

Perkembangan Teknologi *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* dalam Mengidentifikasi Genom *Avian Influenza* dan *Newcastle Diseases*

Dyah Ayu Hewajuli dan Dharmayanti NLPI

Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl. RE Martadinata No. 30, Bogor 16114
dhewajuli@yahoo.com

(Makalah masuk 25 Oktober 2013 – Diterima 27 Februari 2014)

ABSTRAK

Virus *Avian Influenza* (AI) bersifat zoonosis dan dapat menyebabkan kematian pada manusia. Virus *Newcastle Diseases* (ND) mempunyai dampak kerugian ekonomi pada bidang perunggasan. Oleh karena itu, identifikasi dan karakterisasi virus AI dan ND secara tepat, akurat dan cepat merupakan hal penting untuk melindungi kesehatan unggas dan manusia. *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) adalah *gold standard* terbaru untuk mendeteksi genom virus AI dan ND. Saat ini, RT-PCR sudah banyak dikembangkan dalam aplikasi diagnostik rutin dan penelitian. RT-PCR merupakan teknik yang digunakan untuk mengamplifikasi sekuens genom DNA yang didahului dengan proses *reverse transcriptase* dengan metode enzimatis yang diperantarai primer. Faktor-faktor yang mempengaruhi deteksi AI dan ND dengan metode RT-PCR adalah rancangan primer dan jenis *probe*, jenis sampel, enzim, komposisi reagen, suhu dan siklus amplifikasi serta faktor teknis dan non-teknis lainnya seperti kontaminasi, keahlian dan ketrampilan petugas. Modifikasi RT-PCR konvensional dan *real time* mampu untuk meningkatkan spesifisitas dan sensitivitas pengujian tersebut.

Kata kunci: Deteksi, *Avian Influenza*, *Newcastle Disease*, RT-PCR

ABSTRACT

The Advance of Technology of Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction in Identifying the Genome of Avian Influenza and Newcastle Diseases

Avian Influenza (AI) viruses are zoonotic and caused death in humans. *Newcastle Diseases* (ND) virus has an economical impact in poultry. Therefore, the identification and characterization of AI and ND viruses that are appropriate, accurate and quick are important to protect human and poultry health. *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) was the latest gold standard to detect the genome of AI and ND viruses. Recently, RT-PCR was developed in routine diagnosis and research. RT-PCR is a method to amplify the sequences of DNA genome, preceded by reverse transcriptase process with the primer-mediated enzymatic. Some factors that influenced detection of AI and ND are design primer and probe, types of samples, enzyme, reagent composition, amplification temperature and cycles, technical and non-technical factors such as contamination and trained staff. Modified conventional and real time RT-PCR are able to improve the specificity and sensitivity of the test.

Key words: Detection, *Avian Influenza*, *Newcastle Diseases*, RT-PCR

PENDAHULUAN

Beberapa patogen zoonosis yang menyebabkan penyakit pada manusia (Cleaveland et al. 2001), antara lain virus influenza H5N1 dan H7N7 yang ditularkan dari unggas (Koopmans et al. 2004) dan virus H1N1 yang ditularkan dari babi (Dawood et al. 2009). Virus tersebut selain berdampak pada kesehatan masyarakat juga berdampak pada ekonomi, sosial dan politik. Lebih lanjut, isu tentang bioteroris yang berkembang akhir-akhir ini dan tersedianya berbagai kemudahan dalam memperoleh agen berbahaya yang dapat digunakan sebagai senjata biologis, menyebabkan penyakit ini menjadi sangat penting dan strategis. Oleh karena itu, identifikasi dan karakterisasi virus baru yang patogen pada hewan secara tepat, akurat dan cepat sangat diperlukan.

Identifikasi virus dapat dilakukan dengan berbagai teknik pengujian, baik secara konvensional maupun teknik molekuler. Penggunaan mikroskop elektron, kultur jaringan, isolasi virus pada telur ayam bertunas *specific pathogen free* (SPF) dan serologi sering dilakukan (Storch 2007). Namun, metode tersebut mempunyai keterbatasan seperti kurang sensitif, pertumbuhan organisme lambat, interpretasi hasil sangat kompleks dan tingginya terjadi reaksi silang (Carman et al. 2000). Bahkan virus tidak dapat ditumbuhkan di laboratorium, tetapi hanya dapat dikarakterisasi dengan metode molekuler. Dalam dua dekade, inovasi teknologi sebagai alat untuk deteksi dan identifikasi virus secara cepat dan sensitif telah dikembangkan dan tersedia secara komersial. Dua teknologi yang sangat penting untuk deteksi secara cepat adalah generasi

antibodi monoklonal dan kumpulan metodologi teknologi molekuler yang menciptakan dasar teknologi rekombinan DNA. Saat ini, teknik-teknik molekuler sering digunakan untuk penelitian penyakit berbahaya. Salah satunya adalah pendekatan menggunakan informasi sekuen agen patogen yang diketahui untuk mengidentifikasi kekerabatannya dan mempelajari epidemiologinya. Kemajuan teknologi molekuler yang lain adalah amplifikasi genom dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) konvensional atau PCR degenerasi yang menjadi *gold standard* terbaru untuk mendeteksi beberapa mikroba. *Polymerase Chain Reaction* yang dulunya hanya sebagai teknologi untuk penelitian, sekarang telah dikembangkan sebagai aplikasi diagnostik rutin di laboratorium mikrobiologi klinik (Cockerill & Smith 2002). *Polymerase Chain Reaction* dapat digunakan untuk mengamplifikasi DNA atau RNA. Untuk mengamplifikasi RNA, proses PCR didahului dengan *reverse transcriptase* terhadap molekul mRNA sehingga diperoleh molekul *complementary DNA* (*cDNA*). Molekul *cDNA* tersebut kemudian digunakan sebagai cetakan dalam proses PCR. Proses PCR untuk mengamplifikasi RNA dikenal dengan *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR).

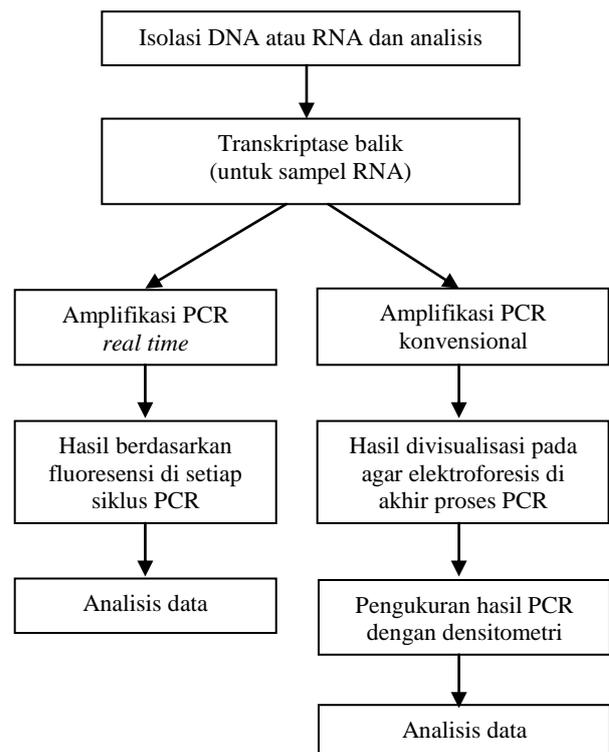
Saat ini, sensitivitas dan spesifitas pengujian RT-PCR konvensional dan *real time* dapat ditingkatkan dengan modifikasi pengujian tersebut seperti *multiplex* RT-PCR konvensional maupun *real time* dan *nested* RT-PCR. Modifikasi pengujian ini telah banyak diterapkan untuk mengidentifikasi genom virus di lapangan seperti *Avian Influenza* (AI) dan *Newcastle Diseases* (ND). Makalah ini menjabarkan ketersediaan teknik molekuler RT-PCR konvensional dan *real time* serta perannya dalam mengidentifikasi genom agen patogen AI dan ND.

POLYMERASE CHAIN REACTION

Polymerase Chain Reaction adalah teknik biologi molekuler untuk mengamplifikasi sekuen DNA spesifik menjadi ribuan sampai jutaan kopi sekuen DNA. Teknik ini menggunakan metode enzimatik yang diperantarai primer. Prinsip dasar PCR adalah sekuen DNA spesifik diamplifikasi menjadi dua kopi selanjutnya menjadi empat kopi dan seterusnya. Pelipat gandaan ini membutuhkan enzim spesifik yang dikenal dengan polimerase. Polimerase adalah enzim yang mampu menggabungkan DNA cetakan tunggal, membentuk untaian molekul DNA yang panjang. Enzim ini membutuhkan primer serta DNA cetakan seperti nukleotida yang terdiri dari empat basa yaitu *Adenine* (A), *Thymine* (T), *Cytosine* (C) dan *Guanine* (G) (Gibbs 1990). Reaksi amplifikasi ini dimulai dengan melakukan denaturasi DNA cetakan yang berantai ganda menjadi rantai tunggal, kemudian suhu

diturunkan sehingga primer akan menempel (*annealing*) pada DNA cetakan yang berantai tunggal. Setelah proses *annealing*, suhu dinaikkan kembali sehingga enzim polimerase melakukan proses polimerase rantai DNA yang baru. Rantai DNA yang baru tersebut selanjutnya sebagai cetakan bagi reaksi polimerase berikutnya (Yuwono 2006).

Metode PCR dibedakan menjadi dua yaitu PCR konvensional dan *real time*. Analisis hasil amplifikasi fragmen DNA pada PCR konvensional dilakukan dengan visualisasi di agar elektroforesis. Sedangkan PCR *real time*, jumlah DNA yang diamplifikasi dapat dideteksi dan diukur di setiap siklus proses PCR. Perbandingan prosedur antara PCR konvensional dan PCR *real time* secara singkat dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Perbandingan prosedur PCR konvensional dan *real time*

Sumber: Adaptasi dari Fraga et al. (2008)

Kedua prosedur pada gambar di atas dimulai dengan isolasi RNA atau DNA dilanjutkan dengan karakterisasi terhadap kemurniannya. Sampel RNA murni diawali dengan tahap transkripsi balik (*reverse transcriptase*) tetapi tahap ini tidak dilakukan apabila sampel berupa DNA murni. Jumlah amplifikasi fragmen DNA pada PCR konvensional divisualisasikan dengan menggunakan agar elektroforesis. Penandaan fragmen DNA dengan *fluorescent dye* dan intensitas pita DNA dapat diukur dengan menggunakan mesin

digital densitometri. Hal ini berbeda pada PCR *real time*, jumlah DNA diukur di setiap siklus proses amplifikasi PCR terutama pada fase eksponensial. Deteksi akumulasi amplifikasi DNA pada PCR *real time* menggunakan *probe* DNA fluoresen. Walaupun demikian, analisis data hasil kedua prosedur tersebut baik PCR konvensional maupun *real time* memerlukan normalisasi data terhadap acuan yang diketahui untuk menentukan kualitas awal ekspresi target gen (Fraga et al. 2008).

POLYMERASE CHAIN REACTION KONVENSIONAL

Reaksi PCR konvensional biasanya menggunakan satu pasang primer oligonukleotida untuk mengamplifikasi bagian tertentu dari genom agen infeksi serta dilakukan pada suatu tabung. Primer PCR adalah oligodeoksiribonukleotida pendek, atau oligomer yang dirancang untuk melengkapi urutan akhir sekuen dari ampikon target PCR dan digunakan untuk mengawali sintesis rantai DNA. Panjang basa DNA primer umumnya 15-25 nukleotida dan mempunyai 50-60% kandungan *Guanine* ditambah *Cytocine*. Primer yang digunakan dalam PCR ada dua yaitu oligonukleotida yang mempunyai sekuen yang identik dengan salah satu rantai DNA cetakan pada ujung 5'-fosfat dan oligonukleotida yang kedua identik dengan sekuen pada ujung 3'-OH rantai DNA cetakan yang lain. Masing-masing dari dua primer PCR melengkapi untai tunggal yang berbeda dari target untai ganda. Untuk mendapatkan skrining sekuen yang potensial dan homolog, rancangan primer ditetapkan dengan menggunakan perangkat lunak seperti Oligo (*National Biosciences, Plymouth, NC*) atau situs pencarian online seperti BLAST (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Namun demikian, primer PCR juga dapat homopolimer misalnya oligo (dT) yang sering digunakan untuk mengawali proses PCR RNA.

Proses amplifikasi RNA didahului dengan siklus *reverse transcriptase* (RT) yang berlangsung pada suhu 42-55°C. Proses PCR dibagi menjadi tiga tahap. Pertama, denaturasi cetakan DNA beruntai ganda pada suhu di atas 90°C sehingga menjadi DNA cetakan berantai tunggal. Kedua, penempelan (*annealing*) primer oligonukleotida ke DNA cetakan berantai tunggal biasanya pada suhu 50-60°C sehingga primer akan membentuk jembatan hidrogen dengan cetakan pada daerah sekuen yang komplementer dengan sekuen primer. Suhu dimana primer *annealing* biasanya diistilahkan dengan T_m . Ketiga, perpanjangan atau ekstensi fragmen DNA dengan enzim polimerase dan primer untuk menghasilkan kopi DNA yang dapat berfungsi sebagai DNA cetakan untuk siklus selanjutnya yang berlangsung pada suhu 70-78°C.

Kedua DNA cetakan asli dan target yang teramplifikasi selanjutnya berfungsi sebagai substrat untuk proses denaturasi, penempelan primer dan perpanjangan fragmen DNA. Berdasarkan teori, setiap siklus akan menggandakan jumlah kopi target DNA sehingga terjadi amplifikasi geometri. Amplifikasi DNA target sebanyak 25 siklus akan menghasilkan 33 juta kopi. Setiap penambahan 10 siklus menghasilkan 1024 lebih kopi. Rataan perubahan suhu atau tahapan lamanya inkubasi di setiap suhu dan jumlah waktu setiap siklus yang diulang, dikontrol dengan suatu program dari alat *thermal cycler*. Jumlah siklus amplifikasi PCR harus dioptimasi tergantung pada konsentrasi awal DNA target (Carman et al. 2000). Minimal diperlukan 25 siklus untuk dapat melipatgandakan satu kopi sekuen DNA target sehingga hasil PCR dapat dilihat secara langsung dengan menggunakan agar elektroforesis.

Keberhasilan proses PCR juga ditentukan oleh jenis enzim DNA polimerase yang digunakan. Enzim DNA polimerase yaitu enzim yang melakukan katalisis reaksi sintesis rantai DNA. Enzim DNA polimerase idealnya harus tahan panas, mempunyai laju polimerisasi dan prosesivitas yang tinggi. Prosesivitas adalah kemampuan suatu enzim polimerase untuk menggabungkan nukleotida dengan suatu *primer* secara terus menerus tanpa terdisosiasi dari kompleks *primer*-DNA cetakan. Pada awalnya, PCR menggunakan DNA polimerasi yang berasal dari *Eschericia coli*. Namun demikian, DNA polimerase ini mempunyai kelemahan harus didenaturasi pada suhu yang sesuai untuk DNA cetakan dan harus ditambahkan di setiap siklus PCR. Beberapa kelemahan lain yang dimiliki DNA polimerase ini adalah tidak tahan panas serta mempunyai laju polimerisasi dan prosesivitas rendah (Yuwono 2006). Untuk itu, penemuan dan penerapan suatu enzim DNA polimerase lain yang lebih baik dari DNA polimerase sangat diperlukan.

Taq DNA polimerase adalah suatu enzim yang dihasilkan dari bakteri *Thermus aquaticus* yang sangat tahan panas. Enzim ini memungkinkan reaksi amplifikasi terbentuk pada suhu yang lebih tinggi sehingga reaksi PCR dapat dilakukan secara otomatis karena penambahan enzim tidak diperlukan di setiap siklus PCR. Walaupun demikian, *Taq* DNA polimerase dari *T. aquaticus* tidak dapat memanfaatkan RNA sebagai cetakan dan memiliki aktivitas transkripsi balik yang rendah. Oleh karena itu, digunakan DNA polimerase yang lain, yaitu *Taq* DNA polimerase dari *Thermus thermophilus* (*Tth* DNA polymerase) yang mempunyai aktivitas DNA polimerase yang lebih tinggi untuk proses transkripsi balik RNA. Enzim ini dapat digunakan untuk melakukan RT-PCR molekul RNA sampai ukuran 1000 pasangan basa (bp, *base pairs*) (Yuwono 2006). Beberapa enzim DNA polimerase yang diisolasi dari mikroba *extremophilic* yaitu *Pwo* Polymerase, *Amylase*, *Pullanase*, *Glutamin*

Synthetase I, Galactosidase dan *Ferredoxin* diperoleh dari *Pyrococcus woesei* (Kim et al. 2007).

Pyrococcus woesei adalah suatu mikroba *heterotrophic* dan anaerob serta dapat tumbuh secara optimum pada suhu 98-100°C (Kim et al. 2007). Wanarska et al. (2005) melaporkan bahwa aktivitas *P. woesei* β -D-galactosidase ditingkatkan dengan senyawa tiol, ion Mg^{2+} dan D-galaktosa serta dihambat ion logam berat dan D-glukosa tetapi keberadaan ion Ca^{2+} tidak berpengaruh terhadap aktivitas *P. woesei*. Aktivitas *Pwo* DNA polimerase sebanding dengan *Pfu* DNA polimerase komersial (Ghasemi et al. 2011).

Pfu DNA polimerase adalah suatu *proof reading* DNA polimerase yang diisolasi dari *Pyrococcus furiosus*. *Pfu* DNA polimerase merupakan suatu pilihan yang ideal untuk berbagai teknik PCR yang membutuhkan sintesis DNA tinggi dengan tingkat ketepatan yang tinggi dibandingkan dengan enzim lain dengan kondisi yang sama sebagai acuan (Biles & Connolly 2004). Kanoksilatham (2007) melaporkan bahwa *Pfu* DNA polimerase lebih banyak digunakan jika dibandingkan dengan *Taq* DNA polimerase, dikarenakan tingkat akurasinya yang lebih tinggi selama proses amplifikasi.

Selain jenis enzim DNA polimerase yang digunakan, efisiensi PCR juga dikontrol dengan beberapa parameter diantaranya komposisi penyangga dan stabilitas, kemurnian, konsentrasi dNTPs, parameter siklus, serta karakteristik sampel awal. Kualitas DNA atau RNA yang akan diamplifikasi juga sangat penting. Deteksi virus dalam sampel dengan PCR tidak hanya tergantung pada kinerja dari PCR itu sendiri, tetapi juga pada efisiensi dari prosedur kerja ekstraksi asam nukleat dari material. Prosedur kerja ekstraksi DNA atau RNA yang sangat panjang, rumit dan membutuhkan waktu lama yang diterapkan pada tahun 1990an telah diganti dengan prosedur kerja yang cepat dan sederhana atau dengan kit ekstraksi DNA atau RNA yang tersedia secara komersial. Sejumlah perusahaan telah mengembangkan kit ekstraksi DNA atau RNA manual untuk aplikasi di laboratorium klinik. Kit ekstraksi DNA atau RNA manual menggunakan reagen non-korosif sehingga penggunaannya bersifat aman bagi personel laboratorium. Kit ini umumnya murah dan aplikasinya mudah (Germer et al. 2003).

Pelatihan intensif bagi personel laboratorium yang melakukan ekstraksi DNA atau RNA manual diperlukan untuk mendapatkan konsistensi pekerjaan laboratorium diantara personel laboratorium, sehingga hasil pengujian dapat dipercaya. Beberapa sistem komersial terpadu memungkinkan untuk ekstraksi DNA atau RNA secara otomatis. Sistem ekstraksi otomatis mempunyai kelebihan khusus dibandingkan dengan sistem ekstraksi DNA atau RNA manual. Sampel yang dibutuhkan pada ekstraksi DNA atau

RNA otomatis relatif lebih sedikit. Peralatan untuk ekstraksi DNA atau RNA otomatis menggunakan sistem tertutup sehingga dapat menurunkan resiko kontaminasi. Sistem ekstraksi DNA atau RNA otomatis biasanya berjalan secara otomatis, sehingga meminimalkan tenaga personel laboratorium. Namun demikian, sistem tersebut harus dievaluasi terlebih dahulu sebelum dapat diadopsi untuk deteksi rutin (Germer et al. 2003).

Sensitivitas pengujian dapat berkurang karena pengaruh inhibitor yang berada dalam ekstrak asam nukleat. Untuk mengontrol substansi yang dapat mengganggu proses amplifikasi, internal kontrol dapat didesain di setiap pasang primer (Cubero et al. 2002) atau PCR *real time* dapat digunakan.

POLYMERASE CHAIN REACTION REAL TIME

Selama beberapa tahun terakhir, pengujian PCR *real time* yang berdasarkan fluoresensi menjadi suatu metode pengujian yang sering digunakan untuk deteksi RNA, DNA dan *cDNA*. Teknik ini sangat sensitif yang memungkinkan amplifikasi terjadi secara bersamaan serta kuantitas sekuens asam nukleat dapat diketahui. Disamping memiliki sensitivitas lebih tinggi, kelebihan pengujian PCR *real time* jika dibandingkan dengan PCR konvensional adalah lebih dinamis, risiko kontaminasi silang lebih sedikit, kemampuan aplikasi penggunaannya untuk pengujian lebih banyak (Black et al. 2002). *Polymerase Chain Reaction* (PCR) *real time* tepat untuk berbagai aplikasi seperti analisis ekspresi gen, penentuan jumlah virus, deteksi organisme yang mengalami mutasi genetik, diskriminasi alel dan genotipe *single nucleotide polymorphisms* (SNP). Penggunaan *probe* yang spesifik membantu peningkatan spesifisitas pada pengujian PCR *real time* jika dibandingkan dengan pengujian PCR konvensional (Chantrata et al. 2008). Namun demikian, PCR *real time* juga mempunyai kelemahan yaitu memerlukan peralatan dan reagen yang mahal serta pemahaman teknik yang benar untuk hasil yang akurat.

Tahapan-tahapan umum yang dilakukan selama pengujian PCR *real time* dimulai dari isolasi RNA atau DNA sampai analisis data. Prinsip kerja PCR *real time* adalah mendeteksi dan mengkuantifikasi reporter fluoresen. Sinyal fluoresen akan meningkat seiring dengan bertambahnya amplifikasi DNA PCR dalam reaksi. Reaksi selama fase eksponensial dapat dipantau dengan mencatat jumlah emisi fluoresen pada setiap siklus. Peningkatan hasil amplifikasi PCR pada fase eksponensial berhubungan dengan jumlah inisiasi target gen. Makin tinggi tingkat ekspresi target gen maka deteksi emisi fluoresen makin cepat terjadi (Pardal 2010). Kuantitas urutan DNA target dicapai dengan menentukan jumlah siklus amplifikasi. Jumlah siklus amplifikasi diperlukan untuk menghasilkan

produk PCR berdasarkan fluoresensi di awal fase eksponensial PCR serta untuk melewati garis ambang fluoresensi/siklus *threshold* (Ct). Jumlah siklus yang diperlukan untuk mencapai ambang batas disebut Ct. Siklus Ct adalah prinsip dasar dari PCR *real time* dan sebagai bagian yang sangat penting untuk memperoleh data yang akurat. Nilai Ct PCR *real time* sangat berkorelasi dengan kuantitas urutan DNA target (Giglio et al. 2003). Apabila kuantitas urutan DNA target tinggi di awal reaksi, nilai Ct akan lebih cepat diketahui. Namun demikian, nilai Ct akan lebih sering ditemukan pada fase eksponensial di setiap siklus amplifikasi PCR. Hal ini yang menjadi alasan utama bahwa nilai Ct lebih mampu mengukur jumlah amplifikasi DNA target dari awal reaksi.

Reaksi PCR *real time* dapat dilakukan satu tahap (*one step real time PCR*) maupun dua tahap (*two step real time PCR*). Keseluruhan reaksi sintesis *cDNA* sampai amplifikasi PCR dalam PCR *real time* satu tahap dilakukan dalam satu tabung. *Polymerase Chain Reaction* (PCR) *real time* satu tahap dapat meminimalkan variasi perlakuan laboratorium karena reaksi kedua enzim terjadi dalam satu tabung. Reaksi *reverse transcriptase* pada proses PCR *real time* dua tahap dilakukan terpisah dari pengujian PCR *real time*. Prosedur PCR *real time* dua tahap akan bekerja lebih baik ketika menggunakan suatu DNA *binding dye* seperti SYBR *green I* karena akan lebih mempermudah untuk mengeliminasi primer-dimer melalui manipulasi Tm. SYBR *green I* merupakan salah satu jenis DNA *binding dye* yang mempunyai kemampuan mengikat 100 kali lebih tinggi dan relatif lebih ramah lingkungan jika dibandingkan dengan *ethidium bromide*. Bahkan, DNA *binding dye* ini lebih mudah diterapkan karena tidak memerlukan adanya *probe* yang spesifik dan biaya yang dibutuhkan relatif terjangkau. PCR *real time* dua tahap memberikan kemungkinan untuk terjadinya peningkatan kontaminasi DNA (Vandesompele et al. 2002; Giglio et al. 2003).

Berbagai modifikasi PCR *real time* telah dikembangkan untuk meningkatkan kerja dari PCR *real time* seperti PCR *real time* multiplex. Saat ini, telah tersedia kit komersial untuk PCR *real time* multiplex yang memungkinkan untuk kombinasi beberapa pengujian dalam satu reaksi. *Polymerase Chain Reaction* (PCR) multiplex adalah amplifikasi secara berkelanjutan dua atau lebih DNA atau *cDNA* target dalam satu reaksi tabung dan hanya dapat dilakukan dengan menggunakan *probe* berlabel spesifik pada setiap urutan DNA target. Kelebihan dari PCR multiplex adalah jumlah sampel yang dibutuhkan lebih sedikit sehingga berguna apabila jumlah sampel yang tersedia dalam jumlah terbatas dan kemampuannya untuk menggabungkan pengujian dalam satu sistem internal kontrol (Belak 2007; Hoffmann et al. 2007). Meskipun demikian, pengujian ini harus dioptimasi

terlebih dahulu untuk meminimalkan adanya interaksi kompetitif yang akan sangat berpengaruh terhadap sensitivitas pengujian (Chantratita et al. 2008).

Penggunaan teknologi *probe* novel fluoresensi dapat meningkatkan sensitivitas dan spesifisitas PCR *real time*. Terdapat tiga tipe metode PCR *real time* yang sering digunakan untuk deteksi asam nukleat dalam mikrobiologi klinik, yaitu *TaqMan probe*, *molecular beacon* dan *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET) *probe* hibridisasi. *TaqMan probe* adalah suatu *probe* fluorescent *real time* yang pertama kali dikembangkan dan merupakan oligonukleotida pendek yang mengandung 5' *fluorescent dye* dan 3' *quenching dye* yang terpisah. *Fluorescent dye* yang terpisah terakumulasi setelah setiap suhu siklus PCR dan dapat diukur di setiap waktu selama tahapan siklus PCR termasuk tahap hibridisasi. Hal ini berbeda dengan *probe molecular beacon* dan FRET hibridisasi karena fluoresensi hanya dapat diukur selama tahap hibridisasi (Uhl & Cockerill 2004).

Molecular beacon adalah suatu *probe* oligonukleotida yang dilabel oleh 5' *fluorescent dye* dan 3' *quenching dye* dan berbentuk seperti jepit rambut (Tyagi & Kramer 1996). *Fluorescence Resonance Energy Transfer* adalah suatu proses spektroskopi dengan mengalirkan energi sebesar 10-100 *Amstrong* di antara molekul yang berbeda. Peningkatan sinyal fluoresensi sebanding dengan akumulasi produk PCR yang akan timbul sebagai akibat dari pemindahan energi resonansi fluoresensi (FRET) antara label fluorogenik yang berbeda (yang dikenal sebagai *reporter* dan *quencher*) yang terhubung dengan *probe* atau primer. Beberapa format telah digunakan dalam *real time PCR*. *Quencher* fluorogenik yang paling sering digunakan adalah 6-*carboxytetramethylrhod-amine* (TAMRA), 4-*dimethylaminoazo benzene-4-carboxylic acid* (DABCYL) dan *Black Hole Quencher* (BHQ) (Didenko 2001).

Meskipun RT-PCR *real time* (rRT-PCR) merupakan suatu pengujian diagnostik yang sensitif dan spesifik serta banyak digunakan untuk deteksi penyakit secara cepat, tetapi adanya kemungkinan reaksi negatif palsu dapat terjadi. Reaksi ini kemungkinan disebabkan oleh adanya penghambat RT-PCR, ekstraksi virus RNA yang sedikit atau sudah terdegradasi, kesalahan personel laboratorium dalam melakukan pengujian rRT-PCR dan kualitas dari salah satu reagen yang sudah kadaluarsa. Sampel yang diperiksa dapat mengandung substansi penghambat PCR yang memungkinkan menghasilkan hasil negatif palsu. Penghambat amplifikasi PCR dapat dideteksi dengan kontrol internal. Kontrol internal merupakan faktor yang sangat penting sebagai kontrol dari kualitas pengujian sehingga pengujian dilakukan secara benar (Das et al. 2006).

Penerapan tipe kontrol internal positif yang berbeda pada pengujian rRT-PCR telah dikembangkan untuk menguji sampel klinik. Berdasarkan sifatnya terhadap target cetakan DNA, kontrol internal positif dibagi menjadi dua, yaitu kompetitif dan non-kompetitif. Kontrol internal positif kompetitif menggunakan suatu rancangan tiruan yang digunakan untuk mengikat bagian primer yang sama dengan sekuen internal sehingga dapat dibedakan dari sekuen target baik ukuran maupun *probe*-nya. Kontrol internal positif nonkompetitif menggunakan sekuen target yang berbeda dan memiliki primer atau *probe* yang berbeda sehingga tidak digunakan untuk mengamplifikasi target amplicon serta berkompetitif secara tidak langsung dengan target amplicon (Abdulmawjood et al. 2002; Dingle et al. 2004).

Penggunaan kontrol yang spesifik, yaitu kontrol positif dan negatif serta pengendalian mutu reagen sebagai salah satu pelaksanaan program jaminan mutu dari suatu laboratorium sangat diperlukan selama pengujian sehingga hasil yang diperoleh akurat. Kontrol positif yang dapat digunakan adalah sampel yang mengandung organisme atau asam nukleat yang dapat dideteksi. Konsentrasi kontrol positif yang digunakan harus mampu memberikan hasil positif yang konsisten. Air atau *buffer* sering digunakan sebagai kontrol negatif. Namun demikian, kontrol negatif yang bagus adalah sampel yang mengandung asam nukleat selain target untuk mengetahui tidak adanya amplifikasi PCR non-spesifik atau amplifikasi produk. Selain itu, kontrol negatif digunakan untuk menunjukkan bahwa reagen yang digunakan tidak terkontaminasi dengan asam nukleat target (NCCLS 1995). Jaminan mutu reagen sangat penting untuk memastikan keberhasilan pengujian PCR *real time* (Burgos et al. 2002). Biasanya, komponen *master mix* yang mengandung konsentrasi reagen baku telah tersedia secara komersial tetapi tidak selalu tersedia untuk primer dan *probe* FRET.

Resiko kontaminasi pada PCR *real time* masih dapat terjadi meskipun resiko kontaminasi yang terjadi pada PCR *real time* sangat kecil, karena amplifikasi PCR *real time* dilakukan dalam sistem yang tertutup dan tidak memerlukan tahapan-tahapan yang panjang seperti yang dilakukan seperti di PCR konvensional. Kontaminasi paling sering terjadi antar sampel jika dibandingkan dengan kontaminasi produk amplifikasi. Kontaminasi antar sampel dapat terjadi pada saat memasukkan sampel ke tabung PCR atau tabung ekstraksi DNA atau RNA. Teknik pipetasi harus dilakukan dengan hati-hati untuk menghindari adanya aerosol yang dapat menimbulkan kontaminasi. Tahapan-tahapan prosedur PCR membutuhkan ruangan kerja yang terpisah di laboratorium. Selain itu, penerapan alur kerja searah serta praktik kerja

laboratorium yang benar harus dijalankan untuk memperoleh hasil yang akurat (Niesters 2002).

VALIDASI *POLYMERASE CHAIN REACTION* KONVENSIONAL DAN *REAL TIME*

Analisis terhadap sampel lapang sangat penting dilakukan untuk mendapatkan kualitas data yang bagus. Penerapan sistem *quality assurance* (QA) dan *quality control* (QC) sangat diperlukan seperti prosedur yang benar serta penggunaan sampel kontrol untuk memastikan bahwa sistem bekerja dengan benar sehingga data yang diperoleh reprodusibilitas dan berkualitas. Sistem QA dan QC serta personel laboratorium yang kompeten merupakan hal yang sangat penting bagi jaminan mutu laboratorium. Faktor lain yang juga sangat penting adalah validasi untuk memberikan jaminan mutu bahwa hasil uji berasal dari sampel yang benar. Validasi adalah suatu proses untuk menentukan ketepatan pengujian tertentu yang dikembangkan, dioptimasi dan distandarisasi dengan tepat (Burkardt 2000)

Umumnya ada beberapa kriteria validasi yaitu, penentuan tujuan, optimasi, standarisasi, *repeatability*, analitik sensitivitas, analitik spesifitas, *threshold (cut-offs)*, sensitivitas pengujian, spesifitas pengujian, *reproducibility*, pemantapan dan aplikasi tujuan (OIE 2013). Optimasi adalah proses evaluasi dan mengatur parameter fisik, kimia dan biologi dari pengujian untuk memastikan bahwa karakteristik dari pengujian tersebut sangat sesuai dengan tujuan validasi. *Repeatability* adalah tingkat keberterimaan hasil replikasi sampel yang diuji dengan metode yang sama dalam suatu laboratorium. Hasil *repeatability* diperoleh dengan evaluasi variasi hasil replika. Replika pengujian ditentukan berdasarkan hitungan statistik, minimal tiga sampel sebagai perwakilan aktivitas analit dalam lingkup pengujian. Analitik spesifisitas (ASp) adalah kemampuan pengujian untuk membedakan antara analit target (seperti antibodi, organisme, genom) dan bukan analit target (seperti kontrol). Analitik sensitivitas (ASe) biasanya menggunakan batasan pengujian (LOD) sebagai ukuran dalam pengujian ASe. Batasan pengujian adalah perkiraan jumlah analit dalam suatu kontrol spesifik yang menghasilkan hasil positif. *Reproducibility* adalah kemampuan suatu metode pengujian untuk menjamin konsistensi hasil pengujian yang ditentukan dengan perkiraan presisi. *Reproducibility* menggunakan sampel, prosedur, reagen dan kontrol yang sama kemudian diuji di beberapa laboratorium yang berbeda (OIE 2013).

Jenis sampel pengujian sangat mempengaruhi ketepatan metode PCR baik konvensional dan *real time*. Metode ekstraksi DNA akan berbeda dengan

ekstraksi RNA, karena RNA lebih mudah terdegradasi. Beberapa metode ekstraksi DNA dan RNA yang tersedia secara komersial seperti *robotic*, *spin column* dan kimia sebelumnya divalidasi terlebih dahulu untuk menentukan efisiensinya termasuk dalam meminimalkan kontaminasi silang antara sampel positif dan negatif yang diekstraksi secara bersama-sama. Apabila metode ekstraksi ini mengalami perubahan, validasi harus diulang lagi. Optimasi terhadap semua parameter dari metode dan reagen yaitu suhu dan waktu inkubasi, pH, konsentrasi primer, serta larutan penyangga yang digunakan dalam proses PCR yang merupakan bagian dari validasi harus dilakukan sebagai kontrol terhadap parameter tersebut seperti kadaluarsa reagen. Reagen yang mempunyai nomor *batch* baru maka *repeatability* perlu dilakukan kembali. *Repeatability* pengujian PCR minimal memerlukan replikasi tiga kali di setiap sampel pengujian setelah itu diekstraksi kemudian diamplifikasi dengan menggunakan kontrol yang sama. Variasi nilai rata-rata pengujian ditentukan sebagai indikasi pengulangan. Evaluasi *repeatability* ini juga diperlukan untuk menjamin bahwa kontrol yang digunakan dalam pengujian PCR tidak mengandung penghambat PCR. Setidaknya diperlukan tiga laboratorium yang berbeda untuk melakukan *reproducibility*. *Reproducibility* diharapkan mampu menciptakan harmonisasi pengujian PCR di antara laboratorium-laboratorium (OIE 2008).

Kurva standar adalah suatu metode yang umum digunakan untuk mengkalibrasi reaksi PCR *real time* terhadap konsentrasi asam nukleat yang diketahui. Bahan acuan seperti ampikon, plasmid, oligonukleotida, atau sintesis RNA mempunyai pengaruh terhadap terbentuknya kurva standar. Penggunaan bahan acuan tergantung pada identifikasi efisiensi amplifikasi bahan acuan dan sampel cDNA. Sampel cDNA biasanya mengandung penghambat PCR yang diperoleh dari sisa proses ekstraksi RNA, penggunaan DNase, tahap *reverse transcriptase*, atau semua hal yang secara tidak langsung berpengaruh terhadap efisiensi PCR (McPherson & Møller 2000). Pemakaian cDNA untuk membentuk kurva standar dapat meminimalkan adanya perbedaan efisiensi amplifikasi antara standar dan cetakan DNA. Meskipun demikian, kisaran kurva standar cDNA yang terbentuk dibatasi oleh tingkat ekspresi sampel yang digunakan. Konsentrasi sampel sangat berpengaruh terhadap pembentukan kurva standar. Pengenceran sampel yang lebih rendah akan menghasilkan variasi pengujian yang lebih tinggi sedangkan pengenceran yang lebih tinggi kurang bagus untuk terbentuknya kurva standar. Lebih lanjut, kadar konsentrasi asam nukleat dalam suatu reaksi PCR berpengaruh terhadap efisiensi amplifikasi (Kainz 2000). Efisiensi amplifikasi merupakan faktor yang sangat penting terhadap akurasi PCR *real time* sehingga diperlukan suatu cara yang tepat untuk dapat

memonitoring efisiensi amplifikasi semua sampel. Penggunaan data mentah merupakan cara yang tepat untuk menentukan efisiensi amplifikasi PCR di setiap reaksi (Freeman et al. 1999).

APLIKASI DAN MODIFIKASI REVERSE TRANSCRIPTASE-POLYMERASE CHAIN REACTION UNTUK DETEKSI GENOM AVIAN INFLUENZA

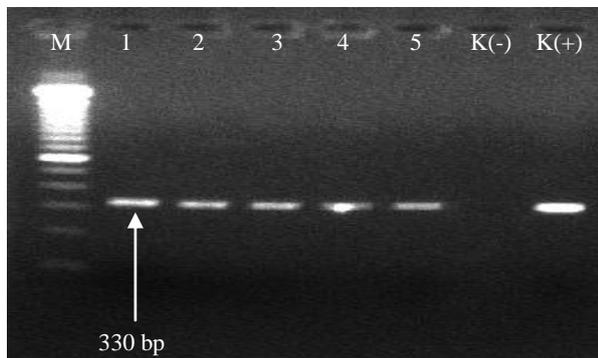
Penyakit AI disebabkan oleh virus influenza tipe A yang termasuk famili *Orthomyxoviridae*. Penyakit ini selama dua dekade terakhir telah berkali-kali menimbulkan wabah penyakit yang sangat berbahaya di unggas dan manusia sehingga termasuk penyakit yang mempunyai patogenitas tinggi dan bersifat epizootik. Virus influenza tipe A ditentukan berdasarkan antigen *nucleocapsid* (NP) dan *matrix* (M) sedangkan subtipe virus diklasifikasi berdasarkan antigen *hemagglutinin* (HA) dan *neuraminidase* (NA). Saat ini, terdapat 16 subtipe H (H1-16) dan 9 subtipe N (N1-9) (Swayne & Halvorson 2008).

Deteksi secara tepat dan cepat untuk menentukan keberadaan virus AI dalam sampel merupakan kunci dalam pengendalian penyakit AI. Uji diagnostik yang direkomendasikan untuk pengendalian penyakit ini adalah uji patogenitas secara *in vivo* dan molekuler. Londt et al. (2007) dalam penelitiannya melaporkan bahwa virus AI subtipe H5 dan H7 bersifat patogen berdasarkan molekul biologinya. Oleh karena itu, identifikasi dan karakterisasi patotipe yang tepat seperti penentuan sekuen *cleavage site* HA0 dan subtipe semua virus influenza A sangat diperlukan untuk diagnostik, surveilans, studi epidemiologi serta investigasi motif asam amino untuk mengetahui patogenitas virus AI. Penentuan *cleavage site* protein HA0 yang konsisten dari virus *Highly Pathogenic Novel Avian Influenza* (HPNAI) dan klasifikasi subtipe H dengan metode molekuler. Beberapa metode molekuler untuk pengujian AI diantaranya RT-PCR dan rRT-PCR. Sensitivitas dan spesifitas pengujian AI dengan metode molekuler dipengaruhi oleh ekstraksi RNA, enzim yang digunakan untuk amplifikasi, sekuen primer dan *probe* (OIE 2012a).

Amplifikasi RT-PCR akan berjalan sukses tergantung pada desain primer yang spesifik. Suatu set primer tunggal telah dikembangkan oleh Phipps et al. (2004) untuk memperoleh ampikon PCR dari virus influenza tipe A. Desain primer yang spesifik untuk identifikasi subtipe virus AI berdasarkan pada sekuen gen HA yang konsisten diperoleh dengan menggunakan informasi sekuen asam amino dari gen HA dengan variasi antara 20-74% untuk subtipe yang berbeda dan variasi hanya 0-9% untuk subtipe yang sama. Shankar et al. (2009) telah berhasil mengidentifikasi virus AI dengan RT-PCR

menggunakan set primer yang spesifik terhadap gen *Nukleoprotein* (NP) dan HA (H5, H7 dan H9). Sekuen primer yang digunakan berdasarkan Lee et al. (2001) yang menghasilkan amplikon sebesar 488 bp untuk sub tipe H9 dan 545 bp untuk sub tipe H5 serta WHO (2002) yang menghasilkan amplikon sebesar 219 bp. Hewajuli & Dharmayanti (2012) juga melaporkan bahwa identifikasi virus AI dengan menggunakan primer spesifik untuk NP dan H5 berdasarkan Lee et al. (2001) mampu mengamplifikasi target RNA virus dengan baik. Primer spesifik untuk gen NP mampu mengamplifikasi target fragmen gen NP sebesar 330 bp dan sub tipe H5 yang mampu mengamplifikasi target fragmen gen HA sebesar 545. Gambar 2 memperlihatkan identifikasi NP dan Gambar 3 memperlihatkan identifikasi sub tipe H5 berdasarkan Lee et al. (2001).

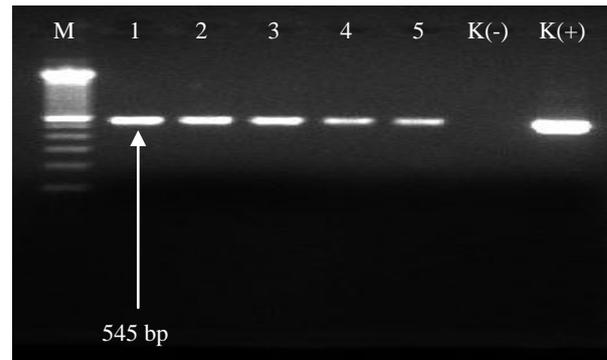
Teknik ini telah sukses digunakan untuk deteksi dan identifikasi sub tipe AI sejak tahun 2003 (OIE 2012b). Akhir-akhir ini, sering timbul masalah pada saat pengujian *strain* baru sub tipe H5 dan H7 atau sub tipe lain dengan RT-PCR. Pengembangan dan validasi metode RT-PCR *pan* HA satu tahap sebagai alat diagnostik baru telah dilakukan sebagai alternatif pengujian. Metode ini dapat mengamplifikasi fragmen *cleavage site* HA0 dari 16 sub tipe virus AI sehingga dapat mendeteksi *strain* baru sub tipe H. Produk PCR yang dihasilkan dapat digunakan untuk sekuensing dan karakterisasi molekuler sekuen *cleavage site* HA0 dan patotipe serta semua sub tipe virus influenza A (Gall et al. 2008). Sekuensing relatif membutuhkan waktu yang lama dan keahlian khusus sehingga tidak tepat diterapkan di laboratorium diagnostik yang mempunyai jumlah sampel yang besar dan mempunyai laporan kasus sub tipe H5N1 HPAI dan LPAI.



M: *marker*; lubang 1-5: sampel yang mampu diamplifikasi dengan primer NP; K(-): kontrol negatif dan K(+): kontrol positif

Gambar 2. *Band* positif di posisi 330 bp yang terbentuk dari RT-PCR AI dengan primer NP dan divisualisasikan dengan gel elektroforesis

Sumber: Hewajuli & Dharmayanti (2012)



M: *marker*; lubang 1-5: sampel yang mampu diamplifikasi dengan primer H5; K(-): kontrol negatif dan K(+): kontrol positif

Gambar 3. *Band* positif di posisi 545 bp yang terbentuk dari RT-PCR AI dengan primer H5 dan divisualisasikan dengan gel elektroforesis

Sumber: Hewajuli & Dharmayanti (2012)

Uji diagnostik cepat dikembangkan untuk membedakan antara HPAI dan LPAI virus AI sub tipe H5 dengan *real time* RT-PCR (rRT-PCR) satu tahap dan analisisnya berdasarkan nilai Ct. Analisis Ct untuk membedakan antara HPAI dan LPAI berdasarkan perbedaan ukuran amplikon dan persentase kandungan guanin sitosin. Rancangan primer H5 untuk rRT-PCR biasanya dirancang dari daerah yang konsisten antara *strain* HPAI dan LPAI dengan menggunakan sekuen nukleotida yang diperoleh dari *GenBank* atau laporan hasil penelitian. rRT-PCR ini telah banyak digunakan untuk diagnosis dan penelitian virus AI yang patogen.

Aplikasi lebih lanjut dari rRT-PCR adalah mengetahui jumlah virus AI untuk kepentingan penelitian. Jumlah ekskresi virus AI dari unggas yang terinfeksi merupakan alat ukur yang sangat penting dalam menentukan patogenitas virus AI. Ekskresi virus AI juga sangat penting untuk menentukan efektivitas vaksin AI. Metode rutin yang sering dilakukan untuk mengetahui jumlah virus AI adalah dengan penumbuhan virus dalam sampel menggunakan telur ayam bertunas dan dinyatakan dengan dosis infeksi telur 50% (EID₅₀). Pengujian ini bersifat akurat dan merupakan acuan pengujian untuk titrasi infeksi virus. Penelitian untuk membandingkan metode titrasi virus AI secara konvensional dan *quantitative real time* RT-PCR (qRT-PCR) satu langkah dengan *probe* hidrolisis fluoresen yang diaplikasikan untuk kuantitas virus AI telah dilakukan Lee & Suarez (2004). Hasilnya menunjukkan bahwa qRT-PCR memungkinkan sebagai metode alternatif dari titrasi virus tradisional yang selama ini sering digunakan dengan beberapa alasan. Pertama, qRT-PCR merupakan metode yang mudah dilakukan dan penanganan materi infeksius dapat dikurangi sehingga mengurangi resiko kontaminasi silang dan meningkatkan reproduktivitas. Metode ini

dapat dilakukan dengan cepat dalam satu hari, sedangkan metode titrasi virus TAB membutuhkan sekitar satu minggu. Ketiga, qRT-PCR adalah pengujian yang sensitif dan dapat mendeteksi RNA yang mempunyai konsentrasi rendah dengan menggunakan *probe* spesifik terhadap tiga gen (M, H5, H7) virus AI.

Metode SYBR *green* adalah suatu tipe prosedur qRT-PCR yang menggunakan interkalator. Prosedur qRT-PCR yang menggunakan *probe* oligonukleotida dan interkalator bersifat sensitif. Metode ini merupakan salah satu metode terbaik untuk diagnosis dan surveilans AI. Namun demikian, reaksi pada metode SBYR *green* harus dioptimasi terlebih dahulu karena *probe*-nya tidak spesifik. *Probe* yang digunakan pada metode SBYR *green* tidak spesifik dapat digunakan sebagai diagnosis awal virus AI karena lebih mudah diterapkan dan biaya yang dibutuhkan lebih murah (Giglio et al. 2003).

Metode lain yang juga umum digunakan untuk diagnosis dan surveilans AI adalah dengan pendekatan *TaqMan* karena mempunyai sensitivitas dan spesifisitas yang sangat tinggi. Akhir-akhir ini, metode qRT-PCR *TaqMan* diterapkan lebih spesifik untuk deteksi terhadap gen HA, NA dan kuantitas RNA virus AI H5N1 (Agüero et al. 2007). Hoffmann et al. (2007) mengembangkan qRT-PCR dengan *probe* yang dilabel *6-carboxyfluorescein/FAM* (FliH5 CS-FAM) yang spesifik terhadap *cleavage site* HA0 virus HPAI H5N1 dan melaporkan bahwa *probe TaqMan* yang spesifik terhadap keberadaan *cleavage site* HA0 yang digunakan dalam rRT-PCR sangat berguna dan lebih sensitif untuk penentuan patotipe *strain* HPAI H5N1 dibandingkan dengan *probe* SYBR.

Gen M sangat konsisten terhadap semua subtipe virus AI yang berasal dari beberapa negara di dunia sehingga gen ini juga digunakan sebagai target gen yang ideal untuk deteksi awal virus AI (Spackman et al. 2002). Das et al. (2006) melaporkan bahwa penyaringan awal pengujian virus AI gen M dengan rRT-PCR lebih akurat dengan penggunaan kontrol positif internal (IPC) RNA untuk membantu mengidentifikasi keberadaan penghambat RT-PCR dalam sampel sehingga hasil negatif palsu dapat diminimalkan. Jenis sampel juga berpengaruh terhadap hasil rRT-PCR AI. Sampel jaringan dan *swab* kloaka biasanya mengandung beberapa penghambat PCR. Keberadaan penghambat PCR dalam sampel akan menurunkan sensitifitas pengujian rRT-PCR AI maka prosedur alternatif untuk ekstraksi RNA virus AI diperlukan untuk menghilangkan keberadaan penghambat PCR. Modifikasi penambahan *lyopiliz* dalam reagen rRT-PCR untuk deteksi gen M virus AI menunjukkan hasil lebih sensitif dibandingkan dengan reagen konvensional.

Selain beberapa faktor yang telah dijelaskan di atas, efektivitas penggunaan biaya juga perlu dipertimbangkan. Penggunaan RT-PCR multiplex (mRT-PCR) dapat meminimalkan pemakaian jumlah reagen untuk beberapa tujuan pengujian subtipe virus AI sehingga dapat mengurangi jumlah biaya pengujian. Metode mRT-PCR dengan set primer gen M, H7 dan H9 mampu mendeteksi virus influenza A dan subtipe H7 serta H9 secara bersama-sama dalam satu kali reaksi (Saberfar et al. 2009). Selain masalah biaya dan waktu, rRT-PCR multiplex satu langkah ini dapat meminimalkan perlakuan sampel yang berulang kali jika dibandingkan dengan RT-PCR standar (Huber et al. 2011). Akhir-akhir ini, rRT-PCR multiplex yang dikenal sebagai FluPlex telah dikembangkan untuk mendeteksi tipe dan subtipe virus influenza. Pengujian FluPlex adalah suatu pengujian novel 12 analit (RT-PCR-*enzyme hybridization*) yang dapat mendeteksi dan membedakan antara virus influenza A dan B secara bersama-sama termasuk semua subtipe virus influenza A yang menginfeksi manusia. Pengujian ini dirancang untuk target fragmen gen M virus influenza A, gen NS1 dan NS2 virus influenza B, 9 gen HA (H1, H2, H5, H7, H9) dan empat gen NA (N1 pada manusia, N2 pada hewan, N2 dan N7). Pengujian ini menunjukkan sensitivitas tinggi (10-100 kopi per reaksi) sehingga berperan sangat penting untuk sensitivitas pengujian dalam menentukan beberapa tipe dan subtipe virus AI dalam satu kali reaksi (He et al. 2009).

Metode-metode molekuler untuk deteksi virus AI akan terus berkembang di masa-masa mendatang dan tidak hanya sebatas pengembangan metode pengujian molekuler seperti yang dijelaskan di atas. Namun demikian, semua teknik molekuler baru tersebut harus divalidasi terlebih dahulu sebelum diterapkan karena validasi ini menjadi kunci utama untuk faktor penerimaan metode baru yang akan diterapkan.

APLIKASI DAN MODIFIKASI REVERSE TRANSCRIPTASE-POLYMERASE CHAIN REACTION UNTUK DETEKSI GENOM NEWCASTLE DISEASES

Penyakit ND adalah salah satu penyakit infeksius yang disebabkan virus *avian paramyxovirus* serotipe 1 (APMV 1) dan sangat berbahaya di unggas. Untuk itu, deteksi dan identifikasi virus secara cepat sangat penting untuk pengendalian penyakit secara efektif. Diagnosis penyakit secara cepat dapat dilakukan dengan menggunakan metode molekuler yaitu RT-PCR. Penerapan RT-PCR telah banyak dilakukan di beberapa laboratorium di dunia untuk deteksi dan identifikasi virus ND. Modifikasi pengembangan RT-PCR telah berhasil dilakukan dengan menggunakan

primer umum untuk mendeteksi semua tipe virus ND (Creelan et al. 2002) dan primer spesifik patotipe yang memungkinkan untuk membedakan patotipe secara cepat serta RT-PCR *nested* yang mempunyai sensitivitas lebih tinggi daripada RT-PCR satu tahap (Kho et al. 2000).

Ketepatan rancangan primer sangat menentukan sensitivitas dan spesifisitas metode RT-PCR satu tahap. Umumnya, primer yang digunakan adalah berdasarkan sekuen gen virus ND galur Lasota dan B1 yang dapat diakses dari *GenBank*. Namun demikian, upaya untuk mencari primer spesifik dan mengevaluasinya masih terus dilakukan dikarenakan virus ND adalah virus RNA yang mudah mengalami mutasi (Zou et al. 2005; Qin et al. 2007). Metode diagnostik RT-PCR satu tahap memiliki kelebihan mampu membedakan virus ND virulen dan kurang virulen.

Penggabungan pengujian RT-PCR satu tahap dan *restriction endonuclease analysis* (REA) dapat diterapkan untuk deteksi dan identifikasi tipe virus APMV dari sampel lapangan karena pengujian ini bersifat sensitif untuk mengamplifikasi secara langsung asam amino dari *strain* lentogenik, mesogenik dan velogenik termasuk pigeon PVM-1 yang menginfeksi inang secara bersama-sama (Creelan et al. 2002). Sensitivitas pengujian RT-PCR menjadi terbatas ketika menguji sampel yang kompleks seperti feses, air limbah peternakan, asam nukleat dan jaringan karena mengandung materi penghambat proses RT-PCR. Untuk menghilangkan pengaruh mikroba dan substansi toksin, purifikasi virus ND dalam sampel yang kompleks dengan menggunakan kemampuan sel darah merah untuk mengikat virus ND. Pengujian RT-PCR yang digabungkan dengan absorpsi sel darah merah mempunyai sensitivitas lebih tinggi jika dibandingkan dengan RT-PCR satu tahap untuk mendeteksi virus ND (Yi & Liu 2011).

Pemilihan sampel lapang harus diperhatikan karena beberapa sampel seperti organ feses kurang sensitif untuk deteksi virus ND karena mengandung materi penghambat PCR (Abu Al-Soud & Rådström 2000). Namun demikian, Ghom et al. (2000) melaporkan bahwa RT-PCR yang menggunakan sampel dari beberapa organ dan feses hewan percobaan mampu memberikan hasil yang positif. Usapan trakea dan orofaring sering digunakan sebagai sampel karena prosesnya mudah dan mengandung sedikit material organik yang dapat mengganggu stabilitas RNA dan amplifikasi PCR sehingga sampel ini kemungkinan lebih sensitif untuk mendeteksi virus ND (OIE 2012b). Selain pemilihan sampel yang tepat, penerapan metode RT-PCR yang mempunyai sensitivitas tinggi seperti metode RT-PCR *nested* juga perlu dilakukan. Mohran et al. (2011) melaporkan bahwa sampel usapan orofaring yang digunakan dalam pengujian RT-PCR standar mampu menghasilkan amplicon di 365 bp,

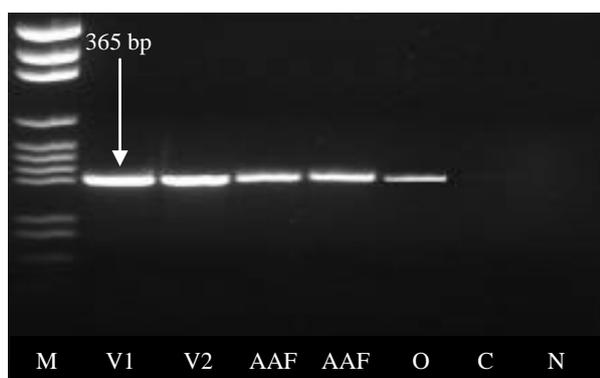
sedangkan usapan kloaka tidak mampu menghasilkan amplicon di 356 bp. Usapan kloaka ini menunjukkan hasil positif dan mampu menghasilkan amplicon di 216 bp setelah diuji dengan RT-PCR *nested*. Kondisi seperti ini dapat dilihat pada Gambar 4 dan 5. Usapan kloaka dengan kode C tidak menunjukkan pita positif pada Gambar 4, tetapi menunjukkan pita positif pada Gambar 5.

Sensitivitas RT-PCR dapat ditingkatkan dengan pengembangan modifikasi RT-PCR *nested*. Pada RT-PCR *nested*, PCR tahap kedua (*second-round*) dilakukan dengan menggunakan primer yang berbeda untuk mengamplifikasi sekuen nukleotida pada bagian gen tertentu yang sulit teramplifikasi pada saat RT-PCR tahap pertama (*first-round*). Sensitivitas RT-PCR *nested* sampai 100 kali lebih tinggi jika dibandingkan dengan RT-PCR standar (*first-round*). Metode ini menggunakan dua pasang primer. Sepasang primer pertama untuk RT-PCR tahap pertama dan sepasang primer kedua untuk RT-PCR tahap kedua. Adi et al. (2008) melaporkan primer yang digunakan untuk mengamplifikasi target gen *phospho protein* (P), *matrix protein* (M), *hemagglutinin-neuraminidase protein* (HN) dan *fusion protein* (F) dengan RT-PCR tahap pertama tidak mampu menghasilkan amplicon sepanjang 1500 bp dengan jelas tetapi primer ini mampu menghasilkan amplicon sepanjang 500 bp dengan jelas setelah melalui RT-PCR tahap kedua (RT-PCR *nested*).

Deteksi asam nukleat virus ND akan lebih sensitif dengan metode RT-PCR *real time* (rRT-PCR) jika dibandingkan dengan RT-PCR konvensional. Penelitian yang dilakukan Wise et al. (2004) menunjukkan hasil bahwa set primer-*probe* gen F yang digunakan dalam rRT-PCR mampu mendeteksi 10^2 - 10^4 kopi RNA dan sedikitnya 10 partikel infeksi virus ND. Creelan et al. (2002) melaporkan konsentrasi minimum RNA virus ND yang dibutuhkan untuk RT-PCR dengan primer F adalah 10^5 . Hal ini membuktikan bahwa rRT-PCR membutuhkan konsentrasi RNA virus ND yang lebih sedikit jika dibandingkan dengan RT-PCR.

Dalam pengujian rRT-PCR untuk deteksi dan diferensiasi virus ND, *probe* yang digunakan secara intensif adalah *TaqMan*. *Probe TaqMan* dan enzim polimerase digunakan dalam pengujian rRT-PCR untuk mendeteksi gen M dan F virus ND. Pengujian rRT-PCR gen M dirancang untuk mendeteksi gen M yang sangat konsisten dari sebagian besar *avian paramyxovirus-1* (APMV-1), terutama virus kelas II. Pengujian ini digunakan sebagai alat skrining untuk mendeteksi APMV-1 dalam sampel diagnostik maupun cairan alantois dari TAB yang diinokulasi virus ND. Pengujian ini juga dilaporkan telah mempunyai keberhasilan yang tinggi dalam mendeteksi APMV-1 (Kim et al. 2008). Sampel yang positif terhadap gen M

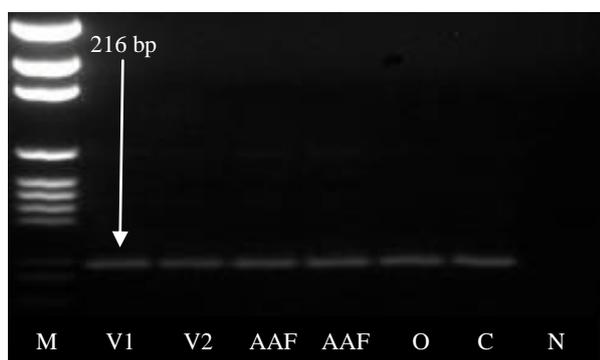
selanjutnya diuji dengan rRT-PCR untuk mendeteksi gen F. Pengujian rRT-PCR dengan target gen F ini dirancang tidak hanya untuk mendeteksi *strain* virulen APMV-1 tetapi juga PPMV. Pengujian ini sudah divalidasi dan telah digunakan untuk diagnostik virus ND. Aplikasi pengujian rRT-PCR dengan target gen F biasanya digunakan untuk membedakan antara virus dari unggas yang divaksin dan virus virulen lapangan, sedangkan rRT-PCR dengan target gen M yang mempunyai daerah sangat konsisten difokuskan untuk mendeteksi virus ND dari unggas yang tidak divaksinasi, misalnya unggas liar (Kim et al. 2006).



Lubang M: *marker*; lubang V1: *strain* vaksin Lasota cIN79; lubang V2: *strain* vaksin Lasota cIHN79 mass; lubang AAF: cairan amnionantoic; lubang O: usapan orofaring; lubang C: usapan kloaka dan lubang N: kontrol negatif

Gambar 4. Hasil elektroforesis RT-PCR standar (satu tahap) menunjukkan kode C (usapan kloaka) negatif *band* di 365 bp

Sumber: Mohran et al. (2011)



M: *marker*; lubang V1: *strain* vaksin Lasota cIN79; lubang V2: *strain* vaksin Lasota cIHN79 mass; lubang AAF: cairan amnionantoic; lubang O: usapan orofaring; lubang C: usapan kloaka dan lubang N: kontrol negatif

Gambar 5. Hasil elektroforesis RT-PCR *nested* menunjukkan kode C (usapan kloaka) positif *band* di 216 bp

Sumber: Mohran et al. (2011)

Pengujian rRT-PCR dengan target gen M dan F tidak selalu menunjukkan keberhasilan dalam mendeteksi semua *strain* virus ND. Akhir-akhir ini, beberapa laporan hasil penelitian menunjukkan bahwa rRT-PCR dengan gen M tidak berhasil mendeteksi sebagian besar isolat APMV-1 dan rRT-PCR dengan target gen F juga tidak dapat mendeteksi PPMV-1. Sebagaiantisipasi, analisis sekuen gen M dan F perlu dilakukan secara berkelanjutan untuk mengetahui terjadinya mutasi pada gen tersebut. Hasil analisis ini dapat digunakan untuk pengembangan pengujian rRT-PCR gen M dan F baru yang mampu mendeteksi semua *strain* virus ND. Sensitivitas dan spesififikasi metode rRT-PCR dengan target gen F virus PPMV-1 dapat ditingkatkan dengan menurunkan suhu *annealing* dari 58°C sampai 50°C atau modifikasi primer dan *probe* (Kim et al. 2006; Kim et al. 2008).

Probe yang dilabel fluoresen mempunyai kelebihan mengikat daerah spesifik pada amplicon target sehingga mengurangi resiko fluoresensi tidak spesifik. Penelitian yang dilakukan Tao et al. (2009) menunjukkan hasil bahwa rasio antara primer yang dilabel fluoresen dan primer yang tidak dilabel fluoresen adalah 10:1. Modifikasi rRT-PCR menggunakan *probe TaqMan* yang dilabel fluoresen *minor groove binder* (MGB) juga dilakukan Farkas et al. (2009). Penambahan *quencher* MGB pada ujung 3' *probe TaqMan* mempunyai beberapa kelebihan yaitu, latar belakang fluoresensi rendah karena jarak antara reporter dan *quencher* pendek sehingga meningkatkan rasio sinyal pengujian, molekul kecil MGB mengikat alur kecil dari DNA beruntai ganda sehingga menstabilkan duplek yang menghasilkan suhu leleh yang lebih tinggi dan memungkinkan penerapan *probe* yang lebih pendek dan spesifik daripada *probe* standar. Penggabungan rRT-PCR dengan MGB *TaqMan probe* dapat digunakan untuk pengujian *strain* virus ND yang cepat dan simpel. Namun demikian, kendala perbedaan geografi menjadi pertimbangan utama untuk pengembangan pengujian untuk semua *strain* virus ND virulen karena resiko hasil negatif palsu kemungkinan bisa terjadi sebagai akibat adanya perbedaan lokasi rancangan primer atau *probe*. Kondisi ini menjadi tantangan untuk pengembangan pengujian virus ND. Untuk itu, modifikasi primer dan *probe* yang digunakan dalam pengujian rRT-PCR secara berkelanjutan sangat diperlukan untuk meningkatkan sensitivitas pengujian virus ND.

KESIMPULAN

RT-PCR konvensional maupun *real time* telah menjadi metode pengujian utama untuk deteksi genom virus AI dan ND di laboratorium selama lebih dari

beberapa dekade yang lalu. Metode RT-PCR ini mempunyai sensitivitas dan spesifitas yang tinggi, resiko kontaminasi silang rendah, serta mampu mendeteksi sampel dalam jumlah banyak dan waktu singkat sehingga pengujian ini akan menjadi alat pengujian utama untuk pemberantasan dan pengendalian penyakit AI dan ND di masa yang akan datang. Pengembangan dan modifikasi teknologi RT-PCR telah banyak dilakukan untuk meningkatkan spesifitas dan sensitivitas deteksi genom virus AI dan ND. Validasi dan standarisasi pengembangan dan modifikasi teknologi RT-PCR harus dilakukan untuk harmonisasi pengujian di seluruh dunia dengan tujuan untuk menghindari interpretasi yang salah dari hasil pengujian tersebut sehingga penentuan tindakan pemberantasan serta pengendalian penyakit AI dan ND di lapangan tidak terjadi kesalahan.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdulmawjood A, Roth S, Bülte M. 2002. Two methods for construction of internal amplification controls for the detection of *Escherichia coli* O157 by polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes*. 16:335-339.
- Abu Al-Soud W, Rådström P. 2000. Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces, and meat. *J Clin Microbiol*. 38:4463-4470.
- Adi AAAM, Astawa NM, Putra KSA, Hayashi Y, Matsumoto Y. 2008. Deteksi virus penyakit tetelo isolat lapangan dengan metode *nested* RT-PCR. *J Vet*. 9:128-134.
- Agüero M, Sánchez A, San Miguel E, Gómez-Tejedor C, Jiménez-Clavero MA. 2007. A real-time TaqMan RT-PCR method for neuraminidase type 1 (N1) gene detection of H5N1 Eurasian strains of Avian Influenza virus. *Avian Dis*. 51:378-381.
- Belak S. 2007. Molecular diagnosis of viral diseases, present trends and future aspects. A view from the OIE collaborating centre for the application of polymerase chain reaction methods for diagnosis of viral diseases in veterinary medicine. *Vaccine*. 25:5444-5452.
- Biles BD, Connolly BA. 2004. Low-fidelity *Pyrococcus furiosus* DNA polymerase mutants useful in error-prone PCR. *Nucleic Acids Res*. 32:3-7.
- Black EM, Lowings JP, Smith J, Heaton PR, McElhinney LM. 2002. A rapid RT-PCR method to differentiate six established genotypes of rabies and rabies-related viruses using TaqMan technology. *J Virol Methods*. 105:25-35.
- Burgos JS, Ramírez C, Tenorio R, Sastre I, Bullido MJ. 2002. Influence of reagents formulation on real-time PCR parameters. *Mol Cell Probes*. 16:257-260.
- Burkardt HJ. 2000. Standardization and quality control of PCR analyses. *Clin Chem Lab Med*. 38:87-91.
- Carman WF, Wallace LA, Walker J, McIntyre S, Noone A, Christie P, Millar J, Douglas DJ. 2000. Rapid virological surveillance of community influenza infection in general practice. *BMJ*. 321:736-737.
- Chantratita W, Sukasem C, Kaewpongsri S, Srichunrusami C, Pairoj W, Thitithanyanont A, Chaichoune K, Ratanakron P, Songserm T, Damrongwatanapokin S, Landt O. 2008. Qualitative detection of Avian Influenza A (H5N1) viruses: a comparative evaluation of four real-time nucleic acid amplification methods. *Mol Cell Probes*. 22:287-293.
- Cleaveland S, Laurenson MK, Taylor LH. 2001. Diseases of humans and their domestic mammals: pathogen characteristics, host range and the risk of emergence. *Philos Trans R Soc Lond Ser B. Biol Sci*. 356:991-999.
- Cockerill FRIII, Smith TF. 2002. Rapid-cycle real-time PCR: a revolution for clinical microbiology. *ASM News*. 68:77-83.
- Creelan JL, Graham DA, McCullough SJ. 2002. Detection and differentiation of pathogenicity of avian paramyxovirus serotype 1 from field cases using one-step reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Avian Pathol*. 31:493-499.
- Cubero J, van der Wolf J, van Beckhoven J, López MM. 2002. An internal control for the diagnosis of crown gall by PCR. *J Microbiol Methods*. 51:387-392.
- Das A, Spackman E, Senne D, Pedersen J, Suarez DL. 2006. Development of an internal positive control for rapid diagnosis of Avian Influenza virus infections by real-time reverse transcription-PCR with lyophilized reagents. *J Clin Microbiol*. 44:3065-3073.
- Dawood FS, Jain S, Finelli L, Shaw MW, Lindstrom S, Garten RJ, Gubareva L V, Xu X, Bridges CB, Uyeki TM. 2009. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N Engl J Med*. 360:2605-2615.
- Didenko V V. 2001. DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications. *Biotechniques*. 31:1106-1116, 1120-1121.
- Dingle KE, Crook D, Jeffery K. 2004. Stable and noncompetitive RNA internal control for routine clinical diagnostic reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol*. 42:1003-1011.
- Farkas T, Székely E, Belák S, Kiss I. 2009. Real-time PCR-based pathotyping of Newcastle Disease virus by use of TaqMan minor groove binder probes. *J Clin Microbiol*. 47:2114-2123.
- Fraga D, Meulia T, Fenster S. 2008. Real-time PCR. In: *Current protocols essential laboratory techniques*. New York (US): John Wiley & Sons, Inc. p. 10.3.1-10.3.33.
- Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE. 1999. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques*. 26:112-125.

- Gall A, Hoffmann B, Harder T, Grund C, Beer M. 2008. Universal primer set for amplification and sequencing of HA0 cleavage sites of all influenza A viruses. *J Clin Microbiol.* 46:2561-2567.
- Germer JJ, Lins MM, Jensen ME, Harmsen WS, Ilstrup DM, Mitchell PS, Cockerill FR, Patel R. 2003. Evaluation of the MagNA pure LC instrument for extraction of hepatitis C virus RNA for the COBAS AMPLICOR Hepatitis C virus test, version 2.0. *J Clin Microbiol.* 41:3503-3508.
- Ghasemi A, Salmanian AH, Sadeghifard N, Salarian AA, Gholi MK. 2011. Cloning, expression and purification of Pwo polymerase from *Pyrococcus woesei*. *Iran J Microbiol.* 3:118-122.
- Ghom DS, Thur B, Hofmann MA. 2000. Detection of Newcastle Disease virus in organs and faeces of experimentally infected chickens using RT-PCR. *Avian Pathol.* 29:143-152.
- Gibbs RA. 1990. DNA amplification by the polymerase chain reaction. *Anal Chem.* 62:1202-1214.
- Giglio S, Monis PT, Saint CP. 2003. Demonstration of preferential binding of SYBR Green I to specific DNA fragments in real-time multiplex PCR. *Nucleic Acids Res.* 31:e136.
- He J, Bose ME, Beck ET, Fan J, Tiwari S, Metallo J, Jurgens LA, Kehl SC, Ledebor N, Kumar S, Weisburg W, Henrickson KJ. 2009. Rapid multiplex reverse transcription-PCR typing of influenza A and B virus, and subtyping of influenza A virus into H1, 2, 3, 5, 7, 9, N1 (human), N1 (animal), N2 and N7, including typing of novel swine origin influenza A (H1N1) virus, during the 2009. *J Clin Microbiol.* 47:2772-2778.
- Hewajuli DA, Dharmayanti NLPI. 2012. Sirkulasi flu burung subtipe H5 pada unggas di Jawa Barat, Banten dan Jawa Timur sepanjang tahun 2008-2009. *J Vet.* 13:293-302.
- Hoffmann B, Harder T, Starick E, Depner K, Werner O, Beer M. 2007. Rapid and highly sensitive pathotyping of *Avian Influenza A H5N1* virus by using real-time reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol.* 45:600-603.
- Huber I, Campe H, Sebah D, Hartberger C, Konrad R, Bayer M, Busch U, Sing A. 2011. A multiplex one-step real-time RT-PCR assay for influenza surveillance. *Eurosurveillance.* 16:1-7.
- Kainz P. 2000. The PCR plateau phase-towards an understanding of its limitations. *Biochim Biophys Acta-Gene Struct Expr.* 1494:23-27.
- Kanoksilapatham W. 2007. Directed-mutagenesis and deletion generated through an improved overlapping-extension PCR based procedure. *Silpakorn Univ Sci Technol J.* 1:7-12.
- Kho CL, Mohd-Azmi ML, Arshad SS, Yusoff K. 2000. Performance of an RT-nested PCR ELISA for detection of Newcastle Disease virus. *J Virol Methods.* 86:71-83.
- Kim LM, Afonso CL, Suarez DL. 2006. Effect of probe-site mismatches on detection of virulent Newcastle Disease viruses using a fusion-gene real-time reverse transcription polymerase chain reaction test. *J Vet Diagn Invest.* 18:519-528.
- Kim LM, Suarez DL, Afonso CL. 2008. Detection of a broad range of class I and II Newcastle Disease viruses using a multiplex real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay. *J Vet Diagnostic Investig.* 20:414-425.
- Kim YJ, Lee HS, Bae SS, Jeon JH, Lim JK, Cho Y, Nam KH, Kang SG, Kim SJ, Kwon ST, Lee JH. 2007. Cloning, purification, and characterization of a family B type DNA polymerase from a hyperthermophilic archaeon *Thermococcus* sp. NA1. *J Microbiol Biotechnol.* 17:1090-1097.
- Koopmans M, Wilbrink B, Conyn M, Natrop G, van der Nat H, Vennema H, Meijer A, van Steenbergen J, Fouchier R, Osterhaus A, Bosman A. 2004. Transmission of H7N7 *Avian Influenza A* virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands. *Lancet.* 363:587-593.
- Lee CW, Suarez DL. 2004. Application of real-time RT-PCR for the quantitation and competitive replication study of H5 and H7 subtype *Avian Influenza* virus. *J Virol Methods.* 119:151-158.
- Lee MS, Chang PC, Shien JH, Cheng MC, Shieh SK. 2001. Identification and subtyping of *Avian Influenza* viruses by reverse transcription PCR. *J Virol Methods.* 97:13-22.
- Londt BZ, Banks J, Alexander D. 2007. Highly pathogenic *Avian Influenza* viruses with low virulence for chickens in *in vivo* tests. *Avian Pathol.* 36:347-350.
- McPherson MJ, Møller SG. 2000. PCR. Oxford (UK): BIOS Scientific Publishers.
- Mohran KA, Haroun M, Hasan M. 2011. Molecular detection, virus isolation pathotyping of Newcastle Disease virus field strain from backyard chickens in Qatar. *Res J Poult Sci.* 4:28-32.
- NCCLS. 1995. Molecular diagnostic methods for infectious diseases; approved guideline. 1st ed. Wayne (Pennsylvania): National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- Niesters HG. 2002. Clinical virology in real time. *J Clin Virol.* 25(Suppl.3):3-12.
- OIE. 2008. Validation and quality control of polymerase chain reaction methods used for the diagnosis of infectious diseases. Chapter 1. Paris (France): OIE Terrestrial Manual.
- OIE. 2012a. Avian Influenza disease. Chapter 2.3.4. Paris (France): OIE Terrestrial Manual.
- OIE. 2012b. Newcastle Disease. Chapter 2.3.14. Paris (France): OIE Terrestrial Manual.

- OIE. 2013. Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases. Chapter 1.1.5. Paris (France): OIE Terrestrial Manual.
- Pardal SJ. 2010. Menguji ekspresi gen menggunakan *real time* PCR. *Warta Penelitian dan Pengembangan Pertanian*. 32:13-14.
- Phipps LP, Essen SC, Brown IH. 2004. Genetic subtyping of influenza A viruses using RT-PCR with a single set of primers based on conserved sequences within the HA2 coding region. *J Virol Methods*. 122:119-122.
- Qin Z, Sun L, Ma B, Cui Z, Zhu Y, Katamura Y, Liu W. 2007. F gene recombination between genotype II and VII Newcastle Disease virus. *Virus Res*. 131:299-303.
- Saberfar E, Najafi A, Goodarzi Z, Lashini H. 2009. Multiplex reverse transcription-PCR assay for detection of type A influenza virus plus differentiation of avian H7 and H9 hemagglutinin subtypes in Iran. *Iran J Publ Health*. 38:29-34.
- Shankar BP, Sreenivas GRN, Pattnaik B, Manjunatha PBH, Sreenivas BK, Vinuthan MK, Ranjith D, Pradhan HK. 2009. Identification and subtyping of Avian Influenza viruses by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and agarose gel electrophoresis. *Int J Poult Sci*. 8:465-469.
- Spackman E, Senne DA, Myers TJ, Bulaga LL, Garber LP, Perdue ML, Lohman K, Daum LT, Suarez DL. 2002. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J Clin Microbiol*. 40:3256-3260.
- Storch GA. 2007. Diagnostic virology. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology* vol 1. Philadelphia (Pennsylvania): Lippincott Williams & Wilkins. p. 565-604.
- Swayne DE, Halvorson DA. 2008. Influenza. In: Saif YM, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Swayne DE, editors. *Diseases of poultry*. Ames (USA): Wiley-Blackwell. p. 153-184.
- Tao Q, Wang X, Bao H, Wu J, Shi L, Li Y, Qiao C, Yakovlevich SA, Mikhaylovna PN, Chen H. 2009. Detection and differentiation of four poultry diseases using asymmetric reverse transcription polymerase chain reaction in combination with oligonucleotide microarrays. *J Vet Diagn Invest*. 21:623-632.
- Tyagi S, Kramer FR. 1996. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol*. 14:303-308.
- Uhl JR, Cockerill FRI. 2004. The fluorescence resonance energy transfer system. In: Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, Tang JW, Unger ER, Relman DA, White TJ, editors. *Molecular microbiology diagnostic principles and practice*. Washington DC (USA): ASM Press. p. 295-306.
- Vandesompele J, De Paepe A, Speleman F. 2002. Elimination of primer-dimer artifacts and genomic coamplification using a two-step SYBR green I real-time RT-PCR. *Anal Biochem*. 303:95-98.
- Wanarska M, Kur J, Pladzyk R, Turkiewicz M. 2005. Thermostable *Pyrococcus woesei* β -D galactosidase-high level expression, purification and biochemical properties. *Acta Biochim Pol*. 52:781-787.
- WHO. 2002. WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance. Geneva (Switzerland): World Health Organization.
- Wise MG, Suarez DL, Seal BS, Pedersen JC, Senne DA, King DJ, Kapczynski DR, Spackman E. 2004. Development of a real-time reverse-transcription PCR for detection of Newcastle Disease virus RNA in clinical samples. *J Clin Microbiol*. 42:329-338.
- Yi J, Liu C. 2011. Detecting Newcastle disease virus in combination of RT-PCR with red blood cell absorption. *Virology*. 8:202.
- Yuwono T. 2006. Teori dan aplikasi *polymerase chain reaction*. Yogyakarta (Indonesia): Penerbit Andi.
- Zou J, Shun SH, Yen NT, Gong ZX. 2005. Complete genome sequence and biological characterization of a novel goose paramyxovirus SF02 isolated in China. *Virus Gene*. 30:13-21.