

DETEKSI VIRUS *AFRICAN SWINE FEVER* (ASF) PADA SAMPEL ORGAN BABI MENGGUNAKAN RT-PCR: ARTIKEL REVIEW

Afta Daniel Zato Waruwu¹, Garry Ganvis Jonteo Hani², I Gede Widhiantara³

^{1,2,3}Program Studi Biologi, Fakultas Kesehatan dan Sains, Universitas Dhyana Pura, Jl. Raya Padang Luwih Tegaljaya Dalung Kuta Utara, Bali, Indonesia
Email: 20121301016@undhirabali.ac.id

ABSTRAK

Artikel ini bertujuan untuk mengevaluasi efektivitas metode Real-time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) dalam mendeteksi virus African Swine Fever (ASF) pada sampel organ babi. Metode RT-PCR digunakan untuk deteksi cepat dan akurat, memungkinkan pengambilan tindakan pencegahan yang efektif terhadap penyebaran virus ASF. Penelitian ini menjelaskan prosedur pengujian RT-PCR, termasuk preparasi sampel, ekstraksi RNA, pembuatan master mix, penambahan template, dan amplifikasi. Hasil interpretasi RT-PCR didasarkan pada nilai Cycle threshold (Ct) yang mengindikasikan jumlah target virus dalam sampel. Kurva amplifikasi juga digunakan untuk menentukan keberhasilan amplifikasi dalam thermal cycler. Diharapkan metode RT-PCR dapat membantu dalam pencegahan penyebaran virus ASF.

Kata kunci: ASF, RT-PCR, deteksi virus, babi, pencegahan.

1. Pendahuluan

African Swine Fever (ASF) adalah penyakit virus yang sangat menular yang menyerang babi domestik dan liar. Penyakit ini disebabkan oleh *African Swine Fever Virus* (ASFV), yang dapat bertahan dalam jangka waktu lama di lingkungan dan dapat ditularkan melalui kontak langsung dengan babi yang terinfeksi, pakan yang terkontaminasi, dan benda-benda yang terkontaminasi. ASF mempunyai dampak yang signifikan terhadap industri babi, menyebabkan tingginya angka kematian dan kerugian ekonomi (Djawapatty *et al.*, 2022). Di Indonesia, ASF pertama kali dilaporkan pada tahun 2019 dan kini telah menyebar ke beberapa provinsi (Sendow *et al.*, 2020).

Sebuah penelitian yang dilakukan di Kota Kupang, Nusa Tenggara Timur (NTT), menunjukkan bahwa kasus ASF telah terkonfirmasi di Pulau Timor, termasuk di wilayah Kota Kupang. Penelitian ini melakukan analisis nukleotida dan homologi sekuens fragmen gen p72 (B646L) virus ASF asal Kota Kupang. Hasil analisis menunjukkan tingkat homologi yang tinggi antara fragmen gen ASFV p72 (B646L) dari Kota Kupang dengan fragmen gen dari Jawa Barat, Sumatera Utara, dan beberapa negara Asia lainnya (Sanam *et al.*, 2022). Penelitian lain dilakukan di

Regional VI Pusat Penyidikan Penyakit Denpasar Bali. Penelitian ini mencakup tiga provinsi di Indonesia, termasuk Bali, Nusa Tenggara Barat, dan Nusa Tenggara Timur. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sekitar 3.4% dari sampel darah babi di Bali dan Nusa Tenggara Timur positif terinfeksi virus ASF. Sementara itu, virus tidak terdeteksi di Nusa Tenggara Barat (Tenaya et al., 2023)

African Swine Fever (ASF) merupakan penyakit viral hemoragik yang sangat menular pada babi dan babi liar, menyebabkan kerugian ekonomi bagi peternakan skala kecil dan besar. Penyebaran virus ASF yang sangat cepat mengakibatkan tingkat kematian babi yang tinggi. Pesatnya penyebaran virus ini telah menimbulkan kerugian ekonomi yang cukup besar dan menimbulkan ketakutan di kalangan masyarakat untuk mengonsumsi daging babi dan produk babi lainnya. Dampak ASF terhadap perekonomian Indonesia sangat besar, karena industri peternakan babi merupakan sumber pendapatan dan lapangan kerja yang penting. Wabah ini telah menyebabkan penurunan produksi dan konsumsi daging babi, yang berdampak pada harga daging babi dan produk babi lainnya. Pemerintah telah menerapkan langkah-langkah untuk mencegah penyebaran virus, seperti mengendalikan pergerakan ternak babi dan produk hewani ilegal, namun dampak ekonomi dari wabah ini masih terasa (Djawapatty et al., 2022).

Dari beberapa penelitian tersebut diatas, dapat disimpulkan bahwa virus ASF telah menyebar di beberapa wilayah di Indonesia, termasuk di Pulau Timor dan Bali. Pencegahan penyebaran virus ASF memerlukan langkah-langkah biosekuriti yang ketat. Salah satu upaya yang dapat dilakukan dalam membantu pencegahan penyebaran virus ini adalah dengan penggunaan Real-time PCR dengan memberikan deteksi yang cepat dan akurat, sehingga memungkinkan untuk mengambil tindakan pencegahan yang efektif. Real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan salah satu metode yang sangat sensitif dan spesifik untuk mendeteksi virus ASF. Mesin Real-time PCR memungkinkan deteksi cepat dan akurat dari materi genetik virus ASF dalam sampel babi (Kurniawati et al., 2019).

Real-time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) adalah metode bioteknologi yang digunakan untuk mengamplifikasi (menggandakan) sejumlah kecil fragmen DNA menjadi jumlah yang cukup besar untuk analisis lebih lanjut termasuk ASF. RT-PCR dapat mendeteksi virus pada berbagai sampel, termasuk sampel darah, serum, dan jaringan (Laisnima et al., 2023).. Untuk itu ulasan artikel ini menekankan pada bagaimana proses mesin real-time PCR dalam melakukan deteksi dini virus ASF secara cepat sehingga dapat diambil tindakan pencegahan selanjutnya yang efektif.

2. Metode

Metode yang digunakan dalam penulisan artikel ini adalah dengan metode literature review melalui studi pustaka secara online. Pustaka dikaji dengan literatur artikel penelitian maupun artikel review yang dipublikasikan selama tahun 2013 sampai 2023, dengan 70% sumber dari lima tahun terakhir. Penulis melakukan pencarian artikel melalui Google Scholar dan textbook menggunakan kata kunci "*African Swine Fever (ASF)*", "*Real-time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)*", dan "sampel organ babi". Artikel yang dipilih berupa jurnal penelitian, jurnal review yang terfokus pada RT-PCR, ASF, amplifikasi, dan ct (*cycle threshold*). Pencarian literatur dibatasi pada publikasi jurnal bereputasi. Total 17 artikel yang dimasukkan ke dalam review ini.

3. Hasil dan Pembahasan

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam pengujian *Real Time* PCR adalah Mikropipet, tube, PCR Cabinet (Esco), BioSafety Cabinet (Kojair), Sentrifuge (Hermle Z 233 MK-2), Vortex (Maxi Mix II Barnstead Thermolyne), Spindown (Hermle Z 100 M), Thermocycler (9700 Gene Amp, Applied Biosystems), mesin realtime PCR Motor-Gene Q (Qiagen, Germany). Bahan yang digunakan dalam pengujian *Real Time* PCR adalah sampel organ babi, primer, PCR Reaction/master mix, kontrol positif (dari sampel sebelumnya yang positif ASF), dan kontrol negatif berupa RNase Free Water (Waluyo *et al.*, 2023)

Prosedur Pengujian

Prosedur pengujian mesin Real-Time PCR pada deteksi virus ASF (*African Swine Fever*) dapat dilakukan dengan mengikuti langkah-langkah sebagai berikut:

A. Preparasi Sampel

Preparasi dikerjakan di dalam BSC Class II, dengan spesimen berupa organ yang diduga mengandung virus ASF. Kemudian, organ dipotong kecil-kecil sebanyak kurang lebih 1 gram ditempatkan dalam mortar steril kemudian digerus menggunakan pastel steril hingga halus untuk dibuat menjadi suspensi 10% (m/v) homogen dengan 9 ml larutan PBS steril. Kemudian dituang ke dalam tabung 10 ml steril. Setelah itu, suspensi homogenate organ 10% (m/v) disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit dan cairan supernatan dipisahkan dari pelletnya dan ditempatkan dalam tabung steril untuk diekstraksi dengan kit yang digunakan (Arimurti, *et al.*, 2021).

B. Ekstraksi RNA

Ekstraksi RNA virus ASF dilakukan dengan menggunakan master mix invitrogen sesuai dengan prosedur pembuat kit. Secara ringkas sebagai berikut:

Siapkan Carrier RNA terlebih dahulu dengan mencampurkan 310 μ L RNase Free Water kedalam 310 μ L lypolized carrier RNA kemudian di aliquot 20 μ L/tabung. Komposisi setiap 1 sampel RNA berisi 0,21 ml lysis buffer dan 5,88 μ L carrier RNA. Setelah Carrier RNA siap, mix 200 μ L lysis buffer (yang telah ditambahkan carrier RNA) dengan 200 μ L specimen dan 25 μ L proteinase K. Vortex dan inkubasi di suhu 56 °C selama 15 menit kemudian spin beberapa detik. Tambahkan 250 μ L etanol absolute, inkubasi 5 menit di suhu ruang kemudian vortex dan spin. Transfer dalam spin kolom lalu sentrifuse 8000 rpm selama 1 menit. Ganti collection tube/buang supernatant dan tambahkan 500 μ L washing buffer kemudian sentrifuse 8000 rpm selama 1 menit. Ulangi sebanyak 2x dengan kecepatan sentrifuse terakhir yaitu 14.000 rpm kemudian ganti collection tube dengan 1,5 ml recovery tube lalu tambahkan 50 μ L RNase Free Water kemudian inkubasi selama 1 menit pada suhu ruang. Sentrifuse 14.000 rpm selama 1 menit, dan RNA total siap digunakan (BBVET, 2022; Musdalifa *et al.*, 2020).

C. Master mix

Adapun tahapan master mix yaitu terlebih dahulu siapkan bahan yaitu reagen : enzim polymerase sampel 1 μ L, primer forward 1 μ L, primer reverse 1 μ L, probe 1 μ L, free water 3,5 μ L dan X reaction buffer 12,5 μ L (volume per sampel). Kemudian, siapkan reagen mastermix sesuai dengan pengujian yang akan dilakukan. Volume total untuk 1 reaksi pengujian adalah 25 μ L (20 μ L Mastermix + 5 μ L RNA). Untuk pengujian dengan $n > 1$ reaksi dengan mengalikan masing-masing komponen mastermix dengan jumlah reaksi yg dibutuhkan kemudian dialiquot masing-masing sesuai dengan jumlah reaksi. Dalam setiap reaksi pengujian harus menyertakan sekurang-kurangnya 1 (satu) control positif, 1 (satu) kontrol negative dan NTC (*No Template Control*) (Helmi *et al.*, 2014).

D. Template

Adapun tahapan template yaitu penambahan RNA virus yang sudah jadi 5 μ L per sampel kedalam lubang uji pada satu tube. Untuk kontrol tanpa template (NTC) tidak dimasukkan RNA sama sekali (Muararif, 2015).

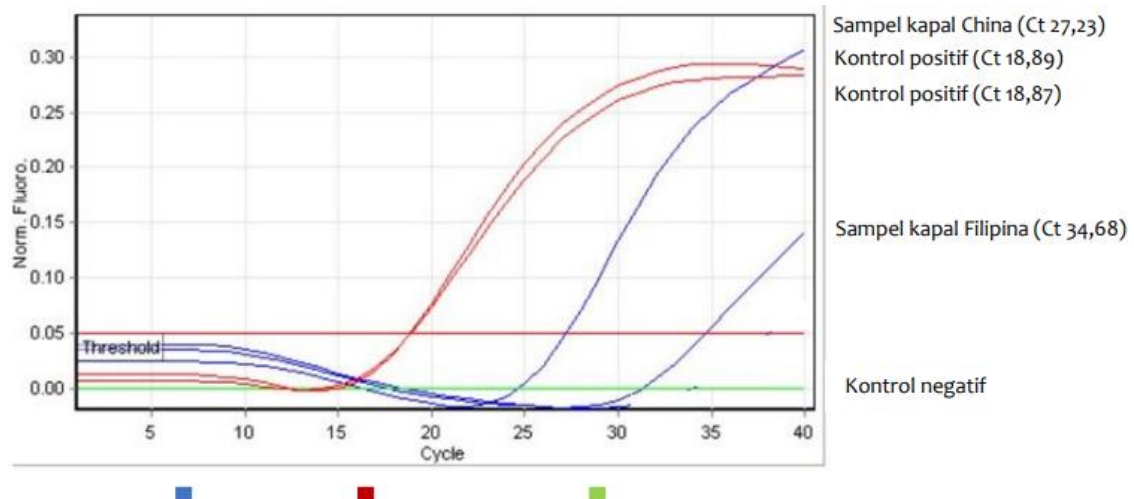
E. Amplifikasi

Jalankan pengujian dengan mesin *real-time* PCR dengan memasukkan tube hasil template pada ring RT-PCR . Kemudian tabung PCR tersebut dimasukan ke dalam mesin realtime PCR *Rotor-Gene Q* (*Qiagen, Germany*), yang telah diprogram

dengan kondisi suhu: 1) Sintesis cDNA 45°C selama 10 menit, 2) Pre-denaturasi 95°C selama 10 menit dan dilanjutkan 45 kali siklus program dengan kondisi 1) denaturasi 95°C selama 15 detik, 2) annealing 60°C selama 45 detik dan 3) extention/elongasi 72°C selama satu menit. Hasil amplifikasi dibaca oleh mesin komputer dan ditampilkan dalam bentuk pola grafik (Martinez *et al.*, 2021).

F. Interpretasi hasil

Interpretasi hasil *Real-Time* PCR dilakukan dengan mengamati *Result* yang menampilkan data detektor dan *Cycle threshold* (*Ct*). *Cycle threshold* (*Ct*) adalah siklus *fluorescence* yang dihasilkan dari reaksi yang memotong garis *threshold* dan kemudian juga dilihat data report dan *Amplification Plot* (AP) untuk mengamati hasil running *Real-Time* PCR. Uji *Real-Time* PCR dinyatakan valid, jika *Ct* value kontrol positif kurang dari 40 dan control negatif tidak memiliki karakter curve yang sama dengan kontrol positif. Bila *Ct* value dari sampel yang diuji bernilai kurang dari 25, dinyatakan positif kuat. (OIE, 2021).



Gambar 1. Plot amplifikasi real-time PCR pada sampel uji positif deteksi virus African Swine Fever dari sampah makanan kapal laut internasional di Pelabuhan Tanjung Priok (Arimurti, *et al.*, 2021).

Hasil pengujian real-time PCR dari deteksi virus African Swine Fever dari sampah makanan kapal laut internasional di Pelabuhan Tanjung Priok sebanyak 2 sampel positif mengandung virus ASF. Sampel positif berasal dari kapal China dan kapal Filipina. Nilai ct pada sampel positif dari kapal China adalah 27,23 dan dari kapal Filipina adalah 34,68 (Arimurti, *et al.*, 2021).

Interpretasi dilihat berdasarkan nilai *Ct* (*cycle threshold*) yang dihasilkan pada plot amplifikasi *cycle threshold*. Hasil positif ditunjukkan jika sampel uji mempunyai nilai *Ct* < 40, sedangkan hasil negatif ditunjukkan dengan nilai *Ct* > 45, dan jika

terdapat nilai Ct antara < 40 sampai dengan >45 , maka pengujian diulang atau tidak dapat ditentukan (Arimurti *et al.*, 2021). Nilai Ct (*Cycle Threshold*) pada hasil uji RT-PCR dapat digunakan untuk memperoleh informasi tentang jumlah target molekul DNA yang ada dalam sampel. Nilai Ct yang rendah menandakan adanya jumlah target yang tinggi, sedangkan nilai Ct yang tinggi menandakan adanya jumlah target yang rendah. Namun, hubungan antara nilai Ct dan jumlah target tidak selalu bersifat absolut (Astuti, 2022).

Kurva amplifikasi berfungsi untuk menentukan apakah terjadi amplifikasi dalam *thermal cycler* yang digunakan yaitu berdasarkan intensitas dari *fluorescent*, yaitu jika semakin banyak produk amplifikasi yang dihasilkan, maka semakin besar pula akumulasi *fluorescent* yang akan terbaca (Susilowati, 2020). PCR *real-time* bekerja dengan mendeteksi sinyal fluoresensi yang dihasilkan selama amplifikasi gen target. Sinyal fluoresensi meningkat seiring dengan meningkatnya jumlah salinan gen target selama reaksi PCR. Hasil PCR *real-time* ditampilkan sebagai kurva eksponensial pada perangkat lunak komputer, dimana sumbu Y mewakili jumlah sinyal fluoresensi yang terdeteksi, dan sumbu X mewakili jumlah siklus PCR (Zuraeda, 2018).

Kenaikan kurva amplifikasi pada analisis real time PCR menandakan kenaikan konsentrasi DNA, semakin banyak DNA yang terbentuk semakin tinggi pula intensitas fluoresen yang dihasilkan. Nilai Ct < 30 menunjukkan konsentrasi DNA yang tinggi sehingga dinyatakan sebagai sampel positif yang sangat kuat (Arimurti *et al.*, 2021). Hasil negatif menunjukkan bahwa tidak ada kenaikan kurva amplifikasi pada analisis *real-time* PCR. Hal ini dapat disebabkan oleh beberapa faktor, seperti: sampel yang diuji tidak mengandung target molekul DNA yang spesifik yang ditargetkan oleh primer dan probe pada reaksi PCR, konsentrasi target molekul DNA dalam sampel terlalu rendah untuk dideteksi oleh metode *real-time* PCR, atau terdapat kesalahan dalam proses pengambilan, pengolahan, atau penyimpanan sampel yang mengakibatkan hilangnya atau kerusakan target molekul DNA sebelum uji dilakukan (Susilowati, 2020).

4. Simpulan

Metode Real-time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) efektif digunakan untuk mendeteksi virus African Swine Fever (ASF) pada sampel organ babi. Metode ini memungkinkan deteksi yang cepat dan akurat, sehingga tindakan pencegahan terhadap penyebaran virus ASF dapat diambil dengan efektif.

5. Daftar Rujukan

- Arimurti, P.I., Basri, C. and Lukman, D.W., 2021. Deteksi virus african swine fever dari sampah makanan kapal laut internasional di Pelabuhan Tanjung Priok. *Acta VETERINARIA Indonesiana*, 9(2), pp.112-119.
- Astuti, P., 2022. Analisis Gen ORF dan Gen N Pada Pasien Terkonfirmasi Covid19 Kategori Positif Tinggi di Kalimantan Barat. *Jurnal Vokasi Kesehatan*, 7(1), pp.7-12.
- BBVET, 2022. BBVET LAPORAN TAHUNAN 2022.
- Djawapatty, D.J., Rembo, E. and Puspita, V.A., 2022. Pencegahan Penyebaran Virus African Swine Fever (ASF) di Desa Turaloa Kecamatan Wolomeze Kabupaten Ngada. *Dedikasi Sains dan Teknologi (DST)*, 2(1), pp.53-59.
- Helmi, T.Z., Widayanti, R., & Haryanto, A. (2014). PENENTUAN SUBTIPE VIRUS AVIAN INFLUENZA DENGAN METODE SINGLE STEP MULTIPLEX REVERSE TRANSCRIPTASE- POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-PCR) ISOLAT ASAL PROVINSI ACEH. *Jurnal Kedokteran Hewan*, 8.
- Kurniawati, M.D., Sumaryam, S. and Hayati, I.N., 2019. Aplikasi polymerase chain reaction (PCR) konvensional dan real time-pcr untuk deteksi virus vnn (viral nervous necrosis) pada ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*). *Techno-Fish*, 3(1), pp.19-30.
- Laisnima, V.P.K.P., Rahayu, N.R. and Cahya, N.A.D.A., 2023. Analisis Risiko Kualitatif Pemasukan Produk Olahan Daging Babi (Daging Se'i) Dari Kupang Ke Ambon Terkait African Swine Fever Melalui Bandar Udara Pattimura Ambon. *Kalwedo Sains*, 4(1), pp.43-55.
- Martinez, N.W.I., Kencana, G.A.Y. and Dibia, I.N., 2021. Deteksi Virus Avian Influenza Subtipe H5N1 pada Itik di Pasar Hewan Beringkit dan Pasar Galiran, Bali. *Jurnal Veteriner September*, 22(3), pp.442-449.
- Muararif, S. (2015). DETEKSI VIRUS AVIAN INFLUENZA H5N1 PADA AYAM PETELUR (LAYER) DI KABUPATEN ACEH BESAR DENGAN METODE RT-PCR (REVERSE TRANSCRIPTASE-POLYMERASE CHAIN REACTION).
- Musdalifa, A., Kencana, G.A.Y., Suartha, I.N., 2020. Deteksi Antigen Virus *Avian Influenza* pada Ayam Kampung di Pasar Hewan Beringkit dan Pasar Umum Galiran, Bali. *Indones. Med. Veterinus* 9, 757-772.
- OIE, 2021. OIE updates on Avian Influenza - 2021.
- Sanam, M.U., Gelolodo, M.A. and Toha, L.R., 2022. Analisis Nukleotida dan Homologi Sekuens Fragmen Gen p72 (B646L) Virus African Swine Fever Virus (ASF) Asal Kota Kupang. *Jurnal Kajian Veteriner*, 10(2), pp.165-175.

- Sendow, I., Ratnawati, A., Dharmayanti, N.L.P. and Saepulloh, M., 2020. African Swine Fever: Penyakit Emerging yang Mengancam Peternakan Babi di Dunia. *Indonesian Bulletin of Animal and Veterinary Sciences*, 30(1), p.15.
- Susilowati, T., 2020. Deteksi Kontaminan DNA Babi Pada Sampel Penggilingan Daging Di Pasar Surya Kota Surabaya Menggunakan Real-Time Polymerase Chain Reaction (Doctoral dissertation, Thesis. <https://digilib.uinsby.ac.id>. Accessed on 20th of September).
- Tenaya, W.M., Swacita, I.B.N., Wirata, K., Damriyasa, M., Besung, N.K., Suarsana, N., Sari, T.K. and Agustina, K.K., 2023. A study of African swine fever virus in Regional VI of the Disease Investigation Center of Denpasar Bali in Indonesia. *Veterinary World*, 16(4), p.844.
- Waluyo, S., Malau, J., Raekiansyah, M., Yulian, E., & Hardiman, I. (2023). Deteksi dan Kuantifikasi Cemarkan Babi pada Sampel Olahan Daging Menggunakan Real-time PCR. *Al-Kauniyah: Jurnal Biologi*.
- Zuraeda, K., 2018. Analisis cemarkan daging babi pada produk bakso sapi yang beredar di Kecamatan Ciputat Timur menggunakan Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) (Bachelor's thesis, Jakarta: Fakultas Ilmu Kesehatan UIN Syarif Hidayatullah).