

## PENGEMBANGAN POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) UNTUK DIAGNOSA SPESIFIK HOG CHOLERA

SIMSON TARIGAN, A. SAROSA, dan T. SYAFRIATY

Balai penelitian Veteriner  
Jalan R.E. Martadinata 30, P.O. Box 151, Bogor 16114

### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi teknik *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR) sebagai diagnosa penyakit Hog cholera (HC). Isolasi RNA dan *reverse transcription* dilakukan dengan cepat dan praktis dengan menggunakan kit komersial. Reaksi amplifikasi dijalankan sebanyak 40 siklus dalam sebuah *thermal cycler* yang setiap siklusnya terdiri dari 30 detik denaturasi pada suhu 94°C, 60 detik *anealing* pada suhu 59°C, dan 120 detik perpanjangan DNA pada suhu 72°C. Sensitivitas dan spesivitas RT-PCR dianalisa terhadap virus HC berbagai isolat dan virus BVD yang dipropagasi dalam biakan sel lestari PK-15 atau *Bovine turbinate*. Teknik RT-PCR ini dapat mendeteksi keberadaan virus HC (RNA virus HC) dalam sel PK-15 yang sebelumnya telah diinokulasi dengan virus HC. Sensitivitas RT-PCR tersebut sangat tinggi karena dapat mendeteksi keberadaan RNA virus HC dalam total atau campuran RNA sel dan virus yang sangat kecil (0,125 µg). Bahkan sensitivitas deteksi dapat ditingkatkan menjadi 0,0625 µg total RNA apabila amplifikasi dilakukan dua ronde. Selain itu RT-PCR tersebut dapat mendeteksi RNA dari semua isolat atau strain virus HC yang digunakan (isolat Riau, isolat Kapuk, isolat Kalimantan dan strain vaksin Japanese GPE). Spesifitas RT-PCR tersebut juga sangat tinggi karena selalu memberikan hasil yang negatif terhadap RNA yang diisolasi dari sel yang tidak terinfeksi virus HC atau sel yang terinfeksi dengan virus BVD. Dari hasil penelitian ini disimpulkan bahwa RT-PCR sangat cocok untuk diagnosa HC karena sensitif dan spesifik dan hasil dapat diperoleh dengan cepat (1 hari).

**Kata kunci :** RT-PCR, diagnosis, hog cholera

### PENDAHULUAN

Hog Cholera (HC) atau classical swine fever adalah penyakit viral pada babi yang sangat ganas dan sangat menular. Penyakit ini dikenal sebagai penyakit yang paling merugikan pada babi sehingga sangat ditakuti terutama oleh peternak babi. Wabah HC di Indonesia yang puncaknya terjadi tahun 1995 menimbulkan kerugian ekonomi yang sangat tinggi terutama akibat kematian babi yang jumlahnya sangat besar. Saat ini penyakit tersebut telah tersebar di seluruh wilayah Indonesia. Dengan demikian biaya penanggulangan dan kerugian ekonomi yang ditimbulkan penyakit tersebut setiap tahunnya sangat besar.

Virus penyebab HC termasuk genus Pestivirus, berbentuk bundar dengan diameter berkisar antara 40-50 nm, mempunyai nucleocapsid berbentuk hexagonal berukuran sekitar 29 nm, dan mengandung material genetik RNA berbentuk 'single stranded' dan polarity positif (HORZINEK, 1981). Nucleocapsid tersebut diselaputi oleh sebuah selubung (*envelope*) yang mengandung tiga glycoprotein yakni glycoprotein E1 (gp55), E2 (gp44/48) dan E3 (gp33). Ketiga glycoprotein tersebut terdapat dalam bentuk dimer yang satu sama lain dihubungkan oleh ikatan disulfida. Glycoprotein E1 dan E2 masing masing merupakan homodimer, sedangkan E3 dapat juga membentuk dimer dengan E1 (THIEL *et al.*, 1991).

Genom (RNA) yang panjangnya 12.248 *base pair* (bp) telah lengkap disequencing (MEYERS *et al.*, 1989; MOORMANN *et al.*, 1990; RUMENAPF, 1990). Analisa dari hasil *sequencing* menunjukkan bahwa genom tersebut terdiri dari hanya satu *open reading frame* yang panjang, menyandi sebuah precursor polyprotein sepanjang 3.898 asam amino (438,3 kD). Precursor polyprotein tersebut setelah mengalami proses enzimatis oleh signalase terpecah menjadi beberapa protein dan glycoprotein, antara lain tiga buah glycoprotein yang menjadi komponen viral envelope (E1, E2 dan E3), sebuah protein nucleocapsid, dan beberapa non struktural protein. Secara immunologis dan genetis, virus HC mempunyai kesamaan yang sangat dekat dengan virus Bovine viral diarrhoea (BVD), kedua virus ini adalah anggota dari genus Pestivirus. Virus BVD selain patogen pada sapi, dapat pula menginfeksi dan menyebabkan penyakit pada babi (TERPSTRA dan WENSVOORT, 1986). Kedua virus mempunyai susunan genom dan protein yang sama, keduanya mempunyai kesamaan sequence asam nukleat sebesar 66% dan asam amino sebesar 85% (MEYERS *et al.*, 1989; RUMENAPF, 1990). Karena persamaan yang banyak tersebut, diagnosa definitif HC sering sulit ditegakkan dengan hanya menggunakan antibodi poliklonal.

Diagnosa HC yang paling banyak digunakan akhir-akhir ini adalah ELISA. Untuk mendeteksi antigen HC digunakan *double* tipe antibodi *sandwich* baik menggunakan antibodi poliklonal monospesifik ataupun monoklonal. Bahkan, beberapa perusahaan atau laboratorium referensi HC telah memproduksi ELISA kit secara komersial. Dari hasil sebuah workshop yang diadakan untuk mengevaluasi teknik ELISA yang telah dihasilkan oleh laboratorium referensi di negara-negara Masyarakat Ekonomi Eropa disimpulkan bahwa sebagian besar ELISA kit yang dievaluasi dalam workshop tersebut hanya spesifik untuk Pestivirus dan hanya Elisa kit CVL-2 saja yang spesifik untuk virus HC. Akan tetapi ELISA kit yang spesifik HC tersebut tidak mampu mendeteksi semua strain virus HC (DEPNER *et al.*, 1995).

*Polymerase chain reaction* sampai saat ini belum dipakai secara rutin untuk diagnosa HC. Beberapa penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa PCR sangat sensitif dan spesifik akan tetapi jumlah isolat yang diuji masih sedikit (LIU *et al.*, 1991, HARDING *et al.*, 1996). Belum diketahui apakah teknik PCR di atas cocok untuk virus HC isolat Indonesia. Disamping sebagai alat diagnostik, PCR masih memiliki banyak manfaat yang lain. Hasil amplifikasi dari PCR dapat langsung di sequens untuk mengetahui keragaman genetis isolat isolat yang ada di suatu tempat.

## BAHAN DAN METODE

### Propagasi virus dalam biakan sel

Sebanyak kira kira  $3 \times 10^5$  sel lestari PK-15 atau sel lestari *bovine turbinate* dibiakkan dalam flask 5 ml dengan media DMEM yang mengandung 5% *fetal calf serum*, 200 IU/ml penisilin, 200 µg/ml streptomisin dan 5 µg/ml *Fungizone*. Setelah mencapai konfluen yang biasanya setelah diinkubasikan selama 1- 2 hari, sel PK-15 diinfeksi dengan virus HC dan sel *bovine turbinate* diinfeksi dengan virus BVD. Setelah inokulasi, sel diinkubasikan seperti sebelumnya selama 2 hari. Sebagai kontrol negatif, sel dibiakkan dengan cara yang sama kecuali sel tidak diinfeksi.

### Isolasi RNA

Isolasi RNA dilakukan dengan *RNAagents® Total RNA Isolation system* (Promega Co) dengan sedikit modifikasi dari prosedur yang dianjurkan.

Media dari biakan sel yang telah diinfeksi dibuang dan sel dibilas dengan PBS dingin. Ke dalam flask dimasukkan 2 ml *Denaturing solution* dingin dan flask diagitasi untuk melisis semua

sel. Setelah sel lisis, campuran *Denaturing solution* dan sel yang telah lisis tersebut dimasukkan ke dalam tabung eppendorf (600 µl/tabung).

Ke dalam tabung yang mengandung lisis sel ditambahkan 60 µl Sodium acetate (2M) kemudian tabung dibalik-balik sebanyak 5 kali supaya bahan di atas tercampur dengan baik. Setelah itu ditambahkan 600 µl campuran *phenol, chloroform, isoamyl alcohol*, tabung ditutup rapat, dibolak-balik sebanyak 5 kali kemudian dikocok dengan kuat selama 10 detik. Setelah disimpan di atas es selama 15 menit, tabung disentrifus dengan *microfuge* yang ditempatkan dalam refrigerator 4°C dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit. Setelah sentrifus, sebanyak 500 µl dari isi tabung bagian atas (*aqueous phase*) dipindahkan dengan hati-hati ke dalam tabung eppendorf yang baru.

Ke dalam tabung yang berisi cairan 500 µl *aqueous phase*, ditambahkan 500 µl *Isopropanol* kemudian tabung ditempatkan pada suhu -20°C selama sekurang-kurangnya 5 menit untuk mempresipitasi RNA. Sesudah itu, tabung disentrifus selama 10 menit (4°C, 12.000 rpm) dan supernatan dibuang.

Ke dalam tabung ditambahkan 1 ml ethanol 70% dingin (4°C), pelet RNA dipecah atau dihancurkan dengan tip pipet eppendorf, kemudian disentrifuse seperti sebelumnya selama 10 menit. Supernatan dibuang dengan cara membalikkan tabung di atas kertas saring kemudian sisa alkohol dalam tabung diuapkan dalam ruangan yang bersih tetapi pelet tidak sampai kering betul. Terakhir, pelet disuspensikan dengan 80 µl air bebas RNase.

### **Reverse transcription**

Untuk me *reverse transcribe* RNA yang telah diisolasi, ke dalam sebuah tabung eppendorf dimasukkan reagen-reagen dengan urutan sebagai berikut:

- 4 µl MgCl<sub>2</sub>, 25 mM
- 2 µl *Reverse transcription buffer* 10x
- 2 µl dNTPs *mixture*
- 0,5 µl RNasi<sup>®</sup> *ribonuclease inhibitor*
- 0,6 µl AMV *reverse transcriptase*
- 1 µl Ologo (dT)<sub>15</sub> primer
- 1 µl sampel RNA
- 8,9 RNase-free dH<sub>2</sub>O

Semua bahan di atas, kecuali sampel RNA, tersedia dalam kit *Reverse Transcription System* (Promega Co.). Tabung diinkubasikan dalam penangas air 42°C selama 15 menit kemudian 99°C selama 5 menit. Sampel disimpan dalam 4°C sebelum digunakan.

### **Polymerase chain reaction**

Primer yang digunakan sama seperti yang dipakai HARDING *et al.* (1996) yakni: Primer-1 5'-GCTCCTGGTTGGTAACCTCGG-3' dan Primer-2 5'-TGATGCTGTCACACAGGTGAA -3'. Primer diatas dipesan dari Promega Singapura melalui Pt. Diastika Biotikindo, Jakarta. Primer tersebut disuspensikan dalam *nuclease-free* ddH<sub>2</sub>O dengan konsentrasi 200 pmol/µl kemudian dialiquat dalam 5 µl dalam tabung eppendorf dan disimpan dalam -20°C.

Reaksi amplifikasi mengandung reagen-reagen sebagai berikut:

20  $\mu$ l *first-strand cDNA reaction* (hasil dari *reverse transcription*)  
4  $\mu$ l  $MgCl_2$ , 25 mM  
8  $\mu$ l *Reverse transcription* 10x buffer  
50 pmol primer-1  
50 pmol primer-2  
2,5 unit *Taq DNA polymerase*  
*Nuclease-free ddH<sub>2</sub>O* sampai mencapai volume 100  $\mu$ l

Reaksi amplifikasi dijalankan sebanyak 40 siklus dalam sebuah *thermal cycler*. Setiap siklus terdiri dari 30 detik denaturasi pada suhu 94°C, 60 detik *annealing* pada suhu 59°C, dan 120 menit perpanjangan DNA pada suhu 72°C.

### Analisa produk PCR

Fragmen DNA yang hasil amplifikasi PCR dianalisa dengan elektroforesis gel menggunakan 1% agarose, 80 volt, 90 menit, dan Tris boric acid EDTA (TBE) bufer. Fragmen DNA dalam gel diwarnai dengan Ethidium bromida (Sigma Co.), diamati dan difoto dengan bantuan sinar ultra violet. *pGEM DNA markers* (Promega Co.) digunakan sebagai acuan untuk berat molekul fragmen DNA.

## HASIL

### Isolasi RNA

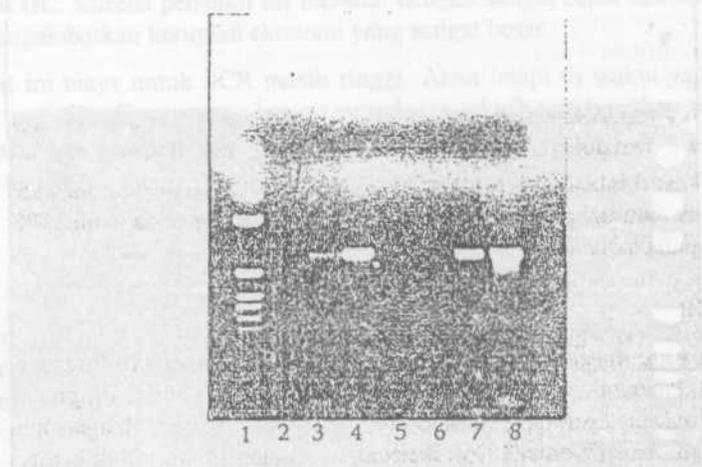
Total RNA yang dapat diisolasi dari 1 flask (5 ml biakan sel lestari PK-15 atau bovine turbinate adalah sekitar 150  $\mu$ g. Karena jumlah sel dalam 1 flask berisi sel yang konfluen diperkirakan sebanyak  $2 \times 10^7$ , maka jumlah RNA yang dapat diisolasi per 10<sup>6</sup> sel adalah 7,6  $\mu$ g. Tidak terlihat perbedaan dalam jumlah RNA yang terisolasi dari sel yang diinokulasi dengan virus dengan sel yang sama tanpa inokulasi virus. Hal ini berarti bahwa proporsi RNA virus dalam sediaan total RNA sangat kecil sekali.

### Reverse transcription

Keberhasilan reaksi *reverse transcription* tidak diuji tetapi diketahui berhasil dengan baik karena cDNA hasil reaksi yang dipakai sebagai template dalam reaksi PCR memberikan hasil seperti yang diharapkan.

### Spesivitas PCR

Amplifikasi cDNA produk *reverse transcription* yang berasal dari sel PK-15 yang diinfeksi dengan virus HC memberikan hasil amplifikasi sekitar 700 *base pair* (bp). cDNA yang berasal dari sel PK-15 atau sel *bovine turbinate* sama sekali tidak memberikan hasil amplifikasi (Gambar 1, lajur 2 dan 5). Sedangkan cDNA dari sel PK-15 yang diinfeksi dengan virus HC isolat Riau, isolat Kalimantan, isolat Kapuk dan strain vaksin Japanese GPE semuanya memberikan hasil amplifikasi yang sama (Gambar 1, lajur 3, 4, 5, 7). cDNA yang berasal dari sel *bovine turbinate* yang diinfeksi dengan virus BVD sama sekali tidak memberikan hasil amplifikasi (Gambar 1, lajur 6). Keberhasilan infeksi oleh virus BVD ini tidak dapat diragukan karena sel yang diinfeksi virus BVD membentuk CPE yang jelas.



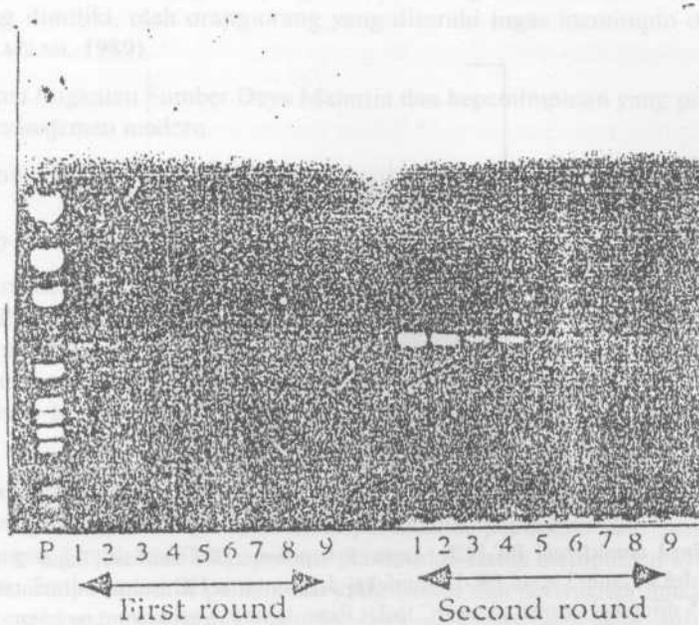
**Gambar 1.** Hasil amplifikasi RT-PCR. Lajur 1 = *pGem DNA markers*, lajur 2 = sel PK-15 tanpa infeksi, lajur 3 = sel PK-15 diinfeksi dengan virus HC isolat Kalimantan, lajur 4 = sel PK-15 diinfeksi dengan virus HC isolat Riau, lajur 5 = sel *bovine turbinate* tanpa infeksi, lajur 6 = sel *bovine turbinate* diinfeksi dengan virus BVD, lajur 7 = sel PK-15 diinfeksi dengan virus HC isolat Kapuk, lajur 8 = sel PK-15 diinfeksi dengan virus HC strain Japanese GPE

#### Sensitivitas *first* dan *second round* PCR

Untuk memperkirakan sensitivitas PCR, maka cDNA yang berasal dari  $\pm 1 \mu\text{g}$  total RNA diencerkan secara seri (2 kali lipat, sampai pengenceran 1/256) sebelum diamplifikasi. Hasil amplifikasi terlihat dengan jelas hanya sampai pengenceran 1/2 tetapi *band* tipis masih terlihat sampai pengenceran 1/8 (Gambar 2). Untuk membuktikan apakah *second round* PCR dapat meningkatkan sensitivitas, produk PCR tersebut dijadikan sebagai *template* DNA kemudian diamplifikasi seperti biasa. Hasil penelitian ini menunjukkan dengan jelas bahwa *second round* PCR mampu meningkatkan sensitivitas. Hasil amplifikasi dengan jelas terlihat sampai pengenceran 1/8, dan pada pengenceran 1/16 hasil amplifikasi masih terlihat tetapi dengan *band* yang jauh lebih tipis (Gambar 2).

#### PEMBAHASAN

Peneguhan diagnosa HC sering mengalami kesulitan sehingga dalam beberapa kasus diagnosa definitif dengan menggunakan teknik konvensional tidak dapat ditentukan. Pada kultur sel, virus tidak menimbulkan *cytopathic effects* (CPE) sehingga untuk memastikan pertumbuhan virus diperlukan antibodi terhadap virus HC (TERPSTRA, 1991). Poliklonal antibodi terhadap virus HC selalu menimbulkan reaksi silang dengan virus BVD. Virus BVD juga sering menginfeksi babi dan bahkan kadang-kadang menimbulkan gejala yang serupa dengan yang ditimbulkan oleh virus HC (DEPNER *et al.*, 1995). Banyak kit ELISA komersial yang beredar dipasaran untuk diagnosa HC menggunakan antibodi poliklonal.



**Gambar 2.** Sensitivitas RT-PCR pada amplifikasi pertama dan kedua. Amplifikasi RT-PCR dari 1  $\mu$ g total RNA dari sel PK-15 yang diinfeksi dengan virus HC isolat Kalimantan yang diencerkan secara seri. Lajur 1 = cDNA tanpa diencerkan (1  $\mu$ g RNA), lajur 2 = diencerkan 1/2 (0,5  $\mu$ g RNA), lajur 3 = diencerkan 1/4 (0,25  $\mu$ g RNA), lajur 4 = diencerkan 1/8 (0,125  $\mu$ g RNA), lajur 5 = diencerkan 1/16 (0,0625  $\mu$ g), dan seterusnya

Antibodi monoklonal yang spesifik terhadap virus HC, yaitu tidak mempunyai reaksi silang dengan virus BVD, telah berhasil diproduksi oleh beberapa peneliti tetapi sensitivitas antibodi monoklonal yang dihasilkan rendah sehingga tidak semua isolat/strain virus HC bereaksi dengan antibodi monoklonal yang dihasilkan (DEPNER *et al.*, 1995). Karena kekurang-puasan dengan teknik diagnosa imunologis beberapa pihak mencari alternatif dengan teknik molekuler. Teknik PCR untuk penyakit tersebut telah dikembangkan oleh beberapa peneliti dan kesimpulan yang diperoleh adalah PCR sangat sensitif, lebih sensitif dibandingkan dengan teknik imunologi untuk mendeteksi virus HC dalam jaringan (LIU *et al.*, 1991, HARDING *et al.*, 1994). Primer untuk PCR yang digunakan oleh HARDING *et al.* (1994) bahkan terbukti spesifik untuk virus HC dan tidak memberikan reaksi silang dengan virus BVD.

Penelitian yang dilaporkan ini juga menggunakan primer yang sequensinya sama seperti yang dipakai oleh HARDING *et al.* (1994). Seperti yang diharapkan, PCR dengan metode yang dipakai dalam penelitian ini juga sangat sensitif dan spesifik untuk mendeteksi virus HC. Asam inti virus dengan konsentrasi yang sangat rendah sekalipun masih dapat dideteksi. Semua virus HC isolat lapang dan virus strain vaksin dalam sampel dapat dideteksi. Spesifitas teknik ini sangat tinggi karena sampel dari virus BVD, virus yang paling dekat dengan virus HC, tidak teramplifikasi. Kemampuan suatu teknik diagnosa HC yang dapat membedakan virus HC dan virus BVD sangat diharapkan karena virus BVD sering menginfeksi babi. Test imunologis yang dipakai secara rutin selama ini tidak memiliki kemampuan tersebut (DEPNER *et al.*, 1995).

Disamping sensitif dan spesifik, hasil dari teknik PCR dapat diperoleh dengan cepat (1 hari). Suatu teknik diagnosa yang dapat memberikan hasil dengan cepat sangat diperlukan, terutama untuk penyakit HC. Karena penyakit ini menular dengan sangat cepat kelambatan diagnosa 1 hari saja sering mengakibatkan kerugian ekonomi yang sangat besar.

Pada saat ini biaya untuk PCR masih tinggi. Akan tetapi di waktu yang akan datang biaya tersebut akan mengalami penurunan karena pemakaian teknik tersebut akan makin luas. Perlu juga ditekankan bahwa kit ELISA komersial untuk HC, yang tidak spesifik untuk HC, harganya juga sangat mahal di Indonesia.

### KESIMPULAN

PCR dengan primer 5'-GCTCCTGGTTGGTAACCTCGG-3' dan 5'-TGATGCTGTACACAGGTGAA-3' spesifik untuk virus HC dan tidak memberikan reaksi silang terhadap virus BVD. PCR yang dikembangkan mampu mendeteksi semua isolat lapangan dan strain virus vaksin yang dipakai dalam penelitian ini. PCR tersebut sangat sensitif apalagi bila dijalankan amplifikasi ronde ke dua (*second round* PCR) dan memberikan hasil dalam waktu yang sangat cepat.

### DAFTAR PUSTAKA

- DEPNER, K., D.J. PATON, C. CRUCIERE, G.M. DE MIA, A. MULLER, F. KOENEN, R. STARK, and B. LIESS. 1995. Evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay for the rapid screening dan detection of classical swine fever virus antigens in the blood of pigs. *Rev. Sci. Tech. Int. Epiz.* 14: 677-689.
- HARDING, M. J., I. PRUD'HOMME, C.M. GRADIL, R.A. HECKERT, J. RIVA, R. MCLAURIN, G.C. DULAC, and J. VYDELINGUM. 1996. Evaluation of nucleic acid amplification methods for the detection of hog cholera virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8: 414-419.
- HORZINEK. 1981. *Non-Arthropod-Borne Togaviruses*. Academic Press. New work.
- LIU, S. T., S.N. LI, D.C. WANG, S.F. CHANG, S.C. CHIANG, W.C. HO, Y.S. CHANG, and S.S. LAI. 1991. Rapid detection of hog cholera virus in tissues by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 35: 227-236.
- MEYERS, G., T. RUMENAPF, and H.J. THIEL. 1989. Molecular cloning dan nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus. *Virology* 171: 555-567.
- MOORMANN, R., P. WARMERDAM, B.V.D. MEER, and M.M. HULST. 1990. Nucleotide sequence of hog cholera virus RNA: properties of the polyprotein encoded by the open reading frame spanning the viral genomic RNA. *Vet. Microbiol.* 23: 1-4.
- RUMENAPF, T. H. 1990. Cloning, sequencing dan expression of the genome of classical swine fever virus. *Inaugural-Dissertation, Fachbereich Veterinarmedizin, Justus-Liebig-Universitat, Giessen, Germany.*
- TERPSTRA, C. 1991. Hog cholera: an update of present knowledge. *British Vet. J.* 147: 397-406.
- THIEL, H. J., R. STARK, E. WEILAND, T. RUMENAPF, and G. MEYERS. 1991. Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus. *J. Virol.* 65: 4705-4712.
- WENSVOORT, G., C. TERPSTRA, J. BOONSTRA, M. BLOEMRAAD, and D.V. ZAANE. 1986. Production of monoclonal antibodies against swine fever virus dan their use in laboratory diagnosis. *Vet. Microbiol.* 12: 101-108.