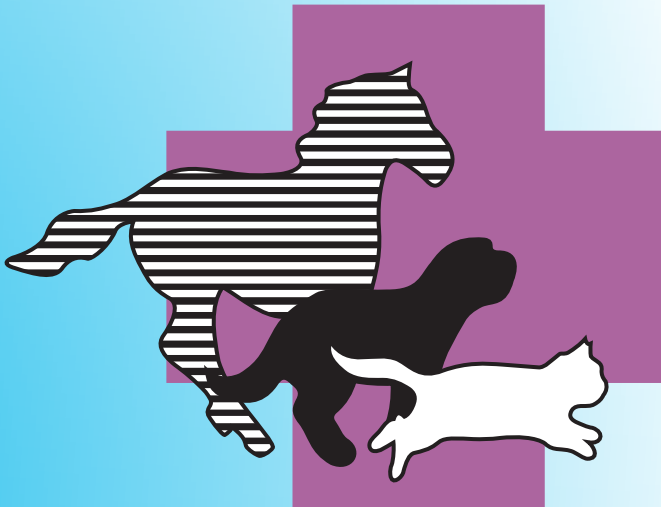




Proceeding Proceeding

SEMINAR NASIONAL PPDH

**EMERGING DAN RE-EMERGING DISEASES
TANTANGAN DAN PERAN DOKTER HEWAN
DI ERA GLOBAL**



**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS GADJAH MADA
3 Desember 2011**

ISBN 978-979-96104-5-4



Dengan Ayam

Membangun Bangsa

WONOKOYO FEED



WONCHICK



888 ISA BROWN



DAGING AYAM 808



GOLDSTAR NUGGET



**WONOKOYO
GROUP**



BREEDING FARM SUKABUMI

PT. WONOKOYO JAYA CORPORINDO

Jl. Taman Bungkul 1 - 7, Surabaya 60231

Telp. (031) 295 6000 - Fax. (031) 567 5699

PT. WONOKOYO JAYA KUSUMA

Jl. Raya Rangkasbitung Km. 2, Cikande, Serang 42185

Telp. (0254) 403 333 - Fax. (0254) 400 602

www.wonokoyo.co.id

SAHABAT SETIA PETERNAK



EKA FARMA

Jl. Imam Bonjol 190 A. Semarang, Jawa Tengah
Telp. 024 - 3516636, 3541746, 3545234 Fax. 3541748

www.ekafarma.com

DETEKSI VIRUS PENYAKIT JEMBRANA (JDV) PADA SPESIMEN DARAH LAMA

Erwin Nugroho TA¹, Narendra Yoga Hendarta² dan Asmarani Kusumawati¹

¹. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada

². Analis Kesehatan Poltekkes Kemenkes Yogyakarta

Korespondensi Penulis: kartapati_2008@yahoo.com

ABSTRAK

Virus jembrana adalah virus eksogenus anggota *Lentiviridae*, sebagai agen penyebab penyakit jembrana yang menginfeksi fatal pada penyakit fase akut. Penyakit jembrana dapat mengakibatkan kematian hingga 71% pada 1-6 minggu awal infeksi. Virus ini menginfeksi berat sapi Bali (*Bos javanicus*) dan sapi lainnya dengan gejala yang ringan. Virus jembrana merupakan virus RNA dalam famili *retroviridae* dengan inangnya pada sel yang mempunyai molekul CD4 sebagai reseptor utama seperti limfosit T, monosit, makrofag dan sel dendritik yang berada dalam darah. Penyimpanan sampel darah terinfeksi dengan antikoagulan EDTA telah umum dilakukan dalam prosedur rutin laboratorium. Virus akan bertahan pada sel inangnya yang masih utuh selama penyimpanan ataupun dalam bentuk partikel bebas dalam plasma darah. Penelitian ini bertujuan untuk mengeksplorasi deteksi virus Jembrana dari dalam darah-EDTA yang sudah disimpan lama (lebih dari 10 bulan) pada suhu 4⁰C dengan metode *two step* RT-PCR. Beberapa sampel darah terinfeksi dari BBVET Kalimantan diisolasi RNA virus menggunakan kit dan diamplifikasi dengan *two-step* RT-PCR menggunakan primer spesifik pada sekuen gen target *env-tm*. Amplikon dianalisis dengan gel elektroforesis memperlihatkan adanya pita spesifik. Hal ini menunjukkan RNA virus berhasil diekstraksi dengan integritas yang bagus walaupun darah-EDTA specimen telah disimpan lama.

Kata kunci : Virus penyakit jembrana, darah EDTA, RNA virus, *two step* RT-PCR

DETECTION OF JEMBRANA DISEASE VIRUS (JDV) FROM LONG STORING TIME BLOOD SPECIMEN

ABSTRACT

Jembrana virus is exogen virus (member of Lentiviridae), as causative agent of Jembrana disease that infenct universally fatal in acute disease. The mortality rate is up to 71% in the first six weeks in acute disease. Jembrana virus infects seriously in Balinese cattle (*Bos javanicus*) and also mildly in other cattle. Virus jembrana is RNA virus belong to Retroviridae family as lymphocyte CD4 T cell, monocyte, macrophage, and dendritic cell as its host cell in the bloodstream. The storing of infected blood sample utilizing EDTA, generally be used in routine laboratory procedure. Jembrana virus reside wholly in host cell and also in free particle form in blood plasma. This research aim to explore detection of Jembrana virus from EDTA- blood after a long storing time (more than 10 months) in 4°C, using two step RT-PCR method. RNA virus in several infected blood sample from BBVET Kalimantan was isolated using RNA extraction kit then amplified using two step RT-PCR with specific primers that target in *env-tm* gene sequences. Amplicons were analyzed by gel electrophoresis showed a specific band. This indicate that successful viral RNA extraction with great integrity, although the EDTA-blood sample specimen was stored after a long storing time.

Keyword : Jembrana Virus Disease (JDV), blood, EDTA, two step RT-PCR

PENDAHULUAN

Sapi Bali (*Bos javanicus*) merupakan plasma nutfah Indonesia dengan karakter reproduksi baik sehingga mudah dikembangkan dan tersebar ke berbagai pulau sebagai hewan ternak potensial. Penyakit Jembrana terjadi pertama kali di Bali tahun 1964, dalam 9 bulan telah menyebar ke berbagai daerah di Bali dan membunuh 60.000 ekor sapi Bali. Penyakit ini telah menyebar ke berbagai daerah diantaranya Jawa Timur, Lampung, Kalimantan, dan Sumatra Barat (Hartaningsih *et al.*, 1994) serta Australia (Chadwick *et al.*, 1998) dan menyebabkan kerugian ekonomi cukup besar.

Penyakit Jembrana yang disebabkan *Jembrana Disease Virus* (JDV) sulit dideteksi dengan gejala klinis karena adanya kemiripan gejala dengan penyakit lainnya. Diagnosa secara serologis (ELISA dan presipitasi antigen-antibodi) juga tidak bisa dilakukan saat awal infeksi karena sifat JDV dalam menekan respon imun humoral (IgG dan IgM) (Wareing *et al.*, 1999) sedangkan ELISA hanya dapat diterapkan apabila sistem kekebalan humoral sapi yang terinfeksi bereaksi sehingga mampu mensintesis antibodi. Antibodi terhadap JDV tidak dapat dideteksi pada mayoritas sapi yang terinfeksi pada awal kejadian penyakit sampai sapi tersebut dapat bertahan dari fase akut hingga 11 hari pasca infeksi (Hartaningsih *et al.*, 1994).

Jembrana Disease Virus (JDV) memiliki kekerabatan dekat dengan *Bovine Immunodeficiency Virus* (BIV) dan dapat terjadi reaksi silang dalam deteksi secara serologis tanpa adanya antibodi monoklonal. Meskipun upaya pembuatan antibodi monoklonal protein kapsid 10H1 untuk deteksi BIV telah dilakukan (Zeng *et al.*, 2001), namun ketersediaan antibodi tersebut terbatas serta menggunakan teknologi hibridoma sehingga memerlukan biaya tinggi. Selain itu penelitian selanjutnya dari Desport *et al.*, (2005), menunjukkan beberapa domain antigenik protein rekombinan *gag* 10H1 JDV tersebut belum mampu digunakan untuk membedakan secara serologis JDV dengan *Lentivirus* non patogenik lain yang menyerang sapi Bali. Karena beberapa kelemahan dalam pendekatan metode serologis tersebut maka diperlukan pendekatan selain secara serologis untuk deteksi JDV. Dalam hal ini pendekatan genomik memungkinkan untuk dapat digunakan dalam meningkatkan akurasi, spesifitas dan sensitivitas deteksi lebih dini.

Ketersediaan metode deteksi yang spesifik dan cepat diperlukan untuk pengawasan kesehatan hewan terutama hewan yang berpotensi untuk dikembangkan dalam skala peternakan. Dalam hal ini deteksi infeksi viral yang infeksius penting sebagai upaya pencegahan terjadinya *outbreak* karena

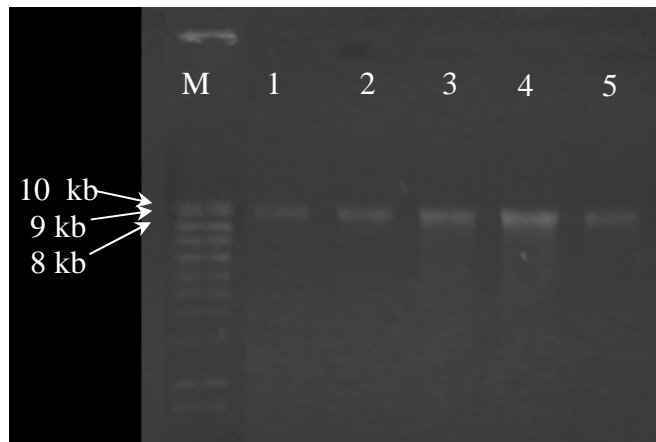
infeksi virus. Teknik genomik yang digunakan dalam penelitian ini adalah RT-PCR .

MATERI DAN METODE

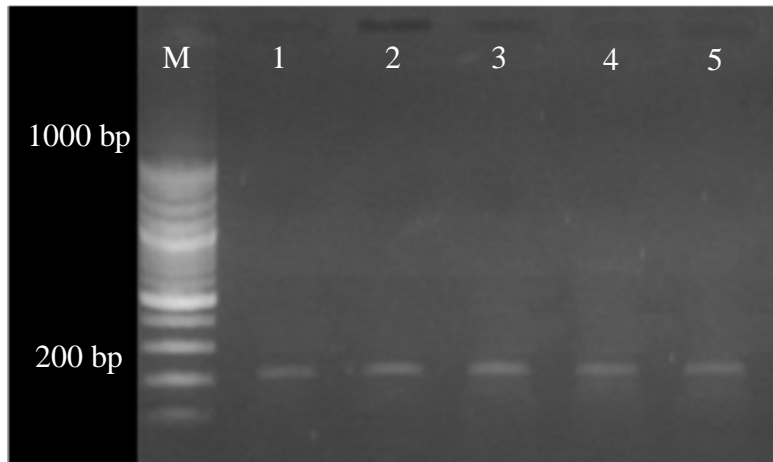
Beberapa sampel darah terinfeksi dari BBVET Kalimantan diisolasi RNA virus menggunakan *High Pure Viral Nucleid Acid Kit* dari Roche (Jerman) mengikuti prosedur dari pabriknya. RNA diamplifikasi *two-step* RT-PCR yaitu sintesis cDNA menggunakan enzim AMV-RT dari Promega dimana sampel RNA dan primer *reverse* (TTTCTCCCCACAGTCCAC) dipanaskan terlebih dahulu pada suhu 70°C selama 10 menit lalu didinginkan dalam es selama 5 menit. Kemudian dicampur dengan komponen sintesis cDNA lainnya, diinkubasi suhu 37°C selama 60 menit dan dipanaskan suhu 95°C selama 2 menit. Hasil cDNA diamplifikasi menggunakan kit *DreamTaq™ Green PCR Master Mix 2X* dari Fermentas. Amplifikasi pada gen target *env-tm* sepanjang 211 bp menggunakan primer *forward* AGAAGCTCAGCGAAGGCA dan *backward* TTTCTCCCCACAGTCCAC. Reaksi PCR dilakukan dengan program satu siklus denaturasi awal pada suhu 95°C selama 5 menit diikuti 30 siklus masing-masing dengan tahap denaturasi pada suhu 95°C selama 45 detik, penempelan primer pada suhu 58°C selama 30 detik, perpanjangan pada suhu 72°C selama 45 detik, dilanjutkan dengan satu siklus untuk perpanjangan akhir pada suhu 72°C selama 10 menit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

RNA virus hasil ekstraksi di analisis dengan gel elektroforesis 1% memperlihatkan integritas virus yang masih bagus. Genom virus penyakit jembrana berbentuk RNA untai tunggal dengan panjang 7732 basa nukleotida (Chadwick *et.al.*, 1995) terlihat pada sekitar marker DNA 8 kbp. Keutuhan (integritas) RNA sangat penting jika RNA yang tidak utuh akan menghambat reaksi amplifikasi (McDowell, 1999). Amplikon hasil RT-PCR dianalisis dengan elektroforesis gel agaros 1,8% memperlihatkan adanya pita spesifik pada marker sekitar 200 bp yang menunjukkan adanya target virus. Hal ini menunjukkan bahwa RNA hasil ekstraksi memiliki kualitas yang masih bagus. Walaupun darah EDTA telah disimpan lama, RNA virus masih dapat diekstraksi dengan baik dalam keadaan utuh.



Gambar 1. Gambaran RNA VPJ dari sampel darah sapi Bali dan Kalimantan hasil ekstraksi pada gel elektroforesis 1%. (1-5) Darah darah terinfeksi; (M) Marker 10 kbp



Gambar 2. Gambaran amplicon hasil *two step* RT-PCR dengan sampel sarah sapi Bali pada gel elektroforesis 1,8%. (1-5) sampel; (M) Marker 1000 bp.

KESIMPULAN

RNA virus penyakit jembrana dapat diisolasi dengan baik dari darah sapi terinfeksi yang disimpan lama dalam EDTA suhu 4°C.

DAFTAR PUSTAKA

- Chadwick, B.J. Coelen, R.J. Wilcox, G.E. Sammels, LM and Kertayadnya, G. (1995). Nucleotide sequence analysis of Jembrana disease virus: a bovine lentivirus associated with an acute disease syndrome. *J. Gen Virol.*, 76: 1637-1650.
- Chadwick B.J., Desport M., Brownlie J., Wilcox G.E., Dharma D.M. 1998. Detection of Jembrana disease virus in spleen, lymph nodes, bone marrow and other tissues by in situ hybridization of paraffin-embedded sections. *J. Gen Viro.l*, 79:101-106.
- Desport M., Stewart M.E., Sheridan C.A, Ditcham W.G., Setiyaningsih S., Tenaya W.M., Hartaningsih N., Wilcox G.E. 2005. Recombinant Jembrana Disease Virus gag protein identify several different antigenic domains but do not facilitate serological differentiation of JDV and nonpathogenic bovine lentiviruses. *Journal of Virological Methods*, 124(1-2):135-42.

- Dharma, DM. Ladds, PW. Wilcox, GE. And Campbell, RS. (1994). Immunopathology of experimental jembrana disease in Bali cattle. *Vet. Immunopathol.* 44: 31-44.
- Hartaningsih N., Wilcox G.E., Kertayadnya G., Astawa M. 1994. Antibody response to Jembrana disease virus in Bali cattle. *Vet. Microbiol.*, 39 (1-2): 15-23.
- Kertayadnya, G. Wilcox, GE. Soeharsono. S. Hartaningsih, N. Coelen, RJ. Cook, RD. Collins, ME and Brownlie, J. (1993). Characteristic of a retrovirus associated with jembrana disease virus in Bali cattles. *J. Gen. Virol.* 74: 1765-1773.
- McDowell, D.(1999). PCR: Factors Affecting Reliability and Validity. In Analytical Molecular Biology. Quality and Validation. Edited by Ginny C. Saunder and Helen C. Parker. Pp. 58-78. Laboratory of the Government Chemist, Teddington.UK.
- Soeharsono, S. Hartaningsih, N. Soetrisno, M. Kertayadnya, G. and Wilcox, GE. (1990) Studies of experimental jembrana disease in Bali cattles I. Transmission and persistence of the infectious agent in ruminant and pig, and resistance of recovery cattle to reinfection. *J. Comp. Pathol.* 103:49-59.
- Soeharsono S, Wilcox GE, Dharma DM, Hartaningsih N, Kertayadnya G and Budiantono A (1995). Species differences in the reaction of cattle to Jembrana disease virus infection. *J. Comp. Pathol.*, 112 : 391-402.
- Wareing S., Hartaningsih N., Wilcox G. E., Penhale W. J. 1999. Evidence for immunosuppression associated with Jembrana disease virus infection of cattle *Veterinary Microbiology*, 68 (1-2):179-185.
- Vogt, V.M. (1997). Retroviral Virions and Genome. In Retroviroses, pp.27-69. Edited by J.M. Coffin, S.H. Hughes and H. E. Varmur. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Zheng L., Zhang S., Wood C., Kapil S., Wilcox G.E., Loughin T.A., Minocha H.C. 2001. Differentiation of two bovine lentiviruses by a monoclonal antibody on the basis of epitope specificity. *Clin Diagn Lab Immunol*, 8(2): 283-287.