



Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan
Kementerian Pertanian

Prosedur Operasional Baku
Standard Operating Procedure

SOP

UJI conRT-PCR UNTUK DETEKSI MOLEKULAR ANTIGEN PENYAKIT MULUT DAN KUKU (PMK)

Pusat Veteriner Farma

Jl. Pusat Veteriner Farma Jl. Ahmad Yani 68 - 70 Surabaya, Jawa Timur 60231
Telpon (031) 829 1124; Fax (0361) 829 1125
Email: pusvetma@pertanian.go.id
Website: <http://pusvetma.ditjenpkh.pertanian.go.id/home>

HALAMAN REVISI

Revisi	Penulis	Mengesahkan	Tanggal pengesahan

Revisi	Tanggal	Rincian perubahan

Penulis	Drh. Agung Suganda, MSi Drh. Sapto Rini Budi P, M Imun Drh. Ida Arlita Wulandari, M.Biotech. Drh. Rosmalina Sari Dewi Daulay	
Disahkan oleh	Drh Agung Suganda, MSi Kepala Pusat Veteriner Farma	
Publikasi oleh	Laboratorium Rujukan PMK Pusvetma	

DAFTAR ISI

1. PENDAHULUAN	1
1.1 Penyakit Mulut dan Kuku (PMK)	1
1.2 Etiologi	1
1.3 Diagnosa Penyakit	1
1.4 Uji Konvensional PCR untuk Deteksi Virus PMK (<i>conRT-PCR</i>)	2
1.5 Daftar Pustaka	2
2. PERALATAN	2
3. BAHAN UJI	2
3.1 Reagensia	2
3.2 Primer	2
3.3 Bahan Acuan	2
3.4 Contoh uji	3
4. PERSIAPAN	3
4.1 KualifikasiPenguji	3
4.2 Persiapan Contoh Uji	3
4.3 Preparasi Primer	4
4.4 Persiapan Reagen Ekstraksi	4
5. PROSEDUR	5
5.1 Ekstraksi RNA	5
5.2 Pembuatan PCR Reaction/Master Mix, Penambahan Template dan Amplifikasi DNA	5
5.3 Amplifikasi	6
5.4 Elektrophoresis	7
6. HASIL	8
7. RETENSI DAN PEMUSNAHAN	8
7.1 Contoh dengan hasil uji negatif dimusnahkan 6 (enam) bulan setelah pengujian.	9
7.2 Contoh RNA hasil ekstraksi di simpan di freezer -20°C . Apabila terdapat contoh RNA dengan hasil uji positif maka dikoleksi dan disimpan di disuhu -80°C (Deep Freezer).	9
8. JAMINAN MUTU/QUALITY ASSURANCE	9
9. LAMPIRAN	9
10. LEMBAR KERJA	10

1. PENDAHULUAN

1.1 Penyakit Mulut dan Kuku (PMK)

Penyakit Mulut dan Kuku (PMK) adalah penyakit epizootika dengan daya tular tinggi (highly contagious) pada hewan berkuku genap/belah yang paling ditakuti di dunia karena menimbulkan kerugian ekonomi dan sosial yang tinggi. Penyakit ini ditandai dengan adanya pembentukan vesikel/lepuh dan erosi di mulut, lidah, gusi, nostril, puting, dan di kulit sekitar kuku. Penularan PMK melalui pernafasan, dapat tersebar melalui angin, lalu-lintas bahan-bahan makanan, ternak, vaksin yang tercemar virus PMK, dan melalui reproduksi. Gejala klinis yang ditimbulkan dapat bervariasi tergantung galur virus PMK yang menyerang, jumlah virus, umur dan jenis breed hewan, host dan derajat kekebalan dari host. Gejala bervariasi dari yang *ringan* sampai yang tidak tampak dan bahkan sampai berat. Pada sapi terjadi demam (*pyrexia*), tidak mau makan (*anoreksia*), gemeteran, pengurangan produksi susu selama 2-3 hari. Terjadi lepuh-lepuh yang terbentuk di dalam mulut. Lepuh-lepuh ini mudah pecah 24 jam setelah terbentuk sehingga isinya mudah keluar dan meninggalkan erosi. Adanya infeksi sekunder akan menunda kesembuhan lesi (Subronto 1997). (OIE 2018). Pada kambing dan domba, *pyrexia*, pincang dan lesi ringan pada oral, lesi pada kaki sepanjang mahkota band atau ruang interdigital lesi pada *dental pad*. Pada babi terjadi *pyrexia*. Setelah PMK dinyatakan bebas di Indonesia tahun 1986, maka saat ini PMK merupakan penyakit eksotis (penyakit yang tidak ada di suatu negara, tetapi dapat ditemukan di negara lain) bagi Indonesia.

1.2 Etiologi

Penyakit ini disebabkan oleh enterovirus yang sangat kecil dari family Picornaviridae, Genus Aphthovirus. Ada tujuh tipe virus PMK, yakni A, O, C, Asia, South African Territory (SAT) 1, 2, 3. Setiap tipe virus PMK masih terbagi lagi menjadi sub tipe dan galur (strain). Virus penyebab PMK ini berdiameter 10 – 20 milimikron dan terbentuk dari Ribonucleic acid (RNA) serta diselubungi oleh protein.

1.3 Diagnosa Penyakit

Diagnosa PMK lapangan dilakukan berdasarkan gambaran epidemiologi PMK yang hanya menyerang ruminansia dan babi dengan morbiditas tinggi dan kasus kematian (case fatality) yang rendah, gejala klinis seperti pincang, lepuh-lepuh di mulut dan hypersalivasi yang disertai demam. Sedangkan diagnosa laboratoris bisa dilakukan dengan isolasi, serologis (ELISA) dan molekular (PCR). Mengingat penyebaran penyakit sangat tinggi, maka uji molekular PCR merupakan uji yang direkomendasikan OIE.

1.4 Uji Konvensional PCR untuk Deteksi Virus PMK (*conRT-PCR*)

Uji konvensional PCR (*conRT-PCR*) dapat dilakukan dengan cepat untuk mencegah penyebaran PMK. Selain itu, uji *conRT-PCR* aman dilaboratorium karena dilakukan pada virus yang telah dimatikan dengan cairan berbahan dasar deterjen.

1.5 Daftar Pustaka

OIE, 2012. Foot and Mouth Disease Chapter 2.1.5. page 7 – 8.

2. PERALATAN

Micropipet (BioRad), 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), Gel Documentation/High Performance Ultraviolet Tranluminator (UVP), tube 1,5 ml.

3. BAHAN UJI

3.1 Reagensia

- 3.1.1. QIAamp Viral Mini Kit (250) (Qiagen, Cat. 52906)
- 3.1.2. SuperScript™ III One-Step RT-PCR Platinum® Taq High Fidelity (Invitrogen, Cat. 12574-035),
- 3.1.3. 1 kb DNA Ladder (Biolabs, N3232L),
- 3.1.4. Agarose LE (Roche, Cat. 11685678001),
- 3.1.5. Red Safe (Intron, Cat. 21141)

3.2 Primer

Primer Forward dengan sequence 5'-GCCTG-GTCTT-TCCAG-GTCT-3' dan Primer Reverse dengan sequence 5'-CCAGT-CCCCT-TCTCA-GATC-3', Ethanol absolut.

3.3 Bahan Acuan

- 3.3.1. Bahan acuan kontrol positif

Bahan acuan kontrol positif yang digunakan adalah antigen inaktif dari reagen Kit ELISA Liquid Phase Blocking Immunoassay produksi IAH Pirbright Laboratory. Antigen tersebut didapat dari sel kultur, telah

diinaktivasi dengan BEI dan *non-glycerinated* (Protokol Kit ELISA Liquid Phase Blocking Immunoassay produksi IAH Pirbright Laboratory) . Pirbright Insitute Laboratory ditetapkan sebagai laboratorium referensi Penyakit Mulut dan Kuku Dunia oleh FAO dan OIE

3.3.2. Bahan acuan kontrol negatif

Bahan acuan kontrol negatif yang digunakan adalah plasma dari sapi yang tidak menunjukkan gejala PMK.

3.4 Contoh uji

Contoh uji PMK adalah plasma, swab, Oesophageal-Pharyngeal (OP), jaringan epitel, daging, RNA dan cDNA.

4. PERSIAPAN

4.1 KualifikasiPenguji

Penguji adalah petugas bersertifikat pengujian PCR PMK dari laboratorium referensi PMK dan ditunjuk oleh Kepala Balai. Penguji harus memahami biosafety dan biosecurity pengujian dan pembuangan limbah pengujian PMK.

4.2 Persiapan Contoh Uji

4.2.1. Sampel Plasma

Sampel disentrifus dengan kecepatan 2.000 g selama 10 menit, lalu plasma yang terbentuk dipisahkan dari endapan. Kemudian dilakukan sentrifus kembali dengan kecepatan 8.000 g selama 5 menit. Plasma yang terbentuk di bagian atas yang kemudian digunakan sebagai sampel saat ekstraksi.

4.2.2. Sampel Swab

Sampel dalam media transport berupa VTM (Viral Transport Media) atau PBS- dengan pH 7,2-7,6 divortex selama 5 menit kemudian dilakukan sentrifus dengan kecepatan 2.000 g selama 10 menit. Supernatan digunakan sebagai sampel saat ekstraksi.

4.2.3. Sampel Oesophageal-Pharyngeal (OP)

Sampel dalam media transport berupa VTM (Viral Transport Media) atau PBS- dengan pH 7,2-7,6 divortex selama 5 menit kemudian dilakukan sentrifus dengan kecepatan 2.000 g selama 10 menit. Supernatan digunakan sebagai sampel saat ekstraksi.

4.2.4. Sampel Jaringan Epitel

Sampel dalam media transport berupa VTM (Viral Transport Media) atau PBS- dengan pH 7,2-7,6 digerus kemudian dilakukan sentrifus dengan kecepatan 2.000 g selama 10 menit. Supernatan digunakan sebagai sampel saat ekstraksi.

4.2.5. Sampel Daging

Sampel dalam media transport berupa VTM (Viral Transport Media) atau PBS- dengan pH 7,2-7,6 digerus kemudian dilakukan sentrifus dengan kecepatan 2.000 g selama 10 menit. Supernatan digunakan sebagai sampel saat ekstraksi.

4.2.6. Sampel RNA

Sampel dapat langsung digunakan sebagai template PCR

4.2.7. Sampel cDNA

Sampel dapat langsung digunakan sebagai template PCR.

4.3 Preparasi Primer

4.3.1. Stock Solution Primer

Encerkkan masing-masing primer forward dan reverse menjadi 100 μ M dengan Buffer TE dan simpan dalam freezer -30°C.

4.3.2. Working solution primer

Encerkkan masing-masing primer forward dan reverse konsentrasi 100 μ M menjadi 20 μ M dengan Nuclease Free Water (NFW), disimpan dalam freezer -30°C.

4.4 Persiapan Reagen Ekstraksi

4.4.1. Carrier RNA-AVE

Tambahkan 310 μ l buffer AVE pada carrier RNA yang masih dalam bentuk kering beku, vortex, lalu aliquot dan simpan dalam freezer -30°C.

4.4.2. Buffer AW1

Tambahkan ethanol (96-100%) sebanyak 25 ml untuk konsentrat AW1 19 ml, atau ethanol (96-100%) sebanyak 125 ml untuk konsentrat AW1 95 ml.

4.4.3. Buffer AW2

Tambahkan ethanol (96-100%) sebanyak 30 ml untuk konsentrat AW2 13 ml, atau ethanol (96-100%) sebanyak 160 ml untuk konsentrat AW2 66 ml.

5. PROSEDUR

5.1 Ekstraksi RNA

5.1.1. Masukkan *Buffer AVL* (*viral lysis buffer*) sebanyak 560 µl yang mengandung carrier RNA dengan perbandingan: volume *Buffer AVL* 0,56 ml + carrier RNA-AVE 5,6 µl ke dalam tube 1,5 ml.

5.1.2. Masukkan Contoh Ujiujisebanyak 140 µl kedalam campuran *Buffer AVL* dan carrier RNA-AVE di atas dan *spin* selama 30 detik dan tambahkan 560 µl *Ethanol absolut*, vortex 15 detik, lalu lakukan *spindown* 30 detik.

5.1.3. Masukkan 630 ul larutan tersebut ke dalam *spin column* dan sentrifus dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit.

5.1.4. Buang cairan pada bagian bawah dan tambahkan 500 µl *Buffer AW1* (*Washing Buffer*) kemudian sentrifus dengan kecepatan 8.000 rpm selama 1 menit.

5.1.5. Pindahkan *Spin column* ke tabung baru dan tambahkan 500 µl *Buffer AW2*, sentrifus dengan kecepatan 14.000 rpm selama 3 menit dan pindahkan isi ke tube 1,5 ml.

5.1.6. Kemudian tambahkan 60 µl *Buffer AVE* dan inkubasi pada suhu ruang selama 1 menit lalu sentrifus dengan kecepatan 8.000 rpm selama 1 menit.

5.2 Pembuatan PCR Reaction/Master Mix, Penambahan Template dan Amplifikasi DNA

5.2.1. Lakukan pembuatan PCR Reaction Mix dalam PCR Cabinet dan dalam keadaan dingin

5.2.2. Siapkan tabung PCR, contoh yang akan diuji dan bahan acuan kontrol positif dan kontrol negatif.

5.2.3. Siapkan tabung untuk PCR Reaction Mix dan masukkan reagen 2X Reaction Mix sebanyak 12,5 µl dikalikan jumlah reaksi.

5.2.4. Tambahkan reagen H₂O sebanyak 7,5 µl dikalikan jumlah reaksi.

5.2.5. Tambahkan primer Forward 20 µM sebanyak 0,5 µl dikalikan jumlah reaksi.

5.2.6. Tambahkan primer Reverse 20 µM sebanyak 0,5 µl dikalikan jumlah reaksi.

5.2.7. Tambahkan reagen *Superscript III RT Platinum Taq Mix* sebanyak 1 µl dikalikan jumlah reaksi.

5.2.8. Tabung yang sudah berisi PCR Reaction Mix sebanyak 22 µl dibagi ke sejumlah tabung PCR yang sudah disiapkan.

5.2.9. Tambahkan RNA template (Contoh Uji uji / kontrol positif / kontrol negatif) sebanyak 3 μ l ke dalam tabung PCR yang sudah berisi PCR Reaction Mix 22 μ l sehingga jumlah total menjadi 25 μ l.

5.2.10. Vortex agar tercampur homogen.

5.2.11. Lakukan *spin down* dengan mesin *spindown*.

Reagen	Volume untuk 1 reaksi	Volume untuk (x) reaksi
NFW	7,5 μ l	μ l
2X Reaction Mix	12,5 μ l	μ l
<i>Superscript III RT Platinum Taq Mix</i> Enzyme	1 μ l	μ l
Forward primer 5'-GCCTG-GTCTT-TCCAG-GTCT-3'	0,5 μ l	μ l
Reverse primer 5'-CCAGT-CCCCT-TCTCA-GATC-3'	0,5 μ l	μ l
Total volume	22 μ l	μ l
Template	3 μ l	

5.3 Amplifikasi

Masukkan ke dalam mesin thermocycler dengan program sebagai berikut:

- 1x suhu 42°C selama 60 menit
- 1x suhu 94°C selama 5 menit
- 30x suhu 94°C selama 1 menit, suhu 55°C selama 1 menit,
 suhu 72°C selama 2 menit
- 1x suhu 72°C selama 7 menit
- Hold* suhu 4°C ∞

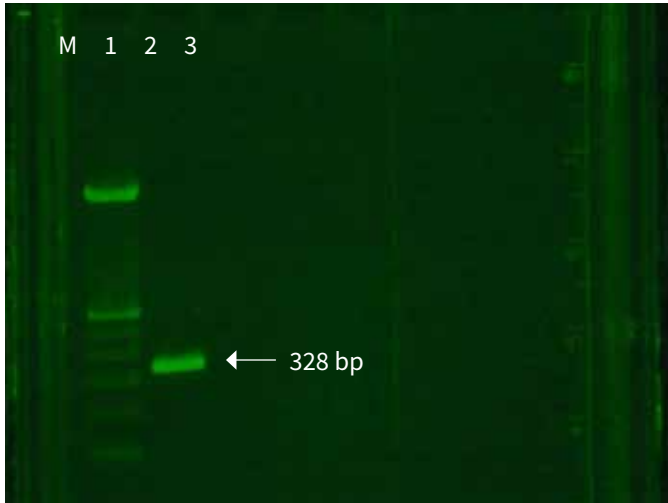
5.4 Elektrophoresis

Pembuatan Gel Elektroforesis dan Running Gel Elektroforesis

- 5.4.1. Timbang agarose sebanyak 1 gram.
- 5.4.2. Tuang ke dalam tabung / gelas erlenmeyer 250 ml.
- 5.4.3. Tambahkan 100 ml 1x TBE Buffer.
- 5.4.4. Didihkan sampai larut dalam microwave selama ± 4 menit, sambil sesekali digoyang untuk meyakinkan terlarut dengan merata.
- 5.4.5. Dinginkan agarose sampai suhu sekitar 60 °C dalam suhu kamar
- 5.4.6. Tambahkan 10 μ l SybrSafe dalam 100 ml agar pada larutan agarose dan tuang dalam tray yang telah dipasang sisir.
- 5.4.7. Biarkan agarose gel sampai mengeras lalu masukkan ke dalam elektroforesis *chamber*
- 5.4.8. Tuang TBE Buffer 1X dalam *chamber* sampai gel terendam seluruhnya
- 5.4.9. Masukkan marker sebanyak 2 μ l dalam 18 μ l *Loading Dye* lalu masukkan ke dalam well agarose paling kiri.
- 5.4.10. Masukkan campuran 5 μ l kontrol negatif, produk PCR dan kontrol positif masing-masing dalam 10 μ l *Loading Dye* ke dalam well agarose dimulai dari kontrol negatif kemudian contoh uji dan terakhir kontrol positif.
- 5.4.11. Buat catatan urutan contoh uji untuk setiap well.
- 5.4.12. Tutup *chamber*, kemudian hubungkan dengan power supply.
- 5.4.13. Nyalakan power supply pada posisi 100 volt selama 30 – 45 menit, lalu matikan
- 5.4.14. Nyalakan komputer *Gel Documentation*, dan nyalakan kamera.
- 5.4.15. Masukkan gel hasil running ke dalam *Gel Documentation* dan nyalakan power dan UV pada *Gel Documentation*.
- 5.4.16. Klik “Capture” yang ada pada komputer untuk memotret hasil running gel
- 5.4.17. Beri nama dan keterangan file hasil pemotretan dan simpan dalam file komputer
- 5.4.18. Hasil positif menunjukkan adanya *band* yang jelas pada posisi 328 bp.

6. HASIL

Contoh uji dinyatakan positif apabila terlihat *band* yang jelas pada posisi 328 bp yang sesuai dengan bahan acuan kontrol positif.



Keterangan :

- M : Marker
- 1 : Kontrol positif
- 2 : Kontrol negatif
- 3 : NTC

7. RETENSI DAN PEMUSNAHAN / BIOSAFETY & BIOSECURITY

Contoh original (plasma, swab, Oesophageal-Pharyngeal (OP), jaringan epitel, daging, RNA dan cDNA) yang diterima di simpan di suhu -20°C (freezer) sampai contoh di uji.

7.1 Contoh dengan hasil uji negatif dimusnahkan 6 (enam) bulan setelah pengujian.

Apabila terdapat contoh dengan hasil positif maka dikoleksi dan disimpan pada -80°C (Deep Freezer) atau dimusnahkan sesuai dengan perjanjian.

7.2 Contoh RNA hasil ekstraksi di simpan di freezer -20°C . Apabila terdapat contoh RNA dengan hasil uji positif maka dikoleksi dan disimpan di suhu -80°C (Deep Freezer).

Musnahkan contoh original dengan autoclave dan incinerator. Sedangkan contoh RNA Negatif dapat langsung dimusnahkan di incinerator.

8. JAMINAN MUTU/QUALITY ASSURANCE

Setiap pengujian wajib menyertakan paling sedikit 1(satu) control positif, 1 (satu) control Negatif dan 1 (satu) NTC (NonTemplate Control). Hasil pengujian dicatat dalam sebuah lembar kerja pengujian laboratorium dengan mencantumkan jenis Kontrol positif dan negatif yang digunakan.

Hasil band control positif dari setiap pengujian dicatat dan dievaluasi secara berkala apakah kontrol yang digunakan masih dapat di gunakan dalam pengujian atau harus di lakukan perubahan.

9. LAMPIRAN

Dalam lampiran ini dapat dituliskan formula-formula cara pembuatan bahan-bahan yang diperlukan (bila ada)

10. LEMBAR KERJA

Lembar Kerja Konvensional PCR

Untuk deteksi virus PMK

Nomor Epi :
 Tanggal terima :
 Kode Lab :
 Tanggal pengujian :
 Jumlah contoh uji :
 Penguji :
 Penyelia :
 Jenis contoh uji :
 Jenis Hewan :
 Operator Input Data :
 Kondisi contoh uji :

Identifikasi Reagen

Kit Ekstraksi DNA/RNA: Nama Kit
 Produksi.....
 batch No.....Tgl expired.....
 Kit Master Mix: Nama Kit
 Produksi.....
 batch No..... Tgl expired.....
 Agarose: Produksi
 batch No.....Tgl expired
 Primer yang digunakan:

 Bahan Acuan control positif (NQC/IQC): Produksi.....
 batch No
 Kesimpulan Reagen:

Pengujian

Ekstraksi

Tanggal ekstraksi RNA/DNA

.....

Master Mix

Komponen	Volume 1x reaksi	Volume.....x reaksi
Total volume		

Hasil

Positif jika muncul pita DNA spesifik seperti control positif

NO	NO EPI	KODE LAB	ASAL CONTOH	HASIL	CATATAN
dst					

Kesimpulan

.....
.....

Saran

.....
.....

Tanggal

Penguji

Penanggung Jawab Lab

.....

.....



Food and Agriculture
Organization of the
United Nations



USAID
FROM THE AMERICAN PEOPLE