

Pengendalian Penyakit pada Ternak Menggunakan Teknologi Molekuler Inaktivasi Gen *ASO*, *RNAi* dan *ss-siRNA*

Muhamad Ali

Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi
Fakultas Peternakan, Universitas Mataram, Jl. Majapahit No. 62, Mataram
malih@yahoo.com; mali.unram@gmail.com

(Makalah masuk 3 Februari 2014 – Diterima 3 Maret 2014)

ABSTRAK

Globalisasi menyebabkan tingginya mobilitas penduduk dan ternak, sehingga dapat meningkatkan penyebaran berbagai jenis penyakit seperti flu burung, *severe acute respiratory syndrome* (*SARS*), maupun flu babi. Oleh karena itu, diperlukan pencegahan untuk penyakit tersebut. Vaksin bekerja efektif untuk pencegahan, namun memerlukan waktu lama untuk pengembangan dan lamban memberikan respon kekebalan guna mencegah pandemi. Makalah ini akan membahas beberapa teknologi inaktivasi gen *antisense oligonucleotide* (*ASO*), *RNA interference* (*RNAi*) dan *single strand-small interfering RNA* (*ss-siRNA*) untuk penanggulangan penyakit. Mekanisme utama teknologi ini adalah menghambat ekspresi gen dengan merusak molekul RNA patogen. Pada saat RNA luar (dari virus) menginfeksi sel hewan, molekul-molekul *ASO*, *RNAi*, dan *ss-siRNA* akan menempel dan mencegah ekspresi RNA patogen tersebut. Penggunaan teknologi inaktivasi gen ini diharapkan akan memberikan alternatif baru yang lebih efektif untuk pemberantasan penyakit-penyakit infeksi pada ternak sebelum membahayakan manusia.

Kata kunci: Inaktivasi gen, *antisense oligonucleotide*, *RNA interference*, *single strand-small interfering RNA*

ABSTRACT

Disease Control in Animals Using Molecular Technology by Inactivation of *ASO*, *RNAi* and *ss-siRNA* Genes

Globalization causes high mobility of human and livestock, hence increase the transmission of infectious diseases, including avian influenza, severe acute respiratory syndrome (*SARS*), and swine influenza. Therefore, prevention of those diseases is required. Vaccines are effective to prevent infectious diseases; however, their development takes a long time and they cannot provide immediate protection in pandemic cases. This paper describes several gene silencing technologies including antisense oligonucleotide (*ASO*), *RNA interference* (*RNAi*) and *single strand-small interfering RNA* (*ss-siRNA*) for controlling diseases. The primary mechanism of these technologies is inhibition of gene expression, typically by causing the destruction of specific RNA molecule of the pathogen. The use of gene silencing technologies is expected to give new alternative that is more effective in eradication of infectious diseases in animals before threaten human being.

Key words: Gene inactivation, antisense oligonucleotide, *RNA interference*, *single strand-small interfering RNA*

PENDAHULUAN

Saat ini, kehidupan manusia di seluruh dunia tidak memiliki pembatas yang dapat menghalangi mobilitas penduduk antar negara maupun benua (Martens et al. 1995). Aneka tawaran program pariwisata yang dikembangkan negara-negara berkembang, telah menyebabkan penduduk negara-negara maju melakukan kunjungan ataupun berlibur ke negara manapun yang ingin dituju. Bahkan, beberapa jenis hewan dapat diperjualbelikan antar Negara, walaupun dengan terlebih dahulu mengalami karantina.

Permasalahan yang muncul dengan terjadinya globalisasi lalu lintas adalah resiko penyebaran berbagai jenis penyakit infeksi dari satu belahan dunia ke belahan dunia yang lain secara cepat (Ali et al. 2013). Pada beberapa tahun terakhir ini, masyarakat

dunia telah dikejutkan oleh munculnya beberapa ancaman penyakit infeksi pandemik yang sangat serius, diantaranya flu burung pada tahun 1997, *severe acute respiratory syndrome* (*SARS*) yang muncul pada tahun 2003 (Ali et al. 2006), flu babi yang merebak pada tahun 2009, penyakit *bovine viral diarrhoea virus* (*BVDV*), maupun virus penyebab penyakit mulut dan kuku (Wang et al. 2012).

Penggunaan vaksin untuk penanggulangan penyakit-penyakit di atas dinilai masih belum efektif. Hal ini tidak hanya disebabkan karena pengembangan vaksin memerlukan waktu yang lama serta tidak dapat menimbulkan respon kekebalan yang cepat guna mencegah terjadinya kejadian pandemik, namun juga mutasi genetik pada patogen tersebut telah menimbulkan resistensi terhadap obat-obat konvensional. Kondisi ini diperparah oleh perubahan

iklim global yang mengakibatkan perubahan temperatur maupun curah hujan yang pada akhirnya menjadi pemacu mutasi (Martens et al. 1995). Faktor mutasi tersebut yang menjadi salah satu penyebab penanganan penyakit yang disebabkan oleh virus flu burung H5N1 ini belum terpecahkan sampai saat ini.

Oleh karena itu, diperlukan pengembangan agen antiviral baru untuk pemberantasan penyakit-penyakit infeksi tersebut. Teknologi molekuler inaktivasi gen merupakan strategi yang sangat menjanjikan dan dinilai akan efektif untuk tujuan tersebut karena mekanisme kerja teknologi di atas langsung pada sasaran, yaitu mencegah ekspresi gen patogen. Pada makalah ini akan dibahas beberapa teknologi inaktivasi gen, diantaranya, *antisense oligonucleotide (ASO)*, *RNA interference (RNAi)* dan *single strand-small interfering RNA (ss-siRNA)* (Brodersen & Voinnet 2006; Ali 2012a; Lima et al. 2012; Yu et al. 2012). Penggunaan teknologi inaktivasi gen tersebut diharapkan akan memberikan pilihan baru yang lebih efektif untuk pemberantasan penyakit-penyakit infeksi pada ternak sebelum menular ke manusia.

Target utama berbagai jenis obat yang umum digunakan saat ini adalah protein, yaitu menghambat atau merusak aktivitas enzim patogen maupun reseptor (Yu et al. 2012). Namun, adanya kesulitan untuk membuat obat berukuran kecil yang dapat bekerja secara efektif dan selektif terhadap beberapa protein sekaligus interaksi antar protein, telah mendorong berbagai upaya untuk menemukan obat-obat baru dengan target langsung pada *pre-mRNA* maupun *mRNA*. Dalam biologi molekuler, *mRNA* merupakan sumber informasi yang dibawa dari DNA untuk ditranslasi menjadi asam-asam amino yang akhirnya menjadi protein (Brodersen & Voinnet 2006; Yu et al. 2012). Penghambatan translasi *mRNA* akan menyebabkan patogen tidak mampu menghasilkan protein yang bersifat patogenik ataupun enzim yang membantu proliferasi patogen pada ternak maupun manusia yang diinfeksi.

Inaktivasi gen penyebab penyakit merupakan salah satu cara pengobatan yang sedang dikembangkan saat ini untuk beberapa jenis penyakit baik pada hewan maupun manusia. Sampai saat ini, teknologi inaktivasi gen yang sudah banyak dikenal adalah dengan menggunakan *ASO* (Chan et al. 2006; Matsui & Corey 2012) dan *RNAi* dan variannya (Brodersen & Voinnet 2006; Pushparaj & Melendez 2006; Maine 2010). Perkembangan mutakhir menunjukkan bahwa kedua teknologi tersebut masih memiliki kelemahan, terutama kurang spesifik. Untuk itu, telah dikembangkan teknologi *ss-siRNA* yang memiliki spesifisitas tinggi (Lima et al. 2012; Yu et al. 2012). Pada tulisan ini, akan dibahas ketiga teknologi molekuler tersebut dalam menginaktivasi terhadap gen-gen tertentu yang

diharapkan tidak terekspresi guna menghindari munculnya penyakit yang dikodenyanya.

INAKTIVASI GEN PENYEBAB PENYAKIT DENGAN ASAM NUKLEAT SINTETIK

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa penambahan beberapa nukleotida pada gen-gen yang memiliki pengulangan CAG, CGG dan AGG dapat menimbulkan penyakit pada manusia. Pengulangan CAG sebanyak 35 ulangan pada kromosom empat manusia (tepatnya pada basa ke 3.076.407 sampai basa ke 3.245.686) tidak memberikan dampak apapun. Namun, karena pengulangan kodon penyandi asam amino glutamin tersebut bersifat tidak stabil dan jika menjadi 36 pengulangan atau lebih akan menimbulkan penyakit Huntington. Sampai saat ini, belum ditemukan pengulangan nukleotida-nukleotida di atas selain pada kromosom empat manusia. Penyakit Huntington merupakan kelainan saraf menurun yang menyebabkan penderita mengalami kesulitan berpikir, berbicara dan bergerak dengan keparahan yang terus memburuk seiring pertambahan usia tersebut sampai saat ini belum ditemukan obatnya (Sah & Aronin 2011; Ali 2012a).

Demikian pula dengan pengurangan (delesi) beberapa nukleotida dapat menimbulkan penyakit, diantaranya seperti penyakit *Duchenne Muscular Dystrophy (DMD)*. Penyakit kelainan genetik ini disebabkan karena hilangnya beberapa nukleotida (*exon*) pada gen yang mengkode distropin, protein yang menghubungkan filamen aktin di dalam sel dengan membran sarkolemma, yang menyebabkan berubahnya *translational reading frame* sehingga mengganggu ekspresi protein distropin (Kole et al. 2012). Penyakit ini ditandai oleh kehilangan kemampuan bergerak pada usia 10-12 tahun yang akhirnya membawa kematian pada saat usia pasien memasuki 20 tahun.

Keberhasilan penggunaan obat-obat konvensional bermolekul kecil pada penyakit-penyakit di atas sangat rendah. Protein Huntington yang menjadi penyebab pada penyakit Huntington memiliki interaksi dengan banyak protein (Yu et al. 2012). Di sisi lain, desain obat berukuran kecil yang dapat bekerja secara efektif dan selektif terhadap interaksi protein-protein tersebut sangat sulit. Sehingga obat untuk penyakit Huntington belum ditemukan walaupun penyebab penyakit ini sudah diketahui lebih dari 20 tahun. Untuk itu, tugas mendesak semua peneliti yang berkecimpung di dunia riset biomedis adalah mencari obat-obat baru yang lebih efektif. Hal yang sama terjadi pada aneka virus yang menyerang ternak, seperti virus flu burung H5N1, SARS, flu babi, *bovine viral diarrhoea virus (BVDV)*, maupun virus penyebab penyakit mulut dan kuku

(Wang et al. 2012). Karena penyebab penyakit-penyakit di atas disebabkan oleh satu gen, maka inaktivasi gen penyebab penyakit tersebut akan merupakan pilihan terapi yang lebih menjanjikan (Kole et al. 2012; Yu et al. 2012).

Asam nukleat sintetis telah digunakan secara luas dan rutin dalam dunia riset di berbagai laboratorium untuk mengatur ekspresi gen tertentu. Penggunaan teknologi tersebut telah mempermudah pelaksanaan berbagai riset biologi molekuler, terutama untuk mengetahui fungsi dan peranan gen tertentu dalam ekspresi protein. Bahkan *Food and Drug Administration* Amerika Serikat telah menyetujui penggunaan *ASO* sebagai obat komersial (Dias & Stein 2002). Saat ini, teknologi tersebut telah menjadi harapan baru untuk digunakan di dunia kesehatan.

Secara umum, konsep inaktivasi gen menggunakan asam nukleat sintetis terdiri dari beberapa tahap. Pada tahap awal, dimulai dengan penentuan DNA ataupun RNA target, yang dilanjutkan dengan sintesis asam nukleat dengan urutan yang komplemen terhadap urutan DNA/RNA target (Dias & Stein 2002). Setelah itu, asam nukleat tersebut dimasukkan dengan teknik transfeksi ke dalam sel yang diikuti dengan pengukuran ekspresi gen serta pemeriksaan fenotif yang dihasilkan (Watts & Corey 2012). Tersedianya beberapa bahan komersial yang menjadi pembawa asam nukleotida masuk ke dalam sel, seperti *FuGene HD Transfection* dari Promega, sangat mempermudah berbagai riset untuk inaktivasi maupun ekspresi gen-gen tertentu pada sel (Ali 2012b).

Konsep penghambatan ekspresi protein menggunakan asam nukleat sintetis ini diperkenalkan pada tahun 1978 oleh Zamenik. Pada percobaannya, penggunaan oligonukleotida sintetis yang sangat sederhana dengan sekuen yang komplemen terhadap RNA virus *Rous sarcoma* telah berhasil menghambat ekspresi protein yang disandi oleh virus tersebut (Agrawal 2010).

Sampai saat ini, dikenal ada beberapa teknologi yang dipergunakan untuk melakukan inaktivasi gen, diantaranya *ASO*, *RNAi* dan *ss-siRNA*. Walaupun ketiga teknologi di atas memiliki persamaan tujuan untuk melakukan inaktivasi gen, namun memiliki mekanisme yang berbeda-beda dalam melakukan inaktivasi terhadap gen-gen target. Namun, secara umum, prinsip kerja teknologi di atas dapat dijelaskan dengan Gambar 1.

TEKNOLOGI ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDE

Antisense oligonucleotide adalah DNA rantai tunggal berukuran antara 13-25 pasang basa (biasanya 20 pasang basa) yang dibuat dengan urutan yang komplemen terhadap *mRNA* yang menjadi target di dalam sel, sehingga terjadi hibridisasi menurut prinsip

Watson-Crick (Dias & Stein 2002; Chan et al. 2006). Terbentuknya heteroduplex antara *ASO-mRNA* akan mendorong terjadinya degradasi *mRNA* oleh aktivitas *RNAse H* sehingga menyebabkan tidak terjadinya proses translasi untuk menghasilkan protein. Jika hibridisasi terjadi pada tahap *pre-mRNA* maka terbentuknya heteroduplex tersebut akan menghambat pematangan *mRNA*, sehingga tidak terjadi proses translasi (Chan et al. 2006).

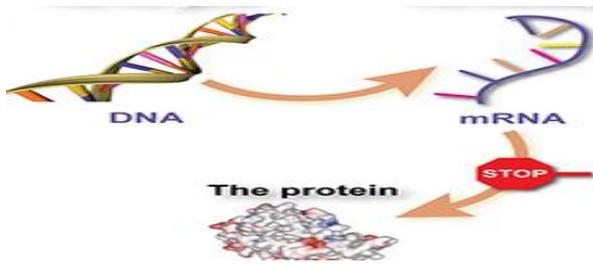
Menurut Chan et al. (2006), kekuatan dan stabilitas ikatan antara *ASO* dan target *mRNA* tergantung pada beberapa faktor, diantaranya stabilitas termodinamik, struktur sekunder target *mRNA*, jarak antara sekuen yang mengalami hibridisasi dengan *start codon* maupun bagian penutup (*5' CAP*) dari *mRNA*. Lebih lanjut, dijelaskan bahwa untuk mendesain *ASO* diperlukan empat data, yaitu prediksi struktur sekunder *mRNA*, identifikasi struktur sekunder *mRNA* yang disukai oleh *ASO*, penghitungan jumlah GC, serta prediksi energi ikatan *ASO* dengan *mRNA* target.

Struktur sekunder *mRNA* dapat diprediksi dengan *software* program *mfold* yang dapat diakses melalui <http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold> ataupun program *sfold* di <http://sfold.wardsworth.org/index.pl>. Struktur sekunder *mRNA* yang mudah diakses oleh *ASO* biasanya terdapat di ujung nukleotida, *loop* yang terbentuk di tengah (*internal loops*), sekuen penghubung dan beberapa tempat lainnya yang dapat diidentifikasi dengan mengakses <http://www.bioit.org.cn/ao/targetfinder.com>. Jumlah GC pada sekuen yang diperoleh dengan kedua data di atas sangat menentukan stabilitas ikatan antara *ASO* dan *mRNA* target, di mana pengulangan GGGG, AAA, ACTG dan *stop codon* TAA dapat memperlemah stabilitas ikatan tersebut. Untuk data terakhir, energi ikatan *ASO* dengan *mRNA* dapat diprediksi dengan program *OligoWalk* yang dapat diakses di <http://128.151.176.70/RNAstructure.html> (Chan et al. 2006).

Antisense oligonucleotide yang didesain seperti DNA rantai tunggal normal dengan ikatan diester fosfat akan mengalami degradasi oleh enzim eksonuklease maupun endonuklease yang terdapat di dalam sel. Akibatnya, *ASO* tersebut tidak berfungsi dan produk degradasi yang dihasilkan bersifat sitotoksik, sehingga dapat mengganggu pembelahan sel. Untuk mengatasi permasalahan degradasi di atas, berbagai modifikasi telah dilakukan seperti penggantian atom oksigen yang tidak berikatan pada ikatan diester fosfat dengan sulfur, sehingga menghasilkan phosphorothioat, maupun modifikasi 2'-alkil dari ribosa menjadi 2'-O-Methyl (2'-OMe) dan 2'-O-Methoxyethyl (2'-MOE). Generasi terbaru pada modifikasi *ASO* adalah modifikasi kimia pada cincin furanosa dengan *peptide nucleic acid* (PNA), *locked nucleic acid* (LNA), maupun *phosphoroamidate morpholino oligomer* (PMO). Modifikasi *ASO* ini ternyata tidak hanya meningkatkan

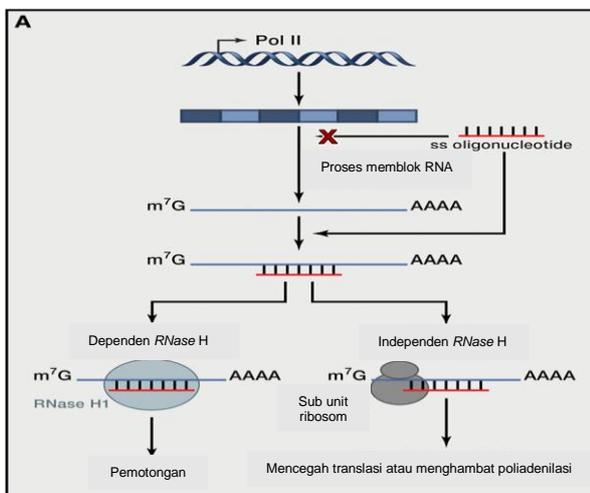
stabilitas *ASO* di dalam sel namun juga dapat meningkatkan absorpsi sel, afinitas hibridisasi, dan spesifikasi target (Chan et al. 2006; Matsui & Corey 2012).

Mekanisme kerja *ASO* dapat dijelaskan secara ringkas pada Gambar 2. Enzim polymerase II akan mengkatalis sintesis *pre-mRNA* berdasarkan *template* DNA. *ASO* yang didesain memiliki asam nukleotida yang komplemen dengan *pre-mRNA* akan langsung menghibridisasi *pre-mRNA*, sehingga akan menghalangi proses pematangan *pre-mRNA* menjadi *mRNA*. Namun *ASO* yang didesain komplemen dengan *mRNA* di sekuen bagian tengah akan berhibridisasi dengan *mRNA*, sehingga akan mengaktifkan enzim *RNAse H* untuk melakukan degradasi terhadap *mRNA*. Sedangkan *ASO* yang didesain komplemen dengan *mRNA* di sekuen bagian *up-stream mRNA* akan menyebabkan terjadinya hibridisasi dan heteroduplex yang terbentuk akan menghalangi RNA ribosom untuk melakukan translasi ataupun menghalangi poliadenilasi di ujung *mRNA* (Davidson & Monteys 2012).



Gambar 1. Mekanisme kerja inaktivasi gen dengan asam nukleat sintetik. Gen ditranskripsi menjadi *mRNA* dan *mRNA* ditranslasi menjadi protein. Adanya nukleotida yang dapat berpasangan dengan *mRNA* akan menyebabkan proses translasi tidak dapat berlangsung

Sumber: Lahiri (2012)



Gambar 2. Mekanisme kerja *ASO* untuk inaktivasi gen

Sumber: Davidson & Monteys (2012)

TEKNOLOGI RNA INTERFERENCE

RNA interference merupakan teknik menghambat atau mencegah ekspresi gen melalui pemanfaatan sifat komplemen (berpasangan) RNA dengan potongan nukleotida atau RNA berukuran pendek (sekitar 21-23 nukleotida). RNA pendek tersebut dihasilkan dari pemotongan RNA rantai ganda berukuran panjang yang terdapat secara alami di dalam sel oleh enzim *Dicer* dan protein *Argonaut 2*. RNA hasil pemotongan tersebut, memiliki kemampuan untuk melakukan hibridisasi dengan bagian *mRNA* yang homolog dengannya, sehingga akan mengaktifkan enzim *RNAse H* untuk melakukan degradasi atau menghalangi terjadinya translasi.

RNA interference merupakan mekanisme pertahanan organisme eukaryotik dari molekul RNA asing (baik virus maupun *transposable element*). Pada tanaman, *RNAi* diperuntukkan untuk melindungi tanaman dari virus. Pada beberapa organisme lain, *RNAi* dipergunakan untuk perlindungan terhadap proliferasi *transposable element* yang memperbanyak diri melalui *intermediate RNA* (Brodersen & Voinnet 2006).

Sebelum melakukan hibridisasi dengan *mRNA*, RNA rantai ganda hasil pemotongan di atas akan memisah membentuk rantai tunggal dan membentuk kompleks dengan protein *Argonoute 2* (*AGO*) membentuk *RNA-induced silencing complex* (*RISC*). Rantai tunggal RNA tersebut kemudian menuntun *AGO* untuk melakukan hibridisasi dengan bagian *mRNA* yang komplemen yang kemudian melakukan inaktivasi gen (Davidson & Monteys 2012).

Ada tiga mekanisme *RNAi* dalam melakukan inaktivasi terhadap gen, yaitu mendorong terjadinya degradasi akibat terbentuknya kompleks gen dengan *RNAi*, menghambat terjadinya translasi akibat terhalangnya RNA ribosom membaca urutan gen karena terbentuknya kompleks RNA-gen, serta induksi modifikasi kromatin dengan promoter sehingga gen mengalami inaktivasi (Watson et al. 2004). Untuk memudahkan pemahaman terhadap *RNAi* dalam melakukan inaktivasi gen, pada Gambar 3 memperlihatkan proses hibridisasi *mRNA* oleh RNA pendek (*short RNA/sRNA*) yang difasilitasi oleh terbentuknya *RISC*, yang merupakan gabungan multi protein, terutama *sRNA*-enzim *AGO*, untuk kemudian membentuk gabungan *mRNA-sRNA* yang mencegah proses translasi untuk menghasilkan protein.

Penelitian yang merintis *RNAi* menunjukkan penyuntikan RNA berantai ganda pada nematoda, *Caenorhabditis elegans*, berhasil menginaktivasi gen yang memiliki urutan nukleotida homolog dengan RNA rantai ganda yang disuntikkan (Fire et al. 1998). Penemuan ini mendorong berbagai riset yang lebih terarah untuk mengembangkan penggunaan *RNAi* untuk inaktivasi gen-gen tertentu. *RNAi* ditemukan

pada jamur, tanaman, cacing, mencit dan kemungkinan juga manusia.

Ada dua tipe RNA yang terlibat dalam *RNAi*, yaitu mikro RNA (*miRNA*) dan *short interfering RNA* (*siRNA*). Mikro RNA (*miRNA*) merupakan RNA pendek (ukuran sekitar 21-23 nukleotida) dan berasal dari dalam sel (gen maupun *endogenous RNA*) dan memiliki kemampuan untuk menginaktivasi gen (*mRNA*) karena memiliki urutan nukleotida yang saling komplemen. *miRNA* dihasilkan dari transkripsi DNA internal sel yang mengalami lipatan, sehingga membentuk struktur *hairpin* (Kole et al. 2012). Mekanisme kerja *miRNA* sedikit berbeda dengan *siRNA* yang secara fisik melakukan pencegahan proses translasi, *miRNA* berikatan dengan ujung akhir *mRNA* (di bagian *untranslated region/UTR*), sehingga hanya berfungsi sebagai sinyal untuk mencegah proses translasi *mRNA* (Davidson & Monteys 2012).

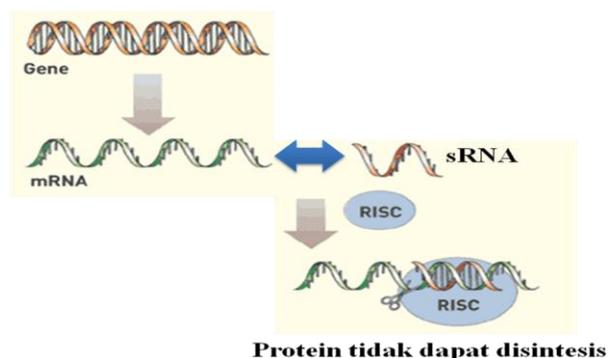
siRNA merupakan RNA pendek berantai ganda, sekitar 20-30 nukleotida, hasil pemotongan *Dicer* terhadap RNA rantai ganda eksogen berukuran panjang yang masuk ke sel dari luar (DNA atau RNA asing seperti virus). Enzim *RNAse III* yang spesifik terhadap RNA rantai ganda, *Dicer*, melakukan degradasi terhadap RNA rantai panjang menghasilkan *siRNA* berantai ganda masing-masing membawa 5'-phosphate dan 3' gugus hidroksil menyisakan 2 nukleotida yang tidak memiliki pasangan (*overhangs*) di ujung 3' (Ghildiyal & Zamore 2009). Untai RNA yang melakukan inaktivasi disebut penunjuk (*guide*), sedangkan yang lain, yang mengalami degradasi disebut pembawa pesan (*passenger*).

Beberapa tahun terakhir ini, terungkap bahwa *RNAi* merupakan teknik yang sangat berpotensi untuk menghambat ekspresi gen. *RNAi* bekerja secara efektif pada planaria, *Trypanosoma*, lalat, mencit, tanaman maupun hewan (Chen et al. 2007; Agustina et al. 2011). Virus avian leukosis atau *avian leukosis virus* (ALV) merupakan salah satu penyakit infeksi pada unggas di seluruh dunia. Sampai saat ini, belum ditemukan vaksin yang efektif untuk menanggulangi penyakit tersebut. Bahkan terjadi mutasi pada virus yang menyebabkan munculnya resistensi. Untuk itu, beberapa teknologi, terutama teknologi *RNAi* sedang dikembangkan sebagai antiviral yang efektif untuk menanggulangi infeksi ALV (Chen et al. 2007). Lebih lanjut, dijelaskan bahwa ekspresi vektor untuk menghasilkan RNA yang komplemen dengan virus ALV sangat efektif menurunkan ekspresi protein pathogen dari virus tersebut pada kultur sel burung.

Virus flu burung, terutama subtipe H5N1, merupakan virus yang sangat menakutkan tidak hanya bagi peternakan unggas di seluruh dunia. Virus tersebut juga menjadi ancaman manusia yang sangat serius di masa mendatang, karena belum ditemukannya vaksin maupun antiviral yang efektif. Untuk mencegah

penularan virus tersebut pada manusia, maka langkah pertama dan utama yang mendesak dilakukan adalah melakukan pencegahan penularan dan penyebaran virus tersebut pada unggas. Strategi penanggulangan penyakit tersebut secara konvensional dengan pengawasan (*surveillance*) yang ketat, pembatasan lalu lintas unggas maupun pembasmian unggas yang terinfeksi tidak dapat mencegah penularan virus tersebut. Upaya penggunaan vaksin untuk mencegah penyakit yang disebabkan oleh virus RNA tersebut terbukti belum efektif. Untuk itu, penggunaan beberapa obat baru, seperti penggunaan kemoterapi antiviral dan *RNA interference* merupakan salah satu alternatif yang sangat menjanjikan (Meng et al. 2011; Abdelwhab & Hafez 2012).

Bovine viral diarrhea virus (BVDV) merupakan salah satu patogen yang mengakibatkan kerugian besar pada industri peternakan sapi di seluruh dunia. Penggunaan aneka bentuk pengobatan untuk menanggulangi penyakit di atas belum membuahkan hasil yang memuaskan sampai saat ini. Sebuah penelitian telah mengungkap penghambatan virus tersebut dengan menggunakan sebuah plasmid yang mampu menghasilkan RNA pendek yang dapat berhibridisasi dengan sekuen tertentu pada genom virus tersebut. Lebih lanjut, dilaporkan bahwa penggunaan plasmid yang mampu menghasilkan dua RNA pendek yang berbeda semakin meningkatkan efisiensi daya hambat terhadap virus tersebut (Yamane et al. 2006; Lambeth et al. 2007).



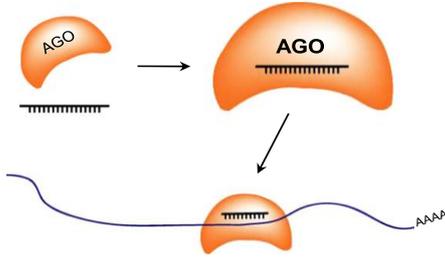
Gambar 3. Mekanisme kerja *RNAi*: proses inaktivasi *mRNA* oleh *sRNA* yang difasilitasi oleh RISC sehingga mencegah proses translasi *mRNA* menjadi protein

Sumber: diadaptasi dari Henry (2004)

TEKNOLOGI SINGLE STRAND-SMALL INTERFERING RNA

Lain halnya dengan *siRNA* yang merupakan RNA pendek berantai ganda *ss-siRNA* merupakan RNA pendek berantai tunggal yang telah dimodifikasi untuk

meningkatkan spesifisitasnya dalam melakukan penempelan pada *mRNA* target. Lima et al. (2012) dan Yu et al. (2012) melaporkan bahwa teknologi ini memiliki potensi 100 kali lipat dan selektifitas 30 kali lipat dibandingkan dengan *miRNA* maupun *siRNA* yang tidak dimodifikasi. Kerja *ss-siRNA* memiliki mekanisme yang sama dengan *RNAi* dengan bantuan enzim AGO (Gambar 4).



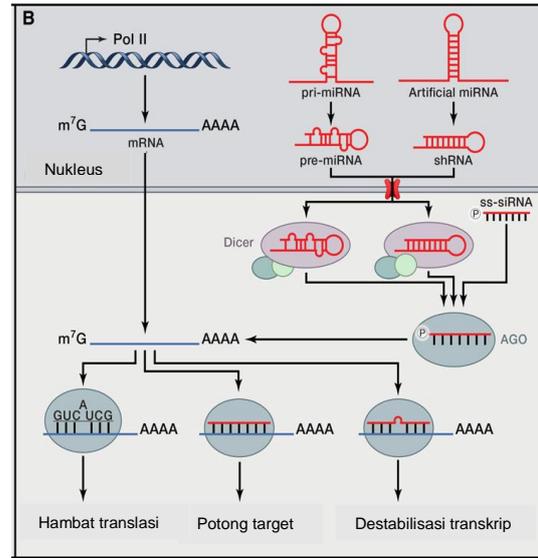
Gambar 4. Mekanisme kerja *ss-siRNA* yang memerlukan enzim *argonaute* (AGO) untuk menempel pada *mRNA* sehingga mencegah translasi

Sumber: Yu et al. (2012)

Pada penggunaan *ASO*, terbentuknya duplek *ASO-mRNA* akan merangsang kerja *RNAse* untuk melakukan degradasi terhadap *mRNA* atau mencegah proses translasi akibat hambatan *ASO*. Untuk mekanisme kerja *miRNA*, pemecahan *pre-miRNA* (ukuran sekitar satu kilo pasang basa) yang diperoleh dari genom menjadi *pre-miRNA* (ukuran sekitar 60-70 basa) oleh enzim endonuklease III *RNAse* Dros, kemudian *pre-miRNA* akan ditranspor secara aktif ke dalam sitoplasma. Di dalam sitoplasma, enzim endonuklease *RNAse* III Dicer akan memotong *pre-miRNA* menyisakan fosfat pada ujung 5' dan 2 basa menggantung pada ujung 3' menghasilkan *miRNA* yang matang. Dengan bantuan AGO, *miRNA* akan berpasangan dengan *mRNA* target untuk mencegah translasi, mendorong pemotongan, atau melakukan destabilisasi terhadap *mRNA*. Mekanisme kerja *ss-siRNA* yang mirip dengan *miRNA* ditampilkan pada Gambar 5. Karena bentuk akhir dari *miRNA* ataupun *siRNA* yang efektif melakukan pasangan dengan *mRNA* target hanya untai tunggal, maka pada penelitian Yu et al. (2012) hanya menggunakan untai tunggal *siRNA* yang kemudian dikenal sebagai *ss-siRNA*.

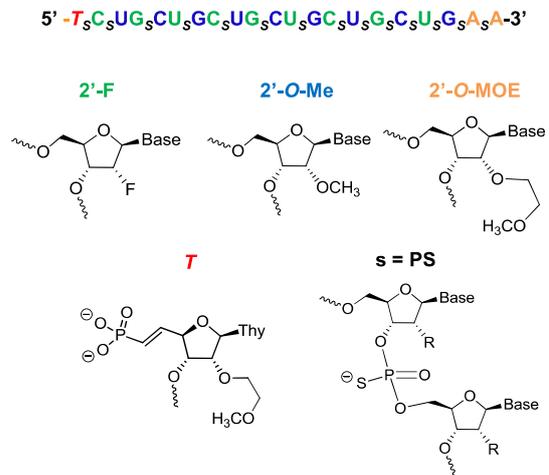
Modifikasi *ss-siRNA* yang dilakukan, dimaksudkan untuk meningkatkan daya tahan terhadap enzim nuklease, memperpanjang usia keberadaan *ss-siRNA* di dalam jaringan (*half-life*) serta meningkatkan afinitas dan potensi nukleotida tersebut untuk berikatan dengan sel secara *in vivo*. Gambar 6 menampilkan struktur *ss-siRNA* yang telah dimodifikasi dengan penambahan 2'-Fluoro (2'-F), 2'-O-Methyl (2'-O-Me), 2'-O-Methoxyethyl (2'-O-MOE), thymidin (T) dan phosphate atau (E)-vinylphosphonate (PS) (Yu et al.

2012), seperti yang telah dilakukan terhadap *ASO* pada penjelasan di atas.



Gambar 5. Mekanisme kerja *miRNA*, *siRNA* dan *ss-siRNA* untuk inaktivasi gen

Sumber: Davidson & Monteys (2012)

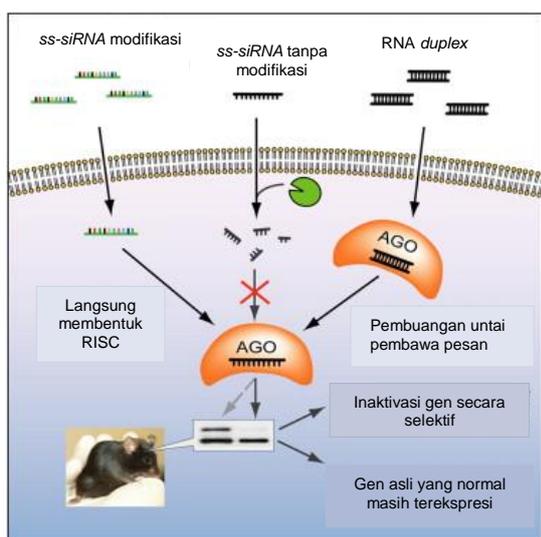


Gambar 6. Struktur *ss-siRNA* yang telah dimodifikasi dengan 2'-Fluoro (2'-F), 2'-O-Methyl (2'-O-Me), 2'-O-Methoxyethyl (2'-O-MOE), thymidin (T) dan phosphate atau (E)-vinylphosphonate (PS)

Sumber: Yu et al. (2012)

Keberadaan *vinylphosphonate* akan mencegah pemotongan oleh enzim nuklease di dalam sel serta meningkatkan daya tahan nukleotida tersebut secara *in vivo*. Selain itu, ikatan PS dinilai dapat meningkatkan daya ikat *ss-siRNA* pada protein-protein serum yang pada akhirnya dapat meningkatkan ketersediaan biologis dari nukleotida tersebut di dalam tubuh.

Modifikasi kimia terhadap *ss-siRNA* akan menyebabkan *ss-siRNA* tersebut lebih stabil di dalam sel dibandingkan dengan *ss-siRNA* yang tidak dimodifikasi yang akan mengalami degradasi setelah masuk sel (Gambar 7). Gambar tersebut juga menunjukkan bahwa *ss-siRNA* yang telah dimodifikasi maupun RNA rantai ganda (*duplex* RNA) akan bergabung dengan enzim AGO membentuk kompleks yang disebut RISC untuk selanjutnya menemukan *mRNA* target dan melakukan inaktivasi. Hasil inaktivasi *mRNA* ini adalah ekspresi protein mengalami reduksi atau tidak terekspresi sama sekali, seperti yang tampak pada Gambar 7.



Gambar 7. *ss-siRNA* yang tidak dimodifikasi akan segera didegradasi oleh enzim nuklease setelah memasuki sel, sedangkan *ss-siRNA* yang dimodifikasi dan RNA untai ganda tidak akan didegradasi sehingga berhasil menemukan *mRNA* target bersama AGO

Sumber: Yu et al. (2012)

Teknologi inaktivasi gen di atas memiliki kelebihan dibandingkan dengan teknologi penanggulangan penyakit secara konvensional menggunakan senyawa-senyawa anti viral ataupun antibodi, diantaranya mudah dimodifikasi mengikuti mutasi patogen, mudah dan cepat disintesis, murah, serta lebih efektif karena langsung pada sasaran menghambat ekspresi gen patogen. Namun, kelemahan teknologi ini adalah terjadinya variasi efektivitas antara penggunaannya secara *in vitro* dan aplikasinya secara *in vivo*.

KESIMPULAN

Teknologi inaktivasi gen merupakan strategi yang memiliki prospek untuk penanggulangan penyakit-penyakit infeksi yang belum dapat diatasi dengan

menggunakan vaksin, antiviral, maupun antibodi. Beberapa teknologi inaktivasi gen, yang meliputi *ASO*, *RNAi*, dan *ss-siRNA* dapat digunakan untuk penanggulangan beberapa penyakit. Teknologi tersebut memiliki kelebihan, seperti mudah dimodifikasi mengikuti mutasi patogen, mudah dan cepat disintesis, murah, serta lebih efektif karena langsung pada sasaran menghambat ekspresi gen patogen. Namun adanya variasi efektivitas antara penggunaannya secara *in vitro* dan aplikasinya secara *in vivo* merupakan kelemahan yang sedang dikaji pemecahannya. Penggunaan teknologi tersebut diharapkan akan memberikan pilihan baru yang lebih efektif untuk pemberantasan penyakit-penyakit infeksi pada ternak.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada Prof. Masaharu Isobe dan Dr. Nobuyuki Kurosawa (*Laboratory of Cellular and Molecular Biology, Graduate School of Innovative Life Science, Toyama University, Jepang*) atas bimbingannya selama penulis melakukan program *postdoc* dan mengkaji teknologi *ASO*, *RNAi* dan *ss-siRNA*.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdelwhab EM, Hafez HM. 2012. Insight into alternative approaches for control of Avian Influenza in poultry, with emphasis on highly pathogenic H5N1. *Viruses*. 4:3179-208.
- Agrawal S. 2010. Remembering Paul C Zamecnik, MD., Father of antisense (1912-2009). *Oligonucleotides*. 20:47-50.
- Agustina D, Sardjono CT, Setiawan B, Sandra F. 2011. Peranan *RNA interference* pada embryonic stem cell. *CDK 186*. 38:332-335.
- Ali M, Alimuddin, Sabrina Y. 2013. Sequence diversity of *pfmdr1* and sequence conserve of *pldh* in *Plasmodium falciparum* from Indonesia: its implications on designing a novel antimalarial drug with less prone to resistance. *Iran J Parasitol*. 8:522-529.
- Ali M, Hitomi K, Nakano H. 2006. Generation of monoclonal antibodies using simplified single-cell reverse transcription-polymerase chain reaction and cell-free protein synthesis. *J Biosci Bioeng*. 101:284-286.
- Ali M. 2012a. Single strand-small interfering RNA technology. In: *Material of regular journal reading, laboratory of cellular molecular biology*. Toyama (Japan): Toyama University. p. 1-12.
- Ali M. 2012b. Direct expression of IgG amplified gene using mammalian cell expression system. In: *Regular seminar laboratory of cellular molecular biology*. Toyama (Japan): Toyama University. p. 1-10.

- Brodersen P, Voinnet O. 2006. The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends Genet.* 22:268-280.
- Chan JHP, Lim S, Wong WSF. 2006. Antisense oligonucleotide: from design to therapeutic application. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 33:533-540.
- Chen M, Granger AJ, VanBrocklin MW, Payne WS, Hunt H, Zhang H, Dodgson JB, Holmen SL. 2007. Inhibition of avian leukosis virus replication by vector-based RNA interference. *Virology.* 365:464-472.
- Davidson BL, Monteys AM. 2012. Singles engage the RNA interference pathway. *Cell.* 150:873-875.
- Dias N, Stein CA. 2002. Antisense oligonucleotide: basic concepts and mechanism. *Mol Cancer Ther.* 1:347-355.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 391:806-811.
- Ghildiyal M, Zamore PD. 2009. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat Rev Genet.* 10:94-108.
- Henry C. 2004. Gene silencer's special delivery. *RNA Interf.* 82:9-12.
- Kole R, Krainer AR, Altman S. 2012. RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides. *Nat Rev Drug Discov.* 11:125-140.
- Lahiri N. 2012. Shooting the messenger with single-stranded RNA gene silencing [Internet]. [disitasi 9 Januari 2013]. Tersedia dari: <http://en.hdbuzz.net/099>
- Lambeth LS, Moore RJ, Muralitharan MS, Doran TJ. 2007. Suppression of bovine viral diarrhea virus replication by small interfering RNA and short hairpin RNA-mediated RNA interference. *Vet Microbiol.* 119:132-143.
- Lima WF, Prakash TP, Murray HM, Kinberger GA, Li W, Chappell AE, Li CS, Murray SF, Gaus H, Seth PP, Swayze EE, Crooke ST. 2012. Single-stranded siRNAs activate RNAi in animals. *Cell.* 150:883-894.
- Maine EM. 2010. Meiotic silencing in *Caenorhabditis elegans*. *Int Rev Cell Mol Biol.* 282:91-134.
- Martens WJM, Niessen LW, Rotmans J, Jetten TH, McMichael AJ. 1995. Potential impact of global climate change on malaria risk. *Environ Health Perspect.* 103:458-464.
- Matsui M, Corey DR. 2012. Allele-selective inhibition of trinucleotide repeat genes. *Drug Discov Today.* 17:443-450.
- Meng QW, Zhang ZP, Wang W, Tian J, Xiao ZG. 2011. Enhanced inhibition of Avian leukosis virus subgroup J replication by multi-target miRNAs. *Viro J.* 8:556.
- Pushparaj PN, Melendez AJ. 2006. Short interfering RNA (siRNA) as a novel therapeutic. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 33:504-510.
- Sah DWY, Aronin N. 2011. Oligonucleotide therapeutic approaches for Huntington disease. *J Clin Invest.* 121:500-507.
- Wang H, Wu J, Liu X, He H, Ding F, Yang H, Cheng L, Liu W, Zhong J, Dai Y, et al. 2012. Identification of short hairpin RNA targeting foot and mouth disease virus with transgenic bovine fetal epithelium cells. *PLoS One.* 7:e42536.
- Watson ME, Jarisch J, Smith AL. 2004. Inactivation of deoxyadenosine methyltransferase (dam) attenuates *Haemophilus influenzae* virulence. *Mol Microbiol.* 53:651-664.
- Watts JK, Corey DR. 2012. Silencing disease genes in the laboratory and the clinic. *J Pathol.* 226:365-379.
- Yamane D, Kato K, Tohya Y, Akashi H. 2006. The double-stranded RNA-induced apoptosis pathway is involved in the cytopathogenicity of cytopathogenic bovine viral diarrhea virus. *J Gen Virol.* 87:2961-2970.
- Yu D, Pendergraff H, Liu J, Kordasiewicz HB, Cleveland DW, Swayze EE, Lima WF, Crooke ST, Prakash TP, Corey DR. 2012. Single-stranded RNAs use RNAi to potently and allele-selectively inhibit mutant huntington expression. *Cell.* 150:895-908.