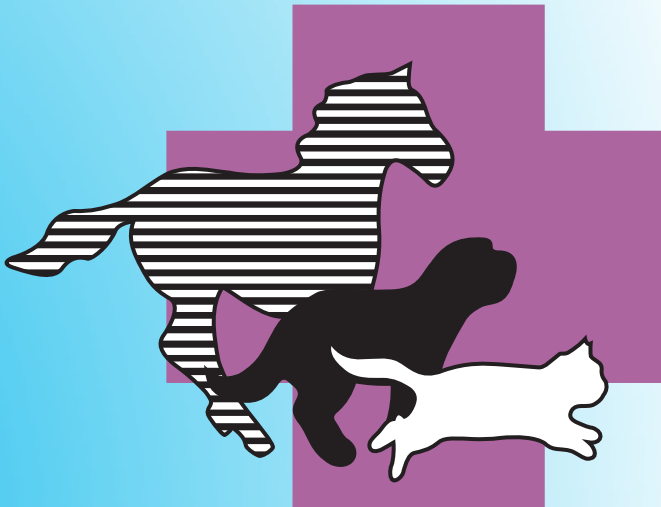




Proceeding Proceeding

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 60241
Telp. (031) 295 6000 - Fax. (031) 567 3655

PT. WONOKOYO JAYA KUSUMA

Jl. Raya Rangkasbitung Km. 2, Cikande, Serang 42186
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 DARI JARINGAN BLOK PARAFIN

Asmarani Kusumawati¹, Narendra Yoga Hendarta² dan Issabelina D. Tampubolon³

¹ Bagian Reproduksi FKH Universitas Gadjah Mada

² Analis Kesehatan Poltekkes Kemenkes Yogyakarta

³ PS. Bioteknologi Universitas Gadjah Mada

Korespondensi Penulis: kartapati_2008@yahoo.com

ABSTRAK

Penyakit Jembrana disebabkan oleh virus jembrana, sejenis Bovin Lentivirus yang dapat menginfeksi sapi, khususnya sapi Bali (*Bos javanicus*). Penyakit jembrana memiliki karakteristik sebagai penyakit yang sangat menular dan mematikan, khususnya pada fase akut. Angka kematiannya hingga 71% pada 1-6 minggu awal infeksi akut. Untuk keperluan pengawasan atau penelitian sudah umum menyimpan sampel jaringan dalam bentuk awetan. Hasil awetan paraffin dapat dipergunakan kembali. Deteksi berdasarkan amplifikasi asam nukleat memberikan hasil yang akurat dan sensitif namun sangat tergantung pada keberhasilan ekstraksi asam nukleat target. *Template* asam nukleat hasil ekstraksi yang baik yaitu memiliki integritas tinggi dan bebas dari zat pengotor yang dapat menghambat reaksi amplifikasi. Penelitian ini mencoba mengisolasi RNA virus dari sampel spesimen yang telah diparaffin. Kemudian dikonfirmasi menggunakan metode *two step* RT-PCR. Isolasi RNA diawali dengan deparafinisasi menggunakan xilen dan dicuci dengan alkohol. Pelet diresuspensi dengan PBS dan RNA virus diekstrak menggunakan kit RNA. RNA virus diamplifikasi dengan *two-step* RT-PCR dengan 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 sampel telah diawetkan dengan paraffin.

Kata kunci : Virus penyakit jembrana, awetan parafinasi, RNA virus, *two step* RT-PCR.

DETECTION OF JEMBRANA DISEASE VIRUS (JDV) FROM PARAFFINIZED TISSUE SAMPLE

ABSTRACT

Jembrana disease caused by Jembrana Disease Virus (JDV), bovine lentivirus that infect cattle, especially Balinese cattle (*Bos javanicus*). Jembrana disease is very infectious and deadly disease, especially in acute disease. The mortality rate is up to 71% in the first six weeks in acute disease. For the purposes of monitoring or research, generally storing of the tissue sample is in the form of preserved samples. Using paraffin, the preservation can be re-used. Sensitive detection based on nucleic acid amplification method is highly dependent on the success of the target nucleic acid extraction. Good template of nucleic acid extraction has high integrity and free from impurities that can inhibit the amplification reaction. This study aim to isolate viral RNA from the sample specimen that has been paraffinized. Then confirmed using two step RT-PCR method. RNA isolation begins with deparaffinized using xylene and washed with alcohol. Deresuspension of pellet is done with PBS then viral RNA was extracted using RNA kit. Viral RNA was amplified with two-step RT-PCR method with specific primers that target in *env-tm* gene sequences. Amplicons were analyzed by gel electrophoresis showed a specific band. This indicated that successful viral RNA extraction with great integrity, although the sample was preserved with paraffin.

Keyword: Jembrana Disease Virus, paraffinized sample, RNA virus, two step RT-PCR.

PENDAHULUAN

Penyakit Jembrana disebabkan oleh virus jembrana, sejenis Bovin Lentivirus yang bersifat sangat akut dan fatal (Soeharsono *et al.*, 1990). Virus ini menginfeksi berat sapi Bali (*Bos javanicus*) dan sapi lainnya dengan gejala yang ringan. Sapi Bali yang terinfeksi mengalami kematian hingga 71% pada 1-6 minggu pertama (Chen *et al.*, 1999). Sedangkan sapi yang selamat baru membentuk respon imunitas adaptif (antibodi) pada

minggu ke-5 dimana terdeteksi hingga 22 bulan dan menjadi *carrier* virus hingga 24 bulan (Soeharsono *et al.*, 1995). Deteksi penyakit tersebut selama ini hanya berdasarkan gejala penyakit yang kemungkinan besar mirip dengan penyakit lain dan metode ELISA masih menunjukkan reaksi silang dengan BIV (*Bovine Immunodeficiency Virus*) (Hartaningsih, 1993). Deteksi berdasarkan amplifikasi asam nukleat memberikan hasil yang akurat dan sensitif. Teknik deteksi ini tergantung pada keberhasilan teknik isolasi atau ekstraksi asam nukleat (DNA atau RNA) (McDowell, 1999). dari sampel segar seperti darah dan organ maupun sampel awetan seperti spesimen dalam blok parafin. Penelitian ini mencoba mengisolasi RNA virus dari sampel spesimen yang telah diparafin kemudian dikonfirmasi menggunakan teknik RT-PCR.

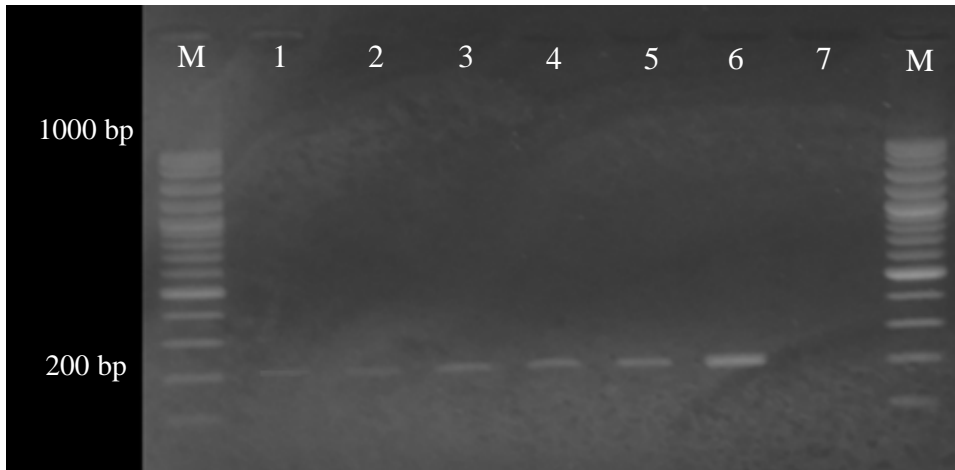
MATERI DAN METODE

Isolasi RNA diawali dengan deparafinisasi menggunakan xilen selama 30 menit pada suhu 37°C sebanyak tiga kali dan selanjutnya dicuci dengan alkohol 100% melalui sentrifugasi pada kecepatan 13000 rpm selama 10 menit sebanyak 3 kali. Pelet diresuspensi dengan PBS dan diekstrak 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 5 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. Kontrol positif dengan plasmid rekombinan yang telah disisipi gen *env* sepanjang 1.1 kbp (pGEX-TM) dan kontrol negatif berupa dH₂O. 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

Amplikon RT-PCR dianalisis dengan gel elektroforesis 1,8% menunjukkan adanya pita spesifik pada marker sekitar 200 bp. Hal ini menunjukkan RNA virus berhasil diekstraksi dengan integritas yang bagus walaupun sampel telah diawetkan dengan parafin dalam waktu yang lama. Keutuhan (integritas) cetakan sebagai target reaksi amplifikasi sangat menentukan hasil amplifikasi dimana target yang terdegradasi akan menghambat amplifikasi (McDowell, 1999). Reaksi berjalan dengan baik dengan ditunjukkan adanya pita amplikon pada kontrol positif dan tidak adanya pita amplikon pada kontrol negatif (Roux, 1995).



Gambar 1. Gambaran amplicon hasil *two step* RT-PCR dari sampel jaringan pada gel elektrofoesis 1,8%. (1-5) sampel jaringan limpa, ginjal, paru, hati, lidah; (6) kontrol positif plasmid pGEX-TM; (7) kontrol negatif dH₂O; (M) Marker 1000 bp.

KESIMPULAN

RNA virus jembrana berhasil diisolasi dari jaringan terinfeksi yang telah diparafinasi dan disimpan dalam waktu yang lama.

DAFTAR PUSTAKA

- Chen H, Wilcox G, Kertayadnya G and Wood C (1999). Characterization of the Jembrana disease virus tat gene and the cis- and trans-regulatory elements in its long terminal repeats. *J. Virol.*, **73** : 658-666.
- Hartaningsih N, Wilcox GE, Kertayadnya G and Astawa M (1993a). Antibody response to Jembrana disease virus in Bali cattle. *Vet. Microbiol.*, **39** : 15-23.
- 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.
- Roux, K.H. (1995). Optimation and Trobleshooting in PCR. Manual Supplement. *Genom Res.* Cold Spring Harbour Laboratory Press **4**:S185-S194.

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.