

PERPUSTAKAAN
BALAI BESAR VETERINER
MAROS
28/5/2021

**Deteksi *African Swine Fever* pada Kasus Kematian Babi di Kabupaten
Manokwari Provinsi Papua Barat dengan Teknik *Real-Time Polymerase
Chain Reaction***

ST Nurul Muslinah Muhiddin, Muflihanah, Sitti Hartati Said
Balai Besar Veteriner Maros
muslinahmuhiddin@gmail.com

ABSTRAK

Teknik *real time* PCR yang digunakan dalam deteksi penyakit *African Swine Fever* (ASF) dinilai memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi serta hasil pemeriksaannya relatif lebih cepat dibanding uji serologis dan isolasi virus. Sebanyak 31 spesimen berupa organ, swab nasal, swab rektal, darah utuh dan produk asal babi dari kasus kematian babi di Kabupaten Manokwari Provinsi Papua Barat yang telah dilakukan pemeriksaan oleh Laboratorium Bioteknologi Balai Besar Veteriner Maros (BBV Maros). Pengujian seluruh spesimen menggunakan dua pasang primer yang mengamplifikasi pada target gen VP72. Sebanyak 17 spesimen menunjukkan hasil positif ASF berdasarkan pengujian *real time* PCR yang dilakukan. Metode PCR digunakan untuk deteksi ASF terutama jika spesimen sudah tidak memadai untuk diisolasi maupun deteksi antigen.

Kata kunci: ASF, PCR, VP72, babi

PENDAHULUAN

Latar Belakang

African Swine Fever (ASF) adalah penyakit infeksius yang menyerang babi domestik maupun babi hutan liar pada semua tingkatan umur dan spesies yang disebabkan oleh *African Swine Fever Virus* (ASFV). Walaupun ASF bukan merupakan zoonosis namun dampak kerugian ekonomi akibat kejadian ini sangat fatal bagi peternak dikarenakan kematian bisa mencapai 100% dan belum adanya vaksin untuk mencegah terinfeksi ternak babi dari ASF. Distribusi ASF telah meluas di lebih dari 50 negara di tiga benua yaitu Afrika, Asia, dan Eropa. Pada Agustus 2018, Tiongkok melaporkan wabah pertama ASF dan merupakan awal penyebaran yang terjadi di Asia (OIE, 2019). Dalam rilisnya, FAO menyatakan bahwa Indonesia melalui Kementerian Pertanian mengumumkan adanya wabah kematian babi di

Provinsi Sumatera Utara yang terindikasi disebabkan oleh virus ASF. Terhitung sampai Februari 2020, Kementerian Pertanian melaporkan kejadian ASF telah menginfeksi ternak babi di 21 kabupaten/kota di Sumatera Utara, 7 kabupaten/kota di Bali, dan 5 kabupaten/kota di Nusa Tenggara Timur (FAO 2020).

ASF sangat sulit dikendalikan karena virus ASF tahan terhadap lingkungan. Virus ASF dapat bertahan selama beberapa hari di dalam feses, dapat bertahan beberapa bulan di kandang yang terkontaminasi, dapat bertahan sampai 18 bulan di dalam darah, dapat bertahan selama 140 hari di dalam produk olahan daging babi, serta dapat bertahan di dalam karkas selama bertahun-tahun (Dirkeswan 2019). Virus ASF dapat menular secara langsung maupun tidak langsung terutama melalui peralatan atau alat yang terkontaminasi.

Gejala klinis ASF diantaranya adanya kemerahan di bagian telinga, abdomen, costae dan scrotum, diare berdarah, berkumpul di dalam kandang, demam (41°C), konjungtivitis, anoreksia, ataksia, paresis, kadang-kadang muntah, tidak nafsu makan, kesulitan bernafas dan sianosis pada beberapa bagian tubuh (Kementan 2020). Gejala klinis dan gambaran posmortem dari ASF memiliki kemiripan dengan *Classical Swine Fever* (CSF) dan *Porcine Dermatitis and Nephrophaty Syndrome* (PDNS) yang juga menginfeksi hewan babi (King 2003). Oleh karena itu, deteksi ASFV yang cepat dan akurat sangat penting tidak hanya untuk penerapan tindakan pengendalian dalam mencegah penyebaran ASF, tetapi juga dalam diagnosa banding dari CSF dan PDNS. Diagnosa laboratorium ASFV secara rutin dapat dilakukan dengan isolasi virus dari inokulasi leukosit babi dan kultur sumsum tulang belakang, tetapi meskipun metode ini sangat sensitif namun dibutuhkan waktu yang lama dalam pengerjaannya. Metode molekuler seperti *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dapat menjadi alternatif uji yang cepat untuk mendeteksi ASFV dan mungkin khususnya dapat diaplikasikan untuk spesimen berkualitas buruk atau terdegradasi dengan virus yang tidak dapat dipulihkan (King 2003).

Penelitian ini bertujuan untuk menggambarkan penggunaan *real time* PCR dalam deteksi virus ASF pada kasus kematian babi di Kabupaten Manokwari, Papua Barat yang dilaporkan pada akhir Maret 2021. Adapun gejala klinis yang ditunjukkan mengarah pada penyakit ASF di antaranya mati mendadak,

demam, tidak nafsu makan, konjungtivitis, kemerahan pada bagian abdomen dan costae serta muntah.

MATERI DAN METODE PENELITIAN

Materi

Materi yang digunakan dalam penelitian ini antara lain :

1. Spesimen berasal dari investigasi kasus kematian babi di Kabupaten Manokwari, Papua Barat berupa organ, swab nasal, swab rektal, darah utuh dan produk asal babi
2. Positif kontrol sintetik ASF 2_D produksi IDT (*Length* : 301bp ; No. Ref : 102623153)
3. Qiamp Viral DNA Mini Kit (Qiagent)
4. Alkohol absolut

Proses amplifikasi menggunakan reagen produk TaqPath 1-Step Multiplex Master Mix NO ROX (Applied Biosystems, No Ref : A28523). Adapun susunan *primer* dan *probe* yang digunakan dapat terlihat pada Tabel 1 berikut :

Tabel 1. Primer dan probe (King *et al.*, 2003)

Primer/Probe	5' to 3' sequence
Fwd	5'- CTGCTCATGGTATCAATCTTATCGA -3'
Rvs	5'- GATACCACAAGATCRGCCGT -3'
Probe	6FAM- CCACGGGAGGAATACCAACCCAGTG -TAMRA

Metode

A. Isolasi DNA

Isolasi DNA menggunakan prosedur dari kit Qiamp Viral DNA Mini Kit (Qiagent) dengan sebelumnya melakukan preparasi pada masing-masing jenis spesimen, yaitu :

a) Organ/produk olahan

Potong kecil jaringan (≤ 10 mg atau ≤ 25 mg jaringan lain) lalu tambahkan 180 μ l Buffer ATL dan 20 μ l Proteinase K dan dihomogenkan kemudian diinkubasi pada suhu 56°C sampai lisis sempurna.

b) Swab nasal & rektal

Ambil 20 μ l Proteinase K ke dalam tube 1.5 ml kemudian tambahkan cairan sampel sebanyak 200 μ l lalu homogenkan.

c) Darah utuh

Ambil 20 µl Proteinase K ke dalam tube 1.5 ml kemudian tambahkan darah berantikoagulan 5-10 µl lalu tambahkan PBS sampai volume mencapai 220 µl.

Setelah dipreparasi kemudian dilanjutkan dengan mengambil sebanyak 200 µl sampel lalu ditambahkan 200 µl Buffer AL. Campuran kemudian dihomogenkan menggunakan vortex dan spindown. Selanjutnya dilakukan inkubasi pada suhu 56°C selama 10 menit lalu dihomogenkan kembali. Kemudian tambahkan sebanyak 200 µl ethanol absolut lalu dihomogenkan. Semua larutan dipindahkan ke Qiamp Spin Column kurang lebih sebanyak 700 µl. Lakukan sentrifugasi 8000 rpm selama 1 menit. Semua cairan yang tertampung di collection tube lalu pindahkan sisa larutan ke RNeasy Spin Column kurang lebih 520 µl kemudian sentrifuse 8000 rpm selama 1 menit. Buang kembali cairan yang tertampung pada collection tube kemudian tambahkan 500 µl Buffer AW1 untuk memcuci membran spin column. Sentrifus 8000 rpm selama 1 menit lalu buang cairan pada collection tube. Sebanyak 500 µl Buffer AW2 ditambahkan lalu disentrifus 14000 rpm selama 3 menit. Semua cairan yang tertampung di collection tube kemudian di-sentrifuse 14000 rpm selama 1 menit tanpa cairan. Qiamp Spin Column kemudian dipindahkan ke collection tube yang baru dan ditambahkan 50 µl Buffer AE dan inkubasi pada suhu ruang selama 1 menit kemudian selanjutnya di-sentrifus 8000 rpm selama 1 menit. Setelah selesai, RNeasey spin column kemudian dibuang dan diberi label pada *tube* yang berisi produk DNA. Penyimpanan produk DNA dilakukan pada *freezer* -30 °C atau -80 °C untuk penyimpanan yang lebih lama.

B. Pembuatan Master Mix

Formulasi *Master Mix* yang digunakan tertera pada Tabel 2.

Tabel 2. *Master Mix* ASF

Komponen	Volume 1 Rx (µl)
Nuclease Free Water	10.75
Taqpath 1-Step Multiplex Master Mix	6.25
Primer FWD	1
Primer RVS	1
Probe ASF	1
Total Sampel	20
Template DNA	5

C. Proses Amplifikasi

Selanjutnya akan dilakukan perbanyakan (amplifikasi) target materi genetik menggunakan mesin Applied Biosystems® 7500 Real Time PCR. Pengaturan program amplifikasi yaitu menggunakan *passive reference NONE*, *reporter dye FAM* dan *quencher NONE*. Adapun *thermal cycling parameter* untuk amplifikasi DNA pada pengaturan di mesin Applied Biosystems® 7500 Real Time PCR adalah :

Satu siklus : 25 °C selama 2 menit

Satu siklus : 53 °C selama 10 menit

Satu siklus : 95 °C selama 2 menit

40 siklus : 95 °C selama 15 detik , 60 °C selama 45 detik

Interpretasi hasil amplifikasi dilihat dari nilai *cycle threshold* (ct) yaitu jika <40 maka dinyatakan positif, berada di antara 40-45 dinilai *intermediate* dan >45 bernilai negatif dan pada mesin PCR tercantum *undet.* (*undetermined*).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Laboratorium Bioteknologi BBV Maros menerima sebanyak 31 spesimen yang berasal dari investigasi kasus kematian babi di Kabupaten Manokwari, Papua Barat yang dilaporkan pada akhir Maret 2021. Sebanyak 5 dari total 6 ekor babi asal spesimen yang diambil merupakan babi betina. Pada 3 ekor babi menunjukkan gejala klinis berupa mati (2 ekor) dan demam (1 ekor). Jumlah dan jenis spesimen serta hasil uji yang dilakukan tertera pada Tabel 3.

Tabel 3. Pengujian *real time* PCR untuk deteksi ASF pada spesimen investigasi kasus kematian babi di Kabupaten Manokwari, Papua Barat

No.	Kode	♂/♀	Jenis spesimen	Gejala Klinis/Ket.	Nilai ct	Interpretasi
1	1D	Betina	Darah utuh	Sehat	34.2	Positif
2	1SN	Betina	Swab nasal	Sehat	45	Negatif
3	2JTG	Betina	Jantung	Mati mendadak	22.66	Positif
4	2HATI	Betina	Hati	Mati mendadak	23.08	Positif
5	2LIM	Betina	Limpa	Mati mendadak	23.56	Positif
6	2USUS	Betina	Usus	Mati mendadak	22.17	Positif
7	2OTOT	Betina	Otot	Mati mendadak	25.75	Positif
8	2GIN	Betina	Ginjal	Mati mendadak	24.02	Positif
9	2PARU	Betina	Paru-Paru	Mati mendadak	21.73	Positif
10	3D	Betina	Darah utuh	Demam	45	Negatif
11	3SN	Betina	Swab nasal	Demam	45	Negatif
12	3SR	Betina	Swab rektal	Demam	45	Negatif

kerangka terbuka pada 150 dan 167 kb dengan kekekalan kerangka pada 125 kb dengan ujung variabel. Bagian ujung variabel ini yang menyandikan lima famili multigen yang berkontribusi pada variabilitas genom virus. Variabilitas strain ASFV ini menyebabkan perbedaan kemampuannya dalam menyebabkan infeksi, namun saat ini hanya ada satu serotipe virus yang dapat dideteksi oleh tes antibodi (Bishop et al., 2015; Chapman et al., 2011; De Villiers et al., 2010; Portugai et al., 2015).

Analisis genetik virus ASF dapat dilakukan dengan menggunakan beberapa target gen diantaranya pp220, pp62, p72, p54, p30, dan CD2v, yang berfungsi sebagai komponen utama partikel virus dan berperan dalam perlekatan, entri, dan replikasi (Jia et al., 2017). Pengujian *real time* PCR ASF yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan primer dengan target gen P72. Penelitian Bastos et al. (2003), menunjukkan bahwa primer yang menggunakan target gen P72 dapat mengidentifikasi pengelompokan virus utama yang sama. Variasi genetik antara strain ASFV lainnya dengan genotipe p72 mencapai 9,4% berdasarkan urutan sekuen nukleotida, menunjukkan bahwa p72 adalah kandidat yang cocok untuk studi epidemiologi molekuler.

KESIMPULAN

Deteksi virus *African Swine Fever* menggunakan metode *Real-Time* PCR dengan target gen p72 dapat digunakan sebagai metode diagnosa penyakit ASF pada kejadian kasus kematian babi di Kabupaten Manokwari, Papua Barat. Dari hasil uji spesimen ditemukan sampel yang positif ASF sebanyak 17 spesimen (54.83 %) berupa darah utuh dan organ.

SARAN

Perlu dilakukan pengembangan pengujian untuk deteksi ASF seperti ELISA dan imunohistokimia dalam peneguhan diagnosa ASF. Pengambilan spesimen sebaiknya memperhatikan jenis sampel dan media transpor yang digunakan untuk keberhasilan uji yang akan dilakukan.

DAFTAR PUSTAKA

- Alejo, Ali, dkk. 2018. Jurnal. A Proteomic Atlas of the African Swine Fever Virus Particle. J. Virol. Vol. 92, Issue 23.
- Bastos, ADS, dkk. 2003. Jurnal. Genotyping field strains of African swine fever virus by partial p72 gene characterisation. Arch Virol. Vol. 148: 693–706.
- Bishop, RP, dkk. 2015. Jurnal. Comparative analysis of the complete genome sequences of Kenyan African swine fever virus isolates within p72 genotypes IX and X. Virus Genes. Vol. 50, 303–309.
- Chapman, DA, dkk. 2011. Jurnal. Genomic analysis of highly virulent Georgia 2007/1 isolate of African swine fever virus. Emerg. Infect. Dis. Vol. 17, 599–605.
- De Villier, EP, dkk. 2010. Jurnal. Phylogenomic analysis of 11 complete African swine fever virus genome sequences. Virology. Vol. 400, 128–136.
- Dirkeswan. 2019. Pedoman Kiatvetindo ASF : Kesiagaan Darurat Veteriner Indonesia Seri African Swine Fever. Direktorat Kesehatan Hewan Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan, Kementerian Pertanian RI.
- Dixon, LK, dkk. 2005. In: Virus Taxonomy, Eighth Edition. London: Elsevier/Academi Press.
- FAO. 2020. ASF situation in Asia update. Dalam http://www.fao.org/ag/aga/info/programmes/en/empres/ASF/situation_update.html diakses pada 15 November 2020.
- Jia, Ning, dkk. 2017. Jurnal. Roles of African swine fever virus structural proteins in viral infection. J Vet Res. Vol. 61, 135–143.
- Kementan. 2019. Artikel Pencegahan Penyakit African Swine Fever (ASF) di Indonesia. Dalam <https://www.pertanian.go.id/home/?show=news&act=view&id=4141> diakses pada 15 November 2020.
- King, DP, dkk. 2003. Jurnal. Development of a TaqMan® PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus. J. Virol. Methods. Vol. 107 (53–61).
- OIE. 2019. African Swine Fever (Infection with African Swine Fever Virus) Chapter 3.8.1. Dalam https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.08.01_ASF.pdf diakses pada 15 November 2020.

Portugal,Raquel, dkk. 2015.Jurnal. Related strains of African swine fever virus with different virulence: genome comparison and analysis. J. Gen. Virol.Vol. 96 (Pt 2), 408–419.

Sánchez-Vizcaíno,JM. dan Arias,M. 2012. African swine fever. In: Diseases of Swine, tenth Edition, Iowa : Iowa State University. pp.396–404.

13	4D	Betina	Darah utuh	Sehat	45	Negatif
14	4SN	Betina	Swab nasai	Sehat	45	Negatif
15	4SR	Betina	Swab rektal	Sehat	45	Negatif
16	5D	Jantan	Darah utuh	Sehat	45	Negatif
17	5SN	Jantan	Swab nasai	Sehat	45	Negatif
18	5SR	Jantan	Swab rektal	Sehat	45	Negatif
19	6D	Betina	Darah utuh	Mati mendadak	15.38	Positif
20	6JTG	Betina	Jantung	Mati mendadak	23.29	Positif
21	6HATI	Betina	Hati	Mati mendadak	20.4	Positif
22	6LIM	Betina	Limpa	Mati mendadak	18.97	Positif
23	6USUS	Betina	Usus	Mati mendadak	25.27	Positif
24	6OTOT	Betina	Otot	Mati mendadak	25.35	Positif
25	6GIN	Betina	Ginjal	Mati mendadak	23.5	Positif
26	6PARU	Betina	Paru-Paru	Mati mendadak	21.81	Positif
27	6LAM	Betina	Lambung	Mati mendadak	26.73	Positif
28	7	-	Organ Babi	Sampel pasar	45	Negatif
29	8	-	Sosis babi	Sampel supermarket	45	Negatif
30	9	-	Daging babi matang dalam kemasan	Sampel supermarket	45	Negatif
31	10	-	Olahan daging babi dalam kaleng	Sampel supermarket	45	Negatif

Pada pengujian ini, sebanyak 31 spesimen dilakukan uji *real time* PCR menggunakan primer dengan target gen VP72. Hasil positif (ct <40) ditunjukkan pada 17 spesimen yang berasal dari 3 ekor babi. Spesimen yang menunjukkan hasil positif berupa darah utuh dan organ. Seluruh babi yang menunjukkan gejala menciri ASF seperti demam dan mati mendadak menunjukkan hasil positif sedangkan babi sehat dan sampel pasar dari produk asal babi dan olahannya seluruhnya menunjukkan hasil negatif.

African Swine Fever Virus (ASFV) adalah virus DNA kompleks *large enveloped* dengan morfologi *icosahedral*. ASFV diklasifikasikan sebagai satu-satunya anggota famili *Asfviridae* dari genus *Asfivirus* (Dixon *et al.*, 2004). Lebih dari 60 struktur protein yang diidentifikasi pada intraseluler partikel virus (200 nm) (Alejo *et al.*, 2018) dan lebih dari 100 protein terkait infeksi teridentifikasi dalam makrofag babi yang terinfeksi, dan setidaknya 50 diantaranya bereaksi dengan serum dari babi yang terinfeksi atau yang telah sembuh (Sánchez-Vizcaíno & Arias, 2012). ASFV merupakan virus DNA untai ganda dengan genom berada antara 170 dan 193 kb dan mengandung