

TESIS

**KARAKTERISASI GEN G VIRUS RABIES STRAIN
ALAM ISOLAT MAROS SULAWESI SELATAN**



FRESHINTA JELLIA WIBISONO

**PROGRAM MAGISTER
ILMU PENYAKIT DAN KESEHATAN MASYARAKAT VETERINER
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2011**

**KARAKTERISASI GEN G VIRUS RABIES STRAIN
ALAM ISOLAT MAROS SULAWESI SELATAN**

TESIS

**Untuk Memperoleh Gelar Magister Veteriner
dalam Program Studi Ilmu Penyakit dan Kesehatan Masyarakat Veteriner
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga**

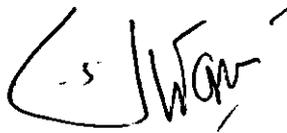
FRESHINTA JELLIA WIBISONO

**PROGRAM MAGISTER
ILMU PENYAKIT DAN KESEHATAN MASYARAKAT VETERINER
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2011**

LEMBAR PENGESAHAN

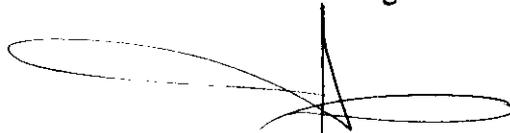
TESIS INI TELAH DIUJI
PADA TANGGAL 21 FEBRUARI 2011

Oleh
Pembimbing Ketua



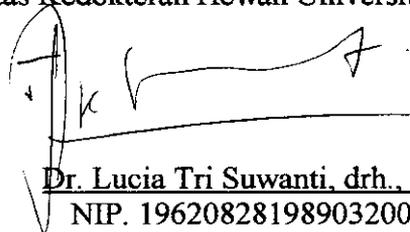
Dr. Suwarno, drh., M.Si
NIP. 196105151989031002

Pembimbing



Prof. Dr. H. Sarmanu, drh., M.S
NIP. 195204071979011001

Mengetahui,
Ketua Program Studi
Magister Ilmu Penyakit dan Kesehatan Masyarakat Veteriner
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga



Dr. Lucia Tri Suwanti, drh., MP
NIP. 196208281989032001

**Tesis ini telah diuji dan dinilai oleh panitia penguji pada Program Magister
Program Studi Penyakit dan Kesehatan Masyarakat Veteriner
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga
Pada Tanggal 21 Februari 2011**

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Prof. Dr. Setiawan Koesdarto, drh., M.Sc

Anggota :

1. Prof. Dr. Rahayu Ernawati, drh., M.Sc
2. Dr. AT. Soelih Estoepangesti, drh
3. Dr. Suwarno, drh., M.Si
4. Prof. Dr. Sarmanu, drh., M.S

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kehadirat Allah SWT yang telah memberikan segala taufik dan hidayahNya, karena hanya dengan limpahan rahmat, berkah dan karuniaNya, penulis dapat menyelesaikan tulisan ini yang merupakan salah satu syarat memperoleh gelar Magister Veteriner pada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Dalam penulisan Tesis yang berjudul “KARAKTERISASI GEN G VIRUS RABIES STRAIN ALAM ISOLAT MAROS SULAWESI SELATAN” penulis mencoba untuk mengetahui karakterisasi dari gen G virus Rabies yang diisolasi dari otak anjing sehingga nantinya bisa dijadikan informasi untuk pengembangan sifat virus rabies.

Keberhasilan dalam penulisan ini tidak lepas dari bantuan dan kerjasama berbagai pihak. Dengan kerendahan hati penulis pada kesempatan ini ingin menyampaikan terima kasih kepada Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi melalui Proyek I'M HERE 2010, Direktur Proyek I'M HERE 2010 Universitas Airlangga, Koordinator Proyek I'M HERE 2010 Universitas Airlangga, Dr. Suwarno, drh., M.Si selaku PIC Aktivitas I Proyek I'M HERE 2010, dan pemilik hibah proyek penelitian Jola Rahmahani, drh., M.Kes yang telah mengizinkan penulis untuk bergabung dalam penelitian ini.

Tesis ini dapat diselesaikan tidak lepas dari dorongan, bimbingan, arahan, saran dan koreksi dari Dosen Pembimbing, oleh karena itu dengan segala kerendahan hati, perkenankanlah penulis menghaturkan terima kasih yang tulus serta penghargaan yang setinggi-tingginya kepada yang terhormat:

Dr. Suwarno, drh., M.Si atas kesedian beliau sebagai Dosen Pembimbing pertama, yang dengan penuh perhatian, pengertian dan kesabaran yang tinggi telah memberikan dukungan mental, bantuan, bimbingan dan masukan penting dari bidang keahliannya yang sangat bermanfaat bagi peningkatan mutu dan terselesainya penyusunan tesis ini, saya mengucapkan terima kasih sedalam-dalamnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya.

Prof. Dr. Sarmanu, drh., M.S sebagai Dosen Pembimbing kedua, yang dengan penuh perhatian dan kesabaran memberikan dorongan, bantuan serta masukan penting dari bidang keahliannya yang sangat bermanfaat bagi peningkatan mutu tesis ini, saya mengucapkan terima kasih yang sedalam-dalamnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya.

Dengan selesainya tesis ini, perkenankanlah penulis juga mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Prof. Hj. Romziah Sidik, drh., Ph.D, atas kesempatan mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Dr. Lucia Tri Suwanti, drh., MP selaku Ketua Program studi Magister Ilmu Penyakit dan Kesehatan Masyarakat Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga yang telah membantu dalam proses pendidikan, pelaksanaan ujian proposal dan tesis.

Prof. Dr. Setiawan Koesdarto, drh., M.Sc yang telah memberikan ilmu dasar, ilmu terapan dan wawasan keilmuan yang sangat bermanfaat serta kritik, saran dan perbaikan pada materi proposal penelitian untuk penulisan tesis saya. Saya

mengucapkan terima kasih yang sedalam-dalamnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya.

Prof. Dr. Rahayu Ernawati, drh., M.Sc selaku Dosen Penguji yang telah memberikan ilmu dasar, ilmu terapan dan wawasan keilmuan yang sangat bermanfaat serta kritik, saran dan perbaikan pada materi proposal penelitian untuk penulisan tesis saya. Saya mengucapkan terima kasih yang sedalam-dalamnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya.

Dr. AT. Soelih Estoepangesti, drh, selaku Dosen Penguji yang telah memberikan ilmu dasar, ilmu terapan dan wawasan keilmuan yang sangat bermanfaat serta kritik, saran dan perbaikan pada materi proposal penelitian untuk penulisan tesis saya. Saya mengucapkan terima kasih yang sedalam-dalamnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya.

Terima kasih kepada semua pihak yang telah mendukung proses pendidikan dan penelitian untuk penulisan tesis ini. Penulisan tesis ini tidak mungkin selesai tanpa dukungan dari semua staf pengajar program Magister Ilmu Penyakit dan Kesehatan Masyarakat Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga serta semua dosen dan staf *ex lab* Virologi Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Seluruh rekan pada Program Magister Ilmu Penyakit dan Kesehatan Masyarakat Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Vaiga Miriami, drh., Amira Baihani, drh., Dewi Nugraheni drh., Krisna Murti drh. serta rekan-rekan S2 Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Suryo Kuncorojaksi, drh, Aulia Firmawati, drh, Asih Kurnia Sri Hartini, drh, Maulana

Hanief Rahman, drh, Retno Wulan Handayani, drh dan Lita Rahma Yustinasari, dan yang lainnya yang tidak bisa disebutkan satu per satu, yang telah bekerja sama dan saling memberi motivasi untuk menyelesaikan pendidikan ini.

Teman-temanku Arynta Widyaningrum, drh., Linda Kumiadewi, drh., Putri Novita, drh., Nurina Titisari, drh., Aprilia Hadi, drh., dan Dwi N.C., drh., atas persahabatannya yang indah dan segala dukungannya selama ini.

Akhirnya dalam kesempatan ini penulis sampaikan rasa hormat dan kasih sayang saya kepada:

Orang tua saya, Ayahanda Bagus Brellian Wibisono, SE dan Ibunda Endang Insetyawati, S.Pd, yang telah mengasuh, mendidik, mengayomi, menafkahi dan memberikan tauladan yang baik serta atas segala do'a, limpahan kasih sayang, dukungan dan nasihat-nasihatnya, saya sampaikan penghargaan yang tak terhingga.

Mertua saya Bapak M. Djajadi, SH (alm) dan Ibunda Budiarti yang telah memberikan do'a, dukungan dan nasihat-nasihatnya, saya sampaikan penghargaan yang tak terhingga.

Suami saya tercinta, Hendra Wijayanto, SE yang senantiasa memberikan pengertian dan perhatian yang sangat luar biasa. Terima kasih atas cinta kasih yang dengan sabar memberikan motivasi selama ini, dan untuk buah hati yang sedang didalam kandunganku terima kasih karena sudah menjadi kuat selama proses penyelesaian tesis ini.

Saudara saya Mas Freegied Satriya Wibisono, S.Pi, Mbak Zahrul Imaniah A.md dan Dik Freshindy Marissa Wibisono terima kasih atas do'a dan dukungannya serta yang selalu saling membantu dalam menjalani kehidupan dan pendidikan.

Keluarga besar Darmo Suwito, Keluarga Besar M. Djajadi dan Keluarga Besar Djais Nawawi, terima kasih atas kehangatan kasih yang hingga saat ini mengalir deras dalam kehidupan saya dan seluruh saudara sepupu yang tidak bisa disebutkan satu persatu, terima kasih atas bantuan doa dan tenaga dalam menyelesaikan tesis ini.

Terima kasih saya sampaikan kepada semua pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu per satu, yang telah memotivasi, mendukung dan membantu hingga tesis ini dapat disusun.

Semoga hasil penelitian ini bermanfaat bagi umat manusia pada umumnya dan ilmu kedokteran hewan pada khususnya dan dapat bermanfaat bagi perkembangan serta peningkatan kualitas peternakan di Indonesia. Penulis menyadari bahwa makalah ini jauh dari sempurna, untuk itu penulis mengharap kritik dan saran dari pembimbing/penguji sebagai upaya penyempurnaan makalah ini.

Surabaya, Februari 2011

Penulis

RINGKASAN**Karakterisasi gen G virus rabies strain alam isolat Maros Sulawesi Selatan**

Penyakit rabies merupakan salah satu jenis penyakit zoonosis yang menyerang susunan syaraf pusat. Rabies masih dianggap penyakit penting di Indonesia karena bersifat fatal dan dapat menimbulkan kematian serta berdampak psikologis bagi orang yang terpapar. Penyakit rabies tersebar luas di berbagai belahan dunia, termasuk Indonesia. Menurut data *World Health Organization* (WHO) rabies terjadi di 92 negara dan bahkan bersifat endemik di 72 negara. Penyakit rabies ini sangat penting adalah kenyataan bahwa selain bersifat fatal, penyakit ini penyebarannya di Indonesia makin lama cenderung meluas karena ada pulau yang sebelumnya bebas menjadi tertular (Soejoedono, 2005).

Setelah beberapa tahun berlalu sejak awal ditemukannya wabah rabies di Indonesia, telah cukup banyak penelitian penelitian yang dilakukan untuk mengkaji dan mengamati perkembangan virus ini baik di dalam negeri maupun diluar negeri. Masih sedikitnya penelitian yang bersifat berkelanjutan didalam pengamatan perkembangan genomik dari gen G virus rabies ini secara khusus. Penelitian ini memang diarahkan untuk dapat memberikan sedikit tambahan informasi tentang perkembangan genetika dan beberapa hal yang berkaitan dengan gen G virus rabies.

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah otak anjing yang berasal dari Maros, Sulawesi Selatan. Kontrol negatif berasal dari otak anjing normal dan kontrol positif berasal dari isolat positif rabies. Tahap pertama yang dilakukan dalam penelitian ini adalah isolasi RNA total dari organ otak anjing dengan cara ekstraksi

menggunakan Trizol untuk mendapatkan RNA total virus rabies. Tahap kedua adalah amplifikasi DNA virus. Hasil isolasi diperoleh RNA total untuk selanjutnya disintesis menjadi cDNA menggunakan metode RT-PCR, kemudian cDNA hasil RT-PCR di amplifikasi dengan metode PCR menjadi DNA yang telah dilipatgandakan jumlahnya. Tahap ini menggunakan primer spesifik RG-3F dan RG-AR untuk mendeteksi dan memperoleh gen G. Tahap ketiga adalah sampel hasil PCR disekuensing sehingga dapat diketahui sekuen urutan nukleotida dari gen G virus rabies.

Hasil penelitian ini yaitu setelah diamplifikasi dengan menggunakan primer tertentu terhadap fragmen gen G virus rabies memiliki panjang 210 bp. Berdasarkan tingkat homologi memiliki kesamaan sekuen 93 % dengan isolat 03003INDO asal Indonesia tahun 2003, dan memiliki tingkat homologi sekuen 90,9 % dengan isolat Maros, Sulawesi Selatan tahun 2004.

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat ditarik kesimpulan bahwa gambaran *amplicon* (produk PCR) terhadap fragmen gen G virus rabies isolat Maros Sulawesi Selatan dengan menggunakan primer tertentu memiliki panjang 210 bp. Terdapat perbedaan sekuen nukleotida fragmen gen G virus rabies isolat Maros Sulawesi Selatan, dibandingkan dengan virus rabies isolat Indonesia tahun 2003 memiliki tingkat homologi 93 % serta jika dibandingkan dengan virus rabies isolat Maros Sulawesi Selatan tahun 2004 memiliki tingkat homologi 90,9 %.

SUMMARY

The characterization of rabies virus G gene Natural Strain Isolate Maros, South Sulawesi.

Rabies is a kind of zoonosis disease which attacks central nervous system. Rabies is still considered as a common disease in Indonesia since it is fatal and deadly, and psychologically affects the infectious people. Rabies spreads throughout the world, including Indonesia. Based on the data from World Health Organization (WHO), rabies has contaminated 92 countries, and even it is endemic in 72 countries. This disease is serious because not only it is fatal but also the spread tends to expand, from an untainted isle to contaminated one.

A few years after the finding of rabies occurrence in Indonesia, many researches have been conducted to study and observe the virus growth either inside or outside the country. Not many continuing researches are exclusively done in the field of the observation on the genomic growth from G gene. This research is expected to give a piece of information about the genetic development and those related to the G gene of rabies virus.

In this research, the sample used is the brain of dog from Maros, South Sulawesi. The negative control from the brain of normal dog and the positive control from the positive isolate rabies. The first step in this research is the total RNA isolation from the organ of dog brain by extracting with Trizol to elicit the total RNA of rabies virus. The second step is the amplification of DNA virus. The result of isolation gained is the RNA total and is synthesized into cDNA using RT-PCR

method, and the cDNA from the result of RT-PCR is amplified using PCR method into DNA which has been doubled. This step uses specific primer of RG-3F and RG-AR to detect and gain G gene. The third step is the sample of PCR sequenced so that the series of nucleotides from G gene of rabies virus.

The result of this research which has been amplified by using certain primer toward the fragment of G-gene of rabies virus can reach 210 bp in length. Based on the homology level, the sequence has the similarity of 93% with isolate 03003INDO of Indonesia in 2003, and has the sequenced homology level of 90,9% with isolate in Maros, South Sulawesi in 2004.

Based on this research, it can be concluded that the description of amplicon (PCR product) toward the fragment of G gene of rabies virus isolate Maros, South Sulawesi by using certain primer which has 210 bp in length. There is a different sequence of nucleotide fragment of G gen rabies virus isolate Maros, South Sulawesi, compared to rabies virus isolate Indonesia in 2003 which had the homology level of 93%, and if it is compared to the rabies virus isolate Maros, South Sulawesi in 2004 which had the homology level of 90,9%.

ABSTRACT

The characterization of rabies virus G gene natural strain isolate Maros, South Sulawesi.

Rabies is one of zoonosis diseases which keep on terrorizing the tranquility of Indonesian people, and the disease is endemic. Rabies is caused by Rhabdovirus which reaches CNS through periphery nervous. This research is aimed at knowing how the sequenced description of nucleotide fragment of G gene rabies virus isolate Maros, South Sulawesi, and knowing whether there are any differences in the sequenced nucleotide fragment of G gene rabies virus isolate Maros, South Sulawesi. The sample was taken from the contaminated dog brain, and the screening was done after the FAT test in Maros, South Sulawesi. The total of RNA extraction was done by using Trizol and amplification fragment of G gene with primer RG-3F (nt 3984-4011) and RG-AR (nt 4165-4194) by using thermal cycler. The cDNA synthesis was done by using RT-PCR bead with denaturation at 94°C 2 minutes and was incubated at 42°C for 90 minutes. The result of RT-PCR was then done to amplify the DNA with early denaturation at 95°C for 5 minutes and followed with denaturation 94°C for 45 seconds, annealing 45°C for 45 seconds, extension 72°C for 10 minutes. The result of the research shows that primer RG-3F and RG-AR can amplify the fragment of G gene rabies virus isolate Sulawesi from the dog in South Sulawesi. Based on the result of this research, it can be concluded that the description of amplicon (PCR product) toward the fragment of G gene rabies virus isolate Maros, South Sulawesi by using certain primer which has 210 bp in length. There are sequenced nucleotide differences of fragment of G gene rabies virus isolate Maros, South Sulawesi, compared to rabies virus isolate Indonesia in 2003 which had the homology level of 93%, and if it is compared to rabies virus isolate Maros, South Sulawesi in 2004 which had the homology level of 90,9%.

Key Words : Rabies, glycoprotein gene, PCR, Sequencing

DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul Depan	i
Sampul Dalam	ii
Prasyarat Gelar	iii
Lembar Pengesahan.....	iv
Panitia Penguji	v
Ucapan Terima Kasih	vi
Ringkasan	xi
Summary	xiii
Abstract	xv
DAFTAR ISI.....	xvi
DAFTAR TABEL	xix
DAFTAR GAMBAR.....	xx
DAFTAR LAMPIRAN	xxi
DAFTAR SINGKATAN	xxii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.4 Manfaat Penelitian	6
1.4.1 Manfaat teoritis	6
1.4.2 Manfaat praktis	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Rabies	7
2.2 Virus Rabies	9
2.2.1 Struktur protein virus	10
2.2.2 Genom virus	12
2.2.3 Glikoprotein dan gen penyandi glikoprotein	13

2.3 Strain Virus	13
2.4 Patogenesis	15
2.5 Replikasi Virus Rabies	16
2.6 Epidemiologi Rabies	19
2.7 PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	22
2.7.1 Teknik dasar amplifikasi PCR	24
2.8 Komponen PCR	26
2.8.1 <i>Template</i> DNA	27
2.8.2 Primer	27
2.8.3 PCR <i>thermal cyclers</i>	28
2.9 Elektroforesis	29
2.10 Sekuensing	30
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL.....	32
3.1 Kerangka Konseptual Penelitian.....	32
BAB 4 MATERI DAN METODE PENELITIAN.....	36
4.1 Jenis Penelitian	36
4.2 Waktu dan Tempat Penelitian	36
4.3 Alat dan Bahan	36
4.3.1 Alat	36
4.3.2 Bahan	37
4.3.3 Sampel	37
4.4 Karakterisasi Gen G virus rabies dengan teknik PCR	38
4.4.1 Isolasi virus	38
4.4.2 Ekstraksi RNA virus rabies	38
4.4.3 Elektroforesis RNA total	38
4.4.4 Sintesis cDNA (RT-PCR)	39
4.4.5 Amplifikasi DNA (PCR)	39
4.4.6 Elektroforesis DNA	40
4.4.7 Pemurnian DNA dari produk PCR	40
4.4.8 Sekuensing	41

4.5 Analisis Data	42
4.6 Kerangka Operasional Penelitian	43
BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA	44
5.1 Isolasi RNA Total	44
5.2 Amplifikasi DNA Gen G Virus Rabies	44
5.3 Sekuensing Gen G virus Rabies	45
BAB 6 PEMBAHASAN	48
6.1 Isolasi RNA Total	48
6.2 Amplifikasi DNA Gen G Virus Rabies	49
6.3 Sekuensing Gen G Virus Rabies	51
BAB 7 PENUTUP	55
7.1 Kesimpulan	55
7.2 Saran	55
DAFTAR PUSTAKA	56
LAMPIRAN	60

DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
4.1	Primer yang Digunakan untuk Amplifikasi Gen G	40
5.1	Sekuens Homologi Gen G Virus Rabies	46
5.2	Persentase Homologi Gen G Virus Rabies	47

DAFTAR GAMBAR

Gambar		Halaman
2.1	Anjing penderita rabies	8
2.2	Virus rabies.....	10
2.3	Struktur virus rabies.....	11
2.4	Berat molekul struktur virus rabies	12
2.5	Struktur genom virus rabies	13
2.6	Penularan virus rabies	16
2.7	Siklus hidup dan replikasi virus rabies.....	17
2.8	Pola penyebaran penyakit rabies di Indonesia	19
2.9	Peta penyebaran rabies di Indonesia.....	20
2.10	Distribusi rabies diseluruh dunia	21
2.11	Tahap tahap pelipatgandaan DNA.....	24
2.12	PCR.....	26
2.13	Elektroforesis DNA.....	29
2.14	Proses <i>cycle</i> sekuensing	30
3.1	Kerangka konseptual penelitian	32
4.1	Kerangka operasional penelitian	43
5.1	Hasil isolasi RNA total virus rabies	44
5.2	Hasil PCR gen G rabies isolat Sulawesi	45

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran		Halaman
1	Hasil Sekuensing Sampel dengan Kode 2.507	60
2	Hasil Sekuensing Sampel dengan Kode 5.452	61

DAFTAR SINGKATAN

bp	: <i>Base pair</i>
cDNA	: <i>complementary DNA</i>
DNA	: <i>deoxynucleotide Acid</i>
dNTP	: <i>deoxynucleotide triphosphate</i>
FAT	: <i>Flourescent Antibody Technique</i>
NCBI	: <i>National Center for Biotechnology Information</i>
OIE	: <i>International Office of Epizootics</i>
PCR	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
RT-PCR	: <i>Reverse Trancriptase Polymerase Chain Reaction</i>
RNA	: <i>Ribonucleic Acid</i>
TAE	: <i>Tris acetate EDTA</i>
UV	: <i>Ultra Violet</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit rabies adalah penyakit infeksi akut pada susunan saraf pusat yang disebabkan oleh virus rabies. Rabies disebut juga penyakit anjing gila. Rabies berasal dari bahasa latin "*rabere*" yang mempunyai arti marah atau dengan kata lain mempunyai sifat pemarah, "*rabere*" juga berasal dari bahasa terdahulu yaitu bahasa Sanskrit "*rabhas*" yang bermakna kekerasan. Orang Yunani mengadopsi kata "*Lyssa*" yang juga berarti "kegilaan". Rabies merupakan simbol bagi penyakit yang menyerang anjing dan membuat anjing seperti gila (*mad Dog*) (Wilkinson, 2002).

Penyakit rabies merupakan salah satu jenis penyakit zoonosis yang menyerang susunan syaraf pusat. Pada anjing dikenal dua bentuk yaitu bentuk ganas (*Furious form*) dan bentuk tenang (*Dumb* atau *Paralytic form*). Rabies bentuk ganas ditandai dengan anjing menjadi galak, agresif, menyerang dan menggigit siapa saja dan apa saja. Hewan terserang bersuara serak atau parau, rahang bawah menggantung dan kepala terkulai serta kelumpuhan pada kaki belakang. Rabies bentuk tenang, anjing terlihat apatis, bersembunyi dan baru menggigit bila diganggu. Kematian biasanya terjadi pada 2 – 5 hari sesudah gejala klinis (Kill, 2009).

Virus rabies dapat ditemukan di dalam kelenjar air liur setelah anjing terinfeksi virus rabies selama 3 – 8 minggu. Pada umumnya gigitan serigala lebih berbahaya dari pada gigitan anjing, karena air liur karnivora liar mengandung lebih banyak *hyaluronidase*, suatu enzim yang dapat meningkatkan permeabilitas

jaringan dan virulensi virus. Air liur banyak mengandung virus terutama bila gejala klinis sudah terlihat, tetapi kadang kadang dalam beberapa hari virus sudah ada dalam air liur sebelum nampak gejala klinis (Charles *et al.*, 2001).

Penyakit ini memiliki distribusi di seluruh dunia dengan pola yang terutama terkait dengan menggigit anjing dan masih menyebabkan kematian ribuan manusia setiap tahun. Banyak negara di mana penyakit pada hewan domestik berada di bawah kontrol ketat (Alves *et al.*, 2003). Rabies masih dianggap penyakit penting di Indonesia karena bersifat fatal dan dapat menimbulkan kematian serta berdampak psikologis bagi orang yang terpapar. Penyakit rabies tersebar luas di berbagai belahan dunia, termasuk Indonesia (Soejoedono, 2005).

Menurut data *World Health Organization* (2008) kasus rabies terjadi di 92 Negara dan bahkan bersifat endemik di 72 Negara. Hal lain yang membuat penyakit rabies ini sangat penting adalah kenyataan bahwa selain bersifat fatal, penyakit ini penyebarannya di Indonesia makin lama cenderung meluas karena ada pulau yang sebelumnya bebas menjadi tertular.

Daerah tertular rabies yang semula hanya beberapa provinsi saja, telah meluas ke daerah lain yang semula bebas yaitu: Sumatera Barat, Jawa Tengah dan Jawa Timur (1953), Sumatera Utara dan Sulawesi Utara (1956), Sulawesi Selatan (1958), Sumatera Selatan (1959), Lampung (1969), Aceh (1970), Jambi dan DI Yogyakarta (1971), Bengkulu, DKI Jakarta dan Sulawesi Tengah (1972), Kalimantan Timur (1974) dan Riau (1975). Akhir akhir ini rabies masih terus menjalar ke wilayah yang sebelumnya bebas menjadi tertular yaitu Pulau Flores (1998) Pulau Ambon dan Pulau Seram (2003), Halmahera dan Morotai (2005)

Ketapang (2005) serta Pulau Buru (2006) kemudian Pulau Bali, Pulau Bengkalis dan Pulau Rupat di Provinsi Riau (2009). Saat ini provinsi yang bebas rabies Provinsi Kepulauan Riau, Bangka Belitung, Nusa Tenggara Barat, Papua dan Papua Barat (Soejoedono, 2005).

Virus rabies yang termasuk virus ss-RNA dari golongan *Rhabdoviridae*, genus *Lyssavirus* bentuknya menyerupai peluru. Virus rabies memiliki ukuran 75 x 180 nm dengan panjang genom 12.000 bp. Protein penyusun struktur pada virus rabies pada utamanya disusun oleh 5 protein, yaitu nukleoprotein (N), phosphoprotein (P), matrix protein (M), glikoprotein (G) dan polymerase (L). Semua virus family *Rhabdoviridae* mempunyai dua komponen utama yaitu inti dari rantai heliks (*ribonucleoprotein core* (RNP)), dan amplop yang menutupinya. Di dalam RNP, genom RNA diselimuti oleh nukleoprotein (N) sedangkan untuk protein penyusun struktur virus lain seperti, phosphoprotein (P) and polymerase (L) merupakan salah satu komponen penyusun yang berhubungan dengan RNP. glikoprotein (G) merupakan protein penyusun permukaan virus yang berbentuk "spike" atau duri (berjumlah kurang lebih 400 duri) dari virus ini sedangkan protein M bertanggung jawab sebagai struktur penyusun amplop dan membungkus RNP. Pada bagian tengah struktur tersebut terdapat genom dari virus yang berupa protein RNA yang berbentuk helix yang tunggal, tidak bersegmen dan mempunyai polaritas yang negatif (Wunner, 2002).

Genom virus rabies memiliki panjang sekitar 12.000 nukleotida dan menyandi 5 gen yakni nukleoprotein (N), phosphoprotein (P), matrix protein (M), glikoprotein (G) dan viral RNA polymerase (L). Dari kelima gen penyandi protein tersebut, gen G merupakan antigen yang dapat merangsang tubuh untuk

membentuk antibodi yang dapat menetralkan virus dan melindungi hewan terhadap virus rabies (Modrow dan Falke, 1997). Penyusunan protein dan RNA genom menentukan struktur dari virus rabies (CDC, 2010).

Menurut Fenner *et al.*, (1993) bahwa virus memiliki keragaman genetik yang sangat besar. Keragaman genetik terjadi melalui seleksi alam yang bekerja pada genom virus yang berubah secara berkelanjutan sebagai akibat mutasi, rekombinasi atau penggabungan kembali. Pada kondisi lain, mutasi yang mempengaruhi epitop dari protein permukaan virion sangat sering terjadi jika virus bereplikasi dengan adanya antibodi dalam tubuh inang.

Perbedaan nukleotida dapat terjadi karena pengaruh waktu dan daerah geografik. Penggunaan metode PCR berdasarkan gen G telah dilakukan oleh banyak peneliti terutama untuk tujuan diagnostik karena merupakan salah satu gen yang jarang terjadi mutasi. Pada tahun 2003, Bourhy *et al.*, berhasil melakukan amplifikasi gen G virus rabies yang berasal dari otak anjing isolat 03003INDO asal Indonesia, dengan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (Bourhy *et al.*, 2008).

Melalui teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan menggunakan primer spesifik gen, panjang *Deoxyribonucleic Acid* (DNA) genom gen G virus rabies dapat diketahui. Produk PCR berupa DNA virus dapat disekuensing, sehingga sekuens genom dapat diketahui. Genom virus rabies dapat diamplifikasi dengan PCR, karena teknik ini mampu melipatgandakan DNA sesuai panjang yang dikehendaki, melalui penggunaan pasangan primer (*forward – reverse*) spesifik. Genom virus rabies merupakan *messenger Ribonucleic Acid* (mRNA) sehingga dengan bantuan enzim *reverse transkriptase* mRNA akan diubah

menjadi *complementary* (c) DNA pada *reverse transkriptase* (RT) – PCR dan dilanjutkan dengan amplifikasi DNA menggunakan enzim polimerase (Suwarno, 2005).

Berdasarkan latar belakang inilah yang mendorong peneliti melakukan penelitian untuk mendeteksi fragmen gen G virus rabies di Maros, Sulawesi Selatan dengan primer RG-3F dan RG-AR. Masih sedikit nya penelitian yang bersifat berkelanjutan di dalam pengamatan perkembangan genomik dari gen G virus rabies ini secara khusus, oleh karena itu penelitian ini diarahkan untuk dapat memberikan sedikit tambahan informasi tentang perkembangan genetika dan beberapa hal yang berkaitan dengan gen G virus rabies.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka yang menjadi permasalahan adalah :

1. Bagaimana gambaran *amplicon* (produk PCR) terhadap fragmen gen G virus rabies isolat Maros, Sulawesi Selatan dengan menggunakan primer tertentu?
2. Apakah terdapat perbedaan sekuen nukleotida fragmen gen G virus rabies isolat Maros Sulawesi Selatan dibandingkan dengan isolat sebelumnya?

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui gambaran *amplicon* (produk PCR) terhadap fragmen gen G virus rabies isolat Maros Sulawesi Selatan dengan menggunakan primer tertentu.
2. Mengetahui apakah terdapat perbedaan sekuen nukleotida fragmen gen G virus rabies isolat Maros Sulawesi Selatan dibandingkan dengan isolat sebelumnya.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat teoritis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan masukan dalam bidang kedokteran hewan tentang karakter fragmen gen G virus rabies berdasarkan sekuensing nukleotida dan dapat memberikan manfaat bagi pengembangan vaksin virus rabies dan antigen diagnostik di Indonesia.

1.4.2. Manfaat praktis

Untuk pengembangan kajian penelitian dalam rangka pemberantasan penyakit rabies, khususnya sebagai dasar penggunaan protein glikoprotein sebagai kit diagnostik virus rabies.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

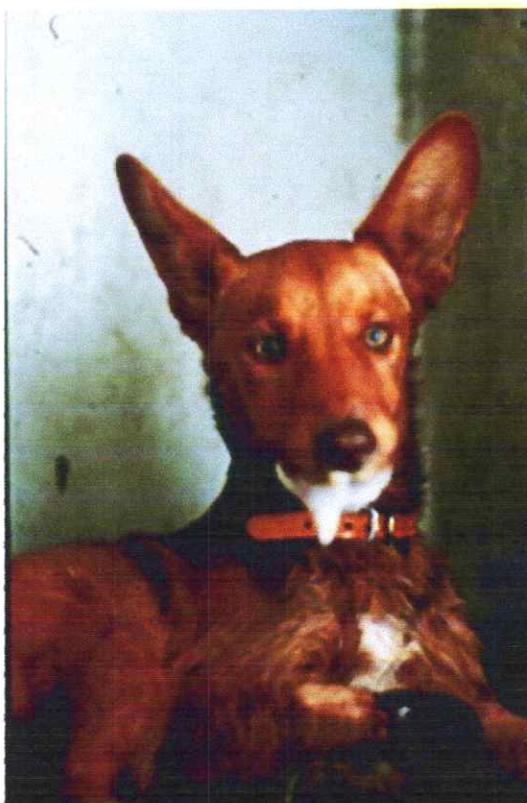
2.1 Rabies

Rabies atau *hydrophobia*, *la rage* (Perancis), *la rabbia* (Italia), *la rabia* (Spanyol), *die tollwut* (Jerman) atau di Indonesia dikenal dengan nama penyakit anjing gila, adalah penyakit infeksi akut pada susunan saraf pusat yang disebabkan oleh virus rabies, dan ditularkan melalui gigitan hewan penular rabies terutama anjing, kucing, dan kera (Ronohardjo dan Hastiono, 1990).

Soeharsono (2002) menjelaskan bahwa penyakit yang dapat menular dari hewan kepada manusia untuk pertama kali nya diberi istilah zoonosis oleh Virchow. Kata “rabies” berasal dari bahasa sansekerta yang berarti “melakukan kekerasan” bahasa Yunani menyebut penyakit ini “*lyssa*” atau “*lytta*” yang berarti “kegilaan” (Marr, 1999). Istilah rabies dikenal sejak zaman Babylonia kira-kira abad ke 23 Sebelum Masehi (SM) dan Democritus menulis secara jelas binatang menderita rabies pada tahun 500 SM. Tulisan adanya infeksi rabies pada manusia dengan gejala *hydrophobia* dilaporkan pada abad pertama oleh Celsus dan gejala klinis rabies baru ditulis pada abad ke-16 oleh Fracastoro, seorang dokter Italia. Pada tahun 1880 Louis Pastuer mendemostrasikan adanya infeksi pada susunan saraf pusat. Pengobatan dilakukan dengan cara kauterisasi sampai ditemukannya vaksin oleh Louis Pastuer pada tahun 1885. Pertumbuhan virus rabies pada jaringan ditemukan pada tahun 1930 dan baru dapat diperlihatkan dengan mikroskop elektron pada tahun 1960 (Adjid dkk, 2005).

Secara umum, penularan rabies terjadi diakibatkan infeksi karena gigitan binatang, namun rabies juga dapat menular melalui beberapa cara antara lain

melalui cakaran hewan, sekresi yang mengkontaminasi membrane mukosa, virus yang masuk melalui rongga pernapasan, dan transplantasi kornea. Virus rabies menyerang jaringan saraf dan menyebar hingga system saraf pusat dan dapat menyebabkan *encephalomyelitis* (radang yang mengenai otak dan medulla spinalis). Hampir selalu terjadi kematian 2 – 3 hari sesudahnya sebagai akibat gagal nafas atau henti jantung ataupun paralisis generalisata. Tidak ada terapi untuk penderita yang sudah menunjukkan gejala rabies, penanganan hanya berupa tindakan suportif dalam penanganan gagal jantung dan gagal nafas. Walaupun tindakan perawatan intensif umumnya dilakukan, hasilnya tidak menggembirakan. perawatan intensif hanyalah metode untuk memperpanjang dan bila mungkin menyelamatkan hidup pasien dengan mencegah komplikasi respirasi dan kardiovaskuler yang sering terjadi (WHO, 2008).



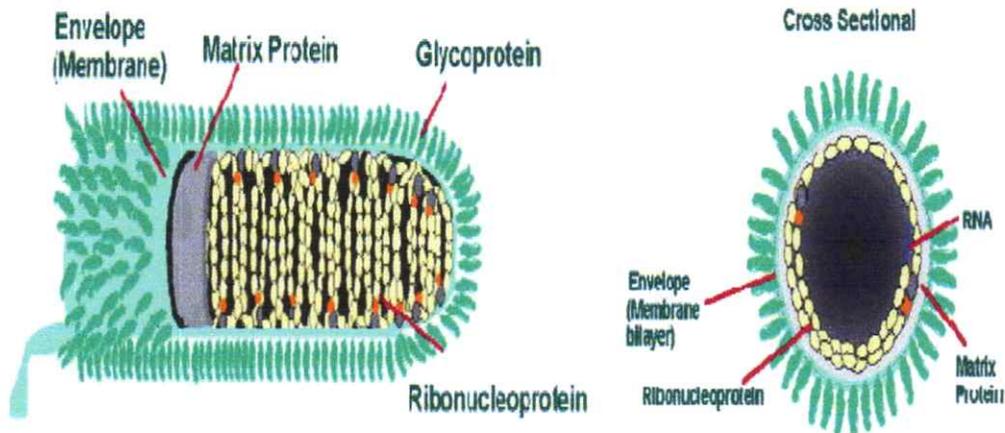
Gambar 2.1. Anjing penderita rabies (Kill, 2009).

2.2 Virus Rabies

Rhabdovirus berasal dari bahasa Yunani yaitu *Rhabdo* yang berarti berbentuk batang, jadi *Rhabdovirus* merupakan virus yang mempunyai bentuk seperti batang. Rabies merupakan infeksi akut dari susunan saraf pusat yang berakibat fatal. Virus ditularkan ke manusia melalui gigitan dan kadang melalui jilatan (air liur) hewan yang terinfeksi rabies. Hewan yang dapat menularkan penyakit rabies antara lain anjing, kucing, kerbau, dan kelelawar (Adjid dkk., 2005).

Klasifikasi dari virus rabies ini adalah Order : Mononegavirales, Famili : Rhabdoviridae, Genom : Lyssavirus dan Spesies : *Rhabdovirus* (virus rabies). Virus ini adalah virus neurotropik, yang hanya dapat berkembang biak di dalam jaringan saraf. Ukurannya antara 100 – 150 milimikron (Manning *et al.*, 2008).

Virus rabies stabil antara pH 3 dan pH 11 dan dapat bertahan hidup untuk beberapa tahun pada suhu -70°C atau bila dalam keadaan beku kering dan disimpan pada suhu $0^{\circ}\text{C} - 4^{\circ}\text{C}$. Virus rabies dapat terinaktivasi secara cepat oleh pengeringan, terpapar langsung oleh sinar UV, *X-Ray* dan sinar matahari, tripsin, b-propiolaktone, eter serta deterjen (WHO, 2002). Masa Inkubasi pada hewan sekitar 3 – 6 minggu setelah gigitan hewan rabies, sedangkan pada manusia tergantung dari parah tidaknya luka gigitan, jauh tidaknya luka dengan susunan saraf pusat, banyaknya saraf pada luka, jumlah virus yang masuk, serta jumlah luka gigitan virus rabies dapat menginfeksi semua hewan berdarah panas dan pada hampir semua kejadian infeksi akan berakhir dengan kematian (Fenner *et al.*, 1993).

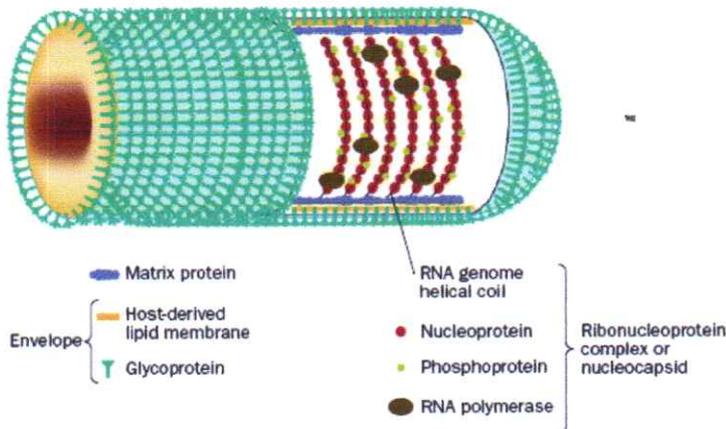


Gambar 2.2 Virus rabies (CDC, 2009).

2.2.1. Struktur protein virus

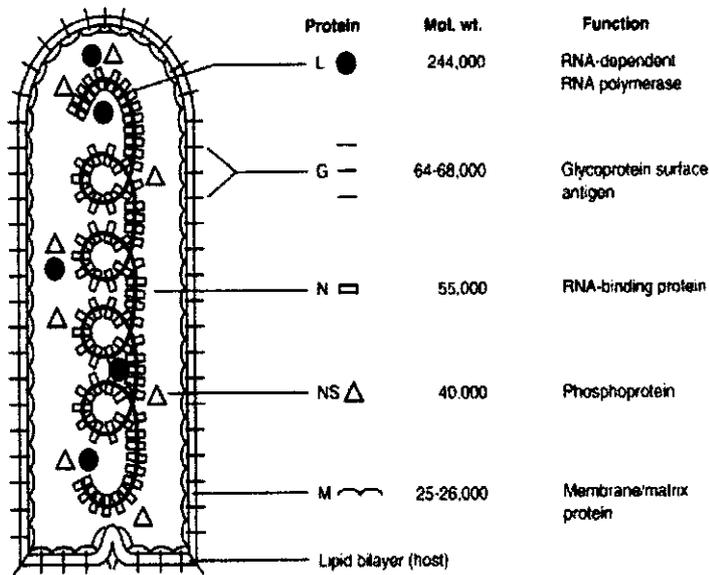
Virus rabies merupakan salah satu virus yang mempunyai sifat morfologik dan biokimiawi yang lazim dengan virus somatis vesikuler sapi dan beberapa virus hewan, tanaman, dan serangga. Virus rabies dan jenis virus lainnya terdiri dari dua komponen dasar, yaitu sebuah inti dari asam nukleat yang disebut genom dan yang mengelilingi protein yang disebut kapsid. Rhabdovirus merupakan partikel berbentuk batang atau peluru berdiameter 75 nm x panjang 180 nm. Partikel dikelilingi oleh selubung selaput dengan duri yang menonjol yang panjangnya 10 nm, dan terdiri dari glikoprotein tunggal. Genom beruntai tunggal, RNA *negative-sense* (12 kb; BM 4,6 x 10⁶) yang berbentuk linear dan tidak bersegmen. Sebuah virus rabies yang lengkap diluar inang (*virion*) mengandung polimerase RNA. Komposisi dari virus rabies ini adalah RNA sebanyak 4%, protein sebanyak 67%, lipid sebanyak 26%, dan karbohidrat sebanyak 3%. Rhabdovirus melakukan replikasi dalam sitoplasma dan virion bertunas dari selaput plasma. Karakter yang menonjol dari Rhabdovirus ini merupakan virus yang bersusun luas dengan rentang inang yang lebar. Virus ini merupakan jenis

virus yang mematikan. Kapsid melindungi genom dan juga memberikan bentuk pada virus (Fenner *et al.*, 1993).



Gambar 2.3 Struktur virus rabies (CDC, 2009).

Virus rabies yang termasuk virus ss-RNA dari golongan *Rhabdoviridae*, memiliki ukuran 75 x 180 nm dengan panjang genom 12.000 bp. Struktur protein tersusun dari 5 komponen, yakni glikoprotein (G) dengan berat molekul (BM) 62-67 kDa, nukleoprotein (N) 54 kDa, transkriptase (L) 190 kDa, protein matrik (M) 24 kDa, dan protein non-struktural (NS) 37 kDa. Protein L, N, dan NS terikat secara *non-kovalen* pada *virion* RNA, dan menghasilkan kompleks nukleokapsid yang berbentuk gulungan heliks dalam virion. Nukleokapsid dikelilingi amplop lipoprotein yang terdiri dari protein M dan pada permukaan virion terdapat protein-G (Fenner *et al.*, 1993).



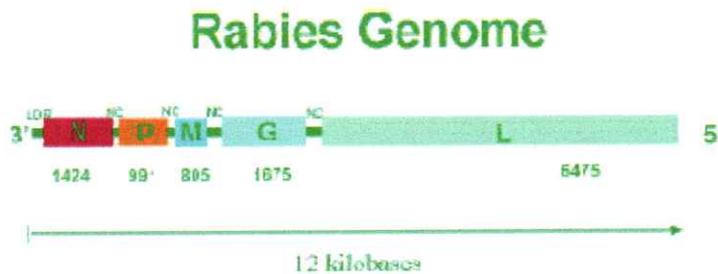
Gambar 2.4. Berat molekul struktur virus rabies (Manning *et al.*, 2008)

2.2.2. Genom virus

Rhabdovirus memiliki 2 struktur utama: sebuah *helical ribonucleoprotein core* (RNP) dan sebuah *envelope* yang mengelilinginya. RNP (*helical ribonucleoprotein core*), genom RNA secara kuat terbungkus oleh nukleoprotein. Protein viral lainnya, yaitu phosphoprotein dan protein besar (L-protein atau polymerase) yang berhubungan dengan RNP. Glikoprotein membentuk ± 400 *spike* trimerik yang menyusun permukaan virus. Protein M berhubungan dengan *envelope* dan RNP menjadi protein sentral (Adjib dkk., 2005). Struktur genom virus rabies dapat dilihat pada gambar 2.5.

Virion (partikel virus infeksi) dari virus paling sederhana terdiri dari molekul asam nukleat tunggal yang terbungkus oleh selubung protein yang disebut kapsid. Kapsid pembungkus inti terdiri dari satu atau lebih protein yang menyelubungi asam nukleat virus, kapsid dan asam nukleat selanjutnya membentuk nukleokapsid. Pada beberapa virus, kapsid dibungkus oleh amplop lipoprotein. Kapsid tersusun oleh sejumlah tertentu unit morfologi yang disebut

kapsomer. Komposisi kimia virion Rhabdoviridae terdiri 1 jenis asam nukleat yaitu RNA untai tunggal, (Fenner *et al.*, 1993).



Gambar 2.5. Struktur genom virus rabies (CDC, 2003).

2.2.3. Glikoprotein dan gen penyandi glikoprotein

Menurut Arai *et al*, seperti yang dikutip oleh Suwarno (2005) glikoprotein berperan dalam hal bertautnya (*attachment*) virus ke permukaan sel yang “*susceptible*”, juga mengandung antigen yang membentuk “*serum neutralizing antibody*” yang memberikan proteksi terhadap virus rabies. Gen G penyandi glikoprotein, yang tersusun atas nukleotida. glikoprotein yang merupakan protein eksternal, mempunyai peran penting dalam patogenitas dan antigenitas virus, serta mampu menimbulkan antibodi netralisasi yang bersifat protektif, sehingga bisa di ajukan acuan pada penentuan kandindat vaksin. Gen G tersusun atas sekitar 1574 bp nukleotida, terletak pada urutan ke 3318 – 4892.

2.3 Strain Virus

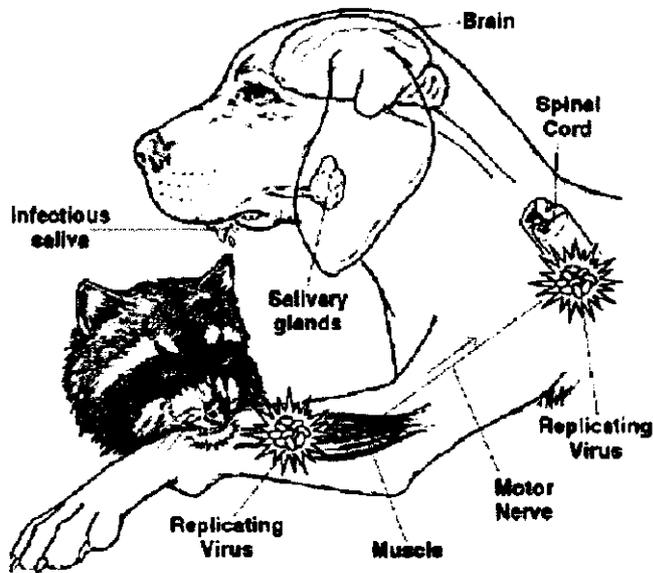
Menurut Maar (1999), di alam terdapat dua jenis virus rabies yaitu, strain alam (*Street Virus*) dan strain fiks (*Fixed Virus*) yang dikenal sebagai strain laboratorium karena telah diadaptasi melalui pasase serial di laboratorium. Virus yang diisolasi dari alam penyebab rabies biasanya disebut *street virus* sedangkan virus rabies yang disuntikkan terus menerus pada hewan coba seperti pada kelinci,

di mana sampai menghasilkan masa inkubasi tetap disebut *fixed virus*. *Street virus* pada kelinci biasanya memiliki masa inkubasi 15 sampai 21 hari. Fiksasi muncul melalui proses pasase yang menjadikan masa inkubasi menjadi secara progresif lebih pendek hingga menjadi "*fixed*" pada 6 – 8 hari. Strain dari *street virus* bervariasi dari kemampuannya menjadi *fixed*. Beberapa virus menjadi *fixed* dalam 20 pasase sementara yang lain harus melewati hingga 50 pasase atau lebih dan bahkan tidak dapat menjadi *fixed* sama sekali. Biasanya semakin virulen *street strain* maka cenderung menjadi *fixed* pada beberapa pasase saja.

Fixed virus dimodifikasi dengan cara lain daripada memendekkan masa inkubasinya. *Fixed virus* bereplikasi secara cepat dan dalam jumlah lebih besar pada virus yang ditemukan di jaringan otak. *Fixed virus* juga kehilangan sebagian besar kemampuannya untuk membentuk *Negri bodies* dan menjadi kurang virulen pada host selain dimana virus tersebut telah menjadi *fixed*. Sekarang telah diketahui bahwa isolat yang terdapat dalam tubuh kelelawar ternyata berbeda dengan *strain* yang telah ada, sementara *strain* di dalam tubuh rakun dan hewan lain di Amerika Timur adalah sama, kecuali yang berasal dari virus rubah. Penemuan ini mempermudah pengkajian epidemiologi dari rabies, dan sangat penting untuk penyelenggaraan vaksinasi. Terdapat perbedaan virulensi virus, antara virus alam dan virus *fixed*. Virus alam lebih virulen dari pada virus *fixed*. 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 (Jackson *et al.*, 2000).

2.4 Patogenesis

Setelah virus rabies masuk melalui luka gigitan, maka selama 2 minggu virus tetap tinggal pada tempat masuk dan didekatnya, kemudian bergerak mencapai ujung-ujung serabut saraf posterior tanpa menunjukkan perubahan fungsinya. Masa inkubasi bervariasi yaitu berkisar antara 2 minggu sampai 2 tahun, tetapi pada umumnya 3 – 8 minggu berhubungan dengan jarak yang harus ditempuh oleh virus sebelum mencapai otak. Sampai di otak virus kemudian memperbanyak diri dan menyebar luas dalam semua bagian neuron, terutama mempunyai predileksi khusus terhadap sel-sel sistem limbik, hipotalamus dan batang otak. Masa inkubasi pada anjing dan kucing: 2 minggu ; Pada manusia : 2-3 minggu. Lama masa inkubasi tergantung pada 1) Jumlah virus yang masuk melalui luka. 2) Dalam atau tidaknya luka. 3) Jumlah luka gigitan (tunggal/banyak) dan 4) Jarak luka dengan susunan syaraf pusat. Virus rabies masuk ke dalam tubuh melalui luka gigitan atau luka yang terkena air liur hewan penderita rabies. Amplop virus akan berfusi dengan membran plasma dan ribonukleoprotein memasuki sitoplasma. Genom virus bergerak secara sentripetal dalam sitoplasma dari akson sistem saraf tepi sampai mencapai sistem saraf pusat. Virus dapat bereplikasi di tempat gigitan pada otot, lalu memasuki ujung syaraf tepi (Fenner *et al.*, 1993).

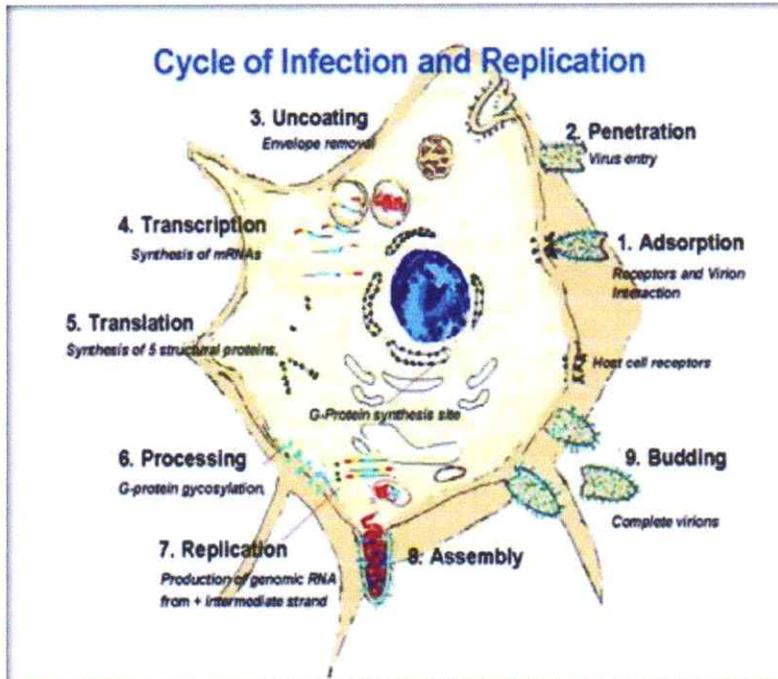


Gambar 2.6 Penularan virus rabies (WHO., 2006).

2.5 Replikasi Virus Rabies

Pertama-tama, virus rabies ini akan melekat atau menempel pada dinding sel inang. Virus rabies melekat pada sel melalui duri glikoproteinnya, reseptor asetilkolin nikotinat dapat bertindak sebagai reseptor seluler untuk virus rabies (secara endositosis virus dimasukkan ke dalam sel inang). Tahap penetrasi, virus telah masuk ke dalam sel inang dan melakukan penyatuan diri dengan sel inang yang ia tempati kemudian terjadi transkripsi dan translasi. Genom RNA untai tunggal direkam oleh polymerase RNA terkait, virion menjadi lima spesies mRNA. mRNAs monosistronik ini menyandi untuk lima protein virion. Genom ini merupakan cetakan untuk perantara replikatif yang menimbulkan pembentukan RNA keturunan. RNA genomik berhubungan dengan transkriptase virus, fosfoprotein dan nukleoprotein. Setelah enkapsidasi, partikel berbentuk peluru mendapatkan selubung melalui pertunasan yang melewati selaput plasma. Protein matriks virus membentuk lapisan pada sisi dalam selubung, sementara

glikoprotein virus berada pada selaput luar dan membentuk duri. Setelah bagian-bagian sel lengkap, sel virus tadi menyatukan diri kembali dan membentuk virus yang baru. Setelah itu virus keluar dari sel inang dan menginfeksi sel inang yang lainnya. Keseluruhan proses dalam siklus hidup virus rabies ini terjadi dalam sitoplasma (Hanlon *et al.*, 2002).



Gambar 2.7 Siklus hidup dan replikasi virus rabies (Guyatt *et al.*, 2003).

Berikut adalah siklus hidup dari virus rabies : 1: Adsorpsi (*receptors* dan virion berinteraksi). 2: Penetrasi (masuknya virus ke dalam sel inang). 3: Uncoating (pengilangan bagian amplop virus). 4. Transkripsi (sintesis mRNAs). 5. Translasi (sintesis dari struktur protein). 6. Prosesing (glikoprotein *glycosylation*). 7. Replikasi (produksi genom RNA dari *intermediate strand*). 8. *Assembly*. 9. *Budding* (keluar virus complete dari sel inang) (Guyatt *et al.*, 2003).

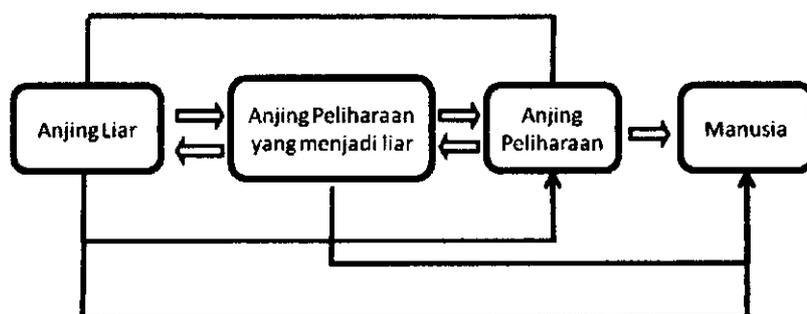
Virus rabies membelah diri dalam otot atau jaringan ikat pada tempat inokulasi dan kemudian memasuki saraf tepi pada sambungan neuromuskuler dan menyebar sampai ke susunan saraf pusat. Virus membelah diri disini dan

kemudian menyebar melalui saraf tepi ke kelenjar ludah dan jaringan lain. Kepekaan terhadap infeksi dan masa inkubasinya bergantung pada latar belakang genetik inang, strain virus yang terlibat, konsentrasi reseptor virus pada sel inang, jumlah inokulum, beratnya laserasi, dan jarak yang harus ditempuh virus untuk bergerak dari titik masuk ke susunan saraf pusat. Terdapat angka serangan yang lebih tinggi dan masa inkubasi yang lebih pendek pada orang yang digigit pada wajah atau kepala (Morimoto *et al.*, 1993).

Virus rabies menghasilkan inklusi sitoplasma eosinofilik spesifik, badan Negri, dalam sel saraf yang terinfeksi. Adanya inklusi seperti ini bersifat patognomonik rabies tetapi tidak terlihat pada sedikitnya 20% kasus. Virus rabies memperbanyak diri di luar susunan saraf pusat dan dapat menimbulkan infiltrat dan nekrosis seluler dalam kelenjar lain, dalam kornea, dan di tempat lain Virus rabies dapat menginfeksi semua hewan berdarah panas dan hampir semua kejadian infeksiya akan berakhir dengan kematian. Rabies sapi penting di Amerika Tengah dan Selatan, di mana lebih dari 1 juta sapi diperkirakan mati tiap tahunnya. Rabies anjing masih tetap penting di banyak bagian dunia, virus dalam air liur anjing yang terinfeksi menyebabkan sebagian besar dari perkiraan 75.000 kasus rabies pada manusia yang terjadi tiap tahun diseluruh dunia. Di banyak negara Eropa, di Amerika Serikat dan Kanada, Rabies hewan liar makin lama makin penting artinya. Rabies terdapat di seluruh dunia, kecuali di Australia, Jepang, Inggris, dan banyak pulau kecil seperti Hawaii dan sebagian besar pulau di Kepulauan Karibia. (Fenner *et al.*, 1993)

2.6. Epidemiologi Rabies

Pada akhir 1997, pulau Flores (Nusa Tenggara Timur) tertular Rabies akibat masuknya anjing secara ilegal dari Buton, Sulawesi Tenggara. Hingga akhir Agustus 2000 sebanyak 2.784 orang digigit anjing tersangka, dan sebanyak 85 orang di antaranya meninggal. Sementara dari kurun waktu 1996-1999, jumlah kasus gigitan anjing di Sulawesi mencapai 12.573, dan 16% dari jumlah tersebut dikonfirmasi sebagai Rabies. Beberapa tahun kemudian Kepulauan Maluku tidak lagi bebas dari rabies. Tahun 2000 kasus rabies telah tersebar luas di seluruh tanah air, kecuali 4 propinsi yang masih dinyatakan bebas, yakni Bali, Nusa Tenggara Barat, Irian Jaya dan Maluku (Suwarno, 2005). Outbreak baru penyakit rabies di Ambon pada awal 2003. kejadian rabies di Ambon adalah akibat kedatangan anjing dari Sulawesi dan telah menyebabkan setidaknya 22 orang meninggal sampai dengan akhir tahun 2003 (Windiyaningsih dkk., 2004).



Gambar 2.8 Pola Penyebaran penyakit Rabies di Indonesia (Deptan, 2007).

Diseluruh dunia, diperkirakan terjadi 15.000 kasus rabies yang ditularkan ke manusia setiap tahunnya. Kejadian ini sebagian besar terjadi di negara berkembang termasuk Indonesia. Rabies ditularkan kepada manusia melalui gigitan anjing pembawa virus rabies. Di Kanada, Amerika Serikat, dan kawasan Eropa Barat, virus rabies yang dibawa oleh anjing dan kucing dapat dikendalikan.

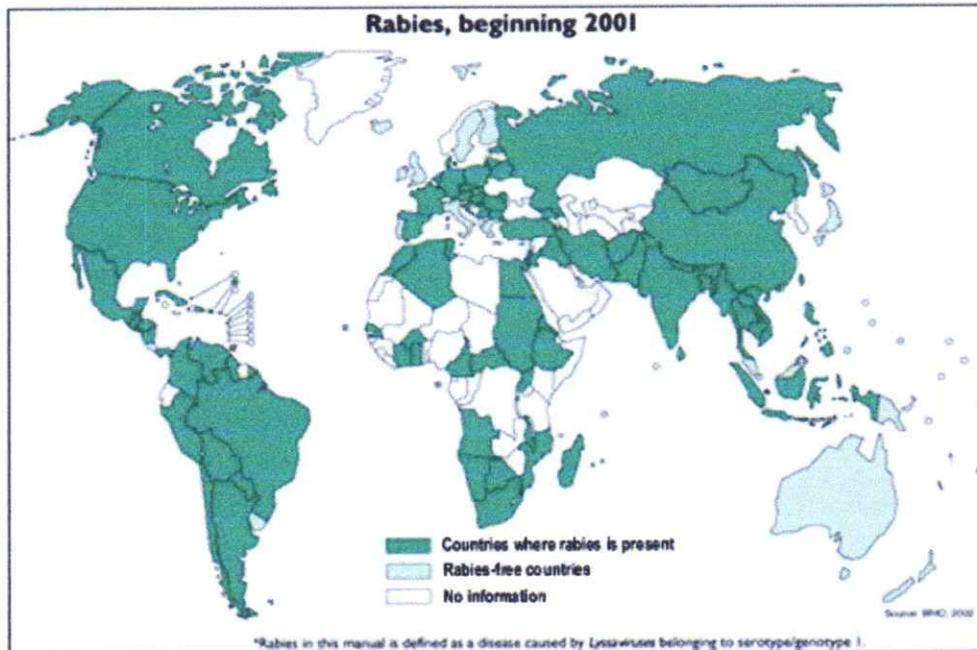
Manusia dapat tertular melalui gigitan hewan liar, khususnya sigung, rubah, dan kelelawar. Di Amerika Latin, rabies khususnya ditularkan melalui kelelawar vampir yang secara normal menghisap darah ternak, tetapi juga dapat menggigit manusia. Rabies hewan liar di AS dan beberapa negara maju lain memberi risiko yang jauh lebih besar bagi manusia dibandingkan pada anjing atau kucing. Hewan liar yang diperangkap dan dijual sebagai binatang peliharaan dapat menjadi sumber pada manusia (Soeharsono, 2002).



Gambar 2.9 Peta penyebaran rabies di Indonesia (Deptan, 2007).

Dari tahun 1980-1983, telah didiagnosis 18 kasus rabies manusia di AS, menggunakan penanda molekuler, 7 dari 9 kasus yang diketahui merupakan rabies, terbukti mengandung virus yang berkaitan dengan kelelawar. Racoon telah menjadi reservoir penting untuk Rabies di daerah timur AS dan pada saat ini merupakan lebih dari setengah kasus rabies hewan yang dilaporkan. Telah diyakini bahwa rabies racoon masuk ke daerah Atlantik tengah pada tahun 1970,

ketika racoon yang terinfeksi dibawa ke daerah tersebut dari AS bagian tengara untuk memenuhi persediaan pemburu (Kurniadhi, 2005).



Gambar 2.10 Distribusi rabies di seluruh dunia (Kill, 2009).

Tahun 1981, lebih dari 7.000 kasus rabies hewan yang dipastikan secara laboratorium telah dilaporkan di AS dan sekitarnya. Tujuh jenis hewan yang terkena pada 97% kasus: sigung (62%), kelelawar (12%), racoon (7%), sapi (6%), kucing (4%), anjing (3%), dan rubah (3%). Dari kasus-kasus ini, 85% kasus terjadi pada hewan liar dan 15% pada hewan peliharaan (Soeharsono, 2002).

Hewan-hewan yang terkena virus rabies akan mengeluarkan air liur secara berlebihan. Kelelawar menimbulkan masalah khusus karena mereka dapat membawa virus rabies sementara mereka tampak sehat, mengeluarkan rabies dalam liur, dan menularkannya ke hewan lain, termasuk kelelawar lain dan ke manusia. Kelelawar vampir Amerika Selatan dapat menularkan rabies ke kelelawar insektivora yang hidup dalam gua-gua. Kelelawar ini pada gilirannya,

dapat menularkan rabies pada kelelawar pemakan buah yang mengunjungi gua-gua ini dan bermigrasi ke tempat lain. Kelelawar gua dapat mengandung aerosol virus rabies dan merupakan risiko bagi penelusur gua. Infeksi rabies dari manusia ke manusia sangat jarang. Kasus rabies yang ditularkan melalui transplan kornea hanya merupakan kasus tercatat. Kornea yang berasal dari donor yang meninggal dengan penyakit susunan saraf pusat yang tidak terdiagnosis, dan resipien meninggal akibat rabies 50-80 hari kemudian. Secara teoritis, rabies dapat berasal dari air liur pasien yang menderita rabies. Tetapi penularan semacam ini tidak pernah tercatat (Soeharsono, 2002).

2.7. PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Reaksi Polimerase Berantai atau dikenal sebagai *Polymerase Chain Reaction* (PCR), merupakan suatu proses sintesis enzimatik untuk mengamplifikasi nukleotida secara *in vitro*. Metoda PCR dapat meningkatkan jumlah urutan DNA ribuan bahkan jutaan kali dari jumlah semula. Setiap urutan basa nukleotida yang diamplifikasi akan menjadi dua kali jumlahnya. Pada setiap siklus PCR akan diperoleh 2^n kali banyaknya DNA target. Kunci utama pengembangan PCR adalah menemukan bagaimana cara amplifikasi hanya pada urutan DNA target dan meminimalkan amplifikasi urutan non-target (Fatchiyah dkk., 2006).

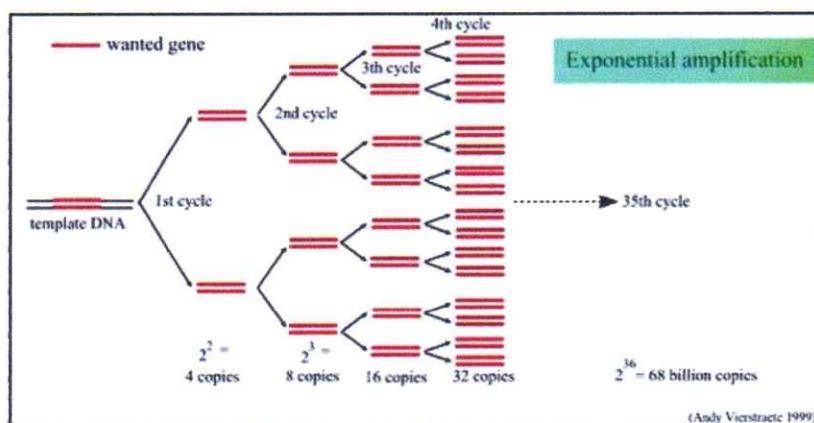
Polymerase Chain Reaction pertama kali ditemukan oleh Kary Mullis pada tahun 1986. Penemuan awal dari teknik PCR didasarkan pada tiga *waterbaths* yang mempunyai temperatur yang berbeda. *Thermalcycler* pertama kali dipublikasikan pada tahun 1986, akan tetapi DNA polimerase awal yang

digunakan masih belum *thermostable* dan harus ditambahkan disetiap siklusnya (Fatchiyah, 2006). *Polymerase Chain Reaction* adalah suatu teknik yang dipakai untuk melipatgandakan asam nukleat (DNA atau RNA) secara *in vitro* dengan enzimatik di dalam suatu mesin pengubah yang dikenal dengan *Thermocycler*. Proses pelipatgandaan DNA ini terjadi melalui tiga tahapan yaitu denaturasi, annealing dan ekstensi (Rantam, 2007). Tahap denaturasi dilakukan pada suhu sekitar 92°C untuk menguraikan rantai ganda menjadi rantai tunggal. Kemudian dilanjutkan dengan tahap *annealing* dengan suhu sekitar $37^{\circ}\text{C} - 65^{\circ}\text{C}$. Pada proses ini primer menempel pada daerah spesifik DNA template. Proses ekstensi dilakukan pada suhu 72°C yang dimaksudkan untuk penambahan enzim *Taq* DNA polymerase sehingga primer akan disambung dengan nukleotid dNTP dan terbentuk rantai nukleotida yang lebih panjang. Reaksi PCR meniru reaksi penggandaan atau replikasi DNA yang terjadi dalam makhluk hidup. Secara sederhana PCR merupakan reaksi penggandaan daerah tertentu dari DNA cetakan (template) dengan bantuan enzim DNA polymerase. (Suwarno, 2007).

Penggunaan PCR telah berkembang secara cepat seiring dengan perkembangan biologi molekuler. *Polymerase Chain Reaction* digunakan untuk identifikasi penyakit genetik, infeksi oleh virus, diagnosis dini penyakit seperti AIDS, *Genetic profiling in forensic, legal and bio-diversity applications*, biologi evolusi, *Site-directed mutagenesis of genes* dan *mRNA Quantitation* di sel ataupun jaringan (Fatchiyah, 2006).

2.7.1. Teknik Dasar Amplifikasi PCR

Proses PCR merupakan proses siklus yang berulang meliputi denaturasi, *annealing* dan ekstensi oleh enzim DNA polimerase. Sepasang primer oligonukleotida yang spesifik digunakan untuk membuat hibrid dengan ujung-5' menuju ujung-3' untai DNA target dan mengamplifikasi untuk urutan yang diinginkan. Dasar siklus PCR ada 30-35 siklus meliputi: denaturasi (95°C), 30 detik., *annealing* (55–60°C), 30 detik., ekstensi (72°C), waktu tergantung panjang pendeknya ukuran DNA yang diinginkan sebagai produk amplifikasi. Peningkatan jumlah siklus PCR diatas 35 siklus tidak memberikan efek yang positif (Fatchiyah, 2006).



Gambar 2.11 Tahap tahap pelipatgandaan DNA (Erlich, 1991).

Setiap siklus reaksi PCR terdiri atas tiga tahap, yaitu:

a. Denaturasi untai ganda DNA

Denaturasi untai ganda DNA merupakan langkah yang kritis selama proses PCR. Temperatur yang tinggi pada awal proses menyebabkan pemisahan untai ganda DNA. Temperatur pada tahap denaturasi pada kisaran 92-95°C, suhu 94°C merupakan pilihan standar, selama 30-60 detik. Suhu ini DNA utas ganda akan memisah menjadi utas tunggal. Temperatur denaturasi yang tinggi membutuhkan

kandungan GC yang tinggi dari DNA *template*, tetapi *half-life* dari Taq DNA Polymerase menekan secara tajam pada temperatur sekitar 95°C (Fatchiyah, 2006).

b. Primer *Annealing*

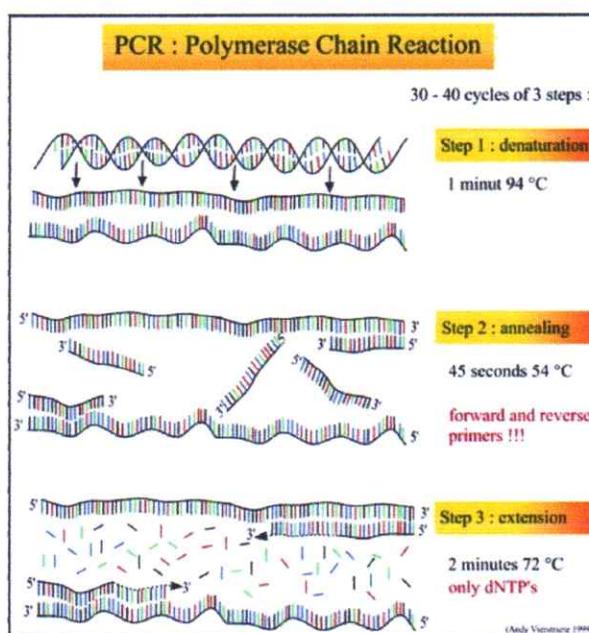
Setelah DNA menjadi utas tunggal, suhu diturunkan ke kisaran 40-60°C selama 20-40 detik untuk memberikan kesempatan bagi primer untuk menempel pada DNA *template* di tempat yang komplemen dengan sekuen primer. Primer *Annealing*, pengenalan suatu primer terhadap DNA target tergantung pada panjang untai, banyaknya kandungan GC, dan konsentrasi primer itu sendiri. Optimalisasi temperatur *annealing* dimulai dengan menghitung *Melting Temperature* (T_m) dari ikatan primer dan DNA *template*. Cara termudah menghitung untuk mendapatkan *melting-temperatur* yang tepat menggunakan rumus $T_m = \{(G+C) \times 4\} + \{(A+T) \times 2\}$. Rumus standar dapat dilihat di subbab primer pada komponen PCR. Temperatur *annealing* biasanya 5°C di bawah T_m primer yang sebenarnya. Secara praktis, T_m ini dipengaruhi oleh komponen buffer, konsentrasi primer dan DNA *template* (Fatchiyah, 2006).

c. DNA polymerase extension

Tahap *extensi* ini terjadi proses pemanjangan untai baru DNA, dimulai dari posisi primer yang telah menempel di urutan basa nukleotida DNA target akan bergerak dari ujung 5' menuju ujung 3' dari untai tunggal DNA. Proses pemanjangan atau pembacaan informasi DNA yang diinginkan sesuai dengan panjang urutan basa nukleotida yang ditargetkan. Setiap satu kilobase (1000bp) yang akan diamplifikasi memerlukan waktu 1 menit, jika kurang dari 500bp hanya 30 detik dan pada kisaran 500 tapi kurang dari 1kb perlu waktu 45 detik, namun

apabila lebih dari 1kb akan memerlukan waktu 2 menit di setiap siklusnya. Adapun temperatur ekstensi berkisar antara 70-72°C. Dilakukan dengan menaikkan suhu ke kisaran suhu kerja optimum enzim DNA polymerase, biasanya 70-72oC. Tahap ini DNA polymerase akan memasangkan dNTP yang sesuai pada pasangannya, jika basa pada template adalah A, maka akan dipasang dNTP, begitu seterusnya (pasangan A adalah T, dan C dengan G, begitu pula sebaliknya). Enzim akan memperpanjang rantai baru ini hingga ke ujung. Lamanya waktu ekstensi bergantung pada panjang daerah yang akan diamplifikasi, secara kasarnya adalah 1 menit untuk setiap 1000 bp (Fatchiyah, 2006).

Tahapan Reaksi



Gambar 2.12 PCR (Erlich, 1991).

2.8 Komponen PCR

Pada reaksi PCR diperlukan DNA template, primer spesifik, enzim DNA polimerase yang thermostabil, buffer PCR, ion Mg²⁺, dan thermal cyler (Fatchiyah *et al.*, 2006).

2.8.1. *Template DNA*

Ukuran target amplifikasi biasanya kurang dari 1000 pasangan basa (bp) atau 1KB, Hasil amplifikasi yang efisien antara 100-400bp, kemungkinan hasil amplifikasi lebih dari 1 kB tetapi prosesnya kurang efisien, karena produk yang panjang rentan terhadap inhibitor yang mempengaruhi kerja enzim DNA polymerase dan waktu yang diperlukan lebih lama. Hal ini dapat menyebabkan hasil amplifikasi yang tidak diinginkan (Fatchiyah, 2006).

2.8.2. Primers

Primer disusun dari sintesis oligonukleotida sepanjang 15-32bp dan primer ini harus mampu mengenali urutan yang akan diamplifikasi. Untuk standar amplifikasi sepasang primer akan mempunyai kisaran pasangan basa sekitar 20 basa panjangnya pada tiap primernya. Kandungan GC harus antara 45-60%. Annealing temperatur antara primer yang digunakan harus berkisar antara 1°C. Ujung 3' dari setiap primer harus G atau C, akan tetapi hindari susunan nukleotida G/C berturut-turut tiga pada ujung ini, misal CCG, GCG, GGC, GGG, CCC, GCC. Pada penentuan atau penyusunan sepasang primer, penting diperhatikan urutan primer tidak saling komplementer sehingga membentuk dimer-primers, berikatan satu sama lain, atau membentuk hairpins. Hal lainnya hindari menyusun primer pada daerah DNA repetitif (Fatchiyah, 2006).

Primer adalah sepasang DNA utas tunggal atau oligonukleotida pendek yang menginisiasi sekaligus membatasi reaksi pemanjangan rantai atau polimerisasi DNA. PCR mampu menggandakan DNA pada daerah tertentu sepanjang maksimum 10.000 bp, dan dengan teknik tertentu bisa sampai 40.000

bp. Primer dirancang untuk memiliki sekuen yang komplemen dengan DNA template, jadi dirancang agar menempel mengapit daerah tertentu yang kita inginkan (Susanto, 2008).

Menurut Suwarno (2005) proses PCR memerlukan sekurang-kurangnya 2 macam primer, yakni *primer forward* dan *primer reverse*. Masing-masing primer merupakan suatu rantai nukleotida, mempunyai urutan nukleotida yang berpasangan dengan nukleotida dan mengapit kedua ujung fragmen DNA yang diamplifikasi. Konsentrasi primer antara 0,1 dan 0,5 μM adalah optimal. Konsentrasi primer yang terlalu tinggi akan meningkatkan salah menempel, akumulasi hasil produk PCR yang tidak spesifik dan terjadinya artefag yang disebut primer dimer (Rantam, 2007).

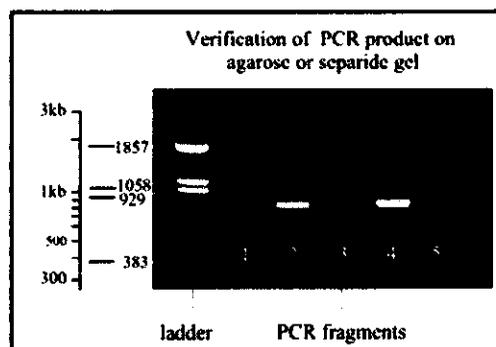
2.8. 3. PCR *Thermal Cycler*

PCR *thermal cycler* pertama kali dikembangkan oleh perusahaan PerkinElmer sebagai pemegang paten asli. Pada saat ini telah diproduksi berbagai macam tipe alat PCR *thermal cycler* ini dari berbagai perusahaan yang bergerak dalam bioteknologi. Walaupun nama masing-masing alat itu berbeda tetapi prinsip kerjanya sama. Alat ini secara tepat meregulasi temperatur dan siklus waktu yang dibutuhkan untuk reproduibilitas dan keakuratan reaksi amplifikasi (Fatchiyah, 2006). Kegagalan PCR kebanyakan disebabkan denaturasi DNA *template* produk PCR yang tidak sempurna (Suwarno, 2005).

2.9. Elektroforesis

Elektroforesis merupakan suatu cara analisis kimiawi yang didasarkan pada pergerakan molekul-molekul protein bermuatan di dalam medan listrik (titik isoelektrik). Pergerakan molekul di dalam medan listrik dipengaruhi oleh bentuk, ukuran, besar muatan dan sifat kimia dari molekul (Pratiwi, 2001). Elektroforesis digunakan dengan tujuan untuk mengetahui ukuran dan bentuk suatu partikel baik DNA, RNA dan protein. Selain itu, elektroforesis juga digunakan untuk mengisolasi masing-masing komponen dari campurannya, mempelajari fitogenetika, kekerabatan dan mempelajari penyakit yang diturunkan (Klug and Cummings., 1994).

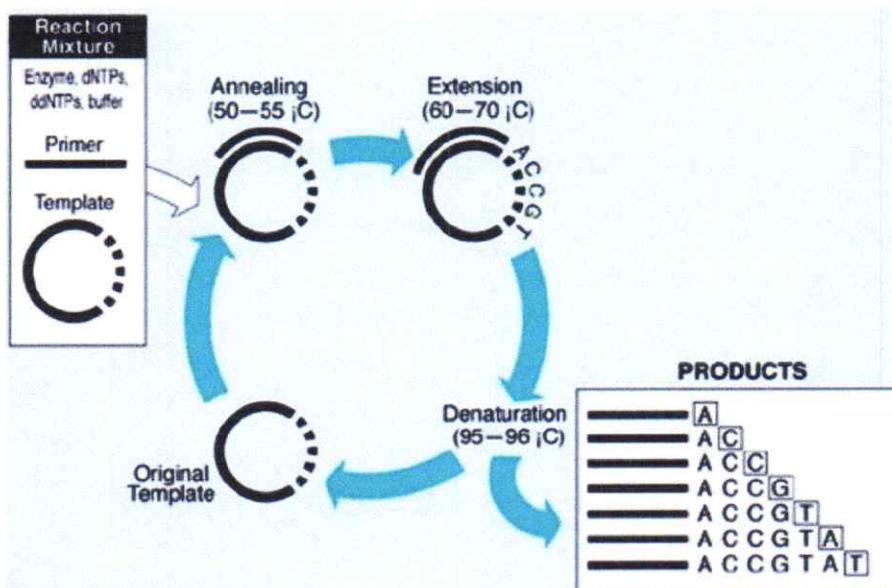
Setelah siklus PCR sudah tercapai sesuai dengan yang diinginkan, selanjutnya dilakukan pembacaan hasil amplifikasi DNA. Hal ini dilakukan dengan metode Agarose Gel Electrophoresis (AGE). Konsentrasi agarose ditentukan oleh besarnya nukleotida dari DNA yang diamplifikasi. Untuk memperoleh gambaran yang lebih baik, semakin besar jumlah nukleotidanya maka semakin kecil konsentrasi agarosenya. agarose ditambahkan ethidium bromid, selanjutnya dibaca dengan iluminasi ultra violet (Nidom, dan De Vries, 2007).



Gambar 2.13 Elektroforesis DNA. (Erlich, 1991)

2.10. Sekuensing

Metode sekuensing yang ada saat ini pada dasarnya menggunakan metode sanger yaitu metode terminasi rantai dan dalam metode terminasi rantai ini diperlukan untai tunggal DNA yang selanjutnya dengan reaksi enzimatik akan disintesis DNA komplementer. Reaksi enzimatik ini diperlukan salah satu primer yang digunakan untuk PCR yang berfungsi untuk pemanjangan rantai komplementer. Reaksi ini dikatalisis oleh DNA Polymerase, dNTP spesifik untuk terminasi rantai dan gel poliakrilamid yang dapat memisahkan rantai tunggal DNA dengan perbedaan satu basa nukleotida. Cetakan DNA atau DNA yang akan disekuensing dapat diperoleh dari hasil PCR atau yang biasa disebut dengan direct sequencing (Sambrook *and* Russel., 2001).



Gambar 2.14 Proses *cycle* sekuensing (Appliedbiosystems, 2010)

Teknik DNA Sekuensing, yaitu metode yang digunakan untuk menentukan urutan basa nukleotida (adenine, guanine, cytosine dan thymine) pada molekul DNA. Prinsip Dasar DNA Sekuensing menggunakan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) sebagai pijakannya. DNA yang akan ditentukan

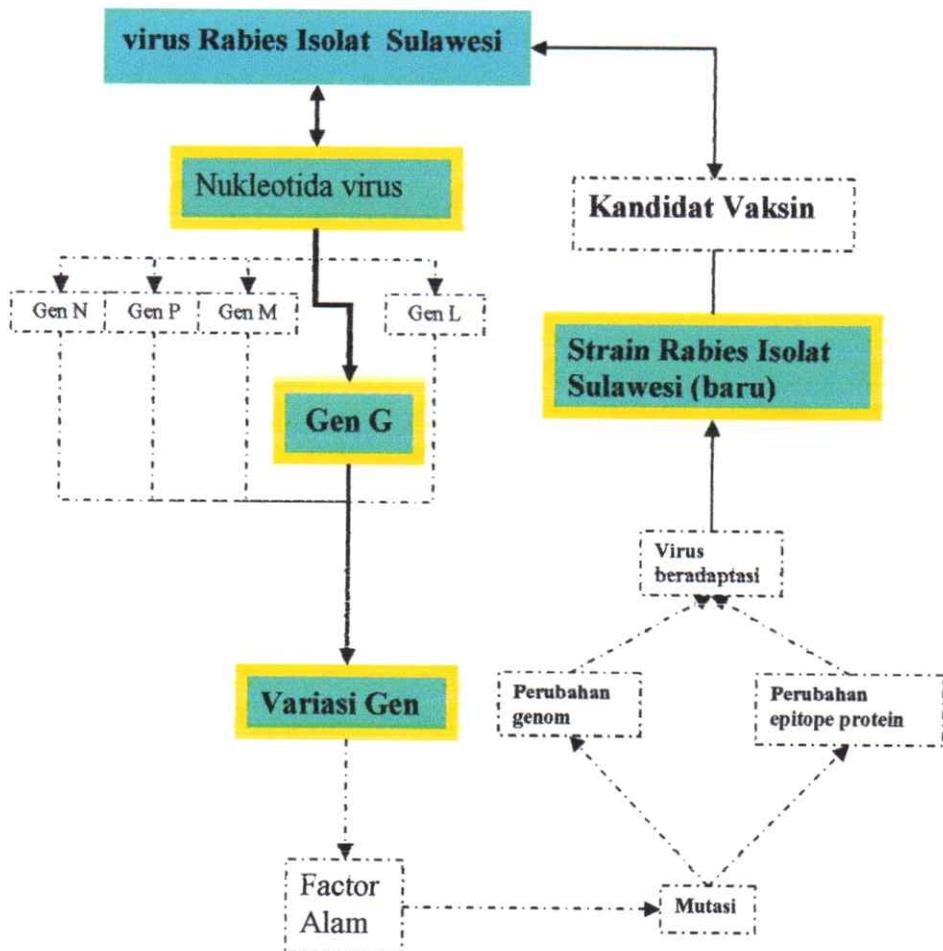
urutan basa ACGT-nya dijadikan sebagai cetakan untuk kemudian diamplifikasi menggunakan enzim dan bahan-bahan yang mirip dengan reaksi PCR, namun ada penambahan beberapa pereaksi tertentu. Proses ini dinamakan *cycle* sekuensing. Jadi yang membedakan *cycle* sekuensing dengan PCR biasa adalah: Primer yang digunakan hanya satu untuk satu arah pembacaan, tidak dua (sepasang) seperti PCR (Appliedbiosystems, 2010).

Saat proses ekstensi, enzim polimerase akan membuat rantai baru DNA salinan dari template dengan menambahkan dNTP-dNTP sesuai dengan urutan pada DNA cetakannya. Nah, jika yang menempel adalah ddNTP, maka otomatis proses polimerisasi akan terhenti karena ddNTP tidak memiliki gugus 3'-OH yang seharusnya bereaksi dengan gugus 5'-Posfat dNTP berikutnya membentuk ikatan posfodiester (Appliedbiosystems, 2010).

Pada akhir *cycle* sekuensing, yang dihasilkan adalah fragmen fragmen DNA dengan panjang bervariasi. Jika fragmen-fragmen tersebut dipisahkan dengan elektroforesis, maka akan terpisah-pisah dengan jarak antar fragmennya satu basa-satu basa (Appliedbiosystems, 2010).

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL

3.1 Kerangka Konseptual Penelitian



Keterangan :

- tidak diteliti
- diteliti

Gambar 3.1 Kerangka konseptual penelitian

Berdasarkan fakta epidemiologis, rabies endemik di beberapa daerah di Indonesia. Virus rabies terdiri dari dua komponen dasar, yaitu sebuah inti dari asam nukleat yang disebut genom dan yang mengelilingi protein yang disebut kapsid. Rhabdovirus merupakan partikel berbentuk batang atau peluru berdiameter 75 nm x panjang 180 nm. Partikel dikelilingi oleh selubung selaput dengan duri yang menonjol yang panjangnya 10 nm, dan terdiri dari glikoprotein tunggal. Genom beruntai tunggal, RNA *negative-sense* (12 kb; BM 4,6 x 10⁶) yang berbentuk linear dan tidak bersegmen. Sebuah virus rabies yang lengkap diluar inang (virion) mengandung polimerase RNA.

Struktur protein tersusun dari 5 komponen, yakni glikoprotein (G) dengan berat molekul (BM) 62-67 kDa, nukleoprotein (N) 54 kDa, transkriptase (L) 190 kDa, protein matrik (M) 24 kDa, dan protein non-struktural (NS) 37 kDa. Protein L, N, dan NS terikat secara non-kovalen pada virion RNA, dan menghasilkan kompleks nukleokapsid yang berbentuk gulungan heliks dalam virion. Nukleokapsid dikelilingi amplop lipoprotein yang terdiri dari protein M dan pada permukaan virion terdapat protein-G. Genom virus rabies mempunyai panjang 12.000 *base pair* (bp). Sekuen gen dalam genom RNA adalah 3'-N-NS-M-G-L-5'.

Di alam terdapat dua jenis virus rabies, yaitu strain alam dan strain fiks yang telah diadaptasi melalui pasase serial dilaboratorium. Perubahan struktur virus yang setiap saat dapat berbeda dari sebelumnya disebabkan oleh mutasi. Beberapa virus punya tingkat mutasi yang tinggi untuk mengelabui sistem kekebalan. Mutasi juga bisa terjadi karena kesalahan pada saat replikasi dan kerusakan akibat cahaya ultraviolet. Virus memiliki keragaman genetik yang sangat besar.

Keanekaragaman genetika dapat terjadi karena adanya perubahan nukleotida penyusun DNA. Perubahan ini mungkin dapat mempengaruhi reaksi individu terhadap lingkungan tertentu. Secara umum keanekaragaman genetik dari suatu populasi dapat terjadi karena adanya mutasi, rekombinasi, atau migrasi gen dari satu tempat ke tempat lain.

Keragaman genetik yang terjadi melalui seleksi alam yang bekerja pada genom virus yang berubah sebagai akibat mutasi. Faktor faktor yang menjadi penyebab terjadinya mutasi antara lain faktor lingkungan (alam). Faktor itu mengenai apa yang ada didalam gen (Nukkleotida/Basa Nitrogen / DNA) disebut mutasi gen. Mutasi yang terjadi akibat faktor alam ini misalnya disebabkan sinar kosmis, radioaktif alam yang umumnya bersifat resesif dan merugikan. Jadi mutasi alam dapat disebabkan oleh tiga faktor: 1. Biologi. contoh: virus. virus yang hidup di dalam sel hidup dapat mengubah susunan materi genetik inang dengan menyisipkan materi genetik virus. 2. Fisik. contoh: sinar gamma, sinar X, dan sinar UV sebagai mutagen. susunan gen makhluk hidup dapat berubah jika terpapar pancaran sinar gamma, sinar X, dan sinar UV. mutasi yang terjadi adalah perubahan susunan materi genetik dalam skala kromosom. 3. Kimiawi. contoh: senyawa kimia asam nitrit sebagai mutagen: reaksi asam nitrit dengan adenin menjadi zat hipoxanthine. Zat ini akan menempati tempat adenin asli dan berpasangan dengan sitosin, bukan lagi dengan timin. mutasi yang terjadi adalah perubahan susunan materi genetik dalam skala gen

Pada kondisi lain mutasi akan memberikan pengaruh pada perubahan susunan genom dan adanya perubahan epitop protein. Mutasi pada perubahan susunan genom

yang sering terjadi yaitu mutasi titik, dimana mutasi titik ini hanya mengalami perubahan pada beberapa nukleotida saja. Mutasi yang dipengaruhi epitop dari protein permukaan virion sangat sering terjadi jika virus bereplikasi dengan adanya antibodi dalam tubuh inang. Dengan adanya mutasi maka terjadi perubahan susunan nukleotida sehingga akan terbentuk varian baru dari virus rabies isolat sulawesi.

BAB 4 MATERI DAN METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

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

4.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan selama tiga bulan, mulai tanggal 1 Agustus 2010 sampai 15 Desember 2010, bertempat di ex Laboratorium Virologi dan Imunologi Departemen Mikrobiologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dan dilakukan di Pusat Veterinaria Farma (PUSVETMA).

4.3 Alat dan Bahan

4.3.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah pipet pastuer, micropipet, tabung *eppendorf*, gelas ukur, rak gabus, *laminar flow Hood*, pipet, *microcentrifuge* (Beckman), *transilluminator-UV*, *gel electrophoresis apparatus* (Bio-Rad), vortex, *Centrifugasi*, *agarose electrophoresis apparatus* (Bio-Rad), *white tip*, *blue tip*, *yellow tip*, mortar dan penggerusnya, *bulb*, tabung *erlenmayer*, selotip, Mesin *Sequencer AB*

Applied Biosystem 3130 Genetic Analyser HITACHI, Mesin PCR System 9700 AB Applied Biosystem Gene Amp[®].

4.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah PZ steril, Chloroform, Propanol, Trizol (Cat. 15596-026), Alkohol 75%, *Nuklease Free Water* (NFW), RT-PCR bead (Cat. 27952901 OL/AC), PCR bead (Cat. 27955901 OL/AC), Primer gen G (RG-3F dan RG-AR), agarose, *ethidium bromide*, buffer TAE, DNA marker, buffer loading, buffer NT, Nucleospin[®] Extract II Column, buffer NT3, Big dye X Terminator Purification kit.

4.3.3 Sampel

Sampel penelitian berupa otak anjing tertular virus rabies dan telah dinyatakan positif berdasarkan uji *fluorescent antibody technique* (FAT) dan *Seller*. Sampel berasal dari Balai Besar Veteriner (BBVet) Maros, Sulawesi Selatan, yang diperoleh melalui Dr. Suwarno drh., M.Si. Sampel sebanyak 2 sampel dan sebagai pembandingan digunakan otak anjing normal yang tidak terinfeksi virus rabies sebanyak 1 sampel sebagai kontrol negatif dan otak anjing yang terinfeksi virus rabies sebanyak 1 sampel sebagai kontrol positif, sehingga total sampel berjumlah 4 sampel. Kontrol positif berasal dari isolat Sulawesi yang diisolasi oleh Dr. Suwarno, drh., M.Si pada tahun 2004.

4.4 Karakterisasi Gen G virus Rabies dengan teknik PCR

4.4.1 Isolasi Virus:

Sampel otak ditimbang sebanyak 1 g secara aseptis dan digerus dengan mortar, untuk selanjutnya dibuat suspensi 10-20 % dengan pelarut PZ steril. Suspensi kemudian digunakan untuk isolasi virus atau isolasi RNA total.

4.4.2 Ekstraksi RNA Virus Rabies

Isolasi RNA total menggunakan Trizol-LS (Invitrogen). Otak anjing terinfeksi/normal dibuat suspensi 20% dengan PBS. Sebanyak 250 μ l gerusan otak ditambah dengan 750 μ l Trizol-LS dan diaduk dengan pipet. Ke dalam campuran kemudian ditambahkan 200 μ l kloroform, difortex, inkubasi suhu ruang 5 menit dan disentrifus 12.000 rpm selama 15 menit suhu 4°C. sebanyak 500 μ l supernatan dipindahkan ke tabung baru dan ditambah dengan 500 μ l propanol, 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 alkohol 75% dan disimpan pada -20°C (Suwarno, 2005).

4.4.3 Elektroforesis RNA Total

RNA Total hasil Ekstraksi dilakukan analisis dengan agarose RNA elektroforesis dengan konsentrasi akhir 1%. Untuk elektroforesis RNA digunakan marker RNA dengan tetapan pengendapan 23S dan 26S, Agarose 1% dipanaskan kemudian ditambah 0,4 μ g/ml etidium bromid dan dicetak pada gel plate yang

didalamnya diletakkan comb, selanjutnya dituangi dengan buffer TAE (Sambrook and Russel, 2001). Sebanyak 5 μ l RNA ditambah dengan 3 μ l *blue juice* dimasukkan ke dalam sumuran *comb* pada agar. Setelah itu power supply dinyalakan dengan kekuatan 125 V selama 45 menit. Gel kemudian divisualisasi dengan UV transluminator (Suwarno, 2005).

4.4.4 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). *Bead RT-PCR* ditambah dengan 5 μ l larutan RNA, 2 μ l (20 pmol) primer RG-3F, 43 μ l NFW sehingga total volume 50 μ l. *Bead* kemudian di-*spindown* dan dimasukkan mesin PCR Thermal cycles (Perkins Elmer) diinkubasi dengan 42°C selama 90 menit. Produk RT kemudian dimasukkan ke dalam es dan disimpan pada -20°C sampai digunakan (Suwarno, 2005).

4.4.5 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 (20 pmol) primer RG-3F, 2 μ l primer RG-AR, 16 μ l NFW, sehingga total volume 25 μ l. *Bead* kemudian di-*spindown* dan dimasukkan mesin PCR dengan denaturasi awal 95°C 2 menit dan diikuti dengan denaturasi 94°C selama 1 menit, *anealing* 55°C 2 menit, *extention* 72°C 7 menit dan *extention* akhir

72°C 10 menit, tahap 2 sampai dengan 4 dilakukan sebanyak 40 siklus. Produk PCR kemudian dimasukkan ke dalam es dan disimpan pada -20°C sampai digunakan (Suwarno, 2005). Pemilihan primer untuk amplifikasi cDNA dengan metode PCR dipilih berdasarkan penelitian Suwarno (2005).

Tabel 4.1 Primer yang Digunakan untuk Amplifikasi Gen-G

No.	Nama	Sekuen	Lokasi
1.	RG-3F	5'-cctgcagcgttgaggattgtgacg -3'	3984 - 4011
2.	RG-AR	5'-caacaaggtgctcaatttctgagcgaa -3'	4165 - 4194

4.4.6 Elektroforesis DNA

DNA produk PCR dilakukan analisis dengan agarose DNA elektroforesis dengan konsentrasi akhir 1%. Untuk elektroforesis DNA digunakan Marker 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 *and* Russel, 2001). Sebanyak 5 µl DNA ditambah dengan 3 µl *blue juice* dimasukkan ke dalam sumuran *comb* pada agar. Setelah itu *power supply* dinyalakan dengan kekuatan 125 V selama 45 menit. Gel kemudian divisualisasi dengan UV *transluminator*.

4.4.7 Pemurnian DNA dari Produk PCR

Pemurnian DNA dari larutan produk PCR dilakukan dengan *gen clean kit* (Nucleospin @ Extract II Column). Sebanyak 100 µl larutan DNA ditambah dengan

200 μ l spin glassmilk yang telah diletakkan dalam filter spin. Tabung diinkubasi pada suhu ruang 5 menit dan dicampur tiap 1-2 menit, disentrifus 1 menit atau sampai likuid dapat dipindahkan dari *cacthtube* kemudian filter dicuci dengan 600 μ l larutan pencuci dan disentrifus 1 menit, disentrifus ulang 2 menit untuk mengeringkan pelet. Filter kemudian dipindahkan ke *catchtube* baru dan ditambah dengan 15 μ l larutan elusi pada firter. *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 (Appliedbiosystem, 2010).

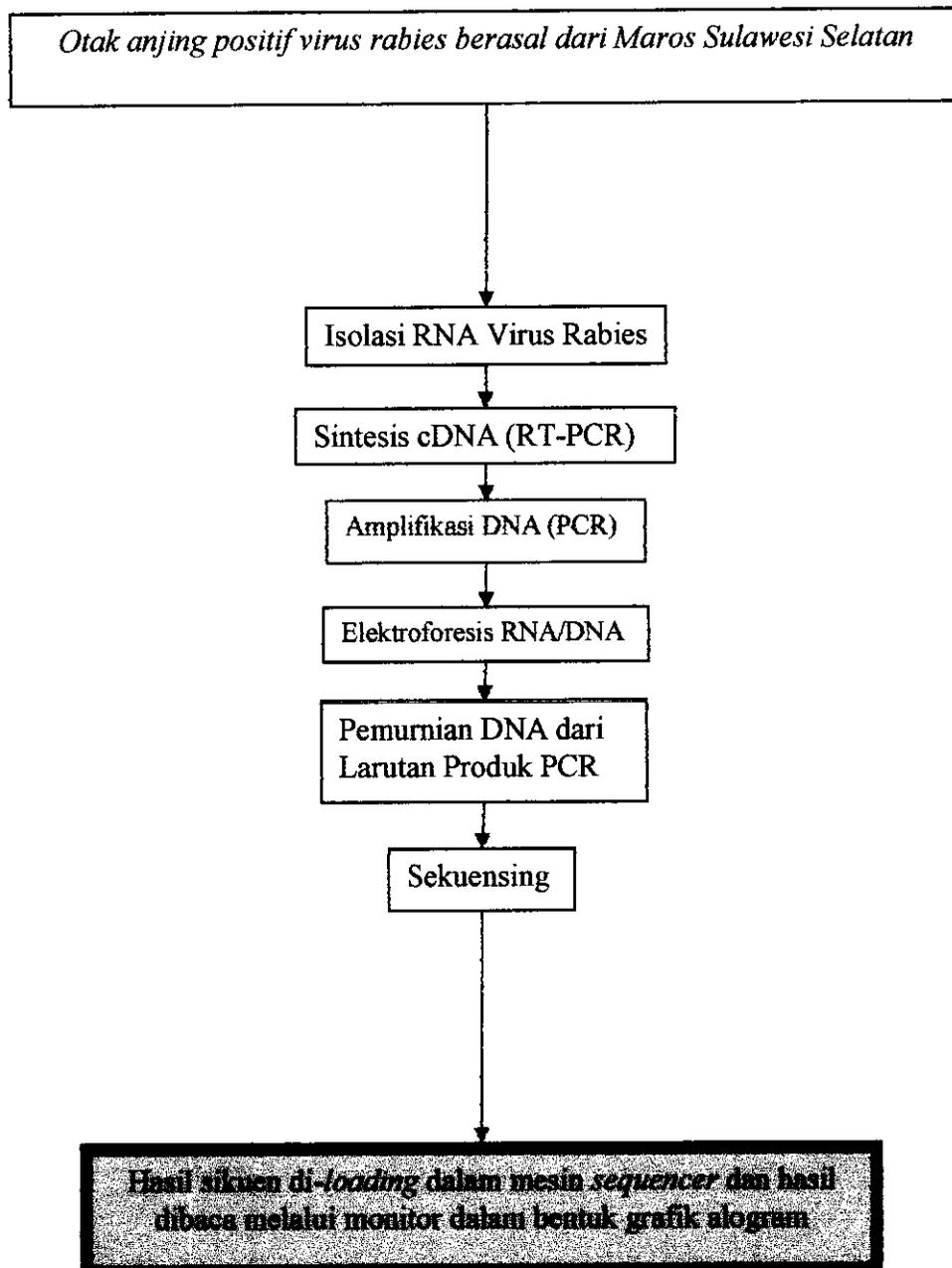
4.4.8 Sekuensing

Sekuensing dilakukan dengan Mesin *Sequencer* AB *Applied Biosystem 3130 Genetic Analyser HITACHI automated* dengan menggunakan *big dye X terminator™ Solution kit* dan *SAM™ Solution (Applied Biosytems)*. Vortex terlebih dahulu Big Dye X Terminator sampai homogen, kemudian masukkan SAM Sol 4,5 kali volume cycle sequencing ke dalam well dan masukkan Big Dye X Terminator satu kali volume hasil cycle sequencing sehingga total volume mencapai 20 μ l. Vortex selama 30 menit dan sentrifugasi 1000 *g*/rcf selama 2 menit. di pindahkan kedalam plate dan dimasukkan ke mesin *sequencer* dengan program 96°C 1 menit sebagai denaturasi awal, dan selanjutnya 96°C 10 detik, 50°C 5 detik dan 60°C 4 menit sebanyak 25 siklus. Hasil sikuen kemudian di-*loading* dalam mesin *sequencer* dan hasil dibaca melalui monitor dalam bentuk grafik alogram (Applied Biosystem, 2010).

4.5 Analisis Data

Hasil pengamatan pada penelitian secara deskriptif menjelaskan identifikasi gen G dan sekuen dari fragmen dari gen G virus rabies, serta homologi nukleotida menggunakan NCBI *Blast*.

4.6 Kerangka Operasional Penelitian

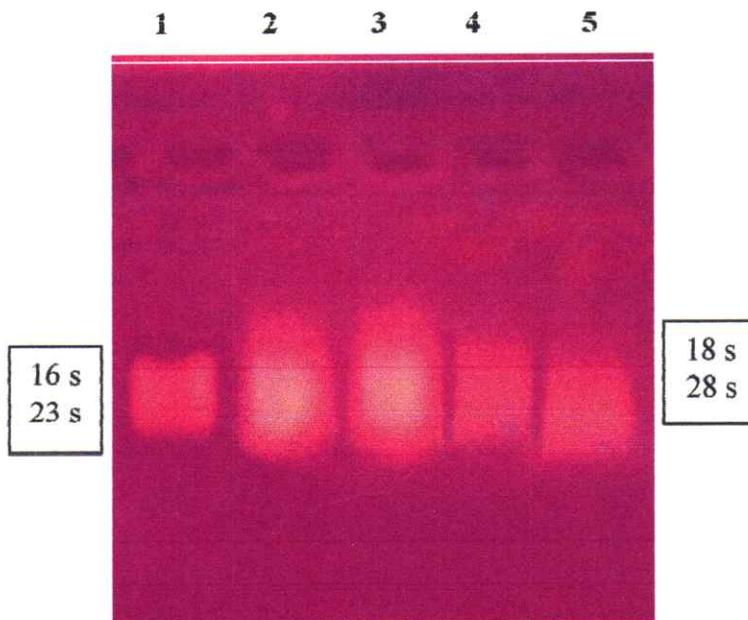


Gambar 4.1 Kerangka operasional penelitian

BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Isolasi RNA Total

Setelah dilakukan elektroforesis RNA dengan agarose 1 % dan divisualisasi di bawah sinar UV dengan panjang gelombang 302 nm, hasil isolasi RNA total didapatkan gambaran pada Gambar 5.1. Pada Gambar 5.1 menunjukkan adanya pita RNA total yang diisolasi dari otak anjing, dan selanjutnya RNA total hasil ekstraksi dengan Trizol dapat digunakan dalam proses sistesis cDNA dengan RT-PCR.

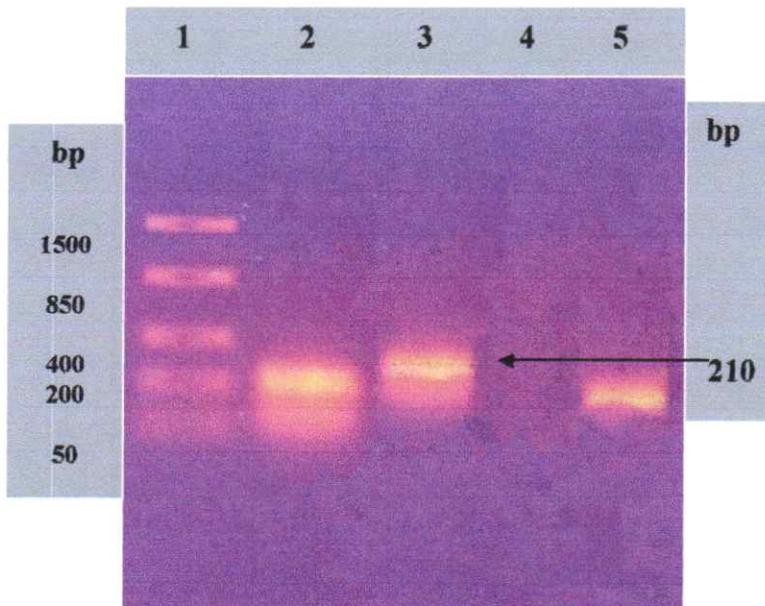


Gambar 5.1 Hasil Isolasi RNA Total Virus Rabies. Kolom 1 Marker RNA low range, Kolom 2 Kontrol positif (+), Kolom 3 Sampel 2.507, Kolom 4 Kontrol negatif (-), Kolom 5 Sampel 5.452.

5.2 Amplifikasi DNA Gen G Virus Rabies

Proses amplifikasi dengan PCR yang mengubah cDNA menjadi DNA virus Rabies menggunakan primer RG-AR dan RG-3F mampu menghasilkan fragmen gen

G dengan panjang 210 bp. Setelah dilakukan elektroforesis dan dibaca di bawah sinar ultraviolet dengan panjang gelombang 302nm, panjang amplicon dari fragmen gen G dapat dilihat pada Gambar 5.2



Gambar 5.2 Hasil PCR gen G virus Rabies isolat Sulawesi. Kolom 1 Marker DNA, Kolom 2 Kontrol positif (+), Kolom 3 Sampel 2.507, Kolom 4 Kontrol negatif (-), Kolom 5 Sampel 5.452.

Gambar 5.2 dapat diketahui panjang fragmen gen G virus rabies dengan menggunakan primer RG-AR dan RG-3F yaitu sebesar 210 bp yang tampak pada kolom 3, yaitu sampel dengan kode 2.307 dan tampak pada kolom 5 merupakan sampel 5.452 menunjukkan negatif dengan panjang amplifikasi yang tidak sesuai.

5.3 Sequencing Gen G Virus Rabies

Hasil PCR untuk selanjutnya disekuensing dengan menggunakan RG-AR sehingga dapat diketahui urutan nukleotida dari gen G virus rabies. Gambar 5.3 berikut menunjukkan hasil sekuensing dari sampel dengan kode 2.307 asal Maros,

Sulawesi, dengan referen berasal dari isolat 03003INDO asal Indonesia yang diisolasi tahun 2003 oleh Bourhy *et al.* (2008) dan kontrol positif .berasal dari isolat Sulawesi yang diisolasi tahun 2004 oleh Suwarno (2005).

Hasil sekuensing isolat Maros asal Sulawesi Selatan tahun 2010 ini memiliki kekerabatan dengan virus rabies isolat 03003INDO yang diisolasi dari anjing di Indonesia oleh Bourhy *et al.*, (2008). Sebagaimana tampak pada Tabel 5.1 Sekuens homologi Nukleotida Gen G Virus Rabies berikut :

Tabel 5.1 Sekuens Homologi Nukleotida Gen G Virus Rabies.

	812	822	832	842	852
Referen	caccatttgg	Tctcatctga	cgtctgaagt	gcaacccatg	ttccatccat
Kontrol	*****a	*****	t*****t*	**g*****	****g*****
+					
Sample	*****	*t**g*****	*****	*****	*****
2.507					
Sample	NgaNN***NN	aNntgcaacN	*a*gNtNcaN	T*cNtaan*c	*aaNNcNNNN
5.452					
	862	872	882	892	902
Referen	aagtctaagt	Ccaagaacc	cacatagctt	cagcttgc	gcccctttta
Kontrol	*****	**t*****	*****	*****	**t*****
+					
Sample	g**c*****	****g*****	*****	*****c	*****
2.507					
Sample	accNNNNNN	N*ctt*g*tt	gcatgccct	tttaga*ac*	tgta*aagcc
5.452					
	912	922	932	942	952
Referen	gagacttgta	Caagcctctt	tcatctacia	atccacaagg	cctgaagg
Kontrol	*****	*****	*****	*****	*****
+					
Sample	*****	*****	**g**a*****	****g*****	*****
2.507					
Sample	tctttcgtc*	ac*aatc*gc	aag***g**gg	gNNNtNNNNa	aNcN***N
5.452					

(*) Menunjukkan terdapat kesamaan dengan referen.

Hasil sekuens yang tampak pada Tabel 5.1 di atas menunjukkan homologi antara sampel penelitian isolat Maros, Sulawesi Selatan dibandingkan dengan referen isolat 03003INDO asal Indonesia yang diisolasi Bourhy *et al.*, pada tahun 2003. dan dibandingkan dengan kontrol positif yang berasal dari isolat Sulawesi yang diisolasi oleh Suwarno pada tahun 2004. hasil persentase homologi Nukleotida gen G virus rabies terlihat pada Tabel 5.2 berikut :

Tabel 5.2 Persentase Homologi Nukleotida Gen G Virus Rabies

	Referen	Kontrol Positif	Sampel
Referen	---	94,3 %	93 %
Kontrol Positif	---	---	90.9 %

BAB 6 PEMBAHASAN

6.1 Isolasi RNA Total

Asam ribonukleat merupakan senyawa yang merupakan bahan genetik dan memainkan peran utama dalam ekspresi genetik. Dalam dogma pokok genetika molekular, RNA menjadi perantara antara informasi yang dibawa DNA dan ekspresi fenotipik yang diwujudkan dalam bentuk protein. Struktur dasar RNA mirip dengan DNA. RNA merupakan polimer yang tersusun dari sejumlah nukleotida. Setiap nukleotida memiliki satu gugus fosfat, satu gugus pentosa, dan satu gugus basa nitrogen (basa N). Polimer tersusun dari ikatan berselang-seling antara gugus fosfat dari satu nukleotida dengan gugus pentosa dari nukleotida yang lain. Perbedaan RNA dengan DNA terletak pada satu gugus hidroksil cincin gula pentosa, sehingga dinamakan ribosa, sedangkan gugus pentosa pada DNA disebut deoksiribosa. Basa nitrogen pada RNA sama dengan DNA, kecuali basa timina pada DNA diganti dengan urasil pada RNA. Jadi tetap ada empat pilihan: adenina, guanina, sitosina, atau urasil untuk suatu nukleotida. Selain itu, bentuk konformasi RNA tidak berupa pilin ganda sebagaimana DNA, tetapi bervariasi sesuai dengan tipe dan fungsinya (Malik, 2005).

Namun demikian, peran penting RNA terletak pada fungsinya sebagai perantara antara DNA dan protein dalam proses ekspresi genetik karena ini berlaku untuk semua organisme hidup. Dalam peran ini, RNA diproduksi sebagai salinan kode urutan basa nitrogen DNA dalam proses transkripsi. Kode urutan basa ini tersusun dalam bentuk 'triplet', tiga urutan basa N, yang dikenal dengan nama kodon.

Setiap kodon berelasi dengan satu asam amino (atau kode untuk berhenti), monomer yang menyusun protein (Agrawal, *et al.*, 2003).

Pada penelitian ini isolasi RNA total diperlukan untuk memperoleh mRNA (genom virus rabies). Penggunaan enzim reverse transkriptase pada RT-PCR akan mengubah mRNA menjadi cDNA. Agar mendapatkan hasil yang optimal untuk mengamplifikasi genom virus rabies melalui teknik PCR, diperlukan RNA total atau mRNA dengan jumlah cukup dan kualitas baik. RNA total hasil elektroforesis, pita yang terlihat tebal pada kolom adalah bentukan rRNA, sedangkan bentukan smear adalah mRNA. Berdasarkan ketajamannya, kedua bentukan ini dapat dijadikan indikator bahwa mRNA belum mengalami degradasi. Sampel yang disimpan terlalu lama atau pada suhu kritis, menyebabkan degradasi RNA dan berakibat kegagalan amplifikasi DNA (Suwarno, 2005).

6.2 Amplifikasi DNA Gen G Virus Rabies

Keberhasilan pada penelitian ini lebih didasarkan kepada kesesuaian primer dan efisiensi dan optimasi proses PCR. Primer yang tidak spesifik dapat menyebabkan teramplifikasinya daerah lain dalam genom yang tidak dijadikan sasaran atau sebaliknya tidak ada daerah genom yang teramplifikasi. Optimasi PCR juga diperlukan untuk menghasilkan karakter yang diinginkan. Optimasi ini menyangkut suhu denaturasi dan annealing DNA dalam mesin PCR. Suhu denaturasi yang rendah dapat menyebabkan belum terbukanya DNA utas ganda sehingga tidak dimungkinkan terjadinya polimerisasi DNA baru. Proses penempelan primer pada utas DNA yang sudah terbuka memerlukan suhu optimum, sebab suhu yang terlalu

tinggi dapat menyebabkan amplifikasi tidak terjadi atau sebaliknya suhu yang terlalu rendah menyebabkan primer menempel pada sisi lain genom yang bukan sisi homolognya; akibatnya dapat teramplifikasi banyak daerah tidak spesifik dalam genom tersebut. Suhu penempelan ini ditentukan berdasarkan primer yang digunakan yang dipengaruhi oleh panjang dan komposisi primer.

Sintesis dan amplifikasi genom virus Rabies memerlukan primer spesifik. Berdasarkan hasil sintesis cDNA dengan RT-PCR dan amplifikasi cDNA dengan PCR menggunakan referensi primer dari beberapa penelitian terdahulu, tidak semuanya memberikan hasil positif. Perbedaan sekuens nukleotida genom dengan sekuens primer yang dipilih menyebabkan tidak terjadinya penempelan primer, sehingga gagal melakukan amplifikasi (Suwarno, 2005)

Produk PCR diamati dengan gel elektroforesis dengan menggunakan gel agarose ataupun gel poliakrilamida dan diamati dengan uv-transiluminator. Hasil amplifikasi fragmen gen G menghasilkan nukleotida dengan panjang 210 bp. Penggunaan primer RG-3F dan RG-AR sangat cocok dengan sekuens nukleotida gen G virus reaksi strain alam asal Sulawesi.

Gen penyandi protein G bertugas melekatkan virus ke membran sel host (Conzelmann *et al.*, 1999). Gen penyandi protein G ini juga berfungsi untuk menginduksi Virus Neutralizing Antibody (VNA) dan perlindungan terhadap hewan coba yang disuntik virus Rabies secara intracerebral (Fenner *et al.*, 1993).

6.3 Sekuensing gen G Virus Rabies

Hasil PCR untuk selanjutnya di sekuensing dengan menggunakan primer RG-AR sehingga dapat diketahui urutan nukleotida dari gen G virus Rabies. Pembacaan hasil elektroforesis dimulai dari pita yang terjauh. Pita ini menunjukkan ukuran DNA yang paling kecil dan merupakan rantai yang diakhiri dengan penggabungan dNTP pada posisi pertama cetakan, misalnya ini pada jalur A maka nukleotida pertama pada urutan A. Pita berikutnya yang bergerak paling jauh setelah pita pertama akan sesuai dengan molekul DNA yang lebih panjang satu nukleotida dari pita pertama, misalkan jalur T, maka sampai tahap ini urutan yang terbentuk yaitu AT. Demikian seterusnya sehingga keseluruhannya dapat dibaca (Sambrook *and* Russel 2001).

Pada penelitian ini urutan nukleotida dari hasil sekuensing fragmen gen G pada posisi nt 3984 – 4194 (210 nukleotida) strain alam asal Maros, Sulawesi selatan mengalami mutasi dibandingkan dengan isolat 03003INDO asal Indonesia oleh Bourhy *et al.*, tahun 2003. Sekuensing penelitian isolat tahun 2010 asal Maros, Sulawesi Selatan ini menunjukkan tingkat homologi 90,9 % dengan kontrol positif yang diisolasi oleh Suwarno tahun 2004 isolat asal Sulawesi. Jika dibandingkan dengan Referen isolat 03003INDO asal Indonesia tahun 2003, hasil sequencing ini menunjukkan tingkat homologi 93 %. Jika kontrol positif yang diisolasi oleh Suwarno tahun 2004 isolat asal Sulawesi dibandingkan dengan referen isolat 03003INDO asal Indonesia tahun 2003 menunjukkan tingkat homologi 94,3 %.

Menurut Susetya dkk (2009) yang menganalisis gen G virus rabies asal Indonesia menunjukkan bahwa isolat SN01-23 dari Indonesia lebih erat kaitannya dengan virus rabies dari China daripada virus dari Thailand dan Malaysia. Data

genetik dan latar belakang sejarah menunjukkan bahwa virus rabies di Cina telah dialihkan ke Indonesia melalui anjing yang dibawa oleh manusia yang bermigrasi dari Cina ke Indonesia. Urutan asam amino dari gen G virus rabies lapangan SN01-23 dari Indonesia menunjukkan homologi sebesar 93% di ectodomain gen G dari strain RC-HL, yang digunakan untuk produksi vaksin hewan di Jepang.

Pada penelitian ini urutan urutan basa hasil sekuensing terdapat basa N yaitu basa nukleotida (atau nukleobasa) merujuk pada bagian pada DNA dan RNA yang dapat terlibat dalam pemasangan basa, utamanya adalah cytosine, guanine, adenine (DNA dan RNA), thymine (DNA) dan urasil (RNA), secara berurutan disingkat C, G, A, T, dan U. Dalam genetika, basa nukleotida tersebut biasanya hanya disebut sebagai basa atau basa N (N singkatan dari nitrogen, karena memiliki gugus amina yang beratom nitrogen). Karena A, G, C, dan T muncul pada DNA, molekul-molekul ini disebut basa DNA, sedangkan A, G, C, dan U disebut basa RNA.

Teknologi sekuensing yang umum digunakan saat ini adalah *Dye-terminator sequencing*, di mana *output* alat sekuenser nya adalah puncak puncak yang terdiri atas 4 warna yang mewakili masing-masing nukleotida yaitu hijau untuk adenine (A), merah untuk thymine (T), biru untuk cytosine (C) dan hitam untuk guanine (G). puncak inilah yang dinamakan *electropherogram*. *Electropherogram* ini sudah diinterpretasikan secara otomatis oleh program computer DNA Sekuenser menjadi urutan-urutan basa nukleotida (A-C-G-T), namun masalahnya seringkali program komputer melakukan 'kesalahan' interpretasi pada *electropherogram* yang bermasalah sehingga urutan basa nukleotida yang dihasilkannya pun bisa salah. Hal ini tentu saja berpengaruh terhadap hasil penelitian dan juga analisa lanjutan yang

akan dilakukan terhadap hasil sekuensing tersebut. Mutlak adanya interpretasi manual untuk mencari puncak yang ambigu dan membuang bagian electropherogram yang mengandung terlalu banyak kesalahan yang diinterpretasikan dengan 'N' (Benmansour *et al.*, 2004).

Pada electropherogram hasil sekuensing pada penelitian ini terlihat sedikit gangguan pada dasar tetapi puncak utamanya masih sangat jelas. Ada nya gangguan tersebut sehingga mempengaruhi pembacaan pada komputer. Gangguan seperti itu umum terjadi ketika sinyal sampel sequencingnya terlalu redup, ini bisa dilihat dari 'signal intensity' dari electropherogram yang ada pada windows yang berbeda pada program 'Electropherogram viewer' di komputer atau pada bagian atas hasil print-out electropherogram. Hasil sekuensing seperti itu terbaca dengan puncak yang ambigu menjadi 'N', terkadang spasi yang terlalu lebar juga diartikan sebagai 'N' oleh *software*, padahal secara kasat mata terlihat bahwa tidak ada puncak di bawah 'N' Idealnya satu posisi peak hanya terdiri atas satu warna saja, namun bisa saja terjadi satu posisi diisi oleh lebih dari satu warna peak, biasanya jika produk PCR yang disekuensing berasal dari DNA genom diploid, di mana posisi yang polimorfik akan memunculkan kedua nukleotida secara simultan. Hasil pembacaannya bisa jadi 'N' atau salah satu peak yang lebih tinggi (Benmansour *et al.*, 2004).

Pada penelitian ini referen yang digunakan adalah virus rabies isolat 03003INDO yang diisolasi dari anjing pada tahun 2003 di wilayah Indonesia oleh Bourhy *et al.*, Hasil penelitian dari isolat Maros Sulawesi selatan ini menunjukkan homologi 93 % dibandingkan referen isolat 03003INDO tahun 2003. Mutasi terjadi dengan adanya perubahan beberapa nukleotida saja sehingga disebut sebagai mutasi

titik atau *point mutation*. Pada urutan nukleotida ke 812 dari referen terlihat nukleotida c menggantikan nukleotida t pada hasil penelitian ini. Serta urutan ke 815 terlihat nukleotida a menggantikan nukleotida g. Urutan ke 851 terlihat nukleotida a menggantikan nukleotida g. urutan ke 854 terlihat nukleotida t menggantikan nukleotida c. Urutan ke 866 terlihat nukleotida a menggantikan nukleotida g. Urutan ke 890 terlihat nukleotida t menggantikan nukleotida c. Urutan ke 923 terlihat nukleotida a menggantikan nukleotida g. Urutan ke 926 terlihat nukleotida t menggantikan nukleotida a. Urutan 935 terlihat nukleotida a menggantikan nukleotida g dari hasil penelitian ini.

Kontrol positif dari penelitian ini berasal dari Isolat Sulawesi tahun 2004 yang diisolasi oleh Suwarno (2005). Dari hasil penelitian dibandingkan dengan kontrol positif ini menunjukkan perbedaan beberapa nukleotida. Hal ini juga menunjukkan adanya mutasi titik dari isolat sulawesi tahun 2004 sebagai kontrol positif dibandingkan dengan hasil penelitian tahun 2010 isolat Sulawesi ini.

BAB 7 PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat ditarik kesimpulan bahwa :

1. Gambaran *amplicon* (produk PCR) terhadap fragmen gen G virus rabies isolat Maros Sulawesi Selatan dengan menggunakan primer tertentu memiliki panjang 210 bp.
2. Terdapat perbedaan sekuen nukleotida fragmen gen G virus rabies isolat Maros Sulawesi Selatan, dibandingkan dengan virus rabies isolat Indonesia tahun 2003 memiliki tingkat homologi 93 % serta jika dibandingkan dengan virus rabies isolat Maros Sulawesi Selatan tahun 2004 memiliki tingkat homologi 90,9 %.

7.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disarankan melakukan penelitian lanjutan dari gen G menggunakan primer *full length* susunan nukleotida sehingga menghasilkan sekuensing gen G secara utuh sehingga bisa dimanfaatkan sebagai kandidat vaksin isolat lokal dan sebagai kit diagnostik.

DAFTAR PUSTAKA

- Adjid, R.M.A., Sarosa, T. Syafriati dan Yuningsih. 2005. Penyakit rabies di Indonesia dan pengembangan teknik diagnosis nya. *Wartazoa* 15(4): 165 – 172.
- Agrawal, N., et al. 2003. RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67(4): 657-685.
- Alves L M; Rodrigo M S; Cortez A; Richtzenhain L J; Fumio N I., 2003. Pathogenesis of rabies virus by ERA and PV strains administered orally in hamsters (*M. auratus*). *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* vol.40 no.1 São Paulo 2003.
- Appliedbiosystems. 2010. Manual procedure. <http://www.appliedbiosystems.com/>
- Benmansour A., M. Brahimi C. Tuffereau, P. Coulon, F. Lafay and A. Flamand. 2004. Rapid sequence evolution of street rabies glycoprotein is related to the highly heterogeneous nature of the viral population. *Virology*. Volume 187, Issue 1 , March 1992, Pages 33-45.
- Bourhy H., Reynes J M., Dunham E J., Dacheux I., Holmes E C., 2008. The origin and phylogeography of dog rabies virus. *J. Gen. Virol.* 89.
- Center for Disease Control and Prevention (CDC). 2003. The Rabies Virus. <http://www.cdc.gov> Diakses tanggal 3 Maret 2010
- Center for Disease Control and Prevention. 2009. Introduction CDC rabies. www.cdc.gov/ncidod/dvrd/rabies/the_virus/virus.htm
- Center for Disease Control and Prevention. 2010. virus rabies. www.cdc.gov/
- Charles, L., Stoltenow, K. Solemsaas, M. Niezgod, P. Yager and CE. Rupprecht. 2001. Rabies in an American Bison from North Dakota. *J. Wildlife Diseases*. 96(1): 169-171.
- Conzelmann KK. 1999. Nonsegmented negative-strand RNA viruses: genetics and manipulation of viral genomes. *Annu Rev Genet.* 1999;32:123-62.
- Departemen Pertanian, D.J.P., Direktorat Kesehatan Hewan, 2007. KIAT VETINDO Rabies Kesiagaan Darurat Veteriner Indonesia Penyakit Rabies. Departemen Pertanian, Indonesia.
- Erlich, H.A. 1991. Basic Methodology: In PCR Technology. Principles and Application for DNA Amplification. Stockton Press. 1-5.

- Fatchiyah. 2006. Polymerase Chain Reaction: Dasar Teknik Amplifikasi DNA dan Aplikasinya. Laboratorium Sentral Biologi Molekuler & Seluler. Universitas Brawijaya. Malang.
- Fatchiyah, S. Widyarti, F.I. Arumingtyas. 2006. PCR, RT-PCR dan Real Time PCR. <http://inherent.brawijaya.ac.id/biomol>
- Fenner, FJ., Gibbs, E.P.J., Murphy, F.A., Rott, R., Studdert, MJ., White, D.O. 1993. Rhabdoviridae. In: *Veterinary Virology*. Veterinary Virology. 2nd ed. London: Academic Press. Inc. San Diego, California. pp.523-544.
- Guyatt, K. J., Twin, J., Davis, P., Holmes, E. C., Smith, G. A., Smith, I. L., Mackenzie, J. S., Young, P. L. 2003. A molecular epidemiological study of Australian bat lyssavirus. *J. Gen. Virol.* 84: 485-496
- Hanlon, CA, M. Niezgod, P. Morrill, C.E. Rupprecht. April 2002. Oral Efficacy of an attenuated rabies virus vaccine in skunks and raccoons. *J Wildl Dis.* 2002 Apr;38(2):420-7.
- Jackson AC, Phelan CC, Rossiter JP. 2000. Infection of Bergmann glia in the cerebellum of a skunk experimentally infected with street rabies virus. *Can J Vet Res* 2000; 64:226±228.
- Kill K. 2009. Rabies. *Micobiology.* <http://microbiology2009.wikispaces.com/Rabies>
- Klug, W. S., and M. R. Cummings. 1994. *Concepts of genetics*. 4th edition. Prentice Hall. Englewood cliffs. pp. xvi + 779.
- Kurniadhi, P. 2005. Perbanyak Virus Rabies Standar Galur Challenge Virus Standar sebagai Standar Diagnosis Rabies dengan Uji FAT. *Buletin Teknik Pertanian* Vol.10 No.2.
- Maar T.E. 1999. The Rabies Virus. <http://www.elmhurst.edu/~chm/studentport/maar/RabiesInternet.html> Diakses 20 Juli 2009
- Malik, A., 2005. RNA Therapeutic, Pendekatan baru dalam terapi gen. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, Vol. II, No.2, Agustus 2005, 51 - 61
- Manning SE, Rupprecht CE, Fishbein D, Hanlon CA, Lumlertdacha B, Guerra M, Meltzer MI, Dhankhar P, Vaidya SA, Jenkins SR, Sun B, Hull HF. 2008. Advisory Committee on Immunization Practices Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Human rabies prevention--United States, 2008: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices. *MMWR Recomm Rep.* 2008 May 23;57(RR-3):1-28.
- Modrow, S. and D. Falke. 1997. Rhabdo viren. In: *Molekulare Virology*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin. Pp. 190-202.

- Morimoto, Iwatani, and Kawai. 1993. Shedding of Gs protein (a soluble form of the viral glycoprotein) by the rabies virus-infected BHK-21 cells. *Virology* 195:541-549
- Nidom, C.A, dan G.C. de Vries. 2007. Isolasi DNA Prokariotik Untuk Amplifikasi Genom dengan Polymerase Chain Reaction. Workshop Aplikasi PCR di Bidang Kesehatan dan Kedokteran. FKH Unair. Surabaya.
- Pratiwi, R. 2001. Mengenal Metoda Elektroforesis. *Oseana*. Volume XXVI. Nomor 1 : 25-31.
- Rantam, F.A. 2007. Dasar-Dasar Polymerase Chain Reaction. Workshop Aplikasi PCR di Bidang Kesehatan dan Kedokteran. FKH Unair. Surabaya.
- Ronohardjo, P dan Hastiono, S. 1990. Standarisasi Diagnosa Rabies. *Balivet Newsletter*. Vol. 2 No. 2 Bogor.
- Sambrook and David W. Russel. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN 0-87969-576-5. Chapter 8: In vitro Amplification of DNA by the Polymerase Chain Reaction
- Simanjuntak, and Suroso. 1996. Rabies epidmiology and elimation programe in Indonesia. Meeting of Optimalization of Rabies Elimination Programe Through Regional Animal Health Information System. Yogyakarta, Oktober. 18-19
- Soejoedono, R.R. 2005. Status zoonosis di Indonesia. Pros. Lokakarya Nasional Penyakit Zoonosis. Puslitbang Peternakan, Bogor.
- Soeharsono. 2002. Zoonosis, Penyakit Menular dari Hewan ke Manusia. Kanisius. Yogyakarta. pp. 115 – 119.
- Susanto, A.H. 2008. Sekuensing DNA. <http://www.biomol.wordpress.com/bahan-ajar/sekuensing-dna>
- Susetya H, Ito Naoto, Makoto Sugiyama, and Nobuyuki Minamoto. 2009. Genetic Analysis of Glycoprotein Gene of Indonesian Rabies Virus. *Indonesian Journal of Biotechnology* © 2009 Biotechnology, Gadjah Mada University
- Suwarno. 2005. Karakterisasi Molekuler Protein Serta Gen Penyandi Nucleoprotein dan Glycoprotein Virus Rabies dari beberapa Daerah Geografik di Indonesia. Disertasi. Program Doktor Ilmu Kedokteran. Program PascaSarjana. Universitas Airlangga. Surabaya.

- Suwarno. 2007. Isolasi RNA/DNA untuk tujuan Identifikasi Fragment/Full Genom Organisme dengan Polymerase Chain Reaction. Workshop Aplikasi PCR di Bidang Kesehatan dan Kedokteran. FKH Unair. Surabaya.
- WHO. 2002. Expert Committee on Rabies. 8th Report, WHO Technical Report Series. No. 824. Genewa.
- WHO. 2006. Rabies Bulletin Europe: Transmission and pathogenesis of rabies virus. <http://www.who-rabies-bulletin.org>.
- WHO. 2008. Rabies Bulletin Europe: Transmission and pathogenesis of rabies virus. <http://www.who-rabies-bulletin.org>
- Wilkinson, L., 2002. History. In: Jackson, A.C., Wunner, W.H. (Eds.), RABIES. Elsevier Science (USA), London, UK, pp. 1-21.
- Windyaningsih, 2004. The Rabies Epidemic on Flores Island, Indonesia (1998-2003). J Med Assoc Thai Vol.87 No.11.
- Wunner, W.H., 2002. Rabies Virus. In: Jackson, A.C., Wunner, W.H. (Eds.), RABIES. Elsevier Science (USA), London, UK, pp. 23-61.

Lampiran 2. Hasil Sekuensing Sampel dengan Kode 5.452



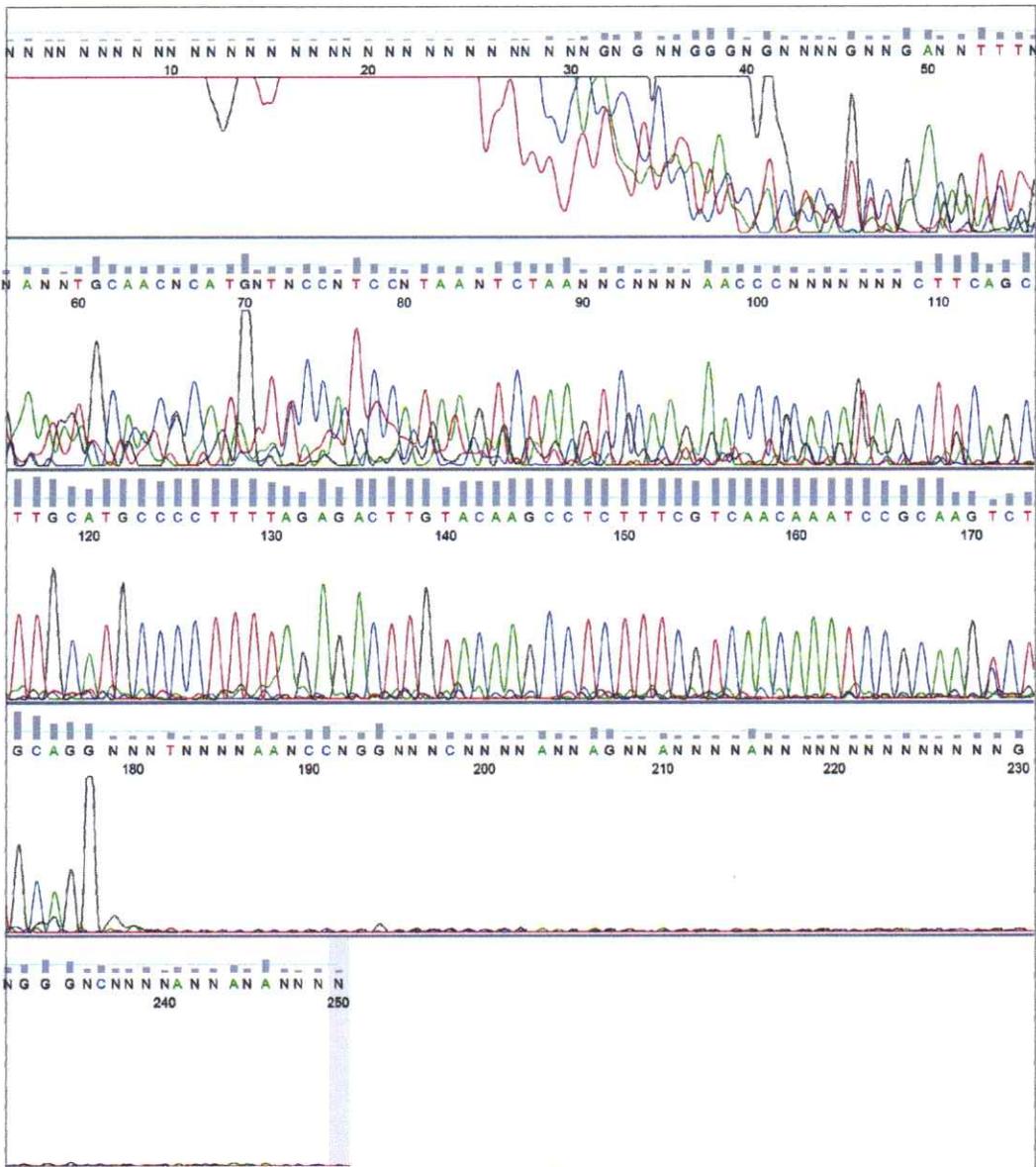
PUSAT VETERINARIA FARMA
JL. A.YANI NO 68-70 SURABAYA
Telp : (031)8291124, 8291125
Fax : (031) 8291183
Email : pusvetma@deptan.go.id



File: 2010-12-17_Rabies_4_RGAR_17_12_2010_002.ab1

Sample Name: Rabies_4_RGAR_17_12_2010
Mobility: KB_3130_POP7_BDTv3.mob
Spacing: -14.4569
Comment: n/a

Signal Strengths: A = 295, C = 365, G = 388, T = 341
Lane/Cap#: 2
Matrix: n/a
Direction: Native



Printed: Dec 23, 2010 8:47AM

FinchTV v.1.4.0

Page 1 of 1

PUSVETMA PRODUSEN VAKSIN DAN ANTIGEN BERKUALITAS