

ANALISIS GEN NUKLEOPROTEIN VIRUS RABIES BALI (CVB751)

KETUT KARUNI NYANAKUMARINATHI, ENUH RAHARDJO DJUSA, YUNI YUPIANA, DAN DODO HERMAWAN

Unit Uji Virologi

Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan, Gunungsindur-Bogor 16340

ABSTRAK

Metode satu tahap *reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (*one step RT-PCR*) digunakan untuk mendeteksi gen nukleoprotein (N) virus rabies dari isolat yang berasal dari propinsi Bali (CVB751). Sepasang primer RT-PCR (RHN 17: TTC AAA GTC AAT CAG GTG G dan RHN 18: CCA TGT AGC ATC CAA CAA AGT) digunakan untuk mengamplifikasi bagian gen N. Isolat rabies yang ditumbuhkan pada mencit dan sel neuroblastoma (N2A) menunjukkan hasil yang positif pada *band* 947. Sekuen dari 2 produk DNA yang diamplifikasi bersama dengan 25 sekuen yang diperoleh dari *gen bank* dianalisa dengan menggunakan *software* Mega 5.05. Pada penelitian ini virus Rabies dikelompokkan menjadi 7 kelompok yaitu: I (7 isolat *central* Sumatra dan *south* Sumatra), II (4 isolat *central* Sumatra, *south* Sumatra dan *North* Sumatra), III (1 isolat *Java*), IV (9 isolat *West* Sumatra, Flores dan Kalimantan), V (1 isolat Rabies Bali), VI (2 isolat China), VII (3 isolat dari Thailand, CVS dan India).

Kata kunci: Rabies, Gen Nukleoprotein, PCR

ABSTRACT

One step Method reverse transcriptase-polymerase chain reaction (one step RT-PCR) was used to detect gen nucleoprotein (N) Rabies virus originated from Bali isolate (CVB751). A pair of primer RT-PCR (RHN 17: TTC AAA GTC AAT CAG GTG G dan RHN 18: CCA TGT AGC ATC CAA CAA AGT) was employed to amplify gen N. Rabies Isolate that was propagated in mice and Neuroblastoma (N2A) cell showed positive result on band 947. Sequence of 2 DNA products were analyzed together with 25 sequences derived from gen bank using Mega 5.05 software. The analysis classify the sequences into 7 groups namely: I (7 isolates from central Sumatra and south Sumatra), II (4 isolates from central Sumatra, south Sumatra and North Sumatra), III (1 isolate from Java), IV (9 isolates from West Sumatra, Flores and Kalimantan), V (1 isolate Rabies Bali), VI (2 isolates from China), VII (3 isolates from Thailand, CVS and India).

Keywords: Rabies, Nucleoprotein Gene, PCR

PENDAHULUAN

Rabies merupakan penyakit zoonosis yang bersifat fatal. Virus rabies termasuk dalam genus *Lyssavirus* dan keluarga *Rhabdoviridae*. Klasifikasi taksonomi *Lyssavirus* berdasarkan perbedaan antigenik pada protein nukleoprotein (N). Terdapat 6 genotipe dan virus rabies termasuk dalam genotipe 1 (1,5).

Virus rabies termasuk virus RNA rantai tunggal berpolaritas negatif (ss-RNA virus). Virus rabies mempunyai panjang 180 nm dan diameter 75 nm. Panjang genom 11 –12 kb dan tersusun atas lima daerah penyandi protein yaitu: gen Polymerase/Transkriptase (L), Glikoprotein (G), Matriks (M), Non Struktural protein / Phosphorprotein(NS/P) dan Nukleoprotein (N). Protein L, NS dan N berada di dalam nukleokapsid, sedangkan protein G dan M berada di dalam amplop (1,8).

Kejadian penyakit rabies di Indonesia dilaporkan telah terinfeksi virus Rabies sejak 1889 dan hingga kini masih belum berhasil diberantas, bahkan daftar wilayah tertular semakin panjang. Wilayah yang tadinya merupakan

wilayah bebas historis, misalnya Pulau Bali (2008), Pulau Nias (2010) kini menjadi daerah endemis dan telah mengakibatkan korban meninggal pada manusia dengan tingkat kesakitan yang sangat tinggi. Pada akhir tahun 2011 lalu juga telah terjadi kasus di Kabupaten Morotai, Provinsi Maluku Utara dan Pulau Babar, Kabupaten Maluku Barat Daya, Provinsi Maluku. Sedangkan wilayah dengan status bebas historis dari rabies ada 5 (lima) Provinsi yaitu Papua, Papua Barat, Nusa Tenggara Barat, Kepulauan Riau dan Kepulauan Bangka Belitung. Selain itu kita juga berhasil membebaskan Provinsi Jawa Timur, Jawa Tengah dan DI Yogyakarta pada tahun 1997 serta DKI Jakarta yang dibebaskan pada tahun 2004, sehingga saat ini tercatat ada 9 (sembilan) provinsi di Indonesia yang berstatus bebas rabies (3).

Kasus rabies di Propinsi Bali pertama kali terjadi di Kedonganan Kabupaten Badung pada bulan Nopember tahun 2008 dan Bali dinyatakan tertular secara resmi berdasarkan Keputusan Menteri Pertanian No. 1637/I/2008 tertanggal 1 Desember 2008. Berdasarkan kajian kasus pada manusia dan hewan, diperkirakan rabies masuk ke

Semenanjung Bukit, Kabupaten Badung sekitar bulan April 2008 (9). Saat ini penularan rabies sudah ke seluruh kabupaten/Kota di Propinsi Bali (3). Hal ini mungkin disebabkan cakupan vaksinasi yang tidak optimal, kualitas vaksinnya, penanganan vaksin, atau terjadi perbedaan struktural gen pada virus rabies. Perbedaan gen dapat menyebabkan vaksin yang diberikan tidak mampu lagi memberikan perlindungan.

Saat ini teknik molekuler banyak digunakan untuk mendiagnosa rabies. Pada teknik ini, gen N yang bersifat lestari di antara Lyssavirus yang lain digunakan sebagai daerah target (4).

Tujuan penelitian ini adalah menganalisa gen N virus Rabies isolat yang berasal dari Propinsi Bali (CVB751) secara molekuler yang disepadankan dengan isolat virus rabies dari beberapa propinsi di Indonesia dan negara lain. Hasil penelitian ini diharapkan bermanfaat untuk mengetahui kekerabatan isolat virus rabies Bali.

MATERI DAN METODE

Virus

Isolat virus rabies lapang berasal dari Kecamatan Selat Kabupaten Karangasem Propinsi Bali dengan kode CVB751. Isolat tersebut dengan uji *Flourescent Antibody Technique* (FAT) positif dan dalam biakan jaringan neuroblastoma (N2A) mempunyai titer $10^{3.5}$ TCID₅₀. Secara uji biologis dengan menggunakan mencit menghasilkan titer $10^{4.0}$ MLD₅₀ (7).

Isolasi RNA/Ekstraksi

Metode isolasi/ekstraksi RNA menggunakan *Qiamp Viral RNA Mini Kit* (Qiagen, Cat: 52904) untuk memperoleh RNA (2). Preparasi sebelum melakukan ekstraksi adalah dengan menambahkan 60 ml Ethanol absolut ke dalam 19 ml Buffer AW1 dan 44 ml Ethanol absolut ke dalam 13 ml Buffer AW2.

Ekstraksi RNA dilakukan dengan memasukkan sampel sebanyak 140 µl ke dalam *life touch microcentrifuge tube* 1.7 ml yang bersih dan steril yang ditambah dengan 560 µl Buffer AVL. Kemudian campuran ini divortex selama 15 detik dan diinkubasikan pada suhu ruang selama 10 menit. Setelah itu disentrifus selama 1 menit dengan kecepatan 8000 rpm. Tambahkan 560 µl Ethanol absolut dan divortex selama 15 detik serta di sentrifus selama 1 menit dengan kecepatan 8000 rpm. Larutan sebanyak 630 µl dipindahkan ke dalam *Qiamp Spin Column* dan disentrifus selama 1 menit dengan kecepatan 8000 rpm. Cairan yang tertampung dalam *Collection Tube* dibuang dan sisa larutan sebanyak 520 µl dipindahkan kedalam *Collection Tube* yang baru kemudian ditambahkan Buffer AW1 sebanyak 500 µl dan disentrifus selama 1 menit dengan kecepatan 8000 rpm. Cairan yang tertampung didalam *Collection Tube* dibuang

dan ditambahkan Buffer AW2 sebanyak 500 µl untuk mencuci membran *spin column*. Setelah itu disentrifus selama 3 menit dengan kecepatan 14000 rpm. Cairan yang tertampung pada *Collection Tube* dibuang dan disentrifus lagi selama 1 menit dengan kecepatan 14000 rpm. Selanjutnya cairan beserta *Collection Tube* diibuang. *Qiamp Spin Column* dipindahkan ke dalam *Collection Tube* yang baru dan ditambahkan Buffer AVE sebanyak 50 µl, diinkubasi selama 1 menit pada suhu ruang kemudian disentrifus selama 1 menit dengan kecepatan 8000 rpm. Tahap akhir adalah *Qiamp Spin Column* dibuang dan filtrat yang didalam tabung adalah RNA. Simpan RNA pada suhu -20° C sampai akan digunakan untuk identifikasi selanjutnya

Primer

Primer yang digunakan adalah Primer untuk mengamplifikasi gen Nukleoprotein RHN 17 (TTC AAA GTC AAT CAG GTG G) dan RHN 18 (CCA TGT AGC ATC CAA CAA AGT). Primer akan menghasilkan fragmen 947 bp (2).

Amplifikasi PCR

Amplifikasi PCR tujuannya untuk mendeteksi keberadaan materi genetik virus rabies menggunakan perosedur *One Step RT-PCR (Gel Based)* (Qiagen, Cat: 210212)(1,2).

Kedalam tabung 200 ul dicampurkan reagen PCR *mix* yang terdiri dari 5 µl *One Step Buffer*, 1 µl dNTP, 1 µl Primer RHN 17 (40 µM), 1 µl Primer RHN 18 (40 µM), 1 µl *One Step Enzyme* dan 11 µl *RNAse Free Water* sehingga total volume mencapai 20 µl. Setelah itu campuran di vorteks dan sentrifus beberapa detik dan ditambahkan *template RNA* sebanyak 5 ul. Tabung dimasukkan ke dalam mesin *thermal cycler* (Eppendorf) dengan program yang diawali dengan *Reverse Transcriptase* pada suhu 50° C selama 30 menit, *Hot start* 94° C selama 15 menit, kemudian 35 siklus dimana masing-masing siklus terdiri dari denaturasi 95° C selama 1 menit, pelekatan (*annealing*) 60° C selama 1 menit, dan elongasi (*elongation*) 72° C selama 1 menit. Amplifikasi diakhiri dengan elongasi terakhir pada suhu 72° C selama 7 menit.

Analisa Produk PCR

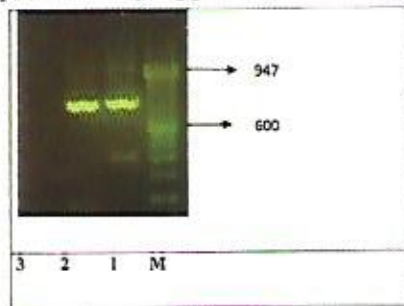
Produk PCR dianalisa dengan elektroforesis menggunakan gel agarose (Invitrogen) 2 % dalam buffer TAE (Invitrogen) dan *syber safe* (Invitrogen). Hasil PCR masing-masing sebanyak 10 µl kemudian dicampur dengan *loading dye* 1 µl. Campuran dimasukkan ke dalam lubang gel agarosa di dalam elektroforesis *chamber*. Salah satu lubang diisi dengan marker 100 bp (Invitrogen) sebanyak 10 µl. Elektroforesis dilakukan pada 100 volt dan 400 mA dalam buffer TAE selama 45 menit. Hasil elektroforesis

dilihat dengan menggunakan sinar biru (2).

Sekuen dari 2 produk DNA yang diamplifikasi bersama dengan 25 sekuen yang diperoleh dari gen bank dianalisa dengan menggunakan *software* Mega 5.05.

HASIL DAN PEMBAHASAN

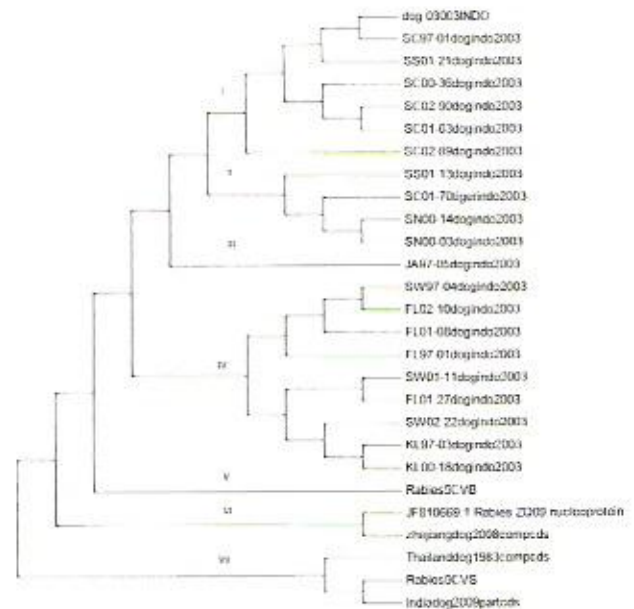
Deteksi isolat rabies dari Propinsi Bali dengan kode CVB751 dengan teknik satu tahap *reverse transcriptase-polymerase chain reaction (one step RT-PCR)* menggunakan sepasang primer RT-PCR (RHN 17: TTC AAA GTC AAT CAG GTG G dan RHN 18: CC ATGTAGC ATC CAA CAA AGT) untuk mengamplifikasi bagian N, menunjukkan hasil yang positif pada *band* 947 (Gambar 1).



Gambar 1. Hasil RT-PCR Gen N Virus Rabies (M: Marker (100 bp); 1 = CVS; 2 = CVB 751 sm1 (27/4/11); 3 = kontrol (-) ekstraksi RNA; 4 = kontrol (-) PCR mix)

Sekuen dari 2 produk DNA yang diamplifikasi bersama dengan 25 sekuen yang diperoleh dari gen bank dianalisa dengan menggunakan *software* Mega 5.05. Pada penelitian virus Rabies dikelompokkan menjadi 7 kelompok yaitu: I (7 isolat *central* Sumatra dan *south* Sumatra), II (4 isolat *central* Sumatra, *south* Sumatra dan *North* Sumatra), III (1 isolat *Java*), IV (9 isolat *West* Sumatra, Flores dan Kalimantan), V (1 isolat Rabies Bali), VI (2 isolat China), VII (3 isolat dari Thailand, CVS dan India) (Gambar 2).

Isolasi dan identifikasi organisme merupakan kegiatan mikrobiologi yang paling penting dalam bidang kedokteran untuk mendiagnosa penyakit, khususnya bagi virus rabies yang bersifat zoonosis dan fatal. Saat ini metode PCR sangat ideal untuk mendeteksi penyakit infeksi karena cepat dan sensitif, dengan pemilihan primer yang spesifik untuk patogen tertentu, teknik ini mempunyai spesifikan yang tinggi. Dengan PCR, dimungkinkan untuk mendeteksi patogen tanpa harus mengkulturkan terlebih dahulu. Ini sangat bermanfaat bila patogen tumbuh lambat atau tidak dapat tumbuh pada kondisi *in vitro*, bila metoda deteksi konvensional kurang sensitif atau dibutuhkan diagnosis yang cepat. Proses PCR memerlukan 2 macam primer yaitu *primer forward* dan *primer reverse*.



Gambar 2. Pohon filogenetik gen N dari isolat Bali (CVB751) dengan beberapa virus asal Indonesia

Gen N merupakan komponen utama di dalam nukleokapsid internal yang mempengaruhi regulasi transkripsi dan replikasi virus rabies (12). Identifikasi gen N isolat virus rabies lapang lebih cepat dan sensitif dilakukan dengan teknik RT-PCR dibandingkan dengan FAT (1). Penggunaan metode PCR berdasarkan gen N telah banyak dilakukan peneliti dan saat ini merupakan teknik yang paling sering dilakukan untuk mendiagnosa rabies karena merupakan salah satu gen yang jarang terjadi mutasi (1,6) dan dapat digunakan untuk mengetahui karakteristik, epidemiologi virus rabies serta hubungan kekerabatan virus rabies (6). Di Indonesia, teknik RT-PCR telah dikembangkan dan diaplikasikan untuk diagnosis rabies dan praktis digunakan pada surveilans dalam rangka upaya pembebasan rabies pada suatu daerah (10).

Gen N selain jarang bermutasi juga cenderung bersifat homolog. Tingkat homologi gen N virus rabies berkisar antara 79.7-96.8% (12). Berdasarkan sekuen gen N, kekerabatan pohon filogenetik antara virus-virus Rabies dapat diamati dengan lebih mudah dibandingkan dengan menggunakan antibodi monoklonal atau metode konvensional yang lain. Kajian yang dilakukan oleh Susetya *et al.* 2003 menunjukkan virus rabies lapang di Thailand memiliki kedekatan genetik dengan isolat dari China sebagai bagian dari garis keturunan Asia. Pada penelitian ini dikonfirmasi bahwa semua isolat dari Indonesia termasuk dalam *Lyssavirus* genotype 1, genotype ini merupakan tipe klasik virus Rabies dan

memiliki kekerabatan lebih dekat dengan isolat dari China dibandingkan dengan Thailand, India atau Srilanka (11). Sementara pada penelitian ini dapat dilihat bahwa kekerabatan virus rabies Bali dengan isolat China juga lebih dekat dibandingkan dengan Thailand dan India. Untuk virus Rabies Indonesia, kajian ini mengelompokkan virus secara genetik menjadi 5 kelompok yaitu kelompok 1 dan 2 termasuk dalam kelompok Sumatra, kelompok 3 termasuk dalam kelompok Jawa, kelompok 4 termasuk dalam kelompok Flores, Kalimantan dan Sumatra Barat dan virus Bali termasuk dalam kelompok 5. Sementara kajian yang dilakukan oleh Susetya dkk (2000) menunjukkan ada 3 kelompok yang secara endemis ada di Indonesia. Hal ini menunjukkan kemungkinan telah terjadinya perubahan secara genetik pada virus yang ada di Indonesia.

Banyak faktor yang menyebabkan masih adanya kasus rabies di Propinsi Bali, antara lain cakupan vaksinasi yang kurang dari 70 %, aplikasi vaksin yang tidak tepat, penanganan vaksin yang kurang baik, kemungkinan anjing yang divaksinasi sudah dalam masa inkubasi dan strain virus vaksin yang digunakan tidak cocok dengan strain virus yang ada di Propinsi Bali.

KESIMPULAN

Hasil analisis gen N virus rabies Bali (CVB751) mengindikasikan adanya perubahan secara genetik dari virus rabies yang ada di Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

1. **Anonim. 2009.** Diagnosis of Rabies by Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). In: Annual Report Virology Research Lab. Veterinary Research Center. Agricultural and Livestock Research. 313-317.
2. **Anonim. 2011.** Standard Operating Procedure (SOP) Deteksi Biologi Molekuler IBR. Disampaikan pada Pelatihan Bioteknologi 2011 Teknik diagnosa virus rabies dan infectious Bovine Rhinotracheitis secara molekuler di Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan 11-15 Juli 2011. PT. Gene Craft labs. Jakarta.
3. **Anonim. 2012.** Rakornas Rabies. Arahan Direktur Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan. Pertemuan Koordinasi Pengendalian Rabies Nasional Bali, 28 Maret 2012.
4. **Arai YT, Yamada K, Kameoka Y, Horimoto T, Yamamoto K, Yabe S, M. Nakayama M, Tashiro M. 1997.** Nucleoprotein gene analysis of fixed and street rabiesvirus variants using RT-PCR. *Arch. Virol* 142: 1787-1796.
5. **Bourhy H, Kissi B, Tordo N. 1993.** Molecular diversity of the Lyssavirus genus. *Virology* 194: 70-81.
6. **Black EM, Lowing JP, Smith J, Heaton PR, McElhinney. 2002.** A Rapid RT-PCR method to differentiate six established genotypes of rabies and rabies-related viruses using TaqMan™ technology. *Journal of Virol. Methods.* 105:25-35.
7. **Djusa ER, Tenaya IWM, Natih KKN, Agustini NLP, Wirata K, Yupiana Y, Hermawan D, Nuryani N. 2011.** Isolasi dan identifikasi isolat virus rabies lapang. Rapat Teknis dan Pertemuan Ilmiah Kesehatan Hewan Tahun 2010. Poster dan Prosiding.
8. **Koprowski H. 1991.** Overview. In: The Natural history of Rabies. 2nd Edition. Editor George M Baer. CRC Press Inc. United States.
9. **Putra AAG, Gunata IK, Faizah, Dartini NL, Hartawan DHW, Setiaji G, Semara-Putra AAG, Soegiarto, Scott-Orr H. 2009.** Situasi Rabies Bali: Enam bulan pasca program pemberantasan. *Buletin Veteriner.* XXI (74):13-26.
10. **Sarosa A, Abdul Adjid RM, Wiyono A. 2003.** Pengembangan teknik reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) untuk diagnosis penyakit rabies. Dalam: Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Puslibang Peternakan Bogor, 29-30 September 2003. Hlm: 432-435.
11. **Susetya H, Sugiyama M, Inagaki A, Naoto I, Mudiarto G, Minamoto N. 2008.** Molecular epidemiology of rabies in Indonesia. *Virus Research.* 135: 144-149.
12. **Suwarno. 2005.** Karakterisasi molekuler protein serta gen penyandi nukleoprotein dan glikoprotein virus rabies dari beberapa daerah geografi di Indonesia. Program Doktor Ilmu Kedokteran. Program Pasca Sarjana. Universitas Airlangga. Surabaya.