

**PENGEMBANGAN METODE AMPLIFIKASI ISOTERMAL NASBA  
(NUCLEIC ACID SEQUENCE BASED AMPLIFICATION) UNTUK DETEKSI  
GEN GAG-CA VIRUS PENYAKIT JEMBRANA (VPJ)**

**DEVELOPMENT OF NASBA (NUCLEIC ACID SEQUENCE BASED  
AMPLIFICATION), AN ISOTHERMAL AMPLIFICATION METHOD FOR  
DETECTION OF GAG-CA GENE JEMBRANA DISEASE VIRUS**

Ida Arlita Wulandari<sup>1,3</sup>, Atik Ratnawati<sup>2,3</sup>, Asmarani Kusumawati<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>Pusat Veteriner Farma (PUSVETMA), Surabaya

<sup>2</sup>Balai Besar Penelitian Veteriner (BBLITVET), Bogor

<sup>3</sup>Program Studi Bioteknologi, Sekolah Pascasarjana Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

<sup>4</sup>Bagian Reproduksi dan Kebidanan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

E-mail : idaarlitawulandari@gmail.com

**ABSTRAK**

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengembangkan metode amplifikasi isothermal NASBA (*nucleic Acid sequence-based amplification*) untuk mendeteksi Virus Penyakit Jembrana (VPJ) dan membandingkannya dengan metode yang umum digunakan yaitu RT-PCR. Sepasang oligonukleotida primer telah didesain untuk mengamplifikasi gen *gag-CA* yang mengkode protein kapsid pada VPJ. Produk amplifikasi NASBA berupa akumulasi untai tunggal *Ribonucleic Acid* (RNA) dalam bentuk *antisense* dan dideteksi dengan teknik elektroforesis gel agarose sederhana.

Kata Kunci : VPJ, NASBA, RT-PCR, *gag-CA*, pGEX-CA

**ABSTRACT**

The aims of this study were developed nucleic Acid sequence-based amplification (NASBA), an isothermal amplification method for the detection of Jembrana Disease Virus (JDV) and compared to the common RT-PCR. A set of oligonucleotide primers targeting the *gag-CA* gene encoding the JDV capsid protein were used for the amplification of viral RNA resulting in accumulation of antisense RNA amplicons. Amplicons were detected by a simple agarose gel electrophoresis.

Keywords : JDV, NASBA, RT-PCR, *gag-CA*, pGEX-CA

**PENDAHULUAN**

Penyakit Jembrana (PJ) dikelompokkan ke dalam salah satu penyakit hewan menular strategis berdasarkan Keputusan Dirjen Peternakan pada tahun 1997 dan

mengakibatkan kerugian ekonomi yang besar. Wabah PJ pertama kali menyerang sapi Bali (*Bos javanicus*) pada tahun 1964 di daerah Jembrana, Bali. Penyakit ini menyebar sangat cepat hingga Sumatera, Jawa, dan Kalimantan (Hartaningsih, *et.al*, 1993). PJ disebabkan oleh Virus Penyakit Jembrana (VPJ) yang merupakan genus Lentivirus dan Famili Retroviridae (Kertayadnya *et al.* 1993). VPJ mempunyai beberapa protein struktural yang sering digunakan sebagai antigen untuk mendeteksi VPJ. Protein kapsid (CA) yang dikode oleh *open reading frame* (ORF) *gag*. CA merupakan protein struktural terbanyak dan sangat imunodominan. Antibodi terhadap CA terdeteksi paling awal pada sebagian besar infeksi lentivirus (Hartaningsih *et al.*,1994). Antibodi terhadap CA sangat penting untuk mendeteksi VPJ secara serologis (Hartaningsih, *et.al*, 1993 dan Hartaningsih *et al.* 1994).

Saat ini, diagnosis laboratoris terhadap PJ adalah berdasarkan deteksi antibodi (ELISA) dan amplifikasi asam nukleat virus (PCR). ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) memiliki keterbatasan yaitu tidak dapat mendeteksi antibodi pada awal infeksi karena antibodi terdeteksi pada minggu ke-11 setelah infeksi (Hartaningsih *et al.* 1994). Metode deteksi untuk mengetahui keberadaan protein virus menggunakan antibodi hanya dapat dilakukan pada saat titer virus cukup dalam darah. PCR (*Polymerase Chain Reaction*) merupakan metode amplifikasi asam nukleat yang sering digunakan untuk deteksi VPJ secara molekuler karena mempunyai sensitifitas dan spesifitas tinggi. Keterbatasan PCR adalah memerlukan peralatan khusus, membutuhkan waktu lebih lama dan biaya yang tidak sedikit. Kekurangan metode PCR adalah adanya kemungkinan hasil yang positif atau negatif palsu. Keberadaan inhibitor akan mengganggu amplifikasi sehingga memberikan hasil negatif palsu. Faktor lain yang menyebabkan hasil negatif atau positif palsu adalah kontaminasi,

ketidaksesuaian antara gen target dan sekuen primer, variasi kondisi eksperimen, prosedur ekstraksi asam nukleat dan deteksi produk PCR (Yu et al. 2012).

Pada penelitian ini, dikembangkan metode alternatif pengganti PCR yaitu NASBA. NASBA merupakan metode amplifikasi isothermal yang melibatkan kerja dari tiga jenis enzim yaitu avian myeloblastosis-reverse transcriptase (AMV-RT), T7 RNA Polimerase, RNase-H dan sepasang oligonukleotida primer (salah satu primer terdapat sekuen promotor T7 pada ujung 5-nya). Tidak seperti PCR, NASBA tidak memerlukan peralatan *thermocycler*. Proses amplifikasi NASBA dapat berlangsung dalam *waterbath* sederhana. Kelebihan NASBA lainnya adalah kemampuan mengamplifikasi langsung sampel berupa RNA dan tidak memerlukan proses transkripsi balik sehingga mengurangi resiko kontaminasi (Loens *et al.*, 2005). Hasil akhir NASBA berupa RNA untai tunggal yang dapat dideteksi langsung menggunakan elektroforesis gel agarose sederhana, hibridisasi dengan probe ataupun sekuensing tanpa perlu denaturasi (Deiman *et al.*, 2002).

Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi VPJ melalui amplifikasi gen *gag-CA* VPJ dengan dari plasma sapi Bali terinfeksi VPJ strain Tabanan/95 menggunakan metode NASBA. Hasil pengembangan metode NASBA diharapkan dapat digunakan sebagai alternatif deteksi berbasis pendekatan genomik yang mudah, cepat, dan ekonomis.

## **MATERI DAN METODE**

### **Desain Primer**

Sekuen primer yang digunakan pada penelitian ini disajikan dalam Tabel 1. Setelah dilakukan penajaran dengan ke-13 strain yang ada di Indonesia, primer ini

didesain untuk mengamplifikasi gen *gag-CA* dan menghasilkan produk sebesar 230 bp. Primer yang digunakan pada NASBA dan RT-PCR mengamplifikasi sekuen target yang sama, tetapi pada salah satu primer NASBA, terdapat sekuen pengenalan promoter T7 RNA polymerase.

### **Isolasi Sampel RNA**

Penelitian ini menggunakan sampel RNA dari plasma 3 ekor sapi Bali terinfeksi VPJ strain Tabanan/95 (koleksi Dr. Asmarani Kusumawati). Kontrol negatif berupa plasma sapi Bali sehat sedangkan kontrol positif adalah plasmid rekombinan pGEX-CA (Kusumawati *et al.*, 2003).

RNA diisolasi menggunakan *High Pure Viral RNA Kit* (Roche®) sesuai petunjuk perusahaan. Pengukuran kemurnian dan konsentrasi RNA menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 260 dan 280 nm.

### **Amplifikasi gen *gag-CA* dengan NASBA**

Komposisi reaksi NASBA awal diadaptasi dari Jean *et al* (2001). Volume akhir reaksi adalah 25 µl terdiri dari 23 µl campuran pre-reaksi dan 2 µl campuran enzim. campuran pre-reaksi terdiri dari 18 µl campuran buffer NASBA-Primer dan 5 µl RNA cetakan. Dalam konsentrasi akhir, campuran buffer NASBA dan primer mengandung 40 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 10 mM DTT (Sigma), 12 mM MgCl<sub>2</sub>, dNTP (Roche) masing-masing 1 mM, NTP (Roche) masing-masing 2 mM, 15 % DMSO, dan 5 pmol Primer. Campuran ini kemudian diinkubasi pada suhu 65°C selama 5 menit untuk mencegah terbentuknya struktur sekunder RNA diikuti inkubasi 41°C selama 5 menit untuk ekuilibrisasi sebelum enzim dimasukkan. Proses inkubasi reaksi NASBA

berlangsung dalam *waterbath*. Setelah proses ekuilibrasi, dimasukkan 2 µl campuran enzim (2,6 µg BSA (Gibco); 40 U T7 RNA Polimerase (NEB); 8U AMV-RT (NEB); 0,2 U RNase H(NEB)) diikuti inkubasi pada suhu 41°C selama 90 menit.

### **Amplifikasi gen *gag*-CA dengan one step RT-PCR**

Uji *One-step* RT-PCR dilakukan menggunakan Transcriptor One Step RT-PCR Kit (Roche®). Volume akhir reaksi adalah 25 µl yang terdiri dari 0,5 µl DNA template (konsentrasi 10-20 pg/µl), masing-masing 1 µl primer (konsentrasi 10 pmol/µl) 12,5 µl PCR mix dan 10 µl *nuclease free water*. Kondisi reaksi RT-PCR dalam mesin *thermocycler* (Eppendorf) adalah transkripsi balik pada suhu 50°C selama 5 menit, denaturasi awal pada suhu 94°C selama 5 menit, 35 siklus reaksi yang terdiri dari : denaturasi (94°C, 10 detik), *annealing* (58°C, 30 detik), ekstensi (72°C, 45 detik), dan ekstensi tambahan pada suhu 72°C selama 10 menit.

### **Deteksi Produk Amplifikasi**

Produk amplifikasi NASBA dan RT-PCR dideteksi dengan elektroforesis gel agarose (Invitrogen) 2% dengan pewarna Goodview™ Nucleic Acid Stain dan *marker* DNA 100 bp (NEB). Proses elektroforesis berlangsung dalam perangkat elektroforesis Mupid-2plus menggunakan buffer 1x TAE. Pengamatan dilakukan dengan UV-Transluminator (Pacific Imaging).

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

Primer yang digunakan dalam reaksi NASBA (P1 dan P2) mengamplifikasi sekuen yang sama dengan primer dalam RT-PCR (JC2-F3 dan JC2B3) sehingga

mempunyai panjang amplikon yang sama yaitu 230 bp. Secara umum, persyaratan desain primer pada NASBA sama dengan PCR kecuali pada salah satu primer NASBA terdapat sekuen pengenalan promotor T7 RNA Polimerase di bagian hulu dari ujung 5 primer diikuti penambahan sekuen purin. Adanya 6-10 nukleotida purin akan meningkatkan efisiensi amplifikasi (Loens *et al.*, 2005), tetapi jika pada ujung 5 primer sudah terdapat sekuen purin, maka penambahan nukleotida purin tidak diperlukan (Deiman, *et al.*, 2002; Loens *et al.*, 2005).

Keunikan lain dari primer NASBA terkait dengan produk amplifikasi NASBA yang berupa ssRNA, maka primer NASBA didesain untuk mengamplifikasi target sepanjang 100-250 nukleotida. Hal ini bertujuan untuk mengurangi peluang terbentuknya struktur sekunder ssRNA (Deiman, *et al.*, 2002; Ong *et al.*, 2012). Sekuen yang lebih pendek atau lebih panjang akan mengurangi efisiensi amplifikasi (Loens *et al.* 2002).

RNA dari plasma 3 ekor sapi Bali terinfeksi VPJ strain Tabanan/95 digunakan sebagai cetakan dalam pengembangan metode NASBA. Pemilihan plasma sebagai sampel adalah karena plasma darah lebih mudah diperoleh dari pembuluh darah tepi vena jugularis, selain itu plasma juga sebagai salah satu media untuk penegakan diagnosa PJ berdasarkan penghitungan leukosit. Pertimbangan lain digunakannya plasma karena dalam plasma sapi yang terinfeksi diperkirakan terdapat titer VPJ sebesar  $10^8$  ID<sub>50</sub> ( Soeharsono *et al.*, 1990; Kertayadnya, *et al.*, 1993). Sehingga plasma merupakan sampel yang potensial dan aplikatif untuk deteksi dini PJ.

Metode amplifikasi NASBA berlangsung dalam dua tahap yaitu non siklik/inisiasi dan tahap siklik ( Loens, *et al.*, 2005; Deiman *et al.*, 2002) Pada tahap non siklik/inisiasi, sampel RNA didenaturasi pada suhu 65°C dan untuk mencegah terbentuknya struktur

sekunder sehingga primer P1 yang berisi sekuen promotor T7 RNA polimerase akan menempel dengan RNA target. Pada suhu 41°C, primer akan mengalami ekstensi/pemanjangan oleh Reverse Transcriptase menjadi cDNA sehingga terbentuk hibrid RNA-cDNA. Hibrid ini akan dihidrolisis oleh RNase H sehingga tersisa cDNA untai tunggal (ss cDNA). Primer kedua (P2) akan mengenali sekuen cDNA dan mengalami pemanjangan oleh reverse transcriptase. Proses pemanjangan ini akan menyempurnakan sekuen promotor RNA polimerase yang akan aktif secara transkripsional dan menghasilkan sekuen promotor T7 untai ganda. Sekuen promotor untai ganda ini akan dikenali oleh T7 DdRp (*DNA dependent RNA polymerase*) untuk menghasilkan RNA baru yang komplementer dengan RNA target.

Tahap siklik diawali dengan hibridisasi primer kedua (P2) dengan RNA baru kemudian mengalami pemanjangan oleh reverse transcriptase. RNase H akan menghidrolisis RNA pada hybrid RNA-cDNA sehingga primer P1 akan berikatan dengan cDNA. Hybrid P1-cDNA akan dikenali oleh AMV-RT dan menghasilkan cDNA menggunakan P1 sebagai cetakan. Sekuen promotor T7 untai ganda akan kembali terbentuk dan merupakan substrat T7 DdRp dan berlanjut ke tahap siklik selanjutnya (Deiman, *et al.*, 2002). Produk akhir NASBA berupa RNA antisense untai tunggal. Proses skematik reaksi amplifikasi NASBA dapat dilihat pada Gambar 1 berikut:

Gambar 2 [A] merupakan visualisasi produk amplifikasi NASBA dan Gambar 2 [B] merupakan visualisasi produk amplifikasi RT-PCR. Pada elektroforesis gel agarose sederhana, pita produk amplifikasi pada NASBA terlihat lebih samar/*blur* dibanding pita produk amplifikasi pada PCR/RT-PCR. Hal ini karena ampikon NASBA berupa kumpulan untai negatif RNA, yang dapat membentuk struktur sekunder ditambah

sedikit dsDNA (<10%) (Compton, 1991; Kievits *et al.*, 1991; Heim & Schumann, 2002).

## KESIMPULAN

NASBA dapat digunakan untuk mendeteksi VPJ dalam sampel terinfeksi VPJ strain Tabanan/95 melalui amplifikasi gen *gag-CA*.

## DAFTAR PUSTAKA

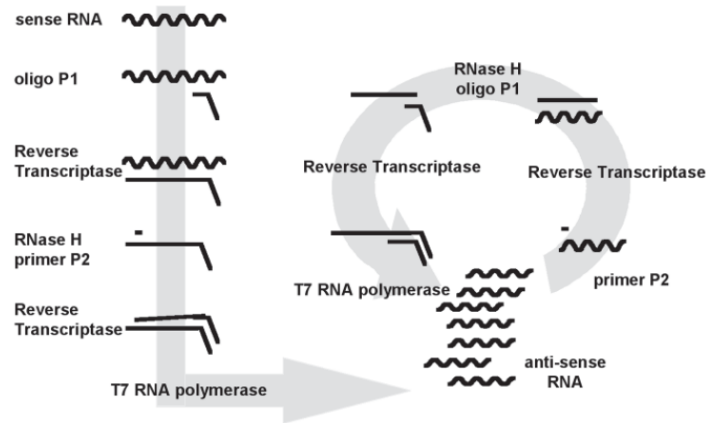
- Compton, J. 1991. Nucleic Acid Sequence-Based Amplification. **Nature**. 350: 91–92.
- Deiman, B., van Aarle, P. and Sillekens, P. 2002. Characteristics and applications of nucleic acid sequence-based amplification (NASBA). **Molecular Biotechnology**. 20(2):163–79.
- Hartaningsih, N., Wilcox, G.E., Kertayadnya, G., and Astawa, M. 1994. Antibody Response to Jembrana Disease Virus in Bali cattle. **Vet. Microbiol**. 39:15–23.
- Hartaningsih, N., Wilcox, G.E. & Soetrisno, M. 1993. Distribution of Jembrana Disease in Cattle in Indonesia. **Vet. Microbiol**. 38:23–29.
- Heim, A. & Schumann, J. 2002. Development and evaluation of a nucleic acid sequence based amplification ( NASBA ) protocol for the detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid samples. **J. Virol. Methods**.103:101–107.
- Jean, J., Blais, B., Darveau, A, and Fliss, I., 2001. Detection of Hepatitis A Virus by the Nucleic Acid Sequence-Based Amplification Technique and Comparison with Reverse Transcription-PCR. **Appl. Environ. Microbiol**. 67(12): 5593-5600.
- Kertayadnya, G., G. E. Wilcox, S. Soeharsono, N. Hartaningsih, R.J. Coelen, R.D. Cook, M.E.C. and J.B., 1993. Characteristic of a retrovirus associated with Jembrana Disease in Bali Cattle. **J. General Virol**. 74: 1765–1773.
- Kievits, T. et al. 1991. NASBA™ isothermal enzymatic in vitro nucleic acid amplification optimized for the diagnosis of HIV- 1 infection. **J. Virol Methods** 35: 273–286.
- Kusumawati, A., Martien, R., Mangkoewidjojo, S., Widada, J.S., 2003. Isolation and Cloning of *gag-CA* Gene of The Jembrana Disease Virus on pGEX-2T Prokaryotic Expression Vector. **Berkala Biologi**. 1: 25–33.



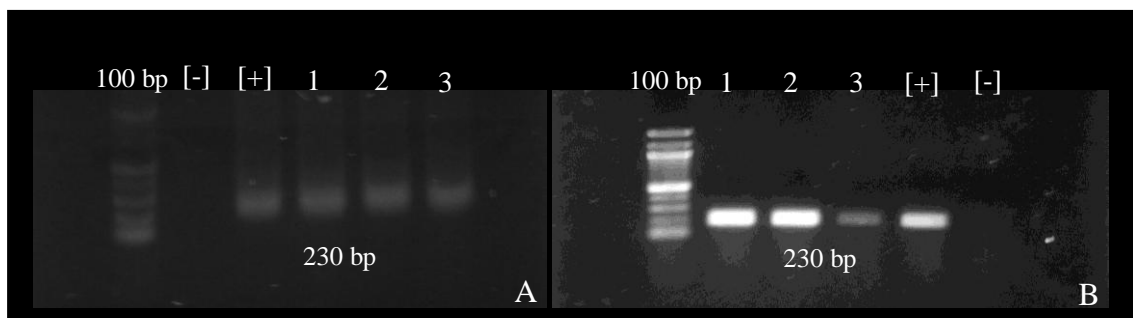
- Loens, K., Ursi, D., Ieven, M., van Aarle, P., Sileken, P., Oudshoorn, P., and Goossens, H. 2002. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in Spiked Clinical Samples by Nucleic Acid Sequence-Based Amplification. **J. Clin. Microbiol.** 40(4):1339–1345.
- Loens, K., Ursi, D., Goossens, H., and Ieven, M. 2005. Nucleic Acid Sequence-Based Amplification. in **Medical Biomethods Handbook**. Walker, J.M and Rapley, R. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc. Totowa, NJ, 273-292.
- Ong, C., Tai, W., sarma, A., Opal, S.M., Artensetein, A.W., and Tripathi, A., 2012. Ligation with Nucleic Acid Sequence-Based Amplification. **J. Molecular Diagn.** 14(3):206–213.
- Yu, A.C., Vatcher, G., Yue, X., Dong, Y., Li, M.H., Tam, P.H.K., Tsang, P.Y.L., Wong, A.K.Y., Hui, M.H.K., Yang, B., Tang, H., Lau, L.T. 2012. Nucleic Acid-Based Diagnostics for Infectious Diseases in Public Health Affairs. **Frontiers of Medicine.** 6(2): 173–186.

Tabel 1. Urutan basa nukleotida primer untuk mengamplifikasi gen *gag*-CA VPJ

Primer	Sekuen	Keterangan
P1	CCA AGA ATG CAG AGA CAC T	NASBA Sekuen dengan garis bawah adalah sekuen promotor T7 RNA Polimerase. Sekuen dengan cetak miring adalah sekuen <i>purin rich</i>
P2	<u>AAT TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG</u> AGA AGG GGC AGT CCT CAT TTG CAT G	
JC2-F3	CCA AGA ATG CAG AGA CAC T	RT-PCR
JC2-B3	GGC AGT CCT CAT TTG CAT G	



Gambar 1. Skema reaksi amplifikasi NASBA. Panah lurus menunjukkan tahap non siklik/inisiasi dan panah melingkar menunjukkan tahap siklik (Loens, *et al*, 2005).



Gambar 2. Visualisasi hasil amplifikasi pada elektroforesis gel agarose 2%. A. NASBA. B. RT-PCR. [-]: plasma sapi Bali sehat; [+]: plasmid rekombinan pGEX-CA; 1-3: plasma sapi Bali terinfeksi VPJ strain Tabanan/95.