

**LAPORAN PELAKSANAAN KEGIATAN PENELITIAN
HIBAH STRATEGIS NASIONAL
TAHUN ANGGARAN 2009**



MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

**HOMOLOGI VIRUS RABIES STRAIN ALAM DI INDONESIA BERDASARKAN
FILOGENETIK GEN-N DALAM USAHA MENCARI KESAMAAN ANTIGEN UNTUK
PRODUKSI KIT DIAGNOSTIK**

Jola Rahmahani, drh., MKes.

Prof. Dr. Rahaju Ernawati, drh., MSc.

Dr. Suwarno, drh., MSi.

Sumber Dana : DIPA / APBN Rupiah Murni tahun Anggaran 2009

Universitas Airlangga

LAPORAN PELAKSANAAN KEGIATAN PENELITIAN
HIBAH STRATEGIS NASIONAL
TAHUN ANGGARAN 2009

kk
kfc
LP. 38/10
Rah
h



HOMOLOGI VIRUS RABIES STRAIN ALAM DI INDONESIA BERDASARKAN
FILOGENETIK GEN-N DALAM USAHA MENCARI KESAMAAN ANTIGEN UNTUK
PRODUKSI KIT DIAGNOSTIK

Jola Rahmahani, drh., MKes.

Prof. Dr. Rahaju Ernawati, drh., MSc.


Dr. Suwarno, drh., MSi.

Sumber Dana : DIPA / APBN Rupiah Murni tahun Anggaran 2009

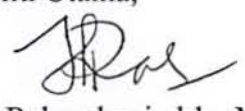
Universitas Airlangga

Halaman Pengesahan Laporan Penelitian Strategis Nasional

1. Judul Penelitian : Homologi Virus Rabies Strain Alam Di Indonesia Berdasarkan Filogenetik Gen-N dalam Usaha Mencari Kesamaan Antigen untuk Produksi Kit Diagnostik.
2. Ketua Peneliti :
- Nama Lengkap : Jola Rahmahani, drh., MKes.
- Jenis Kelamin : Perempuan
- NIP : 131 576 468
- Jabatan Struktural : -
- Jabatan Fungsional : Lektor
- Fakultas / Jurusan : Institute of Tropical Disease, Universitas Airlangga
- Pusat Penelitian : Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Universitas Airlangga
- Alamat : Kampus C Unair, Jl Mulyorejo Surabaya 60115
- Telepon / Fax. : (031) 5992445 / (031) 5992445
- Alamat Rumah : Jambangan X/47 Surabaya
- Handphone/Fax/E-mail : 081703422383/-/snow_arno@yahoo.co.id
3. Jangka Waktu Penelitian : 1 tahun
4. Pembiayaan :
- Jumlah Biaya yang Diajukan : Rp. 100.000.000,-


Mengetahui
Ketua Institute of Tropical Disease,

Dr. Nasronuddin, dr, Sp.PD, K-PTI
NIP. 140/159 073

Surabaya, 9 Desember 2009
Peneliti Utama,


Jola Rahmahani, drh., MKes.
NIP. 131 576 468



Mengetahui,
Ketua Lembaga Penelitian
Universitas Airlangga,


Prof. Dr. Bambang Sektiari L., drh.
NIP. 131 837 004

BAB I PENDAHULUAN

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

1.1 Latar Belakang Masalah

Kasus rabies di Indonesia masih tergolong tinggi dan bersifat endemik (Simanjuntak dan Suroso, 1996). Program vaksinasi sampai saat ini masih belum dapat mengatasi masalah, karena Indonesia masih menggunakan vaksin yang mengandung virus rabies strain laboratorium (strain Pasteur). Rentangan waktu yang panjang dan luasnya daerah geografik menyebabkan timbulnya evolusi virus, sehingga terdapat perbedaan susunan nukleotida genom antar virus rabies strain alam dan strain laboratorium (David *et al.*, 2000). Perbedaan inilah yang merupakan salah satu penyebab kegagalan diagnosis rabies di Indonesia, yang berkaitan dengan pengujian antibodi di lapangan.

Pengujian antibodi rabies hasil vaksinasi seringkali dievaluasi dengan menggunakan kit ELISA yang sementara ini masih diimport. Harga kit yang terlalu mahal dan tidak efisien membuat pengujian menjadi tersendat. Alternatif lainnya adalah penggunaan kit ELISA buatan dalam negeri, namun kit inipun banyak menimbulkan masalah karena banyak terjadi false positif. Alasan yang paling kuat adalah belum adanya usaha produsen untuk mencari tahu sampai seberapa jauh adanya kesamaan homologi antara antigen yang digunakan dalam kit dan virus rabies yang ada di Indonesia, sehingga pada anjing yang tidak divaksinpun seringkali menunjukkan hasil positif. Penggunaan virus utuh sebagai antigen kit ELISA diagnostik juga tidak efektif karena antibodi yang terbentuk sebagian besar tertuju pada protein-N.

Seperti diketahui gen-N virus rabies memiliki arti penting dalam studi epidemiologi molekuler. Meskipun tingkat homologi sikuen nukleotida gen-N virus

rabies di dunia tergolong tinggi (lebih dari 90%), tetapi untuk kondisi daerah geografik di Indonesia belum pernah dilaporkan. Dengan teknik PCR menggunakan primer spesifik, gen-N dapat diamplifikasi, sehingga dapat ditentukan panjang nukleotidanya. Sementara melalui teknik sikuensing susunan nukleotida gen-N dapat dirunut dan diketahui tingkat homologinya serta hubungan kekerabatan antar virus rabies berdasarkan daerah geografis yang berbeda. Dari data tersebut nantinya juga dihubungkan dengan protein-N yang disandinya. Protein-N virus rabies strain alam yang ada di Indonesia yang memiliki kesamaan tinggi akan dibakukan sebagai kandidat antigen diagnostik.

Gen-N virus rabies memiliki panjang nukleotida sekitar 1350 bp yang terletak pada nukleotida urutan ke 71-1423. Pada regio *leader* RNA ujung 3' didahului sekitar 70 nukleotida dan pada ujung 5' mengalami poliadenilasi dengan regio intergenik pendek yang mengandung 2 nukleotida (Arai, 2001; Jayakumar, 2004). Gen-N relatif stabil terhadap perubahan, tetapi evolusi dapat terjadi berdasar rentangan waktu dan daerah geografik (Tordo *et al.*, 1986).

1.2 Rumusan Masalah

Permasalahannya adalah:

- 1) Apakah terdapat perbedaan sikuen nukleotida gen-N virus rabies strain alam di Indonesia dengan strain laboratorium yang biasa digunakan sebagai bahan kit diagnostik?
- 2). Sampai seberapa dekat tingkat homologi dan hubungan kekerabatan virus rabies strain alam di Indonesia berdasarkan daerah geografik?

- 3). Apakah protein-N dari salah satu virus rabies strain alam dapat digunakan sebagai kandidat kit diagnostik untuk pengujian antibodi dengan teknik ELISA?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Memperoleh gambaran skema nukleotida virus rabies strain alam yang ada di Indonesia yang menggambarkan kesamaan protein-N yang disandinya.

1.3.2 Tujuan Khusus

Tujuan khusus dari penelitian ini adalah :

1. Mengetahui homologi urutan skema nukleotida gen-N virus rabies strain alam dan strain laboratorium yang ada di Indonesia.
2. Mengetahui karakter protein-N virus rabies yang ada di Indonesia yang nantinya dapat dibakukan sebagai antigen diagnostik.
3. Menguji imunogenitas protein-N pada teknik ELISA terhadap antibodi rabies.

BAB II STUDI PUSTAKA

Rabies merupakan ensefalitis viral yang bersifat fatal, ditransmisikan dari hewan ke hewan atau dari hewan ke manusia (zoonosis) melalui gigitan hewan gila. Rabies dapat digolongkan sebagai penyakit strategis, karena merugikan dari segi ekonomi dan kesehatan masyarakat. Keberadaan rabies di Indonesia telah dilaporkan sejak tahun 1889 dan saat ini telah tersebar luas di seluruh tanah air, kecuali 4 propinsi yang masih dinyatakan bebas, yakni Bali, Nusa Tenggara Barat, Irian Jaya dan Maluku (Dharma dkk., 2000). Pada tahun 2003 kepulauan Maluku tidak lagi bebas rabies.

Pada akhir tahun 1997, Pulau Flores (NTT) tertular Rabies akibat masuknya anjing tertular secara illegal dari Buton (Sulawesi Tenggara) dan sekarang telah menyebar ke pulau-pulau sekitarnya. Hingga akhir Agustus 2000, sebanyak 2.784 orang digigit anjing tersangka, sebanyak 85 orang di antaranya meninggal. Dikawatirkan penyakit dapat menyeberang ke NTB (Dibia, 2000).

Rabies selain berbahaya bagi manusia, juga dapat menyerang hewan ternak (sapi, kambing, domba, babi, kuda dan ayam), hewan piaraan (anjing, kucing dan kera) atau hewan liar (tikus, serigala, ajak, musang dan bison). Rabies ditularkan oleh gigitan hewan (anjing) gila dan virus dapat disebarkan oleh vampir, beberapa jenis kelelawar dan nyamuk (Modrow dan Falke, 1997).

Virus rabies yang tergolong virus ss-RNA dari famili *Rhabdoviridae* memiliki berat molekul (BM) $4,5 \times 10^6$ Da dengan panjang genom 12 kb, dan tersusun secara struktural atas lima daerah penyandi protein. Susunan genom tersebut adalah 5'-N-NS-M-G-L-3', di mana genom ini menyandi protein inti (N), protein non-struktural (NS), protein matrik

(M), protein gliko (G), dan transkriptase (L). Protein-G dan M terletak pada amplop virus, sedangkan protein N, NS dan L berada dalam nukleokapsid (Arai, 1996).

Di alam terdapat virus rabies *strain* alam (*street virus*) yang terbagi menjadi satu genotipe dan strain laboratorium (*fixed virus*) yang merupakan strain alam yang diadaptasi dalam laboratorium. Susunan nukleotida dan sikuen asam amino antara *strain* alam dan strain laboratorium memiliki kemiripan yang tinggi, yakni sekitar 91% untuk tingkat nukleotida dan 95% untuk tingkat asam amino (Sadkowska-Todys, 2000).

Terdapat perbedaan virulensi virus, antara virus Alam dan virus Fiks. Virus Alam lebih virulen dari pada virus Fiks. Virus Alam dapat bergerak secara transneuronal, sehingga mudah didapatkan di dalam air liur, dan membentuk Negri bodies yang dapat digunakan sebagai acuan diagnosis melalui uji mikroskopis. Sebaliknya *fixed virus* tidak menunjukkan kedua sifat tersebut (Kelly dan Strick, 2000; Lewis *et al.*, 2000); Jackson *et al.*, 2000).

Sadkowska-Todys (2000) berhasil membedakan genotipe dan varian virus Rabies strain Alam berdasarkan urutan nukleotida dan asam amino penyusun fragmen virus dengan teknik PCR. Strain Alam (genotipe 1) memiliki hubungan yang sangat erat dengan strain CVS (berasal dari strain Fiks). Strain Alam dan strain CVS memiliki kemiripan sebesar 91% pada tingkat nukleotida dan 95 % pada tingkat asam amino.

Pada penelitian ini dilakukan analisis gen-N virus rabies strain alam untuk mengetahui lokasi dan susunan nukleotida atau asam amino. Hasil analisis kemudian dapat dipetakan secara genetik sehingga dapat diketahui hubungan kekerabatan antar virus rabies di Indonesia.

Seperti diketahui gen-N terdiri atas 1350 nukleotida dan bersifat homolog pada setiap strain. Perbedaan nukleotida dapat terjadi karena pengaruh waktu dan daerah geografik. Gen-N dapat didigesti dengan enzim *AluI*, *PvuII*, *EcoRI*, *Sau3A*, *HincII*, dan *BamHI*. Isolat Indian memiliki dua sisi pemotongan *BamHI*, tetapi isolat Asian hanya memiliki satu sisi pemotongan atau tidak sama sekali (Tordo *et al.*, 1986; Nadin-Davis *et al.*, 1994; Jayakumar *et al.*, 2004). Berdasar hasil sekuen gen-N, diketahui bahwa isolat Srilangka berada satu cluster dengan isolat India, tetapi tidak dengan isolat Cina, Thailand, Malaysia, Isrzel, Iran, Oman, Saudi Arabia, Rusia, Nepal, Pilipina dan Jepang (arai *et al.*, 2001).

Dari hasil studi pendahuluan tentang karakterisasi virus rabies dari daerah Sulawesi dan Nusa Tenggara yang diadaptasi pada sel neuroblastoma, terdapat persamaan pertumbuhan baik dalam menimbulkan CPE maupun titer virus (Suwarno, 2005). Sementara itu Rahmahani dkk (2004) dengan menggunakan antibodi monoklonal dapat mengenali virus rabies baik yang berasal dari otak maupun air liur.

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksploratif yang bersifat deskriptif. Secara deskriptif bertujuan untuk mengetahui karakteristik molekuler protein dan fragmen gen-N. Karakteristik molekuler diobservasi dengan melakukan preparasi protein virus rabies, amplifikasi fragmen gen-N dan sekuensing nukleotida.

3.2 Sampel Virus

Sampel penelitian berupa otak anjing terinfeksi virus rabies dan telah dinyatakan positif berdasarkan uji *fluorescent antibody technique* (FAT) dan *mouse inoculation test* (MIT). Sebagai kontrol negatif, digunakan otak anjing normal. Sampel diambil dari P. Sulawesi, Nusa Tenggara, Sumatera dan Kalimantan, yang diperoleh melalui Balai Penelitian dan Penyidikan Veteriner (BPPV) Regional II (Bukit Tinggi Sumatera Barat), Regional V (Banjar Baru Kalimantan Selatan), dan Balai Besar Veteriner (Maros, Sulawesi Selatan).

3.3 Isolasi RNA Total

Isolasi RNA total menggunakan Trizol-LS (Invitrogen). Otak anjing terinfeksi/normal dibuat suspensi 20% dengan PBS. Sebanyak 250 µl gerusan otak ditambah dengan 750 µl Trizol-LS dan diaduk dengan pipet. Ke dalam campuran kemudian ditambahkan 200 µl kloroform, difortex, inkubasi suhu ruang 5 menit dan disentrifus 12.000 rpm selama 15 menit suhu 4°C. sebanyak 500 µl supernatan

dipindahkan ke tabung baru dan ditambah dengan 500 μ l propanol-2, difortex. inkubasi 5 menit suhu ruang dan disentrifus 12.000 rpm selama 10 menit suhu 4°C. supernatan dibuang secara perlahan dan pellet yang tertinggal kemudian ditambah dengan 1000 μ l ethanol 70% dan disimpan pada -20°C.

3.4 Sintesis cDNA (RT-PCR)

Sintesis cDNA dilakukan dengan menggunakan *Ready to go RT-PCR kit* (Amersham). RNA total hasil isolasi dikeringkan kemudian ditambah dengan *nuclease free water* (NFW). Sebanyak 10 μ l RNA dipanaskan pada 95°C selama satu menit dengan pendidihan. *Bead* RT-PCR ditambah dengan 5 μ l larutan RNA, 2 μ l (100 pmol) primer N1 atau N3, 43 μ l NFW sehingga total volume 50 μ l. *Bead* kemudian di-*spindown* dan dimasukkan mesin PCR Thermal cycles (Perkins Elmer) dengan denaturasi pada 94°C 5 menit dan diinkubasi dengan 42°C selama 90 menit. Produk RT kemudian dimasukkan ke dalam es dan disimpan pada -20°C sampai digunakan (Fraser *et al.*, 1996; David *et al.*, 2000).

3.5 Amplifikasi DNA (PCR)

Hasil sintesis cDNA kemudian dilakukan amplifikasi DNA (PCR) dengan menggunakan *Ready to go PCR kit* (Amersham). *Bead* PCR ditambah dengan 5 μ l produk RT-PCR, 2 μ l primer (100 pmol) primer N5 atau N7, 2 μ l primer N2, N4 atau N6, 16 μ l NFW, sehingga total volume 25 μ l. *Bead* kemudian di-*spindown* dan dimasukkan mesin PCR dengan denaturasi awal 94°C 5 menit dan diikuti dengan denaturasi 94°C

dipindahkan ke tabung baru dan ditambah dengan 500 μ l propanol-2, difortex, inkubasi 5 menit suhu ruang dan disentrifus 12.000 rpm selama 10 menit suhu 4°C. supernatan dibuang secara perlahan dan pellet yang tertinggal kemudian ditambah dengan 1000 μ l ethanol 70% dan disimpan pada -20°C.

3.4 Sintesis cDNA (RT-PCR)

Sintesis cDNA dilakukan dengan menggunakan *Ready to go RT-PCR kit* (Amersham). RNA total hasil isolasi dikeringkan kemudian ditambah dengan *nuclease free water* (NFW). Sebanyak 10 μ l RNA dipanaskan pada 95°C selama satu menit dengan pendidihan. *Bead* RT-PCR ditambah dengan 5 μ l larutan RNA, 2 μ l (100 pmol) primer N1 atau N3, 43 μ l NFW sehingga total volume 50 μ l. *Bead* kemudian di-*spindown* dan dimasukkan mesin PCR Thermal cycles (Perkins Elmer) dengan denaturasi pada 94°C 5 menit dan diinkubasi dengan 42°C selama 90 menit. Produk RT kemudian dimasukkan ke dalam es dan disimpan pada -20°C sampai digunakan (Fraser *et al.*, 1996; David *et al.*, 2000).

3.5 Amplifikasi DNA (PCR)

Hasil sintesis cDNA kemudian dilakukan amplifikasi DNA (PCR) dengan menggunakan *Ready to go PCR kit* (Amersham). *Bead* PCR ditambah dengan 5 μ l produk RT-PCR, 2 μ l primer (100 pmol) primer N5 atau N7, 2 μ l primer N2, N4 atau N6, 16 μ l NFW, sehingga total volume 25 μ l. *Bead* kemudian di-*spindown* dan dimasukkan mesin PCR dengan denaturasi awal 94°C 5 menit dan diikuti dengan denaturasi 94°C

selama 45 detik, *anealing* 45°C 45 detik, *extention* 72°C 90 detik dan *extention* akhir 72°C 7 menit, sebanyak 40 siklus. Produk PCR kemudian dimasukkan ke dalam es dan disimpan pada -20°C sampai digunakan (Fraser *et al.*, 1996; David *et al.*, 2000).

3.6 Elektroforesis RNA / DNA

RNA total dan DNA produk PCR dilakukan analisis dengan agarose RNA/DNA elektroforesis dengan konsentrasi akhir 1%. Untuk elektroforesis RNA digunakan marker RNA dengan tetapan pengendapan 23S dan 26S, sedangkan sebagai marker DNA digunakan DNA dengan panjang 1 kb (kisaran 250-1000 bp). Agarose 1% dipanaskan kemudian ditambah 0,4 µg/ml etidium bromid dan dicetak pada gel plate yang didalamnya diletakkan comb, selanjutnya dituangi dengan buffer TAE (Sambrook *et al.*, 1989). Sebanyak 5 µl RNA/DNA ditambah dengan 2 µl *blue juice* dimasukkan ke dalam sumuran *comb* pada agar. Setelah itu power supply dinyalakan dengan kekuatan 100 V selama 30 menit. Gel kemudian divisualisasi dengan UV transluminator.

Primer yang digunakan untuk amplifikasi gen-N

Nama	Sikuen nukleotida (5'—3')	Posisi	Sense
N3	GTAGGATGATATATGGG	1013-1029	+
N4	GAGTCACTCGAATATGTC	1402-1419	-
N5	GAGAAAGAACTTCAAGA	1157-1173	+

3.7 Pemurnian DNA dari Larutan Produk PCR

Pemurnian DNA dari larutan produk PCR dilakukan dengan *gen clean kit* (Biogene). Sebanyak 300 µl larutan DNA ditambah dengan 400 µl spin glassmilk yang

telah diletakkan dalam spin filter. Tabung diinkubasi pada suhu ruang 5 menit dan dicampur tiap 1-2 menit, disentrifus 1 menit atau sampai likuid dapat dipindahkan dari *catchtube* kemudian filter dicuci dengan 500 μ l larutan pencuci dan disentrifus 30 detik, disentrifus ulang 2 menit untuk mengeringkan pelet. Filter kemudian dipindahkan ke *catchtube* baru dan ditambah dengan 15 μ l larutan elusi pada filter. *Spin glassmilk* selanjutnya diresuspensi dengan cara memipet, disentrifus 30 detik untuk memindahkan DNA eluat ke dalam *catchtube* baru. *Spinfilter* kemudian dibuang dan DNA dapat disimpan sampai digunakan (Manual Biogene).

3.8 Pemurnian DNA dari TAE Agarose Gel

Teknik pemurnian DNA dari agarose gel hampir sama dengan dari larutan produk PCR, hanya saja larutan DNA diganti dengan gel yang mengandung pita yang telah dipotong. Gel kemudian dipanaskan pada 55°C selama 5 menit untuk melelehkan gel. Selanjutnya sama dengan teknik pemurnian DNA dari produk PCR (Manual Biogene).

3.9 Sikuensing

Sikuensing dilakukan dengan *automated sequencer* ABI Prism 310 dengan menggunakan *ready reaction kit* (Applied Biosystems) dan *big dye terminator kit* (Applied Biosystems). DNA kering dengan konsentrasi 200 ng/ml ditambah 25 μ l *template suppressen reagent*, diforteks, kemudian dipanaskan 95°C selama 5 menit dan dimasukkan ke dalam es. Sebanyak 30-90 ng DNA ditambah primer N5 (ujung depan) atau primer N4 (ujung belakang), 8 μ l *ready reaction mix* sehingga total volume

mencapai 20 μ l. tabung kemudian di-*spin down* dan ditambah 30 μ l *mineral oil*. Tabung kemudian di-running pada mesin *sequencer* dengan program 96°C 5 menit, 96°C 30 detik, 50°C 15 detik dan 40°C 4 detik sebanyak 25 siklus. Hasil sikuen kemudian di-*loading* dalam mesin *sequencer* dan hasil dibaca melalui monitor dalam bentuk grafik alogram (Sambrook *et al.*, 1989).

3.10 Analisis Homologi

Analisis homologi sikuen nukleotida dan hubungan kekerabatan dilakukan dengan menggunakan software komputer dengan program *genetyx mac ver. 8.0*. Sebagai pembanding digunakan sikuen nukleotida gen-N beberapa virus rabies strain alam dan strain laboratorium dari *GenBank*.

3.11 Analisis Protein

Hasil biakan virus segar yang berasal dari kultur sel yang baru dipanen dimurnikan dan berikutnya dilakukan analisis protein dengan SDS-PAGE. Protein kemudian ditransfer pada kertas nitroselulose dan selanjutnya dilakukan *western blot*.

3.11.1 SDS-PAGE

Setelah larutan gel pemisah 12 % dimasukkan pada *gel plate* pada posisi vertikal, kemudian di atasnya ditambahkan butanol sampai mengeras. Butanol kemudian dibuang, dibersihkan dengan PBS dan dikeringkan dengan kertas Whatman. Proses selanjutnya adalah penambahan stacking gel dan setelah itu dimasukkan comb dan ditunggu sampai

betul-betul set. *Comb* kemudian diambil dan dicuci dengan aquades untuk selanjutnya diberi bufer.

Sampel yang sudah dicampur dengan bufer lisis I/II dipanaskan 42 °C, kemudian 10 µl sampel dimasukkan ke lubang. *Power supply* dinyalakan dengan kekuatan 30 mA selama 5 jam dan jika gel sudah sampai ke bawah kemudian dimatikan. Plate dibuka dan dipisahkan, selanjutnya dicuci dengan bufer.

Protein gel kemudian ditransfer ke kertas nitroselulose (PVDF) dengan cara memotong kertas Whatman dan PVDF sesuai dengan besarnya gel. Kertas PVDF diinkubasi pada anode bufer II, kemudian disusun 6 sheet kertas absorben dari bufer I, 3 sheet dari bufer II, PVDF dan polyacrylamid dan 6 sheet pada katode bufer. Selanjutnya diberi aliran listrik 0,8 mA/cm² dari gel. Setelah protein ditransfer, PVDF dicuci dengan aquades dan larutan TBS, untuk kemudian, untuk kemudian di-*blotting*. nitroselulose dan selanjutnya dilakukan western *blotting*.

3.11.2 *Western Blot*

Membran PVDF blot diblok dengan 1 % BSA kemudian dicuci dengan larutan TBS dua kali. Direaksikan dengan antibodi poliklonal anti-rabies dan sebagai kontrol direaksikan dengan serum anjing normal. PVDF diinkubasi pada suhu ruang, dicuci dengan larutan TBS tiga kali, kemudian ditambahkan konjugat anti-dog yang dilabel enzim alkalin fosfatase dan diberi substrat 4-NPP, serta diwarnai dengan *western blue*. Akhirnya dikeringkan di udara pada suhu ruang. Dari hasil ini kemudian ditentukan protein spesifik dan dihitung berat molekul protein.

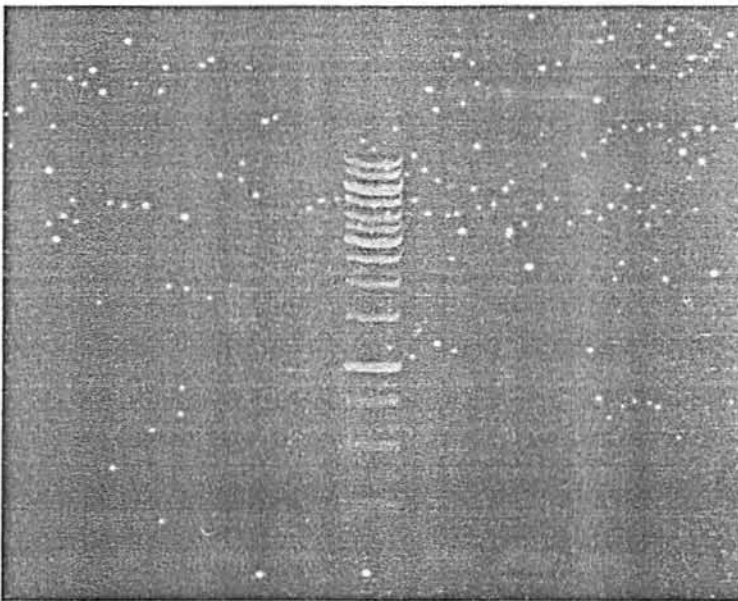
3.12 Analisis Data

Data yang diperoleh kemudian dianalisis berdasarkan panjang amplicon untuk amplifikasi DNA, berat molekul untuk protein dan nilai *optical density* untuk uji imunogenitas.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Amplifikasi Gen-N

Amplifikasi fragmen gen N pada PCR menggunakan primer RN-3 dan RN-4 menghasilkan amplicon dengan panjang 406 bp. Penggunaan primer ini dapat mengamplifikasi fragmen gen-N pada nukleotida urutan ke-1013-1419. Hasil ini menunjukkan, bahwa primer yang digunakan untuk amplifikasi cocok dengan fragmen gen-N virus rabies yang ada di Indonesia. Gambar 4.1 menunjukkan amplicon hasil amplifikasi fragmen gen-N.



Gambar 4.1. Hasil amplifikasi gen-N virus rabies dari beberapa daerah di Indonesia. Kolom 1-2 Isolat Kalimantan, 3-4 Isolat Sulawesi, 5 Marker DNA, 679 Isolat Sumatera, 8-9 Isolat NTT. Amplicon yang teramplifikasi 406 bp.

Pada penelitian ini urutan nukleotida dari hasil sekensing fragmen gen-N pada posisi nt 1261-1420 (160 nukleotida) antar strain alam dari berbagai daerah geografik di

Indonesia dan antar strain laboratorium (*fixed*), tidak banyak mengalami perubahan, kecuali strain CVS yang lebih variatif. Suatu hal menarik adalah adanya hubungan kekerabatan antara virus rabies yang berasal dari Sulawesi dan Nusa Tenggara Timur. Berdasarkan hasil sekuens nukleotida pada posisi nt 1295-1300 yang tersusun atas basa CCCCCC, menunjukkan bahwa strain alam asal Sulawesi dan asal Nusa Tenggara Timur berasal dari satu daerah yang sama. Seperti diketahui bahwa sebelum tahun 1997, Nusa Tenggara Timur merupakan propinsi bebas rabies dan baru pada tahun 1997/1998 dinyatakan sebagai daerah endemik rabies. Ada dugaan kuat, bahwa kejadian endemik rabies di Nusa Tenggara Timur akibat masuknya anjing piaraan yang dibawa pedagang dari Pulau Buton Sulawesi Tenggara ke Larantuka Kabupaten Flores Timur (Akoso, 1998; Dibia, 2000).

Pada Tabel 4.1 disajikan data mengenai tingkat homologi virus rabies strain alam asal Indonesia dibandingkan virus rabies standart dari *GenBank*, berdasarkan sekuens nukleotida gen-N. Pada penelitian ini tingkat homologi virus didasarkan atas sekuens gen-N pada posisi nukleotida 1201-1440 *full length* genom virus rabies. Berdasarkan sekuens nukleotida pada posisi tersebut, tingkat homologi gen-N virus rabies strain alam asal Sulawesi berkisar antara 81,7-96,8%, Nusa Tenggara 79,7%, Kalimantan antara 85,8-92,0%, Sumatera 92,0-95,6%, strain *fixed* 98,2% dan strain CVS 74,3%.

Smith *et al.* (1992) mengamplifikasi gen-N virus rabies dan menganalisis fragmen nukleotida sepanjang 200 bp. Sekuens nukleotida sepanjang 200 bp pada daerah ini merupakan daerah *conserved* dan membedakan isolat Asia, Afrika, Eropa dan Amerika menjadi grup genetik secara unik. Isolat yang berasal dari anjing pada kasus kejadian di Jawa dan dari manusia pada kasus di Jakarta tahun 1989, memiliki kesamaan nukleotida

sebesar 99%. Isolat Indonesia masuk ke dalam grup VB, satu grup dengan isolat Cina. Sementara isolat Thailand masuk ke dalam grup VA. Antara isolat Indonesia dan Cina, tingkat homologi sekuen nukleotida mencapai 95%, sedangkan dengan isolat Thailand tingkat homologinya hanya mencapai 90%.

Tabel 4.1 Tingkat Homologi Sekuens Nukleotida Gen-N Virus Rabies Strain Alam Indonesia terhadap Virus Rabies Strain Pasteur

Asal Virus	Kode	Gen-N (%)
Sulawesi	D-65	96,8
	F-63	81,7
	J-27	89,2
Nusa Tenggara	K-24	79,7
	L-135	79,7
	N-138	79,7
Kalimantan	43	92,0
	119	85,8
	124	92,0
Sumatera	3	95,5
	7	95,6
	9	92,0
Laboratorium**	<i>Fixed</i>	98,2
	CVS	74,3

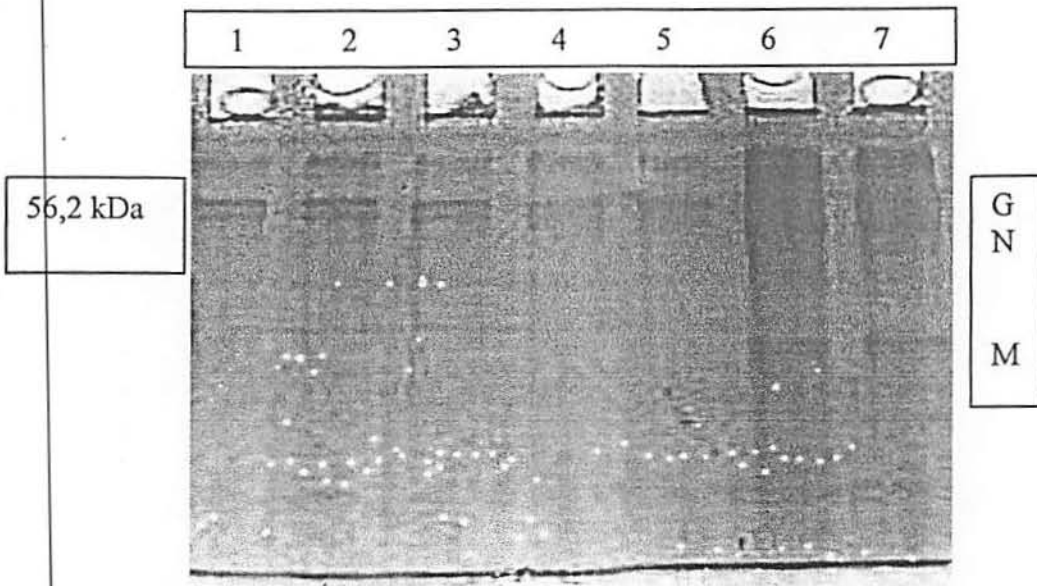
4.2 Karakteristik protein virus rabies

Seperti terlihat pada Gambar 4.2 dari hasil preparasi protein, tampak bahwa semua strain menunjukkan adanya protein-G, N dan L serta beberapa isolat dengan protein-M. Berdasarkan hasil pengujian berat molekul protein-N berkisar antara 56,2-58,2 kDa. Protein-N virus rabies dengan jumlah sekitar 450 asam amino disandi oleh

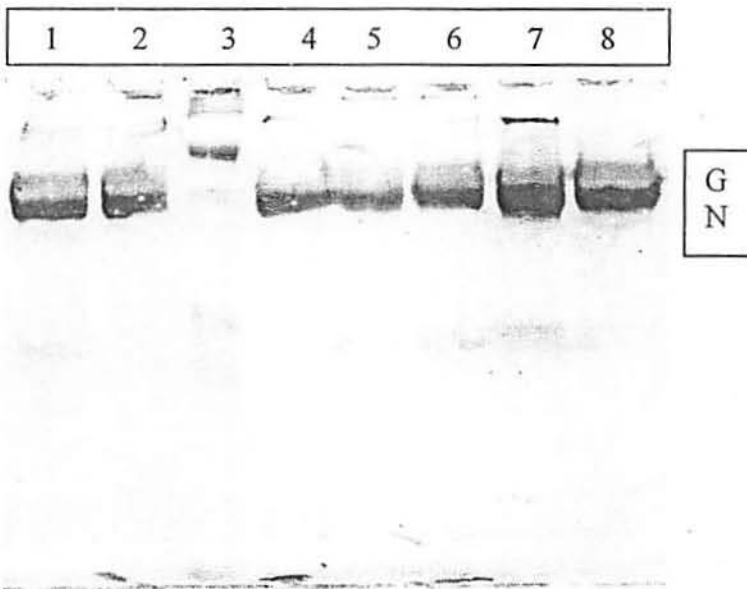
genom yang terletak pada posisi nt 71–1423 dari seluruh genom virus rabies. Pada penelitian ini BM protein-N virus rabies, baik strain alam (asal Sulawesi, Nusa Tenggara, Kalimantan dan Sumatera) maupun strain laboratorium (*fixed* dan CVS), yang dihitung berdasarkan pengukuran protein pada SDS-PAGE, adalah sebesar 56,2-58,2 kDa. Secara morfologi tidak ada perbedaan gambaran BM, baik di antara strain alam itu sendiri atau antara strain alam dengan strain laboratorium. Beberapa peneliti mendapatkan BM protein N sebesar 62 kDa (Madore dan England, 1977); 55 kDa (WHO, 1992); 57 kDa (Tordo, 1996); 50,7 kDa (Mavrakis *et al.*, 2003).

Protein-N mempunyai peran penting membentuk struktur mayor dalam proses enkapsidasi genom RNA. Protein-N juga terlibat pada proses perpindahan antara transkripsi dan replikasi. Replikasi tidak akan terjadi tanpa adanya protein-N dalam jumlah cukup selama proses enkapsidasi pertumbuhan RNA *template*. Protein-N mengalami fosforilasi pada asam amino 389. Mutasi asam amino serin (S) menjadi alanin (A), glisin (G), asam aspartat (D), asparagin (N), asam glutamat (E) dan glutamin (Q), baik pada mini genom atau *full-length* genom virus memberikan pengaruh terhadap proses transkripsi maupun replikasi (Tordo, 1996; Wu, 2002).

Setelah dilakukan SDS-PAGE, maka untuk karakterisasi dilanjutkan dengan *western blot*. Hasil karakterisasi protein dengan *Western blot* dapat dilihat pada Gambar 4.3. Gambar 4.3 menunjukkan hasil karakterisasi protein virus rabies dengan teknik *Western blot*. Protein kemudian direaksikan dengan antibodi anti-rabies (poliklonal) dan konjugat *goat-antirabbit* serta divisualisasikan dengan pewarnaan *Western blue* (BCIP/NBT).



Gambar 4.2 Hasil karakterisasi protein virus rabies dengan SDS-PAGE menggunakan pewarnaan *coomasie brilliant blue*; kolom 1, Isolat asal Sulawesi; 2-3, Isolat asal NTT 4, Isolat asal Kalimantan; 5, Isolat asal Sumatera; 6-7, strain labortatorium (*fixed*).



Gambar 4.3 Hasil karakterisasi protein virus rabies dengan *Western-Blot* menggunakan pewarnaan *fast red*; kolom 1, Isolat asal NTT; 2 dan 4, asal Sumatera; 3 marker *Rainbow BioRad*; 5-6 Isolat Sulawesi; 7-8, Isolat Kalimantan.

4.3 Pengujian Immunogenesitas Protein Virus Rabies

Pengujian imunogenesitas protein pada penelitian ini digunakan virus rabies strain alam yang memiliki rata-rata nilai OD tertinggi pada masing-masing kelompok daerah dari semua tingkatan pasase. Sementara pada strain laboratorium hanya digunakan strain *fixed* untuk pengujian, sedangkan strain CVS tidak digunakan karena strain ini hanya digunakan untuk *challenge* pada hewan percobaan.

Hasil pengujian imunogenesitas protein-N virus rabies strain alam (Sulawesi, Nusa Tenggara, Kalimantan dan Sumatera) dan strain laboratorium (*fixed*) pada mencit, masing-masing dengan dosis 20 µg/ekor pada pengamatan selama 2, 4, 6 dan 8 minggu pasca imunisasi pertama dapat dilihat pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Nilai *Optical Density* Data Hasil Pengujian Immunogenesitas Protein-N Virus Rabies dengan *indirect-ELISA*

Asal virus	Waktu pengamatan (minggu)				Rata-rata
	2	4	6	8	
Sulawesi	0,258	0,259	0,338	0,428	0,321
Nusa Tenggara	0,220	0,251	0,351	0,418	0,310
Kalimantan	0,222	0,282	0,346	0,431	0,320
Sumatera	0,224	0,216	0,281	0,305	0,257
<i>Fixed</i>	0,266	0,332	0,399	0,486	0,371
Kontrol	0,147	0,120	0,139	0,151	0,139

Hasil pengujian antibodi dengan is-ELISA dapat dikatakan bahwa protein-N virus rabies memiliki imunogenesitas dan antigenesitas yang tinggi. Imunogenesitas protein-N strain alam asal Sulawesi hampir menyamai imunogenesitas protein-N strain *fixed* yang selama ini banyak digunakan sebagai vaksin. Dari hasil penelitian ini dapat dikatakan bahwa protein-N virus rabies asal Sulawesi dapat dijadikan sebagai kandidat vaksin subunit atau rekombinan.

Dietzschold *et al.* (1987) yang menggunakan protein ribonukleo (RN) untuk imunisasi pada mencit dengan dosis 10 µg/ekor, menunjukkan peranan respon imun seluler terhadap imunogenesitas protein-N. Mencit atau *raccoon* yang diimunisasi dengan protein RN resisten terhadap ujiantang virus rabies strain homolog atau heterolog. Perrin *et al.* (1991) dengan menggunakan protein RN virus rabies strain Pasteur, *European bat Lyssavirus* (EBL) dan virus Mokola (Mok) melakukan imunisasi untuk manusia. Masing-masing kelompok menunjukkan reaksi positif sebesar 50, 25 dan 35 %. Tidak ada korelasi antara antibodi netralisasi dengan IL-2, tetapi terdapat reaksi silang di antara virus rabies dengan virus yang mempunyai hubungan dengan virus rabies. Hasil ini sekaligus menunjukkan protein-RN mampu mengaktivasi sel T *helper* untuk menghasilkan IL-2. Produksi IL-2 dihubungkan dengan peranan *cellular mediated immunity* (CMI) dan sel T memori.

BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian tentang karakterisasi molekuler protein dan gen penyandi nukleoprotein dan glikoprotein virus rabies strain alam asal Indonesia, maka dapat disimpulkan:

- 1) Amplifikasi fragmen gen-N menghasilkan produk PCR dengan panjang 406 bp. Tidak didapatkan adanya perbedaan panjang nukleotida pada daerah amplifikasi yang sama.
- 2) Berat molekul protein-N virus rabies strain alam berkisar antara 56,2-58,2 kDa, semuanya bereaksi spesifik terhadap antibodi anti-rabies.
- 3) Immunogenesitas protein-N virus rabies sangat bervariasi, berbeda menurut asal daerah geografik dan waktu pengamatan.
- 4) Tingkat homologi gen-N virus rabies strain alam terhadap virus referen berkisar antara 79,7-96,8 %. Ditemukan adanya perubahan nukleotida berupa mutasi titik fragmen gen-N pada daerah yang diamplifikasi.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian tentang karakterisasi molekuler protein dan gen penyandi nukleoprotein dan glikoprotein virus rabies strain alam isolat Indonesia, maka dapat disarankan:

- 1) Mengingat banyaknya variasi homologi dan adanya perubahan sekuens nukleotida fragmen gen-N virus rabies strain alam asal Indonesia dengan virus referen, maka dalam amplifikasi genom virus rabies strain alam perlu didesain suatu *primer*

spesifik agar dapat digunakan untuk melacak genom virus secara keseluruhan sesuai daerah geografiknya.

- 2) Mengingat imunogenesitas dan antigenesitas protein-N virus rabies strain alam asal Indonesia cukup tinggi, maka di antara strain alam tersebut, virus rabies asal Sulawesi dapat dijadikan sebagai kandidat vaksin subunit atau rekombinan untuk pencegahan rabies di Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

- Arai, YT. 1996 Rabies Vaccine. *In*: Vaccine Handbook. 1st Ed. Researcher's Associates National Institute of Health. Maruzen, Tokyo. pp. 145-152.
- Arai, YT., H. Takahashi, Y. Kameoka, T. Shiino, O. Wimalartne, and D.L. Lodmell. 2001. Characterization of Srilanka rabies virus isolates using nucleotide sequence analysis of nucleoproteins gene. *Acta Virol* 45(5-6): 327-333.
- David, D., B. Yakobson, J.S. Smith, and Y. Stram. 2000. Molekuler epidemiologi of rabies virus isolates from Israel and other middle-and near-eastern countries. *J. Clin Microbiol* 38(2): 755-762
- Davis, L.G. , W.M. Kuchl, and J.F. Battey. 1994. Basic Method in Molecular Biology. 2nd Ed. Appleton and Lange, Connecticut.
- Dharma, DMN., SM Astuti, JS Kalianda dan S Hadi. 2000. Evaluasi pengendalian dan pemberantasan Rabies. Rapat Teknis dan Pertemuan Ilmiah Kesehatan Hewan, Departemen Pertanian dan Kehutanan, Bogor 5-6 Oktober.
- Dietzschold, B., W.H. Wunner, R.I. MacFarlan, T.J. Wiktor, M. Kiel, R. Houghten, R.A. Leiner, J.G. Sutcliffe, and H. Koprowski. 1985. The antigenic structure of the rabies virus glycoprotein. *In*: Rabies in the Tropics. Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp. 3-12.
- Dibia, IN. 2000. Surveillance dan pemberantasan Rabies di Pulau Flores NTT. Rapat Teknis dan Pertemuan Ilmiah Kesehatan Hewan, Departemen Pertanian dan Kehutanan, Bogor 5-6 Oktober.
- Fraser, G.C., P.T. Hooper, R.A. Lunt, A.R. Gould, L.J. Gleeson, A.D Hyatt, G.M. Russell, and J.A. Ttenbelt. 1996. Encephalitis caused by a Lyssa virus in fruit bath in Australia. *Emerging Infect Dis* 2(4): 1-6
- Jackson, AC, CC. Phelan, and JP. Rossiter. 2000. Infection of Bergmann glia in the cerebellum of a skunk experimentally infected with Street Rabies virus. *Can. J. Vet. Res.* 64(4): 226-228.
- Jayakumar, R., K.G. Tirumurugaan, G. Ganga, K. Kumanan, and N.A. Mahalinga. 2004. Characterization of nucleoprotein gen sequence of an Indian isolate of rabies. *J. Acta Virol* 48(1): 47-50
- Kelly, RM. and PL. Strick. 2000. Rabies as a transneuronal tracer of circuits in the central nerves system. *J. Neurosci. Methods.* 103(1): 63-71.
- Lewis, P., Y. Fu, and TL. Lentz. 2000. Rabies vrus entry at the neuromuscular junction in nerve-mucleocultures. *Mucle. Nerve.* 23(5): 720-730.
- Modrow, S. and D. Falke. 1997. Rhabdo viren. *In*: Molekulare Virology. Spektrum Akademicher Verlag, Heidelberg, Berlin. Pp. 190-202.
- Nadin-Davis, SA., G.A. Casey, And A.I. Wandeler. 1994. A molecular epidemiological study of rabies virus in central ontoria and western Queebic. *J. Gen. Virool.* 75: 2575-2583.

- Rahmahani, J., Suwarno, Kusnoto, dan S.S. Andayani. 2004. Identifikasi karakter glikoprotein virus rabies isolat lokal sebagai antigen diagnostik. *Media Kedokteran Hewan* 20(Edisi Khusus): 11-15
- Rahmahani, J., Suwarno, Kusnoto dan SS. Andayani. 2006. Rancang Struktur F(ab)₂ Anti-idiotip Homolog Epitop Glikoprotein sebagai Prototip Vaksin Rabies di Indonesia. Laporan Penelitian LPPM Unair.
- Sadkowska-Todys, M. 2000. Phylogenetic relationship of Street Rabies virus strain in their antigenic reactivity with antibodies induced by vaccine strain. I. Analysis of phylogenetic relationship of Street Rabies virus strain isolated in Poland. *Med. Dosb. Mikrobiol.* 52(2): 173-183.
- Sambrook, J. , E. F. Fritsch. and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning*. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Suwarno. 2005. Identifikasi virus rabies yang diadaptasi pada kultur sel neuroblastoma dengan *indirect sandwich-ELISA* dan *direct-FAT*. *Media Kedokteran Hewan* 21(1): 43-46
- Simanjuntak, G.M., and T. Suroso. 1996. Rabies epidemiology and elimination programe in Indonesia. Meeting of Optimalization of Rabies Elimination Programe Through Regional Animal Health Information System. Jogyakarta, Oktober. 18-19
- Tordo, N., O. Poch, A. Ermine, and G. Keith. 1986. Primary structure of leader RNA and nucleoprotein gene of the rabies genome segmented homoiogy with VSV. *Nucleic Acid Res* 14(6): 2671-2683.

Handwritten text on the left margin, possibly a page number or reference.

