

DETEKSI VIRUS CLASSICAL SWINE FEVER DENGAN METODA POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

KETUT KARUNI N. NATIH¹, GATOT, M. MOEDIJONO¹, TATTY SYAFRIATI²,
A. SAROSA², ENDANG SUSANTO¹ DAN SYAMSUL BAHRI SIREGAR¹

1. Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan, Gunung Sindur-Bogor 16340

2. Balai Penelitian Veterinary, Bogor

ABSTRACT

Classical Swine Fever (CSF) is highly contagious viral disease of swine. The CSF virus (Hog Cholera Virus) is taxonomized as RNA virus of Pestivirus genus.

In 1995-1996, there was an outbreak in Indonesia and had caused great economic losses in pig farm industries. At present, in viro amplification of nucleic acid by Polymerase Chain Reaction (PCR) is mostly used by the researcher since this method is more sensitive, specific and faster than previous methods. In this study Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) method was used to detect RNA virus of Classical Swine Fever.

Some specimen of swine organs and sera were taken from slaughter house and some of outbreak areas. Collected samples were isolated for RNA by phenol method DNA complementation was synthesized with specific primer and then continued by amplification of Polymerase Chain Reaction. Specific primer (324/326) gave an agarose electrophoretic fragment result in position 288 bp for pestivirus genus. PCR method was found to be easy, efficient and relatively less time consumed to diagnose Hog Cholera.

PENDAHULUAN

Classical Swine Fever (CSF) adalah penyakit babi yang disebabkan oleh virus yang sangat menular (Anonimus, 1981) CSF disebut juga pes babi, pest porcine classique, europaiseche schweinepest, hog cholera (Ressang, 1988), pestis suum, dan sampar babi (Anonimus, 1981). Penyakit dapat berlangsung akut, sub akut, menahun, atau sub klinis (Ressang, 1988). Penyakit ini sangat cepat menyebar dan merupakan penyakit pada babi yang sangat penting karena mempunyai morbiditas dan mortalitas yang tinggi (Unruh, 1996).

Penyebab penyakit CSF adalah virus yang termasuk dalam famili Flaviridae dan genus Pestivirus. Virus CSF merupakan virus ribonucleid acid (RNA) yang berantai tunggal (Ressang, 1988).

Wabah pertamakali dilaporkan di Ohio (USA) pada tahun 1830. Pada saat ini SCF merupakan penyakit yang sudah menyebar ke seluruh dunia, tetapi ada beberapa negara yang masih bebas, yaitu Australia, Kanada, Inggris, Islandia, Irlandia, Selandia baru, kumpulan negara-negara Skandinavia, Swiss dan Amerika Serikat (Ishikawa, 1996).

Di Indonesia telah terjadi wabah CSF pada tahun 1995 dan 1996 (Anonimus, 1995). Menurut sejarah, kejadian penyakit ini dimulai dari Medan kemudian menyebar ke daerah-daerah lain sehingga merugikan industri peternakan babi (Syafriati, 1996).

Di Indonesia penyakit ini masih belum dipelajari secara mendalam oleh karena masih merupakan penyakit relatif baru dan disadari kemudian bahwa penyakit ini sangat merugikan karena menyerang sejumlah besar ternak rakyat maupun komersial yang kerugiannya sudah

sedemikian besar dan tidak terhitung jumlahnya (Syafriati, 1996).

Berdasarkan gejala klinis, patologi anatomi dan ditinjau dengan sejarah kejadian penyakit serta hasil pemeriksaan laboratoris disimpulkan bahwa penyakit tersebut adalah penyakit CSF (Syafriati, 1996). Untuk lebih memperkuat hasil yang telah diperoleh perlu adanya suatu metoda yang dapat mendeteksi dengan mudah, cepat, dan spesifik terhadap adanya virus CSF, sehingga diperoleh hasil yang lebih akurat.

Metoda Polymerase Chain Reaction (PCR) mampu mendeteksi adanya DNA spesifik pada virus yaitu dengan cara mengamplifikasi fragmen DNA. Metoda ini melibatkan proses amplifikasi fragmen DNA secara eksponensial dalam waktu yang relatif singkat sehingga mempunyai sensitifitas yang tinggi.

MATERI DAN METODA

Materi

Sebelas sampel organ babi diperoleh dari Rumah Potong Hewan Kapuk Jakarta Barat dan beberapa daerah wabah, yaitu Sulawesi (Toraja dan Palopo), Riau, dan Sumatera Barat (Padang). Lima sampel serum babi diambil dari babi sakit di Toraja.

Sebagai kontrol positif digunakan vaksin hidup hog cholera produksi Nisseiken Jepang (strain GPE) dan produksi Malaysia (strain China).

Metoda

1. Perlakuan Spesimen

Masing-masing organ babi digerus dan dihomogen-

genkan dengan medium yang mengandung antibiotik sampai menjadi suspension 10%. Sedangkan untuk serum, darah dipisahkan dan dinaktifasi dalam penangas air dengan suhu 56°C selama 30 menit.

2 Isolasi RNA

Metoda yang digunakan adalah phenol/guanidine isothiocyante. Sebanyak 250 µl sampel ditambahkan kedalam 750 µl Trizole LS reagent (Gibco BRL) dan disimpan selama 5 menit pada suhu kamar. Kemudian ditambah 200 µl chloroform dan dicampur/digoyangkan dengan tangan. Setelah itu disentrifugasi pada 14.000 rpm selama 15 menit. Aqua phase dipindahkan kedalam tabung baru dan ditambah 500 µl isoprovil alkohol dan 1 µl glikogen serta disimpan pada suhu ruang selama 10 menit. Kemudian disentrifugasi pada 14.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang dan ditambah 1000 µl ethanol 75% lalu disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang dan bagian yang mengendap dikeringkan. Setelah itu campur dengan 10 µl H₂O steril. Ekstrak RNA yang terbentuk dapat disimpan pada -20°C.

3 Reaksi RT-PCR

a. Reaksi Reverse-Transkripsi (Pembentukan cDNA)

Tiap reaksi cDNA mengandung 2 µl ekstrak RNA, 4 µl 5xRTB (Promega), 2 µl 0.1 MDTT (Promega), 2 µl 10 mM dNTP (Promega), 0.5 µl Rnase inhibitor (Promega), 1 µl MMLVERTase (Promega), 1.5 anti sense primer (326) (Jepang) dan 7 µl H₂O steril. Sehingga volume akhir 20 µl. Campuran tersebut diinkubasikan dalam mesin thermocycler (Astec Program Temp. Control System/PC 700) pada 37°C selama 60 menit dan 95°C selama 5 menit. Komplemen DNA yang terbentuk dapat langsung digunakan untuk PCR atau disimpan pada -20°C.

b. Reaksi PCR

Amplifikasi cDNA dengan PCR total volume 40 µl yang mengandung 5 µl cDNA, 5 µl 10 x PCR Buffer (Promega), 4 µl 25 mM MgCl₂ (Promega), 1 µl dNTP (Promega), 0.25 µl Taq DNA Polymerase (Promega), 2 µl tiap primer (324 dan 326) (Jepang), dan 20.75 µl H₂O steril. Reaksi dilindungi dengan 30 µl mineral oil (Sigma). Campuran tersebut diinkubasikan dalam mesin thermocycler (Astec Perogram Temp. Control System/PC 700) sebanyak 35 siklus/putaran pada 95°C selama 1 menit, pada 55°C selama 1 menit, 72°C selama 1 menit dan 1 siklus pada 72°C selama 5 menit.

4. Elektrophoresis Agarosa Gel

Analisa elektrophoretik hasil PCR dapat diperoleh dengan menggunakan 2% gel agarose dalam 50 mM Tris Acetat dan 1 mM EDTA dengan pH 7.5 pada 100 V selama

45 menit. Digunakan marker 100 bp DNA ladder (Promega). Fragmen DNA yang terwarnai dengan ethidium bromide akan terlihat dengan menggunakan UV transluminator.

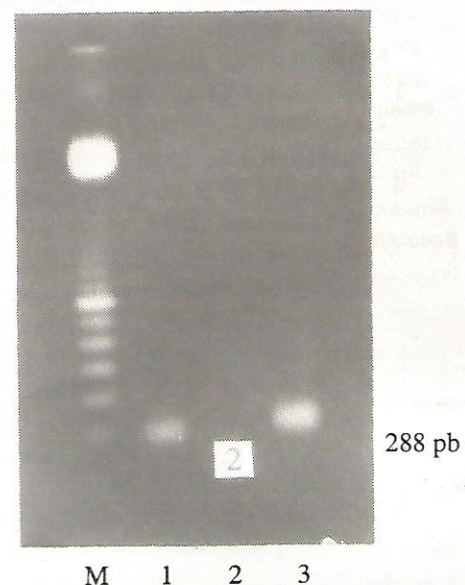
HASIL

Hasil dari pemeriksaan spesimen terhadap virus CVF dengan menggunakan metoda PCR ditunjukkan seperti pada Tabel di bawah ini.

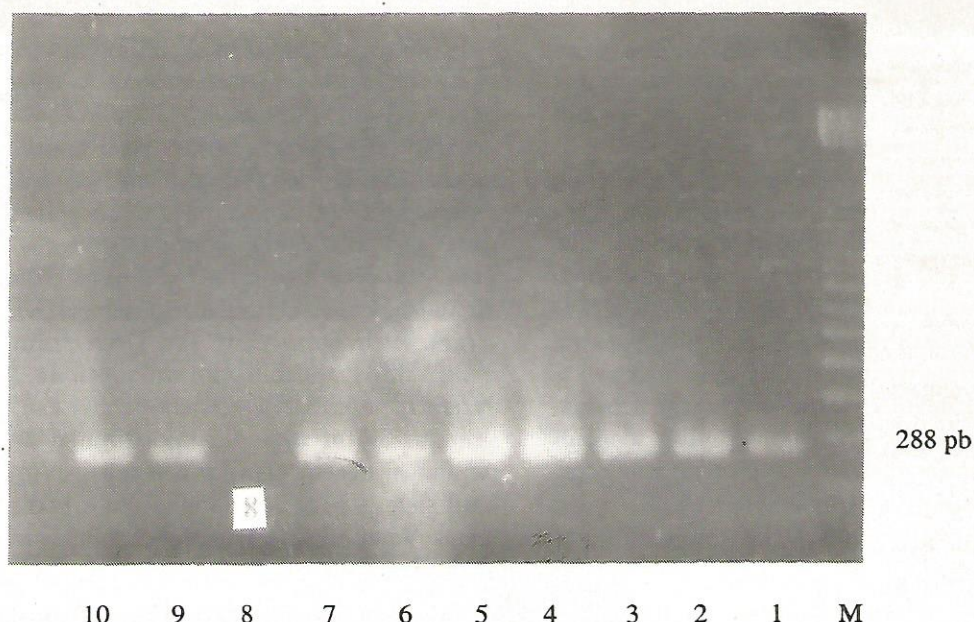
Tabel : Hasil Pemeriksaan Spesimen terhadap virus CSF dengan menggunakan metoda PCR.

No.	Lokasi Pengambilan Spesimen	Waktu	Kode Sample	Jenis Sample	Hasil
1	RPH Kapuk	Mei 1995	157/V/95	Limpa	+
2	RPH Kapuk	Mei 1995	158/V/95	Limpa	+
3	RPH Kapuk	Mei 1995	1959/V/95	Limpa	+
4	RPH Kapuk	Mei 1995	877/V/95	Limpa	+
5	Toraja	Spet 1996	A	Ginjal	+
6	Palopo	Sept 1996	B	Ginjal	+
7	Palopo	Sept 1996	C	Limpa	-
8	Riau	Sept 1996	D	Ginjal	+
9	Padang	Sept 1996	E	Limpa	+
10	RPH Kapuk	Sept 1996	F	Limpa	+
11	Toraja	Des 1996	1 (1)	Serum	+
12	Toraja	Des 1996	1 (2)	Serum	+
13	Toraja	Des 1996	1 (3)	Serum	-
14	Toraja	Des 1996	2 (1)	Serum	+
15	Toraja	Des 1996	2 (2)	Serum	+

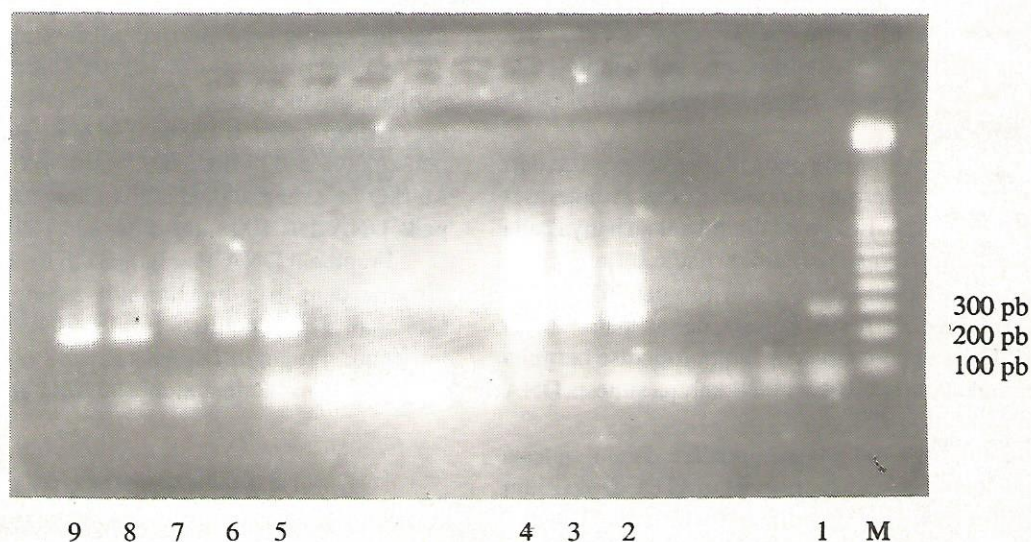
Dimaksud 15 sampel yang diuji dengan metoda PCR terdapat 13 sampel yang positif terhadap virus CSF. Fragmen DNA virus CSF yang terbentuk (pada posisi 288 pb) dapat dilihat pada Gambar 1, 2, dan 3.



Gambar 1. M = Marker; 1 = Kontrol positif (strain GPE⁻); 2 = Kontrol negatif; 3 = Kontrol positif (strain China)



Gambar 2. M = Marker, 1 = Kontrol positif (strain GPE-), 2 = 157/V/95; 3 = 158/V/95, 4 = 159/V/95; 5 = 877/V/95, 6 = A, 7 = B; 8 = C, 9 = D, 10 = E



Gambar 3. M = Marker' 1 = Kontrol positif (strain GPE-); 2 = D, 3 = E, 4 = F, 5 = 1 (1), 6 = 1 (2), 7 = 1 (3); 8 = 2 (1), 9 = 2 (2)

PEMBAHASAN

Pada tahun 1995-1996 telah terjadi wabah penyakit babi yang sangat ganas karena banyak babi yang sakit dan mati. Penyakit tersebut menyebabkan kerugian yang besar bagi peternak babi (Anonimus, 1995). Sejak dilaporkannya penyakit pada babi tersebut telah dilakukan penyidikan terhadap sejarah penyakit, gejala klinis, patologi anatomi dan pemeriksaan laboratorium. Spesimen yang diambil untuk pemeriksaan laboratorium adalah darah, feces, urin dan organ babi.

Sebelumnya belum pernah dilaporkan adanya penyakit CSF di Indonesia. Tetapi berdasarkan temuan di lapangan, gejala klinis, patologi anatomi, dengan sejarah kejadian penyakit dan pemeriksaan laboratorium bahwa penyakit yang menyebabkan wabah di peternakan babi di Kapuk Jakarta Barat adalah penyakit virus dengan dugaan kat Hog Cholera (Anonimus, 1996). Oleh sebab itu perlu mengidentifikasi virus CSF. Teknik yang telah dilakukan untuk mengidentifikasi antigen dalam spesimen adalah Flourescen Antibody Technique (FAT) dan Peroksidase-Linked Antibody; dan untuk mengidentifikasi antibodi

dalam serum adalah Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (Syafriati, 1996) Teknik tersebut diatas membutuhkan waktu yang agak lama dan kurang spesifik (Anonimus, 1981, Ressang, 1988).

Saat ini digunakanlah Polymerase Chain Reaction (PCR) yaitu suatu teknik sistesis dan amplifikasi secara in vitro. PCR digunakan untuk mengamplifikasi fragmen DNA. Keunggulan dari PCR dalam mendeteksi virus adalah tidak memerlukan biakan jaringan atau proses pembiakan sehingga hasil yang diperoleh lebih cepat serta mempunyai sensitifitas dan spesifisitas yang tinggi.

Virus CSF adalah virus RNA rantai tunggal. Sebelum amplifikasi maka molekul RNA harus diubah menjadi cDNA. Oleh sebab itu digunakan proses reverse transkripsi yaitu suatu proses yang merupakan transkripsi yang mampu mensistesis molekul DNA rantai tunggal menggunakan RNA sebagai templat. Dalam proses ini dikatalisis oleh enzim reverse transkriptase sehingga molekul rantai tunggal dapat menjadi rantai ganda.

Komponen yang diperlukan dalam PCR adalah templat rantai ganda yang mengandung DNA target yang akan diamplifikasi (templat DNA), enzim DNA polimerase, nukleotida trifosfat (keempat dNTP), dan sepasang primer oligonukleotida yang menempel pada untai pada DNA komplemennya pada awal dan akhir DNA target.

Enzim DNA polimerase yang digunakan berasal dari alam yaitu bakteri *Thermus aquaticus* (Taq Polimerase) yang telah dimurnikan. Enzim ini ditambahkan hanya pada awal proses amplifikasi jadi tidak pada setiap siklus amplifikasim dan akan tetap[stabil sampai suhu 95oC sehingga tidak akan rusak karena panas pada tahap denaturasi. Dengan penambahan Taq polimerase berguna untuk meningkatkan spesifikasi PCR karena sintesis DNA dilakukan pada suhu 72°C.

Nukleotida trifosfat yang digunakan dalam sintesis DNA adalah deoksiadenosin trifosfat (dATP), deoksitidin trifosfat (dCTP), deoksiguadin trifosfat (dGTP), dan deoksitimidin trifosfat (dTTP). Keempat nukleotida tersebut akan menempel pada gugus 3 hidroksil bebas primer membentuk rantai baru yang komplemen dengan rantai DNA templat.

Sepasang primer yang digunakan adalah primer spesifik untuk Pestivirus yaitu primer 324 dan 326 yang dipilih dari lokasi gen yag sangat terkonservasi "5 non coding/non structural coding". Kedua primer tersebut masing-masing mengenal ke-2 rantai DNA dan berfungsi menyediakan gugus hidroksil bebas pada karbon 3. Setelah kedua primer menempel pada DNA templat, Taq DNA polimerase mengkatalisis proses perpanjangan kedua primer tersebut dengan ditamhakkannya nukleotida trifosfat yang komplemen dengan urutan nukleotida templatnya.

Untuk menghasilkan produk DNA, PCR mengalami banyak siklus. Siklus tersebut mempunyai tiga reaksi yang berurutan yaitu denaturasi templat, annealing yaitu penempelan pasangan primer pada rantai ganda DNA target, dan extension yaitu pemanjangan atau polimerasi. Denaturasi DNA templat pada siklus pertama dilakukan pada suhu 95°C untuk memisahkan kedua rantai DNA genom secara sempurna, sehingga pada saat suhu diturunkan kedua primer dapat menempel pada rantai DNA target. Pada suhu 72°C Taq DNA polimerase akan mengkatalis penambahan nukleotida. Pada siklus pertama, target DNA jumlahnya dua kali dari jumlah semula. Siklus diulangi lagi dimulai dengan tahap denaturasi, penempelan dan pemanjangan primer. Produk hasil sintesis pada akhir setiap siklus berfungsi sebagai tempat untuk siklus selanjutnya, sehingga fragmen DNA akan diamplifikasi secara eksponensial. Jumlah siklus biasanya 23-35 kali (35 kali). Siklus lebih dari 35 kali tidak akan meningkatkan jumlah produk yang diinginkan. Pada akhir PCR akan diperoleh amplikasi sebanyak 106 - 109 kali dari jumlah DNA target awal.

Setelah amplifikasi fragmen DNA selesai, maka ukuran panjangnya dapat ditentukan dengan menggunakan 2% gel agarosa melalui proses elektrophoresis. Agar panjang fragmen hasil amplifikasi DNA dapat diketahui, maka digunakan frafmen DNA marker yang ukuran panjangnya sudah diketahui, yaitu 100 bp DNA ladder. Marker ini sanngat ideal untuk mengetahui ukuran rantai pada DNA dari 100 sampai dengan 1500 pb.

Fragment DNA agar tampak di baah sinar ultraviolet diwarnai dengan ethium bromida, sehingga dengan mudah kita akan dapat melihat band dari flagmen DNA yang terbentuk. Fragment DNA virus CSF terlihat pada posisi 288 pb, ini sesuai dengan posisi pada genus Pestivirus.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Kiyoyasu ISHIKAWA, Tekashi NAKANE, Kepala Balai Penyidikan Penyakit Hewan Wilayah IV Yogyakarta dan Kepala Balai Penelitian Veteriner Bogor serta seluruh asisten virologi Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan atas segala bantuan yang telah diberikan baik bantuan teknis maupun non teknis hingga selesainya penulisan makalah ini.

DAFTAR PUSTAKA

- ANONIMUS, 1981. Pendoman Pengendalian Penyakit Hewan Menular. Jilid III. Direktorat Kesehatan Hewan. Direktorat Jenderal Peternakan. 49-50.

- ANONIMUS. 1995. Penyidikan Kasus Penyakit Babi di Kel. Kapuk, Kec. Cengkareng, Jakarta Barat BPPH Wilayah IV Yogyakarta dan Lab. B DKI Jakarta. Direktorat Bina Kesehatan Hewan Direktorat Jenderal Peternakan Departemen Pertanian.
- ERLICH, H.A. 1989. PCR Technology. Principles and Applications for DNA Amplification Stocktor Press. Canada.
- ISHIKAWA, K. 1996. Hog Cholera and Countermeasures Against it in Japan. National Veterinary Assay Laboratory. Japan.
- NOLAN, C. 1989. Molecular Cloning a Laboratory Manual. In vitro Aplification of DNA by the Polymerase Chain Reaction. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA. 14.2-14.9.
- RESSANG, A. A. 1998. Penyakit Viral Pada Hewan. UI-Press, Jakarta. 168-180.
- RETNONINGRUM, DS. 1996. Prinsip Dasar PCR. UBI Teknologi Farmasi. Jurusan Farmasi FMIPA. ITB. Bandung.
- SYAFRIATI, T. 1996. Sejarah Kejadian Penyakit Babi CSF di Indonesia. Pada Seminar "Penyakit CSF, Situasi Epidemik dan Upaya Penanggulangannya". Denpasar. Bali.
- SYAFRIATI, T. 1996. Tinjauan Penyakit virus Babi Classical Swine Fever (Virus CSF). Pada Seminar Penyakit CSF, Situasi Epidemiologi dan Upaya Penanggulangannya. Denpasar. Bali.
- UNRUH, D. 1996. Diagnosis and Handling of CSF. A Field Veterinarian Perspective. Disampaikan pada Diskusi Ilmiah Tentang Penyakit Pada Babi di Ragunan Pasar Minggu, Jakarta.
- VILCEK, S; HERRING, A.J.; HERRING, J.A; NETTLETON, P.F.; LOWINGS, J.P. and PATON, D.J. 1994. Pestivirus isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using Polymerase Chain Reaction and restriction endonuclease analysis. *Arch Viral.* 136:309-323.
- WIRZ, B. TRATSCHIN, J.D.; MULLER, H.L. and MITCHELL, D.B etc. (1993) Detection of Hog Cholera Virus and differentiation from other Pestivirus by PCR. *Journal of Clinical Microbiology.* 1148-1154.