

IDENTIFIKASI VIRUS PENYAKIT JEMBRANA PADA SAPI BALI MENGUNAKAN PENANDA MOLEKULER GEN *env* SU* [Identification of Jembrana Disease Virus by Using a Molecular Marker of *env* SU Gene in Bali Cattle]

Indriawati[✉], Endang Tri Margawati and Muhammad Ridwan

Laboratorium Genetika Molekuler Hewan, Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI

Jl. Raya Bogor KM.46 Cibinong 16911

email: indr020@lipi.go.id

ABSTRACT

Up to present, detection of Jembrana disease virus has been identified through serological test. Advances in molecular biology has enabled to detect Jembrana disease virus earlier, quicker and more accurate by application of molecular markers. The aim of this study was to identify Jembrana disease by using molecular marker of *env* SU gene in Bali cattle. Total RNA of Jembrana disease virus (7732bp) was collected from spleen of Bali cattle suspected Jembrana disease by using RNEasy Protect Mini Kit (QIAGEN). A pair of specific primers was designed from Jembrana viral genome (*env* SU) that accessed through a GenBank with Accession Number of U21603. A kit of Access Quick RT-PCR System (PROMEGA) was used for Reverse-Transcriptase-PCR (RT-PCR). The RT-PCR products were visualized on 2% agarose gel. The result showed a single band with the size of \pm 900bp in all samples. This size indicated that *env* SU gene was existed in the examined spleen samples. This finding suggests that a molecular marker could be used accurately to identify the *env* SU gene in JDV of Bali cattle.

Keywords: Molecular identification, Jembrana disease virus, *env* SU, Bali cattle

ABSTRAK

Sampai saat ini, deteksi penyakit virus Jembrana masih dilakukan secara serologi. Kemajuan dibidang biologi molekuler dengan penanda molekuler memungkinkan untuk mendeteksi penyakit Jembrana lebih awal, lebih cepat dan akurat. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi virus penyakit Jembrana pada sapi Bali menggunakan penanda molekuler gen *env* SU. Total RNA virus dari genom Jembrana (7732 pb) dikoleksi dari limpa sapi Bali yang dicurigai terinfeksi penyakit Jembrana menggunakan RNEasy Protect Mini Kit (QIAGEN). Sepasang primer spesifik yang berasal dari genom virus Jembrana (*env* SU) yang diakses dari GenBank dengan *Accession Number* U21603 telah dirancang. Proses *Reverse-Transcriptase-PCR* (RT-PCR) menggunakan kit dari Access Quick RT-PCR System (PROMEGA). Produk RT-PCR divisualisasikan pada gel agarosa 2%. Hasil RT-PCR menunjukkan adanya pita tunggal dengan ukuran \pm 900 pb. Ukuran ini mengindikasikan bahwa gen *env* SU terdapat pada sampel limpa terkoleksi. Penelitian ini menunjukkan bahwa penanda molekuler gen *env* SU dapat digunakan untuk mengidentifikasi penyakit Jembrana pada sapi Bali.

Kata Kunci: Identifikasi molekuler, virus penyakit Jembrana, gen *env* SU, sapi Bali

PENDAHULUAN

Penyakit Jembrana (*Jembrana Disease*= JD) pada sapi Bali disebabkan oleh virus penyakit Jembrana (*Jembrana Disease Virus*= JDV) termasuk dalam kelompok retrovirus berdasarkan pada aktivitas *reverse transcriptase*. Virus Jembrana merupakan virus RNA dengan utas tunggal, berbentuk icosahedral dengan panjang basa 7732 pasang basa (pb) dan bersifat patogen hanya pada sapi Bali (Kertayadnya *et al.*, 1993). Gejala umum ternak yang terserang penyakit Jembrana adalah demam tinggi, *lymphadenopathy*, *lymphopenia*, keringat darah dan *mucus* yang berlebihan pada mulut dan hidung. Kematian ternak akibat JDV terjadi pada 1 atau 2 minggu setelah infeksi (Wilcox *et al.*, 1997).

Daerah Kalimantan Selatan memiliki sejarah terhadap JD, adanya lalu lintas ternak dimana sapi Bali didatangkan ke Kalimantan Selatan dapat mem-

icu terjadinya JD. Penyakit epidemik ini terjadi berulang kali setiap kali sapi Bali masuk ke Kalimantan Selatan (Sulaxsono, 2013 komunikasi personal). Oleh karena itu diperlukan deteksi JD yang lebih awal sebelum sapi Bali dikirim ke Kalimantan.

Diagnosis awal ini juga penting untuk menghindari terjadinya kematian pada sapi bali dan aborsi pada ternak sapi Bali betina. Sampai saat ini, deteksi JD dilakukan menggunakan uji serologis (Agustini, 2011). Namun tidak seperti uji lentiviral pada umumnya, diagnosis baru dapat ditegakkan sebelum tahap penyakit klinis menjadi kronis, diagnosis JD tidak dapat ditegakkan jika belum mencapai 5-15 minggu setelah timbulnya gejala klinis (Desport *et al.*, 2009)

Uji secara serologis memiliki beberapa kelemahan seperti tidak dapat digunakan pada stadium awal penyakit, serta efektivitas dan akurasinya

*Diterima: 26 Desember 2012 - Disetujui: 10 Februari 2013

yang rendah. Oleh karena itu, seringkali hasil pengujian secara serologis memerlukan waktu yang cukup lama sampai dapat diketahui penyebab kematian ternak tersebut. Namun disisi lain, tindakan pencegahan harus dilakukan secara cepat untuk menghindari terjadinya penyebaran penyakit JD. Teknik molekuler merupakan suatu terobosan untuk mendeteksi penyebab kematian ternak sapi Bali seawal mungkin, sehingga tindakan pencegahan dapat dilakukan lebih awal untuk menghindari kematian pada sapi Bali.

Perkembangan dalam bidang molekuler memungkinkan untuk mendeteksi penyakit lebih awal, lebih cepat dan akurat. Bioinformatika sangat membantu dalam menelusuri informasi yang berkaitan dengan virus Jembrana. Informasi yang diperoleh digunakan untuk merancang penanda molekuler yang spesifik untuk JD. Teknik molekuler memungkinkan dapat mengidentifikasi secara akurat virus Jembrana pada tingkat DNA menggunakan metode PCR.

Penelitian pendahuluan yang dilakukan oleh Desport *et al.* (2007) menunjukkan bahwa pada ternak yang telah sembuh (recovery), masih terdeteksi adanya virus Jembrana dengan metode PCR. Lewis *et al.* (2009), menyarankan menggunakan kombinasi antara *real-time* PCR dan ELISA JDV p26-his untuk mendeteksi ternak sapi Bali yang terinfeksi penyakit JD di Indonesia.

Virus Jembrana memiliki 3 gen utama, yaitu *gag*, *pol* dan *env*. Gen *env* menyandi protein yang terdapat pada bagian terluar dari virus penyakit Jembrana yaitu protein *Surface Unit* (SU) dan *Transmembrane* (TM). Gen *env* SU menyandi protein SU berbentuk seperti tudung payung dan berada di bagian terluar dari gen *env* (Chadwick *et al.*, 1995). Protein SU memiliki peranan penting pada saat awal proses replikasi dan berinteraksi dengan sel inang

dengan cara mengikat partikel virus Jembrana pada permukaan sel inang (Gallaher *et al.*, 1989). Oleh karena protein SU dapat memicu respon antibody yang mampu menetralsasi virus (Ball *et al.*, 1992), maka gen *env* SU dipilih sebagai penanda molekuler untuk penyakit JD. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi virus Jembrana dengan menggunakan penanda molekuler gen *env* SU.

BAHAN DAN CARA KERJA

Perancangan Penanda Molekuler

Penanda *env* SU dirancang berdasarkan sekuensi genom virus Jembrana, yang diperoleh dari Genbank dengan nomor akses U21603. Ukuran target yang diharapkan adalah 900 pb. Ukuran panjang dan sekuensi penanda ditampilkan pada Tabel 1.

Sampel Limpa

Sebanyak 4 jaringan limpa sapi Bali dikoleksi dari Kotabaru Kalimantan Selatan. Jaringan limpa dipotong kecil-kecil dan dimasukkan kedalam tabung plastik steril yang telah berisi larutan RNAlater untuk menghindari terjadinya degradasi RNA. Sample limpa kemudian disimpan pada suhu -20 °C sampai akan digunakan.

Isolasi total RNA

Masing-masing sebanyak 30 mg jaringan limpa digunakan untuk diambil Total RNANYa menggunakan RNEasy Protect Mini Kit (QIAGEN). Metode isolasi RNA mengikuti prosedur yang disarankan oleh QIAGEN. Total RNA yang dikoleksi digunakan selanjutnya untuk proses RT-PCR

Reverse-Transcriptase (RT) PCR

Penanda spesifik yang telah dirancang digunakan dalam proses RT-PCR. Reagen RT-PCR *Access Quick System* yang terdiri dari 5x AMV Tfl PCR Buffer; 10 mM dNTP mix; 25 mM MgSO₄; 10

Tabel 1. Sekuen Penanda Molekuler Gen *env-su*

Penanda	Sekuen 5' à 3'	Ukuran (pb)
JSUF	GGAATTCATGCTCCTGAGCCCC	22
JSUR	CCAAGCTTCTCTTTCCCCAGG	22

pmol Primer F; 10 pmol Primer R; AMV RT 5U/ μ l; Tfl Polymerase 6U/ μ l, digunakan dalam volume total 25 μ l mix RT-PCR. Program RT-PCR sebagai berikut denaturasi awal 95°C selama 1 menit, diikuti 95°C selama 1 menit; 55°C selama 1 menit dan 72°C selama 1 menit, masing-masing sebagai denaturasi, *annealing* dan ekstensi untuk 30 siklus, dan inkubasi akhir pada 72°C selama 4 menit untuk memastikan ekstensi lengkap.

Visualisasi Fragmen

Hasil RT-PCR divisualisasikan pada 2% gel agarosa. Gel agarosa direndam dalam larutan yang mengandung 5 μ g/ml EtBr selama 15 menit selanjutnya didokumentasikan dengan difoto.

Analisis Sekuen

Hasil RT-PCR disekuensing menggunakan penanda molekuler *env* SU melalui jasa perusahaan sekuensing komersial dan dianalisa dengan program BLASTn melalui website NCBI.

HASIL

Penanda molekuler spesifik gen *env* SU JSUF dan JSUR telah dirancang berasal dari genom virus Jembrana yang diakses melalui Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Ukuran dan sekuen penanda tersebut ditampilkan pada Tabel 1.

Identifikasi Penyakit Jembrana

Hasil amplifikasi RT-PCR virus Jembrana menggunakan penanda molekuler gen *env* SU

(Gambar 1) menunjukkan ukuran yang sesuai target, yaitu 900pb.

Analisis Sekuensing

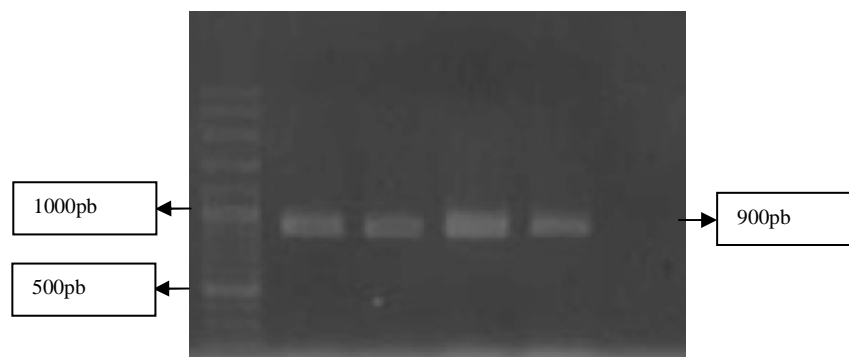
Sampel RT-PCR yang positif disekuensing untuk mengetahui keberadaan daerah spesifik JDV menggunakan penanda molekuler gen *env* SU *forward* dan *reverse* (Gambar 2). Dendrogram yang menggambarkan kesamaan urutan DNA antara virus Jembrana sampel dengan sekuen virus Jembrana yang ada didalam Genbank ditampilkan pada Gambar 3. Analisis ini dilakukan melalui situs NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) menggunakan metode *neighbour joining* dengan membandingkan sekuen gen *env* SU sampel dengan sekuen gen *env* SU virus Jembrana yang sudah ada dalam website tersebut.

PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil penelitian, diperoleh cDNA gen *env* SU dengan panjang \pm 900 pb menggunakan primer spesifik untuk gen *env* SU. Hal ini sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Chadwick *et al.* (1995) gen *env* SU merupakan bagian dari gen *env*, dikodekan oleh nukleotida 5556-6463 pada genom JDV dan memiliki panjang fragment \pm 900 pb.

Identifikasi Penyakit Jembrana

Pada Gambar 1, menunjukkan ke-empat sampel limfa (100%) hasil RT-PCR teridentifikasi positif JD. Hal ini dibuktikan dengan munculnya pita frag-



Gambar 1. Hasil RT-PCR menggunakan penanda molekuler gen *env-su* (M=100 pb DNA Marker; 1-4 Sampel RNA; 5= Kontrol Negatif)

```

Query 32  TCCCAAGGTTATGCATTAGCAATGCTCCCATACCCGACTGTGTACTGGACAGTGCAGA 91
          |||
Sbjct 446  TCCCATGGTTTTGCATTAGCAATGCTCCCATACCCGACTGTGTACTGGACAGTGCAGA 505

Query 92  AGCCAGATCAAAAACACCAACAGATTGAAAACGTGATGGAATTACAGGAAGTGTAGATA 151
          |||
Sbjct 506  AGCCAGATCAAAAACACCAACAGATTGAAAACGTGATGGAATTACAGGAAGTGTAGATA 565

Query 152  ATGCTACCTTTTTTGAAGTACCAGACCTATTTGACAGAGTGTACCTAGAATTGGCCCGCT 211
          |||
Sbjct 566  ATGCTACCTTTTTTGAAGTACCAGACCTATTTGACAGAGTGTACCTAGAATTGGCCCGCT 625

Query 212  TAGATGCAAACAGTACTGGGGTCCCTGTAATAATTCCCCCTACCGGAATAAGCCAGGTTA 271
          |||
Sbjct 626  TAGATGCAAACAGTACTGGGGTCCCTGTAATAATTCCCCCTACCGGAATAAGCCAGGTTA 685

Query 272  AGGGAGACTGCTCAACGGGAGACATTCAAGGGATGAATGAAACACTGAGCACTAGAGGAA 331
          |||
Sbjct 686  AGGGAGACTGCTCAACGGGAGACATTCAAGGGATGAATGAAACACTGAGCACTAGAGGAA 745

Query 332  CTCTAGGGGAGAGAAGTTTCCTGAGCATAAGGCCAGGAGGATGGTTCCACCAACTACTG 391
          |||
Sbjct 746  CTCTAGGGGAGAGAAGTTTCCTGAGCATAAGGCCAGGAGGATGGTTCCACCAACTACTG 805

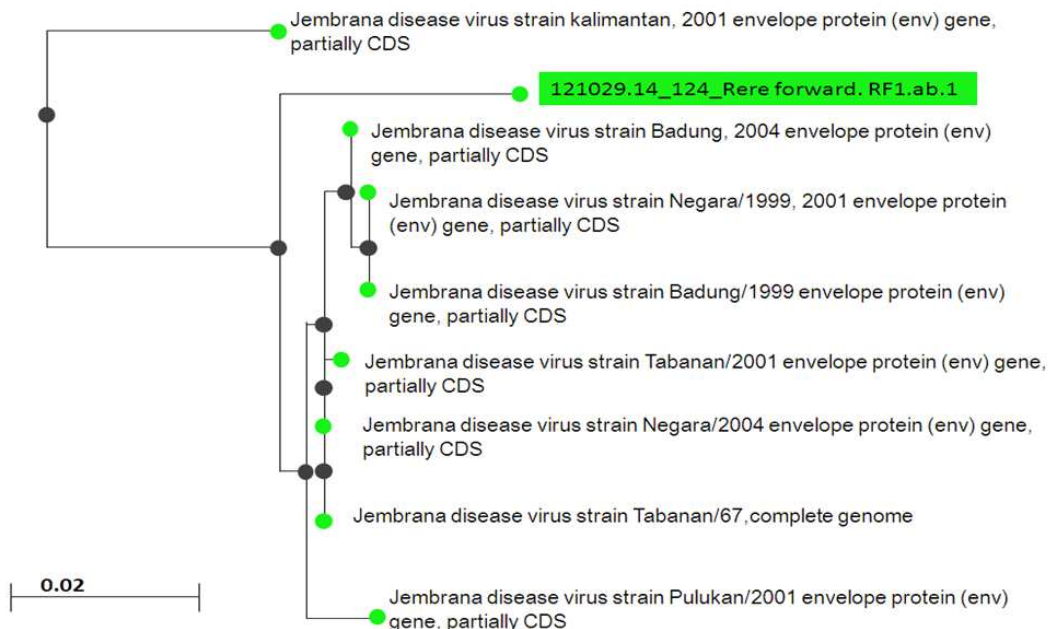
Query 392  TATGGTTCTGTGTCCTTGGCCATTGGATTATCCGAAGAAAGGAAAATCTGGCACAAG 451
          |||
Sbjct 806  TATGGTTCTGTGTCCTTGGCCATTGGATTATCCGAAGAAAGGAAAATCTGTGAGAAG 865

Query 452  GGAGTGGTCAGGGAAGAAATTGCCTCGACCCAATAAATGTACCAGCCCGAGTATCTA 511
          |||
Sbjct 866  GGAGTGGTCAGGTAAGAAATTGCCTCGACCCAATAAATGTACCAGCCCAAGAGTAGCTA 925

Query 512  GTTATTCTACTGGCCCTTGGGATACAAAGGGAAGAACTCTATAAACAAAGGGGTCAAAT 571
          |||
Sbjct 926  ATTATTCTACTGCCCTTGGGAATACAAAGGGAAGAACTATATAAACAAAGGGGTTGAAGT 985

Query 572  GTGTATGAGGA 582
          |||
Sbjct 986  GTGTAGGAGGA 996
    
```

Gambar 2. Hasil Blast sekuens gen *env* SU sampel dengan gen *env* SU virus Jembrana yang ada pada GenBank-NCBI



Gambar 3. Diagram yang menggambarkan pengelompokkan virus penyakit Jembrana. Strain virus Jembrana sampel (stabilo hijau) memiliki kesamaan dengan tujuh strain virus Jembrana lainnya yang berasal dari Bali, namun berbeda dengan strain virus Jembrana yang berasal dari Kalimantan.

men berasal dari RT-PCR menggunakan penanda marker gen *env* SU yang sesuai dengan target, yaitu \pm 900 pb. Proses deteksi penyakit JD ini memerlukan waktu kurang lebih tiga jam. Desport *et al.* (2009) menyatakan bahwa, uji secara serologis lebih sederhana tetapi hanya dapat mendeteksi antibodi pada sapi Bali terinfeksi 5 - 15 minggu setelah munculnya gejala klinis. Teknik PCR tampaknya dapat secara efektif mendeteksi ternak sapi Bali yang mengandung virus JD jauh lebih awal sebelum kemunculan gejala klinis.

Penelitian ini menunjukkan bahwa teknik molekuler lebih efektif dan akurat untuk mendeteksi keberadaan virus JD jika dibandingkan dengan hasil serologis. Beberapa peneliti telah menggunakan teknik molekuler untuk mendeteksi penyakit, seperti Kirkan *et al.* (2008) mendeteksi Q-Fever pada hewan dan manusia, penyakit mulut dan kuku (Longjam *et al.*, 2011), Tuberculosis pada sapi (Collins, 2011), Brucellosis pada domba (Leyla *et al.*, 2003). Menurut Hunt dan Lello (2012) deteksi penyakit viral dapat dilakukan dengan metode *Reverse Transcription-PCR* and PCR. Penelitian tentang perbandingan akurasi penggunaan teknik molekuler versus serologis untuk penyakit Jembrana telah dilakukan oleh Barboni *et al.* (2001), yang menemukan bahwa uji serologis hanya mampu mendeteksi lima dari 10 sampel yang ada (akurasi 50%). Akan tetapi, dengan teknik PCR ternyata akurasinya mencapai 100% yaitu 10 dari 10 sampel yang terinfeksi oleh virus penyakit Jembrana. Berdasarkan data molekuler yang diperoleh, tindakan pencegahan dapat dilakukan pada area dimana sapi Bali telah terinfeksi penyakit JD secara fatal.

Analisis Sekuensing

Hasil BLAST (Gambar 2) menunjukkan bahwa sekuen gen *env* SU JDV asal Banjarbaru Kalimantan Selatan memiliki kemiripan 96% dengan sekuen gen *env* SU delapan strain virus Jembrana yang telah dipublikasi oleh Genbank (Gambar 3). Nomor Akses pada GenBank yaitu DQ229290, U21603.1, DQ229291.1, DQ229288.1, DQ229289.1, DQ229287.1, DQ229292.1, DQ229293.2 (Desport *et al.*, 2007).

Gen *env* SU dari sampel penelitian merupakan sebagian dari *Coding DNA Sequence* (CDS) gen utuh (full length) yang mengkodekan protein Envelope (Env) yang berukuran 2345 basa (Desport *et al.*, 2007). Oleh karena tingginya kemiripan ini menunjukkan bahwa gen *env* SU dapat digunakan untuk penanda molekuler sebagai metode identifikasi penyakit Jembrana.

KESIMPULAN

Penanda genetik *env* SU dengan metode RT-PCR atau PCR dapat digunakan untuk mendeteksi dan mengidentifikasi sapi Bali yang dicurigai terinfeksi penyakit Jembrana lebih dini. Gen *env* SU virus Jembrana dari Banjarbaru Kalimantan Selatan berkerabat dengan gen pengkode protein Env delapan strain virus Jembrana.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh Program Penelitian DIKTI 2011. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dinas Peternakan Kotabaru dan Banjarbaru Kalimantan Selatan dalam penyediaan sampel limfa sapi Bali.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustini NLP.** 2011. Surveillans penyakit Jembrana di Provinsi Bali, Lampung dan Nangroe Aceh Darussalam. *Buletin Veteriner BBVet Denpasar* **23(79)**, 69-76
- Ball JM, KE Rushlow, CJ Iseel and R Montelaro.** 1992. Detailed mapping of the antigenicity of the Surface Unit glycoprotein of equine infections anemia virus by using synthetic peptide strategies. *Journal of Virology* **66**, 732-742.
- Barboni P, I Thompson, J Brownlie, N Hartaningsih and ME Collins.** 2001. Evidence for the presence of two bovine lentiviruses in the cattle population of Bali. *Veterinary Microbiology* **80**, 313-27.
- Chadwick BJ, RJ Coelen, GE Wilcox, LM Samuels and G Kertayadnya.** 1995. Nucleotide sequence analysis of Jembrana disease virus: a bovine lentivirus associated with an acute Disease syndrome. *Journal of Genetics Virology* **76**, 1637-1650.

- Collins DM. 2011.** Advances in molecular diagnostics for mycobacterium bovis. *Veterinary Microbiology* **151**, 2–7.
- Desport M, ME Stewart, AS Mikosza, CA Sheridan, SE Peterson, O Chavand, N Hartaningsih and GE Wilcox. 2007.** Sequence analysis of Jembrana disease virus strains reveals a genetically stable lentivirus. *Virus Research* **126 (1-2)**, 233-244.
- Desport M, WGF Ditcham, JR Lewis, TJ McNab, ME Stewart, N Hartaningsih and GE Wilcox. 2009.** Analysis of Jembrana disease virus replication dynamics in vivo reveals strain variation and a typical responses to infection. *Journal of Virology* **386**, 310-316.
- Hunt PW and J Lello. 2012.** How to make DNA count: DNA-based diagnostic tools in veterinary parasitology. *Veterinary Parasitology* **186**, 101– 108.
- Kertayadnya G, GE Wilcox, S Soeharsono, N Hartaningsih, RJ Coelen, RD Cook and J Brownlie. 1993.** Characteristics of a retrovirus associated with Jembrana disease in Bali Cattle. *Journal of Genetics Virology* **74**, 1765-1773.
- Kirkan S, O Kaya, S Tekbiyik and U Parin. 2008.** Detection of *Coxiella burnetii* in cattle by PCR. *Turkey Journal Veterinary Animal Science* **32 (3)**, 215-220.
- Leyla G, G Kadri and O Umran. 2003.** Comparison Polymerase Chain Reaction and bacterial culture for the diagnosis of sheep Brucellosis using abortus fetus samples. *Veterinary Microbiology* **93**, 53-61.
- Lewis J, T McNaba, M Tenaya, N Hartaningsih, GE Wilcox and M Desport. 2009.** Comparison of immunoassay and real-time PCR methods for the detection of Jembrana disease virus infection in Bali cattle. *Journal of Virology Methods* **159**, 81-86
- Longjam N, DEB Rajib, AK Sarmah, T Tayo, VB Awachat and VK Saxena. 2011.** A Brief review on diagnosis of Foot-and-Mouth disease of livestock: conventional to molecular tools. *Veterinary Medical International* **2011**, 1-17.
- Gallaher W, J Ball, R Garry, MC Griffin and R Montelaro. 1989.** A General model for TM proteins of HIV and other retroviruses. *AIDS Research Human retroviruses* **5**, 431-440.
- Wilcox GE, S Soeharsono, DMN Dharma and JW Copland. 1997.** Jembrana Disease and the Bovine Lentivirus. *ACIAR proceedings* **75**, 10-75