
PENGEMBANGAN TEKNIK *REVERSE TRANSCRIPTASE* POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-PCR) UNTUK DIAGNOSIS PENYAKIT RABIES

A. SAROSA, R.M. ABDUL ADJID dan AGUS WIYONO

Balai Penelitian Veteriner, PO Box 151, Bogor 16114

ABSTRACT

Development of Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) for The Diagnosis of Rabies

A Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) has been developed for the diagnosis of rabies. A total of 19 specimens of dog brains that were collected from rabies elimination programme in Padang, West Sumatera were examined by using RT-PCR and fluorescent antibody test (FAT). The result showed the RT-PCR can detect rabies virus antigen in positive control specimens, whereas all brains specimens from Padang were negative both by RT-PCR and FAT. It was concluded that RT-PCR is a sensitive diagnosis tool to detect rabies virus antigen in dog brain specimens and it can be used for the surveillance programme.

Key words: Rabies, diagnosis, RT-PCR

PENDAHULUAN

Rabies merupakan penyakit zoonosis yang sangat berbahaya, karena baik pada hewan maupun manusia selalu berakibat fatal. Kasus rabies di Indonesia pertama kali dilaporkan oleh Schoorl pada tahun 1884, menyerang seekor kuda di daerah Bekasi, kemudian tahun 1889 Esser melaporkan kasus rabies pada kerbau di Bekasi, kemudian tahun 1890 Penning melaporkan kasus rabies pada anjing, sedang kasus rabies pada manusia dilaporkan oleh E.V. de Haan pada tahun 1894 di daerah Cirebon (HARDJOSWORO, 1984).

Sampai dengan tahun 1995, dari 27 propinsi di Indonesia, 20 propinsi masih dinyatakan tertular rabies, sedang 7 propinsi lainnya dinyatakan bebas rabies, yaitu Bali, NTB, NTT, Timor Timur, Kalimantan Barat, Maluku, Irian Jaya serta Pulau-pulau di sekitar Sumatera (ANONIMUS, 1995). Pada tahun 1997, berdasarkan keputusan menteri pertanian No. 892/Kpts TN 560/9/97 tanggal 9 September 1997, Jawa Timur, D.I. Yogyakarta, dan Jawa tengah dinyatakan bebas dari rabies (ANONIMUS, 1998), tetapi pada bulan Februari 1998, kasus rabies muncul di P. Flores, yang sebelumnya secara historis belum pernah tertular rabies. Program pemberantasan rabies di Indonesia secara umum dilakukan dengan jalan vaksinasi dan eliminasi, dengan target cakupan vaksinasi 70% dan eliminasi 30%, tetapi secara spesifik untuk daerah – daerah tertentu ada kebijaksanaan tersendiri yang disesuaikan dengan situasi sosial budaya setempat (ANONIMUS, 1997). Dari hasil penelitian yang dilakukan di Balitvet, dari 98 sampel otak anjing liar yang terjaring pada pelaksanaan program eliminasi di Banjarbaru

Kalimantan Selatan terdapat 5 sampel yang positif rabies (SIDHARTA *et al.*, 1996) sedang di Kotamadya Padang dari 89 sampel terdapat 3 sampel yang positif (SAROSA *et al.*, 1999) sehingga anjing – anjing liar yang berkeliaran di malam hari itu merupakan sumber penularan rabies. Selama ini diagnosis rabies selalu didasarkan pada pemeriksaan histopatologi, pewarnaan Seller, maupun pemeriksaan dengan teknik FAT. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengembangkan teknik RT-PCR untuk diagnosis rabies, karena teknik ini merupakan teknik yang baru dan sangat sensitif.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini melibatkan pemakaian 2 macam teknik diagnosis yaitu *fluorescent antibody test* (FAT) dan *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR).

Sampel

Sampel yang diuji berupa otak anjing-anjing yang terjaring pada pelaksanaan program eliminasi di Kotamadya Padang, Sumatera Barat, yakni sebanyak 19 sampel dari Kecamatan Bungus.

Kontrol reaksi positif dan negatif

Untuk reaksi kontrol Positif baik untuk FAT maupun RT-PCR dipakai otak mencit yang diinfeksi virus rabies galur CVS dan isolat virus rabies yang

diisolasi dari kasus rabies pada kambing di Kodya Padang, sedang kontrol Negatif dipakai otak mencit normal.

Bahan RT-PCR

Primer

Primer yang digunakan terdiri dari :

- Primer N1 sebagai sense (INVITROGEN)
- Primer N2 sebagai antisense (INVITROGEN)

Gen:	Sekuen (5' - 3'):	Posisi Nukleotida
N1 Sense	5'-TTT GAG ACT GCT CCT TTT G-3'	605
N2 Antisense	5'-CC CAT ATA GCA TCC TAC-3'	1013

Sumber: TORDO *et al.* (1996)

FAT

Pemeriksaan otak dengan FAT dilakukan dengan metode yang umum dipakai (VELLECA and FORRESTER, 1981) yaitu dengan pembuatan preparat apus otak (*brain smears*) pada gelas objek yang diwarnai dengan *antinucleocapsid rabies FITC conjugate* (Bio-Rad lab), kemudian dibaca dibawah mikroskop *fluorescent*. Setiap pemeriksaan selalu disertai dengan kontrol positif dan negatif. Reaksi positif pada uji FAT ini ditandai dengan adanya foki yang berwarna hijau berpendar.

Isolasi RNA

Untuk keperluan isolasi RNA sampel otak (50-100 mg) digerus, kemudian disimpan dalam tabung *Eppendorf* 1.5 ml, ditambah *Trizol reagent* (Invitrogen) 1 ml, dicampur homogen, diinkubasikan pada suhu kamar selama 5 menit, kemudian ditambah *khloroform* (Merck) 200 µl (tiap 1 ml *Trizol* ditambah 200 µl *khloroform*), dan digoyang selama 15 detik perlahan-lahan, selanjutnya diinkubasikan selama 3 menit pada suhu kamar, untuk kemudian diputar dengan mikrosentrifuse selama 15 menit. Cairan yang terbentuk di bagian atas diambil, dimasukkan ke dalam *Eppendorf (tube)* 1.5 ml yang baru dan ditambah 500 µl *isopropyl alkohol* (tiap 1 ml *Trizol* + 500 µl *isopropyl alkohol*) diinkubasikan 10 menit dan diputar lagi selama 10 menit.

Cairan yang ada dibuang dan pelet yang tertinggal (berisi RNA) dicuci dengan menambahkan larutan *ethanol* 75% sebanyak 1 ml, kemudian dikocok dengan *Vortex* beberapa detik, dan selanjutnya diputar selama 5

menit pada mikrosentrifus. Cairannya dibuang kemudian tutup tabung dibiarkan terbuka selama 5-10 menit untuk membebaskan pelet dari *ethanol*. Pelet (yang merupakan RNA) sebelum ditambah H_2O sebanyak 25 µl, kemudian disimpan pada *freezer* $-20^{\circ}C$ sebelum diuji.

RT-PCR

RT-PCR dilakukan dengan menggunakan kit *Invitrogen*, sebagai berikut:

Pellet RNA yang diperoleh pada isolasi RNA (3 µl) dicampur dengan primer N1 (sense) 0.5 µl, primer antisense N2 0.5 µl dan DEPC 8 µl. Campuran tersebut dimasukkan ke dalam *thermocycle* $65^{\circ}C/3$ menit. Ke dalam masing-masing tabung tersebut dimasukkan 2 X *reaction mix* (12,5 µl), RT platinum Tag mix 0,5 µl dan mineral oil 25 µl. Campuran tersebut kemudian dimasukkan ke dalam *thermocycle* $45^{\circ}C/90$ menit, selanjutnya disimpan pada suhu $4^{\circ}C$ semalam Tahap berikutnya dilakukan penyimpanan lagi di *thermocycle* dengan program sebagai berikut :

- $94^{\circ}C / 2$ menit (1X)
- $94^{\circ}C / 15$ detik (40 X)
- $45^{\circ}C / 15$ detik (40 X)
- $50^{\circ}C / 15$ detik (40 X)
- $72^{\circ}C / 1$ menit (40 X)
- $72^{\circ}C / 10$ menit (1X)

Elektroforesis

Proses pada elektroferosis dilakukan dengan membuat *gel* agarose 1.8% dalam TE buffer, kemudian ditambah 2,5 µl *ethidium bromida* dari stok 10 mg/ml. Hasil RT-PCR dituangkan pada tempat masing-masing lubang, demikian pula dengan *markernya* (MWM 1 Kb) masing-masing 5 µl. Proses elektroforesis dilakukan pada 50 V selama 100 menit. Hasil elektroforesis ini divisualisasikan dengan *Ultra Violet transimulator*. Hasil RT-PCR positif ditunjukkan dengan adanya *band* pada kira-kira 443 bp. Tidak adanya pembentukan band menunjukkan reaksi negatif RT-PCR.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari pemeriksaan dengan teknik FAT terhadap 19 sampel otak anjing yang terjaring pada pelaksanaan program eliminasi rabies di Kotamadya Padang, semuanya menunjukkan reaksi negatif. (Tabel 1). Hal ini berarti semua otak anjing yang dikoleksi tersebut tidak mengandung virus rabies berdasarkan uji FAT.

Tabel 1. Hasil pengujian dengan FAT dan RT-PCR

Spesimen	FAT	RT-PCR
CVS (Kontrol +)	+	+
KBG (Kontrol +)	+	+
Tikus normal (Kontrol -)	-	-
O 1 – O 19	-	-

O 1 – O 19 = Sampel otak anjing dari Kotamadya Padang

Otak anjing yang telah dikoleksi selain diuji dengan *direct* FAT juga diuji dengan RT-PCR. Sebagaimana diketahui bahwa *primer* yang digunakan pada penelitian ini diambil dari gen N yang merupakan *conserved region* sehingga memungkinkan untuk perbanyakan dengan RT-PCR (TORDO *et al.*, 1996). Pada proses transkripsi genom virus Rabies, gen tersebut diproduksi dalam jumlah banyak, dengan demikian produk mRNAnya cukup untuk menyiapkan *template* cDNA yang selanjutnya digunakan untuk RT-PCR (TORDO *et al.*, 1996)

Tahap awal pengerjaan RT-PCR adalah optimasi keseluruhan sistem. Pada penelitian ini, reagen PCR yang digunakan dan prosedur pengerjaannya adalah sesuai dengan pabrik pembuat Kit (Invitrogen), tetapi program PCR yang digunakan adalah yang sesuai dengan TORDO *et al.* (1996). Selain itu, terhadap prosedur yang dikeluarkan Invitrogen telah dilakukan modifikasi pada proses pengerjaannya, yakni apabila pada prosedur Invitrogen, proses RT dan PCR dilakukan sekaligus, pada penelitian ini inkubasi pada proses RT setelah dilakukan 45⁰C selama 90 menit

maka dilanjutkan dengan diinkubasi 4⁰C semalam. Berdasarkan RT-PCR yang telah dimodifikasi tersebut, maka telah diperoleh hasil positif terhadap sampel kontrol positif yang berasal dari otak mencit yang diinfeksi dengan *challenge virus standard* (CVS), sedangkan kontrol negatif yang berasal dari otak mencit normal menunjukkan hasil negatif. (Tabel 1).

Setelah RT-PCR berhasil digunakan untuk mendeteksi keberadaan virus Rabies pada otak mencit, selanjutnya dimanfaatkan untuk pengujian sampel lapang.

Sampel yang berasal dari kasus rabies pada kambing di Padang, Sumatra Barat yang terjadi pada tahun 1999 kemudian diinfeksi pada mencit di Balitvet. Virus rabies berhasil dideteksi dengan pengujian *direct* FAT baik pada otak kambing maupun pada otak mencit yang diinfeksi dengan suspensi otak kambing tersebut. Pada penelitian ini, dengan pengujian RT-PCR terhadap sampel otak mencit yang diinfeksi dengan otak kambing memberikan hasil positif. Hasil ini mengkonfirmasi hasil pemeriksaan *direct* FAT pada pemeriksaan sebelumnya. Demikian pula dengan otak mencit yang diinfeksi dengan virus rabies galur CVS memberikan hasil serupa (Gambar 1).

Sedangkan hasil pengujian RT-PCR terhadap sampel otak anjing yang diperoleh dari kegiatan eliminasi rabies di Kotamadya Padang menunjukkan bahwa semua otak anjing tidak mengandung virus rabies. Ini menunjukkan bahwa hasil RT-PCR sesuai dengan hasil pemeriksaan *direct* FAT (Tabel 1).



1. Marker 1 KB
2. Otak Tikus CVS (+)
3. Otak Tikus Normal (-)
4. Otak Tikus yang diinfeksi isolat virus rabies dari kambing (+)
5. Otak Anjing No. 1
6. Otak Anjing No.2
7. Otak Anjing No. 9
8. Otak Anjing No. 10

Gambar 1. Dengan otak mencit yang diinfeksi dengan virus rabies galur cvs

Menurut WHITBY *et al.* (1997) teknik RT-PCR mempunyai kelebihan daripada teknik FAT, karena teknik RT-PCR ini masih dapat digunakan untuk menguji spesimen yang telah mengalami dekomposisi. Di samping itu teknik ini juga cukup praktis untuk diaplikasikan dalam rangka surveilans untuk menentukan bebas tidaknya suatu daerah terhadap rabies. Hal ini dimungkinkan, karena uji serologi terhadap rabies dapat menimbulkan reaksi *false* positif, karena reaksi serologi positif terhadap rabies pernah ditemukan terhadap anjing-anjing yang belum pernah mendapatkan vaksinasi (SIHVONEN *et al.*, 1985).

Dengan telah dapat dikembangkannya teknik RT-PCR untuk diagnosis rabies ini, maka peluang untuk mengembangkan IPTEK dalam penelitian rabies semakin terbuka, karena teknik ini dapat dikembangkan lebih lanjut untuk mempelajari epidemiologi molekuler maupun untuk menjajagi kemungkinannya dapat dipakai pada diagnosis *intravital* (diagnosis sewaktu hewan masih hidup), terutama dalam masa-masa karantina.

KESIMPULAN

Teknik *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) telah dapat dikembangkan dan diaplikasikan untuk diagnosis rabies. Teknik ini cukup praktis digunakan pada surveilans dalam rangka upaya pembebasan rabies pada suatu daerah.

DAFTAR PUSTAKA

- ANONIMUS. 1995. Tinjauan diawal Pelita VI tentang pemberantasan dan pengendalian rabies di Indonesia. Informasi penyakit hewan menular. Direktorat Bina Kesehatan Hewan Direktorat Jenderal Peternakan Jakarta. hal : 1-11.
- ANONIMUS. 1997. Pedoman teknis pemberantasan dan pengendalian penyakit classical swine fever dan pedoman teknis pemberantasan penyakit rabies. Direktorat Bina Kesehatan Hewan Direktorat Jenderal Peternakan Jakarta.
- ANONIMUS. 1998. Pedoman teknis pelaksanaan pemberantasan rabies terpadu di Indonesia. Tim Koordinasi Pemberantasan Rabies Tingkat Pusat.
- HARDJOSWORO. 1984. Epidemiologi rabies di Indonesia. Kumpulan makalah Symposium Nasional Rabies PDHI Cabang Bali, Denpasar.
- SAROSA, A, RMA ADJID, T. SDHARTA, T. SYAFRIATI dan E. MARTINDAH. 1999. Laporan hasil penelitian lapangan penyakit rabies di Sumatera Barat. Balai Penelitian veteriner.
- SIDHARTA, T., A. SAROSA dan P. RONOARDJO. 1996. Tinjauan hasil-hasil penelitian penyakit rabies di Balai Penelitian Veteriner Bogor. Prosiding Seminar Nasional Peternakan dan Veteriner. Cisarua, Bogor 7-8 Nopember 1995. Pusat Penelitian Pengembangan Peternakan - Badan Litbang Pertanian, Bogor: 89 - 94.
- SIHVONEN, L., K. KULONEN, E. NEUVONEN and K. PEKKUNEN. 1995. Rabies antibody titres in vaccinated dogs. *Acta. vet. scand.* 36 (1): 87 - 91
- TORDO, N., D. SACRAMENTO and H. BOURHY. 1996. The polymerase chain reaction (PCR) technique for diagnosis, typing and epidemiological studies of rabies. *In: Laboratory techniques in rabies. 4th Ed. WHO, GENEVE* : 157-174.
- VELLECA, W.M. and F.T. FORRESTER. 1981. Laboratory methods for detecting rabies. US Departement of Health and Human Services, Atlanta Georgia.
- WHITBY, J.E., P.R. HEATON, H.E. WHITBY, E.O. SULLIVAN and P. JOHNSTONE 1997. Rapid detection of rabies and rabies related viruses by RT-PCR and enzyme linked immunosorbent assay. *J. Virol. Meth.* 69: 63-72.

DISKUSI

Pertanyaan:

1. Berapa lama/waktu yang diperlukan untuk deteksi rabies dengan teknik RT-PCR dan berapa biaya yang diperlukan untuk deteksi tersebut
2. Untuk deteksi dengan FAT berapa lama waktu yang diperlukan

Jawaban:

1. Deteksi rabies dengan teknik RT-PCR diperlukan waktu 1 hari, dengan biaya per sampel \$50 atau ± Rp. 400.000,00
2. Deteksi rabies dengan FAT juga diperlukan waktu 1 hari