

PENGUJIAN RT-PCR KONVENSIONAL UNTUK DETEKSI VIRUS AVIAN INFLUENZA

Trio Satrio Tomo P, Inggarsetya Syah Audini, Nur Sabiq Assadah, Warni Puspa Kemala
Balai Besar Pengujian Standar Instrumen Veteriner

PENDAHULUAN

Penyakit *Avian Influenza* (AI) yang disebut juga dengan Flu Burung merupakan penyakit menular yang disebabkan oleh virus *avian influenza A*. Virus ini berasal dari family *Orthomyxoviridae* dengan diameter 80-120 nm dan panjang 200-300 nm. Virus ini memiliki amplop dengan lipid bilayer dan dikelilingi sekitar 500 tonjolan glikoprotein.

Virus AI dibedakan atas 3 tipe antigenik berbeda, yakni tipe A, B dan C. Tipe A ditemukan pada unggas, manusia, babi, kuda dan mamalia, sedangkan tipe B dan C hanya ditemukan pada manusia. Virus AI tipe A tersusun atas 8 segmen gen yang memberikan 10 sandi protein.

Protein HA dan NA merupakan protein terpenting dalam menimbulkan respon imun serta berperan sebagai penentu subtipe virus AI. Berdasarkan perbedaan genetik antar virus AI, saat ini telah diketahui adanya 16 subtipe hemaglutinin (H1-16) dan 9 subtipe neuraminidase (N1-9).

Virus AI dikenal sebagai virus yang mudah mengalami mutasi, yaitu perubahan nukleotida atau asam amino di dalam gen. berdasarkan patotipenya virus AI dibedakan menjadi *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) dan *Low Pathogenic Avian Influenza* (LPAI).

Di Indonesia *Avian Influenza* mewabah sejak pertengahan tahun 2003. Selain menyerang unggas, virus AI juga mampu menginfeksi manusia. Saat ini sesuai dengan *Influenza Monitoring* di Indonesia mayoritas virus HPAI H5N1 di koleksi dari akhir tahun 2021 hingga awal tahun 2024 dengan clade 2.3.2.1c dan LPAI H9N2 dengan clade Y280.

HPAI H5N1 clade 2.3.2.1c secara terus menerus berevolusi menghasilkan 2 silsilah yaitu 2.3.2.1c-i dan clade 2.3.2.1c-ii dengan rata rata jarak antigenic 2.5 Log₂ HI terhadap 2017-H5N1 *Vaccine Straine*. *Antigenic Cartography* secara periodik dilakukan untuk melihat perubahan genetik yang berpengaruh terhadap virus AI. Saat ini terdapat H5N1 clade 2.3.4.4b and H9N2 clade Y439 yang dideteksi di tahun 2022. Sampai saat ini virus tersebut hanya dideteksi pada bebek di area terbatas yaitu Kalimantan Selatan dan Sulawesi Selatan.

Salah satu metode pengujian untuk deteksi Virus AI adalah dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). PCR merupakan metode perbanyakan jumlah DNA secara *in vitro* didalam suatu daerah spesifik dan dibatasi oleh primer tertentu menggunakan sistem enzimatik dan suhu.

Jenis PCR yang kerap digunakan dalam diagnosa virus RNA adalah *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR), yang merupakan metode analisis terhadap molekul RNA yang telah melalui proses transkripsi balik (*reverse transkriptase*) dimana molekul RNA diubah menjadi molekul cDNA (complementary DNA).

PCR Konvensional dilanjutkan dengan analisa hasil produk menggunakan elektroforesis dimana akan terjadi pemisahan molekul berdasarkan ukuran, berat dan muatan listrik molekul tersebut.

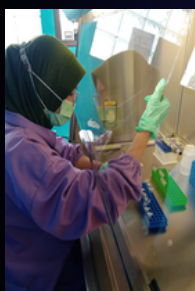
Laboratorium BBPSI Veteriner telah terakreditasi SNI ISO/IEC 17025:2017 sebagai laboratorium pengujian veteriner dengan nomor LP-121 IDN. Pengujian yang telah terakreditasi di Laboratorium Virologi salah satunya ialah *Polymerase Chain Reaction* (PCR) untuk diagnosa virus Avian Influenza.

METODE PEMERIKSAAN

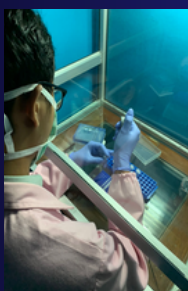
Metode pengujian RT-PCR terbagi menjadi tiga tahapan yaitu:

a. Ekstraksi dan *mastermix*

Ekstraksi adalah tahap awal molekuler untuk memisahkan DNA/RNA. Terjadi pelepasan untaian materi genetik dari inti sel sehingga didapatkan DNA/RNA murni yang telah terpisah dari cairan seluler dan protein lainnya dalam proses metode ekstraksi DNA/RNA. Sedangkan *mastermix* merupakan campuran reaksi yang digunakan dalam teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) untuk mempercepat dan menyederhanakan proses amplifikasi DNA/RNA. *Mastermix* mengandung berbagai komponen yang diperlukan untuk melakukan PCR.



Proses ekstraksi dilakukan di BSC



Proses adding template, yaitu mencampurkan hasil ekstraksi sampel dengan mastermix



Proses memasukkan amplicon ke dalam gel elektroforesis, dilanjutkan dengan proses elektroforesis.

Salah satu metode pengujian untuk deteksi Virus AI adalah dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). PCR merupakan metode perbanyakan jumlah DNA secara *in vitro* didalam suatu daerah spesifik dan dibatasi oleh primer tertentu menggunakan sistem enzimatik dan suhu.

Jenis PCR yang kerap digunakan dalam diagnosa virus RNA adalah *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR), yang merupakan metode analisis terhadap molekul RNA yang telah melalui proses transkripsi balik (*reverse transkriptase*) dimana molekul RNA diubah menjadi molekul cDNA (*complementary DNA*).

PCR Konvensional dilanjutkan dengan analisa hasil produk menggunakan elektroforesis dimana akan terjadi pemisahan molekul berdasarkan ukuran, berat dan muatan listrik molekul tersebut.

Laboratorium BBPSI Veteriner telah terakreditasi SNI ISO/IEC 17025:2017 sebagai laboratorium pengujian veteriner dengan nomor LP-121 IDN. Pengujian yang telah terakreditasi di Laboratorium Virologi salah satunya ialah *Polymerase Chain Reaction* (PCR) untuk diagnosa virus Avian Influenza.

METODE PEMERIKSAAN

Metode pengujian RT-PCR terbagi menjadi tiga tahapan yaitu:

a. Ekstraksi dan *mastermix*

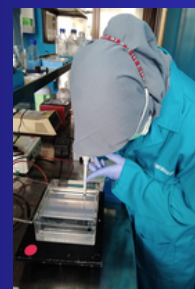
Ekstraksi adalah tahap awal molekuler untuk memisahkan DNA/RNA. Terjadi pelepasan untaian materi genetik dari inti sel sehingga didapatkan DNA/RNA murni yang telah terpisah dari cairan seluler dan protein lainnya dalam proses metode ekstraksi DNA/RNA. Sedangkan *mastermix* merupakan campuran reaksi yang digunakan dalam teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) untuk mempercepat dan menyederhanakan proses amplifikasi DNA/RNA. *Mastermix* mengandung berbagai komponen yang diperlukan untuk melakukan PCR.



Proses ekstraksi dilakukan di BSC



Proses adding template, yaitu mencampurkan hasil ekstraksi sampel dengan mastermix



Proses memasukkan amplicon ke dalam gel elektroforesis, dilanjutkan dengan proses elektroforesis.

b. PCR

Secara umum teknik PCR terbagi menjadi beberapa tahapan, tahapan PCR di mulai dari tahap *initialization* (pra-denaturasi), tahap *denaturing* (denaturasi) DNA, tahap *annealing* (penempelan primer), tahap *elongation/extension* (pemanjangan untai DNA) dan di akhiri dengan *post extension* (pemantapan). Duplikasi DNA akan terjadi di setiap siklus/tahapan berulang, tahapan berulang (siklus) terjadi dari tahap denaturasi hingga elongasi. Pengulangan reaksi PCR akan dilakukan dari tahap denaturasi hingga elongasi, pengulangan ini dapat dilakukan sebanyak 40 kali (siklus) sehingga pada akhir siklus akan didapatkan molekul-molekul DNA rantai ganda yang baru. Hasil PCR (amplikon) dapat langsung dilanjutkan ke proses selanjutnya yaitu elektroforesis atau disimpan pada suhu 4°C sampai proses elektroforesis dapat dilakukan.

c. Elektroforesis

Elektroforesis merupakan proses lanjutan dalam PCR yang bertujuan untuk memisahkan atau memigrasikan fragmen DNA dalam matriks berpori di bawah pengaruh medan listrik. Elektroforesis yang digunakan adalah elektroforesis gel, yaitu menggunakan gel agarosa. Pada tahapan ini sampel positif akan membentuk pita-pita DNA yang sesuai (sejajar panjang molekulnya) dengan panjang molekul kontrol positif, sedangkan sampel negatif tidak memunculkan pita DNA pada lajur dari sumuran sampel/ spesimen seperti pada kontrol positif.

HASIL PEMERIKSAAN

Hasil pemeriksaan RT-PCR Konvensional AI divisualisasi dengan gel agarosa melalui elektroforesis. Hasil elektroforesis ditampilkan pada (Gambar 1.) dibawah ini :

Gambar 1. Hasil Elektroforesis.

Keterangan :

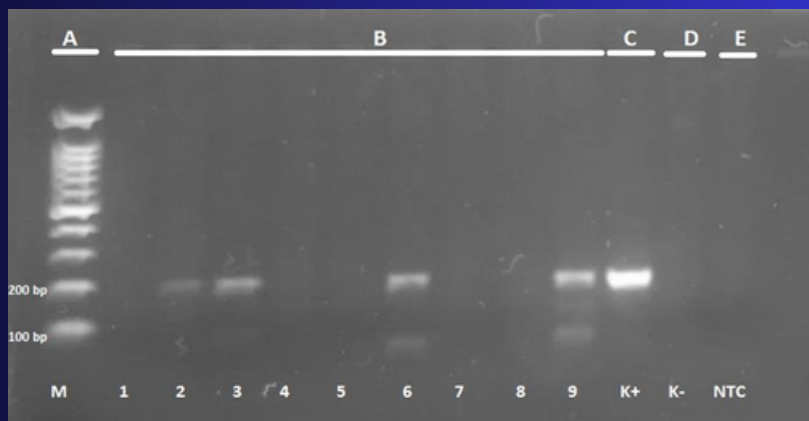
(A). Marker,

(B). Sampel,

(C). Kontrol Positif,

(D). Kontrol Negatif,

(E). No Template Control/NTC.



Hasil positif ditunjukkan dengan adanya pita/band positif sesuai dengan pita/band pada kontrol positif dengan panjang nukleotida 220 bp.

Berdasarkan (Gambar 1.) hasil positif terdapat pada sampel dengan kode (2), (3), (6) dan (9).

Sedangkan sampel dengan kode (1), (4), (5), (7) dan (8) menunjukkan tidak terdapat pita/band yang terbentuk. Pita/band yang terbentuk setelah proses elektroforesis menunjukkan adanya amplifikasi DNA pada sampel.

DAFTAR BACAAN

Kurniawati, M.D., Sumaryam., Haryati, 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*). Jurnal Techno Fish. 3(1) : 19-30.

Lee, M.S., Chang, P.S., Shien, J.H., Cheng, M.C., Shieh, H.K. 2001. *Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR*. Journal of Virological Methods. 97. 13-22.

Maftuchah., Wiyana, A., Zainudin, A. 2014. Teknik Dasar Analisis Biologi Molekuler. Yogyakarta : Deepublish.

Nugroho, E.D., dan Rahayu, D.A. 2018. Pengantar Bioteknologi (Teori dan Aplikasi). Yogyakarta : Deepublish.

OIE Terrestrial Manual. 2021. *Avian Influenza (Including Infection with High Pathogenicity Avian Influenza Viruses)*. Page 12-13.

Sogandi. 2018. Biologi Molekuler : Identifikasi Bakteri Secara Molekuler. Jakarta : Universitas 17 Agustus 1945 Jakarta.

World Health Organization. 2002. Dalam : WHO *Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance*. Department of Communicable Disease Surveillance and Response. WHO.