

# **DISERTASI**

## **KARAKTERISASI MOLEKULER PROTEIN SERTA GEN PENYANDI NUKLEOPROTEIN DAN GLIKOPROTEIN VIRUS RABIES DARI BEBERAPA DAERAH GEOGRAFIK DI INDONESIA**



**SUWARNO**

**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2005**

**KARAKTERISASI MOLEKULER PROTEIN SERTA GEN  
PENYANDI NUKLEOPROTEIN DAN GLIKOPROTEIN  
VIRUS RABIES DARI BEBERAPA DAERAH  
GEOGRAFIK DI INDONESIA**

**DISERTASI**

**Untuk memperoleh Gelar Doktor  
Dalam Program Studi Ilmu Kedokteran  
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga  
Telah dipertahankan di hadapan  
Panitia Ujian Doktor Terbuka  
Pada hari : Kamis  
Tanggal : 1 Desember 2005  
Pukul 10.<sup>00</sup> WIB**

**Oleh :**

**SUWARNO  
NIM. 099913651- D**

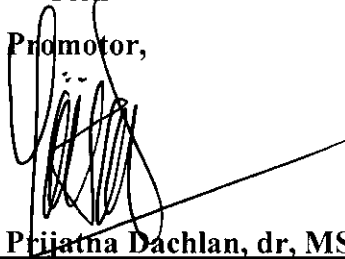
**Lembar Pengesahan**

**DISERTASI INI TELAH DISETUJUI**

**Tanggal 3 Oktober 2005**

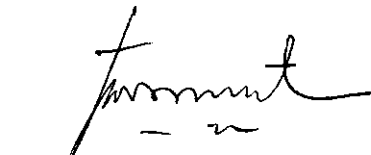
**Untuk Ujian Tahap I**

Oleh  
Promotor,



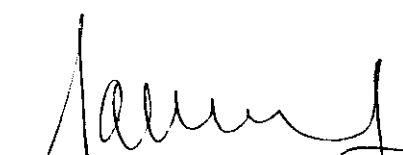
**Prof Dr H Yoes Prijatna Dachlan, dr, MSc**  
NIP:130359278

**Kopromotor I,**



**Dr Wayan T. Artama, drh**  
NIP : 130703605

**Kopromotor II,**



**Dr Fedik A. Rantam, drh**  
NIP : 131653434

**Mengetahui**  
**Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran**  
**Program Pascasarjana Universitas Airlangga,**



**Prof Dr Mandojo Rukmo, drg, MSc, SpKG**  
NIP: 130675839

**Telah diuji pada Ujian Tahap I  
Tanggal 3 Oktober 2005**

---

PANITIA PENGUJI DISERTASI

Susunan Tim Penguji

**Ketua** : Prof. Soetjipto, dr. MS., PhD.

**Anggota** : 1. Prof. Dr. H. Yoes Prijatna Dachlan, dr., MSc.

2. Dr. Wayan T. Artama, drh.

3. Dr. Fedik A. Rantam, drh.

4. Prof. Kuntoro, dr. MPH., Dr.PH.

5. Widya Asmara, drh., SU., PhD.

6. Dr. Eddy Bagus Wasito, dr., MS., SpMK.

# UCAPAN TERIMA KASIH

## UCAPAN TERIMA KASIH

Syukur alhamdulillah saya panjatkan ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat, taufik, hidayah dan inayah-Nya, sehingga sampai saat ini saya masih dapat menikmati indahnya dunia. Tidak lupa sholawat dan salam untuk junjungan kita nabi Muhammad SAW. beserta seluruh keluarga dan para sahabatnya.

Berkat bimbingan dan petunjuk-Nya, maka disertasi yang berjudul: "Karakterisasi Molekuler Protein serta Gen Penyandi Nukleoprotein dan Glikoprotein Virus Rabies dari Beberapa Daerah Geografik di Indonesia" dapat saya selesaikan. Meski dengan pasang-surut, maju-mundur, dan jatuh-bangun, namun dengan segala kerendahan hati dan berkat karunia-Nya, semua penghalang dan aral yang melintang dapat saya singkirkan. Semoga dengan selesainya disertasi ini dapat lebih mendekatkan diri kepada-Nya. Amin.

Berbagai pihak telah banyak membantu dalam penyelesaian disertasi ini. Untuk itu dalam kesempatan yang sangat berbahagia ini saya mengucapkan terima kasih yang setulus-tulusnya, yang tidak dapat saya rangkaikan dengan kata, atas semua bantuan serta budi baik, kepada :

Prof Dr H Yoes Prijatna Dachlan, dr, MSc, selaku promotor, yang telah banyak meluangkan waktu, tenaga dan pikiran, memberikan bimbingan, petunjuk pengarahan, dorongan serta wawasan keilmuan selama saya mengikuti pendidikan Program Doktor sampai penulisan disertasi ini. Kebaikan budi Bapak akan selalu saya kenang.

Dr Wayan Tunas Artama, drh, selaku kopromotor I, atas segala tenaga dan pikiran untuk membimbing, memberikan tambahan keilmuan, saran dan

pengarahan materi, serta dorongan selama kami mengikuti pendidikan Program Doktor hingga penulisan disertasi ini. Ketulusan hati Bapak akan sangat meresap ke dalam sanubari saya.

Dr Fedik Abdul Rantam, drh, selaku kopromotor II, yang dengan penuh semangat telah memberikan dorongan moril, saran dan pengarahan hingga selesainya penulisan disertasi ini. Jiwa kesemangatan Bapak akan saya jadikan pemicu dalam menyikapi setiap problem kehidupan.

Pemerintah Republik Indonesia cq. Menteri Pendidikan Nasional melalui Proyek BPPS, yang telah memberikan kesempatan dan bantuan dana pendidikan kepada saya dalam mengikuti pendidikan Program Doktor pada Program Pascasarjana, Universitas Airlangga, Surabaya.

Rektor Universitas Airlangga, Prof Dr Med Puruhito, dr, SpB, TKV, dan mantan Rektor Universitas Airlangga Prof H Soedarto, dr, DTM&H, PhD, yang telah memberikan kesempatan dan fasilitas kepada saya untuk mengikuti pendidikan Program Doktor pada Program Pascasarjana, Universitas Airlangga, Surabaya.

Direktur Program Pascasarjana, Universitas Airlangga, Prof Dr H Muhammad Amin, dr, SpP(K), dan mantan Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Prof Dr H R Soedijono Tirtowidardjo, dr, SpTHT(K), yang telah menerima dan memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti pendidikan ini.

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Prof Dr Ismudiono, drh, MS, yang telah memberikan ijin dan dorongan untuk mengikuti pendidikan Program Doktor pada Program Pascasarjana, Universitas Airlangga.

# RINGKASAN



## RINGKASAN

### KARAKTERISASI MOLEKULER PROTEIN SERTA GEN PENYANDI NUKLEOPROTEIN DAN GLIKOPROTEIN VIRUS RABIES DARI BEBERAPA DAERAH GEOGRAFIK DI INDONESIA

Suwarno

Rabies disebabkan oleh virus yang bersifat neurotropik termasuk genus *Lyssavirus* dari famili *Rhabdoviridae*. Rabies ditularkan pada semua hewan mamalia. Di Indonesia rabies tersebar secara endemik di Pulau Sulawesi, Nusa Tenggara, Kalimantan dan Sumatera. Program vaksinasi dan eliminasi yang dilakukan belum dapat mengatasi masalah.

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan pertumbuhan virus rabies strain alam dari daerah geografik berbeda di Indonesia (Pulau Sulawesi, Nusa Tenggara, Kalimantan dan Sumatera), berat molekul protein-N dan G serta imunogenesitas protein-N dan G, dibandingkan antara strain alam dengan virus strain laboratorium (*fixed* dan CVS). Tujuan kedua adalah menentukan variasi sekuens nukleotida dari fragmen gen-N dan gen-G, untuk mengetahui korelasi pada tingkat homologi di antara sesama strain.

Penelitian ini dibagi menjadi beberapa tahap, yakni karakterisasi biologik virus rabies pada kultur sel neuroblastoma dan identifikasinya dengan uji *indirect sandwich* ELISA dan *direct* FAT. Protein kemudian dikarakterisasi melalui teknik SDS-PAGE dan imunoblot. Imunogenesitas protein sandi diuji-cobakan pada mencit. Karakterisasi molekuler dilakukan dengan teknik RT-PCR dan analisis genetik dilakukan terhadap produk PCR. Sekuens nukleotida virus rabies isolat lokal dibandingkan dengan virus standart dari *GenBank* dengan *GenMac* versi 8.0.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pertumbuhan virus rabies pada kultur sel neuroblastoma sangat bervariasi, berbeda menurut asal daerah geografik dan tingkat pasase, serta interaksi keduanya. Pertumbuhan virus rabies strain alam dari Sulawesi, Nusa Tenggara, Kalimantan dan Sumatera berbeda sangat bermakna ( $p < 0,01$ ) terhadap nilai *Optical Density* (OD) pada pasase pertama sampai ketiga.

Berat molekul protein-N dan G, berturut-turut adalah 56,2-58,2 kDa dan 66,7-69 kDa. Hasil uji imunogenesitas protein-N dan G sangat bervariasi, berbeda menurut asal daerah geografik dan waktu pengamatan, serta interaksi keduanya. Uji imunogenesitas protein-N dan G menunjukkan perbedaan sangat bermakna ( $p < 0,01$ ) terhadap nilai OD antibodi yang diinduksi dengan protein-N maupun protein-G. Hasil analisis produk PCR menunjukkan panjang fragmen genom 406 bp untuk gen-N dan 210 bp untuk gen-G. Dibandingkan dengan sekuens nukleotida virus referen dari *GenBank* menunjukkan virus rabies strain Indonesia memiliki tingkat homologi sekitar 79,7–96,8% untuk gen-N dan 87,5–93,6 % untuk gen-G.

# ABSTRACT

**ABSTRACT****MOLECULAR CHARACTERIZATION OF PROTEIN AND GENOME CODING FOR NUCLEOPROTEIN AND GLYCOPROTEIN RABIES VIRUS FROM SEVERAL GEOGRAPHICAL AREAS IN INDONESIA****Suwarno**

The objectives of this study is to determine the growth of rabies virus street strain from the different geographical area of Indonesia (the island of Sulawesi, Nusa Tenggara, Kalimantan and Sumatera), the molecular weight of N and G proteins and the immunogenicity of the N and G proteins, was compared between street strains and virus from laboratory (fixed and CVS strain). The second study is to determine the nucleotide sequence variation of the fragment N and G genes for the correlation of homology group.

This study was divided on several stages, including biological characterization of rabies virus in neuroblastoma cell lines, identification of virus by indirect sandwich ELISA and direct FAT, and protein characterization by SDS-PAGE and immunoblot. The immunogenicity of protein coding was applied in mice. Molecular characterization by RT-PCR assays and genetic analysis was performed in PCR products. The nucleotide sequences in this report have been submitted to GenBank by GenMac version 8.0.

The results showed that the growth of rabies virus strain from Sulawesi, Nusa Tenggara, Kalimantan, Sumatera and laboratory strain were significant different ( $p < 0.01$ ) of optical density antigen at the first and third passage. The molecular weight of the protein N and G protein was 56.2-58.2 kDa and 66.7-69 kDa in respectively. Immunogenicity test of proteins in mice showed significant different ( $p < 0.01$ ) of optical density antibody induced by N and G protein. The PCR product analysis of 406 bp fragment of the N gene and 210 bp fragment of the G gene represented the molecular study done in Indonesia. Comparison of the sequence of rabies virus street isolate with the sequence of reference virus for GenBank showed 79.7-96.8 % (N genes) and 87.5-93.6% (G genes) homology.

**Key words:** Rabies virus, Indonesian isolates, biological characteristic, geographical distribution, nucleotide sequence.