

Multiplex Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction untuk Deteksi Cepat Virus Flu Burung H5N1

(*MULTIPLEX REVERSE TRANSCRIPTION-POLYMERASE CHAIN REACTION
FOR RAPID DETECTION OF H5N1 AVIAN INFLUENZA VIRUS*)

¹Raden Wasito, ²Hastari Wuryastuty, ³Gesit Tjahyowati,
⁴Sri Handayani Irianingsih, ⁵Tisna Tyasasmaya

¹Bagian Patologi, ²Bagian Ilmu Penyakit Dalam,
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada,
Jln Fauna No 2, Kampus UGM, Yogyakarta,
Telp/Fax: 0274 9061104; Email: wst_ugm@yahoo.com

³Laboratorium Patologi, ⁴Laboratorium Virologi,
Balai Besar Veteriner Wates, Yogyakarta,

⁵Mahasiswa S3 Program Pascasarjana Sain Veteriner, FKH UGM

ABSTRAK

Virus flu burung subtipe H5N1 sangat ganas dan mematikan pada unggas. Virus tersebut di Indonesia masih mewabah dengan tingkat virulensi yang rendah, meskipun tetap mengakibatkan tingkat morbiditas dan mortalitas tinggi. Pada umumnya, untuk mendiagnosis flu burung pada unggas, ditentukan berdasarkan pada uji serologi konvensional dan isolasi virus yang membutuhkan waktu relatif lama dan biaya relatif mahal. Tujuan penelitian ini adalah untuk melakukan pendekatan molekuler *multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (mRT-PCR)* yang mampu mengamplifikasi lebih dari satu molekul dalam satu reaksi, dikembangkan dan diaplikasikan untuk mendeteksi gen matriks (M), subtipe H5, dan N1 virus flu burung pada ayam komersial. Sebanyak 30 sampel sera unggas komersial yang pada pemeriksaan awal dengan *reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)* adalah positif gen matriks (M) virus flu burung dengan subtipe H5 dan N1 digunakan untuk deteksi flu burung subtipe H5N1 dengan teknik *mRT-PCR*. Produk *mRT-PCR* diamati dengan elektroforesis gel agarosa dan terdiri dari fragmen-fragmen pita DNA virus flu burung 245 bp untuk gen matriks (M), 545 bp untuk gen H5 dan 343 bp untuk gen N1. Dengan demikian, berdasarkan hasil penelitian ini, *mRT-PCR*, dapat membedakan antara gen-gen virus flu burung, sekaligus sangat penting untuk diaplikasikan dalam kontrol dan bahkan eradikasi penyebaran wabah flu burung di Indonesia.

Kata-kata kunci: *mRT-PCR*, subtipe H5N1, ayam komersial, 545 bp gen H5, 343 bp gen N1.

ABSTRACT

Avian influenza virus subtype H5N1 (AIV H5N1) is highly pathogenic and fatal in poultry. The virus is still endemic with low virulence rate, although it may play a critical role in causing high morbidity and mortality rates in poultry in Indonesia. In general, diagnostic approach for AIV H5N1 is based on conventional serological and viral isolation methods that have the potential to produce consumings of time and relatively expensive cost within the laboratory without compromising test utility. Thus, a molecular approach of *multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (mRT-PCR)* was developed and applied for the detection of matrix gene type A influenza viruses, AIV subtype subtype H5 hemagglutinin gene with simultaneous detection of N1 nucleoprotein gene. Thirty sera specimens from the diseased commercial chickens that were specifically amplified positive-RT-PCR for AIV H5N1 were selected for *mRT-PCR*. The *mRT-PCR* products were visualized by agarose gel electrophoresis and consisted of DNA fragments of AIV of 245 bp, 545 bp and 343 bp for M, H5 and N1 genes, respectively. Thus, the *mRT-PCR* that can rapidly differentiate simultaneously between these genes is very important for the control and even eradication of AIV transmission in poultry in Indonesia.

Key words: *mRT-PCR*, subtype H5N1, commercial chickens, 545 bp gen H5, 343 bp gen N1

PENDAHULUAN

Virus flu burung H5N1 mewabah pada unggas di Indonesia sejak tahun 2003 (Wuryastuti dan Wasito, 2003), dan juga negara-negara Asia sejak tahun 2004 (Webster *et al.*, 2006) yang mengakibatkan kerugian ekonomi yang tinggi di dunia perunggasan. Virus flu burung H5N1 mempunyai sifat biologi yang memungkinkan wabah flu burung tersebut dapat meluas mengenai berbagai macam unggas, sangat merugikan industri peternakan unggas karena angka mortalitas yang tinggi (30-70%), terus menerus mengalami mutasi yang mengakibatkan keganasannya semakin meningkat, dan resisten terhadap senyawa terapeutik. Flu burung H5N1 merupakan ancaman yang serius bagi dunia peternakan unggas di Indonesia jika tidak segera ditanggulangi secara profesional, tepat dan terarah. Kejadian flu burung pada unggas di Indonesia tahun 2013 bersifat patogenik rendah dengan gejala klinis kekurusan, bulu kotor, terjadi *torticollis*, dan *curled toe paralysis*. Pada pemeriksaan patologi anatomi, paru-paru mengalami pembengkakan berwarna merah muda keputihan disertai dengan bintik-bintik darah. Pada pemeriksaan serologi dan molekuler *reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR) sera dan paru-paru unggas tersebut ternyata positif flu burung H5N1 (Wuryastuti dan Wasito, 2011; 2013). Virus flu burung subtype H5N1 termasuk dalam famili *Orthomyxoviridae*, dan berdasarkan glikoprotein transmembran terdiri dari hemagglutinin (HA, H) yang mempunyai 16 subtype serologi (H1-H16), dan neuraminidase (NA, N) yang mempunyai sembilan subtype serologi (N1-N9) (Veselinovic, 2007; WHO, 2007; Paek *et al.*, 2010).

Multiplex reverse transcriptase-polymerase chain reaction (mRT-PCR) merupakan modifikasi RT-PCR sehingga mampu mendeteksi delesi atau duplikasi gen yang besar secara cepat. Dalam proses uji molekuler tersebut, mRT-PCR mengamplifikasi sampel DNA genom menggunakan lebih dari satu pasang primer dan polimerase DNA yang dimediasi oleh suhu pada mesin PCR. Dengan demikian, mRT-PCR mampu memvisualisasi lebih dari satu macam mikroorganisme patogenik sasaran dalam satu reaksi. Adanya kemampuan mRT-PCR mengamplifikasi beberapa gen pada saat bersamaan, membuat waktu dan bahan kimia yang digunakan dapat dihemat, tanpa

mengurangi akurasi hasil uji (Edwards dan Gibbs, 1994; Elnifro *et al.*, 2000). Tujuan penelitian ini adalah melakukan pendekatan molekuler mRT-PCR yang mampu mengamplifikasi lebih dari satu molekul dalam satu reaksi dikembangkan dan diaplikasikan untuk mendeteksi gen matriks (M), subtype H5, dan N1 virus flu burung pada ayam komersial. Pada penelitian ini, telah berhasil dikembangkan dan diaplikasikan uji mRT-PCR untuk deteksi H5N1 yang berasal dari ayam komersial.

METODE PENELITIAN

Pada penelitian ini digunakan 30 sampel sera yang berasal dari ayam komersial yang sakit dengan gejala klinis berkurangnya nafsu makan, kekurusan, dan bulu kusam. Sera tersebut, pada pemeriksaan awal dengan RT-PCR menunjukkan hasil positif menderita flu burung subtype H5N1. Selanjutnya, sampel sera dengan RT-PCR positif flu burung subtype H5N1 tersebut digunakan untuk pengembangan dan pengaplikasian uji molekuler mRT-PCR.

Prosedur Ekstraksi RNA

RNA genom virus pada sampel sera diekstraksi dengan menggunakan *high pure viral nucleic acid kit* (Roche). Sebanyak 200 µL serum dipipet ke dalam tabung Eppendorf berukuran 1,5 mL. Ke dalam tabung tersebut ditambahkan *binding buffer* 200 µL yang dicampur dengan *poly A* dan larutan proteinase K 50 µL dan larutan tersebut divorteks sampai tercampur. Sesudah divorteks, campuran larutan diinkubasikan di dalam penangas air suhu 72°C selama 10 menit. Sesudah inkubasi, campuran larutan ditambah *binding buffer* 100 µL dan kemudian dimasukkan ke dalam tabung filter yang dipasang di atas tabung penadah, disentrifugasi 8.000 rpm selama satu menit. Sesudah sentrifugasi, *flowthrough* (filtrat) dan tabung penadah dibuang dan diganti dengan tabung penadah baru. Selanjutnya, 500 µL larutan *inhibitor removal buffer* ditambahkan ke dalam tabung filter dan disentrifugasi 8.000 rpm selama satu menit. Setelah sentrifugasi, filtrat dan tabung penadah dibuang, diganti tabung penadah baru. Sebanyak 450 µL larutan pencuci yang mengandung etanol 70% ditambahkan ke dalam tabung filter dan kemudian disentrifugasi 8.000 rpm satu menit. Filtrat dan tabung penadah dibuang lagi. Tabung filter digabungkan dengan tabung

penadah baru dan larutan pencuci 450 µL ditambahkan lagi ke tabung filter dan disentrifugasi 8.000 rpm satu menit. Filtrat dibuang, tabung filter-tabung penadah dibiarkan tetap ada pada sentrifus dan disentrifugasi ulang 1200 rpm selama 30 detik untuk menghilangkan larutan pencuci yang tersisa. Tabung filter ditempatkan pada tabung Eppendorf steril dan kemudian bufer pengencer 50-75 µL ditambahkan ke dalam tabung filter. Tabung tersebut disentrifugasi 8.000 rpm satu menit. Sentrifugasi 8.000 rpm satu menit diulang sekali lagi untuk mendapatkan koleksi RNA maksimal. Tabung filter dibuang dan tabung Eppendorf yang mengandung RNA disimpan di dalam freezer (-20°C) sampai digunakan untuk uji mRT-PCR.

Prosedur Multiplex RT-PCR

Ekstrak RNA dari sampel sera yang telah diuji dengan teknik RT-PCR terbukti positif gen matriks (M), H5 dan N1, digunakan sebagai sampel untuk pengembangan dan aplikasi teknik mRT-PCR dalam deteksi virus flu burung subtype H5N1. Pada penelitian ini, digunakan tiga pasang primer mRT-PCR yang dikenal dengan nama mRT-PCR trivalen. Primer-primer tersebut merupakan primer-primer yang digunakan untuk mengamplifikasi virus influenza tipe A, H5, dan H7 dengan cetakan RNA yang spesifik untuk subtype hemaglutinin dan dianalisis dengan perangkat lunak analisis OLIGO 5 primer. Hasil mRT-PCR dari pasangan primer yang pertama dicocokkan lagi dengan pasangan primer ke-dua yang mengamplifikasi gen matriks (M), dan gen H5 dan N1. Untaian-untai basa pasangan primer untuk virus influenza tipe A, H5, dan N1 yang digunakan untuk uji mRT-PCR diperoleh dari data publikasi untai basa pasangan primer yang digunakan untuk uji mRT-PCR (Webster dan

Kawaoka, 1987; Ng *et al.*, 2006). Primer oligonukleotida disintesis secara komersial oleh Integrated DNA Technologies, Inc. (Tabel 1). Primer yang telah dilarutkan dengan bufer TE dibagi dalam beberapa tabung dengan konsentrasi akhir 20 pMol/µL dan disimpan pada suhu -20°C sampai digunakan untuk analisis mRT-PCR.

Kondisi Amplifikasi

Multiplex RT-PCR yang digunakan dalam penelitian ini merupakan prosedur satu langkah yang terdiri dari transkripsi balik dan amplifikasi PCR dalam satu tabung. Untuk tujuan tersebut digunakan *Superscript III One-Step RT-PCR kit* dengan *Platinum Taq DNA Polymerase* yang tersedia secara komersial (Invitrogen). Pada setiap tabung PCR dimasukkan 25 µL 2x *Reaction Mix* yang mengandung bufer untuk transkripsi balik dan PCR, deoksiribonukleotida trifosfat dan larutan penstabil, 2,5 µL Mg⁺⁺, 1 µL setiap primer [20 pMol], 2 µL *RT/Platinum Taq mix*, 5 µL RNA AIV dan air bebas nuklease sampai total volume akhir dalam satu tabung berjumlah 50 µL. Amplifikasi mRT-PCR dikerjakan di dalam mesin *thermocycler* dengan kondisi putaran sebagai berikut: sintesis cDNA pada temperatur 50°C selama 30 menit, denaturasi awal pada temperatur 98°C selama 30 detik kemudian 35 putaran yang setiap putaran terdiri dari denaturasi pada temperatur 98°C selama 10 detik, *annealing* pada temperatur 52°C selama 30 detik dan ekstensi pada temperatur 72°C selama 30 detik, diikuti dengan ekstensi akhir pada temperatur 72°C selama 10 menit.

Produk amplifikasi cDNA divisualisasi menggunakan 1,5% *agarose gel* dengan *ethidium bromide* dan menggunakan DNA *marker* 100 bp (Vivantis) pada 100 v selama 25 menit. Hasil amplifikasi yang telah diwarnai

Tabel 1. Untaian basa primer untuk *multiplex reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (mRT-PCR).

No.	Target Gen	Untaian Primer	Produk PCR (bp)
1.	Gen Matrix	MF: 5'-CTT CTA ACC GAG GTC GAA ACG -3' MR: 5'-AGG GCA TTT TGG ACA AAK CGT CTA-3'	245
2.	Gen H5	H5F: 5'-ACA CAT GCY CAR GAC ATA CT -3' H5R: 5'-CTY TGR TTY AGT GTT GAT GT-3'	545
3.	Gen N1	N1F: 5'-TGA AGT ACA ATG GCA TAA TAA CWG ACA C-3' N1R: 5'-CAC TGC ATA TAT ATC CTA TTT GAT ACT CC-3'	343

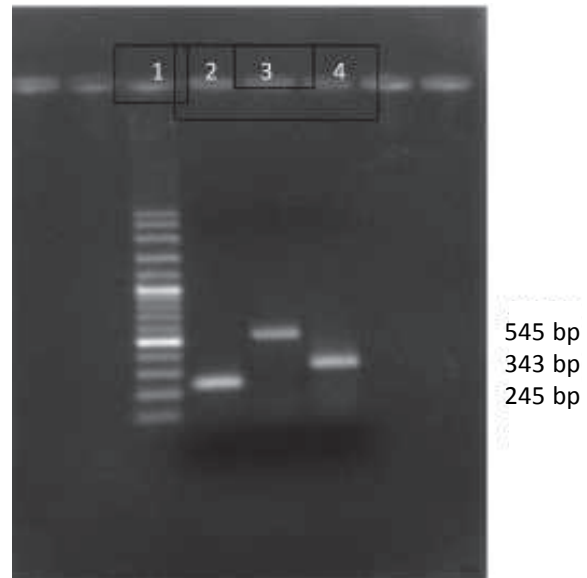
dengan *ethidium bromide* difoto dengan menggunakan *Gel Logic 100 Imaging System*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

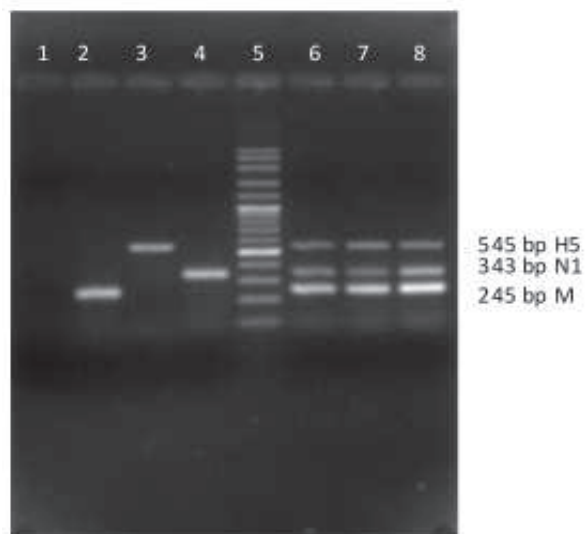
Virus influenza diklasifikasikan menjadi tipe A, B, dan C. Berdasarkan sifat antigenik dua glikoprotein permukaan hemaglutin (HA atau H) dan neuraminidase (NA atau N), virus influenza A (flu burung) diklasifikasikan menjadi beberapa subtipe yang berbeda. Sampai saat ini, telah berhasil diidentifikasi subtipe 16 H dan 9 N (Berinstein *et al.*, 2002; Fouchier *et al.*, 2005). Semua subtipe virus influenza A ditemukan pada unggas (Alexander, 2000). Meskipun demikian, dari 16 subtipe H, hanya subtipe H5 dan H7 yang bersifat sangat virulen pada unggas.

Diagnosis infeksi virus influenza A dilakukan secara rutin dengan cara identifikasi dan isolasi virus, sedangkan untuk diferensiasi subtipe virus influenza dengan serotyping dibutuhkan banyak tenaga dan waktu yang relatif lama. Meskipun teknik RT-PCR satu reaksi (*one step* RT-PCR) telah digunakan untuk deteksi dan diferensiasi subtipe virus flu burung pada unggas, *one step* RT-PCR hanya mengenal satu subtipe spesifik dalam satu waktu pengerjaan (Stockton *et al.*, 1999; Saberfar *et al.*, 2000), seperti yang terlihat pada hasil penelitian ini (Gambar 1). Teknik *mRT*-PCR telah dilaporkan untuk deteksi virus flu burung H5 dan H9 (Saberfar *et al.*, 2007).

Pada penelitian ini, telah berhasil dikembangkan dan diaplikasikan metode *mRT*-PCR yang mampu mendeteksi gen matriks (M) virus flu burung tipe A dan pada saat yang sama (secara simultan) mendeteksi subtipe hemaglutin H5 dan N1. Pita DNA gen matriks (M), H5, dan N1 teramplifikasi positif secara jelas, masing-masing pada posisi 245 bp untuk gen M, 545 bp untuk gen H5, dan 343 bp untuk gen N1 (Gambar 2). Virus flu burung H5N1 adalah sangat penting karena keganasannya mampu menimbulkan kerugian ekonomi yang sangat besar di dunia peternakan unggas (Guo *et al.*, 1999; Alexander, 2000; Tran *et al.*, 2004) sehingga metode pemeriksaan secara cepat dan sekaligus mampu mengidentifikasi gen M, H5, dan N1, seperti halnya *mRT*-PCR perlu diaplikasikan dalam rangka program rutin kontrol, pengendalian dan bahkan eradikasi wabah flu burung (Ellis dan Zambon, 2001; Spackman *et al.*, 2002), terutama di Indonesia.



Gambar 1. Hasil amplifikasi RNA virus flu burung yang diekstraksi dari sera ayam komersial dengan metode *one step* RT-PCR. Lane 1: DNA marker 100 bp; Lane 2: Gen M (245 bp); Lane 3: Gen H5 (545 bp); Lane 4: Gen N1 (343 bp).



Gambar 2. Hasil amplifikasi RNA virus flu burung yang diekstraksi dari sera ayam komersial dengan metode *one step* RT-PCR dan *multiplex* RT-PCR. Hasil *one step* RT-PCR: Lane 1. Kontrol negatif dan Lane 2-4. Kontrol positif, masing-masing untuk gen M (245 bp), gen H5 (545 bp) dan gen N1 (343 bp). Lane 5. DNA marker 100 bp. Hasil *multiplex* RT-PCR positif virus flu burung: Lane 6-8, masing-masing untuk gen M (245 bp), gen H5 (545 bp) dan gen N1 (343 bp).

Beberapa laporan membuktikan, bahwa *mRT-PCR* mampu diaplikasikan untuk mendeteksi virus influenza A pada spesimen jaringan unggas pada kasus-kasus di lapangan (Liolios *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2008; Rashid *et al.*, 2009; Saberfar *et al.*, 2007).

Tetapi, hasil penelitian ini merupakan pertama kali laporan yang menggunakan spesimen sera untuk optimasi *mRT-PCR* yang secara simultan mampu mendeteksi gen M virus flu burung tipe A bersama-sama dengan subtype H5 dan N1. Teknik *mRT-PCR* mampu mendeteksi gen M, H5, dan N1 pada semua sampel sera (100%). Hal ini membuktikan, virus influenza A subtype H5N1 pada ayam komersial yang berumur 5-32 hari mengalami viremia pada saat diambil darah dari jantung.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini, disimpulkan bahwa kebaruan (*novelty*) teknik *mRT-PCR* yang telah dikembangkan untuk mendeteksi virus flu burung menghemat waktu karena mampu mendeteksi flu burung subtype H5N1 dalam satu reaksi sekaligus, dan biayanya lebih murah.

SARAN

Teknik *mRT-PCR* yang merupakan hasil penelitian ini, perlu diaplikasikan dalam rangka program rutin kontrol, pengendalian dan bahkan eradikasi wabah flu burung di Indonesia.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada pihak Dikti Kemendiknas RI dan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta yang telah mendanai Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi, Universitas Gadjah Mada (LPPM-UGM/1348/LIT/2013) ini. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Prof Roger K Maes DVM, PhD, Section Head Virology Diagnostic Center for Population and Animal Health, Michigan State University, 4125 Beaumont Rd, Lansing, M. 48910, USA atas saran-saran yang telah diberikan selama persiapan penelitian dan penulisan naskah.

DAFTAR PUSTAKA

- Alexander DJ. 2000. A review of avian influenza in different bird species. *Vet Microbiol* 74: 3-13.
- Berinstein A, Bruce S, Suarez DI. 2002. Hetroduplex mobility assay for detection of new avian influenza virus variants. *Avian Dis* 46: 393-400.
- Chen HT, Zhang J, Sun DH, Zhang JL, Cai XP, Lu XT, Ding YZ, Ma LN, Yang SH, Jin L, Liu Y. 2008. Rapid discrimination of H5 and H9 subtypes of avian influenza viruses and Newcastle disease virus by multiplex RT-PCR. *Vet Res Commun* 32: 491-498.
- Edwards MC, Gibbs RA. 1994. Multiplex PCR: Advantages, development, and applications. *Genome Res* 3: S65-S75.
- Ellis JS, Zambon MC. 2001. Combined PCR-heteroduplex mobility assay for detection and differentiation of influenza A viruses from different animal species. *J Clin Microbiol* 39: 4097-4102.
- Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper, RJ, Klapper PE. 2000. Multiplex PCR: Optimization and application in diagnostic virology. *Clin Microbiol Rev* 13: 559-570.
- Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, Rimmelzwaan GF, Olsen B, Osterhaus AD. 2005. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from Black-Headed Gulls. *J Virol* 79: 2814-2822.
- Guo Y, Li J, Chen X. 1999. Discovery of men infected by avian influenza A (H9N2) virus. *Chin J Exp Clin Virol* 13: 105-108.
- Liolios L, Jenney A, Spelman D, Kotsimbos T, Catton M, Wessellingh S. 2001. Comparison of a multiplex reverse transcription-PCR enzyme hybridization assay with conventional viral culture and immunofluorescence techniques for the detection of seven viral respiratory pathogens. *J Clin Microbiol* 39: 2779-2783.
- Ng L, Barr I, Nguye T, Noor SM, Tan R, Agathe LV, Gupta S, Khalil H, To TL, Hassan SS, Ren E. 2006. Specific detection of H5N1 avian influenza A virus in field specimens by a one-step RT PCR assay. *BMC Infect Dis* 10: 6-40.

- Paek MR, Lee YJ, Yoon H, Kang HM, Kim MC, Choi JG, Jeong OM, Kwon JS, Moon OK, Lee SJ, Kwon JH. (2010) Survival rate of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses at different temperature. *Poult Sci* 89: 1647-1650.
- Rashid S, Naeem K, Ahmed Z, Saddique N, Abbas MA, Malik SA. 2009. Multiplex polymerase chain reaction for the detection and differentiation of avian influenza viruses and other poultry respiratory pathogens. *Poult Sci* 88: 2526-2531.
- Saberfar E, Forghani-fard M, Mosavi M. 2007. Multiplex RT-PCR assay for typing and subtyping of influenza A (H5 & H9) virus in Iran. *Iranian Biomed J* 11: 69-74.
- Saberfar E, Marschall M, Muhammadi H, Fayas A, Meier-Fwert H. 2000. A sensitive neutralization assay for influenza C viruses based on the acethyl esterase activity HEF glycoprotein. *Iranian Biomed J* 1: 27-32.
- Spackman E, Seunne DA, Myers TJ, Bulaga LL, Garber LP, Perdue ML, Lohman K, Daum LT, Suarez DL. 2002. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J Clin Microbiol* 40: 3256-3260.
- Stockton J, Ellis S, Saulle J, Clewley P, Zambon M (1999) Multiplex PCR for typing and subtyping influenza and respiratory syncytial viruses. *J Clin Microbiol* 36: 2990-2995.
- Tran TH, Nguyen TI, Nguyen TD, Luong TS, Pham PM, Nguyen VC. 2004. Avian influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam. *N Engl J Med* 350: 1171-1172.
- Veselinovic M. 2007. Avian influenza A/H5N1. *Acta Medica Medianae* 46: 44-51.
- Webster RG, Kawaoka Y. 1987. Avian influenza. *Crit Rev Poult Biol* 1: 212-246.
- Webster RG, Peiris M, Chen H, Guan Y. 2006. H5N1 outbreaks and enzootic influenza. *Emerg Infect Dis* 12: 2-8.
- Wuryastuti H, Wasito R. 2003. Unpublished data.
- Wuryastuti H, Wasito R. 2011. Unpublished data.
- WHO. 2007. Recommendations and laboratory procedures for detection of avian influenza A (H5N1) virus in specimens from suspected human cases. WHO Geneva. Pp 1-28.