

PEMETAAN GENETIK VIRUS RABIES PADA ANJING SEBAGAI DASAR PENETAPAN PENGENDALIAN PENYAKIT

Genetic Mapping of Rabies Virus in Dogs as a Basis for Disease Control

Muharam Saepulloh¹ dan R.M. Abdul Adjid¹

¹Laboratorium Virologi Balai Besar Penelitian Veteriner, Bogor
E-mail: muharam@bbalivet.org

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui karakter genetik virus rabies berdasarkan hubungan kekerabatan antar virus rabies di berbagai daerah di Indonesia. Telah diteliti urutan asam amino gen penyandi nukleoprotein (N) dari virus rabies isolat Indonesia asal Banten (RV/Banten-01/dog/2007), Makasar (RV/MKS-26/dog/2010), Bukit Tinggi (RV/BKT-52/dog/2009) dan RV/BKT-58/dog/2009), Medan (RV/Medan-27/dog/2007), dan Bali (RV/Bali-1/dog/2009; RV/Bali-2/dog/2009; RV/Bali-3/dog/2009). Isolat-isolat ini menunjukkan tingkat homologi yang tinggi di antara sesama isolat Indonesia yaitu mencapai 100%. Tingkat homologi antara isolat virus rabies dari kucing dengan isolat virus rabies dari anjing asal Indonesia mencapai 97%. Hasil analisis kekerabatan berdasarkan urutan asam amino gen N menunjukkan bahwa semua isolat virus rabies asal Indonesia memiliki hubungan kekerabatan yang lebih dekat dengan virus rabies asal Cina dibandingkan dengan virus rabies asal Thailand, Laos, Birma, dan Vietnam yang secara geografis lebih dekat dengan Indonesia. Data yang diperoleh dari hasil analisis hubungan kekerabatan tersebut diharapkan dapat melacak sumber penyebaran rabies serta kemungkinannya untuk membuat vaksin yang lebih sesuai dengan virus rabies yang menyebar di suatu lokasi di Indonesia. Berdasarkan hasil analisis hubungan kekerabatan menggunakan urutan asam amino protein gen N virus rabies menunjukkan bahwa semua isolat virus rabies asal anjing dari sejumlah daerah di Indonesia memiliki hubungan kekerabatan yang sangat dekat yaitu mencapai 97-100%.

Kata kunci: pengurutan, rabies, gen penyandi nukleoprotein (N), homologi

ABSTRACT

The purpose of this study was to determine the genetic characteristics of rabies virus based on phylogenetic relationship among rabies virus in various regions in Indonesia. The amino acid sequence of the nucleoprotein gene of rabies virus isolate from Banten (RV/Banten-01/dog/2007), Makasar (RV/MKS-26/dog/2010), Bukit Tinggi (RV/BKT-52/dog/2009 and RV/BKT-58/dog/2009), Medan (RV/Medan-27/dog/2007) and Bali (RV/Bali-1/dog/2009; RV/Bali-2/dog/2009; RV/Bali-3/dog/2009), Indonesia was determined. These isolates showed a high degree of homology among Indonesian isolates which reached 100%. Meanwhile, the level of homology between rabies virus isolates from cats rabies virus isolates from dogs reached 97%. Results of phylogenetic analysis using the amino acid sequences of the N genes showed that all of Indonesian rabies virus isolates were closely related to rabies viruses from China than those from Thailand, Laos, Burma, and Vietnam which geographically closer to Indonesia. Data obtained from the phylogenetic analysis is expected to trace the source of rabies spread and the possibility to create a vaccines which more suitable with rabies virus that spreads in Indonesia. Based on the phylogenetic relationship analysis using the amino acid sequence of the rabies virus N protein gene showed that all of rabies virus isolated from Indonesian regions share a high homology with others ranging from 97-100%.

Key words: sequencing, rabies, nucleoprotein gene (N), homology

PENDAHULUAN

Rabies merupakan penyakit virus yang fatal dan zoonosis bagi spesies mamalia termasuk manusia. Infeksi penyakit ini terjadi pada sistem saraf pusat yang menyebabkan *encephalomyelitis* akut. *Rabies virus* (RV) dan *rabies-related virus* (RRVs) termasuk famili *Rhabdoviridae* dari genus *Lyssavirus*. Genus tersebut dibagi menjadi empat serotipe berdasarkan hubungan secara serologis menggunakan antibodi monoklonal. Berdasarkan urutan *ribonucleic acid* (RNA) dikenal tujuh genotipe *Lyssavirus* (Nidia *et al.*, 2013).

Genotipe 1 termasuk galur virus rabies yang klasik ditemukan hampir di seluruh dunia, termasuk yang pada umumnya galur lapang. Genotipe 2-6 termasuk RRVs, virus ini lebih spesifik lagi yaitu *Lagos bat virus* (genotipe 2), *Mokola virus* (genotipe 3), *Duvenhage virus* (genotipe 4), dan *European Bat Lyssavirus* (EBLV) 1 dan 2 (Genotipe 5 dan 6), dan *Australian Bat Lyssavirus* 1 dan 2 (ABLV-1 dan ABLV-2) (Genotipe 7). Virus *Lagos bat*, *Duvenhage*, dan *Mokola* secara geografis telah tersebar di Afrika dan Eropa (Sunday *et al.*, 2014). Dari semua genotipe virus yang ada, *Lagos*

bat virus merupakan penyebab penyakit rabies asal kalong pada manusia yang disebabkan oleh RRVs (Nottidge *et al.*, 2007).

Di Indonesia, program pemberantasan penyakit rabies telah dilaksanakan baik melalui vaksinasi maupun eliminasi secara teratur setiap tahunnya. Program vaksinasi dan eliminasi yang dianggap cukup efektif adalah 70%, serta eliminasi sebesar 30% dari populasi anjing. Namun pada kenyataannya penyakit rabies masih berkeliaran terutama di 23 provinsi yang telah dinyatakan sebagai daerah endemik rabies. Provinsi Bali yang semula daerah bebas rabies, sekarang telah terjadi kasus rabies yaitu pada tahun 2008 (DGLS, 2009). Salah satu faktor ketidakberhasilan mungkin disebabkan kurang tepatnya atau kompatibilitas virus vaksin dengan virus yang bersirkulasi di lapang. Oleh karena itu, diperlukan suatu kajian secara molekuler terhadap keberadaan penyakit rabies yang terjadi di daerah endemik. Melalui kajian molekuler, karakteristik virus rabies dapat diketahui, termasuk adanya keragaman genetik virus antara daerah yang satu dengan daerah lain, sehingga akan memudahkan dalam pengendalian dan

pengecanaan penyakit rabies. Walaupun demikian, pada kenyataannya penyakit rabies masih tersebar hampir di 23 provinsi dan dinyatakan sebagai daerah endemik rabies. Kasus rabies terjadi di beberapa daerah diantaranya yaitu tahun 1977 di Flores, pulau Lembata, dan NTT; Tahun 2003 di Ambon, pulau Seram, dan Maluku; tahun 2005 di pulau Halmahera, Maluku Utara, Ketapang, Kalimantan Barat, dan tahun 2008 di Badung-Bali. Kasus rabies tertinggi yaitu terjadi di Sulawesi Utara dan Sulawesi Selatan pada tahun 2008 (DGLS, 2009; Susilawathi *et al.*, 2012).

Untuk keberhasilan pencegahan dan pengendalian penyakit rabies di Indonesia terlebih dahulu perlu diketahui karakteristik virus rabies yang bersirkulasi sehingga penanganan terhadap penyakit rabies akan lebih tepat dan terarah, terutama dalam memilih galur virus rabies yang akan digunakan untuk vaksin dan perangkat diagnostik. Selain itu, hubungan kekerabatan antara virus rabies yang ada di beberapa daerah di Indonesia perlu pula diketahui. Hal tersebut sangat bermanfaat untuk mengetahui dinamika penyebaran penyakit rabies di Indonesia serta dalam melacak asal usul terjadinya wabah atau infeksi virus rabies di suatu wilayah di Indonesia.

Penelitian ini bertujuan mengetahui karakter genetik virus rabies berdasarkan hubungan kekerabatan antar virus rabies di berbagai daerah di Indonesia melalui pengurutan dan analisis filogenetika virus rabies, sehingga diperoleh alternatif rekomendasi baru dalam pengendalian penyakit rabies ditinjau dari informasi keragaman karakter genetik virus.

MATERI DAN METODE

Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel otak anjing yang telah terdeteksi positif virus rabies berdasarkan uji *fluorescent antibody test* (FAT), yaitu sebanyak delapan sampel otak anjing yang dikoleksi pada tahun 2007-2010. Sampel tersebut terdiri atas dua sampel (RV/BKT-52/dog/2009 dan RV/BKT-58/dog/2009) berasal dari Bukit Tinggi, satu sampel (RV/MKS-26/dog/2010) dari Makasar, satu sampel (RV/Banten-01/dog/dog/2007) dari Banten, satu sampel (RV/Medan-27/dog/2010) dari Medan, dan tiga sampel (RV/Bali-1/dog/2009; RV/Bali-2/dog/2009; RV/Bali-3/dog/2009) dari Bali. Selain itu, disertakan pula vaksin rabies Rabvac (Fort Dodge, USA) yang seringkali digunakan oleh praktisi untuk vaksinasi.

Ekstraksi RNA

Total RNA diekstraksi secara langsung dari 200 μ l sampel suspensi otak 20% dengan menggunakan QIAmp *viral RNA Mini kit* (Qiagen, USA) sesuai dengan rekomendasi pembuat kit. Ekstrak RNA diresuspensikan dengan 50 μ l *RNase-free Water* kemudian konsentrasi RNA diukur dengan menggunakan spektrofotometer (NanoDrop ND-1000 UV-Vis, Wilmington, DE). Sampel RNA langsung dapat digunakan untuk *reverse*

transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) dan sisanya disimpan pada suhu -70° C untuk pengujian lebih lanjut.

Primer

Primer yang digunakan dalam penelitian ini (Tabel 1) berdasarkan data dari *GenBank* yaitu *Rabies virus* (RV) dan *Rabies-Related Viruses* (RRV) yang keduanya mewakili genotip 1 (Pasteur virus [PV] strain, *GenBank accession no.* PV-X03673) dan genotipe 3 (Mokola virus, *GenBank accession no.* S59448) (Heaton *et al.*, 1997; Dantas *et al.*, 2004). Primer tersebut dapat mengenal semua bagian dengan tingkat homologi yang tinggi antara nukleoprotein yang menyandi gen.

Sintesis cDNA

Reverse transcriptase (RT) virus RNA dibuat dengan mendenaturasi 2 μ g/ μ l ekstrak RNA pada suhu 100° C selama 5 menit, didinginkan dalam es, kemudian ditambahkan pereaksi hingga total volume 10 μ l dengan 1x *Moloney murine leukemia virus* (M-MLV) bufer *reverse* transkripsi (Invitrogen, USA), 1 mM dNTPs, 14 unit RNasin (Invitrogen, USA), 1 mM *dithiothreitol*, 7,5 pmol/ μ l primer JW12 (Tabel 1) dan 200 unit M-MLV RT (Invitrogen). Campuran tersebut diinkubasi pada suhu 42° C selama 60 menit, kemudian dilanjutkan pada suhu 100° C selama 5 menit dan akhirnya didinginkan dalam es. Campuran reaksi tersebut diencerkan 1/10 kali dengan *RNase-Free water* (Franka *et al.*, 2004).

Nested RT-PCR

Nested RT-PCR dikerjakan berdasarkan prosedur Franka *et al.* (2004) dengan sedikit modifikasi. Amplifikasi RT-PCR: 5 μ l RT-cDNA ditambahkan ke dalam campuran reaksi dengan total volume 50 μ l; 1 x PCR bufer yang mengandung 1,5 mM $MgCl_2$, 200 μ M dNTPs (Vivantis), 7,5 pmol primer JW6 (masing-masing 2,5 pmol) dan 7,5 pmol primer JW12 (Midland), dan 0,5 unit *Taq Polymerase* (Vivantis). Amplifikasi menggunakan *GeneAmp[®] PCR System 9700 (Apply Biosystem, ABI)* dengan pre-denaturasi pada suhu 95° C selama 10 menit, kemudian dilanjutkan dengan 5 putaran yaitu denaturasi pada suhu 95° C selama 90 detik, pelekatan primer suhu 45° C selama 90 detik, ekstensi 50° C selama 20 detik, dan ekstensi akhir pada suhu 72° C selama 90 detik. Kemudian dilanjutkan dengan 40 putaran: denaturasi suhu 95° C selama 30 detik, pelekatan primer suhu 45° C selama 60 detik, ekstensi suhu 50° C selama 20 detik, dan ekstensi akhir suhu 72° C selama 60 detik. Dilanjutkan dengan 1 putaran: denaturasi suhu 95° C selama 30 detik, pelekatan primer suhu 45° C selama 90 detik, ekstensi suhu 50° C selama 20 detik, dan perpanjangan suhu 72° C selama 10 menit.

Sebanyak 1 μ l produk eksternal RT-PCR yang telah diamplifikasi di atas, direaksikan dengan campuran reaksi PCR melalui penambahan 7,5 pmol/ μ l internal primer JW10 (masing-masing 2,5 pmol/ μ l) dan 7,5 pmol/ μ l primer JW12 dengan total reaksi campuran

sebanyak 50 µl. Amplifikasi *nested* RT-PCR sama seperti yang dilakukan untuk amplifikasi RT-PCR, hanya jumlah putarannya tidak 40 putaran akan tetapi 25 putaran. Hasil produk PCR dianalisis dengan menggunakan agarose 1,5% yang dilengkapi dengan etidium bromida (0,5 µg/ml), visualisasi dan dokumentasi menggunakan *GelDoc*. Interpretasi hasil sampel dinyatakan positif mengandung virus rabies apabila tervisualisasikan target yang spesifik pada pita 586 bp (*nested* RT-PCR) atau 606 bp (RT-PCR).

Pemurnian DNA dan Pengurutan

Sebanyak 50µl masing-masing produk PCR dimurnikan dengan menggunakan *QIAquick PCR Purification kit* (Qiagen, USA) sesuai dengan prosedur dari pembuat kit. Pengurutan mengikuti prosedur yang terdapat pada kit (*BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*) yaitu: total reaksi 20 µl terdiri atas 1 µl *ready reaction premix*, 3,5 µl *BigDye sequencing buffer* (5x), 2 µl primer eksternal (*forward JW12* dan *reverse JW6*) masing-masing pada tabung terpisah (1,6 pmol/µl), 2 µl produk PCR, 0,5 µl *hot start Taq polymerase* (5 U/µl) dan 9 µl air deionisasi steril. Proses amplifikasi dilakukan sebagai berikut: denaturasi awal suhu 95° C selama 5 menit, denaturasi suhu 95° C selama 30 detik, pelekatan suhu 50° C selama 10 menit dan ekstensi suhu 60° C selama 4 menit, dengan total siklus 25 putaran. Produk PCR dimurnikan sebagai berikut: 20 µl produk PCR dicampur dengan 2 µl *ethylene diamine tetraacetic acid* (EDTA) 125 mM, 2 µl natrium asetat 3 M dan 50 µl etanol 100%, kemudian diinkubasikan pada suhu ruangan selama 15 menit dan disentrifugasi pada 3.000 x g selama 30 menit pada suhu 4° C. Supernatan dibuang, endapan (pelet) dicuci dengan penambahan 70 µl ethanol 70% kemudian disentrifugasi pada 1.650 x g selama 15 menit pada suhu 4° C. Akhirnya endapan dikering-udarkan dan dilarutkan dengan 10 µl *formamide* (Sigma Aldrich, USA) dan dipanaskan pada suhu 95° C selama 2 menit, didinginkan secepatnya, divorteks, dan disentrifugasi selama 2 detik. Sampel disimpan dalam es hingga siap digunakan. Sebanyak 0,5 µl sampel dipindahkan ke dalam tabung dan dimasukkan ke alat pengurutan (ABI PRISM 3130 *Genetic Analyser*, Applied Biosystem, USA) melalui kapiler elektroforesis yang mengandung polimer POP-6TM (Applied Biosystem, USA).

Analisis Urutan dan Filogenetika

Analisis urutan DNA dan translasi asam amino dilakukan dengan menggunakan *software BioEdit Version 7.0.5* (Hall, 1999). Pensejajaran (*alignment*) urutan menggunakan *software the Clustal W version 1.83* (Thompson *et al.*, 1994). Kesamaan (homologi) urutan antara isolat BHV-1 dianalisis dengan menggunakan *The Basic Alignment Search Tools* (BLAST) dari *The National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Analisis hubungan kekerabatan antar urutan dilakukan dengan program *Molecular Evolutionary Genetic Analysis* (MEGA) version 3.1.

(Kumar *et al.*, 2004) dengan rancangan konstruksi pohon kekerabatan menggunakan *neighbor-joining* (NJ) *tree* berdasarkan parameter Kimura-2 dengan 2000 replikasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil uji *nested* RT-PCR menunjukkan bahwa delapan sampel otak anjing yang diuji menunjukkan hasil positif virus rabies. Kedelapan sampel otak tersebut sebelumnya telah positif virus rabies dengan uji FAT. Selain itu, dalam penelitian ini disertakan pula vaksin rabies Rabvac (Fort Dodge, USA) dan diperoleh hasil positif dengan menggunakan primer gen N.

Pada Gambar 1 dan Tabel 1 ditampilkan hasil pengurutan, pensejajaran dan analisis urutan asam amino virus rabies gen N asal delapan sampel otak anjing dan satu vaksin rabies yang dibandingkan dengan isolat virus rabies dari daerah lain di Indonesia dan isolat virus rabies dari Cina. Hasil pensejajaran terhadap 132 asam amino virus rabies gen N menunjukkan bahwa virus rabies koleksi tahun 2009-2010 asal Bukit Tinggi (RV/BKT-52/dog/2009, RV/BKT-58/dog/2009), Medan (RV/Medan-27/dog/2010), Bali (RV/Bali-1/dog/2009, RV/Bali-2/dog/2009, RV/Bali-3/dog/2009), Makasar (RV/MKS-26/dog/2010), Banten (RV/Banten-1/dog/2007) memiliki kesamaan asam amino gen N mencapai 100%. Demikian pula halnya antara isolat virus rabies koleksi Tahun 2009-2010 dengan isolat virus rabies yang berasal dari daerah lain di Indonesia (RV/Ind/SW01-11N/dog/2003, RV/Ind/030031N/dog/2003, RV/Ind/SC97-01N/dog/2003) memiliki kesamaan asam amino hingga 100%, dan hanya satu isolat virus rabies asal Indonesia (RV/Ind/JA97-05 N/dog/2003) yang memiliki kesamaan dengan isolat virus rabies koleksi 2009-2010 mencapai 95-99%. Isolat virus rabies koleksi tahun 2009-2010 (Banten, Makasar, Bali, Bukit Tinggi, dan Medan) dengan vaksin rabies (Rabvac) memiliki kesamaan asam amino mencapai 92-95%.

Selanjutnya pada Tabel 2 disajikan hasil analisis urutan asam amino yang menunjukkan isolat virus rabies asal otak anjing (semuanya dari Indonesia) memiliki perbedaan urutan asam amino gen N dengan isolat virus rabies asal otak kucing sebesar 3% atau tingkat persamaan urutan asam aminonya hanya sebesar 97%. Adanya perbedaan urutan asam amino ini mengakibatkan terjadi perbedaan yang mencolok dalam pohon kekerabatan (Gambar 2). Isolat virus rabies asal otak kucing (RV/Ind/SC01-68 N/Cat/2008) terpisah dari kelompok isolat virus yang diperoleh dari otak anjing asal Indonesia. Perbedaan isolat virus rabies asal otak kucing dan anjing ini terletak pada 4 asam amino posisi 1-4 yaitu serin-prolin-serin-arginin (otak rabies asal kucing), sedangkan isolat virus rabies asal otak anjing diisi oleh leusin-lisin-proline-asam glutamat. Dibandingkan virus rabies pada vaksin Rabvac, isolat virus rabies asal Indonesia berbeda pada beberapa residu asam amino ke-24 (serin vs sistein), ke-44 (asparagin vs serin), ke-78 (leusin vs valin), ke-102 (serin vs asparagin), dan ke-119 (serin vs prolin).

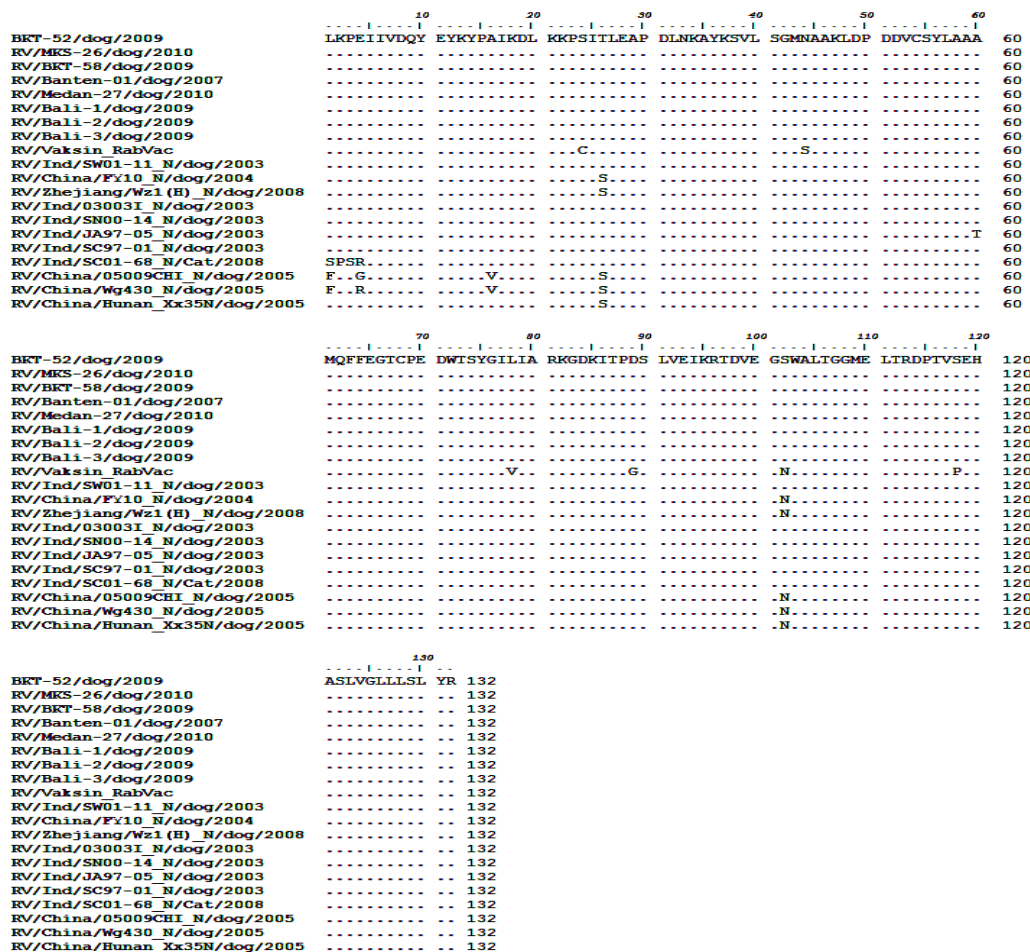
Tabel 1. Primer oligonukleotida untuk *nested* RT-PCR

Primer ^a	Urutan (5' – 3')	Sense ^b	Posisi genome ^c
JW12	ATG TAA CAC C(C/T)CTA CAA TTG	M	55-73
JW6 (DPL)	CAA TTC CGA CAC ATT TTG TG	G	660-641
JW6 (E)	CAG TTG GCA CAC ATC TTG TG	G	660-641
JW6(M)	CAG TTA GCG CAC ATC TTA TG	G	660-641
JW10(DLE2)	GTC ATC AAA GTG TG (A/G) TGC TC	G	636-617
JW10(ME1)	GTC ATC AAT GTG TG (A/G)TGT TC	G	636-617
JW10(P)	GTC ATT AGA GTA TGG TGT TTC	G	636-617

^a Huruf yang ada di dalam kurung menunjukkan genotype berdasarkan pada saat primer di design: DPL, Duvenhage virus, PV, dan Lagos bat virus; E, EBLs 1 dan 2; M, Mokola virus; DLE2, Duvenhage virus, Lagos bat virus, dan EBL2; ME1, Mokola virus dan EBL 1; P, PV. ^b M= Messenger; G= Genotipe, ^c Posisi nukleotida merupakan urutan berdasarkan urutan PV

Tabel 2. Homologi urutan asam amino di antara virus rabies gen N yang dibandingkan

Virus rabies	Persentase kesamaan asam amino																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1 RV/BKT-52																				
2 RV/MKS-26/dog/2010	100																			
3 RV/BKT-58/dog/2009	100	100																		
4 RV/Banten-01/dog/2007	100	100	100																	
5 RV/Medan-27/dog/2010	100	100	100	100																
6 RV/Bali-1/dog/2009	100	100	100	100	100															
7 RV/Bali-2/dog/2009	100	100	100	100	100	100														
8 RV/Bali-3/dog/2009	100	100	100	100	100	100	100													
9 RV/Vaksin RabVac	95	95	95	95	95	95	95	95												
10 RV/Ind/SW01-11N/dog/2003	100	100	100	100	100	100	100	100	100											
11 RV/China/FY10N/dog/2004	100	98	98	98	98	98	98	98	98	98										
12 RV/Zhejiang/Wz1(H)N/dog/2008	98	98	98	98	98	98	98	98	98	95	98	100								
13 RV/Ind/030031N/dog/2003	100	100	100	100	100	100	100	100	95	100	98	98								
14 RV/Ind/SN00-14N/dog/2003	100	100	100	100	100	100	100	100	95	100	98	98	100							
15 RV/Ind/JA97-05N/dog/2003	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99						
16 RV/Ind/SC97-01/dog/2003	100	100	100	100	100	100	100	100	95	100	98	98	100	100	99					
17 RV/Ind/SC01-68N/Cat/2008	97	97	97	97	97	97	97	97	92	97	95	95	97	97	96	97				
18 RV/China/05009CHI-N/2005	96	96	96	96	96	96	96	96	93	96	98	98	96	96	95	96	95			
19 RV/China/Wg430-N/2005	96	96	96	96	96	96	96	96	93	96	98	98	96	96	95	96	95	99		
20 RV/China/Hunan_Xx35N/dog/2005	98	98	98	98	98	98	98	98	95	98	100	100	98	98	98	98	95	98	98	



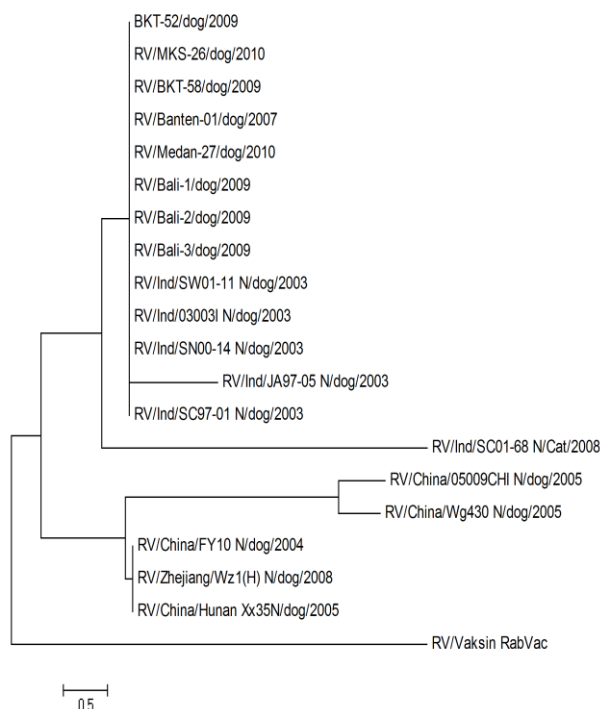
Gambar 1. Hasil perbandingan urutan asam amino antara isolat virus rabies asal Indonesia dengan virus rabies asal Cina serta vaksin rabies Rabvac

Pada Gambar 1 menampilkan perbedaan urutan asam amino gen N pun terjadi antara isolat virus rabies asal Indonesia dengan isolat virus rabies asal Cina (*GeneBank*). Perbedaan tersebut didominasi oleh adanya asam amino serin dan asparagin pada isolat virus rabies asal Cina menggantikan posisi asam amino treonin dan glisin dari isolat virus rabies asal Indonesia. Keberadaan asam amino serin dan asparagin terjadi pada semua isolat virus rabies asal Cina. Sementara itu, kesamaan (homologi) asam amino antara isolat rabies virus asal Indonesia dengan isolat virus rabies asal Cina mencapai 96-98% (Tabel 1).

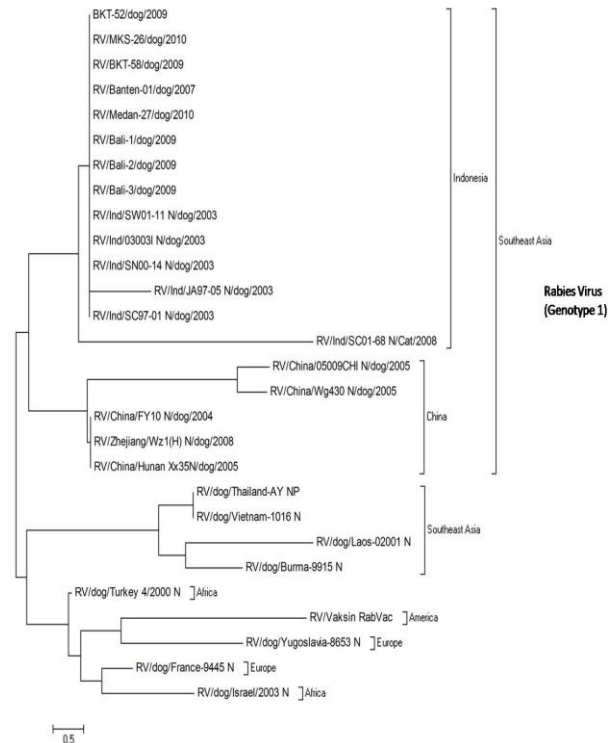
Walaupun terdapat perbedaan urutan asam amino antara isolat virus rabies asal Indonesia dengan isolat virus rabies asal Cina, namun persentase perbedaan tersebut tidak signifikan (masing-masing 5 dan 3%). Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa isolat virus rabies asal Indonesia berhubungan lebih dekat dengan isolat virus rabies asal Cina dibandingkan dengan virus rabies asal *strain* vaksin Rabvac (Port Dodge, USA) (Gambar 2). Hal tersebut diperkuat dengan hasil analisis hubungan kekerabatan antara isolat virus rabies asal Indonesia dengan beberapa isolat virus asal negara lain (Afrika, Eropa, Thailand, Vietnam, Laos, dan Birma) yang menunjukkan bahwa isolat virus rabies asal Indonesia lebih dekat hubungannya dengan isolat virus rabies asal Cina dibandingkan dengan isolat virus rabies asal Asia Tenggara lainnya seperti Thailand, Burma, Vietnam, dan Laos (Gambar 3). Kedekatan hubungan kekerabatan antara isolat virus rabies asal Indonesia dengan isolat virus rabies asal Cina pernah pula dilaporkan Susetya *et al.* (2005; 2008) Demikian pula

Tang *et al.* (2000) pernah melaporkan bahwa virus rabies dari Indonesia (SN01-23) lebih dekat hubungan kekerabatannya dengan virus rabies (CNX8601) dari Ningxia-Cina dibandingkan dengan virus rabies asal Malaysia dan Thailand yang secara geografi berdekatan dengan Indonesia. Sementara itu, vaksin rabies Rabvac (Port Dodge, USA) yang sering digunakan di Indonesia, terutama oleh kalangan praktisi (praktek dokter hewan) memiliki hubungan kekerabatan yang dekat dengan isolat virus rabies asal Eropa (RV/dog/Europe, RV/dog/9445 Europe_N). Walaupun tingkat homologi asam amino antara vaksin rabies Rabvac (USA) dengan isolat virus rabies asal Indonesia mencapai 95%, hal ini sudah cukup efektif bila digunakan di Indonesia dan Cina. Badrane *et al.* (2001) melaporkan bahwa dua kelompok *Lyssavirus* akan terjadi netralisasi silang (*cross neutralization*) satu sama lain apabila memiliki tingkat homologi lebih dari 72%.

Data yang diperoleh dari hasil analisis hubungan kekerabatan tersebut memperkuat asumsi bahwa virus rabies galur lapang asal Cina telah berpindah ke Indonesia melalui anjing yang dibawa pemiliknya dari Cina ke Indonesia. Oleh karena itu, untuk mencegah terjadinya penyebaran virus rabies dari negara lain terutama Cina, diperlukan pengawasan yang ketat terutama di lokasi *entry point* pelabuhan udara atau laut di Indonesia. Untuk keberhasilan pembebasan penyakit rabies di Indonesia, maka diperlukan kerjasama antara instansi terkait terutama pihak karantina hewan yang memiliki otoritas dalam pengawasan masuk-keluarnya hewan ke Indonesia.



Gambar 2. Phylogenetic tree asam amino gen N virus rabies antara isolat Indonesia dan Cina serta vaksin rabies Rabvac. Garis horizontal menunjukkan perbedaan asam amino



Gambar 3. Phylogenetic tree asam amino gen N virus rabies antara isolat Indonesia dengan virus rabies dari negara lain. Garis horizontal menunjukkan perbedaan asam amino

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil analisis hubungan kekerabatan menggunakan urutan asam amino protein gen N virus rabies menunjukkan bahwa semua isolat virus rabies asal anjing dari sejumlah daerah di Indonesia memiliki hubungan yang sangat dekat (homologi 97-100%). Isolat virus rabies asal kucing memiliki tingkat homologi yang lebih rendah (92-97%) dari isolat virus rabies yang berasal dari anjing, akan tetapi masih tetap termasuk dalam satu kluster. Semua isolat rabies asal Indonesia memiliki hubungan kekerabatan yang sangat dekat dengan isolat virus rabies asal Cina.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dinas Peternakan Propinsi Bali, Balai Besar Veteriner Denpasar, Dinas Pertanian dan Peternakan Provinsi Banten, Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner Regional II Bukittinggi, dan Balai Besar Veteriner Maros yang telah membantu kelancaran penelitian ini. Penulis juga mengucapkan terimakasih kepada saudara Pudji Kurniadi dan Zulkifli atas bantuan teknis baik di lapangan maupun di laboratorium.

DAFTAR PUSTAKA

- Badrane, H., C. Bahloul, P. Perrin, and N. Tordo. 2001. Evidence of two Lyssavirus phylogroups with distinct pathogenicity. *J. Virol.* 75:3268-3276.
- Dantas, J.J.V., L.M.S. Kimura, M.S.R. Ferreira, A.M. Fialho, M.M.S. Almeida, C.R.V. Gregio, P.C. Romijn, and J.P.G. Leite. 2004. Reverse transcription-polymerase chain reaction assay for rabies virus detection. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 56 (3):398-400.
- DGLS. Directorate General of Livestock Services. 2009. The overview and the outbreak of rabies in Bali. *Workshop "Control and Prevention of AI and Rabies"*, Jakarta.
- Franka, R., S. Svrcek, M. Madar, M. Kolesarova, A. Ondrejko, R. Ondrejka, Z. Benisek, J. Suli, and S. Vilcek. 2004. Quantitation of the effectiveness of laboratory diagnostic of rabies using classical and molecular-genetic methods. *Vet. Med. Czech.* 49(7):259-267.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41:95-98.
- Heaton, P.R., P. Johnstone, L.M. McElhinney, R. Cowley, E. O'Sullivan, and J.E. Whitby. 1997. Heminested PCR assay for detection of six genotype of rabies and rabies-related viruses. *J. Clin. Microbiol.* 35(11):2762-2766.
- Kumar, S., K. Tamura, and M. Nei. 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.* 5:150-163.
- Nidia, A.C., S.V. Moron, J.M. Berciano, O. Nicolas, C.A. Lopez, J. Juste, C.R. Nevado, Á. A. Setien, and J.E. Echevarría. 2013. Novel lyssavirus in bat, Spain. *Emerging Infect. Dis.* 19(5):793-795.
- Nottidge, H.O., T.O. Omobowale, and O.O. Oladiran. 2007. Mokola virus antibodies in humans, dogs, cats, cattle, sheep, and goats in Nigeria. *Int. J. Appl. Res. Vet. Med.* 5:105-106.
- Sunday, E.H., A.D. Asabe, K.P.K. Jacob, H.M. Kazeem, J.U. Umoh, and D.A. Hambolu. 2014. Rabies and Dog Bites Cases in Lagos State Nigeria: A Prevalence and Retrospective Studies (2006-2011). *Global J. Health Sci.* 6(1):107-114.
- Susetya, H., I. Naoto, M. Sugiyama, and N. Minamoto. 2005. Genetic analysis of glycoprotein of Indonesian rabies virus. *Indonesian J. Biotech.* 10(1):795-800.
- Susetya, H., M. Sugiyama, A. Inagaki, N. Ito, G. Mudiarto, and N. Minamoto. 2008. Molecular epidemiology of rabies in Indonesia. *Virus Research.* 135:144-149.
- Susilawathi, N.M., A.E. Darwinata, I.B.N.P. Dwija, N.S. Budayanti, G.A.K. Wirasandhi, K. Subrata, N.K. Susilarini, R.A.A. Sudewi, F.S. Wignall, and G.N.K. Mahardika. 2012. Epidemiological and clinical features of human rabies cases in Bali 2008-2010. *BMC Infectious Diseases.* 12:1-8.
- Tang, Q., L.A. Orciari, C.E. Rupprecht, and X.Zhao. 2000. Sequencing and position analysis of the glycoprotein gene of four Chinese rabies viruses. *Zhongguo Bingduxue.* 15:22-33.
- Thompson, J.D., H.G. Higgins, and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680.