

Kombinasi *One-step Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)* dan *Nucleic Acid Lateral Flow (NALF)* sebagai Metode Deteksi Gen *env-tm* Virus Jembrana Strain Tabanan 1987

Combination of One-step Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and NALF (Nucleic Acid Lateral Flow) Methods to Detect env-tm Gene of Jembrana Virus Tabanan 1987 strain

Asmarani Kusumawati^{1,2,*}, Fatimah²

¹Departemen Obstetri dan Reproduksi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

²Program Studi Bioteknologi, Sekolah Pascasarjana, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

*Email: kartapati_2008@yahoo.com

Naskah diterima : 29 Agustus 2017, direvisi 28 Desember 2017, disetujui 10 November 2018

Abstract

Jembrana disease is an acute viral disease in Bali cattle that have short incubation period, high mortality and morbidity rate. Early diagnostic methods are needed to prevent the further spreading of this disease. In this study, we combined One-step RT-PCR and NALF methods to detect *env-tm* gene of Jembrana virus Tabanan 1987 strain. Viral RNA isolated from a spleen of the infected cattle was used as the template. One-step RT-PCR procedure was performed using oligoprobes labeled digoxigenin and right primer sequence that were designed using the primer3plus program based on the conserved region of *env-tm* gene from NCBI database. The product of one-step RT-PCR was tested using NALF method instead of electrophoresis. Positive result was shown by the appearance of dark lines on the test line of digoxigenin in NALF dipstick device.

Key words : digoxigenin; *env-tm* gene; Jembrana disease virus Tabanan 1987 strain; NALF; RT-PCR

Abstrak

Virus Jembrana merupakan suatu penyakit viral akut yang menyerang ternak sapi, khususnya sapi Bali. Penyakit ini memiliki masa inkubasi yang pendek, tingkat mortalitas dan morbiditas yang tinggi. Metode diagnostik dini virus Jembrana diperlukan sebagai salah satu upaya untuk penanggulangan penyebaran dan tingkat kematian ternak akibat penyakit Jembrana. Pada penelitian ini dilakukan kombinasi metode *one-step* RT-PCR dan NALF untuk mendeteksi virus Jembrana strain Tabanan 1987 dengan target gen *env-tm*. RNA viral yang diisolasi dari organ limpa sapi yang terserang penyakit Jembrana 1987 digunakan sebagai *template*. *One-step* RT-PCR dilakukan menggunakan oligoprobe berlabel digoxigenin dan sekuen primer *right* yang didesain menggunakan program primer3plus berdasarkan pada daerah *conserved* gen *env-tm* dari NCBI. Hasil *One-step* RT-PCR kemudian dilakukan pengecekan menggunakan metode NALF sebagai pengganti elektroforesis. Hasil positif tervisualisasi dengan munculnya garis berwarna gelap pada garis uji digoxigenin pada perangkat *dipstick* berbasis metode NALF.

Kata kunci : digoxigenin; gen *env-tm*; virus Jembrana strain Tabanan 1987; NALF; RT-PCR

Pendahuluan

Penyakit Jembrana merupakan salah satu penyakit viral akut yang disebabkan oleh virus Jembrana. Virus jembrana termasuk salah satu dari anggota genus *lentivirus*, yang termasuk di dalamnya; *bovine immunodeficiency virus* (BIV), *human immunodeficiency virus type 1* (HIV-1), *human*

immunodeficiency virus type 2 (HIV-2), *simian immunodeficiency virus* (SIV), *feline immunodeficiency virus* (FIV), *maedi-visna virus* (MVV), *caprin arthritis encephalitis virus* (CAEV) dan *equine infectious anemia virus* (EIAV). Virus penyakit Jembrana (JDV) menyerang pada sapi terutama pada sapi Bali. Pada awalnya, virus ini

Asmarani Kusumawati, *et. al.*

pertama kali diidentifikasi di Bali pada tahun 1964 (Kertayadnya *et al.*, 1993), namun sekarang penyakit telah menyebar ke beberapa wilayah di Indonesia, yaitu; Sumatera, Jawa Timur, dan Kalimantan (Hartaningsih *et al.*, 1993; Wilcox, 1997). Penyakit Jembrana memiliki tingkat kematian yang tinggi, mencapai 98% (Ramachandran, 1996), masa inkubasi yang singkat yakni 5-12 hari (Soeharsono *et al.*, 1995) dan keberadaan virus yang masih terdeteksi 2 tahun setelah sapi dinyatakan sembuh (Soeharsono *et al.*, 1990).

Pada tahun 2016 pemerintah melalui Kementerian Pertanian meluncurkan program Upaya Khusus Percepatan Populasi Sapi dan Kerbau Bunting (Upsus Siwab), sebagai upaya pemenuhan kebutuhan sapi potong. Usaha untuk mempercepat peningkatan populasi tidak mudah, ada beberapa masalah dalam peternakan sapi, di antaranya tingkat kelahiran sapi yang rendah dan serangan penyakit. Berdasarkan keputusan Menteri Pertanian pada tahun 2013, menyebutkan bahwa virus Jembrana merupakan salah satu penyakit hewan menular strategis di Indonesia.

Penanggulangan penyakit Jembrana dapat dilakukan dengan mengembangkan deteksi dini virus Jembrana pada sapi. Metode RT-PCR merupakan suatu metode amplifikasi yang mengkombinasikan antara sintesis cDNA dan PCR (dos Santos *et al.*, 2004). Metode RT-PCR cocok digunakan untuk mendeteksi dan kuantifikasi ekspresi mRNA, dan RNA (dos Santos *et al.*, 2004). Metode RT-PCR juga merupakan metode yang paling sensitif untuk mengamplifikasi molekul asam nukleat, serta mampu mendeteksi gen yang memiliki level ekspresi yang rendah (Shiao, 2003). Metode RT-PCR berdasarkan pada tahapan kerjanya dapat dibagi menjadi dua jenis, yaitu *one-step* RT-PCR dan *two-step* RT-PCR. Letak perbedaan kedua metode tersebut terletak pada reaksinya. *One-step* RT-PCR proses reaksi sintesis

cDNA dan PCR berjalan langsung dalam satu tabung dan prosesnya tidak terpisah, sedangkan *two step* RT-PCR proses sintesis cDNA berjalan sendiri dan kemudian cDNA ditambahkan pada reaksi PCR (Wacker and Michael, 2005). Metode *one-step* RT-PCR memiliki, beberapa kelebihan, yaitu persiapan lebih cepat, lebih murah, kesalahan *pipetting* lebih rendah, dan kontaminasi yang rendah (Wacker and Michael, 2005). Virus Jembrana memiliki genom berupa *single strand RNA* (Chadwick *et al.*, 1995; Kusumawati *et al.*, 2014), sehingga metode *one-step* RT-PCR cocok digunakan untuk mendeteksi virus Jembrana.

Metode NALF merupakan suatu metode hibridisasi spesifik asam nukleat dari amplicon dengan *probe* komplemen yang diimobilisasi (Posthuma-Trumpie *et al.*, 2008). Metode NALF merupakan aplikasi dari metode *Lateral Flow Assay* (LFA) yang memiliki prinsip kerja mengalirkan cairan melalui membran (Posthuma-Trumpie *et al.*, 2008). Prinsip kerja tersebut sama dengan aplikasi metode LFA yang lain, yaitu *Lateral Flow ImmunoAssay* (LFIA) dan *Nucleic Acid Lateral Flow Immunoassay* (NALFIA). Perbedaan antara metode tersebut terletak pada prinsip kombinasi pengikatan antigen dan antibodi dan *double-strand amplicon* (*ds-amplicon*) dengan tag label spesifik. Metode NALF merupakan suatu metode hibridisasi spesifik asam nukleat dari amplicon dengan *probe* komplemen yang diimobilisasi (Posthuma-Trumpie *et al.*, 2008). Pada penelitian yang dilakukan Haridas *et al.* (2014), metode NALF dapat digunakan untuk mendeteksi hasil amplifikasi DNA *Mycobacterium tuberculosis*. Penelitian lain yang dilakukan Rohrman *et al.* (2012) menunjukkan bahwa LFA dapat digunakan untuk kuantifikasi hasil amplifikasi RNA virus HIV-1. Berdasarkan pada acuan dari kedua jurnal tersebut, dapat diambil hipotesis bahwa kombinasi *one-step* RT-PCR dan NALF

mampu mendeteksi gen *env-tm* virus Jembrana strain Tabanan 1987 dan dapat dikembangkan sebagai metode diagnostik dini virus Jembrana.

Materi dan Metode

Perancangan Primer dan Oligoprobe

Perancangan primer dan oligoprobe diawali dengan melakukan *alignment* gen *env-tm* dari 7 strain virus Jembrana (Kalimantan 2001, Pulukan 2001, Tabanan 2001, Negara 2004, Negara 1999, Badung 2004, dan Badung 1999) dan sekuens penuh genom virus Jembrana strain Tabanan 1987. Data sekuens tersebut diperoleh dari *database* NCBI. *Alignment* dilakukan menggunakan program CLC Main Workbench 6.8.1. Hasil daerah gen *env-tm* yang memiliki tingkat konservasi tinggi dipilih sebagai daerah target amplifikasi primer dan oligoprobe. Primer dan oligoprobe dirancang menggunakan program Primer3plus.

Isolasi RNA Viral

RNA viral diisolasi dari organ limpa sapi yang terinfeksi virus Jembrana strain Tabanan 1987. Isolasi dilakukan dengan menggunakan kit *High Pure Viral RNA* (Roche), sesuai prosedur perusahaan. RNA hasil isolasi dilakukan pengukuran untuk mengetahui konsentrasi RNA *viral* dengan menggunakan perangkat *nanodrop*. RNA *viral* kemudian disimpan pada suhu -32.

One-step RT-PCR

Uji *One-step* RT-PCR diawali dengan membuat *master mix* 1 kali reaksi ($2 \times$ *react mix* 12.5 μ l, superscript 0.5 μ l, $MgSO_4$ 2 μ l) kit *Superscript III One step RT-PCR System with platinum Taq DNA polymerase* (Invitrogen). *Master mix* ditambahkan dengan oligoprobe berlabel digoxigenin (Dig) 1 μ l, primer *Right* 1 μ l, *Nuclease Free Water* 6 μ l, F-12 UTP

2.4 μ l, dan terakhir ditambahkan sampel RNA viral 2 μ l. Campuran tersebut kemudian direaksikan dengan menggunakan alat *thermalcycler*.

Nucleic Acid Lateral Flow

Metode NALF dilakukan dengan cara mencampurkan 10 μ L amplikon hasil reaksi *One-step* RT-PCR dengan 20 μ L *buffer assay* kit *dipstick* (HybriDetect 2T, Milenia Biotec), dilanjutkan dengan pencelupan *dipstick*. Hasil dapat diamati dalam jangka waktu 5 menit setelah pencelupan.

Hasil dan Pembahasan

Isolasi RNA viral

Berdasarkan pengukuran menggunakan perangkat *nanodrop*, hasil isolasi RNA *viral* dari 50 mg organ limpa sapi yang terinfeksi virus Jembrana strain Tabanan 1987 didapatkan konsentrasi RNA *viral* sebesar 124,33 ng/ μ l.

Sampel RNA viral diisolasi dari organ limpa sapi yang terinfeksi virus Jembrana strain Tabanan 1987. Organ limpa dipilih sebagai sampel untuk memperoleh RNA virus karena limpa merupakan tempat virus Jembrana berkolonisasi pada awal infeksi. Limpa memiliki peranan sebagai *reservoir* sebelum virus menyebar pada jaringan dan organ lain: limponodus, paru-paru, hati, ginjal, dan sumsum tulang (Desport & Joshua, 2010). Hasil isolasi RNA viral kemudian dilakukan pengukuran konsentrasi RNA menggunakan perangkat *nanodrop*. Konsentrasi RNA *viral* hasil isolasi lebih rendah dari pada konsentrasi RNA virus pada fase akut. Berdasarkan pada Ditcham *et al.*, (2009) pada fase akut konsentrasi virus Jembrana dapat mencapai 10^6 genom/ μ l. Hasil RNA *viral*, diamplifikasi menggunakan metode *one-step* RT-PCR dengan target amplifikasi gen *env-tm*. Gen *env-tm* pada virus Jembrana merupakan salah satu gen struktural pada virus Jembrana (Kusumawati *et al.*,

2014). Gen *env-tm* dalam proses translasinya mengalami pemotongan sehingga terbentuk 2 protein, yaitu: SU (*Surface Protein*) dengan panjang asam amino 422 dan TM (*Transmembran Protein*) dengan panjang asam amino 359 (Kusumawati et al., 2014; Kusumawati et al., 2010; Chadwick et al., 1995).

Reaksi amplifikasi gen *env-tm* menggunakan metode *onestep* RT-PCR

Amplifikasi gen *env-tm* dengan reaksi *one-*

Tabel 1. Sekuens primer dan oligoprobe berlabel digoxigenin

Primer/Probe	Sekuen	Posisi	Panjang /bp
Left	5'CACCTGGCAACAATGGATGT 3'	1611	20
Right	5'TGCACTGGAGGACCTTAAAT 3'	1849	20
<i>env-tm</i> probe berlabel digoxigenin	5'-/5DigN/TGGGGTAGTTGGGTGGATAA 3'	1771	20+digoxigenin

Primer dan oligoprobe hasil desain mengamplifikasi gen *env-tm* dengan panjang ± 238 bp. Primer tersebut dapat digunakan untuk mendeteksi gen *env-tm* dari 8 strain virus Jembrana, karena dalam proses perancangan primer dilakukan *alignment* dan dipilih daerah dengan tingkat konservasi yang tinggi dan tidak memiliki perbedaan yang signifikan pada susunan basa nukleotida dari keseluruhan strain. Pada reaksi *one-step* RT-PCR juga ditambahkan F-12 UTP yang berfungsi sebagai pengganti *Fluorescein Isothianat* (FITC). F-12 UTP nantinya akan bereaksi dengan *colloidal gold* yang terdapat pada perangkat *dipstick*. Reaksi tersebut menyebabkan timbulnya warna pada daerah *test-line* dan *control line*.

Visualisasi ampikon pada perangkat *dipstick* berbasis metode NALF

Hasil amplifikasi reaksi *one-step* RT-PCR divisualisasi menggunakan perangkat *dipstick* (HybriDetect 2T, Milenia Biotec), berbasis metode NALF. Pada kit *dipstick* tersebut memiliki 2 *test-line*, yaitu; *test-line* biotin dan *test-line* digoxigenin. Dalam penelitian ini, ampikon yang terbentuk

step RT-PCR dilakukan dengan menggunakan primer dan oligoprobe spesifik berlabel digoxigenin untuk mengamplifikasi gen *env-tm* yang didesain menggunakan program online Primer3plus. Penambahan label digoxigenin pada oligoprobe bertujuan agar ampikon dapat berikatan dengan molekul anti-dig pada *test-line* perangkat *dipstick* pada visualisasi dengan NALF. Sekuens primer dan oligoprobe hasil desain menggunakan program Primer3plus tersaji pada Tabel 1.

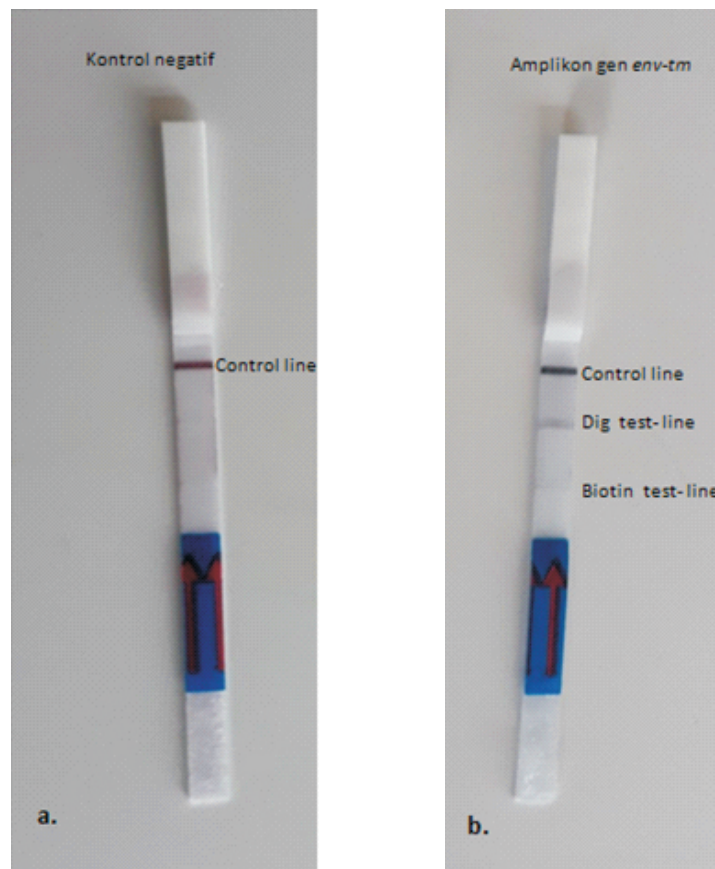
menggunakan label digoxigenin akan berikatan dengan anti-dig yang terdapat pada *test-line*, dan akan muncul warna yang disebabkan reaksi F-12 UTP dengan *colloidal gold*. Pada penelitian ini digunakan digoxigenin sebagai label, dikarenakan digoxigenin memiliki sensitifitas 10 kali lebih besar jika dibandingkan dengan penggunaan biotin, dalam mendeteksi hasil PCR (Dayanghirang & Masanori, 1993). Berdasarkan pada hasil pengujian menggunakan *dipstick* (Gambar 1) menunjukkan hasil positif, ditandai dengan munculnya 2 garis, yaitu: pada *test-line* digoxigenin dan pada kontrol *line*. Hasil positif pada visualisasi ampikon menggunakan metode NALF menunjukkan bahwa metode *one-step* RT-PCR dapat dikombinasikan dengan metode NALF.

Penggunaan metode NALF untuk visualisasi ampikon relatif lebih cepat jika dibandingkan dengan visualisasi menggunakan elektroforesis pada gel agarosa. Visualisasi menggunakan elektroforesis pada gel agarosa membutuhkan waktu sekitar 1 jam, untuk melihat hasil uji, sedangkan dengan metode NALF hanya membutuhkan waktu sekitar 5 menit untuk menunggu cairan terabsorpsi dan mengalir

pada daerah garis uji dan kontrol pada perangkat *dipstick*.

Metode NALF selain dapat digunakan untuk memvisualisasikan amplicon hasil PCR, juga dapat digunakan untuk memvisualisasikan amplicon hasil amplifikasi isothermal, seperti; *Reverse-Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification* (RT-LAMP). Berdasarkan Andrade & Lightner., (2009) menyatakan hasil produk amplifikasi *Infectious Myonecrosis Virus*

(IMNV) menggunakan RT-LAMP dapat dideteksi menggunakan metode NALF, dan dapat mempersingkat waktu diagnosis. Pada kasus *multidrug-resistant tuberculosis* (MDR-TB) metode PCR dan NALF dikombinasikan dan dikembangkan sebagai salah satu metode alternatif dan sebagai metode deteksi molekuler secara cepat, yang hasilnya terbukti mempercepat hasil deteksi dan lebih murah (Kamphee *et al.*, 2015).



Gambar 1. Pengujian hasil amplifikasi gen *env-tm* dengan metode NALF. (a.) Kontrol negatif dari sampel darah sapi sehat, (b.) Amplikon gen *env-tm*

Kesimpulan

Berdasarkan pada hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa metode *one-step* RT-PCR dapat dikombinasikan dengan metode NALF mampu mendeteksi gen *env-tm* virus Jembrana strain Tabanan 1987. Kombinasi metode *one-step* RT-PCR dengan metode NALF, dapat digunakan sebagai metode diagnostik dini virus Jembrana, karena mampu

mendeteksi konsentrasi virus dalam jumlah yang lebih kecil dari konsentrasi virus pada fase akut.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih diucapkan kepada Menristek Dikti yang telah mendanai penelitian ini melalui skim Program Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi (PUPT) tahun anggaran 2015-2018.

Daftar Pustaka

- Andrade, T. P. D, and Lightner, D. V. 2009. Development of a method for detection of infectious myonecrosis virus by reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification and nucleic acid lateral flow hybrid assay. *Journal of Fish Disease* 32.
- Chadwick, B. J., Coelen, R. J., Wilcox, G E., Sammels, L. M., Kertayadnya, G. 1995. Nucleotide sequence analysis of Jembrana disease virus: a bovine lentivirus associated with an acute disease syndrome. *Journal of General Virology* 76: 1637–1650.
- Dayanghirang, J. A. and Masanori, M. 1993. Quantitative determination of PCR products by colorimetric method. *Jpn. J. Leprosy* 62: 21-27.
- Desport, M. and Joshua, L. 2010. Jembrana Disease Virus: host response, viral dynamics, and disease control. *Current HIV Research* 8: 53-65.
- Ditcham, W. G. F., Joshua, R. L., Robert, J. D., Nining, H., Graham, E. W., Moira, D. 2009. Vaccination reduces the viral load and the risk of transmission of Jembrana disease virus in Bali cattle. *Virology* 386: 317-324.
- Dos Santos, C. F., Vivien, T. S., Maria, A. D. A. M., Daniela., N. S., Andrew, S. G. 2004. Reverse transcription and polymerase chain reaction: principles and applications in dentistry. *Journal Applied Oral Science* 12:1-11.
- Hartaningsih, N., Wilcox, G.E., Dharma, D.M., Soetrisno, M., 1993. Distribution of Jembrana disease in cattle in Indonesia. *Veterinary Microbiology* 38: 23–29.
- Kamphée, H., Angkana, C., Therdsak, P., Natpapas, W., Airin, K., Tararaj, D. 2015. Rapid Molecular Detection of Multidrug-Resistant Tuberculosis by PCR-Nucleic Acid Lateral Flow Immunoassay. *PloS ONE* 10: e0137791. doi: 10.1371/journal.pone.0137791.
- Kertayadnya, G., Wilcox, G. E., Soeharsono, S., Hartaningsih, N., Coelen, R. J., Cook, R. D., Collins, M. E., Brownlie, J. 1993. Characteristics of a retrovirus associated with Jembrana disease in Bali cattle. *Journal of General Virology* 74: 1765–1778.
- Kusumawati, A., Pratiwi, R., Astuti, P., Hamid, P. H. 2010. Characterization of envelope-transmembrane gene of jembrana disease virus tabanan 1995 isolate. *Indonesian Journal of Biotechnol* 15: 15–19.
- Kusumawati, A., Tenri, A. W., Rizqa, F. P., Basofi, A. M., Isabellina, D. T. 2014. The structure and function of jembrana disease virus genom. *Journal Infection and Molecular Biology* 2: 26-29.
- Rohrman, B. A., Leautaud, V., Molyneux, E., Richards-Kortum, R. R. 2012. A Lateral Flow Assay for Quantitative Detection of Amplified HIV-1 RNA. *PLoS ONE* 7: e45611. doi:10.1371/journal.pone.0045611.
- Haridas, T. K., Thiruvengadam, S., Bishor, V. I. 2014. Development of a PCR Based Nucleic Acid Lateral Flow Assay Device for Detection of Mycobacterium Tuberculosis Complex. *International Journal of PharmTech Research* 6: 1695-1702.
- Posthuma-Trumpie, GA. Korf, J. And van Amerongen, A. 2008. Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 393: 569–582.
- Ramachandran, S. 1996. Early observations and research on jembrana disease in Bali and other Indonesian Islands. *ACIAR Proceeding* 75: 5-9.
- Shiao, Y. H. 2003. A new reverse transcription-polymerase chain reaction method for accurate quantification. *BMC Biotechnology* 3: 22-34.
- Soeharsono, S., Hartaningsih, N., Soetrisno, M., Kertayadnya, G., Wilcox, G.E. 1990. Studies of experimental Jembrana disease in Bali cattle. I. Transmission and persistence of the infectious agent in ruminants and pigs, and resistance of recovered cattle to re-infection. *Journal of Comparative Pathology* 103: 49-59.
- Soeharsono, S., Wilcox, G. E., Putra, A. A., Hartaningsih, N., Sulistyana, K., Tenaya, M. 1995. The transmission of Jembrana disease, a lentivirus disease of *Bos javanicus* cattle. *Epidemiology and Infection* 115: 367-374.

Wacker, M. J., and Michael, P. G. 2005. Analysis of One-Step and Two-Step Real-Time RT-PCR Using SuperScript III. *Journal of Biomolecular Technology* 16:266–271.

Wilcox, G., 1997. Jembrana disease. *Australian Veterinary Journal* 7:492–493.