

# OPTIMASI PROGRAM REVERSE TRANSCRIPTASE POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-PCR) VIRUS INFECTIOUS BRONCHITIS ISOLAT LAPANG INDONESIA

N. L. P. I. DHARMAYANTI<sup>1</sup>, W. ASMAR<sup>2</sup>, W.T. ARTAMA<sup>2</sup>, R. INDRIANI<sup>1</sup> dan DARMINTO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Balai Penelitian Veteriner, PO. Box 151, Bogor 16114

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

## ABSTRACT

Optimization of Program RT-PCR for Infectious Bronchitis Virus (IBV) Field Isolates in Indonesia

Infectious bronchitis is the respiratory disease caused by infectious bronchitis virus (IBV). It is a positive-sense single stranded RNA virus. IBV in allantoic fluid can be confirmed by RNA extraction and use the RNA for Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) reaction. While, that study never done for IBV field isolates in Indonesia. In this study to optimize RT-PCR for IBV field isolates that are I-14, I-37 and I-269. The result of this study suggest that RT-PCR program for I-14 and I-37 isolates are RT reaction 42°C for 30 minute, 95°C for 4 minute. PCR amplification was performed for 35 cycles. The denaturation step for 30 second at 94°C, the annealing step for 1 minute at 50°C and the extension step for 1 minute at 72°C. The Final extension for 15 minute at 72°C. For I-269 isolate has same optimization but the annealing step for 1 minute at 48°C.

**Key words:** Optimization, RT-PCR, Infectious Bronchitis Virus field isolates

## PENDAHULUAN

*Infectious bronchitis* adalah penyakit pernapasan yang disebabkan oleh virus *infectious bronchitis*. Penyakit ini bersifat akut, sangat kontagius dan ditandai dengan batuk, bersin dan mungkin dapat menyerang ginjal. Pada ayam petelur penyakit ini biasanya menyebabkan penurunan produksi dan kualitas telur. Kematian dapat juga terjadi pada ayam muda yang terinfeksi pada saluran pernapasan ataupun ginjal (CAVANAGH dan NAQI, 1997).

Virus IB mempunyai genom RNA *positifve single strand*, dengan panjang genom sekitar 27.6 Kb (BOURNELL *et al.*, 1987). Genom virus ini mengandung informasi untuk empat protein struktural yaitu *spike glycoprotein*, *membrane glycoprotein*, *small membrane glycoprotein* dan *nucleocapsid*. *Spike glycoprotein* dikaitkan dengan *virus neutralisasi*, *serotype specificity* dan *cell attachment* dan dipisahkan pada saat post translasi menjadi subunit N terminal S-1 dan C terminal S-2 (KOCH *et al.*, 1990; NIESTERS *et al.*, 1989).

RNA virus IB dapat dideteksi dalam jaringan terinfeksi dengan menggunakan metode RT-PCR. RNA dapat diekstraksi dari swab trakea atau jaringan ayam hidup. Adanya virus IB dalam cairan allantois dapat dikonfirmasi dengan ekstraksi RNA secara langsung dari beberapa ratus mikroliter cairan allantois dan menggunakan RNA tersebut dalam reaksi RT-PCR. Produk DNA divisualisasi dengan pewarnaan ethidium

bromide setelah elektroforesis dalam gel agarose atau polyacrylamide. Primer oligonukleotida universal disusun berdasarkan sekuen dalam gen S1 (KWON *et al.*, 1993), gen S2 (LIN *et al.*, 1991a; LIN *et al.*, 1991b) dan gen nukleokapsid (ZWAAGSTRA *et al.*, 1992). Oligonukleotida yang lain disusun berdasarkan pada bagian dari gen N dan gen M (BEACH and SCHALM, 1936 dalam CAVANAQ and NAQI, 1997; JACKWOOD *et al.*, 1992).

*Polymerase chain reaction* (PCR) merupakan suatu teknologi yang menyediakan suatu terobosan baru bagi deteksi virus IB, yang sebelumnya dengan metode tradisional deteksi IBV membutuhkan waktu seperti adaptasi IBV pada embrio. *Polymerase chain reaction* menggunakan primer yang menciptakan hibridisasi spesifik pada segmen *template* DNA, kemudian diikuti dengan DNA polimerase yang menghasilkan DNA lebih banyak dengan mengkopi templat DNA. *Polymerase chain reaction* terdiri dari tiga langkah yang dilakukan bersamaan dalam sebuah siklus :1) temperatur tinggi untuk denaturasi DNA menjadi *single strand*, 2) annealing primer pada *single strand* DNA, 3) polimerisasi *strand* baru DNA dengan DNA polimerase. Umumnya DNA polimerase diperoleh dari bakteri yang stabil dan mampu tumbuh pada temperatur tinggi yaitu *Thermus aquaticus*. Jumlah DNA akan meningkat dua kali setiap siklus. Untuk menghasilkan jumlah DNA yang besar, siklus PCR dilakukan 20-30 siklus (ANDREASEN *et al.*, 1991). Pada IBV karena mempunyai genom RNA, maka pertama kali yang

dilakukan adalah membuat kopi DNA (cDNA) dengan menggunakan *reverse transcriptase*. Setelah itu cDNA diamplifikasi dengan PCR (ANDREASEN *et al.*, 1991). Sementara itu, RT-PCR belum pernah dilakukan pada virus IB isolat lapang Indonesia. Berdasarkan latar belakang di atas penelitian ini bertujuan untuk melakukan optimasi program RT-PCR pada virus IB isolat lapang Indonesia sehingga dapat digunakan sebagai dasar untuk penelitian virus ini selanjutnya.

## MATERI DAN METODE

### Virus

Tiga virus *Infectious Bronchitis* isolat lapang Indonesia yaitu I-14, I-269 dan I-37 (DARMINTO, 1992; INDRIANI dan DARMINTO, 2000) digunakan dalam penelitian ini. Virus IB diperbanyak dengan menggunakan telur *specific pathogen free* (SPF) berembrio umur 9 hari. Stok virus diinokulasikan ke dalam cairan allantois sebanyak 0,2 ml masing-masing telur dan diinkubasi selama 48 jam. Setelah 48 jam, semua embrio dibunuh dengan memasukkan pada suhu 4°C selama 24 jam. Cairan allantois dipanen setelah 24 jam dan digunakan untuk pembuatan virus pekat dengan cara diultrasentrifugasi kecepatan 93.000 g selama 2 jam (WANG and KHAN, 2000).

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

Isolasi RNA virus ini dilakukan dengan kit *Quick Prep Total RNA Extraction Kit* (Amersham Pharmacia). Hasil isolasi RNA diamplifikasi dengan menggunakan *Ready to go RT-PCR beads* (Amersham Pharmacia) dengan primer CK4/CK2 (Cybergene AB). Primer CK4 (*forward*) dengan total panjang 23 basa dengan sekuen TCAAAGCTTCANGGNGGNGCNTA dan primer CK2 (*reverse*) total panjang 25 basa dengan sekuen CTCGAATTCNGTRTTRTAYTGRCa pada mesin *thermal cycler* (Perkin Elmer 2400). Selanjutnya dilakukan optimasi program PCR. Hasil PCR dicek dengan menggunakan agarose gel (Promega, *analytical grade*) 1%.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

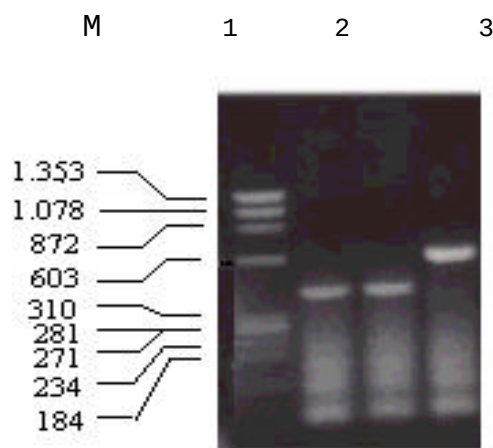
Reaksi RT-PCR dilakukan dengan menggunakan *Ready to go RT-PCR beads* (Amersham Pharmacia) sesuai instruksi penggunaan dengan modifikasi. Masing-masing *bead* mengandung ~ 2 unit *Taq DNA polymerase*, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0 pada temperatur ruang), 60 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM masing-masing dNTP, *Moloney Murine Leukemia Virus* (M-

MuLV) *Reverse Transcriptase*, *RNAguard Ribonuclease Inhibitor* (*porcine*) dan *stabilizers* termasuk *Rnase/Dnase-free BSA*.

Volume total RNA dan primer yang akan digunakan dalam reaksi RT-PCR *bead* harus ditentukan karena penting untuk menentukan jumlah air yang harus ditambahkan didalam *bead*. Reaksi RT-PCR hasil optimasi adalah sebagai berikut, primer yang digunakan adalah 50 pmol/µl. Adapun reaksinya adalah primer CK2 dan CK4 masing-masing 2 µl, templat RNA 2µl, DEPC-dH<sub>2</sub>O 44 µl, hingga total keseluruhan reaksi adalah 50 µl. Tabung selanjutnya dimasukkan pada mesin *thermal cycler* dan dilakukan optimasi program.

Optimasi program RT-PCR yang diperoleh adalah untuk isolat I-14 dan I-37 adalah reaksi *Reverse Transcriptase* (RT) pada suhu 42°C selama 30 menit. Reaksi kemudian diinkubasikan pada suhu 95°C selama 5 menit untuk menginaktifkan *reverse transcriptase* dan denaturasi komplit *template*. Reaksi dilanjutkan dengan *polymerase chain reaction* (PCR) yaitu denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik; annealing, 50°C selama 1 menit; ekstensi, 72°C selama 1 menit; final ekstensi, 72°C selama 15 menit dengan siklus PCR sebanyak 35 kali. Untuk isolat I-269 optimasinya sama dengan optimasi diatas hanya berbeda pada suhu annealing yaitu pada suhu 48°C.

Pada Gambar 1 dapat dilihat hasil amplifikasi dari ketiga isolat lapang virus *infectious bronchitis* yaitu, isolat I-14 menghasilkan 400 bp, isolat I-37 sekitar 600 bp dan isolat I-269 memberikan hasil pada posisi 400 bp.



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

---

## KESIMPULAN

Penelitian ini menghasilkan optimasi program RT-PCR yang digunakan untuk isolat I-14 dan I-37 adalah reaksi RT pada suhu 42°C selama 30 menit, 95°C selama 4 menit dan reaksi PCR dilakukan dengan denaturasi, 94°C selama 30 detik; annealing, 50°C selama 1 menit; ekstensi, 72°C selama 1 menit; final ekstensi, 72°C selama 15 menit dengan siklus PCR sebanyak 35 kali. Untuk isolat I-269 optimasinya sama dengan optimasi diatas hanya berbeda pada suhu annealing yaitu pada suhu 48°C.

## DAFTAR PUSTAKA

- ANDREASEN, J.R., M.W. JACKWOOD, dan D.A. HILT. 1991. Polymerase chain reaction amplification of the genome of infectious bronchitis virus. *Avian Dis.* 35: 216-220.
- BOURSNELL, M.E.G., T.D.K. BROWN, I.J. FOULDS, P.F. GREEN, F.M. TOMLEY and M.M. BINNS. 1987. Completion of the sequence of the genome of the coronavirus avian infectious bronchitis virus. *J. Gen. Virol.* 68: 55-77.
- BURLESOM, F.G., T.M. CHAMBERS, and D.L. WEDBRAUK. 1992. *Virology: A Laboratory manual*. Academic Press, Inc. California. 40-57
- CAVANAGH, D., and S.A. NAQI. 1997. Infectious bronchitis In: *Diseases of poultry*, 10<sup>th</sup> ed. B.W. Calnek ed. Iowa State University. Ames, IA. 511-526
- DARMINTO, 1992. Serotyping of infectious bronchitis viral isolates. *Penyakit Hewan*. 24 (44): 76-81.
- INDRIANI, R dan DARMINTO. 2000. Variasi serotipe isolat virus infectious bronchitis yang berasal dari beberapa daerah di pulau Jawa. *JITV*. 5 (4): 234-240.
- JACKWOOD, M.W., H.M. KWON and D.A. HILT. 1992. Infectious bronchitis virus detection in allantoic fluid using the polymerase chain reaction and a DNA probe. *Avian Dis.* 36: 403-409
- KEELER, C.L., K.L. REED, R.W. NIX, and J.G. GELB. 1998. Serotype identification of avian infectious bronchitis virus by RT-PCR of peplomer (S-1) gene. *Avian Dis.* 42: 275-284.
- KOCH, G., L. HARTOG, A. KANT and D.J. VAN ROOZELAAR. 1990. Antigenic domain on the peplomer protein of avian infectious bronchitis virus: correlation with biological functions. *J. Gen. Virol.* 71: 1929-1935.
- KWON, M.K., M.W. JACKWOOD, and J. GELB. 1993. Differentiation of infectious bronchitis virus serotypes using polymerase chain reaction and Restriction fragment length polymorphism analysis. *Avian Dis.* 37: 194-202
- LIN, Z.A., KATO, Y. KUDOU, and S. UEDA. 1991a. A new typing method for the avian infectious bronchitis virus using polymerase chain reaction and restriction enzyme fragment length polymorphism. *Virology*. 116: 19-31.
- LIN, Z.A., KATO, Y. KUDOU, K. UEDA and S. UEDA. 1991b. Typing of recent infectious bronchitis isolates causing nephritis in chickens. *Arch. Virol.* 120: 145-149
- ZWAAGSTRA, K.A., B.A.M. VAN DER ZEIJST and J.G. KUSTERS. 1992. Rapid detection and identification of avian infectious bronchitis virus. *J. Clin. Microbiol.* 30: 79-84.
- NIESTERS, H., P.N. BLEUMINK, A. OSTERHAUS, M.C. HORZINEK dan B.A.M. VAN DER ZEIJST. 1989. Epitopes on the peplomer protein of infectious bronchitis coronavirus M41 as defined by monoclonal antibodies. *Virology*. 161: 511-519.