

PENENTUAN SUBTIPE VIRUS AVIAN INFLUENZA DENGAN METODE SINGLE STEP MULTIPLEX REVERSE TRANSCRIPTASE- POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-PCR) ISOLAT ASAL PROVINSI ACEH

Typing and Subtyping of Avian Influenza Virus Isolate from Aceh by Using Single Step Multiplex Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Method

Teuku Zahrial Helmi¹, Rini Widayanti², dan Aris Haryanto²

¹Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

²Bagian Biokimia Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

E-mail: zahrialbiochemistrykhusk@gmail.com

ABSTRAK

Tujuan dari penelitian ini adalah mengidentifikasi keberadaan gen M, H5, dan N1 virus *avian influenza* (AI) melalui metode *single step multiplex reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR), sebagai acuan untuk peneguhan diagnosis secara molekuler virus AI di Provinsi Aceh. Penelitian ini menggunakan 11 isolat virus AI asal Provinsi Aceh yang diperoleh dari Laboratorium Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner (BPPV) Regional I Medan di Sumatera Utara dari tahun 2006-2008. Penelitian dilakukan di Laboratorium Virologi BPPV Regional I di Medan, Sumatera Utara. Amplifikasi terhadap gen matriks (M) virus AI menggunakan metode *simplex* RT-PCR. Hasil *simplex* RT-PCR terhadap gen M diperoleh 10 isolat yang menunjukkan pita *deoxyribonucleic acid* (DNA) pada 276 bp dan satu isolat yang tidak muncul, kemudian dilanjutkan dengan metode *single step multiplex* RT-PCR menggunakan pasangan primer gen penyandi protein N1, H5, dan M. Produk PCR 131 bp (N1), 189 bp (H5), dan 276 bp (M) muncul sebagai hasil elektroforesis dari semua isolat virus AI. Semua virus AI yang mewabah dari tahun 2006-2008 di Provinsi Aceh termasuk ke dalam virus influenza A sub tipe H5N1.

Kata kunci: virus AI, *single step multiplex* RT-PCR, gen M, gen H5, gen N1

ABSTRACT

The aims of this research was to identify the presence of M, H5, and N1 genes of AI virus by single-step multiplex RT-PCR method, as a reference for validation of molecular diagnostic of AIV in Aceh Province. This research used 11 AI virus isolates from several regions in Aceh province which collected from BPPV Regional I Medan during 2006 to 2008. Research was conducted at the Virology Laboratory of Investigation and Testing Center of Veterinary (BPPV) Regional I Medan. Amplification of the matrix gene (M) AI virus using Simplex method RT-PCR was performed on 11 isolates of AI virus. Results of simplex RT-PCR for M gene showed that only 10 isolates generated DNA bands 276 bp, and 1 isolate do not appear, then 10 isolates were further amplified by single step multiplex RT-PCR using primer set of encoding for M, H5, and N1 genes. RT-PCR products of all 10 isolates showed that the DNA fragments generated were 131 bp for N1 gene, 189 bp for H5 gene, and 276 bp for M gene. All AI viruses outbreak during 2006-2008 in Aceh Province are from H5N1 subtype.

Key words: avian influenza virus, *single step multiplex* RT-PCR, gene M, gene H5, gene N1

PENDAHULUAN

Kasus flu burung (*avian influenza*= AI) di Provinsi Aceh pertama sekali muncul pada tahun 2004, dengan ditemukannya kasus pertama pada ayam kampung (*broiler*) di kota Banda Aceh dan mewabah hampir di seluruh kabupaten di Provinsi Aceh. Berdasarkan pemeriksaan yang dilakukan oleh Laboratorium Tipe B Dinas Kesehatan Hewan dan Peternakan Provinsi Aceh, kasus AI sampai dengan tahun 2008 telah ditemukan di 12 kabupaten di Provinsi Aceh, dengan kematian ternak lebih dari 20.000 ekor. Pemeriksaan atau diagnosis kasus AI di Provinsi Aceh umumnya dilakukan berdasarkan gejala klinis, isolasi virus, *rapid test*, dan pemeriksaan patologi anatomi (Anonimus, 2008).

Avian influenza disebabkan virus *ribonucleic acid* (RNA) berantai tunggal tipe A, yang terdiri atas 8 segmen gen yang menyandi sekitar 10 jenis protein. Kesepuluh protein tersebut yaitu hemagglutinin (HA) dan neuraminidase (NA), nukleoprotein (NP), protein matriks (M1 dan M2), protein polimerase (PA, BP1, dan BP2) serta protein nonstruktural (NS1 dan NS2) (Ito *et al.*, 1991). Sampai saat ini virus AI tipe A telah

diketahui ada 16 jenis sub tipe HA (H1-H16) dan ada 9 sub tipe NA (N1-N9) (Boyce *et al.*, 2008; Yee *et al.*, 2008).

Pemeriksaan virus AI dengan metode *hemagglutination* (HA) dan *hemagglutination inhibition* (HI) tes adalah metode diagnostik yang rutin dilakukan di laboratorium-laboratorium diagnostik untuk mendeteksi dan menentukan sub tipe virus influenza A. Penggunaan teknik molekuler secara langsung dapat mendeteksi virus dalam cairan alantois yang telah diinfeksi sehingga identifikasi dan karakterisasi genetika virus influenza A termasuk AI menjadi cepat dan akurat (OIE, 2000).

Pemeriksaan secara molekuler melalui metode *single step multiplex reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR) merupakan teknik yang mempunyai banyak kelebihan bila dibandingkan dengan metode-metode PCR lainnya. Metode ini lebih sederhana, murah, sangat spesifik, dan dapat mengurangi risiko kontaminasi silang di antara isolat uji serta tidak memerlukan waktu yang lama karena dapat mengamplifikasi beberapa gen dari isolat yang diuji secara sekaligus. Metode *single step multiplex* RT-PCR

ini sangat tepat bila digunakan di laboratorium-laboratorium diagnostik untuk meminimalkan biaya operasional laboratorium dan dapat diperoleh hasil dalam waktu yang singkat (Payungporn *et al.*, 2004).

Penelitian untuk menentukan tipe dan subtipe virus AI dengan metode *single step single tube multiplex* RT-PCR pada 400 isolat virus influenza dari tahun 1999-2001 di San Diego, California telah dilakukan oleh Poddar (2002). Penggunaan metode *multiplex* RT-PCR juga pernah dilakukan oleh Saberfar *et al.* (2007) untuk menentukan virus AI tipe A dan subtipe H5 dan H9 di Iran. Payungporn *et al.* (2004) pernah melakukan penelitian untuk mendeteksi tipe dan subtipe dari virus AI H5N1 dengan menggunakan metode *single step multiplex* RT-PCR terhadap 26 sampel yang dikoleksi selama tahun 2004 di Thailand. Penelitian tersebut menggunakan satu pasang primer yang spesifik terhadap gen M, H5, dan N1 dengan besarnya fragmen masing-masing 276, 189, dan 131 bp. Penelitian untuk menentukan tipe dan subtipe virus AI yang pernah menginfeksi berbagai unggas di Provinsi Aceh melalui metode *single step multiplex* RT-PCR isolat virus AI subtipe H5N1 belum pernah dilaporkan. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan menerapkan metode *single step multiplex* RT-PCR untuk menentukan tipe dan subtipe virus AI sebagai acuan untuk peneguhan diagnosis secara molekuler virus AI H5N1 di Provinsi Aceh.

MATERI DAN METODE

Preparasi Sampel

Sampel berasal dari isolat virus yang ada di Laboratorium Virologi Balai Penyelidikan, dan Pengujian Veteriner (BPPV) Regional I di Medan, Sumatera Utara dari tahun 2006-2008. Untuk mendapatkan sampel dalam penelitian ini, maka isolat virus diinokulasikan kembali ke dalam telur ayam berembrio yang berumur 10-11 hari, dan diinkubasikan pada suhu 37° C. Setelah 24-72 jam diinkubasi, virus dipanen dengan cara mengambil cairan korioalantoisnya.

Ekstraksi RNA Virus

Ekstraksi RNA virus yang berasal dari cairan korioalantois dilakukan menggunakan *Purelink™ micro-to-Midi Total RNA Purification System* dari Invitrogen, mengikuti prosedur standar yang direkomendasikan perusahaan. Ekstrak RNA selanjutnya digunakan sebagai *template* untuk RT-PCR dan disimpan suhu -20° C sampai digunakan.

Amplifikasi Gen M dengan Metode Simplex RT-PCR

Setelah diperoleh *template* dari proses isolasi RNA virus, maka semua isolat uji diamplifikasi terhadap gen matriks (M) menggunakan metode *simplex* RT-PCR. Sebelum dilakukan amplifikasi, dipersiapkan *master mix* dengan volume 22,5 µl untuk satu sampel. Sebanyak 1x *buffer mix reaction* dengan volume 12,5 µl dimasukkan ke dalam *tube*, kemudian ditambahkan dengan 0,5 µl *primer forward* dan 0,5 *primer reverse* yang spesifik terhadap gen M dengan konsentrasi 10 pmol/µl, lalu

ditambahkan dengan 8 µl dH₂O dan 1 µl enzim *Taq Superscript™ III Polimerase*.

Campuran *master mix* ditambahkan dengan 2,5 µl *RNA template* sehingga volume total reaksi untuk satu sampel adalah 25 µl. Campuran reaksi PCR yang terdiri atas *master mix* dan *template* siap untuk diamplifikasi. Proses sintesis cDNA dilakukan dengan proses *reverse transcription* pada suhu 48° C selama 45 menit sebanyak 1 siklus dan *initial denaturation* pada suhu 94° C selama 5 menit, sebanyak 1 siklus. Kemudian proses dilanjutkan pada PCR amplifikasi sebanyak 40 siklus dengan suhu masing-masing denaturasi 94° C selama 30 detik, *annealing* 47° C selama 60 detik, ekstensi 68° C selama 30 detik, dan final ekstensi pada suhu 68° C selama 10 menit.

Analisa Produk Hasil PCR dengan Elektroforesis Gen M

Produk amplifikasi PCR dianalisis dengan elektroforesis pada gel *agarose* 2%. Tahapan dalam melakukan elektroforesis yaitu disiapkan larutan Tris/Borate/EDTA (TBE) bufer 1x konsentrasi sebanyak 1000 ml dengan pengencer akuades. *Agarose* ditimbang sebanyak 2 g dan dimasukkan ke dalam larutan TBE bufer 100 ml (1x konsentrasi), dicampur sampai homogen dan dipanaskan sampai agar larut dengan sempurna. Setelah agar mulai dingin, ditambahkan dengan *ethidium bromida* 1,5 µl (10 mg/ml) dan dihomogenkan. Larutan agar dituang ke gel *tray* dan didinginkan sampai mengeras. Lalu dimasukkan larutan TBE 1 x sampai melebihi permukaan agar.

Setiap sampel yang akan dielektroforesis dicampurkan dengan *loading dye buffer* sebagai pemberat sebanyak 2 µl per sampel yang ditambahkan dH₂O dan dihomogenkan hingga merata. Sampel pertama dimasukkan ke dalam sumuran ke-2 hingga sampel yang ke-11. Pada sumuran pertama diisi dengan DNA *ladder* 100 bp sebagai *marker* sedangkan kontrol positif dimasukkan pada sumuran yang terakhir. Setelah semua sumuran terisi dengan sampel, *marker* dan kontrol positif, dilakukan *running* elektroforesis pada tegangan 135 volt selama 45 menit. Hasil elektroforesis dibaca pada *trans illuminator viewer*.

Multiplex RT-PCR terhadap Gen M, H5, dan N1

Hasil *simplex* RT-PCR terhadap gen M setelah dielektroforesis, yang menunjukkan *band* pada 276 bp dilanjutkan dengan pemeriksaan dengan metode *single step multiplex* RT-PCR. Metode ini menggunakan tiga primer spesifik untuk gen H5, N1, dan M. Langkah-langkahnya dalam melakukan *single step multiplex* RT-PCR adalah mempersiapkan *master mix* dengan volume 22,5 µl untuk satu sampel. Sebanyak 1x *buffer mix reaction* dengan volume 12,5 µl dimasukkan ke dalam *tube*, kemudian ditambahkan dengan masing-masing 0,5 µl *primer forward* dan 0,5 *primer reverse* yang spesifik terhadap gen H5, N1, dan M dengan konsentrasi 10 pmol/µl. Lalu ditambahkan dengan 6 µl dH₂O dan 1 µl enzim *Superscript™ III One-Step RT-PCR Taq Polymerase*. Campuran *master mix* ditambahkan dengan

2,5 µl *template* sehingga volume total reaksi untuk satu sampel adalah 25 µl.

Campuran reaksi PCR yang terdiri atas *master mix* dan *template* siap untuk diamplifikasi. Proses sintesis cDNA dilakukan dengan proses *reverse transcription* pada suhu 48° C selama 45 menit sebanyak 1 siklus dan *initial denaturation* pada suhu 94° C selama 5 menit, sebanyak 1 siklus. Kemudian proses dilanjutkan pada PCR amplifikasi sebanyak 40 siklus dengan suhu masing-masing denaturasi 94° C selama 30 detik, *annealing* 47° C selama 60 detik, ekstensi 68° C selama 30 detik, dan final ekstensi pada suhu 68° C selama 10 menit.

Analisis Produk Hasil PCR dengan Elektroforesis Gen H5, N1, dan M

Produk hasil amplifikasi dengan metode *single step multiplex* RT-PCR dilakukan *running* elektroforesis pada tegangan 100 volt selama 45 menit pada gel *agarose* 2%. Hasil elektroforesis dibaca pada *trans illuminator viewer* (Payungporn *et al.*, 2004).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi virus dilakukan melalui inokulasi kembali isolat virus yang sudah ada pada telur ayam berembrio yang *specific pathogen free* (SPF) umur 10-11 hari. Setelah dieramkan semua embrio ayam mati pada hari kedua, kemudian diambil cairan korioalantois dan dilakukan tes dengan menggunakan *rapid test*. Uji ini dilakukan untuk memastikan semua isolat yang digunakan dalam penelitian ini benar-benar positif terinfeksi oleh virus AI. Hasil inokulasi dan *rapid test* menunjukkan bahwa semua isolat memberikan hasil positif terhadap keberadaan virus AI. Hasil inokulasi dan *rapid test* isolat disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil inokulasi pada telur ayam *specific pathogen free* (SPF) berembrio umur 10-11 hari dan hasil *rapid test*.

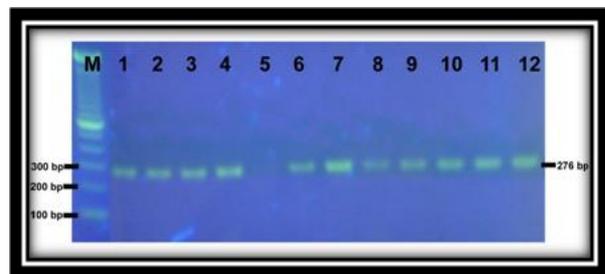
No	Nomor Agenda Sampel*	Asal Daerah	Hasil Inokulasi pada TAB	Hasil <i>Rapid Test</i>
1.	477 (I)/ 08	Aceh Timur	+	+
2.	477 (II)/ 08	Aceh Timur	+	+
3.	15/07	Pidie	+	+
4.	79 / 07	Bireuen	+	+
5.	16/07	Pidie	+	+
6.	477 (III)/ 08	Aceh Timur	+	+
7.	340/08	Lhokseumawe	+	+
8.	739(I)/08	Simeulue	+	+
9.	12/07	Aceh Besar	+	+
10.	12 04/ 06	Pidie	+	+
11.	12 03/ 06	Pidie	+	+

Hasil inokulasi yang positif kemudian dilanjutkan dengan skrining untuk menentukan tipe dari virus AI terhadap isolat yang digunakan dengan cara melakukan amplifikasi terhadap gen matriks. Amplifikasi ini dilakukan dengan metode *single step simplex* RT-PCR dan menggunakan satu pasang primer yang spesifik terhadap influenza tipe A yaitu *reverse* dan *forward*.

Primer yang digunakan seperti yang direkomendasikan oleh Payungporn *et al.* (2004), yaitu primer untuk gen Matrix (M), yaitu sebagai primer *reverse* adalah urutan nukleotida dengan urutan 5'-GTTGACAAAATGACCATCG-3' dan untuk primer *forward* 5'-TGATCTTCTTGAAAATTTGCAG-3' dengan panjang hasil amplifikasi sebesar 276 bp.

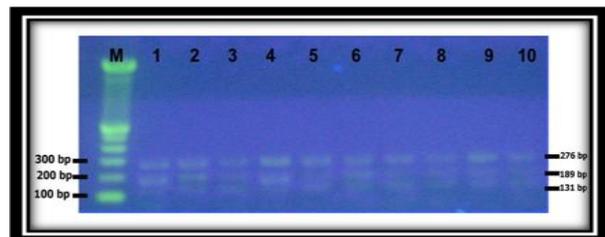
Hasil amplifikasi gen matriks kemudian dilakukan elektroforesis pada *agarose gel* 2% dan diperoleh hasil berupa pita *deoxyribonucleic acid* (DNA) pada satu posisi yang sama untuk semua isolat uji yaitu pada posisi 276 bp seperti yang disajikan pada Gambar 1. Hal ini menandakan bahwa proses RT-PCR berlangsung dengan baik tanpa adanya kontaminasi. Hal ini sesuai dengan laporan Payungporn *et al.* (2004), skrining sampel virus AI yang dilakukan dengan menggunakan primer matriks 276 bp akan memunculkan pita DNA hanya pada kelompok virus AI tipe A.

Pada Gambar 1 dapat dilihat pita hasil amplifikasi gen M pada 276 bp. Hasil tersebut di atas menunjukkan bahwa satu isolat lapangan memberikan hasil yang negatif, yakni tidak munculnya pita DNA yaitu pada isolat ayam/Pidie/16/2007. Hal ini menandakan bahwa isolat tersebut kemungkinan tidak termasuk ke dalam kelompok virus AI tipe A atau tidak teramplifikasinya gen matriks pada isolat virus tersebut. Selanjutnya semua isolat yang termasuk ke dalam kelompok virus tipe A, dilanjutkan dengan melakukan amplifikasi terhadap gen H5, N1, dan M untuk menentukan subtype.



Gambar 1. Hasil elektroforesis produk RT-PCR fragmen gen matriks (M) pada (11) sebelas isolat yang diuji (M= marker; 100 bp, lajur 1-11 isolat yang diuji dan lajur 12 kontrol positif)

Amplifikasi dengan metode *single step multiplex* RT-PCR dilakukan untuk mengidentifikasi gen H5, N1, dan M terhadap sepuluh sampel yang termasuk dalam kelompok virus AI tipe A. Hasil amplifikasi pada semua isolat terbentuk pita 3 DNA disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Hasil elektroforesis produk RT-PCR fragmen gen H5 (189 bp), N1 (131 bp) dan M (276 bp) pada kesepuluh isolat yang diuji (M= marker; 100 bp, lajur 1-11 isolat yang diuji dan lajur 12 kontrol positif)

Semua virus AI yang mewabah dari tahun 2006-2008 di Provinsi Aceh termasuk ke dalam subtipe H5N1. Pita DNA yang muncul pada semua isolat uji secara berurutan pada daerah sekitar 189,131, dan 276 bp. Hasil yang diperoleh sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Payungporn *et al.* (2004) untuk menentukan tipe dan subtipe dari virus AI terhadap 26 sampel yang dikoleksi selama tahun 2004 di Thailand. Pada penelitian tersebut menggunakan 3 pasang primer yang spesifik terhadap gen M, H5, dan N1 dengan besarnya fragmen masing masing adalah 276, 189, dan 131 bp.

KESIMPULAN

Semua virus AI yang mewabah dari tahun 2006-2008 di Provinsi Aceh termasuk ke dalam virus influenza A subtipe H5N1.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kepala Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner Regional I Medan di Sumatera Utara, Kementerian Pertanian Republik Indonesia, dan Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala. Sebagian dana penelitian ini dibiayai oleh proyek Penelitian Multi Tahun Hibah Bersaing XV (TA 2007-2008) Universitas

Gadjah Mada, Yogyakarta atas nama Dr. drh. Aris Haryanto, M.Si.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonimus. 2008. **Laporan Kasus Flu Burung**. Dinas Kesehatan Hewan dan Peternakan Provinsi Nanggroe Aceh Darussalam, Banda Aceh
- Boyce, W.M., S. Christian, K.J. Chris, K. Terra, and C. Carol. 2008. Avian influenza viruses in wild birds: A moving target. **CIMID**. 657:234-241.
- Ito, T., T.G. Owen, K. Yoshihiro, J.B. William, and G.W. Robert. 1991. Evolutionary analysis of the influenza A virus with comparison of the M1 and M2 protein. **J. Virol.** 65(10):5491-5498.
- OIE. 2000. **Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines**. OIE, Paris.
- Payungporn, S., P. Phakdeewit, S. Chutinimitkul, A. Theamboonlers, J. Keawcharoen, K. Raveerakul, A. Amonsin, and Y. Poovorawan. 2004. Single step multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for influenza A virus subtype H5N1 detection. **Viral Immunol.** 17:588-593.
- Poddar, S.K. 2002. Influenza virus types and subtypes detection by single step single tube multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and agarose gel electrophoresis. **J. Virol. Methods.** 99:63-70.
- Saberfar, E., M.F.F. Mohammad, and M. Mirlatif. 2006. Multiplex reverse transcriptase-PCR assay for typing and subtyping of influenza A (H5 & H9) virus in Iran. **Iranian Biomed. J.** 11(2):69-74.
- Yee, K.S., E.C. Tim, and J.C. Carol. 2008. Epidemiology of H5N1 avian influenza. **CIMID**. 662:156-163.