

Efektivitas Metode PCR dan AGID dalam Mendeteksi Penyakit *Enzootic Bovine Leucosis* di Indonesia

Saepulloh M, Sendow I

Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl. RE. Martadinata No. 30, Bogor 16114
E-mail: muharam@bbalitvet.org

(Diterima 13 Januari 2015; direvisi 3 Maret 2015; disetujui 24 Maret 2015)

ABSTRACT

Saepulloh M, Sendow I. 2015. Effectivity of PCR and AGID methods to detect of enzootic bovine leukosis in Indonesia. JITV 20(1): 71-78. DOI: <http://dx.doi.org/10.14334/jitv.v20i1.1120>

Enzootic Bovine Leucosis (EBL) is one of viral diseases in cattle caused by bovine leukemia virus (BLV), from Retroviridae. The virus can be detected using several methods such as Polymerase Chain Reaction (PCR), while antibody can be detected using Agar Gel Immunodiffusion (AGID). The aim of this experiment was to study the effectivity of PCR and AGID methods to detect enzootic bovine leukosis virus in Indonesia. Samples of peripheral blood leukocyte (PBL) were collected from cattles those with and without showing clinical signs. A total of 307 blood and serum samples were tested against BLV using PCR and AGID tests, while 21 semen samples which were from similar animals for blood collection were collected only for PCR test. The results indicated that twelve cattles have positive results with PCR test in PBL, but from those cattles only seven were positive with AGID. On the other hand, the PCR did not detect EBL in 21 bovine semen samples tested, although one sample gave positive result with PCR in PBL. This results indicated that PCR method from blood samples was more sensitive than that AGID method. The PCR detection was also more sensitive for PBL than that for semen samples.

Key Words: Enzootic Bovine Leucosis, Indonesia

ABSTRAK

Muharam S, Indrawati S. 2015. Efektivitas metode PCR dan AGID dalam mendeteksi penyakit *Enzootic Bovine Leucosis* di Indonesia. JITV 20(1): 71-78. DOI: <http://dx.doi.org/10.14334/jitv.v20i1.1120>

Enzootic Bovine Leucosis (EBL) adalah suatu penyakit virus pada sapi yang disebabkan oleh *Bovine Leukemia Virus* (BLV) dari Famili *Retroviridae*. Virus ini dapat dideteksi dengan menggunakan beberapa metode diantaranya teknik *Polymerase chain reaction* (PCR), sedangkan antibodi ternak terinfeksi dapat dideteksi menggunakan *agar gel immunodiffusion* (AGID). Tujuan penelitian ini adalah mempelajari efektivitas metode PCR dan AGID untuk mendeteksi keberadaan virus BLV atau infeksi penyakit *Enzootic Bovine Leucosis* (EBL) di Indonesia. Sampel berupa *peripheral blood leukocyt* (PBL) dari 307 ekor sapi yang menunjukkan dan tidak menunjukkan gejala klinis digunakan untuk uji PCR dan AGID, sedangkan sampel semen dari 21 ekor sapi yang juga dikoleksi darahnya hanya dianalisis dengan metode PCR. Hasil analisis menunjukkan bahwa 12 ekor sapi positif EBL dengan metode PCR, sedangkan dengan uji AGID hanya tujuh ekor yang terdeteksi positif. Sementara itu, terhadap 21 sampel semen sapi yang diuji, tidak satupun terdeteksi positif EBL dengan uji PCR, walaupun satu sampel berasal dari ternak yang menunjukkan hasil positif pada sampel darah. Hasil tersebut menunjukkan bahwa pada sampel darah PCR lebih sensitif dibandingkan dengan AGID dan uji PCR pada sampel semen.

Kata Kunci: *Enzootic Bovine Leucosis*, Indonesia

PENDAHULUAN

Enzootic Bovine Leucosis (EBL) adalah suatu penyakit virus pada sapi dan kerbau yang disebabkan oleh *Bovine Leukemia Virus* (BLV), sejenis retrovirus dari Famili *Retroviridae*. Penyakit EBL ditandai dengan meningkatnya sel leukosit dalam darah dengan sel B limfosit sebagai target sel. Hal ini terjadi karena adanya rangsangan virus EBL pada jaringan limfatik sehingga sel-sel jaringan tersebut mengalami hiperplasia. Karena sel limfosit hiperplasia, maka manifestasi yang tampak berupa pembengkakan jaringan limfatik terutama *limfoglandula perifer* (Amills et al. 2004; Uera et al.

2012; Yoon et al. 2005; Konnai et al. 2013). Sekitar 30% sapi yang terinfeksi mengakibatkan limfositosis persisten dan kurang dari 5% dapat menimbulkan limfoma (Amills et al. 2004; Konnai et al. 2013; Inoue et al. 2013). Di negara dimana kasus EBL cukup tinggi, infeksi virus BLV mengakibatkan masalah yang serius di dunia kesehatan hewan. Penyakit ini dapat mengakibatkan gangguan sistem reproduksi dan penurunan produksi susu, sehingga menyebabkan kerugian ekonomi bagi peternak (Yavru et al. 2007; Kobayashi et al. 2010; Rodriguez et al. 2009). Lebih lanjut OIE (2012) mengemukakan bahwa penyakit EBL termasuk dalam daftar penyakit penting.

Infeksi yang disebabkan oleh BLV merupakan infeksi persisten dan kronik dengan tahapan sebagai berikut: (i) pada tahap awal hewan yang terinfeksi tidak memperlihatkan gejala klinis ataupun kelainan hematologis dan hewan tersebut akan bersifat sebagai *carrier*, (ii) pada tahap kedua dijumpai adanya perubahan gambaran darah dengan terjadinya peningkatan jumlah limfosit persisten, dan (iii) bentuk limfosarkoma dimana terjadi perubahan yang tampak secara klinis yaitu munculnya tumor yang diikuti dengan bentuk limfosit persisten (Sharifzadeh et al. 2011). Penyakit ini banyak menyerang sapi, kambing, domba, dan babi. Di samping itu, kerbau juga dapat terserang walaupun kejadiannya jarang.

Beberapa faktor yang dapat mempengaruhi timbulnya penyakit ini antara lain umur, rute masuknya bibit penyakit, faktor imunitas yang menurun pada setiap spesies ternak, dan pengaruh musim. Grimshaw et al. (1979) melaporkan bahwa terdapat 4 bentuk EBL pada sapi, yaitu: (1) bentuk mudah menyebar (*juvenile form*), menyerang sapi berumur di bawah 6 bulan, (2) bentuk timus (*thymic form*), menyerang sapi umur 6 bulan - 2 tahun, (3) bentuk dewasa yang menyebar (*adult multicentric form*), paling banyak terjadi dan biasanya menyerang sapi berumur 4-11 tahun dan, (4) bentuk kulit (*skin form*) menyerang sapi umur 2-3 tahun, tetapi sangat jarang terjadi. Pada EBL bentuk kulit ternyata umur tidak spesifik, sebab pada hewan percobaan dapat terjadi pada sapi yang berumur 10, 15 dan 24 bulan.

BLV pada umumnya menular secara horisontal melalui cairan tubuh seperti darah, susu, saliva dan semen yang terkontaminasi oleh limfosit yang terinfeksi virus. Setelah terjadi infeksi, BLV akan memicu sistem imun pada sapi dewasa sebagai respon tanggap kebal yang kuat terhadap amplop protein gp51. Antibodi ini dapat dideteksi dengan Uji AGID dan juga ELISA (Forti et al. 2014; Murakami et al. 2011). Lorin et al. (2007) menyarankan bahwa suatu peternakan akan terbebas dari BLV apabila hewan yang memiliki seropositif dipisahkan dari kelompok hewan yang seronegatif. Akan tetapi, beberapa peneliti melaporkan bahwa monitoring secara serologis tidaklah cukup sensitif untuk mendeteksi semua sapi yang terinfeksi BLV (Ramanavicius et al. 2007). Sementara itu, masalah lain juga timbul dengan hewan yang menunjukkan titer antibodi terhadap BLV secara permanen rendah (Stone et al. 2000). Lebih lanjut Beier et al. (2004) melaporkan bahwa uji serologis tidak dapat membedakan antara antibodi maternal dan kekebalan aktif yang disebabkan oleh infeksi BLV.

Jimba et al. (2012) melaporkan bahwa beberapa provirus yang berasal dari hewan yang secara alami tidak terdeteksi adanya antibodi terhadap BLV oleh uji AGID atau ELISA, dapat terdeteksi dengan menggunakan uji terkini yaitu menggunakan PCR-BLV

CoCoMo-q. Pada sel yang terinfeksi, BLV diintegrasikan ke dalam DNA inang dalam bentuk sebuah provirus, dan berada dalam sel perifer darah sapi dalam jumlah yang banyak sehingga dapat dideteksi dengan metode biologi molekuler, seperti Quantitative real time PCR (qRT-PCR) (Aida et al. 2014). Metoda ini mulai banyak dikembangkan dibandingkan dengan menggunakan uji PCR konvensional seperti pada hasil penelitian ini. Uji PCR ini memiliki beberapa keuntungan yaitu lebih sensitif dibandingkan uji serologis. Pengendalian kesehatan kawanan ternak menjadi tidak tepat akibat sangat rendahnya prevalensi infeksi BLV. Di samping itu, uji PCR dapat dijadikan uji konfirmasi bagi hasil uji AGID dan ELISA yang meragukan (Markiewicz et al. 2003; Mohammadabadi et al. 2011).

Penyakit EBL akhir-akhir ini sangat mendapat perhatian di negara-negara anggota Masyarakat Ekonomi Eropa (MEE), karena termasuk ke dalam kelompok penyakit menular. Di Indonesia ada beberapa penyakit hewan menular pada ternak bibit yang mendapat perhatian khusus, dan penyakit yang harus bebas pada ternak bibit diantaranya Brucellosis, *Infectious Bovine Rhinotracheitis* (IBR), *Bovine Viral Diarrhoe* (BVD), *Bovine Genital Campylobacteriosis* (BGC), *Tuberculosis* (TBC), *Enzootic Bovine Leucosis* (EBL), *Trichomoniasis*, *Leptospirosis*, *Babesiosis*, *Anaplasmosis*, dan *Theileriasis* (Anonim 2005).

Keberadaan penyakit ini telah menyebar dan terdeteksi di berbagai negara (Rodriquez et al. 2009) seperti Eropa (Nuotio et al. 2003), Amerika (Scott et al. 2006; Gutierrez et al. 2011), Timur Tengah (Mousavi et al. 2014), Australia dan Asia (Uera et al. 2012; Yoon et al. 2005; Murakami et al. 2011). Akhir-akhir ini telah dilaporkan adanya infeksi EBL pada sapi di Filipina baik dengan menggunakan uji serologis maupun nested PCR (Uera et al. 2012). Pemeriksaan serologis terhadap EBL pada sapi impor di Indonesia mulai dilakukan pada tahun 1987. Di Indonesia, penyakit ini telah terdeteksi secara serologis pada sapi yang berasal dari sapi impor yaitu pada sapi Fresian Holstein (FH), sapi Brahman, sapi Ongole, sapi Sahiwal, sapi Sahiwal Cross, sedangkan serum dari sapi Bali dan sapi Madura semuanya bereaksi negatif (Sarosa & Ronohardjo 1988).

Mengingat ratusan ribu ekor sapi perah telah didatangkan ke Indonesia dari negara yang pernah tertular leukosis sapi menular seperti Amerika Serikat, Australia, dan Brazil dan dapat menimbulkan kerugian ekonomi, maka peranan EBL di Indonesia menjadi sangat penting dan perlu mendapat perhatian yang serius. Kepentingan ini menjadi lebih besar lagi dengan digalakkannya peternakan sapi perah rakyat di berbagai daerah di Indonesia, karena sebagian besar peternak di Indonesia merupakan peternak kecil dengan modal yang terbatas.

Tujuan penelitian ini adalah mempelajari efektivitas metode PCR dan AGID untuk mendeteksi keberadaan penyakit *Enzootic Bovine Leucosis* (EBL) pada sapi di Indonesia.

MATERI DAN METODE

Sampel

Sebanyak 328 sampel yang terdiri dari 166 darah sapi (Limousin, Simmental, Angus, FH dan PO) asal peternakan sapi di Bogor; 30 sampel darah sapi dan 21 sampel semen sapi (Limousin, Simmental, Angus, FH dan Ongole) asal peternakan sapi di Lembang; dan 111 sampel darah sapi Brahman asal peternakan sapi di Palembang. Sampel semen berasal dari ternak yang sama dengan yang diambil contoh darahnya.

Perlakuan terhadap sampel darah yaitu darah dikoleksi dengan tabung venoject yang mengandung EDTA dan tidak mengandung EDTA untuk uji serologis. Selanjutnya ke dalam darah dengan EDTA ditambahkan Ficol (Sigma) untuk memisahkan sel yang memiliki densitas yang sama akan tetapi memiliki ukuran yang berbeda, dengan perbandingan sama banyak. *Buffy coat* dipisahkan dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 1.500 rpm selama 15 menit dan digunakan untuk ekstraksi DNA, sedangkan serum digunakan untuk uji serologik dengan menggunakan AGID.

Perlakuan terhadap sampel semen untuk analisis PCR dilakukan berdasarkan Mohammadabadi et al. (2011) sebagai berikut: (i) untuk menghindari faktor inhibitor yang terdapat pada semen maka semen tersebut dicampur dengan DEPC-dH₂O dengan perbandingan sama banyak, (ii) kemudian campuran semen-DEPC-dH₂O tersebut di beku cairkan sebanyak 3 kali dan (iii) akhirnya 300 µl digunakan untuk ekstraksi RNA.

Uji serologik dengan Agar Gel Imunodifusi (AGID)

Uji serologik dilakukan dengan menggunakan kit AGID yang berasal dari *Synbiotics Corporation* (Prancis). AGID digunakan untuk mendeteksi antibodi terhadap BLV antigen gp51. Pada uji ini dibuat 7 lubang pada agar gel yang telah disiapkan. Lubang yang ada di tengah diisi dengan antigen sebanyak 32 µl, sedangkan lubang yang ada di atas dan di bawah lubang yang berisi antigen diisi dengan serum referensi sebanyak 73 µl. Keempat lubang lainnya diisi dengan serum lapangan, masing-masing sebanyak 73 µl. Agar yang telah diisi dengan antigen, antiserum, dan serum lapangan ini kemudian dimasukkan ke dalam kotak plastik yang diberi alas kertas saring yang dibasahi dengan air, untuk menjaga agar keadaannya selalu

lembab dan disimpan pada suhu kamar, serta diamati setiap hari sampai 3 hari.

Reaksi serologik dinyatakan positif apabila dalam waktu 24-72 jam terbentuk garis presipitasi antara lubang yang berisi antigen dan lubang yang berisi serum lapangan, dan garis presipitasi ini bersambung dengan garis presipitasi yang terbentuk antara lubang yang berisi antigen dan lubang yang berisi antiserum.

Ekstraksi DNA

Total RNA diekstraksi secara langsung dari 200 µl sampel (*buffy coat* dan semen) dengan menggunakan QIAmp *viral RNA Mini kit* (Qiagen) sesuai dengan rekomendasi pembuat kit. Ekstrak RNA diresuspensikan dengan 50 µl RNase-bebas air, kemudian konsentrasi RNA diukur dengan menggunakan Spektrofotometer (NanoDrop ND-1000 UV-Vis, Wilmington, DE). Sampel RNA langsung dapat digunakan untuk PCR dan sisanya disimpan di -70°C untuk pengujian lebih lanjut.

Primer

Primer yang digunakan berasal dari BLV gen gp51 *env* yang menghasilkan target spesifik sebesar 521 bp, yaitu: Forward 5'-GGG CCA TGG TCA CAT ATG ATT G-3' (posisi genome 5128-5149) dan Reverse 5'-CGT TGC CTT GAG AAA CAT TGA AC-3' (posisi genome 5627-5649) (Camargos et al. 2003).

Amplifikasi PCR

Total reaksi PCR dibuat dalam 20 µl dengan komposisi: larutan 10 mM TrisHCl pH 8,3; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 1% glycerol (v/v); 1% (v/v) dimetilsulfoxide (DMSO); 10 pmol masing-masing primer; 0,2 mM dNTPs (Invitrogen); 0,5 Taq DNA polimerase (Invitrogen) dan 1 µl DNA (150 ng DNA). Reaksi amplifikasi menggunakan ABI 9700, dengan siklus inkubasi 95°C selama 3 menit, diikuti dengan 35 siklus terdiri dari denaturasi 95°C selama 60 detik, *annealing* 59°C selama 60 detik, perpanjangan 72°C selama 60 detik. Siklus terakhir pada suhu 72°C selama 10 menit (Camargos et al. 2003).

Analisis produk PCR

Produk PCR dianalisis dengan 1% agarose gel (invitrogen) yang mengandung EtBr. Elektroforesis dilakukan pada tegangan konstan yaitu pada 100 volt dalam TBE buffer selama 1 jam. Hasil PCR dinyatakan positif apabila terlihat adanya produk yang spesifik dari primer yang digunakan.

Estimasi limit deteksi PCR

Antigen yang digunakan untuk uji limit deteksi berasal dari antigen gp51 BLV yang diperoleh dari Synbiotics (Prancis). Prosedur perlakuan terhadap Antigen BLV menurut Abd El-Hafeid et al. (2010) sebagai berikut: antigen gp51 BLV dalam bentuk kering beku mula-mula diencerkan dengan 1 ml RNase-bebas air. RNA diekstraksi secara langsung dari 200 µl antigen BLV dengan menggunakan QIAmp *viral RNA Mini kit* (Qiagen) sesuai dengan rekomendasi pembuat kit. Ekstraks RNA diresuspensikan dengan 50 µl *RNase-free Water* kemudian diencerkan kelipatan 10. Setiap enceran diukur konsentrasinya menggunakan spektrofotometer (NanoDrop ND1000). Kemudian setiap enceran diuji dengan PCR dan ditentukan limit deteksi PCR tersebut.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Limit deteksi PCR

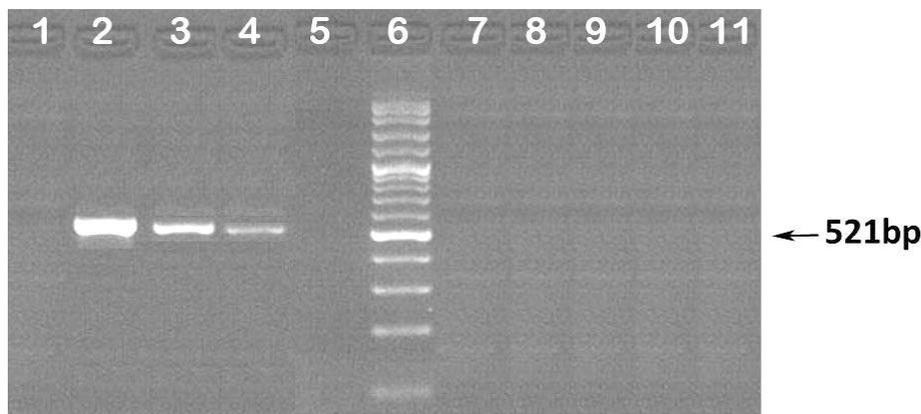
Hasil deteksi terhadap DNA BLV dengan konsentrasi awal sebesar 120 ng/µl yang diencerkan secara seri kelipatan 10 mulai dari 10⁻¹ (120 ng/µl) hingga 10⁻⁹ (120 x 10⁻⁹ ng/µl) menunjukkan bahwa PCR yang dikembangkan memiliki limit deteksi hingga 120 x 10⁻³ ng/µl DNA murni (Gambar 1). Hasil tersebut menunjukkan bahwa minimal konsentrasi DNA BLV yang dapat terdeteksi oleh PCR adalah 120 x 10⁻³ ng/µl DNA atau sebesar 120 pg/µl. Hasil tersebut sesuai dengan metode PCR yang dikembangkan oleh Camargos et al. (2003).

Spesifisitas PCR

Untuk menentukan bahwa primer yang digunakan dalam PCR adalah spesifik hanya untuk EBL, maka dilakukan uji spesifisitas PCR, yaitu pendeteksian terhadap virus yang dapat menimbulkan penyakit pada sapi diantaranya yaitu *Infectious Bovine Rhinotracheitis* (IBR), *Bovine Viral Diarrhea* (BVD), dan *Bovine Respiratory Syncytial Virus* (BRSV). Ketiga virus tersebut seringkali menimbulkan gejala klinis yang sama dengan klinis yang disebabkan oleh penyakit EBL. Hasil uji PCR terhadap ketiga virus tersebut menunjukkan bahwa hanya virus BLV (EBL) yang dapat terdeteksi positif oleh PCR. Hal tersebut membuktikan bahwa PCR yang dikembangkan dengan menggunakan primer BLV-*env* yang menyandi protein gp51 sudah spesifik (Gambar 2).

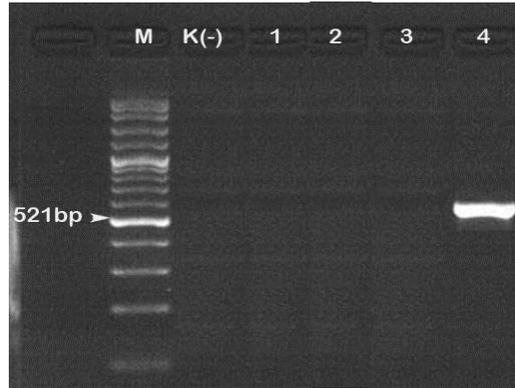
Uji PCR dan uji serologik

Hasil Uji PCR terhadap sampel PBL (Tabel 1) menunjukkan bahwa dari 328 sampel yang diuji, terdeteksi positif hanya 12 sampel (3,66%) atau bila dihitung sampel yang sama maka dari 307 sampel PBL terdeteksi positif sebanyak 12 sampel (3,91%), sedangkan dengan uji serologi dari 307 sampel yang diuji terdeteksi 7 sampel (2,28%) positif antibodi (Tabel 1 dan Gambar 3). Hasil tersebut menunjukkan bahwa tingkat sensitivitas uji PCR lebih tinggi dibandingkan dengan uji serologi dengan AGID. Perbandingan antara uji PCR dan uji serologik dengan menggunakan AGID disajikan pada Tabel 2.



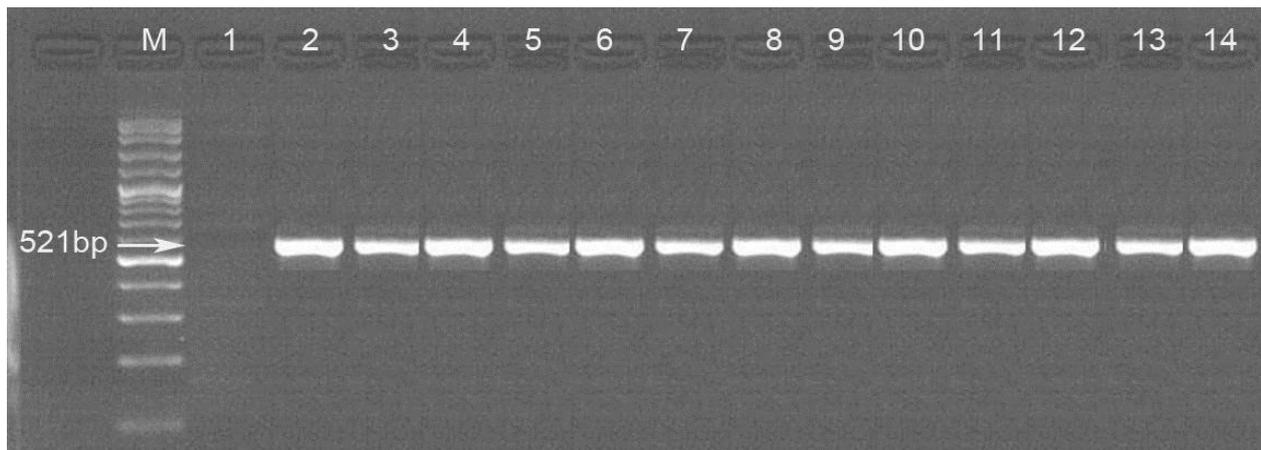
1 = Kontrol reagensia; 2 = 120 ng/µl; 3 = 120 x 10⁻² ng/µl; 4 = 120 x 10⁻³ ng/µl; 5 = 120x10⁻⁴ ng/µl; 6 = Marker (100 bp); 7 = 120 x 10⁻⁵ ng/µl; 8 = 120 x 10⁻⁶ ng/µl; 9 = 120 x 10⁻⁷ ng/µl; 10 = 120x10⁻⁸ ng/µl; 11 = 120x10⁻⁹ ng/µl

Gambar 1. Tingkat sensitifitas berbagai konsentrasi DNA virus EBL



M = Marker 100bp; 1 = IBR; 2 = BVD; 3 = BRSV; dan 4 = EBL

Gambar 2. Uji spesifisitas sampel positif terhadap virus IBR, BVD dan BRSV



M = Marker 100bp; 1 = Kontrol Negatif; 2 = Kontrol Positif; 3-13 = Sampel asal Palembang; dan 14 = Sampel asal Jawa Barat

Gambar 3. Hasil positif deteksi virus EBL pada sapi asal Jawa Barat dan Palembang

Lebih lanjut, sebanyak 21 sampel semen asal Peternakan sapi di Lembang yang diuji, tidak satupun menunjukkan hasil positif dengan PCR, walaupun salah satu ternak positif BLV dengan uji PCR PBL. Hal ini menunjukkan bahwa semen tersebut bebas dari virus EBL. Penelitian lebih lanjut diperlukan terhadap sampel semen dalam jumlah yang lebih banyak dan positif EBL untuk mengetahui ekskresi virus EBL melalui semen. Hasil ini juga menunjukkan uji PCR dari PBL lebih sensitif dari contoh semen.

Hasil serologis dengan menggunakan uji AGID menunjukkan bahwa dari tiga lokasi yang disampling, ternak sapi asal Palembang mempunyai persentase tertinggi yaitu 6 sampel positif dari 111 sampel yang diuji (5,41%), dibandingkan dengan ternak asal Lembang dan Bogor, sedangkan dengan uji PCR terdeteksi positif 11 sampel (9,91%). Mengingat semua ternak sapi asal Palembang semuanya berjenis sapi Brahman, sehingga tidak ada keragaman *breed*. Namun

demikian, semua sampel yang terdeteksi positif dengan AGID, juga terdeteksi positif dengan PCR berasal dari ternak yang sama. Pemeriksaan serologik pada ternak sapi asal Peternakan di Palembang tersebut pernah dianalisis dan dilakukan pada tahun 2012. Pada saat itu terdeteksi positif sebanyak 4 ekor sapi yaitu sapi dengan *ear tag* 1021F, 0819C, 1020F dan 1022F. Namun pada saat penelitian ini dilakukan hanya terdapat sapi Brahman dengan *ear tag* 1020F dan sapi tersebut masih positif terhadap EBL. Sementara untuk ketiga sapi yang pernah terdeteksi positif kemungkinan sudah dikeluarkan. Hal ini harus menjadi perhatian bagi pengambil kebijakan, apabila terdapat ternak yang terdeteksi positif EBL baik dengan uji serologik maupun PCR, maka sebaiknya ternak tersebut dieliminasi. Bila tidak dieliminasi, peningkatan jumlah sapi terinfeksi terjadi semula yang terdeteksi positif sebanyak 4 ekor sekarang sudah bertambah menjadi 11 ekor. Demikian pula halnya dengan peternakan sapi

yang ada di Lembang. Pada tahun 2012 secara serologik (AGID) telah terdeteksi positif 1 ekor sapi jenis Ongole. Pada saat penelitian ini dikoleksi sebanyak 30 sampel dari sapi jenis Simental, Limousin, Ongole, FH dan Angus. Dari 30 ekor sapi yang diperiksa baik secara serologis maupun deteksi proviral DNA BLV dengan PCR, ternyata diperoleh 1 ekor sapi yang positif EBL baik dengan uji AGID maupun PCR yaitu sapi ongole yang pernah positif di tahun 2012. Hasil serologik positif EBL pada sapi Brahman 2,67% (n=75) asal Lampung dan Ongole 1,33% (n=525) asal Lampung pernah pula dilaporkan pada tahun 1988 (Sarosa & Ronohardjo 1988). Namun penelitian tersebut tidak dilanjutkan dengan konfirmasi menggunakan PCR. Hasil kedua penelitian di atas menunjukkan bahwa penyakit EBL sudah dapat dipastikan ada di Indonesia.

Dalam beberapa situasi, uji serologi mungkin gagal untuk mengidentifikasi hewan yang terinfeksi. Beberapa contoh situasi ini mungkin terjadi pada hewan yang baru terinfeksi, dalam beberapa kasus deteksi antibodi terjadi hanya tiga minggu setelah infeksi (Beier et al. 2004); secara permanen hewan seronegatif (Abd El-Hafeid et al. 2010); secara transient atau permanen memiliki tingkat antibodi yang rendah (Camargos et al. 2007); serta hewan dalam waktu yang sama terinfeksi BVDV sehingga dapat menekan respon imun terhadap BLV (Zaher & Ahmed 2014). González et al. (2008) melaporkan bahwa hewan yang secara terus-menerus terinfeksi bovine virus diare (BVD), menunjukkan terjadi penurunan respon kekebalan terhadap BLV. Oleh karena itu, dapat dipahami apabila jumlah ternak yang positif akan lebih banyak terdeteksi dengan metode PCR dibandingkan dengan menggunakan uji serologik dalam hal ini dengan uji AGID.

Sapi yang terinfeksi oleh virus BLV akan membentuk antibodi dalam jangka waktu yang lama (Balic et al. 2012). Terlebih lagi bila di daerah tersebut, vaksinasi terhadap penyakit EBL belum pernah dilakukan, maka terdeteksinya antibodi terhadap virus BLV yang menyebabkan penyakit EBL dapat dikonfirmasi sebagai infeksi alami. Terdeteksinya antibodi terhadap virus BLV tidak selalu diiringi dengan munculnya gejala klinis (Jimba et al. 2012). Tidak munculnya gejala klinis dan tidak terdeteksinya antibodi terhadap BLV bukan berarti hewan tersebut tidak terinfeksi virus BLV. Hal ini dapat disebabkan oleh jumlah virus BLV yang sangat sedikit sehingga tidak dapat menggerak sistem kekebalan tubuh untuk menghasilkan antibodi yang dapat terdeteksi dengan uji serologis baik dengan uji AGID atau ELISA. Di samping itu, pada awal infeksi, antibodi biasanya belum muncul, sedangkan virus sudah mulai berkembang seperti terlihat pada Tabel 1 dan Tabel 2. Oleh sebab itu uji PCR dapat digunakan untuk mendeteksi adanya infeksi virus BLV, yang akhir akhir ini telah banyak

dikembangkan (Jimba et al. 2012; Inoue et al. 2013; Aida et al. 2014).

Sebagian besar infeksi BLV tidak menunjukkan gejala klinis, dan setelah masa laten hingga 8 tahun sapi dapat menunjukkan *malignant B-cell lymphosarcomas*. Tetapi, 30% sapi yang terinfeksi secara alami, akan menunjukkan *persistent leucocytosis* yang menyebabkan pro-virus BLV banyak bersirkulasi dalam darah tanpa menunjukkan gejala klinis (Gillet et al. 2007). Provirus ini dapat terdeteksi dengan uji PCR. PCR dapat mendeteksi sejumlah kecil DNA provirus, melalui hibridisasi, reamplifikasi atau prosedur *seminested* (Matgorzata et al. 2012).

PCR dapat digunakan untuk deteksi BLV pada pedet yang masih mengkonsumsi kolostrium dari sapi induk yang seropositif, dalam kasus tumor, untuk membedakan limfoma menular yang terjadi secara sporadis, pada jaringan tumor pada sapi dari dugaan kasus yang dikumpulkan dari Rumah Potong Hewan (RPH), infeksi yang baru terjadi, sebelum pengembangan antibodi, dalam hasil reaksi positif lemah/meragukan pada uji AGID, untuk pemantauan tes keturunan sapi sebelum digunakan di pusat inseminasi buatan, dan sapi yang digunakan untuk produksi vaksin (Camargos et al. 2007; Sharifzadeh et al. 2011; OIE 2012).

Beberapa keuntungan menggunakan uji PCR antara lain: uji PCR dapat digunakan sebagai uji pelengkap saat hasil uji serologis dengan menggunakan uji ELISA atau AGID negatif. Selain itu, hasil PCR dapat diselesaikan dalam waktu satu hari, sedangkan untuk uji AGID biasanya dibutuhkan dalam tiga hari. Infeksi BLV dapat dideteksi dengan PCR dua minggu lebih awal dibandingkan dengan uji AGID. Lebih lanjut, PCR dapat digunakan dalam program pemberantasan BLV, terutama pada ternak-ternak dengan prevalensi infeksi yang rendah. Selain itu metode PCR dapat diandalkan untuk pemeriksaan hewan ekspor atau memilih hewan yang bebas BLV, khususnya untuk persiapan/pembuatan vaksin (misalnya, anaplasmosis, Babesiosis).

Hasil uji PCR dalam mendeteksi virus EBL ini merupakan temuan pertama yang mengindikasikan keberadaan penyakit BLV di Indonesia, sehingga diperlukan kewaspadaan terhadap penyebaran penyakit. Pertanyaan yang muncul adalah, apakah virus EBL tersebut memang berasal dari Indonesia atau masuk ke Indonesia dari luar, seperti melalui sapi impor, semen atau pakan ternak yang terkontaminasi virus EBL. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mengetahui sebaran variasi genetik virus EBL dan originalitas isolat yang ada di Indonesia dan kekerabatannya dengan virus EBL yang berasal dari negara lain. Hasil tersebut diharapkan dapat dijadikan bahan masukan bagi pemangku kebijakan untuk mengantisipasi penyebaran atau masuknya infeksi EBL di Indonesia.

Tabel 1. Hasil deteksi virus dan antibodi terhadap EBL pada sapi asal Jawa Barat dan Palembang

Asal Sampel	Jenis Hewan	Jumlah sampel	Uji PCR		UJI AGID	
			Positif	Negatif	Positif	Negatif
Bogor	Limousin, Simental, Angus, FH, PO	166 darah	0	166	0	166
Lembang	Limousin, Simental, Angus, FH, Ongole	30 darah	1	29	1	29
		21 semen*	0	21	-	-
Palembang	Brahman	111 darah	11	100	6	105
Total		328	12	316	7	300

FH = Fresian Holstein (*Bos taurus*); *contoh semen berasal dari ternak yang sama dengan yang diambil contoh darahnya
PO = Peranakan Ongole (lokal)

Tabel 2. Evaluasi uji PCR dan serologis (AGID) pada ternak yang sama

	AGID		Total
	Positif	Negatif	
PCR			
Positif	7	5	12
Negatif	0	295	295
Total	7	300	307

KESIMPULAN

Teknik PCR telah berhasil mendeteksi BLV dari sampel *Pheripheral Blood Leucocyte* (PBL) sapi, sementara itu, antibodi terhadap BLV dapat dideteksi dengan menggunakan uji serologis dengan AGID. Kedua teknik tersebut mempunyai korelasi positif dan dapat digunakan untuk mendeteksi infeksi BLV maupun deteksi antibodinya pada sapi yang sama, namun demikian uji PCR lebih baik bila dibandingkan dengan uji AGID. Dengan demikian, teknik PCR sampel darah (PBL) dapat digunakan untuk monitoring penyakit EBL pada sapi dan terutama dapat digunakan bila hasil uji dengan AGID memberikan hasil negatif.

DAFTAR PUSTAKA

Abd El-Hafeid YGM, Metias KN, Ibrahim IGA. 2010. Comparative serological detection of Enzootic Bovine Leukosis Virus (EBLV) in cattle sera. *Global Vet.* 4:267-270.

Aida Y, Takeshima S, Panei CJ, Omori T, Nunoya T, Davis WC, Ishizaki H, Matoba K. 2014. BLV-CoCoMo-qPCR: Estimation of bovine leukemia virus (BLV) proviral load harbored by lymphocyte subpopulations in BLV-infected cattle at the subclinical stage of enzootic bovine leucosis. *Retrovirology*, 11(Suppl 1):P143. <http://www.retrovirology.com/content/11/S1/P143>.

Amills M, Norimine J, Olmstead CA, Lewin HA. 2004. Cytokine mRNA expression in B cells from bovine leukemia virus-infected cattle with persistent lymphocytosis. *Cytokine*. 28:25-28.

Anonim. 2005. Draft final rencana strategis pembangunan kesehatan hewan. Direktorat Kesehatan Hewan, Direktorat Jenderal Peternakan. Departemen Pertanian.

Balic D, Lojkic I, Periskic M, Bedekovic T, Jungic A, Lemo N, Roic B, Cac Z, Barbic L, Madic J. 2012. Identification of a new genotype of bovine leukemia virus. *Arch Virol*. 157:1281-1290.

Beier D, Riebe R, Blankenstein P, Starick E. 2004. Establishment of a new bovine leukosis virus producing cell line. *J Virol Methods*. 121:239-246.

Camargos MF, Stancek D, Rocha MA, Lessa LM, Reis JK, Leite RC. 2003. Partial sequencing of env gene of bovine leukaemia virus from Brazilian samples and phylogenetic analysis. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 49:325-331.

Camargos MF, Feliziani F, De Giuseppe A, Lessa LM, Reis JKP, Leite RC. 2007. Evaluation of diagnostic test to bovine leukemia virus. *Revista Portuguesa Ciencias Vet.* 102:169-173.

Forti K, Rizzo G, Cagiola M, Ferrante G, Marini C, Feliziani F, Pezzotti G, De Giuseppe F. 2014. Identification of a novel overlapping sequential E epitope (E0) on the bovine leukaemia virus SU glycoprotein and analysis of immunological data. *Vet Microbiol*. 172:157-167.

- Gillet N, Florins A, Boxus M, Burteau C, Nigro A, Vandermeers F, Balon H, Bouzar AB, Defoiche J, Burny A, Reichert M, Kettmann R, Willems L. 2007. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology*. 4:18.
- González ET, Licursi M, Vila RV, Bonzo E. 2008. Evidence of bovine immunodeficiency virus (BIV) infection: serological survey in Argentina. *Res Vet Sci*. 85:353-358.
- Grimshaw WT, Wiseman RA, Petrie L, Selman LE. 1979. Bovine leucosis (lymphosarcoma): A clinical study of 60 pathologically conformed cases. *Vet Rec*. 105:267-272.
- Gutierrez G, Alvarez I, Politzki R, Lomonaco M, Dus Santos MJ, Rondelli F, Fondevila N, Trono K. 2011. Natural progression of Bovine Leukemia Virus infection in Argentinean dairy cattle. *Vet Microbiol*. 151:255-263.
- Inoue E, Matsumura K, Soma N, Hirasawa S, Wakimoto M, Arakaki Y, Takashi Yoshida T, Osawa Y, Okazaki K. 2013. L233P mutation of the Tax protein strongly correlated with leukemogenicity of bovine leukemia virus. *Vet Microbiol*. 167:364-371.
- Jimba M, Takeshima S, Murakami H, Kohara J, Kobayashi N, Matsuhashi T, Ohmori T, Nunoya T, Aida Y. 2012. CoCoMo-qPCR: a useful tool for evaluating bovine leukemia virus infection status. *BMC Veterinary Research* 2012, 8:167 <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/8/167>.
- Kobayashi S, Tsutsui T, Yamamoto T, Hayama Y, Kameyama K, Konishi M, Murakami K. 2010. Risk factors associated with within-herd transmission of bovine leukemia virus on dairy farms in Japan. *BMC Vet Res*. 6:1-6.
- Konnai S, Suzukia S, Shirai T, Ikebuchia R, Okagawa T, Sunden Y, Mingala CN, Onuma M, Murata S, Ohashi K. 2013. Enhanced expression of LAG-3 on lymphocyte subpopulations from persistently lymphocytotic cattle infected with bovine leukemia virus. *Comp Immun Microbiol Infect Dis*. 36:63-69.
- Lorin A, Lins L, Stroobant V, Brasseur R. 2007. Determination of the minimal fusion peptide of bovine leukemia virus gp30. *Biochem Biophys Res Commun*. 355:649-653.
- Małgorzata S, Sławomir Z, Sylwia K. 2012. Diagnosis of the bovine leukaemia virus infection in Polish Holstein-Friesian cows and comparison of their milk productivity. *Acta Vet Brno*. 81:353-358.
- Markiewicz L, Rulka J, Kaminski S. 2003. Detection of BLV provirus in different cells by nested-PCR. *Bull Vet Inst Pulawy*. 47:325-331.
- Mohammadabadi MR, Soflaei M, Mostafavi H, Honarmand M. 2011. Using PCR for early diagnosis of bovine leukemia virus infection in some native cattle. *Gen Mol Res*. 10:2658-2663.
- Mousavi S, Haghparast A, Mohammadi G, Tabatabaeizadeh SE. 2014. Prevalence of bovine leukemia virus (BLV) infection in the northeast of Iran. *Vet Res Forum*. 5:135-139.
- Murakami K, Kobayashi S, Konishi M, Kameyama K, Yamamoto T, Tsutsui T. 2011. The recent prevalence of bovine leukemia virus (BLV) infection among Japanese cattle. *Vet Microbiol*. 148:84-88.
- Nuotio L, Rusanen H, Sihvonen L, Neuvonen E. 2003. Eradication of enzootic bovine leukosis from Finland. *Prev Vet Med*. 59:43-49.
- [OIE] Office International des Epizootics. 2012. Enzootic bovine leukosis. OIE Terrestrial Manual 2012. Chapter 2.4.11.
- Ramanavicius A, Kurilcik N, Jursenas S, Finkelsteinas A. 2007. Conducting polymer based fluorescence quenching as a new approach to increase the selectivity of immunosensors. *Biosens Bioelectron*. 23:499-505.
- Rodriguez SM, Golemba MD, Campos RH, Trono K, Jones LR. 2009. Bovine leukemia virus can be classified into seven genotypes: evidence for existence of two novel clades. *J Gen Virol*. 90:2788-2797.
- Sarosa A, Ronohardjo P. 1988. Studi pendahuluan penyebaran penyakit enzootic bovine leukosis di beberapa daerah di Indonesia. *Penyakit Hewan*. 20:20-22.
- Scott HM, Sorenson O, Wu JT, Chow EY, Manninen K, VanLeeuwen JA. 2006. Seroprevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, *Neospora caninum*, bovine leukemia virus, and bovine viral diarrhea virus infection among dairy cattle and herds in Alberta and agroecological risk factors associated with seropositivity. *Can Vet J*. 47:981-991.
- Stone DM, Norton LK, Chambers JC, Meek WJ. 2000. CD4 T lymphocyte activation in BLV-induced persistent B lymphocytosis in cattle. *Clin Immunol*. 96:280-288.
- Sharifzadeh A, Abbas D, Payam GD. 2011. Molecular detection of Bovine Leukemia virus (BLV) in the Semen Samples of Bulls. *World J Zoology*. 6:285-290.
- Uera JA, Ventura Lazaro JV, Mingala CN. 2012. Detection of Enzootic Bovine Leukosis in Cattle using Nested Polymerase Chain Reaction Assay. *Thai J Vet Med*. 42:319-324.
- Yavru S, Kale M, Ata A, Yapkcic O, Bulut O, Gulay MS. 2007. Effects of subclinical bovine leukemia virus infection on fertility of holstein cows and heifers. *Medycyna Wet*. 63:667-669.
- Yoon SS, Bae YC, Lee KH, Han B, Han HR. 2005. Characteristics of Bovine Lymphoma Caused by Bovine Leukemia Virus Infection in Holstein-Friesian Dairy Cattle in Korea. *Asian-Aust. J Anim Sci*. 18:728-733
- Zaher KS, Ahmed WM. 2014. Bovine leukemia virus infection in dairy cows in Egypt. *Acad J Cancer Res*. 7:126-130.