

APLIKASI *POLYMERASE CHAIN REACTION* (PCR) DALAM DIAGNOSIS PENYAKIT *MALIGNANT CATARRHAL FEVER* (MCF) DI INDONESIA

MUHARAM SAEPULLOH dan DARMINTO

Balai Penelitian Veteriner
Jalan R.E. Martadinata No. 30, P.O. Box 151, Bogor 16114, Indonesia

ABSTRAK

Malignant catarrhal fever (MCF) adalah penyakit yang disebabkan oleh virus, menyerang sapi, kerbau dan ruminansia liar lainnya. Penyakit ini bersifat fatal ditandai dengan terjadinya proliferasi dan infiltrasi limfosit dalam jaringan, kemudian diikuti dengan nekrosis organ yang terinfeksi. Ditinjau dari virus penyebabnya, MCF dikelompokkan menjadi dua macam yaitu *wildebeest-associated* MCF (WA-MCF) yang disebabkan oleh *Alcelaphinae herpesvirus-1* (AHV-1) dan *sheep-associated* MCF (SA-MCF) yang disebabkan oleh *ovine herpesvirus-2* (OHV-2). MCF yang ada di Indonesia adalah MCF yang erat hubungannya dengan domba. Karena virus utuh SA-MCF belum pernah bisa diisolasi, maka diagnosis penyakit ini hanya didasarkan pada gejala klinis dan kelainan patologi. Keberhasilan mengisolasi segmen tertentu dari asam dioksiribosa nukleat (ADN) virus SA-MCF dari kasus-kasus SA-MCF pada kelinci, rusa dan sapi memungkinkan para peneliti untuk mempelajari sekuen dari segmen ADN tersebut dan mengembangkannya sebagai suatu teknik diagnosis. Melalui perkembangan teknik biologi molekuler, kemudian berhasil dikembangkan suatu teknik *polymerase chain reaction* (PCR) untuk mendeteksi adanya segmen ADN virus SA-MCF pada organ-organ yang terserang. Publikasi ini mengulas aplikasi teknik PCR dalam diagnosis SA-MCF di Indonesia.

Kata kunci : MCF, PCR, diagnosis, sapi, kerbau

ABSTRACT

APPLICATION OF *POLYMERASE CHAIN REACTION* (PCR) IN DIAGNOSIS OF *MALIGNANT CATARRHAL FEVER* (MCF) IN INDONESIA

Malignant catarrhal fever (MCF) is a fatal viral disease of cattle, buffalo and other ruminants characterized by proliferation and infiltration of lymphocytes and followed by necroses of infected organs. According to the aetiological of the agents, MCF is classified into two types: *wildebeest-associated* MCF (WA-MCF) which is caused by *Alcelaphinae herpesvirus-1* (AHV-1) and *sheep-associated* MCF (SA-MCF) which is caused by *Ovine herpesvirus-2* (OHV-2). Most MCF cases in Indonesia is SA-MCF. Due to the intact virus of SA-MCF has not been able isolated, the diagnosis of this disease is based on the clinical signs and pathological changes. However, a segment of DNA virus of SA-MCF has been isolated from MCF cases in rabbit, deer, and cattle which provided an opportunity to study a DNA sequencing and led to the development of diagnostic technique based on the molecular biology, *Polymerase Chain Reaction* (PCR). The PCR technique was able to detect segments of DNA of SA-MCF virus in infected organs. This publication describes the application of PCR for diagnosis of SA-MCF in Indonesia.

Key words : MCF, PCR, diagnosis, cattle, buffalo

PENDAHULUAN

Malignant catarrhal fever (MCF) atau penyakit ingusan adalah penyakit fatal terutama menyerang sapi, kerbau dan rusa; dan menyebabkan proliferasi serta infiltrasi limfoid yang diikuti oleh nekrosis di berbagai jaringan (PLOWRIGHT, 1984). Dua macam MCF yang dikenal: (1) WA-MCF (*wildebeest-associated* MCF) yaitu MCF yang berkaitan dengan *wildebeest* (*Connochaetes* sp.), dan (2) SA-MCF (*sheep-associated* MCF), yaitu MCF yang berkaitan dengan domba (PLOWRIGHT *et al.*, 1960). WA-MCF dilaporkan terjadi di Afrika dan di kebun binatang

yang memiliki hewan *wildebeest*, sedangkan SA-MCF terjadi di seluruh dunia termasuk Afrika. Kedua tipe MCF secara klinik dan histopatologik tidak dapat dibedakan (PLOWRIGHT, 1984).

Agen penyebab WA-MCF sudah dapat diisolasi dan dinyatakan sebagai *Bovine herpesvirus-3* yang kemudian dikarakterisasi oleh REID *et al.* (1975) sebagai *Alcelaphinae herpesvirus-1* (AHV-1) (PLOWRIGHT *et al.*, 1960). Sebaliknya, virus SA-MCF sampai saat ini belum bisa diisolasi, tetapi dari kasus SA-MCF pada kelinci, rusa dan sapi di Inggris diperoleh biakan sel limfoblastoid yang infeksi (REID *et al.*, 1983). Agen SA-MCF dalam sel limfoblastoid

tersebut ada dalam bentuk episomal. Selanjutnya berdasarkan studi molekuler biologi oleh beberapa ahli, virus SA-MCF ini dinamakan *Ovine herpesvirus-2* (OHV-2) (BRIDGEN dan REID, 1991; ROIZMAN *et al.*, 1992).

Di Indonesia, MCF pertama kali dilaporkan oleh PASZOTTA pada kerbau di Kediri pada tahun 1894, dan kemudian menyebar ke Madura, Lombok dan seluruh Jawa (MANSJOER, 1954). Selanjutnya, penyakit ini dilaporkan terdapat di seluruh Indonesia kecuali di Propinsi Irian Jaya, Maluku, Kalimantan Tengah, Barat dan Selatan (PARTADIREDA *et al.*, 1988). *Sheep-associated* MCF pada domba diduga sudah sejak lama terjadi baik secara epidemiologik maupun serologik. Oleh karena itu domba berperan sebagai hewan reservoir (WIYONO *et al.*, 1996), karena wabah penyakit MCF biasa terjadi pada daerah yang populasi dombanya cukup tinggi. Secara ekonomis, penyakit ini merupakan penyakit penting, walaupun kerugian yang pasti oleh penyakit tersebut belum diketahui (DANIELS *et al.*, 1988).

Diagnosis baku kedua macam MCF hingga saat ini masih didasarkan pada gejala klinik dan kelainan patologik (LIGGITT dan DEMARTIN, 1980; PLOWRIGHT, 1984). Sementara itu, diagnosis secara serologik untuk SA-MCF belum dapat dikembangkan karena agen penyebabnya belum dapat diisolasi (HEUSCHELE, 1983). Di samping itu, upaya mengisolasi agen SA-MCF belum berhasil (PLOWRIGHT, 1984). Untuk mendiagnosis MCF dan mengetahui lebih jauh mengenai patogenesis dan epidemiologi dari SA-MCF disarankan untuk memanfaatkan teknik biologi molekuler, salah satu di antaranya adalah pemakaian teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (CAMPBELL, 1988; DANIELS *et al.*, 1988; FLANAGAN dan HOFFMAN, 1988; REID, 1988; UNRUH *et al.*, 1988).

Salah satu keuntungan pemeriksaan penyakit MCF dengan menggunakan teknik PCR, yaitu dapat digunakan untuk mengidentifikasi penyakit MCF secara dini tanpa harus membunuh hewan yang dicurigai terserang MCF. Keuntungan lain ialah teknik PCR merupakan uji yang sangat sensitif, spesifik dan cepat (BAXTER *et al.*, 1993). Meskipun demikian, uji ini memerlukan biaya yang cukup mahal bila dibandingkan dengan uji identifikasi penyakit MCF secara konvensional.

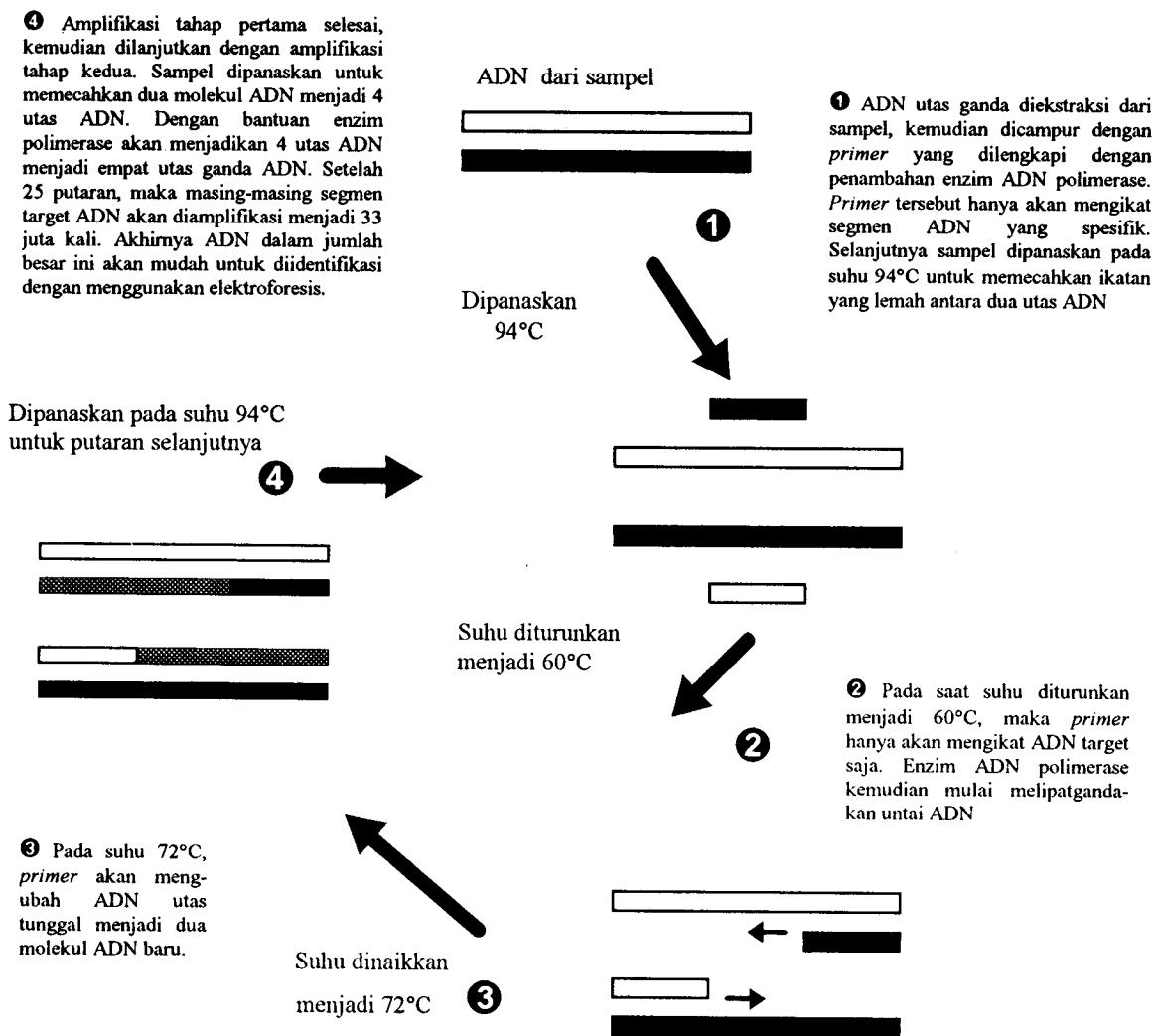
Pada kesempatan ini dikemukakan rangkuman hasil-hasil penelitian teknik pengembangan PCR untuk mendiagnosis kejadian penyakit MCF di Indonesia.

TEKNIK PCR

PCR adalah suatu teknik sintesis dan amplifikasi asam deoksiribosa nukleat (ADN) secara *in vitro*.

Proses tersebut mirip dengan proses replikasi ADN *in vivo*. PCR membutuhkan *template* untai ganda yang mengandung ADN target (ADN yang akan diamplifikasi), enzim ADN polimerase, nukleosida trifosfat, dan sepasang *primer* oligonukleotida. Untuk merancang urutan nukleotida *primer*, perlu diketahui urutan nukleotida pada awal dan akhir ADN target. *Primer* oligonukleotida tersebut disintesis menggunakan suatu alat yang disebut ADN *synthesizer*. Pada kondisi tertentu, kedua *primer* tersebut berikatan dengan untai ADN komplemennya yang terletak pada awal dan akhir ADN target. Kedua *primer* tersebut masing-masing mengenal kedua untai ADN tersebut dan berfungsi untuk menyediakan gugus hidroksil bebas pada karbon 3'. Setelah kedua *primer* berikatan dengan ADN *template*, ADN polimerase tahan panas (tahan hingga suhu 95°C) mengkatalis proses pemanjangan kedua *primer* tersebut dengan menambahkan nukleotida yang komplemen dengan urutan nukleotida *template*-nya (SAMBROOK *et al.*, 1989).

Prosedur PCR meliputi tiga tahap yang berurutan, yaitu tahap denaturasi *template*, tahap *annealing* (pengikatan) pasangan *primer* pada masing-masing untai ADN target dan tahap *extension* (polimerase) yang dikatalis oleh enzim ADN polimerase tahan panas. *Template* ADN untai ganda didenaturasi dengan panas pada suhu 94°C selama 20 detik sehingga kedua untai ADN terpisah. Setelah itu, memasuki tahap *annealing* (pengikatan) pasangan *primer* pada suhu 60°C selama 30 menit, sehingga kedua *primer* berikatan dengan masing-masing untai ADN target. Jumlah *primer* lebih banyak dari *template* sehingga kemungkinan ADN *template* berikatan dengan *primer* lebih besar daripada ADN yang berikatan dengan ADN *template* satu sama lain. Setelah *primer* berikatan dengan ADN target, ADN polimerase akan mengkatalis penambahan nukleotida yang dilakukan pada tahap *extension* (polimerasi) pada suhu 72°C selama 30 detik. Setelah inkubasi selama waktu tertentu, suhu dinaikkan kembali untuk memisahkan untai ganda yang terbentuk. Suhu kemudian diturunkan kembali sehingga kedua *primer* berikatan dengan target ADN yang kini jumlahnya dua kali lebih besar dari jumlah semula dan seluruh proses dilakukan berulang kali. Produk hasil sintesis akan berfungsi sebagai *template* untuk *primer* bebas dalam siklus selanjutnya, sehingga karena PCR dilakukan berulang-ulang hingga 25 siklus, maka fragmen ADN akan diamplifikasi secara eksponensial (Gambar 1). Setiap siklus membutuhkan lebih kurang 5 menit, sehingga seluruh proses hanya memerlukan beberapa jam (ANON., 1990; BAXTER *et al.*, 1993).



Gambar 1. Skema tahapan proses amplifikasi ADN dengan PCR (ANON., 1990)

Setelah amplifikasi, produk PCR dielektroforesis menggunakan agarosa yang mengandung Ethidium Bromida. Setelah elektroforesis, fragmen ADN dilihat di bawah sinar ultra violet (SAMBROOK *et al.*, 1989).

Teknik PCR telah banyak dipakai untuk mendeteksi berbagai macam virus yang menyerang manusia dan hewan antara lain : virus Epstein-Barr (TELENTI *et al.*, 1990) dan virus *acquire immunodeficiency syndromes* (AIDS) (GIBSON *et al.*, 1993), virus *bovine leukosis* (BRANDON *et al.*, 1991), virus penyakit kuku dan mulut (HOUSE dan MEYER, 1993), virus *infectious laryngotracheitis* (ILT) (SHIRLEY *et al.*, 1990; WILLIAMS *et al.*, 1992), virus kholera pada babi (WIRZ *et al.*, 1993), dan virus rabies (WHITBY *et al.*, 1977).

DIAGNOSIS MCF DENGAN TEKNIK PCR

Penelitian biologi molekuler pada MCF awalnya dilakukan terhadap WA-MCF, kemudian dikembangkan teknik PCR untuk deteksi virus AHV-1 (SHIH *et al.*, 1988; HSU *et al.*, 1990). Selanjutnya, teknik PCR dikembangkan untuk deteksi segmen ADN dari virus OHV-2 pada SA-MCF dan dipergunakan sebagai metode diagnosis penyakit MCF di Indonesia (BAXTER *et al.*, 1993; WIYONO *et al.*, 1994a).

Untuk mendeteksi agen penyebab MCF dengan teknik PCR dapat digunakan terhadap sampel yang diambil dari hewan yang diduga terinfeksi atau sebagai reservoir penyakit tersebut. Sampel dapat berupa sediaan usap mukosa mulut, mata, vagina domba atau

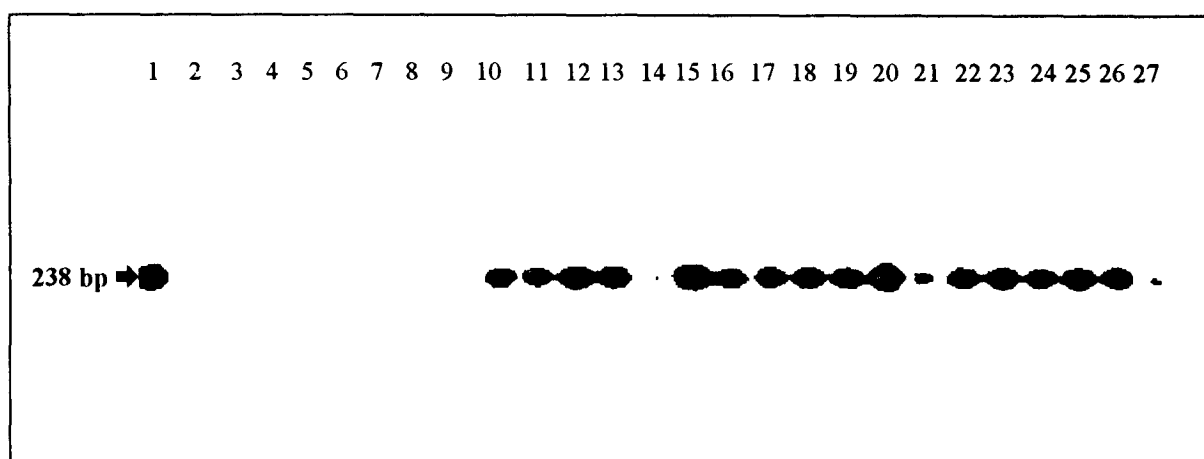
folikel bulu hewan reservoir, sedangkan untuk hewan yang dicurigai terinfeksi penyakit MCF, sampel dapat berupa organ tubuh seperti limfoglandula, otak, hati, ginjal, kornea mata, dan jantung, tanpa pengawet (segar) atau disimpan pada gliserin; dan sel darah putih perifer (*peripheral blood leucocytes*=PBL) (WIYONO *et al.*, 1994a; WIYONO *et al.*, 1994b; WIYONO *et al.*, 1995; WIYONO *et al.*, 1996)

ADN dari setiap sampel organ dan PBL di atas diekstraksi menggunakan fenol dan kloroform, kemudian diendapkan dengan etanol absolut. ADN yang diperoleh kemudian diperiksa dengan menggunakan alat spektrofotometer dengan panjang gelombang 260 nm. Selanjutnya, sampel ADN tersebut digunakan untuk uji PCR (SAMBROOK *et al.*, 1989).

Sampel usap mukosa diambil dengan cara menempelkan dan menggosokkan secara perlahan-lahan kapas steril bertangkai selama 1-2 menit pada mukosa mata, hidung, dan vagina dari hewan yang diduga terserang MCF. Kapas segera dimasukkan pada *phosphat buffered saline* (PBS) steril pada tabung *ependorf*, dikocok menggunakan *vortex* kemudian kapas bertangkai dibuang. Tabung *ependorf* disentrifugasi pada mikrosentrifuge selama 10 menit. Pelet dilarutkan dalam PBS yang mengandung 100 µg/ml *proteinase K*, dipanaskan selama 1 jam pada suhu 45°C dalam penangas air. Selanjutnya dikocok dengan *vortex*, dan *proteinase K* diinaktifkan dengan

cara diinkubasikan pada suhu 100°C selama 10 menit. Setelah dipelet pada mikrosentrifuge selama 10 menit, maka supernatan dipakai sebagai sampel ADN yang akan dideteksi dengan uji PCR (SAMBROOK *et al.*, 1989).

Dalam uji PCR, penggandaan ADN dilakukan oleh tiga jenis *primer*, yaitu *primer* 555; 556; dan 755 (Tabel 1). Menurut BAXTER *et al.* (1993) ketiga *primer* tersebut sangat spesifik untuk deteksi ADN OHV-2 yang termasuk dalam kelompok virus Herpes, tetapi tidak dapat digunakan untuk deteksi ADN yang berasal dari virus lain seperti *bovine herpesvirus-1* (BHV-1), *bovine herpesvirus-4* (BHV-4), dan *alcelaphine herpesvirus-1* (AHV-1), walaupun ketiganya tergolong ke dalam virus Herpes (Gambar 2). Oleh karena itu, uji PCR sangat spesifik. Uji PCR juga sangat sensitif karena dengan jumlah 6,4 piko gram (pg), target ADN masih dapat terdeteksi (BAXTER *et al.*, 1993). Spesifitas dan sensitifitas yang sangat tinggi pada teknik PCR dapat tercapai manakala semua dilakukan dengan benar dan optimal. Oleh karena itu terdapat beberapa hal yang harus diperhatikan untuk menghindari ketidakakuratan hasil PCR. Ketidakakuratan pada PCR disebut dengan *mis-match* atau *mis-priming* atau *mis-incorporation*. Hal ini dapat terjadi karena bahan reaksi dan/atau protokol amplifikasi tidak dalam keadaan kondisi optimal (SAMBROOK *et al.*, 1989).



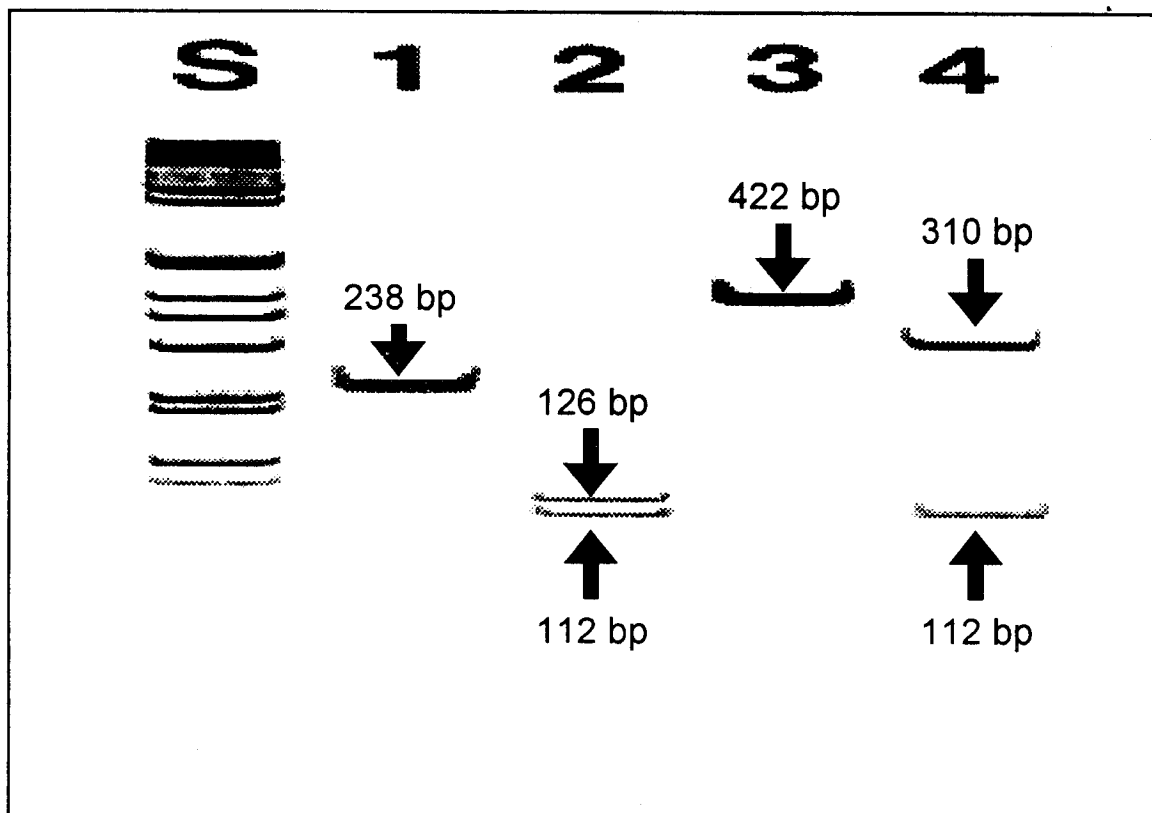
Gambar 2. Konfirmasi OHV-2 hasil amplifikasi PCR yang dilanjutkan dengan uji hibridisasi *southern blot* menggunakan [³⁵S]-dATP yang dilabel dengan *Bam* HI ADN yang berasal dari *plasmid* OHV-2 *clone* Bp4a1. 1) LCL MF 629, 2) H₂O, 3) AHV-1, 4) BHV-1, 5) BHV-4, 6) *bovine embryonic kidney*, 7) *fetal lamb muscle*, 8) RK 13, 9) *deer testis*, 10) BJ 576, 11) LCL MF 816, 12) BJ 393, 13) BJ 793, 14) BJ 773, 15) BJ 784, 16) BJ802, 17) BJ 797, 18) BJ 777, 19) BJ 716, 20) BJ 676, 21) BJ 796, 22) S1, 23) S2, 24) S3, 25) S4, 26) S5, 27) S6. No. 10 s/d 21 berasal dari kasus SA-MCF No. 23 s/d 27 berasal dari domba normal sebagai kontrol (BAXTER *et al.*, 1993)

Dalam penggandaan ADN tersebut, *primer* dirancang secara berpasangan (sepasang *nested primer*), yaitu 556/755 dan 556/555. Pasangan *primer* 556/755 menghasilkan 422 pasangan basa atau *base pairs* (bp) dan 556/555 menghasilkan 238 bp (BAXTER *et al.*, 1993; WIYONO *et al.*, 1994a). Menurut BAXTER *et al.* (1993) pasangan *primer* 556/555 dan 556/755 bila dilakukan pemotongan dengan enzim *Rsa I* maka masing-masing akan dihasilkan 2 fragmen, yaitu 310 bp, 112 bp dan 112 bp, 126 bp (Gambar 3).

Dalam reaksi penggandaan ADN tersebut, digunakan katalisator yang tahan panas, yaitu enzim *ADN polymerase* (SAIKI *et al.*, 1988). Setiap reaksi penggandaan mengandung 50 µl reagen campuran (*master mix*) yang terdiri dari 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0,01 % v/v/ gelatin, 10 % v/v *dimethyl sulfoxida* (DMSO), 200 µM *deoxyadenosine trisulphat* (dATP), *deoxycytosine triphosphate* (dCTP), *deoxyguanine tryphosphate* (dGTP), *deoxythymidine triphosphate* (dTTP) 1,0 µM, masing-masing *primer* dan 2 unit *Taq ADN*

polymerase. Proses penggandaan ADN yang dikatalisis oleh enzim ADN polimerase tahan panas itu disebut polimerisasi. Pada tahap ini hanya nukleotida yang komplemen dengan nukleotida pada ADN *template* yang akan digandakan oleh enzim ADN polimerase. ADN polimerase mempunyai keterbatasan, yaitu hanya dapat menggandakan nukleotida, bila terdapat gugus hidroksil bebas pada karbon 3' pada nukleotida sebelumnya. Oleh karena itu, proses polimerase memerlukan *primer* yang menyediakan gugus hidroksil tersebut.

Dalam proses penggandaan ADN, digunakan mesin *Thermal Cycle* yang suhunya telah diprogram sedemikian rupa, sehingga sesuai untuk proses penggandaan ADN virus MCF (BAXTER *et al.*, 1993). Program pengaturan suhu untuk penggandaan ADN meliputi 3 tahap, yaitu tahap denaturasi *template* ADN untai ganda (*double stranded*); tahap pengikatan *primer* (*primer annealing*) dan tahap *extension* (polimerasi) (SAMBROOK *et al.*, 1989).



Gambar 3. Analisis *Rsa I* terhadap fragmen OHV-2 hasil PCR yang menggunakan pasangan *primer* spesifik 556/555 dan 556/755. 1) 556/555 tidak dipotong, 2) 556/555 *Rsa I*, 3) 556/755 tidak dipotong, 4) 556/755 *Rsa I*, S) standar berat molekul 1 kb ladder (BAXTER *et al.*, 1993)

Pada awalnya dilakukan pemanasan *template* ADN (*free-cycle*) pada suhu 99°C selama 3 menit tanpa penambahan enzim *taq* polimerase. Kemudian dilakukan penambahan enzim *taq* polimerase sehingga memenuhi tahap denaturasi *template* ADN untai ganda pada suhu 94°C selama 20 detik sehingga kedua untai ADN terpisah. Setelah itu memenuhi tahap *annealing* (pengikatan) pasangan *primer* pada suhu 60°C selama 30 menit sehingga kedua *primer* berikatan dengan masing-masing untai ADN target. Jumlah *primer* lebih banyak dari *template* sehingga kemungkinan ADN *template* berikatan dengan *primer* lebih besar dari pada berikatan dengan ADN *template* satu sama lain. Setelah *primer* berikatan dengan ADN target, ADN polimerase akan mengkatalisis penambahan nukleotida yang dilakukan pada tahap *extension* (polimerasi) pada suhu 72°C selama 30 detik (SAMBROOK *et al.*, 1989; BAXTER *et al.*, 1993). Proses penggandaan diulang-ulang mulai dari tahap denaturasi, pengikatan *primer* hingga *extension* sebanyak 25 siklus. Proses penggandaan di atas menggunakan pasangan *primer* 556/755. Kemudian 2% (v/v) dari reagen hasil penggandaan tadi, dipindahkan ke campuran reagen (*master mix*) yang mengandung pasangan *primer* 556/555. Selanjutnya, dilakukan proses penggandaan ADN seperti di atas sebanyak 25 siklus. Akhirnya, penggandaan ADN dilanjutkan dengan tahap *extension* akhir pada suhu 72°C selama 5 menit. Produk hasil sintesis ADN di atas, akan berfungsi sebagai *template* untuk *primer* bebas dalam siklus selanjutnya. Karena PCR dilakukan berulang-ulang, maka fragmen ADN akan diperbanyak secara eksponensial (SAMBROOK *et al.*, 1989; BAXTER *et al.*, 1993; WIYONO *et al.*, 1996).

Tabel 1. Primer OHV-2 untuk mendiagnosis agen penyebab MCF dengan uji PCR

Primer	Runutan basa
556	5'- AGTCTGGGTATATGAATCCAGATGGCTCTC -3'
555	5'- TTCTGGGGTAGTGGCGAGCGAAGGCTTC -3'
755	5'- AAGATAAGCACCAGTTATGCATCTGATAAA -3'

Keterangan :

A: Adenin, T: Timin, C: Cytosin, dan G: Guanin

Sumber : BAXTER *et al.* (1993)

Hasil perbanyakkan ADN di atas (total 5%), divisualisasi secara langsung dengan menggunakan 1,8% *agarose gel electrophoresis* dan *ethidium bromida fluorescence*. Hasilnya kemudian dibaca di bawah sinar ultra violet (UV viewer) (BAXTER *et al.*, 1993; WIYONO *et al.*, 1996).

APLIKASI PCR UNTUK DIAGNOSIS MCF DI INDONESIA

Di Indonesia, uji PCR untuk mendiagnosis penyakit MCF sudah dimanfaatkan terhadap beberapa kasus MCF pada kerbau dan sapi Bali, baik dari kasus alami (Tabel 2) maupun kasus asal penularan buatan seperti yang terlihat pada Tabel 3 (WIYONO *et al.*, 1994a).

Tabel 2. Hasil pemeriksaan PCR terhadap spesimen yang berasal dari hewan yang secara alami sakit

No.	Nomor hewan	Spesies	Jenis sampel	Hasil uji PCR
1.	347	Kerbau	LN	-
2.	505	Kerbau	LN	+
3.	226	Kerbau	PBL	+
4.	414	Kerbau	PBL	-
5.	295	Kerbau	PBL	+
6.	159	Kerbau	PBL	+
7.	157	Kerbau	LN	-
8.	171	Kerbau	LN	+
9.	448	Kerbau	LN	-

Keterangan :

LN : Limfoglandula

PBL : sel darah putih perifer

Sumber : WIYONO *et al.* (1995)

Tabel 3. Hasil pemeriksaan PCR terhadap spesimen dari kerbau dan sapi Bali yang diinfeksi dengan darah kerbau yang positif terserang MCF

No.	Nomor hewan	Jenis hewan	Sumber infeksi buatan	Jenis sampel	Hasil uji PCR
1.	505	Kerbau	kasus alami Balitnak	LN	+
2.	63	Sapi Bali	asal hewan no. 505	PBL	+
3.	66	Sapi Bali	asal hewan no. 63	PBL	+
4.	36	Kerbau	asal hewan no. 63	PBL	+
5.	38	Kerbau	asal hewan no. 36	PBL	+
6.	55	Sapi Bali	asal hewan no. 36	PBL	+

Keterangan :

LN : limfoglandula

PBL : sel darah putih perifer

Sumber : WIYONO *et al.* (1995)

Di samping itu, uji PCR telah dipergunakan untuk deteksi *Ovine herpesvirus-2* (OHV-2) pada sel darah putih perifer induk dan anak domba (BAXTER *et al.*,

1993; WIYONO *et al.*, 1994a). Selanjutnya WIYONO *et al.* (1996) juga telah mempergunakan uji PCR untuk mendeteksi OHV-2 pada sediaan usap mukosa hidung, mata dan vagina serta folikel bulu anak dan induk domba. Sungguhpun mekanisme penyebaran OHV-2 yang pasti dari domba ke sapi atau ke kerbau belum jelas, akan tetapi virus SA-MCF dalam sekresi tersebut sangat potensial untuk menyebarkan penyakit MCF. Akhir-akhir ini, WIYONO *et al.* (1998) telah berhasil mengembangbiakkan sel lestari limfoblastoid (*lymphoblastoid cell line*=LCL) yang berasal dari biakan jaringan kornea mata sapi dan kerbau asal kasus MCF dari daerah Banyuwangi, ternyata sel LCL tersebut membawa informasi genetik virus penyebab SA-MCF, dan setelah dilakukan uji PCR ternyata diidentifikasi sebagai OHV-2. Dari penelitian tersebut dilaporkan bahwa dari biakan LCL yang diperoleh dapat dimanfaatkan sebagai bahan pembuatan vaksin rekombinan MCF. Dengan demikian, teknik PCR merupakan langkah awal untuk memulai penelitian variasi genetik terhadap agen penyebab penyakit MCF (OHV-2) pada sapi atau kerbau yang dicurigai terserang penyakit MCF di beberapa daerah di Indonesia. Dengan teknik tersebut, dapat diketahui persamaan atau perbedaan genetik agen penyebab penyakit MCF tersebut di daerah yang satu dengan daerah yang lain.

KESIMPULAN

Berdasarkan uraian di atas dapat disimpulkan bahwa teknik PCR dapat dipergunakan untuk mendeteksi OHV-2 secara dini pada hewan yang dicurigai maupun hewan yang sudah jelas gejala kliniknya. Dengan menggunakan pasangan *primer* yang spesifik terhadap OHV-2, maka hasil uji PCR merupakan teknik yang tepat untuk diagnosis penyakit yang gejala kliniknya sama dengan penyakit lain pada hewan yang dicurigai.

DAFTAR PUSTAKA

ANONIMOUS. 1990. Applying new technology to disease diagnosis. In: Australian Animal Health Laboratory. CSIRO, Australia. *Newsletter* 4:5.

BAXTER, S.I.F., I. POW, A. BRIDGEN, and H.W. REID. 1993. Polymerase chain reaction detection of the sheep-associated agent of malignant catarrhal fever. *Arch. Virol.* 132:145-159.

BRANDON, R. B., H. NAIF, R. C. W. DANIEL, and M. F. LAVIN. 1991. Early detection of bovine leucosis virus DNA in infected sheep using the polymerase chain reaction. *Res. Vet. Sci.* 50:89-94.

BRIDGEN, R.B. and H.W. REID. 1991. Derivation of a DNA clone corresponding to the viral agent of sheep-associated malignant catarrhal fever. *Res. Vet. Sci.* 50:38-44.

CAMPBELL, R.S.F. 1988. The pathology of malignant catarrhal fever. In: *Malignant Catarrhal Fever in Asian Livestock*. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra. pp.64-67.

DANIELS, P.W., SUDARISMAN, A. WIYONO, and P. RONOHARDJO. 1988. Epidemiological aspects of malignant catarrhal fever in Indonesia. In: *Malignant Catarrhal Fever in Asian Livestock*. Australian centre for International Agricultural Research, Canberra. pp. 20-31.

FLANAGAN, M. and D. HOFFMANN. 1988. Malignant catarrhal fever research in Queensland. In: *Malignant Catarrhal Fever in Asian Livestock*. Australian centre for International Agricultural Research, Canberra. pp.64-67.

GIBSON, K.M., J. MORI, and J.P. CLEWLEY. 1993. Detection of HIV-1 in serum, using reverse transcription and the polymerase chain reaction (RT-PCR). *J. Virol. Methods* 43:101-110.

HEUSCHELE, W.P. 1983. Diagnosis of malignant catarrhal fever due to alcelaphine herpesvirus-1. *Proceedings 11: International Symposium Veterinary Laboratory. Diagnostic.* pp. 707-713.

HOUSE, C. and R.F. MEYER. 1993. The detection of foot and mouth disease virus in oesophageal-pharyngeal samples by a polymerase chain reaction technique. *J. Virol. Methods* 43:1-6.

HSU, D., L.M. SHIH, A.E. CASTRO, and Y.C. ZEE, 1990. A diagnostic method to detect alcelaphine herpesvirus-1 of malignant catarrhal fever using the polymerase chain reaction. *Arch. Virol.* 114: 259-263.

LIGGITT, H. D. and J. C. DEMARTIN. 1980. The pathomorphology of malignant catarrhal fever. I. Generalized lymphoid vasculitis. *Vet. Pathol.* 17:58-73.

MANSJOER, M. 1954. Penyelidikan Tentang Penyakit Ingusan Pada Sapi dan Kerbau di Indonesia, Terutama di Pulau Lombok. Tesis PhD. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Indonesia, Bogor.

PARTADIREDJA, M., I.G. SUDANA, and SUSILO. 1988. Malignant catarrhal fever in Indonesia. In: *Malignant Catarrhal Fever in Asian Livestock*. Australian centre for International Agricultural Research, Canberra. pp. 14-18.

PLOWRIGHT, W. 1984. Malignant catarrhal fever virus: A lymphotropic herpesvirus of ruminants. G. WITTMANN, R.M. GASKELL H.J. RHIZA (Eds). In: *Laten Herpesvirus Infections in Veterinary Medicine*, Martinus Nijhoff Publisher, Boston, pp. 279-305.

- PLOWRIGHT, W., R.D. FERRIS, dan G.R. SCOTT. 1960. Blue wildebeest and the aetiological agent of bovine malignant catarrhal fever. *Nature* 188: 1167-1169.
- REID, H.W. 1988. Current malignant catarrhal fever research in the United Kingdom. In : *Malignant Catarrhal Fever in Asian Livestock*. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra. pp.98-102.
- REID, H.W., D. BUXTON, I. POW, J. FINLAYSON, and E.L. BERRIE. 1983. A cytotoxic T-lymphocyte line propagated from a rabbit infected with sheep-associated malignant catarrhal fever. *Res. Vet. Sci.* 34: 109-113.
- REID, H.W., W. PLOWRIGHT, and L.W. ROWE. 1975. Neutralizing antibody to herpesviruss derived from wildebeest and hartebeest in wild animals in East Afrika. *Res. Vet. Sci.* 18:269-273.
- ROIZMAN, B., R.C. DESROSIERS, B. FLECKENSTEIN, C. LOPEZ, A.C. MINSON, and M.J. STUDDERT. 1992. The family herpesviridae an update. *Arch. Virol.* 123: 425-449.
- SAIKI, R.K., D.H. GELFAND, S. STOFFEL, S.T. SCHARF, R. HIGUCHI, G.T. HORN, K.B. MULLIS, and H.A. ERLICH. 1988. Primer detection enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- SAMBROOK, J., E.F. FRITSCH, and T. MANIATIS. 1989. *Molecular Cloning- A Laboratory Manual*. 2nd Ed. Cold Spring Harbor laboratory Press.
- SHIH, L.M., J.M. IRVING, Y.C. ZEE, and R.F. PRITCHETT. 1988. Cloning and characterization of a genomic probe for malignant catarrhal fever virus. *American J. Vet. Res.* 49: 1665-1668.
- SHIRLEY, M.W., D.J. KEMP, M. SHEPPARD, and K.J. FAHEY. 1990. Detection of DNA from infectious laryngotracheitis virus by colourimetric analysis of polymerase chain reactions. *J. Virol. Methods* 30:251-260.
- TELENTI, A., W.F. MARSHALL, and T.F. SMITH. 1990. Detection of Epstein-Barr virus by polymerase chain reaction. *J. Clinical Microbiol.* 28:2187-2190.
- UNRUH, D., B.T. AKOSO, and W. SUDARTO, 1988. The differential diagnosis of malignant catarrhal fever in Indonesia. In: *Malignant Catarrhal Fever in Asian Livestock*. Australian centre for International Agricultural Research, Canberra. pp. 77-82.
- WHITBY, J.E., P.R. HEATON, H.E. WHITBY, E. O'SULLIVAN, and P. JOHNSTONE. 1977. Rapid detection of rabies and rabies-related viruses by RT-PCR and enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Virol. Methods* 69: 63-72.
- WILLIAMS, R.A., M. BENNETT, J.M. BRADBURY, R.M. GASKELL, R.C. JONES, and F.T.W. JORDAN. 1992. Demonstration of sites of latency of infectious laryngotracheitis virus using the polymerase chain reaction. *J. General Virol.* 73: 2415-2430.
- WIRZ, B., J. D. TRATSCHIN, H. K. MULLER, and D. B. MITCHELL. 1993. Detection of hog cholera virus and differentiation from other pestiviruses by polymerase chain reaction. *J. Clinical Microbiol.* 31(5): 1148-1154.
- WIYONO, A., S.I.F. BAXTER, MUHARAM S., R. DAMAYANTI, P. DANIELS, and H.W. REID. 1994a. PCR detection of ovine herpesvirus-2 DNA in Indonesian ruminants-normal sheep and clinical cases of malignant catarrhal fever. *Vet. Microbiol.* 42: 45-52.
- WIYONO, A., S. I. F. BAXTER, R. DHARSANA, R. DAMAYANTI, MUHARAM S., M. C. PEARCE, P. W. DANIELS, SUDARISMAN, and H. W. REID. 1994b. Sheep associated malignant catarrhal fever in buffalo : An abattoir survey in West Java, Indonesia. *The Kenya Veterinarian* 18(2): 464-466.
- WIYONO, A., S.I.F. BAXTER, MUHARAM S., SUDARISMAN, R. DAMAYANTI, P.W. DANIELS, dan H.W. REID. 1995. Diagnosis malignant catarrhal fever di Indonesia dengan menggunakan teknik reaksi berantai polimerase (PCR). Prosiding Seminar Teknologi Veteriner untuk Meningkatkan Kesehatan Hewan dan Pengamanan Bahan Pangan Asal Ternak. Cisarua, Bogor 22-24 Maret 1994. Balai Penelitian Veteriner, Bogor. pp. 112-120.
- WIYONO, A., MUHARAM S., R. DAMAYANTI, dan SUDARISMAN. 1996. Teknik polymerase chain reaction untuk mendeteksi virus malignant catarrhal fever pada sediaan usap mukosa domba. Prosiding Seminar nasional Peternakan dan Veteriner. Cisarua, Bogor, 7-8 Nopember 1995. Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan, Bogor. pp. 963-996.
- WIYONO, A., MUHARAM S., dan R. DAMAYANTI. 1998. Pengembangbiakan sel lestari limfoblastoid asal kasus malignant catarrhal fever di Kabupaten Banyuwangi. Prosiding Seminar Nasional Peternakan dan Veteriner 1998, Bogor 1-2 Desember 1998. Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan, Bogor. (*in press*).