

Analisis Penyebaran dan Genotipe Rubela di Jawa Barat Tahun 2011–2013

**Acep T. Hardiana¹, Ardini S. Raksanagara², Rd. Tina D. Judistiani²,
Dyah Widhiastuti¹, Novilia S. Bachtiar¹**

¹PT. Bio Farma, Bandung, Indonesia

²Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran, Bandung, Indonesia

Abstrak

Penyakit rubela menyebar di seluruh dunia dan berbahaya bagi ibu hamil karena dapat menyebabkan abortus, kematian janin atau sindrom rubela kongenital (*congenital rubella syndrome*/CRS) hingga 90%. Penyebaran dan identifikasi genotipe rubela di Indonesia penting untuk memastikan adanya virus endemis atau importasi yang menyebar di masyarakat. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui penyebaran dan genotipe rubela di Jawa Barat dalam upaya pencegahan yang efektif. Penelitian ini dilakukan dengan memeriksa sampel urin penderita *suspect* campak menggunakan protokol WHO melalui tahapan isolasi pada sel vero, uji PCR, uji sekuensing, dan analisis hasil sekuensing. Sampel diambil dari program surveilans campak-rubela nasional pada tahun 2011–2013. Sebanyak 251 sampel urin yang diperiksa, diperoleh hasil sebanyak 32 sampel (12,7%) positif. Sebanyak 28 kasus (87,5%) merupakan genotipe 1E sedangkan sisanya 4 kasus (12,5%) merupakan genotipe 2B. Penyebaran virus rubela terutama terjadi di Kabupaten Kuningan, Garut, Tasikmalaya, Kota Bandung, Kota Cimahi, dan Kota Tasikmalaya. Pencegahan penyebaran penyakit rubela dan surveilans CRS di wilayah endemis perlu menjadi prioritas untuk memutus rantai penularan.

Kata kunci: Genotipe rubela 1E, genotipe rubela 2B, epidemiologi rubela

Distribution and Genotypic Analysis of Rubella Virus in West Java on 2011–2013

Abstract

Rubella spreads around the world and dangerous especially for pregnant women because it can cause abortion, fetal death or congenital rubella syndrome (CRS) almost 90% cases. Spread and identification of rubella genotypes in Indonesia is important to ensure the indigenous or importation virus. The purpose of this study was to determine the rubella genotype distribution and spread in West Java in effective prevention efforts. This study was conducted by examining the urine samples of suspect measles patients using WHO protocol through the virus isolation in vero cells, PCR, DNA sequencing, and analysis of the sequencing results. Samples taken from the measles-rubella surveillance program nationwide in 2011–2013. Of the 251 urine samples were examined, 32 samples (12.7%) were positive. A total of 28 cases (87.5%) were genotype 1E while the remaining 4 cases (12.5%) were genotype 2B. Rubella virus spread primarily occurs in District of Kuningan, Garut, Tasikmalaya, Bandung City, Cimahi City, and Tasikmalaya City. Prevention of the rubella diseases and CRS surveillance in endemic areas should be priority task to break the chain of transmission.

Key words: Rubella genotype 1E, rubella genotype 2B, rubella epidemiology

Korespondensi: Acep T. Hardiana, SKM., Bagian Surveilans dan Epidemiologi, PT. Bio Farma, Bandung, Indonesia, *email:* tantanhardiana@yahoo.com

Naskah diterima: 7 Juli 2014, Diterima untuk diterbitkan: 21 Oktober 2014, Diterbitkan: 1 Maret 2015

Pendahuluan

Rubela adalah salah satu penyakit umum yang menyebar di seluruh dunia dan menyerang berbagai umur dengan gejala yang bervariasi. Infeksi pada anak-anak ditandai dengan adanya ruam pada kulit dan demam. Pada usia dewasa, infeksi rubela akan tampak lebih nyata dengan timbulnya sakit kepala, mata merah dan berair, sakit pada persendian, dan hilangnya nafsu makan. Gejala kelainan yang berat muncul pada wanita hamil apabila infeksi terjadi pada usia kehamilan kurang dari 13 minggu. Infeksi pada masa tersebut dapat menyebabkan abortus, kematian janin, atau sindroma rubela kongenital (*congenital rubella syndrome/CRS*) hingga 90%.¹⁻³

Dalam upaya eliminasi global rubela tahun 2020 diperlukan surveilans penyakit maupun genotipe dari virus rubela untuk memantau penyebarannya dan memastikan tidak ada lagi virus rubela endemis di setiap negara.² Program eradikasi rubela juga dapat tercapai jika cakupan vaksinasi dipertahankan lebih dari 95%, tetapi vaksinasi rubela di Indonesia belum menjadi program nasional.⁴

Penyebaran dan genotipe virus rubela di Indonesia belum menjadi prioritas penelitian. Program surveilans rubela pada umumnya dilaksanakan bersamaan dengan surveilans campak dikarenakan kedua penyakit tersebut memiliki gejala klinis yang hampir sama.^{5,6} Program surveilans campak dan rubela di Jawa Barat telah dilaksanakan sejak tahun 1998. Pada tahun 2002 Laboratorium Surveilans dan Epidemiologi Bio Farma ditunjuk sebagai laboratorium rujukan campak dan rubela tingkat nasional. Pemeriksaan biomolekuler dalam penentuan genotipe rubela dimulai sejak tahun 2009 dari sampel urin. Virus rubela dapat diidentifikasi dari cairan tubuh seperti saliva, urin, dan hapus tenggorok.⁷ Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui penyebaran dan genotipe virus rubela di Provinsi Jawa Barat pada tahun 2011–2013.

Metode

Sampel urin diambil dari *suspect* penderita campak atau rubela dalam waktu <5 hari sejak muncul ruam di tubuh penderita oleh petugas Dinas Kesehatan Kabupaten/Kota di Provinsi Jawa Barat lalu dikirim ke laboratorium Surveilans dan Epidemiologi PT. Bio Farma. Informasi kasus diperoleh secara berjenjang dari puskesmas hingga ke dinas kesehatan provinsi. Jumlah sampel yang dikirim ke laboratorium dibatasi hanya tiga kasus untuk setiap kejadian luar biasa (KLB). Setiap kasus dilengkapi laporan C1 tentang identitas dan riwayat penderita. Jumlah sampel secara keseluruhan sangat bergantung pada aktivitas petugas dalam melacak kasus. Urin diambil sebanyak 10–50 mL ditampung dalam wadah steril bertutup, dikirim dalam keadaan dingin di dalam *cold box* 2–8 °C dan harus tiba di laboratorium dalam waktu <24 jam.⁸

Pengolahan urin dilakukan dengan cara sentrifugasi selama 15 menit dalam kecepatan 3000 rpm pada suhu 2–8 °C. Pelet dipisahkan dan dilarutkan pada 2 mL *minimum essential medium* (MEM) Sigma seri M3024 yang mengandung *penicilline-streptomycine*, lalu disimpan ke dalam tabung steril pada suhu -20 °C sebelum digunakan.

Virus rubela diisolasi menggunakan sel Vero ke dalam *tissue culture flask* 25 cm² dari Nunc katalog 136196. Sebanyak 0,5–1,0 mL sampel diinokulasikan ke dalam setiap *flask* berisi 5 mL MEM dan diamati selama 2x7 hari. Isolat digunakan untuk pemeriksaan *polymerase chain reaction* (PCR) virus rubela. Pemeriksaan PCR untuk identifikasi genotipe didasarkan pada genom E1 virus rubela. Pemeriksaan dilakukan melalui tahapan ekstraksi *ribonucleic acid* (RNA), siklus PCR, elektroforesis, dan dokumentasi gel.⁸ Ekstraksi RNA virus rubela menggunakan QIAmp Viral RNA Mini Kit katalog 52904 produksi Qiagen. Isolat yang digunakan sebanyak 140 uL dan suspensi RNA akhir sebanyak 60 uL.

Hasil ekstraksi disimpan pada suhu -20°C .

Siklus pada PCR dilakukan menggunakan *Thermal Cycler Verity* dari *Applied Biosystem*, sedangkan reagen yang digunakan adalah Qiagen One-step RT PCR kit katalog 210212 dari Qiagen, primer spesifik (RV11, RV12, RV12.2), dan RNase inhibitor. Formula reagen PCR dibuat dengan mencampurkan 10 μL 5x Qiagen One-Step RT PCR, 10 μL 5x Q solution, 2 μL dNTP mix, 0,5 μL RV11, 0,5 μL RV12, 0,5 μL RV12.2, 19,5 μL RNase free water, 2 μL Qiagen One-Step enzyme mix, 0,5 μL RNase inhibitor, dan 5,0 μL sampel. Siklus PCR dilakukan melalui tahapan inkubasi 50°C selama 30 menit dan 95°C selama 15 menit, amplifikasi 40x dengan siklus 94°C selama 30 detik, 60°C selama 30 detik, 72°C selama 1 menit, dan tahap akhir 72°C selama 10 menit kemudian disimpan pada suhu 4°C .

Elektroforesis gel dilakukan menggunakan Mupid-Exu elektroforesis apparatus dengan reagen gel agarose katalog 1613101 dari Bio Rad, DNA ladder 100 pb katalog 1708202 dari Bio Rad, bufer TBE 10x Invitrogen dan Gel Red sebagai pewarna DNA. Pembacaan dilakukan pada gel documentation system Bio Rad. Gel agarose dibuat 2% dalam TBE bufer dan penambahan 1 μL Gel Red untuk setiap 50 mL gel. Sampel dimasukkan ke dalam setiap sumur sebanyak 10 μL setelah dicampur loading dye 2 μL . Gel dirunning selama 30 menit pada 100 volt dengan DNA ladder sebagai standar.

Sekuensing untuk virus rubela dilakukan dengan tahapan purifikasi hasil PCR, siklus sekuensing, purifikasi hasil siklus sekuensing, dan elektroforesis kapiler, serta analisis hasil. Purifikasi hasil PCR menggunakan QIAquick PCR Purification Kit nomor 28104 atau QIAquick Gel Extraction Kit nomor 28704 dari Qiagen. Hasil purifikasi kemudian dilarutkan ke dalam 50 μL nuclease free water untuk digunakan dalam pemeriksaan berikutnya.

Siklus sekuensing dilakukan menggunakan *Thermal Cycler Verity* dari *Applied Biosystem*,

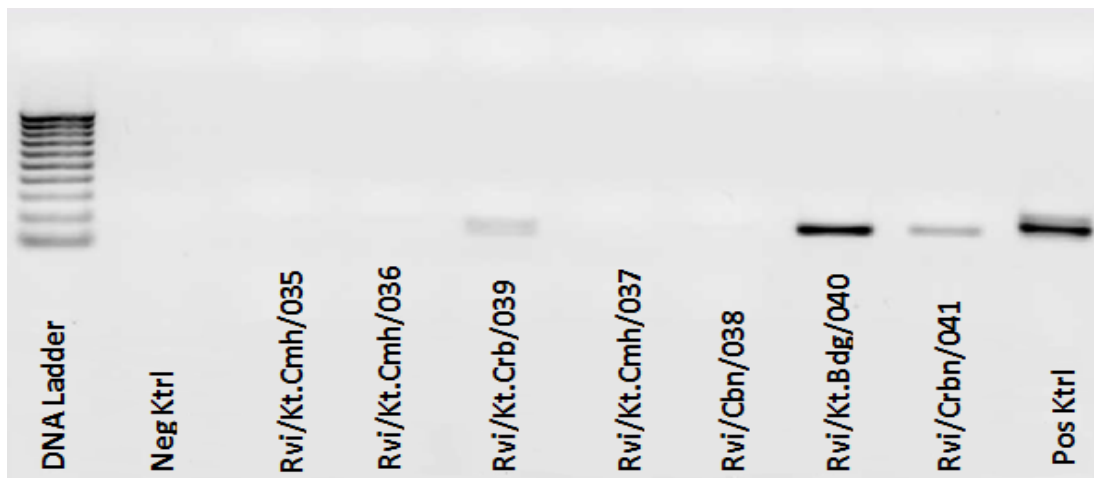
sedangkan reagen yang digunakan adalah *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* versi 3.1 katalog 4337455, *Big Dye Terminator 5x Buffer* dari *Applied Biosystem* dan primer spesifik (RV8633, RV9112, RV8945, RV9577). Formula reagen siklus sekuensing dibuat dengan cara mencampurkan 2,0 μL 5x *Big Dye buffer*, 2,0 μL *Big Dye Terminator reaction mix*, 0,5 μL masing-masing primer 3,2 mMol, 5,0 μL RNase free water, 0,5 μL sampel (pengenceran 1:4). Siklus sekuensing dilakukan melalui tahapan amplifikasi 25x dengan siklus 95°C selama 30 detik, 50°C selama 15 detik, 60°C selama 2 menit, dan tahap akhir 4°C .

Purifikasi terhadap hasil siklus sekuensing dilakukan dengan menggunakan *Big Dye X Terminator Purification Kit* katalog 4376486 dari *Applied Bio System*. Hasil purifikasi lalu dimasukkan ke dalam DNA Analyzer model 3130 dari *Applied Biosystem* untuk dilakukan elektroforesis kapiler. Elektroforesis kapiler pada DNA Analyzer dilakukan dengan cara memasukkan 15 μL sampel hasil purifikasi dan 10 μL HiDi formamide dari *Applied Biosystem* ke dalam sumur sequencing plate yang sesuai.

Analisis sekuensing dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak *Sequencing analysis*. Pemetaan virus dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak *Health Mapper* sedangkan proses pengeditan nukleotida, klasifikasi genotipe, dan *phylogenetic tree* menggunakan perangkat lunak MEGA6.

Hasil

Selama tahun 2011–2013 diperiksa sebanyak 251 bahan pemeriksaan urin dari tersangka penderita penyakit campak di Provinsi Jawa Barat. Pemeriksaan dilakukan melalui tahap pengolahan urin, isolasi pada sel Vero, PCR, sekuensing, dan analisis hasil sekuensing dengan perangkat lunak *sequencing analysis*, MEGA6, dan *Health Mapper*. Hasil dari



pemeriksaan PCR rubela dapat dilihat pada Gambar 1 sedangkan perbedaan nukleotida genotipe 1Edan2B dapat dilihat pada Gambar 2.

Pembahasan

Sebanyak 24 dari 26 kabupaten/kota yang

berada di Provinsi Jawa Barat mengirimkan sampel urin ke laboratorium selama periode tahun 2011–2013. Sebanyak 32 (12,7%) dari 251 sampel urin dinyatakan positif rubela. Hasil PCR menunjukkan beberapa sampel positif dengan ukuran produk yang sama yaitu 180 pb (Gambar 1).⁹ PCR digunakan hanya

[illegible]

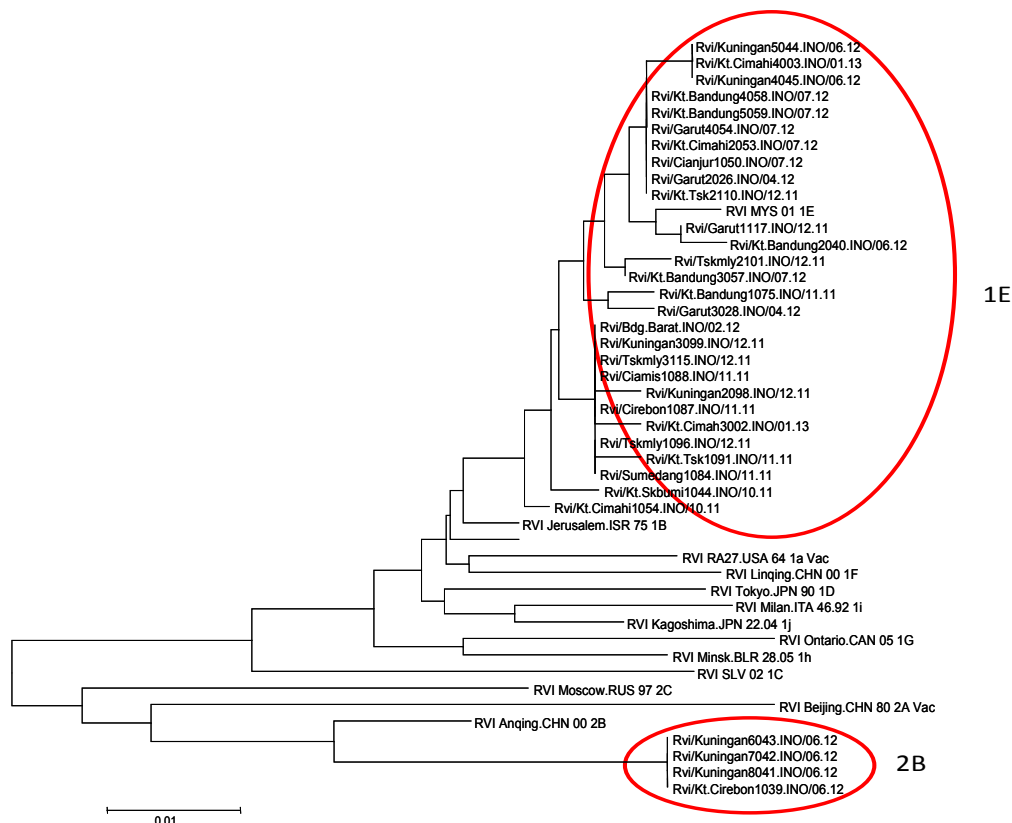


Gambar 3 Sebaran dan Genotipe Rubela di Jawa Barat

untuk identifikasi kualitatif suatu sampel dinyatakan positif atau tidak. Pada identifikasi genotipe dilakukan uji sekuensing dengan melihat beberapa perubahan nukleotida yang

dapat dilihat pada Gambar 2.

Sampel positif berasal dari 13 kabupaten/kota di Jawa Barat yaitu Kabupaten Bandung Barat, Ciamis, Cianjur, Cirebon, Garut,



Gambar 4 *Phylogenetic Tree* Genotipe Virus Rubela di Jawa Barat

Kuningan, Sumedang, Tasikmalaya, Kota Bandung, Kota Cimahi, Kota Cirebon, Kota Sukabumi, dan Kota Tasikmalaya. Sampel positif terutama berasal dari Kabupaten Kuningan, Garut, Kota Bandung, dan Kota Cimahi. Hal ini berkaitan dengan banyaknya kejadian luar biasa (KLB) yang dilaporkan di daerah tersebut.⁹

Pada Gambar 3 ditunjukkan penyebaran rubela terutama terjadi di wilayah Jawa Barat bagian Tengah dan Timur (Kota Bandung, Kota Cimahi, Garut, Tasikmalaya, Kota Tasikmalaya, Kuningan, dan Cirebon). Jika pembagian didasarkan pada wilayah rural dan urban maka kondisi penyebaran rubela di Jawa Barat dianggap tidak ada perbedaan yang jelas, hal ini sejalan dengan penelitian Al-Shereef¹⁰ dan Ouyahia¹¹ yang menyatakan tidak terdapat perbedaan penyebaran rubela antara daerah urban dan rural. Perlu perhatian dari pemerintah untuk mencegah penyebaran rubela ke daerah lain yang memiliki kondisi sama. Penyebaran rubela di daerah tertentu seperti ini perlu pencegahan melalui tindakan vaksinasi sebagai prioritas.

Analisis pada genotipe rubela dilakukan berdasarkan kandungan nukleotida pada gen E1 (nukleotida ke 8291–9469).^{12,13} Genotipe virus rubela yang menyebar di Jawa Barat sebagian besar adalah genotipe 1E sebanyak 28 kasus (87,5%), sedangkan sisanya 4 kasus (12,5%) merupakan genotipe 2B seperti yang terlihat pada Gambar 4. Berdasarkan penelitian Zheng¹⁴, Abernathy², dan laporan dari WHO⁸, Indonesia hanya memiliki satu genotipe sampai tahun 2010, yaitu 1E. Pada penelitian ini diperoleh hasil genotipe 2B di Kabupaten Kuningan dan Kota Cirebon tahun 2012.

Berdasarkan galur keturunan, genotipe virus rubela yang menyebar di Jawa Barat berasal dari dua kelompok, yaitu genotipe 1E yang galurnya sejenis dengan galur di Malaysia (RVI/MYS/01) dan genotipe 2B yang memiliki jenis yang sama dengan galur dari Anqing, China (RVI/ANKING.CHN/00).

Genotipe 1E dan 2B merupakan genotipe yang paling banyak menyebar di seluruh dunia.¹⁵ Genotipe 1E paling dominan di China sejak ditemukan tahun 2001.^{16,17} Penyebaran virus saat ini sudah lintas batas karena mudahnya transportasi antar negara termasuk ke China dan Malaysia. Identifikasi genotipe masing-masing negara penting untuk menyatakan status negara sudah berhasil mengeliminasi genotipe tertentu dengan tidak ditemukan lagi genotipe yang biasa bersirkulasi di negara tersebut. Dengan kata lain untuk memastikan apakah virus yang ditemukan di suatu negara merupakan virus indigenous atau importasi.

Simpulan

Virus rubela menyebar di 50% kabupaten/kota yang ada di Jawa Barat selama tahun 2011–2013. Penyebaran terutama di Jawa Barat bagian tengah dan timur. Genotipe virus rubela yang ditemukan di Jawa Barat adalah 1E dan 2B. Genotipe 2B merupakan genotipe baru yang ditemukan tahun 2012 dan menyebar di Kabupaten Kuningan dan Kota Cirebon. Penelitian lebih lanjut mengenai faktor risiko, luas penyebaran virus rubela, dan surveilans CRS di wilayah endemis diperlukan untuk melakukan tindakan pencegahan yang efektif.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada PT Bio Farma Bandung dan Dinas Kesehatan Kabupaten/Kota dan Provinsi Jawa Barat yang telah membantu penyelesaian artikel ini.

Daftar Pustaka

1. WHO. The immunological basis for immunization series: modul 11: rubella. Geneva: Dept. Immunization, Vaccine and Biological; 2008.
2. Albernathy ES, Hubschen JM, Muller CP,

- Jin L, Brown D, Komase K, et al. Status of global virologic surveillance for rubella viruses. *J Infect Dis.* 2011;204(Suppl 1):S524–32. doi: 10.1093/infdis/jir099.
3. Castillo-Solorzano C, Marsigli C, Bravo-Alcantara P, Flannery B, Matus CR, Tambini G, et al. Elimination of rubella and congenital rubella syndrome in the Americas. *J Infect Dis.* 2011;204(Suppl 2):271–78. doi: 10.1093/infdis/jir472
 4. WHO. Status report on progress towards measles and rubella elimination. SAGE Working Group on Measles and Rubella. Geneva: Dept of IVB, WHO; 2013.
 5. CDC. Epidemiology and prevention of vaccine-preventable diseases, the pink book. Chapter 19: Rubella. Edisi ke-12. Atlanta: CDC; 2012.
 6. Ditjen P2MPL. Petunjuk teknis surveilans campak. Jakarta: Depkes RI; 2008.
 7. Rota PA, Brown KE, Hubschen JM, Muller CP, Icenogle J, Chen MH, et al. Improving global virologic surveillance for measles and rubella. *J Infect Dis.* 2011;204(Supl 1):506–13. doi: 10.1093/infdis/jir117.
 8. SEARO WHO. Protocols for molecular epidemiology of measles virus and rubella virus. Bangkok: NIH; 2010.
 9. Bio Farma. Laporan tahunan Divisi Surveilans dan Uji Klinis. Bandung: PT. Bio Farma (Persero); 2012.
 10. Al-Sheref F, Jefri OH, El-Sayed Z. Seroprevalence of rubella among pregnant woman and young females. *Egyptian J Med Microbiol.* 2010;19(1):119–28.
 11. Ouyahia A, Segueni A, Laouamri S, Touabti A, Lacheheb A. Seroprevalence of rubella among woman of childbearing age in Algeria. Is there a need for a rubella vaccination?. *Int J Publ Health Epid.* 2013;2(1):56–9.
 12. Zhou Y, Ushijima H, Frey TK. Genomic analysis of diverse rubella virus genotype. *J General Virol.* 2006;88(3):932–41. doi: 10.1099/vir.0.82495-0
 13. Cloete LJ, Tanov EP, Muhire BM, Martin DP, Harkins GW. The influence of secondary structure, selection and recombination on rubella virus nucleotide substitution rate estimates. *Virol J.* 2014;11(166):1–12. doi: 10.1186/1743-422X-11-166.
 14. Zheng DP, Frey TP, Icegnole J, Kato S, Abernathy S, Song K, et al. Global distribution of rubella virus genotypes. *Emerging Infec Dis.* 2003;9(12):1523–30. doi: 10.3201/eid0912.030242
 15. Padhi A, Ma L. Molecular evolutionary and epidemiological dynamics of genotypes 1G and 2B of rubella virus. *PLoS One.* 2014;9(10):1–7. doi: 10.1371/journal.pone.0110082.
 16. Zhu Z, Ciu A, Wang H, Zhang Y, Liu C, Wang C, et al. Emergence and continuous evolution of genotype 1E rubella viruses in China. *J Clin Microbiol.* 2012;50(2):353–63. doi: 10.1128/JCM.01264-11.
 17. Chen M, Zhu Z, Liu D, Huang G, Huang F, Wu J, et al. Rubella epidemic caused by genotype 1E rubella viruses in Beijing, China, in 2007–2011. *Virol J.* 2013;10:122. doi: 10.1186/1743-422X-10-122.