

## **Pengembangan Kontrol Positif Sintetik dan Metode *Gradient Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) Gen VP6 *Bovine Rotavirus* Group A**

*(DEVELOPMENT OF SYNTHETIC POSITIVE CONTROL  
AND VP6 GENE OF A GROUP BOVINE ROTAVIRUS OF GRADIENT REVERSE  
TRANSCRIPTASE POLYMERASE CHAIN REACTION [RT-PCR] METHOD*

**Dyah Ayu Hewajuli<sup>1</sup>, Pratama Y<sup>1</sup>, Winarsongko A<sup>1</sup>, Purwani A<sup>1</sup>  
Ajeng Fabean<sup>1</sup>, Suyatno T<sup>1</sup>, Harimurti Nuradji<sup>1</sup>, Nur Sabiq<sup>2</sup>,  
Atik Ratnawati<sup>1</sup>, Muharam Saepulloh<sup>1</sup>, Ni Luh Putu Indi Dharmayanti<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Pusat Riset Veteriner, Organisasi Riset Kesehatan,  
Badan Riset Inovasi Nasional

<sup>2</sup>Badan Standarisasi Instrumen Pertanian Veteriner,  
Badan Standarisasi Instrumen Pertanian, Kementerian Pertanian  
Email: [dhewajuli@yahoo.com](mailto:dhewajuli@yahoo.com)

### **ABSTRAK**

Rotavirus adalah jenis virus yang sering menyebabkan diare. Rotavirus grup A merupakan penyebab utama diare pada sapi. Rotavirus dibedakan menjadi delapan kelompok (A-H) berdasarkan perbedaan antigenik dan keragaman genetik protein VP6. Uji *Gradient Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) bersifat sensitif, spesifik, dan cepat untuk mendeteksi rotavirus grup A dalam sampel feses. Tujuan dari penelitian ini adalah mengembangkan kontrol positif sintetik dan mengoptimasi RT-PCR satu langkah dengan target gen VP6 untuk deteksi rotavirus grup A dari sampel feses. Kontrol positif sintetik *bovine rotavirus* grup A gen VP6 disintesis dengan *gBlocks Gene Fragments*. Optimasi menggunakan metode *Gradient Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR). Hasil penelitian menunjukkan bahwa kontrol positif sintetik dan primer - menghasilkan pita jelas pada 1356 *basepairs* (bp) pada suhu *annealing* (56,4; 59,4; 61,6)°C, sedangkan kontrol positif sintetik dan primer - menghasilkan pita jelas pada 450 bp terutama pada suhu *annealing* (45; 45,4; 46,4; 48,1; 50,3; 53,1; 56,4; 59,4; 61,6)°C. Selanjutnya, suhu *annealing* yang menghasilkan pita optimal digunakan dalam metode RT-PCR pada sampel penelitian. Hasil RT-PCR dari sampel penelitian menunjukkan 157 sampel negatif terhadap Rotavirus dengan primer Chinsangaram *et al.*, 1993 tetapi satu sampel positif terhadap Rotavirus dengan primer Wang *et al.*, 2019 yang ditandai dengan pita di 450 bp. Berdasarkan hasil penelitian tersebut dapat disimpulkan bahwa pengembangan kontrol positif sintetik dan optimasi RT-PCR untuk deteksi *Bovine Rotavirus* grup A dengan gen target VP6 dapat digunakan sebagai metode skrining untuk mendeteksi Rotavirus pada sampel lapang.

Kata-kata kunci: rotavirus; kontrol positif sintetik; RT-PCR

### **ABSTRACT**

Rotaviruses are the major viral agents that responsible for diarrhea. Group A rotaviruses are the predominant causes of bovine viral diarrhea. Rotaviruses are distinguished into eight groups (A-H) based on antigenic differences and genetic diversity of VP6 protein. The Gradient Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) assay possess characteristics of sensitive, specific, and rapid for detection of group A rotavirus in faecal samples. The objective of this study was to develop the synthetic positive control and to optimize the one step RT-PCR for detection of group A rotaviruses from fecal samples. Positive control of synthetic of group A Bovine Rotaviruses of VP6 gene was synthesized by *gBlocks Gene Fragments*. Optimization used the Gradient Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) method. The results showed that the synthetic positive controls and primers Chinsangaram *et al.*, 1993 produced a clear band at 1356 basepairs

(bp) at annealing temperatures (56.4; 59.4; 61.6) °C but not clear band at annealing temperatures (45; 45.4; 46.4; 48.1; 50.3; 53 ;1; 63.5; 64.5; and 65) °C. However, the synthetic positive controls and primers Wang *et al.*, 2019 produced a clear band at 450 bp at annealing temperatures (45; 45.4; 46.4; 48.1; 50.3; 53.1; 56.4; 59.4; 61.6)°C yet not clear band at annealing temperatures (63.5; 64.5; and 65)°C. Subsequently, the annealing temperature that generated the optimal band is used in RT-PCR method for the research samples. The RT PCR results from research samples indicate that 157 samples were negative for Rotavirus with Chinsangaram *et al.*, 1993 but one sample was positive for Rotavirus with the primers Wang *et al.*, 2019 marked with a band at 450 bp. The conclusion study is this study succeeded to develop a synthetic positive control and to optimize the RT-PCR for the detection of Bovine Rotavirus with the VP6 target gene, then can be used as a screening test for the detection of Rotavirus in field samples.

Keywords: rotavirus; synthetic positive control; RT-PCR

## PENDAHULUAN

Diare telah dilaporkan sebagai penyebab tingginya angka kesakitan dan kematian pada hewan. Diare pedet neonatal merupakan penyakit penting dan menimbulkan kerugian ekonomi yang serius pada ternak yang disebabkan oleh beberapa faktor, salah satunya adalah agen infeksius Rotavirus adalah jenis virus yang paling sering menyebabkan diare. Rotavirus merupakan virus RNA untai ganda (dsRNA), tidak berselubung, mempunyai tiga kapsid protein, dan termasuk keluarga Reoviridae. Partikel rotavirus disusun oleh 11 segmen gen yang mengkode enam protein struktural (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, VP7) dan enam protein nonstruktural (NS1-NS6) (Fukuda *et al.*, 2013). Rotavirus dibedakan menjadi delapan kelompok (A-H) berdasarkan perbedaan antigenik dan keragaman genetik protein VP6 (Matthijnssens *et al.*, 2012).

Rotavirus grup A adalah penyebab utama diare virus pada sapi (Fukuda *et al.*, 2013). Protein VP6 Rotavirus grup A bersifat sangat imunogenik di antara serotipe yang lain. Antibodi terhadap protein VP6 mudah terbentuk sehingga antibodi VP6 dapat digunakan sebagai indikator pengujian utama yang bersifat sensitif terhadap infeksi virus Rotavirus (Svensson *et al.*, 1987). Panjang segmen genom VP6 adalah 1353 atau 1354 nukleotida (nt) (Matthijnssens *et al.*, 2012). Protein VP6 adalah protein lestari (*conserved*) yang memiliki kemampuan untuk berikatan dengan dirinya sendiri dan protein VP4, VP2 dan VP7. Protein VP6 mengandung asam amino utama yang dilestarikan (Afchangi *et al.*, 2019).

Terdapat beberapa metode pengujian di laboratorium diagnostik yang rutin digunakan untuk deteksi rotavirus dari sampel feses. Metode pengujian tersebut seperti mikroskop elektron,

immuno-electrophoresis, *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA), Hemaglutinasi pasif, uji aglutinasi latek dan isolasi virus (VI) (Fukuda *et al.*, 2013). Metode *one step* (satu tahap) RT-PCR dapat mengurangi kontaminasi silang, dan menjadi lebih bermanfaat diterapkan di negara berkembang, khususnya negara yang memiliki laboratorium dan tenaga kerja terampil yang terbatas (Esona *et al.*, 2015). Sampel untuk identifikasi galur (*strain*) virus Rotavirus grup A dengan metode RT-PCR dapat menggunakan sampel langsung dari feses atau kultur sel. Uji RT-PCR bersifat sensitif, spesifik, dan cepat untuk mendeteksi rotavirus grup A dalam sampel feses (Mondal *et al.*, 2013). Optimasi metode RT-PCR satu langkah untuk deteksi gen VP6 *Bovine Rotavirus* grup A perlu dilakukan untuk mendapatkan komposisi dan kondisi metode yang sesuai sehingga hasil metode tersebut menjadi optimal. Setiap pengujian rotavirus dengan metode RT-PCR memerlukan kontrol positif. Saat ini di Indonesia, kontrol positif *bovine rotavirus* grup A menjadi kendala karena belum mampu diisolasi dari lapang dan mendatangkan kontrol positif dari luar negeri sehingga perlu pengembangan kontrol positif sintetik untuk keperluan pengujian RT-PCR. Kontrol positif sintetik sudah banyak dikembangkan dan digunakan untuk pengujian beberapa penyakit. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengembangkan kontrol positif sintetik dan mengoptimasi RT-PCR satu langkah dengan target gen VP6 untuk deteksi *bovine rotavirus* grup A dari sampel feses.

## METODE PENELITIAN

### Sampel

Sampel lapangan (feses segar) yang diperlukan untuk menguji protokol RT-PCR. Feses dikoleksi langsung dari rektum sapi di

Kabupaten Bogor pada bulan September 2020 – Januari 2021. Sampel feses ditempatkan pada *sampling bag*. Sampel dijaga pada suhu 4°C dan dibawa ke Laboratorium Virologi Bblitvet, Bogor untuk disimpan pada suhu -80° C sampai analisis lebih lanjut.

**Sequence primer**

Sekuens primer spesifik untuk pengembangan sintetik kontrol positif dan optimasi uji RT-PCR untuk mendeteksi Rotavirus A ditentukan berdasarkan *marker gen* yang diamplifikasi sesuai dengan penelitian sebelumnya (Chinsangarams *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 2019). Target gen yang diamplifikasi untuk Rotavirus A adalah VP6. Ukuran produk amplifikasi dari target gen adalah 1.062 (1356 bp) *base pair* (bp) (Chinsangarams *et al.*, 1993) dan 450 *base pair* (bp) (Wang *et al.*, 2019). Set primer yang dipergunakan dalam penelitian ini disajikan pada Tabel 1. Primer-primer tersebut disintesis di AITbiotech PTE LTD, Singapura.

**Kontrol Positif Sintetik**

Kontrol positif sintetik yang digunakan dalam penelitian ini adalah *double stranded* DNA molekul dengan panjang sekitar 1356 bp yang diperoleh dari *Gene Bank* (NCBI) dan disintesis dengan *gBlocks Gene Fragments*.

**Isolasi atau Ekstraksi Total RNA**

Isolasi total RNA baik untuk kontrol positif sintetik maupun sampel lapangan menggunakan kit komersial *geneaid total RNA extraction kit* (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan) sesuai dengan prosedur yang didapatkan dari penyedia kit. Sebanyak 0,2 mL *inactivated antigen* ditambahkan ke dalam *microfuge tube* 0,5 mL yang berisi alkohol 70% dan 4 µL *betamercapto ethanol*. Sampel kemudian ditambahkan ke dalam reagen Geneaid, dicuci dan RNA dielusi menggunakan 50 µL *RNAse free water*. Hasil ekstraksi RNA kemudian disimpan pada suhu -20°C sampai analisis lebih lanjut.

**Gradient Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) untuk Optimasi Kontrol Positif Sintetik**

Uji *gradient* RT-PCR dilakukan dengan mengikuti prosedur dari *My Taq One Step RT-PCR kit* (Bioline reagent Ltd) pada Mesin Thermal Cycler AB9700 atau AB9800 Fast. Reaksi RT-PCR menggunakan konsentrasi total volume sebanyak 50 µL dan 25 µL. Konsentrasi total volume sebanyak 50 µL mengandung sebanyak 5 µL templet RNA, sebanyak 25 µL 2x My Taq One Step Mix, sebanyak 2 µL Forwad primer (10 µM), sebanyak 2 µL Reverse primer (10 µM), sebanyak 0,5 µL *Reverse Transcriptase*, sebanyak 1 µL *Ribosafe RNase Inhibitor*, sebanyak 14,5 µL DPEC H<sub>2</sub>O. Konsentrasi total volume sebanyak 25 µL mengandung sebanyak 5 µL templet RNA, sebanyak 12,5 µL 2x My Taq One Step Mix, sebanyak 1 µL *Forwad primer* (10 µM), sebanyak 1 µL *Reverse primer* (10 µM), sebanyak 0,25 µL *Reverse Transcriptase*, sebanyak 0,5 µL *Ribosafe RNase Inhibitor*, sebanyak 4,75 µL DPEC H<sub>2</sub>O. Primer yang digunakan mengikuti primer yang dikembangkan oleh penelitian sebelumnya, Chin\_BRV6F dan Chin\_BRV6R, (Chinsangarams *et al.*, 1993) serta Wang\_BRVP6F dan Wang\_BRVP6R (Wang *et al.*, 2019).

**Optimasi Sintetik Kontrol Positif**

Kontrol positif sintetik diverifikasi lebih dahulu sebelum digunakan. Kontrol positif sintetik yang digunakan dioptimasi dengan uji *Gradient* RT-PCR. Suhu *annealing* biasanya 5°C di bawah T<sub>m</sub> primer yang sebenarnya. Variasi suhu *annealing* pada optimasi ini dihitung dengan merata-ratakan jumlah suhu *melting* (T<sub>m</sub>) primer *Forward* dan primer *Reverse* selanjutnya dikurangi 5. Variasi suhu *annealing* ini dilakukan dengan memasukkan program *gradient* pada mesin PCR. Senyawa DNA Kontrol positif sintetik didilusi dengan konsentrasi 10<sup>-1</sup>(1 ng/µL), 10<sup>-2</sup>(0,1 ng/µL), 10<sup>-3</sup>(0,01 ng/µL), 10<sup>-4</sup>(0,001 ng/µL), 10<sup>-5</sup>(0,0001 ng/µL), 10<sup>-6</sup>(0,00001 ng/µL) dengan mengencerkan stok kontrol sintetik 10 ng/µL menggunakan

**Tabel 1.** Nama primer, *sequence*, ukuran produk RT-PCR dari primer untuk deteksi Rotavirus yang digunakan dalam penelitian ini

Name	Sequence	Product size
Chins_BRVP6F	5'-GGCTTTTAAACGAAGTCTTC-3'	1356 bp
Chins_BRVP6R	5'-GGTCACATCCTCTCACTACG-3'	
Wang_BRVP6F	TTTCCCTTATTACGCTTCATTCACGTTGAACAGATCGCA	
Wang_BRVP6R	AACGCCGCTACCGCTGGTGTCAATTTGGTGGTCTCATC	450 bp

larutan *Tris-EDTA* (TE) kemudian diuji dengan RT-PCR.

Pengujian gradient RT-PCR diawali dengan proses *reverse transcriptase* pada suhu 45°C selama 40 menit sebanyak satu siklus dilanjutkan dengan inaktivasi enzim pada suhu 95°C selama satu menit sebanyak satu siklus. Amplifikasi gen dilakukan sebanyak 40 siklus yang terdiri atas *denaturation* (95°C, 20 detik), *annealing* (45; 45,4; 46,4; 48,1; 50,3; 53,1; 56,4; 59,4; 61,6; 63,5; 64,5 dan 65) °C, selama 20 detik) dan *elongation* (72°C, 1 menit). *Final extention* dilakukan pada suhu 72°C selama 5 menit.

Analisis produk RT-PCR dilakukan dengan elektroforesis menggunakan 5 µL produk PCR pada 100 V selama satu jam pada agarose 1,5% dalam larutan Tris Boric EDTA (TBE). Visualisasi produk PCR pada agarose menggunakan *ethidium bromide* dan *transluminator ultraviolet*. Hasil elektroforesis ini dianalisis dengan membandingkan ketebalan pita DNA secara visual. Pita DNA yang optimal adalah pita yang tebal, tunggal/*single* dan sesuai ukuran target. Suhu *annealing* yang menghasilkan pita yang optimal selanjutnya digunakan untuk RT-PCR pada sampel penelitian.

#### **Aplikasi Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) untuk Pengujian Sampel Penelitian**

Untuk mengetahui data deteksi rotavirus di lapang dan mengevaluasi efektivitas perangkat diagnosis RT-PCR di lapang. Uji RT-PCR digunakan untuk menguji sebanyak 157 sampel lapangan yang dikoleksi dari feses segar yang diambil langsung dari rektum sapi di Kabupaten Bogor.

Reaksi Amplifikasi RT-PCR untuk menguji sampel lapang menggunakan reagen *My Taq One Step RT=PCR kit* (Bioline reagent Ltd) sesuai prosedur kit pada Mesin Thermal Cycler AB9700 atau AB9800 Fast. Untuk setiap reaksi sebanyak 25 µL yang mengandung sebanyak 5 µL templet RNA, sebanyak 12,5 µL 2x My Taq One Step Mix, sebanyak 1 µL *Forward primer* (10 µM), sebanyak 1 µL *Reverse primer* (10 µM), sebanyak 0,25 µL *Reverse Transcriptase*, sebanyak 0,5 µL *Ribosafe RNase Inhibitor*, sebanyak 4,75 µL DPEC H<sub>2</sub>O. Primer yang digunakan adalah Chin\_BRV6F dan Chin\_BRV6R, (Chinsangarams *et al.*, 1993) serta Wang\_BRVP6F dan Wang\_BRVP6R (Wang *et al.*, 2019).

Pengujian RT-PCR diawali dengan proses *reverse transcriptase* pada suhu 45°C selama 40 menit sebanyak satu siklus dilanjutkan dengan inaktivasi enzim pada suhu 95°C selama satu menit sebanyak satu siklus. Amplifikasi gen dilakukan sebanyak 40 siklus yang terdiri atas *denaturation* (95°C, 20 detik), *annealing* (60°C, 20 detik) dan *elongation* (72°C, 1 menit). *Final extention* dilakukan pada suhu 72°C selama 5 menit. Visualisasi hasil dilakukan dengan elektroforesis (100 volts, satu jam), larutan Tris Boric EDTA (TBE) pada gel agarose 1,5% yang mengandung *ethidium bromida*. *Ladder DNA* 100 bp (Invitrogen™) digunakan sebagai penanda ukuran fragmen gen yang telah diamplifikasi.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **Optimasi Kontrol Positif Sintetik**

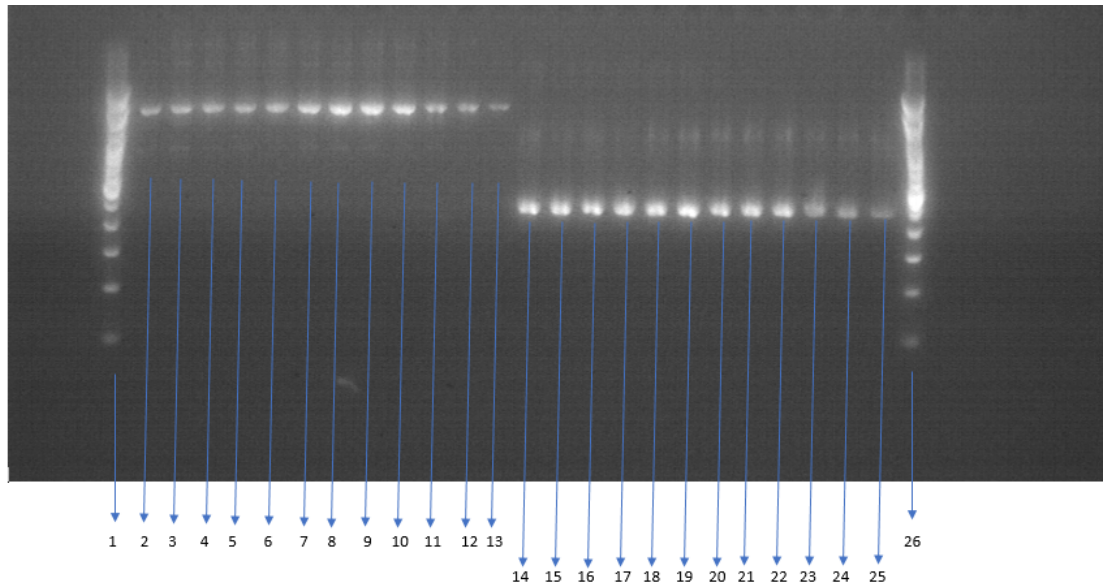
Kontrol positif sintetik dan primer yang dikembangkan dalam penelitian ini digunakan dalam uji RT-PCR memperlihatkan bahwa kontrol positif sintetik dan primer Chinsangaram *et al.* (1993) yang digunakan menghasilkan pita yang jelas pada 1356 bp pada suhu *annealing* (56,4; 59,4; 61,6) °C tetapi pita terlihat tidak jelas pada suhu *annealing* (45; 45,4; 46,4; 48,1; 50,3; 53,1; 63,5; 64,5 dan 65) °C. Namun demikian, kontrol positif sintetik dan primer Wang *et al.* (2019) yang digunakan menunjukkan pita yang jelas pada 450 bp pada suhu *annealing* (45; 45,4; 46,4; 48,1; 50,3; 53,1; 56,4; 59,4; 61,6) °C tetapi pita terlihat kurang jelas pada suhu *annealing* (63,5; 64,5; dan 65) °C (Gambar 1).

DNA Kontrol positif sintetik dengan konsentrasi 0.1; 0.01; 0.001; 0.0001; 0.00001 yang diamplifikasi menggunakan primer Chin\_BRVP6 menunjukkan pita yang jelas pada 1356 bp dan primer Wang\_BRVP6 dengan konsentrasi DNA kontrol positif 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001 menunjukkan pita yang jelas pada 450 bp. Hasil penelitian juga menunjukkan semua total volume konsentrasi reagen RT-PCR yaitu 50 uL dan 25 uL menghasilkan gambar pita yang jelas dan sesuai target.

### **Aplikasi Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) untuk Pengujian Sampel Penelitian**

Sampel feses sapi yang berasal dari lapang sebanyak 157 sampel di Kabupaten Bogor telah dilakukan pengujian RT PCR terhadap Rotavirus menggunakan primer Chin\_





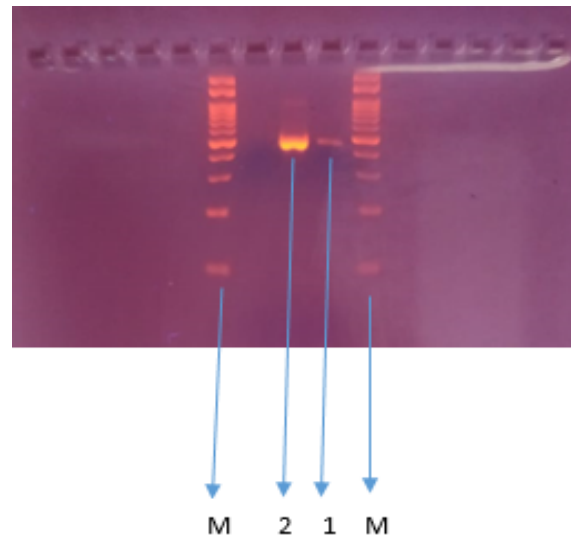
Keterangan :

- |                        |                        |                        |                        |                        |                        |
|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| 1. Marker 100bp        | 2. Primer Chin 45°C    | 3. Primer Chin 45.4°C  | 4. Primer Chin 46.4°C  | 5. Primer Chin 48.1°C  | 6. Primer Chin 50.3°C  |
| 7. Primer Chin 53.1°C  | 8. Primer Chin 56.4°C  | 9. Primer Chin 59.4°C  | 10. Primer Chin 61.6°C | 11. Primer Chin 63.5°C | 12. Primer Chin 64.5°C |
| 13. Primer Chin 65°C   | 14. Primer Wang 45°C   | 15. Primer Wang 45.4°C | 16. Primer Wang 46.4°C | 17. Primer Wang 48.1°C | 18. Primer Wang 50.3°C |
| 19. Primer Wang 53.1°C | 20. Primer Wang 56.4°C | 21. Primer Wang 59.4°C | 22. Primer Wang 61.6°C | 23. Primer Wang 63.5°C | 24. Primer Wang 64.5°C |
| 25. Primer Wang 65°C   | 26. Marker 100 bp      |                        |                        |                        |                        |

**Gambar 1.** Analisis produk *gradient* RT-PCR kontrol positif sintetis menggunakan primer Chin\_BRVP6 (Chinsangaram *et al.*, 1993) dan Wang\_BRVP6 (Wang *et al.*, 2019) primer, selanjutnya produk PCR divisualisasikan pada *gel electrophoresis* agarose 1.5%

BRVP6 dan Wang\_BRVP6. Hasil uji RT PCR dari sampel tersebut menunjukkan sebanyak 157 sampel negatif terhadap Rotavirus dengan primer Chin\_BRVP6, sedangkan metode RT PCR dengan primer Wang\_BRVP6 menunjukkan satu sampel positif terhadap Rotavirus yang ditandai dengan pita di 450 bp (Gambar 2).

Penelitian ini telah berhasil mengembangkan kontrol positif sintetis yang digunakan dalam uji RT-PCR untuk virus Rotavirus yang sering menyebabkan gastroenteritis pada sapi di lapangan. Optimasi RT-PCR dengan kontrol positif sintetis pada penelitian ini dapat mendeteksi virus Rotavirus berdasarkan ukuran amplifikasi gen target VP6 pada 1356 bp dan 450 bp. Kontrol negatif tidak menunjukkan hasil amplifikasi produk. Hasil ini sesuai dengan penelitian sebelumnya dengan primer yang sama, produk PCR yang dihasilkan terlihat sekitar 1356 bp (Chinsangaram *et al.*, 1993) dan 450 bp (Wang *et al.*, 2019). Beberapa penelitian RT-PCR lainnya yang juga telah berhasil dikembangkan untuk deteksi Rotavirus pada sapi (Kassem *et al.*, 2017; Monney *et al.*, 2019).



**Gambar 2.** Pengujian RT-PCR dengan primer Wang\_BRVP6 terhadap sampel lapang menunjukkan hasil positif terhadap Rotavirus. M (Marker); 1 (Sampel lapang positif); 2 (kontrol positif sintetis)

Kontrol positif sintetik RT-PCR Rotavirus dikembangkan pada penelitian ini dengan optimasi suhu *annealing* dan konsentrasi reagen. Suhu *annealing* yang bervariasi digunakan untuk menentukan pengujian karena produk PCR dapat dipengaruhi oleh suhu *annealing* yang berbeda. Suhu *annealing* dalam uji RT-PCR sangat penting karena memengaruhi sensitivitas dari RT-PCR untuk mendeteksi Rotavirus. Suhu *annealing* yang terlalu rendah dapat menghasilkan pita yang tidak spesifik yang dapat menyebabkan *multiple band*. Suhu *annealing* terlalu tinggi juga dapat menyebabkan pita kurang jelas.

Amplifikasi produk RT-PCR juga ditentukan oleh komposisi reagen RT-PCR. Volume komposisi reagen RT-PCR yang lebih sedikit dapat menghemat penggunaan reagen RT-PCR pada waktu pengujian sampel lapang dengan jumlah yang sangat besar. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang menunjukkan bahwa total volume komposisi reagen RT-PCR sebanyak 25  $\mu$ L sudah dapat mengamplifikasi produk RT-PCR dengan pita DNA yang jelas. Optimasi kontrol positif sintetik dan RT-PCR ini perlu dilakukan karena kondisi sampel, reagen dan alat-alat yang terdapat di masing-masing laboratorium berbeda-beda.

Hasil optimasi uji RT-PCR yang telah dikembangkan biasanya hanya diaplikasikan pada tingkatan laboratorium dengan menggunakan kontrol virus. Namun demikian, efektivitas dari uji RT-PCR terhadap sampel lapangan belum diketahui karena kemungkinan kondisi lapangan dapat sangat berbeda dengan kondisi laboratorium. Untuk itu, hasil optimasi pada penelitian ini digunakan untuk pengujian sampel penelitian. Uji RT-PCR terhadap Rotavirus pada penelitian ini diaplikasikan pada 157 sampel lapang. Sebagian besar sampel menunjukkan hasil negatif tetapi terdapat satu sampel lapang yang positif. Pada penelitian ini, sampel lapang dilakukan pengambilan pada waktu musim kemarau sehingga kemungkinan prevalensi *bovine rotavirus* lebih rendah dibandingkan musim penghujan. Selain itu, keberadaan virus dalam sampel lapang kemungkinan tidak dapat terdeteksi karena beberapa faktor yaitu sampel yang diuji tidak mengandung konsentrasi Rotavirus, sampel mengandung rotavirus dengan konsentrasi sangat rendah sehingga tidak dapat terdeteksi dengan RT-PCR, serta adanya faktor *inhibitor* yang dapat menghambat uji RT-PCR (Asano *et al.*, 2010).

Pengembangan kontrol positif sintetik *bovine rotavirus* grup A gen VP6 yang digunakan untuk metode RT-PCR pada penelitian ini dapat mendeteksi secara dini penyakit dan sirkulasi *bovine rotavirus* pada sapi di Indonesia. Pengembangan metode ini mempunyai sensitivitas dan spesifisitas yang lebih tinggi untuk deteksi semua tipe *bovine rotavirus* pada sampel feses karena gen VP6 bersifat *conserved* di antara semua tipe rotavirus jika dibandingkan dengan metode pengujian konvensional seperti ELISA, jaringan kultur dan lainnya yang membutuhkan waktu pengujian lebih lama, sensitivitas dan spesifisitas yang lebih rendah. Metode ini juga mampu mendeteksi asam nukleat virus pada fase awal infeksi tanpa menunggu titer virus tinggi dan terbentuknya respons imun pada inang. Selain itu, pengembangan metode ini dapat mendeteksi *bovine rotavirus* pada hewan reservoir atau tanpa gejala klinis (Kassem *et al.*, 2017).

#### SIMPULAN

Pengembangan kontrol positif sintetik dan uji RT-PCR untuk deteksi Rotavirus dengan gen target VP6 telah berhasil dilakukan dan dioptimasi. Uji RT-PCR Rotavirus yang teroptimasi mampu mendeteksi sebagian kecil sampel lapangan asal Kabupaten Bogor. Uji RT-PCR ini dapat digunakan sebagai uji skrining untuk deteksi Rotavirus pada sampel lapang dalam jumlah besar.

#### SARAN

Hasil pengembangan kontrol positif sintesis dan metode RT-PCR dengan gen target VP6 pada penelitian ini sebaiknya digunakan lebih lanjut secara berkala untuk uji skrining rotavirus di lapang untuk mengetahui sirkulasi rotavirus di lapang secara cepat mengingat data sirkulasi *bovine rotavirus* pada sapi di Indonesia sampai saat ini masih sangat terbatas.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai dari LPDP-Kemristek/BRIN tahun 2020/2021 dengan kode proposal penelitian PRN Sapi 58. Penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya atas bantuan dan kerjasama para laboran di Kelompok Penelitian Virologi, Balai Besar Penelitian Veteriner, Bogor, khususnya yang bekerja di penelitian Rotavirus sehingga penelitian ini dapat terlaksana dengan baik.

## DAFTAR PUSTAKA

- Afchangi A, Jalilvand S, Mohajel N, Marashi SM, Shoja Z. 2019. Rotavirus VP6 as a potential vaccine candidate. *Rev Med Virol* 29(2): e2027. doi: 10.1002/rmv.2027.
- Asano KM, de Souza SP, Iracema Nunes de Barros IN, Ayres GR, Silva SOS, Richtzenhain LJ, Brandão PE. 2010. Multiplex semi-nested RT-PCR with exogenous internal control for simultaneous detection of bovine coronavirus and group A rotavirus. *J Virol Methods* 169(2): 375-379.
- Esona MD, Gautam R, Tam KI, Williams A, Mijatovic-Rustempasica S, Bowena MD. 2015. Multiplexed one-step RT-PCR VP7 and VP4 genotyping assays for rotaviruses using updated primers. *J Virol Methods* 223: 96-104. doi:10.1016/j.jviromet.2015.07.012.
- Fukuda FM, Nagai M, Takai H, Murakami T, Ozawa T, Tsuchiaka S, Okazaki S, Katayama Y, Oba M, Nishiura N, Sassa Y, Omatsu T, Furuya T, Koyama S, Shirai J, Tsunemitsu H, Fujii Y, Katayama K, Mizutani T. 2013. Detection of Bovine Group A Rotavirus Using Rapid Antigen Detection Kits, RT-PCR and Next-Generation DNA Sequencing. *J Vet Med Sci* 75(12): 1651-1655.
- Kassem IK, Magouz AF, Desouky AY, Hagag MF. 2017. Isolation and Identification of Rotavirus Infection in Diarrheic Calves at El Gharbia Governorate. *Glob Vet* 18(3): 178-182.
- Matthijnssens J, Otto PH, Ciarlet M, Desselberger U, Van Ranst M, Johne R. 2012. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. *Arch Virol* 157(6): 1177 - 1182.
- Mondal A, Sharma K, Malik YS, Joardar SN. 2013. Detection of Group A Rotavirus in Faeces of Diarrhoeic Bovine Porcine and Human Population from Eastern India by Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. *Adv Anim Vet Sci* 1(1S): 18-19
- Monney JD, Adjogoua VE, Karamoko Y, Adagba MN, Akran A. 2019. P and G Genotyping of Bovine *Rotavirus* Detected from Fecal Samples of Calves in Abidjan District, Ivory Coast (2015-2017). *J Anim Health Prod* 7(3): 106-112.
- Shepherd FK, Herrera-Ibata DM, Porter E, Homwong N, Hesse R, Bai J, Marthaler DG. 2018. Whole genome classification and phylogenetic analyses of rotavirus B strains from the United States. *Pathogens* 7(2): 44-58.
- Svensson L, Sheshberadaran H, Vesikari T, Norrby E, Wadell G. 1987. Immune response to rotavirus polypeptides after vaccination with heterologous rotavirus vaccines (RIT 4237, RRV-1). *J Gen Virol* 68(Pt 7): 1993-1999.