampel SMI flock A.1.1.; (C) Uji multipleks PCR pada sampel SMI flock A.2.1.; (D) Uji multipleks PCR pada sampel SMI flock A.5.2.; (E) Uji multipleks PCR pada sampel CJR flock B.3.; Penanda molekuler (M) yang digunakan adalah ladder DNA 100 bp (Qiagen)

**Gambar 3.** Uji skrining multipleks PCR untuk identifikasi dan diferensiasi virus Marek serotipe 1, 2 dan 3 pada sampel lapangan asal peternakan ayam komersial dari Kabupaten Sukabumi (SMI) dan Cianjur (CJR) tahun 2011

**Sumber:** Hartawan & Dharmayanti (2013) yang dimodifikasi

**KESIMPULAN**

Identifikasi dan karakterisasi virus MDV-1 dengan menggunakan pendekatan molekuler telah berkembang pesat dimana berbagai macam metode yang berbeda telah diuji coba, mulai dari PCR, *real-time* PCR, HRM, LAMP bahkan sampai dengan

tahapan gen sekuensing. Metode yang dikembangkan telah memberikan hasil yang memuaskan dan beberapa diantaranya telah diterapkan untuk aplikasi di lapangan maupun di tingkat laboratorium. Tersedia pula aplikasi bioteknologi seperti sistem vektor BAC yang dapat meningkatkan kapasitas penelitian terutama untuk mempelajari karakter biologi virus MDV-1 secara lebih

rinci. Meskipun metode molekuler yang ada pada saat ini belum dapat menggantikan penggunaan ujiantang secara *in vivo* sebagai “gold standard” untuk penentuan tingkat patogenitas virus MDV-1, namun metode molekuler tetap menjadi pilihan utama karena lebih mudah, lebih murah dan lebih cepat dibandingkan dengan ujiantang secara *in vivo*. Uji patogenitas virus MDV-1 pada ayam, selain membutuhkan waktu yang lebih lama untuk tahap isolasi dan purifikasi isolat virus lapang tentu saja membutuhkan fasilitas laboratorium yang memadai dan biaya yang relatif besar untuk memenuhi standar eksperimen yang diperlukan. Harapan untuk penelitian kedepan, metode molekuler dapat terus dikembangkan terutama untuk mencari *marker* gen yang tepat dan ideal untuk menentukan tingkat patogenitas virus MDV-1.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Abdul-Careem MF, Hunter BD, Nagy E, Read LR, Sanei B, Spencer JL, Sharif S. 2006. Development of a real-time PCR assay using SYBR Green chemistry for monitoring Marek's disease virus genome load in feather tips. *J Virol Methods*. 133:34-40.
- Angamuthu R, Baskaran S, Gopal DR, Devarajan J, Kathaperumal K. 2012. Rapid detection of the Marek's disease viral genome in chicken feathers by loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol*. 50:961-965.
- Arulmozhi A, Saravanan S, Mohan B, Balasubramaniam GA. 2011. Marek's disease in vaccinated poultry flocks in and around Namakkal region of Tamil Nadu. *Indian J Vet Pathol*. 35:45-47.
- Baigent SJ, Davidson F. 2004. Marek's disease virus: Biology and life cycle. In: Davidson F, Nair V, editors. *Marek's disease: An evolving problem*. London (UK): Elsevier Academic Press. p. 62-77.
- Baigent SJ, Kgosana LB, Gamawa AA, Smith LP, Read AF, Nair VK. 2013. Relationship between levels of very virulent MDV in poultry dust and in feather tips from vaccinated chickens. *Avian Dis*. 57:440-447.
- Baigent SJ, Smith LP, Currie RJW, Nair VK. 2007. Correlation of Marek's disease herpesvirus vaccine virus genome load in feather tips with protection, using an experimental challenge model. *Avian Pathol*. 36:467-474.
- Baigent SJ, Smith LP, Nair VK, Currie RJW. 2006. Vaccinal control of Marek's disease: Current challenges and future strategies to maximize protection. *Vet Immunol Immunopathol*. 112:78-86.
- Baigent SJ, Smith LP, Petherbridge LJ, Nair VK. 2011. Differential quantification of cloned CVI988 vaccine strain and virulent RB-1B strain of Marek's disease viruses in chicken tissues, using real-time PCR. *Res Vet Sci*. 91:167-174.
- Beasley JK, Patterson LT, McWade DH. 1970. Transmission of Marek's disease by poultry house dust and chicken dander. *Am J Vet Res*. 31:339-344.
- Becker Y, Asher Y, Tabor E, Davidson I, Malkinson M, Weisman Y. 1992. Polymerase chain reaction for differentiation between pathogenic and non-pathogenic serotype 1 Marek's disease viruses (MDV) and vaccine viruses of MDV-serotypes 2 and 3. *J Virol Methods*. 40:307-322.
- Biggs PM, Nair V. 2012. The long view: 40 years of Marek's disease research and Avian Pathology. *Avian Pathol*. 41:3-9.
- Brune W, Messerle M, Koszinowski UH. 2000. Forward with BACs-New tools for herpesvirus genomics. *Trends Genet*. 16:254-259.
- Bublot M, Sharma JM. 2004. Vaccination against Marek's disease. In: Davidson F, Nair V, editors. *Marek's disease: An evolving problem*. London (UK): Elsevier Academic Press. p. 168-185.
- Buscaglia C, Nervi P, Risso M. 2004. Characterization of four very virulent Argentinian strains of Marek's disease virus and the influence of one of those isolates on synergism between Marek's disease vaccine viruses. *Avian Pathol*. 33:190-195.
- Buscaglia C. 2013. Mixed infections of Marek's disease and reticuloendotheliosis viruses in layer flocks in Argentina. *Avian Dis*. 57:569-571.
- Calnek BW, Adldinger HK, Kahn DE. 1970. Feather follicle epithelium: A source of enveloped and infectious cell-free herpesvirus from Marek's disease. *Avian Dis*. 14:219-233.
- Chattoo JP, Stevens MP, Nair V. 2006. Rapid identification of non-essential genes for *in vitro* replication of Marek's disease virus by random transposon mutagenesis. *J Virol Methods*. 135:288-291.
- Damayanti R, Wiyono A. 2003. Gambaran histopatologi kasus Marek pada ayam pedaging di Kabupaten Tasikmalaya dan Ciamis, Jawa Barat. *JITV*. 8:247-255.
- Davidson I, Borovskaya A, Perl S, Malkinson M. 1995. Use of the polymerase chain reaction for the diagnosis of natural infection of chickens and turkeys with Marek's disease virus and reticuloendotheliosis virus. *Avian Pathol*. 24:69-94.
- Davidson I, Raibstein I, Al-Touri A. 2013. Quantitation of Marek's disease and chicken anemia viruses in organs of experimentally infected chickens and commercial chickens by multiplex real-time PCR. *Avian Dis*. 57:532-538.
- Davison AJ. 2010. Herpesvirus systematics. *Vet Microbiol*. 143:52-69.
- Doosti A, Golshan M. 2011. Molecular study for detection of Marek's disease virus (MDV) in southwest of Iran. *Sci Res Essays*. 6:2560-2563.

- Dudnikova E, Norkina S, Vlasov A, Slobodchuk A, Lee LF, Witter RL. 2007. Evaluation of Marek's disease field isolates by the "best fit" pathotyping assay. *Avian Pathol.* 36:135-143.
- Gimeno IM, Witter RL, Neumann U. 2002. Neuropathotyping: A new system to classify Marek's disease virus. *Avian Dis.* 46:909-918.
- Gimeno IM. 2008. Marek's disease vaccines: A solution for today but a worry for tomorrow? *Vaccine.* 26:C31-C41.
- Gong Z, Zhang L, Wang J, Chen L, Shan H, Wang Z, Ma H. 2013. Isolation and analysis of a very virulent Marek's disease virus strain in China. *Virol J.* 10:155.
- Hall RN, Meers J, Mitter N, Fowler E V, Mahony TJ. 2013. The meleagrid herpesvirus 1 genome is partially resistant to transposition. *Avian Dis.* 57:380-386.
- Handberg KJ, Nielsen OL, Jorgensen PH. 2001. The use of serotype 1 and serotype 3 specific polymerase chain reaction for the detection of Marek's disease virus in chickens. *Avian Pathol.* 30:243-249.
- Haq K, Fear T, Ibraheem A, Abdul-Careem MF, Sharif S. 2012. Influence of vaccination with CVI988/Rispens on load and replication of a very virulent Marek's disease virus strain in feathers of chickens. *Avian Pathol.* 41:69-75.
- Hartawan R, Dharmayanti NLPI. 2013. Identification of Mardivirus serotypes circulating in poultry farms in Sukabumi and Cianjur district, West Java, 2011 using multiplex polymerase chain reaction (mPCR) approach. *JITV.* 18:301-311.
- Hassanin O, Abdallah F, El-Araby IE. 2013. Molecular characterization and phylogenetic analysis of Marek's disease virus from clinical cases of Marek's disease in Egypt. *Avian Dis.* 57:555-561.
- Hicks JA, Liu H-C. 2013. Current state of Marek's disease virus {microRNA} research. *Avian Dis.* 57:332-339.
- Islam A, Cheetham BF, Mahony TJ, Young PL, Walkden-Brown SW. 2006. Absolute quantitation of Marek's disease virus and herpesvirus of turkeys in chicken lymphocyte, feather tip and dust samples using real-time PCR. *J Virol Methods.* 132:127-134.
- Islam A, Harrison B, Cheetham BF, Mahony TJ, Young PL, Walkden-Brown SW. 2004. Differential amplification and quantitation of Marek's disease viruses using real-time polymerase chain reaction. *J Virol Methods.* 119:103-113.
- Islam A, Walkden-Brown SW. 2007. Quantitative profiling of the shedding rate of the three Marek's disease virus (MDV) serotypes reveals that challenge with virulent MDV markedly increases shedding of vaccinal viruses. *J Gen Virol.* 88:2121-2128.
- Islam AFMF, Walkden-Brown SW, Groves PJ, Underwood GJ. 2008. Kinetics of Marek's disease virus (MDV) infection in broiler chickens 1: Effect of varying vaccination to challenge interval on vaccinal protection and load of MDV and herpesvirus of turkey in the spleen and feather dander over time. *Avian Pathol.* 37:225-235.
- Islam T, Renz KG, Walkden-Brown SW, Ralapanawe S. 2013. Viral kinetics, shedding profile, and transmission of serotype 1 Marek's disease vaccine Rispens/CVI988 in maternal antibody-free chickens. *Avian Dis.* 57:454-463.
- Jwander LD, Abdu PA, Owoade AA, Ekong PS, Ibrahim NDG, Nok AJ. 2012. Molecular detection of Marek's disease virus in avian species from North Central Nigeria. *Vom J Vet Sci.* 9:77-82.
- Kalyani IH, Joshi CG, Jhala CG, Bhandari BB, Purohit JH. 2011. Characterization of 132 bp repeats BamHI-H region in pathogenic Marek's disease virus of poultry in Gujarat, India, using PCR and sequencing. *Indian J Virol.* 22:72-75.
- Kato S, Hirai K. 1985. Marek's disease virus. *Adv Virus Res.* 30:225-227.
- Lawhale NS, Singh A, Deka D, Singh R, Verma R. 2014. Detection of Marek's disease virus meq gene in feather follicle by loop-mediated isothermal amplification. *IOSR-JAVS.* 7:19-24.
- Lee LF, Wu P, Sui D, Ren D, Kamil J, Kung HJ, Witter RL. 2000a. The complete unique long sequence and the overall genomic organization of the GA strain of Marek's disease virus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97:6091-6096.
- Lee SI, Takagi M, Ohashi K, Sugimoto C, Onuma M. 2000b. Difference in the meq gene between oncogenic and attenuated strains of Marek's disease virus serotype 1. *J Vet Med Sci.* 62:287-292.
- Liew M, Pryor R, Palais R, Meadows C, Erali M, Lyon E, Wittwer C. 2004. Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons. *Clin Chem.* 50:1156-1164.
- Mays JK, Silva RF, Kim T, Fadly A. 2012. Insertion of reticuloendotheliosis virus long terminal repeat into a bacterial artificial chromosome clone of a very virulent Marek's disease virus alters its pathogenicity. *Avian Pathol.* 41:259-265.
- Morgan R, Anderson A, Bernberg E, Kamboj S, Huang E, Lagasse G, Isaacs G, Parcells M, Meyers BC, Green PJ, Burnside J. 2008. Sequence conservation and differential expression of Marek's disease virus microRNAs. *J Virol.* 82:12213-12220.
- Murata S, Hashiguchi T, Hayashi Y, Yamamoto Y, Matsuyama-Kato A, Takasaki S, Isezaki M, Onuma M, Konnai S, Ohashi K. 2013. Characterization of Meq proteins from field isolates of Marek's disease virus in Japan. *Infect Genet Evol.* 16:137-143.
- Nair V, Jones RC, Gough RE. 2008. Herpesviridae. In: Mark P, Paul FM, Janet MB, Dennis J, editors. *Poultry diseases.* Edinburgh (Scotland): WB Saunders. p. 258-275.

- NCBI. 2015. GenBank. National Center for Biotechnology Information [Internet]. [cited 25 August 2014]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.
- Niikura M, Dodgson JB, Cheng HH. 2006. Stability of Marek's disease virus 132-bp repeats during serial *in vitro* passages. *Arch Virol.* 151:1431-1438.
- Osterrieder K, Vautherot JF. 2004. The genome content of Marek's disease-like viruses. In: Davidson F, Nair V, editors. *Marek's disease: An evolving problem.* London (UK): Elsevier Academic Press. p. 17-31.
- Pestana EA, Belak S, Diallo A, Crowther JR, Viljoen GJ. 2010. Early, rapid and sensitive veterinary molecular diagnostics-real time PCR applications. Dordrecht (Netherlands): Springer.
- Petherbridge L, Brown AC, Baigent SJ, Howes K, Sacco MA, Osterrieder N, Nair VK. 2004. Oncogenicity of virulent Marek's disease virus cloned as bacterial artificial chromosomes. *J Virol.* 78:13376-13380.
- Reddy SM, Sun AA, Khan AOA, Lee ALF, Ac BL. 2013. Cloning of a very virulent plus, 686 strain of Marek's disease virus as a bacterial artificial chromosome. *Avian Dis.* 57:469-473.
- Renz KG, Cheetham BF, Walkden-Brown SW. 2013. Differentiation between pathogenic serotype 1 isolates of Marek's disease virus and the Rispens CVI988 vaccine in Australia using real-time PCR and high resolution melt curve analysis. *J Virol Methods.* 187:144-152.
- Renz KG, Cooke J, Clarke N, Cheetham BF, Hussain Z, Fakhru Islam AF, Tannock GA, Walkden-Brown SW. 2012. Pathotyping of Australian isolates of Marek's disease virus and association of pathogenicity with meq gene polymorphism. *Avian Pathol.* 41:161-176.
- Schat KA, Nair V. 2008. Marek's disease. In: Saif YM, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Swayne DE, editors. *Diseases poultry.* Ames (US): Blackwell Publishing. p. 452-514.
- Schat KA, Piepenbrink MS, Buckles EL, Schukken YH, Jarosinski KW. 2013. Importance of differential expression of Marek's disease virus gene pp38 for the pathogenesis of Marek's disease. *Avian Dis.* 57:503-508.
- Schumacher D, Tischer BK, Fuchs W, Osterrieder N. 2000. Reconstitution of Marek's disease virus serotype 1 (MDV-1) from DNA cloned as a bacterial artificial chromosome and characterization of a glycoprotein B-negative MDV-1 mutant. *J Virol.* 74:11088-11098.
- Silva RF, Gimeno I. 2007. Oncogenic Marek's disease viruses lacking the 132 base pair repeats can still be attenuated by serial *in vitro* cell culture passages. *Virus Genes.* 34:87-90.
- Silva RF, Reddy SM, Lupiani B. 2004. Expansion of a unique region in the Marek's disease virus genome occurs concomitantly with attenuation but is not sufficient to cause attenuation. *J Virol.* 78:733-740.
- Silva RF. 1992. Differentiation of pathogenic and non-pathogenic serotype 1 Marek's disease viruses (MDVs) by the polymerase chain reaction amplification of the tandem direct repeats within the MDV genome. *Avian Dis.* 36:521-528.
- Spatz SJ, Petherbridge L, Zhao Y, Nair V. 2007. Comparative full-length sequence analysis of oncogenic and vaccine (Rispens) strains of Marek's disease virus. *J Gen Virol.* 88:1080-1096.
- Stephenson FH. 2010. *Calculations for molecular biology and biotechnology. A guide to mathematics in the laboratory.* 2nd ed. Amsterdam (Netherlands): Elsevier.
- Sun A, Li Y, Wang J, Su S, Chen H, Zhu H, Ding J, Cui Z. 2010. Deletion of 1.8-kb mRNA of Marek's disease virus decreases its replication ability but not oncogenicity. *Virol J.* 7:294.
- Sun AJ, Lawrence P, Zhao YG, Li YP, Nair VK, Cui ZZ. 2009. A BAC clone of MDV strain GX0101 with REV-LTR integration retained its pathogenicity. *Chinese Sci Bull.* 54:2641-2647.
- Tan J, Cooke J, Clarke N, Tannock GA. 2007. Molecular evaluation of responses to vaccination and challenge by Marek's disease viruses. *Avian Pathol.* 36:351-359.
- Teng L, Wei P, Song Z, He J, Cui Z. 2011. Molecular epidemiological investigation of Marek's disease virus from Guangxi, China. *Arch Virol.* 156:203-206.
- Tian M, Zhao Y, Lin Y, Zou N, Liu C, Liu P, Cao S, Wen X, Huang Y. 2011. Comparative analysis of oncogenic genes revealed unique evolutionary features of field Marek's disease virus prevalent in recent years in China. *Virol J.* 8:121.
- Tulman ER, Afonso CL, Lu Z, Zsak L, Rock DL, Kutish GF. 2000. The genome of a very virulent Marek's disease virus. *J Virol.* 74:7980-7988.
- Vossen RHAM, Aten E, Roos A, Den Dunnen JT. 2009. High-resolution melting analysis (HRMA)-more than just sequence variant screening. *Hum Mutat.* 30:860-866.
- Wajid SJ, Katz ME, Renz KG, Walkden-Brown SW. 2013. Prevalence of Marek's disease virus in different chicken populations in Iraq and indicative virulence based on sequence variation in the {ecoRI-q} (meq) gene. *Avian Dis.* 57:562-568.
- Walkden-Brown SW, Islam AFA, Groves PJ, Rubite A, Sharpe SM, Burgess SK. 2013. Development, application and results of routine monitoring of Marek's disease virus in broiler house dust using real-time quantitative {PCR}. *Avian Dis.* 57:544-554.
- Witter RL, Calnek BW, Buscaglia C, Gimeno IM, Schat KA. 2005. Classification of Marek's disease viruses according to pathotype: Philosophy and methodology. *Avian Pathol.* 34:75-90.

- Witter RL. 1997. No Title Increased virulence of Marek's disease virus field isolates. *Avian Dis.* 41:149-163.
- Witter RL. 1998. The changing landscape of Marek's disease. *Avian Pathol.* 27:S46-S53.
- Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ. 2003. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin Chem.* 49:853-860.
- Woźniakowski G, Samorek-Salamonowicz E, Kozdruń W. 2011a. Molecular characteristics of Polish field strains of Marek's disease herpesvirus isolated from vaccinated chickens. *Acta Vet Scand.* 53:10.
- Woźniakowski G, Samorek-Salamonowicz E, Kozdruń W. 2011b. Rapid detection of Marek's disease virus in feather follicles by loop-mediated amplification. *Avian Dis.* 55:462-467.
- Woźniakowski G, Samorek-Salamonowicz E, Kozdruń W. 2013. Comparison of loop-mediated isothermal amplification and PCR for the detection and differentiation of Marek's disease virus serotypes 1, 2 and 3. *Avian Dis.* 57:539-543.
- Woźniakowski G, Samorek-Salamonowicz E. 2014. Direct detection of Marek's disease virus in poultry dust by loop-mediated isothermal amplification. *Arch Virol.* 159:3083-3087.
- Young P, Gravel J. 1996. Rapid diagnosis of Marek's disease virus in blood and other tissues using PCR. In: Silva RF, Cheng HH, Coussens PM, Lee LF, Valicer LF, editors. *Current research on Marek's disease: Proceedings of The 5th International Symposium on Marek's Disease.* Michigan, 7-11 September 1996. Michigan (US): American Association of Avian Pathologists Inc. p. 308-310.
- Yu ZH, Teng M, Luo J, Wang XW, Ding K, Yu LL, Su JW, Chi JQ, Zhao P, Hu B, et al. 2013. Molecular characteristics and evolutionary analysis of field Marek's disease virus prevalent in vaccinated chicken flocks in recent years in China. *Virus Genes.* 47:282-291.