

## **Analisis Filogenetik Sekuen Nukleotida bagian Hipervariabel Protein VP2 Virus Gumboro Isolat Indonesia**

(PHYLOGENETIC ANALYSIS OF NUCLEOTIDE SEQUENCE  
OF HIPERVARIABLE FRAGMENT OF VP2  
OF INFECTIOUS BURSAL DISEASE VIRUS ISOLATED IN INDONESIA)

**I Gusti Ngurah Kade Mahardika<sup>1</sup>, Lies Parede<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Laboratorium Virologi, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana  
Jl PB Sudirman, Denpasar; Telp 0361701808; Faksimili: 0361-701808  
Email: gnmahardika@indosat.net.id*

<sup>2</sup>*Balai Besar Penelitian Veteriner, Jln Martadinata, Bogor.*

### **ABSTRAK**

Sekuen nukleotida bagian hipervariabel dari VP2 virus Gumboro/*Infectious Bursal Disease* (IBD) asal Bali dan daerah lain di Indonesia dibandingkan dengan virus IBD *standard virulent* (sv) dan *very virulent* (vv) manca negara yang dapat diakses pada *GeneBank*. Perbandingan dilakukan dengan menggunakan 'program penjajaran sekuens bertingkat' dengan piranti lunak ClustalW (Mega 3.1). Pohon filogenetik dikonstruksi dengan cara '*Neighbor-Joining*' dan diuji dengan *Bootstrap*. Hasil analisis menunjukkan bahwa virus IBD secara genetik dapat dikelompokkan dalam dua kelompok (*cluster*) besar, yaitu kelompok virus IBD Amerika-Eropa dan Australia. Kelompok IBD Amerika-Eropa selanjutnya terbagi lagi dalam dua sub-kelompok, yaitu sub-kelompok IBD-klasik dan sub-kelompok vv-IBD. IBD-klasik direpresentasikan oleh isolat STC, Cu-1, Variant A, F52-70, dan PBG98. Dua isolat asal Bali dan sebagian besar virus IBD Indonesia lainnya berada dalam sub-kelompok vv-IBD, bersama-sama dengan virus IBD yang dilaporkan sebagai isolat yang sangat virulen. Satu isolat asal Indonesia – yaitu Indo 13 – berada dalam sub-kelompok IBD-klasik, dan sangat dekat dengan virus klasik Amerika, STC.

Kata-kata kunci : sekuen nukleotida, hipervariabel protein, virus gumboro.

### **ABSTRACT**

Nucleotide sequence of hypervariable fragment of VP2 of infectious bursal disease virus (IBDV) isolated in Bali and Indonesia were compared to standard virulent (svIBDV's) and very virulent (vvIBDV's) viruses accessed in GeneBank. The comparison were done using the multiple sequence alignment program of Mega 3.1. The sequence were aligned by the ClustalW Method (Mega 3.1), that is grouping the sequences into clusters by examining the distance between all pairs. The sequences were aligned pair wise, then as groups. Phylogenetic tree were constructed using Neighbor-Joining and Bootstrap-tested. The analysis showed that IBDV can be clustered into 2 major groups, i.e. America-Europe and Australia clusters. The America-Europe cluster is further divided into two sub-clusters, i.e. classic IBD and vv-IBD. Classic-IBD is represented by standard STC, Cu-1, Variant A, F52-70, and PBG98 viruses. Two IBDV's isolated in Bali and the most of other Indonesian isolates belong to sub-cluster vv-IBD and share a common cluster with IBDV that were recently reported as very virulent strains. One exceptional isolate is Indo 13, which is grouped into classic IBD, and closely related to classical American standard virus, STC.

Keywords : nucleotide sequence, hypervariable fragment, IBDV.

### **PENDAHULUAN**

Virus infectious bursal disease (IBD) merupakan agen penyebab penyakit yang dikenal sebagai Gumboro. Sekalipun telah dikenal sejak lebih dari 40 tahun yang lalu, penyakit ini tetap sebagai ancaman penting bagi industri peternakan ayam (Mueller. 2003).

Munculnya virus varian serta galur sangat virulen (*very virulent/vv*) dianggap bertanggung jawab pada berbagai kasus wabah pada peternakan unggas yang telah mendapat vaksinasi secara rutin (Brown *et al.* 1994; Yamaguchi *et al.* 1996)

Informasi genetik dari beberapa isolat gumboro asal Bali (Mahardika 2005a; 2005b)

dan daerah lain di Indonesia (Rudd *et al.* 2002; Parede *et al.* 2003) telah dipublikasi dan mengindikasikan bahwa vvIBD juga tersebar di Indonesia. Hubungan filogenetik antara virus IBD asal Bali dengan virus dari berbagai belahan dunia menarik untuk dicermati. Hasil analisis ini dapat membantu pemilahan galur virus IBD vaksin yang hendak digunakan di Indonesia.

#### METODE PENELITIAN

Sekuen nukleotida fragmen VP2 dari dua isolat virus IBD asal Bali Kar97 dan Neg98 yang dipublikasikan (Mahardika 2005a; 2005b) dibandingkan dengan berbagai virus IBD dari Indonesia (Rudd dkk. 2002; Parede *et al.* 2003) dan berbagai negara yang dapat diakses pada *GeneBank* dengan *ClustalW Method* dengan memperhatikan jarak genetik dari pasangan-pasangan sekuen menggunakan piranti lunak Mega 3.1 (Kumar *et al.* 2004). Masing-masing sekuen dijabarkan dengan metode “ClustalW” dengan mengelompokkan sekuen menjadi sub-kelompok dan selanjutnya kelompok besar, dengan menghitung jarak antar sekuen secara berpasangan. ClustalW merupakan program penyepadanan sekuen DNA atau protein umum. Program ini menghitung kesepadanan terbaik dari sekuens tertentu dan mengelompokkannya sehingga kesamaan dan perbedaannya dapat diketahui (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw>). Negara asal dan *Accession Number* virus-virus tersebut ditampilkan pada Tabel 1. Isolat asal Bali Kar97 dan Neg98 juga telah didaftarkan di

*GeneBank* dengan kode akses (Acc. No. EU714287 dan EU714288).

#### HASIL DAN PEMBAHASAN

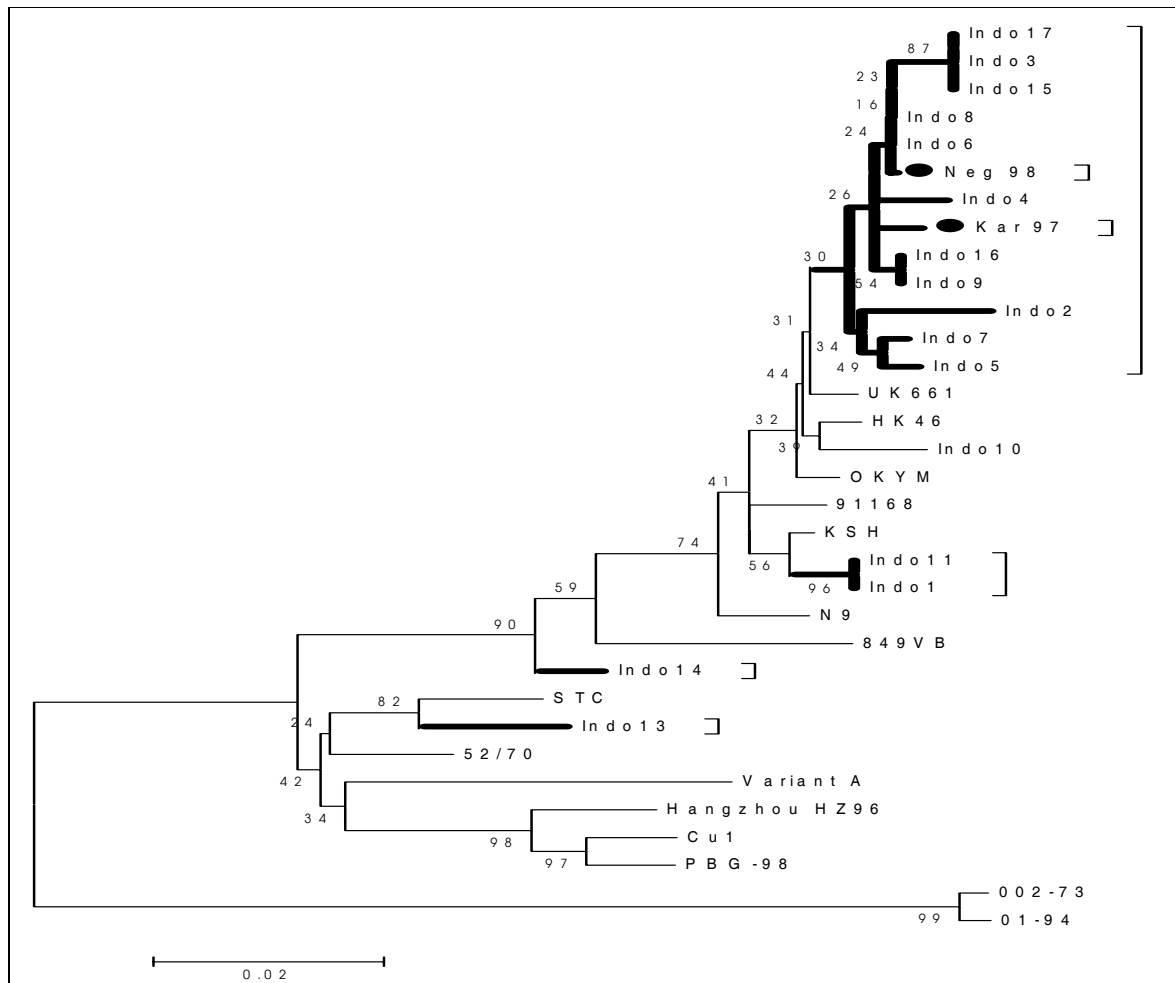
Pohon filogenetik (*phylogenetic tree*) dari representatif virus IBD dari berbagai negara – yang digolongkan sebagai virus IBD virulen klasik dan vvIBD – serta dua isolat asal Bali (Kar97 dan Neg98) serta daerah lain di Indonesia dipresentasikan pada Gambar 1. Jarak genetik (*genetic distance*) antar virus-virus yang dianalisis dapat diduga dengan panjang cabang/ranting horisontal pohon filogenetik tersebut, sesuai dengan skala yang ditampilkan.

Hasil tersebut menunjukkan virus IBD secara genetik dapat dikelompokkan dalam dua kelompok (*cluster*) besar, yaitu kelompok virus IBD Amerika-Eropa dan Australia. Kelompok IBD Amerika-Eropa selanjutnya terbagi lagi dalam dua sub-kelompok, yaitu sub-kelompok IBD-klasik dan sub-kelompok vv-IBD. IBD-klasik direpresentasikan oleh isolat STC, Cu-1, Variant A, F52-70, dan PBG98. Dua isolat asal Bali dan sebagian besar virus IBD Indonesia lainnya berada dalam satu sub-kelompok vv-IBD, bersama-sama dengan virus IBD yang dilaporkan sebagai isolat yang sangat virulen. Satu isolat asal Indonesia – yaitu Indo 13 – berada dalam sub-kelompok IBD-klasik, dan sangat dekat dengan virus klasik Amerika, STC.

Hasil analisis ini menarik dicermati lebih lanjut. Virus IBD asal Indonesia yang dipelajari

Tabel 1. Nomor akses (*Accession Number*) sekuens cDNA dan asam amino virus IBD pada *GeneBank* yang dibandingkan dengan isolat asal Bali

Virus	Asal Virus	GeneBank Acc. No.	Acuan
F52-70	Inggris	D00869	Bayliss <i>et al.</i> (1990)
Cu-1	Jerman	D00867	Bayliss <i>et al.</i> (1990)
PBG98	Inggris	D00868	Bayliss <i>et al.</i> (1990)
STC	Amerika Serikat	D00499	Kibenge <i>et al.</i> (1990)
Variant A	Amerika Serikat	M64285	Lana <i>et al.</i> (1992)
002-73	Australia	X03993	Hudson <i>et al.</i> (1986)
UK661	Inggris	X92760	Brown <i>et al.</i> (1994)
849VB	Belgia	X95883	Van den Berg <i>et al.</i> (1994)
N9	Nigeria	AF159211	Zierrenberg <i>et al.</i> (2000)
01-94	Australia	AF148073	Sapats dan Ignjatovic (2000)
OKYM	Jepang	D49706	Yamaguchi <i>et al.</i> (1997)
HK46	Hongkong	AF092943	Lim <i>et al.</i> (1999)
KSH	Korea Selatan	AF165151	Kwon <i>et al.</i> (2000)
HZ96	Hongkong	AF121256	Yu <i>et al.</i> (1999)
91168	Perancis	Y14957	Etarradosi <i>et al.</i> (1998)
Indo 1-17	Indonesia	AF508738-AF508753	Rudd <i>et al.</i> (2002); Parede <i>et al.</i> (2003)



Gambar 1. “Pohon Filogenetik” (*phylogenetic tree*) hasil analisis *Neighbour-Joining* dan Uji Filogeni Bootstrap Berbagai Isolat virus IBD. Dua isolat virus IBD Bali (Kar97 & Neg98, ditandai dengan bola hitam), dan berbagai virus IBD dari daerah lain di Indonesia serta berbagai negara di dunia berdasarkan sekuens nukleotida daerah hipervariabel VP2. Negara asal dan *accession number* masing-masing virus seperti pada Materi dan Metode. Panjang dari setiap pasangan dari cabang-cabang diatas menunjukkan jarak antara masing-masing pasangan. Skala dibawah pohon menunjukkan ukuran jarak antar sekuens. Angka pada pohon menunjukkan nilai bootstrap masing-masing cabang/ranting. Cabang/ranting virus asal Indonesia ditandai dengan garis tebal.

dalam penelitian ini ternyata secara genetik sangat dekat dengan sebagian besar isolat-isolat baru yang disebut-sebut sebagai vvIBD. Virus-virus tersebut membentuk satu kelompok genetik dan tampaknya berasal dari satu virus asal. Kenyataan ini mendukung spekulasi bahwa wabah-wabah IBD baru yang dilaporkan akhir dekade 1990-an dari Eropa, Afrika, dan Asia berasal dari galur-galur virus IBD yang berhubungan satu sama lainnya (Zierrenberg *et al.* 2000).

Virus-virus tersebut diisolasi pada waktu yang hampir bersamaan, yaitu paruh kedua dekade 1990-an. ‘Gelombang’ munculnya vvIBD di Eropa, Afrika, dan Asia ini tampaknya berasal

dari satu virus asal yang sama. Isolat-isolat tersebut, secara genetik berjarak cukup signifikan dengan virus IBD Australia.

Seperti diketahui, penularan virus IBD umumnya terjadi melalui kontak unggas (ayam) domestik (Lukert dan Hitchner 1984), sementara tidak pernah dilaporkan berhubungan dengan hewan lain maupun burung liar. Karenanya, mata rantai produk-produk biologis untuk unggas dan/atau bahan-bahan asal unggas antar Eropa, Afrika, dan Asia tampaknya bertanggung-jawab dalam penyebaran vvIBD tersebut, termasuk ke Indonesia dan Bali.

Untuk kepentingan pengembangan vaksin, hasil ini menunjukkan bahwa virus-virus IBD

yang bersirkulasi di Indonesia sangat beragam. Sebagian besar isolat memang berada dalam satu ranting yang sama sub-klaster vvIBD. Virus-virus dalam ranting khusus virus Indonesia ini tampaknya berevolusi dari satu vvIBD asal yang sama. Akan tetapi, beberapa isolat berada dalam ranting yang berbeda dengan kelompok besar itu, sekalipun masih dalam klaster vvIBD. Satu isolat bahkan berada dalam sub-klaster IBD-klasik, dan secara genetik sangat dengan virus standar Amerika STC. Fakta ini tampaknya terjadi akibat introduksi berulang virus IBD ke Indonesia.

Keragaman genetik itu dapat mempunyai implikasi yang besar dalam keberhasilan pencegahan kematian dan kerugian ekonomi akibat IBD. Karena itu, berbagai isolat Indonesia perlu dikarakterisasi secara imunologi untuk mengetahui potensi bibit vaksin yang dipasarkan dalam menghasilkan proteksi silang yang sempurna pada tantangan oleh isolat lapang.

### SIMPULAN

Dua isolat asal Bali dan sebagian besar virus gumboro/IBD Indonesia lainnya berada dalam satu sub-kelompok dengan virus IBD yang dilaporkan sebagai isolat yang sangat virulen (*very virulent* (vv) IBD). Satu isolat asal Indonesia – yaitu Indo 13 – berada dalam sub-kelompok IBD-klasik, dan sangat dekat dengan virus klasik Amerika, STC.

### SARAN

Berbagai isolat virus gumboro/IBD Indonesia perlu dikarakterisasi secara imunologi untuk mengetahui potensi bibit vaksin yang dipasarkan dalam menghasilkan proteksi silang yang sempurna pada tantangan isolat lapang.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini merupakan bagian dari proyek URGE Batch II Departemen Pendidikan Nasional Indonesia 1997-1999. Analisis molekuler dilakukan di Institut fuer Virologie, Giessen University, dengan dukungan penuh dari Deutschem Akademischem Austauschdienst (DAAD) dibawah supervisi Dr. Juergen A Richt, TA.

### DAFTAR PUSTAKA

- Bayliss CD, Spies U, Shaw K, Peters RW, Papageogiou A, Muller H, Bournsnel ME., 1990. A comparison of the sequences of segment A of four infectious bursal disease virus strains and identification of a variable region in VP2. *J Gen Virol* 71 :1303-1312.
- Boot HJ, ter Huurne AA, Hoekman AJ, Peeters BP, Gielkens AL., 2000. Rescue of very virulent and mosaic infectious bursal disease virus from cloned cDNA: VP2 is not the sole determinant of the very virulent phenotype. *J Virol* 74:6701-6711.
- Brown MD, Green P, Skinner MA., 1994. VP2 sequences of recent European 'very virulent' isolates of infectious bursal disease virus are closely related to each other but are distinct from those of 'classical' strains. *J Gen Virol* 75 :675-680.
- Etteradossi N, Arnauld C, Toquin D, Rivallan G., 1998. Critical amino acid changes in VP2 variable domain are associated with typical and atypical antigenicity in very virulent infectious bursal disease viruses. *Arch Virol* 143:1627-1636.
- Hudson PJ, McKern NM, Power BE, Azad, A.A. 1986. Genomic structure of the large RNA segment of infectious bursal disease virus. *Nucleic Acids Res.* 14 : 5001-5012.
- Kibenge FS, Jackwood DJ, Mercado CC, 1990. Nucleotide sequence analysis of genome segment A of infectious bursal disease virus. *J Gen Virol* 71 : 569-577.
- Kumar S, Tamura K, Nei M, 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings In Bioinformatics* 5:150-163.
- Kwon HM, Kim DK, Hahn TW, Han JH, Jackwood DJ., 2000. Sequence of precursor polyprotein gene (segment A) of infectious bursal disease viruses isolated in Korea. *Avian Dis* 44:691-696.
- Lana DP, Beisel CE, Silva RF. 1992. Genetic mechanisms of antigenic variation in infectious bursal disease virus: analysis of a naturally occurring variant virus. *Virus Genes* 6 : 247-259
- Lim BL, Cao Y, Yu T, Mo CW., 1999. Adaptation of very virulent infectious bursal disease virus to chicken embryonic fibroblasts by site-directed mutagenesis of residues 279 and 284 of viral coat protein VP2. *J Virol* 73:2854-2862.

- Lukert PD, Hitchner SB, 1984. Infectious Bursal Disease. In Hofstad MS (Ed), *Disease of Poultry*. 8<sup>th</sup> Ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 566-676
- Mahardika IGNK, 2005a. Sekuens cDNA Bagian Hipervariabel Protein VP2 Virus Infectious Bursal Disease yang Diisolasi di Bali. *J Vet*, 6: 94-100
- Mahardika IGNK, 2005b. Sekuens Asam Amino dari Isolat Infectious Bursal Disease Virus Asal Bali Mempunyai Homologi yang Tinggi dengan Galur yang Sangat Virulen. *J Vet*, 6: 15-20.
- Muller H, Islam MR, Raue R 2003. Research on infectious bursal disease—the past, the present and the future. *Vet Microbiol* 97:153-165
- Parede LH, Sapats S, Gould G, Rudd M, Lowther S, Ignjatovic J, 2003. Characterization of infectious bursal disease virus isolates from Indonesia indicates the existence of very virulent strains with unique genetic changes. *Avian Pathol* 32:511-518.
- Rudd MF, Heine HG, Sapats SI, Parede L, Ignjatovic J., 2002. Characterisation of an Indonesian very virulent strain of infectious bursal disease virus. *Arch Virol*. 147:1303-1322.
- Sapats SI, Ignjatovic J. 2000. Antigenic and sequence heterogeneity of infectious bursal disease virus strains isolated in Australia. *Arch Virol* 145 : 773-785
- Van Den Berg TP, M Gonze D, Morales and G. Meulemans, 1994. Acute infectious bursal disease in poultry : immunological and molecular basis of antigenicity of a highly virulen strain. *Avian Pathol* 25: 751-768.
- Yamaguchi T, Ogawa M, Inoshima Y, Miyoshi M, Fukushi H, Hirai K., 1997. Identification of sequence changes responsible for the attenuations of highly virulent infectious bursal disease virus. *Virology*. 223:219-23.
- Yu L, Song AK, Zhang AB, Deng R., 2000. Cloning and expression of the VP2 gene of an infectious bursal disease virus. *Avian Dis* 44:170-178.
- Zierenberg K, Nieper H, van den Berg TP, Ezeokoli CD, Voss M, Muller H. 2000. The VP2 variable region of African and German isolates of infectious bursal disease virus: comparison with very virulent, “classical” virulent, and attenuated tissue culture-adapted strains. *Arch Virol* 145:113-125.