

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Newcastle Disease (ND) merupakan penyakit pada unggas yang sangat menular dan tersebar di seluruh dunia, sehingga menyebabkan kerugian ekonomi yang besar pada industri perunggasan (Samal, 2019). Hal ini dikarenakan angka morbiditas dan angka mortalitas yang tinggi hingga mencapai 100% (Kencana et al., 2019). Sesuai dampak yang ditimbulkan, *Newcastle disease* merupakan salah satu penyakit unggas yang termasuk daftar A oleh *Office International des Epizooties* (OIE) (Rell et al., 2015). Penyakit *Newcastle disease* disebabkan oleh virus dari spesies *Orthoavulavirus javaense* (ICTV, 2022), yang dapat menginfeksi sebagian besar spesies unggas, namun ayam (*Gallus gallus domesticus*) merupakan spesies yang paling peka (Rell et al., 2015). Infeksi *Newcastle disease* menyebabkan penurunan signifikan produksi telur pada ayam layer dan tidak dapat kembali normal walaupun sudah sembuh hingga menyebabkan kematian pada unggas (Akbar et al., 2017). *Newcastle disease* tersebar di Benua Asia, Afrika, Amerika, Australia, dan Eropa, dimana Indonesia merupakan salah satu negara endemis penyakit *Newcastle disease* dan kasus wabah *Newcastle disease* dilaporkan hampir di seluruh wilayah Indonesia (Alwi et al., 2022).

Di Indonesia, *Newcastle disease* dikenal dengan sebutan penyakit tetelo (Kencana et al., 2019). Penyakit *Newcastle disease* pertama kali ditemukan oleh Krenavald di Indonesia tepatnya di pulau Jawa pada tahun 1926 dan pada tahun 1927 yang diisolasi oleh Doyle di *Newcastle upon Tyne* (Joao et al., 2022), sejak saat itu sampai sekarang belum ada satu daerah pun di Indonesia yang bebas dari penyakit ini (Susanti et al., 2021). Menurut data yang diperoleh dari Dinas Peternakan dan Kesehatan Hewan Provinsi Sulawesi Selatan (2024), terdapat sebanyak 70 kasus kematian ayam akibat *Newcastle disease* di Kabupaten Pinrang pada tahun 2023.

Sebagai upaya pencegahan dan pengendalian terhadap kasus kematian ayam akibat infeksi virus *Newcastle disease*, maka dapat dilakukan *monitoring* penyakit. *Monitoring* dapat membantu dalam mengurangi kerugian ekonomi yang signifikan yang ditimbulkan (Martdeliza et al., 2015). Dalam membantu pelaksanaan *monitoring* penyakit *Newcastle disease*, maka dapat dilakukan upaya seperti pemeriksaan makroskopis dan histopatologi organ serta uji RT-PCR (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*). RT-PCR memiliki sensitivitas tinggi dan selektivitas tinggi sehingga digunakan sebagai *gold standart* untuk amplifikasi molekuler dan pengujian virus (Rahman et al., 2016). Dampak negatif dari infeksi virus *Newcastle disease* dapat menyebabkan perubahan patologi pada organ (Retno et al., 2015), sehingga pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis organ diperlukan untuk membantu mengonfirmasi tipe agen serta tingkat keparahan dari penyakit (Etriwati et al., 2017).

Berdasarkan uraian tersebut, diketahui bahwa *Newcastle disease* menjadi agen penyakit dengan angka morbiditas dan angka mortalitas yang tinggi, sehingga pelaksanaan *monitoring* melalui pemeriksaan makroskopis dan histopatologi organ serta uji RT-PCR dapat meminimalisir kerugian ekonomi yang signifikan. Maka dari itu, diperlukan penelitian untuk melihat gambaran makroskopis dan histopatologi organ serta

uji RT-PCR untuk mengonfirmasi *Orthoavulavirus javaense* sebagai agen penyebab penyakit *Newcastle disease* di Kabupaten Pinrang.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dipaparkan, maka dapat diambil rumusan masalah sebagai berikut:

- 1.2.1** Bagaimana gambaran makroskopis ayam layer yang terinfeksi virus *Newcastle disease* di peternakan Kabupaten Pinrang?
- 1.2.2** Bagaimana gambaran histopatologi ayam layer yang terinfeksi virus *Newcastle disease* di peternakan Kabupaten Pinrang?
- 1.2.3** Bagaimana hasil uji cRT-PCR pada ayam layer yang terinfeksi virus *Newcastle disease* di peternakan Kabupaten Pinrang?

1.3 Tujuan Penelitian

- 1.3.1** Untuk melihat gambaran makroskopis ayam layer yang terinfeksi virus *Newcastle disease* di peternakan Kabupaten Pinrang
- 1.3.2** Untuk melihat gambaran histopatologi ayam layer yang terinfeksi virus *Newcastle disease* di peternakan Kabupaten Pinrang
- 1.3.3** Untuk mengetahui hasil uji cRT-PCR pada ayam layer yang terinfeksi virus *Newcastle disease* di peternakan Kabupaten Pinrang

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Pengembangan Ilmu

Manfaat pengembangan ilmu pada penelitian ini adalah dapat memberikan informasi dan literatur ilmiah untuk penelitian selanjutnya terkait gambaran makroskopis dan histopatologi organ serta hasil uji cRT-PCR pada ayam layer yang terinfeksi virus *Newcastle disease* pada peternakan ayam layer di Kabupaten Pinrang.

1.4.2 Manfaat Aplikasi

Manfaat aplikasi pada penelitian ini adalah untuk menyajikan data epidemiologi terkait infeksi virus *Newcastle disease* pada ayam layer di Kabupaten Pinrang.

1.5 Hipotesis

Hipotesis penelitian ini adalah ditemukan hasil bahwa masih terdapat persebaran penyakit *Newcastle disease* pada peternakan ayam layer di Kabupaten Pinrang.

1.6 Keaslian Penelitian

Penelitian yang berjudul “Diagnosa *Newcastle Disease* Berdasarkan Gambaran Makroskopis, Histopatologi dan Uji cRT-PCR pada Salah Satu Peternakan Ayam Layer di Kabupaten Pinrang, Sulawesi Selatan”, belum pernah dilakukan sebelumnya, namun terdapat penelitian serupa, yakni sebagai berikut:

Tabel 1. Penelitian serupa. Dapat dilihat pada tabel persamaan dan perbedaan dengan penelitian serupa yang pernah dilakukan sebelumnya

No.	Judul Penelitian	Persamaan	Perbedaan
1.	(Kencana et al., 2012) dengan judul “Peneguhan Diagnosis Penyakit Newcastle Disease Lapang pada Ayam Buras di Bali Menggunakan Teknik RT-PCR”	Penelitian memiliki satu metode yang serupa yakni menggunakan uji RT-PCR sebagai metode diagnosis.	Objek penelitian berbeda, yakni menggunakan ayam buras, serta pada penelitian ini hanya menggunakan satu metode diagnosis.
2.	(Rahman et al., 2016) dengan judul “Detection of Newcastle disease virus of poultry by real time reverse transcription-polymerase chain reaction”	Penelitian memiliki satu metode yang serupa, yakni menggunakan uji RT-PCR sebagai metode diagnosis.	Sampel isolat yang digunakan sudah ada dari penelitian sebelumnya, serta pada penelitian ini hanya menggunakan satu metode diagnosis.

1.7 Kajian Pustaka

1.7.1 Ayam Layer

Ayam layer atau ayam petelur adalah ayam betina dewasa yang sengaja dipelihara untuk dimanfaatkan telurnya. Ayam layer yang dipelihara sebagai penghasil telur konsumsi umumnya tidak memakai pejantan dalam kandangnya karena telur konsumsi tidak perlu dibuahi (Krisnawati et al., 2018). Ayam layer termasuk salah satu komoditas unggas yang memiliki peran penting dalam mendukung ketersediaan protein hewani yang murah dan mudah diperoleh (Purwadi et al., 2022).



Gambar 1. Ayam layer. Karakteristik dari ayam layer dengan bulu berwarna cokelat (Murugan, 2021)

Fase pemeliharaan ayam petelur dibagi menjadi tiga fase, yaitu fase *starter*, fase *grower*, dan fase *layer*. Fase awal/*starter* merupakan masa ketika anak ayam ras petelur sudah kuat untuk hidup layak, yaitu sejak anak ayam berusia 1 hari – 6 minggu. Fase *grower*, yaitu pemeliharaan ayam dari umur 7 sampai 20 minggu (awal bertelur). Lalu, fase *layer* merupakan masa ayam bertelur dari umur 20 minggu sampai 80 minggu atau (afkir) (Unutio et al., 2015) Fase *layer* digolongkan menjadi dua, yaitu fase *layer* I terhitung sejak awal produksi hingga puncak produksi dan fase *layer* II terhitung sejak akhir puncak produksi hingga afkir. Pada fase *layer* inilah infeksi *Newcastle disease* sangat merugikan peternak (Akbar et al., 2017).

Menurut Sapkota et al. (2020), taksonomi dari ayam *layer* adalah sebagai berikut:

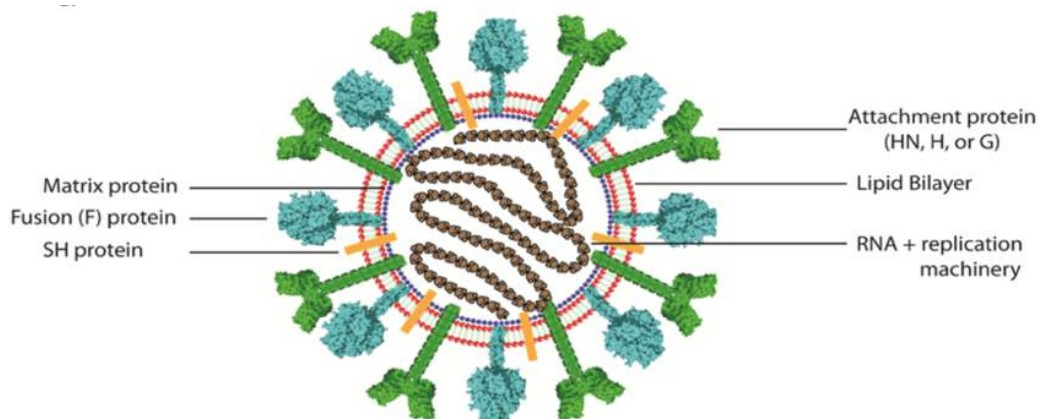
Kingdom	: Animalia
Sub-kingdom	: Metazoa
Phylum	: Chordata
Sub-phylum	: Vertebrata
Class	: Aves
Sub-class	: Neornithes
Order	: Galliformes
Family	: Phasianidae
Genus	: <i>Gallus</i>
Species	: <i>Gallus gallus domesticus</i>

1.7.2 *Newcastle Disease*

Newcastle Disease (ND) merupakan penyakit yang disebabkan oleh *Orthoavulavirus javaense*, yang sebelumnya bernama *Avian orthoavulavirus 1* dan umumnya dikenal sebagai virus *Newcastle Disease* (NDV) yang termasuk ke dalam famili Paramyxoviridae dan genus *Orthoavulavirus* (Amoia et al., 2024). Virus *Newcastle disease* merupakan virus dengan genom RNA beruntai tunggal negatif dan tidak tersegmentasi. Virion dari virus *Newcastle disease* berbentuk bulat dengan diameter 150 nm atau lebih dan berserabut. Genomnya memiliki panjang sekitar 15,2 kb yang mengkode enam protein struktural dan dua protein non-struktural. Genom virus mengkodekan enam protein struktural, diantaranya Nukleoprotein (NP), RNA polimerase besar (L), *Fusion* (F), *Hemagglutinin Neuraminidase* (HN), Matriks (M) dan protein fosfor (P). Sedangkan protein non-struktural, yaitu protein W dan protein V ditambahkan pada gen P selama transkripsi mRNA (Abdisa dan Tagesu, 2017).

Komponen-komponen dalam virus akan bekerja sama untuk menginfeksi sel inang. Setiap protein memiliki peran khusus dan saling mendukung satu sama lain. Protein NP berfungsi untuk membungkus dan melindungi materi genetik virus agar tetap stabil, dan proses ini dibantu oleh protein P dan L. Protein P berperan dalam pembuatan RNA virus dan membantu protein NP agar tetap larut dalam sel. Protein L adalah protein terbesar dan multifungsi, termasuk membantu virus menggandakan materi genetiknya, serta mengontrol proses replikasi virus di dalam sel. Protein M membentuk kerangka virus dan membantu proses pembentukan virus baru. Sementara itu, protein HN dan F

sangat penting untuk memungkinkan virus masuk ke dalam sel inang dan keluar dari sel setelah infeksi (Zhang et al., 2023).



Gambar 2. Struktur virus Newcastle disease. RNA genomik dibungkus oleh protein inti nukleokapsid (coklat), yang dihubungkan ke selubung virus (merah) oleh protein matriks (biru). Perlekatan (hijau), hidrofobik kecil (oranye), dan protein fusi (sian) digambarkan pada permukaan virus (Abdisa dan Tagesu, 2017)

Berdasarkan ICTV (2022), taksonomi dari virus *Newcastle disease* adalah sebagai berikut:

Realm	: Riboviria
Kingdom	: Orthornavirae
Phylum	: Negarnaviricota
Sub-phylum	: Haploviricotina
Class	: Monjiviricetes
Order	: Mononegavirales
Family	: Paramyxoviridae
Sub-family	: Avulavirinae
Genus	: <i>Orthoavulavirus</i>
Species	: <i>Orthoavulavirus javaense</i>

Virulensi virus *Newcastle disease* dapat ditentukan melalui analisis molekuler terhadap sekuen gen yang menyandi protein F, yang berperan penting dalam penetrasi partikel virus ke dalam sel yang terinfeksi. Protein F memiliki bagian yang disebut *cleavage sites* atau daerah pemotongan, yang sangat mempengaruhi proses infeksi virus. Daerah pemotongan ini memainkan peran kunci dalam kemampuan virus untuk masuk ke dalam sel, sehingga keberadaannya menjadi indikator utama dalam menentukan tingkat virulensi virus *Newcastle disease* (Rell et al., 2021).

Menurut Retno et al. (2015), *Newcastle disease* dapat diklasifikasikan menjadi 5 patotipe berdasarkan tingkat virulensi penyakit, diantaranya:

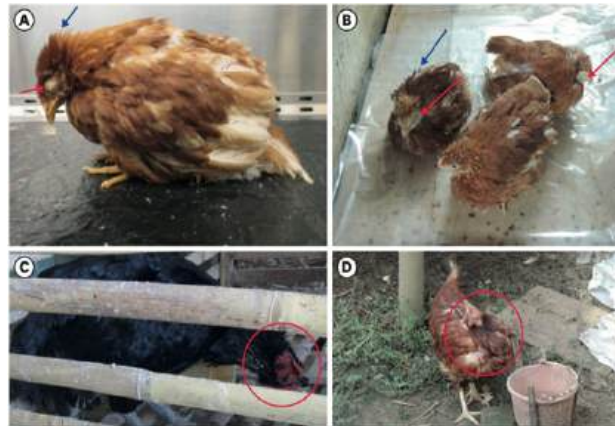
1. *Viscerotropic velogenic* adalah *strain* virus *Newcastle disease* yang menyebabkan serangan akut dan sering kali berakibat fatal, dengan tanda khas berupa luka dan perdarahan pada organ pencernaan. Ayam yang terinfeksi akan menunjukkan tanda-tanda klinis seperti lesu, penurunan nafsu makan,

penurunan produksi telur yang drastis, diare, dan tingkat kematian yang dapat mencapai lebih dari 90%.

2. *Neurotropic velogenic* adalah *strain* virus *Newcastle disease* dengan tingkat kematian yang tinggi, yang biasanya diawali dengan gangguan pernapasan dan gangguan saraf, seperti tortikolis. Ayam yang terinfeksi menjadi lemah dan kesulitan makan serta minum, dengan tingkat kematian berkisar antara 10 hingga 20%.
3. *Mesogenic* adalah *strain* virus *Newcastle disease* yang menyebabkan gangguan pernapasan akut dan gangguan saraf pada sebagian ayam, serta penurunan produksi telur yang berlangsung selama 1-3 minggu. Tingkat kematian pada jenis ini relatif rendah, hanya sekitar 10%.
4. *Lentogenic* adalah *strain* virus *Newcastle disease* yang menimbulkan gangguan pernapasan ringan dan tidak menunjukkan tanda klinis berupa gangguan saraf, bahkan seringkali bersifat subklinis. Penurunan produksi telur tidak signifikan, dan tingkat kematiannya hampir tidak ada. *Strain* virus ini sering digunakan sebagai vaksin aktif.
5. *Asymptomatic enteritic* adalah *strain* virus *Newcastle disease* yang tidak menunjukkan tanda klinis yang jelas dan memiliki tingkat keganasan yang rendah, dengan replikasi utama terjadi di saluran pencernaan.

Kemampuan *strain* dari virus *Newcastle disease* untuk menyebabkan kelainan neurologis bergantung pada beberapa faktor, seperti efisiensi replikasi di jaringan perifer, kemampuan melintasi *blood-brain barrier*, dan juga efisiensi replikasi di jaringan saraf. Perbedaan laju replikasi virus *Newcastle disease* di jaringan saraf dapat membedakan *strain velogenic* dan *strain mesogenic*. Adapun *strain viscerotropic* bereplikasi lebih cepat dibandingkan *strain neurotropic*, sehingga memungkinkan virus menyebar dan bereplikasi secara efisien di sebagian besar jaringan inang dan menyebabkan lesi pada organ (Samal, 2019).

Tanda klinis seperti batuk, sulit bernapas, ngorok dan ditemukannya *nasal discharge* merupakan gangguan pernapasan yang sering ditemukan pada infeksi virus *Newcastle disease*. Tanda klinis lainnya, yaitu nafsu makan berkurang, feses berwarna hijau yang disertai gumpalan putih, gemetaran pada seluruh tubuh, kelainan saraf (kelumpuhan pada kaki atau sayap, tortikolis dan berputar-putar). Pada ayam petelur yang sedang memproduksi, produksi telur akan turun secara drastis. Selain produksi telur, kualitas telur juga akan menurun. Kerabang telur menjadi tidak normal (kasar, tipis, dan lembek), serta fertilitas dan daya tetas telur menurun (Retno et al., 2015). Adapun tanda-tanda klinis tersebut tidak terlalu khas dan serupa dengan tanda klinis dari beberapa penyakit, seperti *highly pathogenic avian influenza*, *infectious bronchitis*, *infectious laryngotracheitis*, *fowl cholera*, dan *psittacosis* (Zhang et al., 2023).



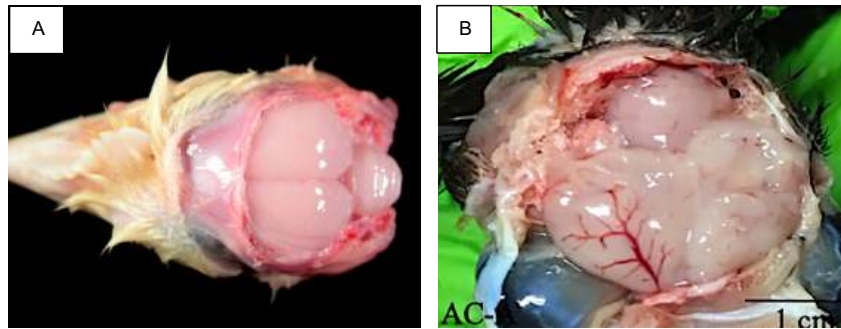
Gambar 3. Tanda klinis yang diamati pada ayam yang terinfeksi virus *Newcastle disease*. Lesu, bulu acak-acakan (panah biru), pembengkakan kelopak mata dan jaringan kepala (panah merah) (A,B) dan tortikolis (lingkaran merah) (C,D) (Dharmayanti et al., 2024)

Unggas yang terinfeksi virus tetapi tidak menunjukkan tanda klinis, dimungkinkan terjadi efek infeksi parsial, sehingga tanda klinis tidak tampak, namun virus tetap dikeluarkan. Selama masa inkubasi, virus bereplikasi pada jalur masuknya. *Strain* virus *Newcastle disease* virulen (mesogenik dan velogenik) dapat menginvasi pembuluh darah, mengikuti peredaran darah dan bereplikasi di organ *visceral*, dikeluarkan melalui feses (Panus et al., 2015), kemudian akan ditularkan langsung ke unggas yang sehat melalui jalur oral dan pernapasan. Selain melalui feses, unggas yang terinfeksi juga dapat menyebarkan virus *Newcastle disease* melalui *nasal discharge*, *lacrimal discharge*, dan udara yang dihembuskan. Air minum, pakan, peralatan, tempat makan, tempat air minum, kantong pakan, tempat penyimpanan telur, kandang, pergerakan manusia, pengunjung, maupun pemilik juga dapat menularkan virus dari satu tempat ke tempat lain. Penularan dari virus *Newcastle disease* hanya terjadi melalui jalur horizontal. Anak ayam yang baru menetas dapat terinfeksi melalui cangkang, baki, dan kotak ayam yang terkontaminasi. Karena cara penyebaran penyakit secara aerosol, virus *Newcastle disease* dapat menginfeksi semua unggas di dalam area terbatas (Sharif et al., 2014).

1.7.3 Gambaran Makroskopis Ayam Layer yang Terinfeksi *Newcastle Disease*

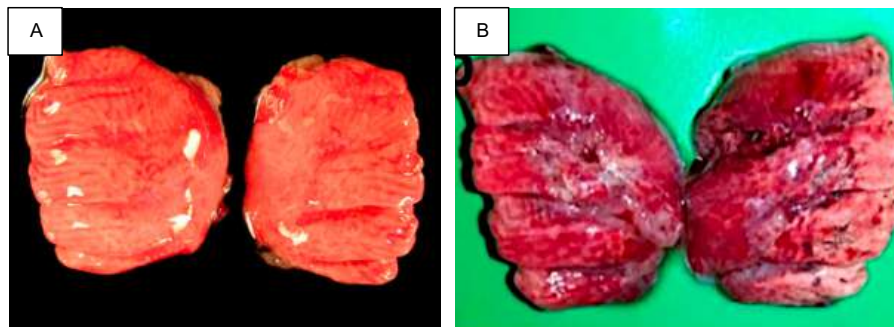
Virus *Newcastle disease* dapat bereplikasi di hampir setiap organ dan terutama pada sistem pencernaan, pernapasan, dan saraf. Infeksi virus *Newcastle disease* dapat menyebabkan perubahan patologi kompleks pada organ-organ tersebut (Dharmayanti et al., 2024). Hasil pemeriksaan patologi anatomi pada ayam layer yang terinfeksi virus *Newcastle disease* dapat ditemukan lesi organ makroskopis, yaitu adanya hemoragi pada organ *visceral* (Napriela da Prasetyo, 2022).

Infeksi virus *Newcastle disease* dapat menyebabkan degenerasi dan penebalan dinding pembuluh darah di otak. Kehadiran virus di otak mengakibatkan kerusakan pada pembuluh darah dan neuron. Kerusakan ini kemudian memicu respons inflamasi yang dapat memperburuk kondisi ayam yang terinfeksi (Etriwati et al., 2023). Pada proses inflamasi, pembuluh darah mengalami vasodilatasi yang menghasilkan peningkatan volume darah (Pranatha et al., 2018).



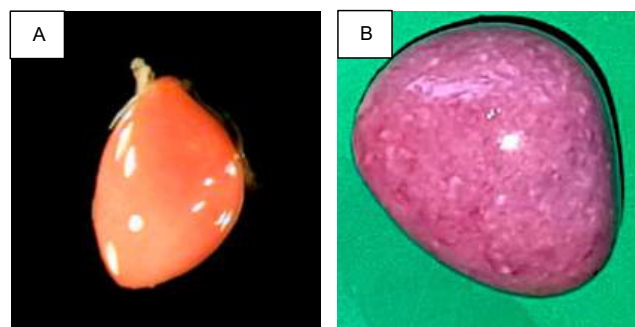
Gambar 4. Perbandingan gambaran makroskopis otak. Gambaran normal otak (A) (Majó & Dolz, 2019), vasodilatasi pada pembuluh darah otak ayam yang terinfeksi virus *Newcastle disease* (B) (Etriwati et al., 2023)

Virus *Newcastle disease* menyerang sistem pernapasan ayam dengan menempel pada sel-sel saluran pernapasan. Pada tahap awal, terlihat perubahan pada pembuluh darah seperti kongesti, hemoragi, dan edema. Perubahan ini diikuti kerusakan pada alveolus dan infiltrasi sel-sel imun (Kabiraj et al., 2020).

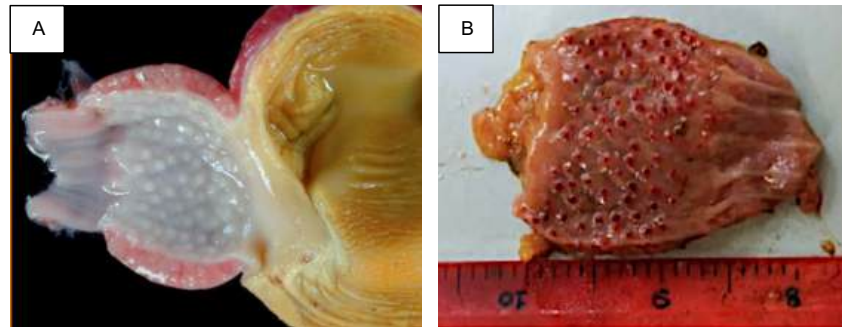


Gambar 5. Perbandingan gambaran makroskopis paru-paru. Gambaran normal paru-paru (A) (Majó & Dolz, 2019), hemoragi pada paru-paru ayam yang terinfeksi virus *Newcastle disease* (B) (Kabiraj et al., 2020)

Pemeriksaan makroskopis pada limpa ayam yang terinfeksi virus *Newcastle disease* menunjukkan adanya nekrosis yang ditandai dengan bintik-bintik putih (*focal nekrotik*) yang tersebar di seluruh bagian limpa (Retno et al., 2015). Jumlah dan ukuran dari *focal nekrotik* akan meningkat seiring waktu. Hal ini lama-kelamaan akan menyebabkan atrofi pada limpa (Kabiraj et al., 2020).

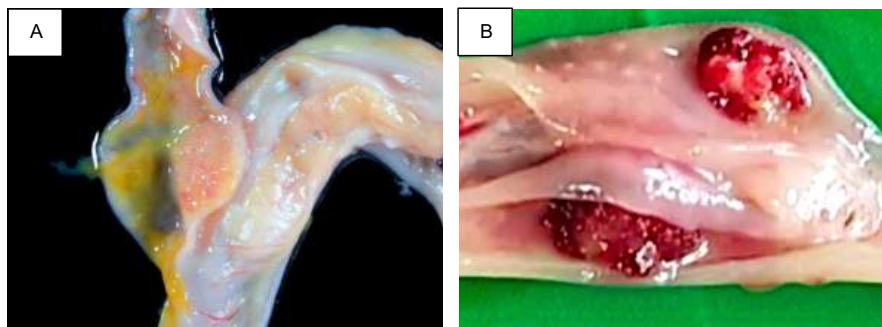


Gambar 6. Perbandingan gambaran makroskopis limpa. Gambaran normal limpa (A) (Majó & Dolz, 2019), atrofi dan focal nekrosis pada limpa ayam yang terinfeksi virus *Newcastle disease* (B) (Kabiraj et al., 2020)



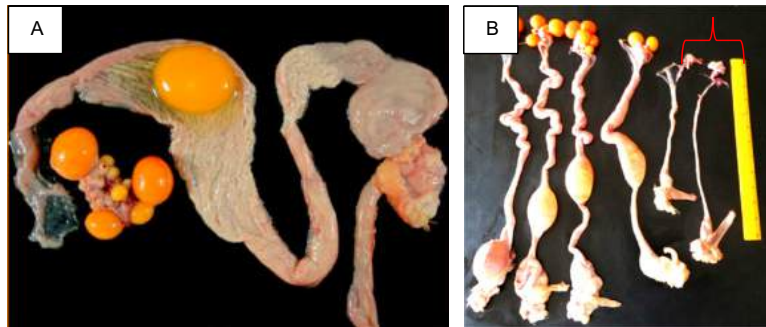
Gambar 7. Perbandingan gambaran makroskopis *proventriculus*. Gambaran normal *proventriculus* (A) (Majó & Dolz, 2019), hemoragi berupa *petechiae* pada *proventriculus* ayam yang terinfeksi virus *Newcastle disease* (B) (Das et al., 2021)

Pada ayam yang terinfeksi virus *Newcastle disease* dapat ditemukan adanya hemoragi pada *proventriculus* dan *caeca tonsil*. Hemoragi dapat berupa *petechiae* dan ekimosa yang terjadi akibat reaksi peradangan karena adanya antigen yang menyebabkan aliran darah yang berlebihan dan peradangan pada sel. Adanya hemoragi dan *petechiae* pada *proventriculus* merupakan tanda patognomonis *Newcastle disease*. Hemoragi merupakan keadaan keluarnya darah dari pembuluh darah oleh adanya proses inflamasi. Pelebaran sel endotel pada proses inflamasi akan meningkatkan volume darah dalam pembuluh darah. Volume darah yang meningkat di jaringan dapat menimbulkan perdarahan (Napriila & Prasetyo, 2022).



Gambar 8. Perbandingan gambaran makroskopis *caeca tonsil*. Gambaran normal *caeca tonsil* (A) (Majó & Dolz, 2019), hemoragi pada *caeca tonsil* ayam yang terinfeksi virus *Newcastle disease* (B) (Kabiraj et al., 2020)

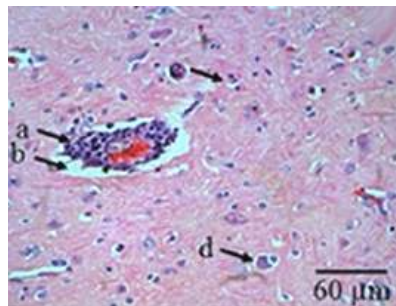
Pada ayam yang terinfeksi virus *Newcastle disease*, pada organ reproduksi akan mengalami berbagai gangguan. Sel telur yang dihasilkan akan menjadi abnormal, dan pada awal infeksi oviduk akan mengalami edema serta hiperemi akibat peningkatan aliran darah. Seiring berjalannya waktu, oviduk akan mengalami atrofi dan pemendekan, sementara ovarium mengalami atresia folikel, di mana folikel yang seharusnya berkembang menjadi telur tidak dapat berkembang dengan baik. Akibatnya, fungsi reproduksi ayam terganggu secara signifikan (Igwe et al., 2018). Selain itu, pada ayam petelur yang sedang berproduksi, dapat ditemukan calon kuning telur yang mengalami perdarahan (Retno et al., 2015).



Gambar 9. Perbandingan gambaran makroskopis organ reproduksi. Gambaran normal organ reproduksi (A) (Majó & Dolz, 2019), atrofi pada organ reproduksi ayam yang terinfeksi virus *Newcastle disease* (B) (Igwe et al., 2018)

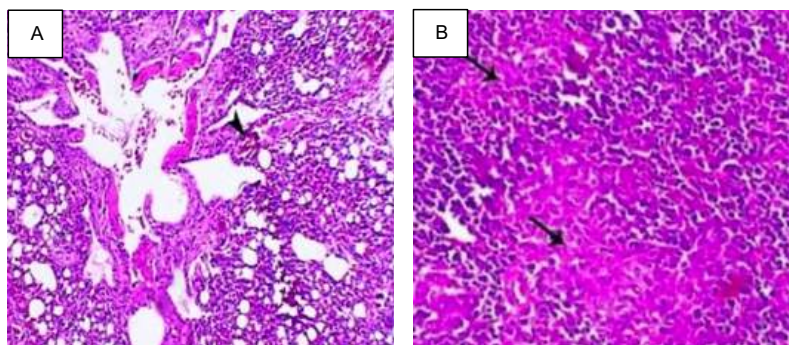
1.7.4 Gambaran Histopatologi Ayam Layer yang Terinfeksi *Newcastle Disease*

Pengamatan mikroskopis berupa perubahan histopatologi pada organ ayam yang terinfeksi *Newcastle disease* dapat membantu dalam menunjukkan tingkat keparahan dari infeksi yang terjadi (Etriwati et al., 2017). Tingkat keparahan berdasarkan pemeriksaan mikroskopis dapat bergantung pada seberapa lama infeksi telah berlangsung (Kabiraj et al., 2020).



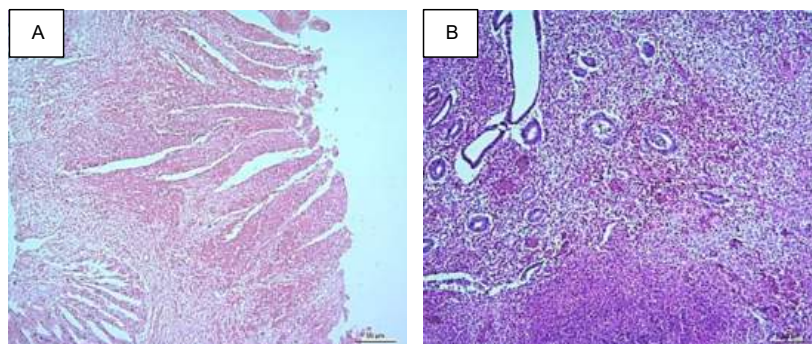
Gambar 10. Perubahan histopatologi pada otak ayam yang terinfeksi virus *Newcastle disease*. Menunjukkan adanya *perivascular cuffing* (Etriwati et al., 2017)

Tanda klinis pada sistem saraf muncul akibat kerusakan sel saraf di otak akibat infeksi dan perkembangan virus *Newcastle disease*. Virus ini merusak pembuluh darah dan neuron di otak, yang kemudian memicu respon inflamasi. Respon ini dimulai dengan penyebaran sel makrofag ke *perivascular cuffing*, lalu meluas ke astrosit dan mikroglia (Etriwati et al., 2017).



Gambar 11. Perubahan histopatologi pada paru-paru dan limpa ayam yang terinfeksi virus *Newcastle disease*. Pada paru-paru menunjukkan adanya kongesti (A), pada limpa menunjukkan adanya deplesi limfoid (B) (Elfatah et al., 2021)

Pada pemeriksaan histopatologi paru-paru ayam yang terinfeksi *Newcastle disease* menunjukkan adanya kongesti kapiler dan obstruksi bronkus akibat masuknya sel-sel inflamasi di sekitar bronkus. Selain itu, dapat terlihat adanya hiperplasia endodermal di sekitar parabronkus, yang terkait dengan infiltrasi sel inflamasi. Adapun pada limpa terlihat adanya deplesi limfoid dengan dengan proliferasi sel *histocytic* (Elfatah et al., 2021).



Gambar 12. Perubahan histopatologi pada *proventriculus* dan *caeca tonsil* ayam yang terinfeksi virus *Newcastle disease*. *Proventriculus* menunjukkan adanya hemoragi, edema, dan infiltrasi sel inflamasi (A), *caeca tonsil* menunjukkan adanya hemoragi pada *lamina propria* dan nodul limfatik (B) (Kabiraj et al., 2020)

Perubahan histopatologi pada *proventriculus* ayam yang terinfeksi virus *Newcastle disease* dapat mencakup deskuamasi pada permukaan epitel dan kelenjar epitel, serta hiperemia pada lapisan muskularis. Selain itu, terdapat infiltrasi sel inflamasi pada lapisan submukosa kelenjar *proventriculus*. Pada *caeca tonsil*, ditemukan nekrosis pada sel epitel mukosa, perdarahan, dan infiltrasi sel inflamasi ke lapisan submukosa. (Etriwati et al., 2017).

1.7.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) juga disebut sebagai ‘*Molecular Phototyping*’ merupakan teknik yang digunakan untuk memperbanyak segmen DNA yang kecil dan tertarget untuk menghasilkan jutaan salinan fragmen dari gen tertentu. Teknik ini dikembangkan pada tahun 1983 oleh Kary Mullis. Persyaratan umum untuk prosedur PCR adalah *thermocycler*, *DNA template*, *primer forward* dan *reverse*, *Taq polymerase*, *deoxynucleotide triphosphates* (dNTP), dan *buffer*. Proses PCR umumnya dilakukan dalam tabung reaksi kecil. Setiap siklus PCR memiliki 3 langkah utama yang penting, yaitu denaturasi (*denaturation*), penyesuaian *primer* spesifik (*annealing*), dan ekstensi akhir (*final extension*). Pada prosedur PCR, diperlukan sampel yang terdiri dari 4 basa nukleotida seperti Adenin, Timin, Sitosin, dan Guanin. Banyak agen infeksius dan galur gen tertentu dapat diidentifikasi dengan teknik PCR. Proses PCR tunggal dapat diselesaikan dalam 30-35 siklus yang memerlukan waktu 2 jam untuk amplifikasi guna menghasilkan fragmen DNA dalam jumlah yang dapat digunakan (Rajalakshmi, 2017).

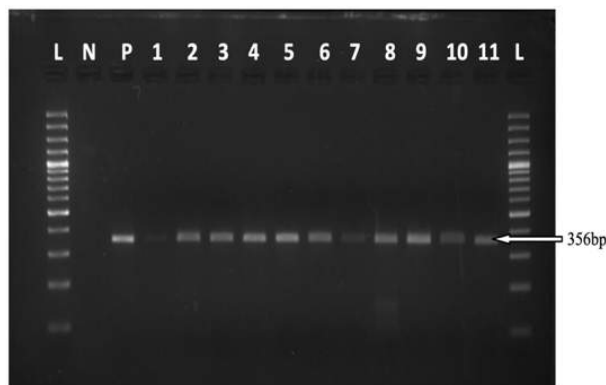
Pendeteksian virus *Newcastle disease* digunakan PCR karena memiliki sensitivitas dan selektivitas tinggi dan dianggap sebagai *gold standart* untuk amplifikasi dan pengujian molekuler virus. Pendeteksian virus *Newcastle disease* menggunakan RT-PCR (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*), yakni dengan terlebih

dahulu dilakukan transkripsi balik asam nukleat dari virus RNA (Mao et al., 2022), dimana RNA yang telah diekstraksi diubah menjadi DNA komplementer (cDNA) menggunakan enzim *reverse transcriptase*. Lalu, dilakukan amplifikasi PCR dimana cDNA kemudian diamplifikasi menggunakan *primer* PCR yang spesifik untuk genom virus *Newcastle disease* (Rahman et al., 2016).

Pada pendeteksian virus *Newcastle disease*, umumnya dilakukan dengan *quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* (qRT-PCR) dan *conventional Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction* (cRT-PCR). Menurut (Rajalakshmi, 2017), perbedaan qRT-PCR dan cRT-PCR sebagai berikut:

1. qRT-PCR (*quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*)
qRT-PCR juga disebut sebagai *real-time* PCR, merupakan teknik molekuler yang digunakan untuk mengukur jumlah salinan DNA dalam sampel secara kuantitatif. Metode ini memungkinkan deteksi dan pengukuran produk amplifikasi DNA dalam waktu nyata (*real-time*), memberikan hasil akurat jumlah salinan target pada sampel. Dalam qRT-PCR, pewarna *fluorescence* digunakan untuk mengidentifikasi produk amplifikasi yang terbentuk selama proses PCR. Selain itu, *probe* digunakan untuk mengukur jumlah produk pada setiap siklus PCR.
2. cRT-PCR (*conventional Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction*)
cRT-PCR didefinisikan sebagai prosedur PCR normal. Dalam prosedur cRT-PCR, digunakan sepasang *primer* yang dirancang untuk mengikat secara spesifik dua untai DNA yang saling berlawanan untuk memastikan amplifikasi yang tepat dari target DNA. *Primer* ini berfungsi untuk membatasi wilayah spesifik urutan DNA yang akan direplikasi. Urutan DNA yang menjadi target akan diperbanyak melalui proses PCR dan menghasilkan miliaran salinan dari segmen DNA. Proses amplifikasi berlangsung dalam siklus yang berulang antara 35 hingga 40 menit. Setelah proses amplifikasi selesai, hasil produk PCR dapat divisualisasikan dan dianalisis menggunakan elektroforesis gel.

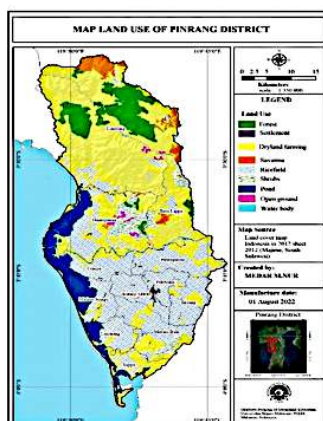
Elektroforesis dengan gel agarosa adalah metode yang digunakan untuk memisahkan fragmen asam nukleat (seperti DNA) berdasarkan ukuran (panjang fragmen). Pada prosedur PCR, proses ini digunakan untuk melihat apakah reaksi PCR berhasil menghasilkan produk yang diinginkan (fragmen DNA dengan panjang tertentu). Ketika sampel DNA yang telah dianalisis dengan PCR dimasukkan ke dalam gel agarosa dan diberi tegangan listrik, fragmen DNA akan bergerak melalui gel. Fragmen DNA yang lebih pendek akan bergerak lebih cepat, sedangkan fragmen yang lebih panjang akan bergerak lebih lambat. Oleh karena itu, panjang fragmen DNA dapat ditentukan berdasarkan posisi relatifnya setelah proses elektroforesis. Agar dapat melihat fragmen DNA yang telah terpisah, pewarna khusus (biasanya yang berikatan dengan DNA, seperti etidium bromida) yang ditambahkan ke gel. Pewarna ini akan menyerap sinar ultraviolet dan memancarkan cahaya yang dapat dilihat, sehingga memungkinkan visualisasi fragmen DNA yang ada. Fragmen DNA akan terlihat sebagai pita-pita terang pada gel. Pita-pita ini menunjukkan produk PCR. Kecerahan pita tersebut berkaitan dengan jumlah fragmen DNA pada panjang tertentu, dimana semakin terang pita, semakin banyak jumlah produk PCR pada panjang tersebut (Wittmeier & Hummel, 2022).



Gambar 13. Visualisasi hasil amplifikasi cRT-PCR menggunakan elektroforesis gel agarosa (Bhadouriya et al., 2018)

1.7.6 Topografi dan Kondisi Peternakan Ayam Layer di Kabupaten Pinrang

Kabupaten Pinrang terletak disebelah utara ibu kota Provinsi Sulawesi Selatan sejauh 185 km, berada pada posisi 3°19'13" sampai 4°10'30" LS dan 119°29'44" sampai 119°47'20" BT. Secara administratif, Kabupaten Pinrang terdiri dari 12 Kecamatan, 39 Kelurahan dan 69 Desa, dengan batas wilayah administrasi, sebelah utara berbatasan dengan Kab. Tana Toraja, sebelah selatan berbatasan dengan Kota Pare-Pare, sebelah timur berbatasan dengan Kab. Enrekang dan Sidrap, serta sebelah barat berbatasan dengan Provinsi Sulabar dan Selat Makassar. Luas wilayah Kabupaten Pinrang mencapai 1.961,77 km² atau sekitar 3,1 persen luas wilayah daratan Sulawesi Selatan. (Dinas Penanaman Modal dan Pelayanan Terpadu Provinsi Sulawesi Selatan, 2020).



Gambar 14. Peta Kabupaten Pinrang. Peta pembagian wilayah administratif dan pemanfaatan lahan Kabupaten Pinrang (Nur et al., 2023)

Kondisi topografi di wilayah Kabupaten Pinrang bervariasi dari kondisi datar hingga curam yang meliputi tiga dimensi kewilayahan dataran rendah, laut dan dataran tinggi. Untuk Kec. Patampanua, Kec. Watang Sawitto dan Kec. Tiroang, topografinya sebagian besar terdiri dari tanah datar. Kecamatan yang memiliki pantai masing-masing, yaitu Kec. Suppa, Kec. Mattiro, Kec. Sompe, Kec. Lanrisang dan Kec. Campa, dengan garis pantai sepanjang 93 km. Sedangkan, kecamatan yang mempunyai topografi berbukit dan bergunung adalah Kec. Lembang, Kec. Duampanua, dan Kec. Batulappa. Adapun ketinggian wilayah bervariasi pada ketinggian 0-500 m (60.41%), ketinggian 500-

1000 m (19.69%) dan ketinggian 1000 m (9.90%) diatas permukaan laut (Dinas Penanaman Modal dan Pelayanan Terpadu Provinsi Sulawesi Selatan, 2020).

Pada sektor peternakan, pemerintah Kabupaten Pinrang memiliki program dalam meningkatkan potensi peternakan dengan memberikan bantuan ternak kepada kelompok tani, pelatihan usaha tani, pengembangan peternakan komoditas unggulan, pengendalian kesehatan hewan, serta pembangunan sumber daya sarana dan prasarana, maka dari itu banyak masyarakat di Kabupaten Pinrang yang berprofesi sebagai peternak (Dinas Penanaman Modal dan Pelayanan Terpadu Provinsi Sulawesi Selatan, 2020).

Populasi ternak ayam layer di Kabupaten Pinrang per kecamatan pada tahun 2023 berdasarkan data dari Dinas Peternakan dan Perkebunan Kabupaten Pinrang (2023), yakni Kec. Suppa (180.020 ekor), Kec. Mattiro Sompe (25.348 ekor), Kec. Lanrisang (71.221 ekor), Kec. Mattiro Bulu (690.013 ekor), Kec. Watang Sawitto (51.625 ekor), Kec. Paleteang (53.298 ekor), Kec. Tiroang (140.204 ekor), Kec. Patampanua (374.341 ekor), Kec. Cempa (39.673 ekor), Kec. Duampanua (53.748 ekor), Kec. Batulappa (22.727 ekor) dan Kec. Lembang (30.746 ekor) dengan total populasi sebanyak 1.732.964 ekor ayam petelur.

Wabah *Newcastle disease* telah dilaporkan di Sulawesi Selatan sejak 2012 pada bulan Januari hingga 2014 pada bulan Mei (Alwi et al., 2022). Berdasarkan studi dari Saputri et al. (2021), diketahui bahwa ketiga sampel yang diambil di Kabupaten Pinrang pada sampel yang diambil tahun 2019 berdasarkan tanda klinis *Newcastle disease* terkonfirmasi positif melalui uji RT-PCR. Kemudian, berdasarkan data yang diperoleh dari Dinas Peternakan dan Kesehatan Hewan Provinsi Sulawesi Selatan (2024), tercatat sebanyak 70 kasus kematian ayam akibat infeksi virus *Newcastle disease* di Kabupaten Pinrang pada tahun 2023.

BAB II METODOLOGI PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan Mei hingga November 2024. Sampel diperoleh dari peternakan ayam layer yang berada di Kabupaten Pinrang. Adapun nekropsi, *sampling*, dan pemeriksaan makroskopis dilakukan di Jl. Manggala 5 No.4 Makassar, pembuatan *slide* histopatologi dilakukan di Laboratorium Patologi Balai Besar Veteriner Maros, pembacaan hasil histopatologi dilakukan di Laboratorium Patologi Rumah Sakit Hewan Unhas dan uji cRT-PCR dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Balai Besar Veteriner Maros.

2.2 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian deskriptif observasional untuk melihat gambaran makroskopis, histopatologi, serta hasil uji *conventional Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* (cRT-PCR) pada ayam layer yang terinfeksi virus *Newcastle disease* di peternakan Kabupaten Pinrang.

2.3 Materi Penelitian

2.3.1 Alat

A. Nekropsi

Alat pengukur (penggaris), *coolbox*, gunting, nampan, dan pinset.

B. Histopatologi

Dishwarmer, *embedding cassette*, *embedding center*, *floatation bath*, gunting, keranjang *tissue processor*, mikroskop, mikrotom putar, *paraffin dispenser*, pengasah pisau mikrotom, pinset, pisau mikrotom, *scalpel*, *slide staining racks*, *staining jars with lids*, tempat pemotong jaringan basah, dan *tissue processor*.

C. cRT-PCR

Bio-Rad Sub-Cell GT, *collection tube*, *Erlenmeyer*, komputer, *microwave*, mikropipet dan pipet tip, penyeimbang, *power supply* elektroforesis, *QIAamp spin column*, *sentrifuge*, tabung PCR, *thermocycler Bio-Rad iCycler*, *tray*, *UV transilluminator Bio-Rad Gel Doc EZ Imager System*, *vortex*, dan *well-forming comb*.

2.3.2 Bahan

A. Nekropsi

Neutral Buffered Formalin (NBF) 10%, pot steril dan VTM (*Viral Transport Media*).

B. Histopatologi

Alkohol 100%, alkohol 70%, alkohol 95%, *aquadest*, *chloroform*, *coverslips*, *entellan*, *ethanol*, *formaldehyde* 37 %w/w, *gelatin powder*, *magnesium sulphate*,

Mayer's haematoxylin dan eosin, paraffin wax (paraplast plain/medos), slide glass, sodium bicarbonate, tap water, toluen, dan xylol.

C. cRT-PCR

Agarose, buffer AVE, buffer AVL, buffer AW1, buffer AW2, DNA ladder, ethanol absolute, lyophilized carrier RNA, negative control, nuclease-free water, PCR buffer, PCR enzyme, positive control, primer forward, primer reverse, QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen), SYBR Safe DNA Gel Stain, TBE 10%, dan template DNA.

2.4 Prosedur Penelitian

2.4.1 Metode Sampling

Pengambilan sampel dilakukan dengan teknik *sampling* terencana sesuai dengan pengetahuan dan kemampuan peneliti, yakni dengan metode *purposive sampling* dimana dipilih ayam layer yang menunjukkan tanda klinis penyakit *Newcastle disease*, yaitu adanya kelainan saraf (tortikolis, gemetaran, dan kelumpuhan), kelainan pernapasan (adanya *nasal discharge*, batuk, sulit bernapas), atau kelainan pencernaan (feses berwarna hijau yang terkadang disertai gumpalan putih).

2.4.2 Pengambilan Sampel

Sampel dikoleksi dari 5 ekor ayam layer yang menunjukkan tanda klinis penyakit *Newcastle disease*. Pengumpulan sampel berupa organ pernapasan, yaitu paru-paru yang dimasukkan kedalam *Viral Transport Media* (VTM) untuk dilakukan uji cRT-PCR dan organ-organ *visceral* berupa otak, paru-paru, limpa, *proventriculus* dan *caeca tonsil* dimasukkan ke dalam *Neutral Buffered Formalin* (NBF) 10% untuk dilakukan pemeriksaan histopatologi. Adapun sampel PCR didistribusikan secara rantai dingin menggunakan *coolbox*.

2.4.3 Nekropsi dan Pengamatan Makroskopis

Berdasarkan Majó & Dolz (2019), nekropsi (bedah bangkai) adalah pemeriksaan pada hewan yang telah mati untuk mengetahui penyebab kematian atau penyakit. Jika ditemukan lesi dengan ciri khas tertentu, lesi tersebut disebut lesi patognomonik yang bisa langsung memberikan diagnosis. Namun, jika lesi dapat ditemukan pada berbagai penyakit, maka perlu beberapa diagnosis banding dan menggunakan tes laboratorium tambahan untuk memastikannya. Nekropsi juga bertujuan untuk mengambil sampel yang dapat membantu mengonfirmasi diagnosis. Dengan sampel tersebut, bisa lebih dipahami penyakit dan hubungan antara lesi dan penyebabnya. Pemeriksaan luar yang lengkap harus dilakukan sebelum memulai nekropsi, mulai dari mengamati mukosa, bulu, dan kulit. Kemudian, buat *incisi* di paha dan dislokasi *extremitas posterior* untuk menstabilkan *cadaver*, lalu amati permukaan sendi. Kemudian, buat *incisi* memanjang ke pangkal paruh untuk mengekspos daerah leher. Buat *incisi* di daerah bawah dada untuk membuka rongga *coelomic*. *Incisi* daerah leher dengan traksi trakea dan esofagus. Amati perubahan pada *air sacs*. Keluarkan semua organ pencernaan secara perlahan, mulai dari esofagus hingga kloaka. Kemudian, keluarkan paru-paru secara perlahan. Amati

organ satu-persatu, dan lakukan pengukuran pada organ. Selanjutnya, untuk mengeluarkan otak dari *cranium*, masukkan gunting ke dalam *foramen magnum*. Buat *incisi* untuk membuka *cranium*, kemudian ekstraksi otak dan amati perubahan pada otak. Setelah melakukan pengamatan makroskopis, koleksi sampel berupa paru-paru pada VTM (*Viral Transport Media*) dan dimasukkan ke dalam *coolbox* untuk dilakukan uji cRT-PCR dan koleksi organ berupa otak, paru-paru, limpa, *proventriculus* dan *caeca tonsil* lalu masukkan ke dalam pot steril berisi *Neutral Buffered Formalin* (NBF) 10% untuk dilakukan pemeriksaan histopatologi.

2.4.4 Pemeriksaan Histopatologi

Prosedur pembuatan *slide* histopatologi berikut dilakukan di Balai Besar Veteriner Maros sesuai dengan standar dan ketentuan Laboratorium Patologi.

1. Fiksasi

Sampel jaringan difiksasi dengan *Neutral Buffered Formaline* (NBF), volume *Neutral Buffered Formaline* (NBF) minimal 10 kali volume jaringan. Pada umumnya waktu yang diperlukan untuk fiksasi sempurna adalah 48 jam.

2. Pemotongan Spesimen

Spesimen yang dipilih untuk pemeriksaan, dipotong setebal 0,5-1 cm. Potongan spesimen dimasukkan dalam keranjang pemrosesan dengan disertai dengan label nomor spesimen yang ditulis dengan pensil. Sisa spesimen dengan *Neutral Buffered Formaline* (NBF) disimpan dalam botol tertutup rapat. Selanjutnya botol ini disimpan berurutan dan dibuang apabila telah melebihi 3 bulan dan ditulis dalam formulir pemusnahan sampel.

3. Prosessing dan Embedding

Embedding cassette yang telah diisi spesimen jaringan dimasukkan kedalam *tissue processor* dengan pengaturan waktu, yaitu fiksasi dengan *buffer* formalin 10% selama 2 jam, fiksasi dengan *buffer* formalin 10% selama 2 jam, dehidrasi dengan alkohol 70% selama 1 jam, dehidrasi dengan alkohol 90% selama 1 jam, dehidrasi dengan alkohol 100% selama 1 jam, dehidrasi dengan alkohol 100% selama 2 jam, dehidrasi dengan alkohol 100% selama 2 jam, *clearing* dengan toluen selama 1 jam, *clearing* dengan toluen selama 1.5 jam, *clearing* dengan toluen selama 1.5 jam, impregnasi dengan parafin selama 2 jam, dan impregnasi parafin selama 3 jam dengan total waktu selama 20 jam. Selanjutnya, *embedding cassette* dikeluarkan dari *tissue processor* dan masukkan ke dalam wadah yang telah tersedia pada alat *embedding center*. Keluarkan contoh spesimen dari keranjang *tissue* untuk diblok oleh parafin satu-persatu (agar tidak tertukar no. contoh spesimen). Tempatkan cetakan dan keranjang pada sisi kanan dan kiri dispenser parafin. Contoh spesimen diletakkan di atas cetakan lalu diisi dengan parafin dengan menekan tombol hitam yang telah tersedia pada alat *embedding center*. Cetakan diberi nomer sesuai nomor contoh spesimen yang letakkan di atas keranjang yang berisi contoh spesimen.

Pindahkan cetakan pada bagian dingin. Setelah beku (parafin mengeras) pisahkan cetakan dengan keranjang. Setelah terpisah pindahkan keranjang siap untuk dilakukan pemotongan dengan pisau mikrotom.

4. Pemotongan

Ambil blok jaringan kemudian difiksir pada mikrotom. Blok jaringan dipotong dengan mikrotom kasar, sehingga didapatkan permukaan yang rata. Gunakan pisau mikrotom yang masih tajam, ketebalan potongan 5-6 mikron. Pilih potongan jaringan terbaik dari pita yang terbentuk. Potongan yang terpilih direntangkan pada *floating out* yang bersuhu sekitar 40°C yang terlebih. Suhu yang ideal akan mengakibatkan potongan jaringan merentang sempurna dan tidak berkerut. Taburkan *gelatin powder* sebanyak 5 gram untuk 100 cc *aquadest* dan biarkan larut sempurna. Potongan yang bagus, tidak tergores, tidak mengkerut dipilih dan diambil dengan gelas *slide* yang sudah bernomor sesuai dengan nomor epi/patologi. *Slide* yang berisi tempelan potongan jaringan ditempatkan diatas pelat pemanas *slide*, minimal 2 jam.

5. Pewarnaan

Sebelum pewarnaan dilakukan, semua bahan pewarna harus diperiksa kejernihannya dan disesuaikan dengan jadwal penggantian yang tersedia (3 kali penggunaan setiap pemakaian). Adapun tahapan pewarnaan, yaitu *xylo* I selama 2 menit, *xylo* II selama 2 menit, alkohol 100% I selama 1 menit, alkohol 100% II selama 1 menit, alkohol 95% I selama 1 menit, alkohol 95% II selama 1 menit, *Mayer's haematoxylin* selama 15 menit, rendam dalam *tap water* selama 20 menit, masukkan dalam *eosin* selama 15 detik - 2 menit, alkohol 95% III selama 2 menit, alkohol 95% IV selama 2 menit, alkohol 100% III selama 2 menit, alkohol 100% IV selama 2 menit, alkohol 100% V selama 2 menit, *xylo* III selama 2 menit, *xylo* IV selama 2 menit, lalu *xylo* V selama 2 menit. Setelah pewarnaan selesai, dilakukan *coverslipping*, siapkan *coverslips* secukupnya sesuai dengan jumlah preparat yang baru saja diwarnai lalu teteskan 1-2 tetes "*entellan*" pada tiap *coverslip*. Balik dan tutupkan pada *slide* preparat yang baru saja diwarnai, cegah jangan sampai terbentuk gelembung udara, biarkan preparat yang sudah tertutup dengan *coverslip* sampai mengering sempurna. Bersihkan *slide glass* dengan *xylo* lalu beri nomor sesuai dengan nomor yang ada di etiket *slide glass* tersebut dan siap untuk diperiksa di bawah mikroskop cahaya.

6. Pembacaan *slide* histopatologi

Adapun pembacaan *slide* histopatologi menggunakan mikroskop cahaya dilakukan di Laboratorium Patologi Rumah Sakit Hewan Unhas dengan menilai kerusakan yang ditemukan.

2.4.5 Uji cRT-PCR

Prosedur uji cRT-PCR berikut dilakukan di Balai Besar Veteriner Maros sesuai dengan standar dan ketentuan Laboratorium Bioteknologi.

1. Ekstraksi RNA

Ekstraksi RNA dilakukan dengan *QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen)*. Terlebih dahulu dilakukan preparasi dengan menambahkan 310 µl *Buffer AVE* ke dalam 310 µg *lyophilized carrier RNA*, vortex hingga homogen, dan simpan pada suhu -20°C. Kemudian, tambahkan *carrier RNA* sebanyak 1/100 volume *Buffer AVL* dan larutkan hingga homogen, dengan *Buffer* ini dapat bertahan selama 48 jam pada suhu 2-8°C. Selanjutnya, tambahkan 25 ml *ethanol* absolut ke dalam 19 ml *Buffer AW1*, dan 30 ml *ethanol* absolut ke dalam 13 ml *Buffer AW*. Untuk proses ekstraksi RNA, tambahkan 560 µl *Buffer AVL* yang mengandung *Carrier RNA* ke dalam sampel, kemudian tambahkan 140 µl suspensi sampel, vortex, dan spin down. Inkubasi selama 10 menit pada suhu ruang, kemudian sentrifus selama 1 menit pada 8000 rpm (setara dengan 6000 g) pada suhu 4°C. Tambahkan 560 µl *ethanol* absolut dan vortex, lalu sentrifus kembali selama 1 menit pada 8000 rpm (setara dengan 6000 g) pada suhu 4°C. Pindahkan 630 µl larutan ke dalam *Qiamap Spin Column*, sentrifus selama 1 menit pada 8000 rpm (setara dengan 6000 g) pada suhu 4°C, dan buang semua cairan pada *Collection Tube*. Pindahkan sisa larutan ke dalam *Qiamap Spin Column*, sentrifus selama 1 menit pada 8000 rpm (setara dengan 6000 g) pada suhu 4°C, dan buang cairan pada *Collection Tube*. Tambahkan 500 µl *Buffer AW1*, sentrifus selama 1 menit pada 8000 rpm (setara dengan 6000 g) pada suhu 4°C, buang cairan pada *Collection Tube*, ganti dengan *Collection Tube* baru, dan tambahkan 500 µl *Buffer AW2*. Sentrifus selama 3 menit pada 14.000 rpm (setara dengan 20.000 g) pada suhu 4°C, buang cairan pada *Collection Tube*, dan sentrifus lagi selama 1 menit pada 8000 rpm (setara dengan 6000 g) pada suhu 4°C. Pindahkan *Qiamap Spin Column* ke *Collection Tube* (1,5 ml) yang baru, tambahkan 50 µl *Buffer AVE*, dan inkubasi selama 1 menit pada suhu ruang. Sentrifus selama 1 menit pada 8000 rpm (setara dengan 6000 g) pada suhu 4°C, kemudian buang *Qiamap Spin Column* dan beri label pada *tube*.

2. Pembuatan *Mastermix*

Sebelum dilakukan proses amplifikasi, terlebih dahulu dibuat *mastermix* dengan menambahkan 4,5 µl *nuclease-free water*, 12,5 µl 2X PCR buffer, 1 µl primer ND forward sebanyak 20 µM, 1 µl primer ND reverse sebanyak 20 µM, dan PCR enzyme sesuai dosis yang dibutuhkan, kemudian tambahkan 5 µl *template DNA*. Campurkan semua komponen dengan hati-hati dan homogenkan. Setelah itu, *aliquot* 20 µl *mastermix* ke dalam tabung PCR yang sudah disiapkan.

3. Proses Amplifikasi

Adapun proses amplifikasi dilakukan menggunakan mesin *thermocycler Bio-Rad iCycler*. Adapun tahapannya, yang pertama proses *denaturation* yang dilakukan pada suhu 50°C selama 30 menit sebanyak 1 siklus. Berikutnya proses *annealing* yang dilakukan pada suhu 95°C selama 15 menit sebanyak 1 siklus. Kemudian, proses *extension* yang dilakukan sebanyak 40 siklus, dimana dilakukan secara bertahap pada suhu 95°C selama 15 detik, suhu 55°C selama 45 detik dan suhu 72°C selama 1 menit. Selanjutnya, proses *final extension* pada suhu 72°C selama 5 menit

sebanyak satu siklus. Setelah semua siklus selesai, hasil amplifikasi disimpan pada suhu -20°C atau langsung gunakan untuk analisis lebih lanjut, seperti elektroforesis gel *agarose* 1,5% untuk memvisualisasikan produk amplifikasi.

4. Persiapan Gel *Agarose*

Setelah proses amplifikasi selesai, maka hasilnya akan divisualisasikan dengan menggunakan gel *agarose* 1,5%. Pembuatan gel *agarose* 1,5% dimulai dengan menyiapkan *tray* (cetakan) pembuatan gel sesuai dengan mesin elektroforesis yang akan digunakan, kemudian pasang *well-forming comb* (sisir). Pastikan posisi *tray* telah seimbang dengan meja kerja dengan menggunakan penyeimbang. Masukkan *agarose* ke dalam tabung *Erlenmeyer* kemudian ditambahkan dengan TBE 10%. Jumlah penggunaan *agarose* dan TBE 10% untuk konsentrasi 1,5%, yaitu 2.25 gram *agarose* dengan 150 ml TBE 10%. Homogenkan campuran *agarose* dan larutan TBE 10%, lalu panaskan larutan yang telah homogen dengan *microwave* selama 180 detik sampai larutan jernih. Keluarkan larutan dari *microwave* dengan sarung tangan pelindung panas, kemudian dinginkan pada suhu ruang selama 15 detik. Tambahkan 10 μl SYBR Safe lalu homogenkan kembali. Tuang larutan yang telah homogen ke dalam *tray*. Hilangkan gelembung cairan yang muncul pada permukaan larutan gel. Setelah 30 menit atau larutan gel telah padat, lepaskan *well-forming combs* dari *tray* secara perlahan. Kemudian, gel siap digunakan untuk elektroforesis.

5. Elektroforesis

Prosedur elektroforesis dilakukan dengan menggunakan *Bio-Rad Sub-Cell GT*. Masukkan sampel hasil amplifikasi dan *loading dye SYBR Safe DNA Gel Stain* ke dalam sumuran gel *agarose* menggunakan mikropipet dan pastikan agar sampel tidak tumpah dan masuk ke dalam sumur yang sesuai dengan urutan yang diinginkan. Masukkan DNA *ladder* untuk memudahkan perbandingan ukuran fragmen. Masukkan *negative control* untuk memastikan tidak adanya kontaminasi eksternal dan masukkan *positive control* untuk memastikan bahwa reaksi PCR berfungsi dengan baik dan memberikan hasil amplifikasi yang diinginkan. Tuangkan TBE hingga gel *agarose* terendam. Tutup alat elektroforesis hingga rapat. Nyalakan *power supply* lalu atur mesin pada tegangan sekitar 90 V selama 70 menit.

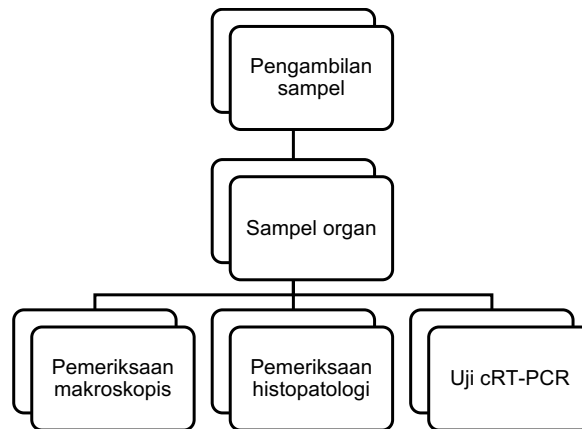
6. Visualisasi Produk

Setelah proses elektroforesis selesai, selanjutnya gel divisualisasikan dengan UV *transilluminator Bio-Rad Gel Doc EZ Imager System* dengan memasukkan *tray* ke dalam alat lalu dijalankan. Visualisasi hasil elektroforesis dapat dilihat pada komputer yang telah terhubung dengan UV *transilluminator*.

2.5 Analisis Data

Analisis data dilakukan secara deskriptif berdasarkan hasil dari gambaran makroskopis, histopatologi dan uji cRT-PCR.

2.6 Alur Penelitian



Gambar 15. Alur penelitian. Dapat dilihat pada skema ilustrasi di atas terkait mekanisme penelitian