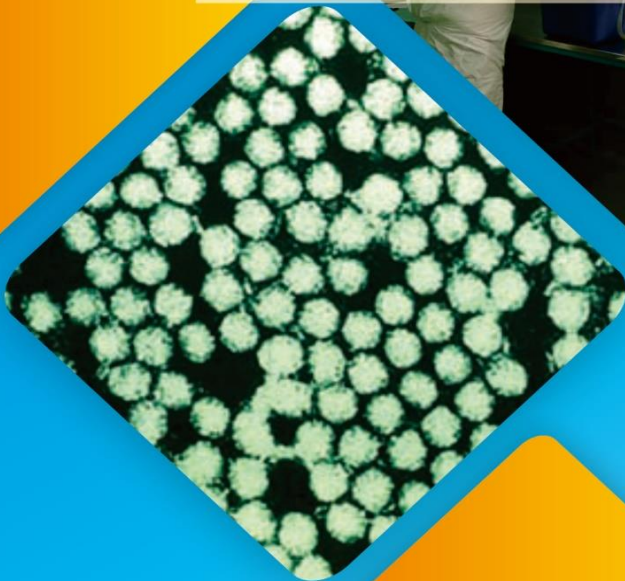


Prosedur Operasional Baku
Standard Operating Procedure
S O P



**UJI BIOMOLEKULER
UNTUK
PENYAKIT MULUT DAN KUKU (PMK)**



**KEMENTERIAN PERTANIAN
DIREKTORAT JENDERAL PETERNAKAN DAN KESEHATAN HEWAN
BALAI BESAR VETERINER FARMA PUSVETMA**

KATA PENGANTAR

Puji syukur kita panjatkan kehadirat Allah SWT, karena atas rahmat dan karuniaNya PROSEDUR OPERASIONAL BAKU-STANDARD OPERATING PROCEDURE (SOP) UJI PCR UNTUK DETEKSI MOLEKULAR ANTIGEN PMK Pusat Veteriner Farma ini dapat tersusun.

Pusat Veteriner Farma (Pusvetma) Surabaya merupakan Unit Pelaksana Teknis (UPT) Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan, Kementerian Pertanian. yang bertanggung jawab kepada Direktur Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan. Sebagaimana tercantum pada Peraturan Menteri Pertanian Nomor 39/Permentan/OT.140/6/2012 tentang Organisasi dan Tata Kerja PUSAT VETERINER FARMA, menyebutkan bahwa tugas pokok dan fungsi Pusvetma adalah melaksanakan produksi, pengujian, distribusi dan pemasaran serta pengembangan produk vaksin, antisera, diagnostika dan bahan biologis lain serta bertanggung jawab atas pelaksanaan surveilans dan diagnosa penyakit mulut dan kuku; pelaksanaan uji rujukan penyakit mulut dan kuku; dan pelaksanaan pengendalian penyakit mulut dan kuku.

SOP Uji PCR untuk deteksi molekuler Antigen PMK untuk Deteksi Molekules AntigenPenyakit Mulut Dan Kuku (PMK) Pusat Veteriner Farma ini disusun dengan maksud untuk memberikan pedoman bagi seluruh pegawai dan masyarakat pengguna layanan/pelanggan/stake holder Pusat Veteriner Farma dalam menyelenggarakan pelayanan publik dan memberikan informasi yang terkait dengan pelayanan Pusat Veteriner Farma khususnya Penyakit Mulut dan Kuku. Selain itu, dengan penetapan dan penerapan SOP Uji PCR untuk deteksi molekuler Antigen PMK untuk Deteksi Molekules AntigenPenyakit Mulut Dan Kuku (PMK) Pusat Veteriner Farma ini maka akan tercipta pelayanan publik yang jelas, berkualitas, cepat, transparan, mudah, terjangkau dan terukur demi terwujudnya pelayanan prima dan diperolehnya kepercayaan masyarakat.

Pada akhirnya kami mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang secara aktif membantu kelancaran penyusunan SOP Uji PCR untuk deteksi molekuler Antigen PMK untuk Deteksi Molekules AntigenPenyakit Mulut Dan Kuku (PMK) Pusat Veteriner Farma ini. Semoga dapat bermanfaat bagi kita semua.

Surabaya, 20 Januari 2020
Kepala Pusat Veteriner Farma,

drh. Agung Suganda M.Si

DAFTAR ISI

HALAMAN DEPAN	1
HALAMAN REVISI	2
DAFTAR ISI	3
1. PENDAHULUAN	
1.1. Penyakit Mulut dan Kuku	4
1.2. Etiologi	4
1.3. Diagnosa	4
2. PERSIAPAN	
2.1. Kualifikasi penguji	5
2.2. Preparasi contoh uji	5
3. UJI REAL-TIME PCR PMK (3D dan 5'UTR)	
3.1. Alat dan Bahan	6
3.2. Prosedur Uji	6
4. UJI KONVENSIONAL PCR PMK (3D)	
4.1. Alat dan Bahan	8
4.2. Prosedur Uji	8
5. UJI SEKUENSING VP1	
5.1. Alat dan Bahan	11
5.2. Prosedur Uji	11
6. RETENSI DAN PEMUSNAHAN CONTOH	15
7. JAMINAN MUTU/QUALITY ASSURANCE	15
8. LAMPIRAN	16
9. DAFTAR PUSTAKA	16

1. PENDAHULUAN

1.1. Penyakit Mulut dan Kuku (PMK)

Penyakit Mulut dan Kuku (PMK) adalah penyakit epizootika dengan daya tular tinggi (highly contagious) pada hewan berkuku genap/belah yang paling ditakuti di dunia karena menimbulkan kerugian ekonomi dan sosial yang tinggi. Penyakit ini ditandai dengan adanya pembentukan vesikel/lepuh dan erosi di mulut, lidah, gusi, nostril, puting, dan di kulit sekitar kuku. Penularan PMK melalui pernafasan, dapat tersebar melalui angin, lalu-lintas bahan-bahan makanan, ternak, vaksin yang tercemar virus PMK, dan melalui reproduksi. Gejala klinis yang ditimbulkan dapat bervariasi tergantung galur virus PMK yang menyerang, jumlah virus, umur dan jenis breed hewan, host dan derajat kekebalan dari host. Gejala bervariasi dari yang *ringan* sampai yang tidak tampak dan bahkan sampai berat. Pada sapi terjadi demam (*pyrexia*), tidak mau makan (*anoreksia*), gemetaran, pengurangan produksi susu selama 2-3 hari. Terjadi lepuh-lepuh yang terbentuk di dalam mulut. Lepuh-lepuh ini mudah pecah 24 jam setelah terbentuk sehingga isinya mudah keluar dan meninggalkan erosi. Adanya infeksi sekunder akan menunda kesembuhan lesi (Subronto 1997). (OIE 2018). Pada kambing dan domba, *pyrexia*, pincang dan lesi ringan pada oral, lesi pada kaki sepanjang mahkota band atau ruang interdigital lesi pada *dental pad*. Pada babi terjadi *pyrexia*. Setelah PMK dinyatakan bebas di Indonesia tahun 1986, maka saat ini PMK merupakan penyakit eksotis (penyakit yang tidak ada di suatu negara, tetapi dapat ditemukan di negara lain) bagi Indonesia.

1.2. Etiologi

Penyakit ini disebabkan oleh enterovirus yang sangat kecil dari family Picornaviridae, Genus Aphthovirus. Ada tujuh tipe virus PMK, yakni A, O, C, Asia, South African Territories (SAT) 1, 2, 3. Setiap tipe virus PMK masih terbagi lagi menjadi sub tipe dan galur (strain). Virus penyebab PMK ini berdiameter 10 – 20 milimikron dan terbentuk dari Ribonucleic acid (RNA) serta diselubungi oleh protein.

1.3. Diagnosa Penyakit

Diagnosa PMK di lapangan dilakukan berdasarkan gambaran epidemiologi PMK yang hanya menyerang ruminansia dan babi dengan morbiditas tinggi dan kasus kematian (case fatality) yang rendah, gejala klinis seperti pincang, lepuh-lepuh di mulut dan hypersalivasi yang disertai demam. Sedangkan diagnosa laboratoris bisa dilakukan dengan isolasi, serologis (ELISA) dan molekular (PCR). Mengingat penyebaran penyakit sangat tinggi, maka uji molekular PCR merupakan uji yang direkomendasikan OIE.

2. PERSIAPAN

2.1. Kualifikasi Penguji

Penguji adalah petugas bersertifikat pengujian PCR PMK dari laboratorium referensi PMK dan ditunjuk oleh Kepala Balai. Penguji harus memahami biosafety dan biosecurity pengujian dan pembuangan limbah pengujian PMK.

2.2. Persiapan Contoh Uji

1. Sampel Plasma

Sampel disentrifus dengan kecepatan 2.000 g selama 10 menit, lalu plasma yang terbentuk dipisahkan dari endapan. Kemudian dilakukan sentrifus kembali dengan kecepatan 8.000 g selama 5 menit. Plasma yang terbentuk di bagian atas yang kemudian digunakan sebagai sampel saat ekstraksi.

2. Sampel Swab

Sampel dalam media transport berupa VTM (Viral Transport Media) atau PBS- dengan pH 7,2-7,6 divortex selama 5 menit kemudian dilakukan sentrifus dengan kecepatan 2.000 g selama 10 menit. Supernatan digunakan sebagai sampel saat ekstraksi.

3. Sampel Oesophageal-Pharyngeal (OP)

Sampel dalam media transport berupa VTM (Viral Transport Media) atau PBS- dengan pH 7,2-7,6 divortex selama 5 menit kemudian dilakukan sentrifus dengan kecepatan 2.000 g selama 10 menit. Supernatan digunakan sebagai sampel saat ekstraksi.

4. Sampel Jaringan Epitel

Sampel dalam media transport berupa VTM (Viral Transport Media) atau PBS- dengan pH 7,2-7,6 digerus kemudian dilakukan sentrifus dengan kecepatan 2.000 g selama 10 menit. Supernatan digunakan sebagai sampel saat ekstraksi.

5. Sampel Daging

Sampel dalam media transport berupa VTM (Viral Transport Media) atau PBS- dengan pH 7,2-7,6 digerus kemudian dilakukan sentrifus dengan kecepatan 2.000 g selama 10 menit. Supernatan digunakan sebagai sampel saat ekstraksi.

6. Sampel RNA

Sampel dapat langsung digunakan sebagai template PCR.

7. Sampel cDNA

Sampel dapat langsung digunakan sebagai template PCR.

3. UJI REAL-TIME PCR PMK (3D dan 5'UTR)

3.1. Alat dan Bahan

Bahan

1. QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen)
2. AgPath-ID One Step RT-PCR Kit (Ambion)
3. 3D forward primer: 5'- ACT-GGG-TTT-TAC-AAA-CCT-GTG-A -3'
3D reverse primer: 5'-GCG-AGT-CCT-GCC-ACG-GA -3'
3D probe: 5'-FAM-TCC-TTT-GCA-CGC-CGT-GGG-AC-TAMRA-3'
4. 5'UTR forward primer: 5'-CACYT-YAAGR-TGACA-YTGRT-ACTGG-TAC-3'
5'UTR reverse primer: 5'-CAGAT-YCCRA-GTGWG-ICITG-TTA-3'
5'UTR probe: 5'-FAM-CCTCG GGGTA-CCTGA-AGGGC-ATCC-TAMRA-3'

Alat

BioSafety Cabinet, PCR Cabinet, Mikropipet, Sentrifus, Vortex, Spindown, Thermal cycler (QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System, Applied Biosystems).

3.2. Prosedur Uji

3.2.1 Ekstraksi RNA

1. *Buffer AVL* sebanyak 560 µl yang mengandung carrier RNA dengan perbandingan : volume *Buffer AVL* 0,56 ml + carrier RNA-AVE 5,6 µl dimasukkan ke dalam tube 1,5 ml.
2. Tambahkan sampel sebanyak 140 µl, vortex 15 detik.
3. Inkubasi pada suhu ruang selama 10 menit.
4. *Spin down* sebentar.
5. Kemudian ditambahkan 560 µl Ethanol absolut, divortex 15 detik, lalu dilakukan *spin down*.
6. Ambil 630 µl cairan dari step 5 lalu dimasukkan ke dalam *spin column* dan disentrifus dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit. Letakkan *spin column* pada tabung penampung yang bersih, dan buang tabung penampung yang mengandung filtrat.
7. Ulangi step 6.
8. Tambahkan 500 µl Buffer AW1 kemudian disentrifus dengan kecepatan 8.000 rpm selama 1 menit. Letakkan *spin column* pada tabung penampung yang bersih, dan buang tabung penampung yang mengandung filtrat.
9. Tambahkan 500 µl Buffer AW2 kemudian disentrifus dengan kecepatan 14.000 rpm selama 3 menit.

10. Rekomendasi: Letakkan *spin column* pada tabung penampung yang bersih, dan buang tabung penampung yang mengandung filtrat. Sentrifus dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit.
11. Letakkan *spin column* ke tube 1,5 ml dan buang tabung penampung yang mengandung filtrat.
12. Tambahkan 60 µl Buffer AVE dan diinkubasi pada suhu ruang selama 1 menit lalu disentrifus dengan kecepatan 8.000 rpm selama 1 menit.

3.2.2 Pembuatan PCR Reaction Mix, Penambahan Template dan Amplifikasi DNA

1. Pengerjaan pembuatan PCR Reaction Mix dilakukan di PCR Cabinet.
2. Tabung PCR disiapkan sejumlah sampel yang akan diuji ditambah dengan kontrol positif dan kontrol negatif.
3. Dalam pembuatan PCR Reaction Mix harus dalam keadaan dingin.
4. Tabung untuk PCR Reaction Mix disiapkan dan masukkan reagen 2X RT-PCR Buffer sebanyak 12,5 µl dikalikan jumlah reaksi yang dikehendaki.
5. Tambahkan reagen nuclease-free water sebanyak 1 µl dikalikan jumlah reaksi yang dikehendaki.
6. Tambahkan primer Forward 10 µM sebanyak 2 µl dikalikan jumlah reaksi yang dikehendaki.
7. Tambahkan primer Reverse 10 µM sebanyak 2 µl dikalikan jumlah reaksi yang dikehendaki.
8. Tambahkan probe 10 µM sebanyak 1,5 µl dikalikan jumlah reaksi yang dikehendaki.
9. Tambahkan reagen 25X RT-PCR Enzyme Mix sebanyak 1 µl dikalikan jumlah reaksi yang dikehendaki.
10. PCR Reaction Mix sebanyak 20 µl dibagi ke sejumlah tabung PCR yang sudah disiapkan.
11. Tambahkan RNA template (sampel uji / kontrol positif / kontrol negatif) sebanyak 5 µl ke dalam tabung PCR yang sudah berisi PCR Reaction Mix 20 µl sehingga jumlah total menjadi 25 µl.
12. Vortex agar tercampur homogen.
13. Dilakukan *spin down*.
14. Masukkan ke dalam mesin thermal cycler dengan program sebagai berikut :

1x	suhu 50°C selama 2 menit
1x	suhu 95°C selama 10 menit
50x	suhu 95°C selama 15 detik, suhu 60°C selama 1 menit

3.2.3 Interpretasi Hasil

Hasil dikatakan positif apabila nilai Ct value <40.

Hasil dikatakan negatif apabila nilai Ct value >50 atau Undeterminate.

Hasil dikatakan indeterminate atau borderline dan harus diuji ulang apabila nilai Ct value 40-50.

4. UJI KONVENSIONAL PCR PMK (3D)

4.1. Alat dan Bahan

Bahan

1. QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen)
2. SuperScript™ III One-Step RT-PCR Platinum® Taq High Fidelity (Invitrogen)
3. 100 bp DNA Ladder (Invitrogen)
4. Agarose LE (Roche)
5. Sybr Safe (Invitrogen)
6. 3D forward primer: 5'-GCCTG-GTCTT-TCCAG-GTCT-3'
3D reverse primer: 5'-CCAGT-CCCCT-TCTCA-GATC-3'

Alat

BioSafety Cabinet, PCR Cabinet, Mikropipet, Sentrifus, Vortex, Spindown, Thermal cycler (ProFlex PCR System, Applied Biosystems), Gel Documentation/High Performance Ultraviolet Tranluminator (UVP).

4.2. Prosedur Uji

4.2.1 Ekstraksi RNA

1. *Buffer AVL* sebanyak 560 µl yang mengandung carrier RNA dengan perbandingan : volume *Buffer AVL* 0,56 ml + carrier RNA-AVE 5,6 µl dimasukkan ke dalam tube 1,5 ml.
2. Tambahkan sampel sebanyak 140 µl, vortex 15 detik.
3. Inkubasi pada suhu ruang selama 10 menit.
4. *Spin down* sebentar.
5. Kemudian ditambahkan 560 µl Ethanol absolut, divortex 15 detik, lalu dilakukan *spin down*.
6. Ambil 630 µl cairan dari step 5 lalu dimasukkan ke dalam *spin column* dan disentrifus dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit. Letakkan *spin column* pada tabung penampung yang bersih, dan buang tabung penampung yang mengandung filtrat.

7. Ulangi step 6.
8. Tambahkan 500 µl Buffer AW1 kemudian disentrifus dengan kecepatan 8.000 rpm selama 1 menit. Letakkan *spin column* pada tabung penampung yang bersih, dan buang tabung penampung yang mengandung filtrat.
9. Tambahkan 500 µl Buffer AW2 kemudian disentrifus dengan kecepatan 14.000 rpm selama 3 menit.
10. Rekomendasi: Letakkan *spin column* pada tabung penampung yang bersih, dan buang tabung penampung yang mengandung filtrat. Sentrifus dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit.
11. Letakkan *spin column* ke tube 1,5 ml dan buang tabung penampung yang mengandung filtrat.
12. Tambahkan 60 µl Buffer AVE dan diinkubasi pada suhu ruang selama 1 menit lalu disentrifus dengan kecepatan 8.000 rpm selama 1 menit.

4.2.2 Pembuatan PCR Reaction Mix, Penambahan Template dan Amplifikasi DNA

1. Pengerjaan pembuatan PCR Reaction Mix dilakukan di PCR Cabinet.
2. Tabung PCR disiapkan sejumlah sampel yang akan diuji ditambah dengan kontrol positif dan kontrol negatif.
3. Dalam pembuatan PCR Reaction Mix harus dalam keadaan dingin.
4. Tabung untuk PCR Reaction Mix disiapkan dan masukkan reagen 2X Reaction Mix sebanyak 12,5 µl dikalikan jumlah reaksi yang dikehendaki.
5. Tambahkan reagen nuclease-free water sebanyak 7,5 µl dikalikan jumlah reaksi yang dikehendaki.
6. Tambahkan primer Forward 20 µM sebanyak 0.5 µl dikalikan jumlah reaksi yang dikehendaki.
7. Tambahkan primer Reverse 20 µM sebanyak 0.5 µl dikalikan jumlah reaksi yang dikehendaki.
8. Tambahkan reagen Superscript III RT Platinum Taq Mix sebanyak 1 µl dikalikan jumlah reaksi yang dikehendaki.
9. PCR Reaction Mix sebanyak 22 µl dibagi ke sejumlah tabung PCR yang sudah disiapkan.
10. Tambahkan RNA template (sampel uji / kontrol positif / kontrol negatif) sebanyak 3 µl ke dalam tabung PCR yang sudah berisi PCR Reaction Mix 22 µl sehingga jumlah total menjadi 25 µl.

11. Vortex agar tercampur homogen.
12. Dilakukan spin down.
13. Masukkan ke dalam mesin thermal cycler dengan program sebagai berikut :

1x	suhu 50°C selama 30 menit
1x	suhu 95°C selama 2 menit
30x	suhu 95°C selama 15 detik, 55°C selama 30 detik dan suhu 68°C selama 1 menit
1x	suhu 68°C selama 1 menit
Hold	suhu 4°C ∞

4.2.3 Running Gel Elektroforesis

1. Timbang agarose sebanyak 1 gram.
2. Tuang ke dalam tabung / gelas erlenmeyer 250 ml.
3. Tambahkan 100 ml 1x TBE Buffer.
4. Didihkan sampai larut dalam microwave selama $\pm$ 4 menit, sambil sesekali digoyang untuk meyakinkan terlarut dengan merata.
5. Agarose dituang dalam tray yang telah dipasang sisir.
6. Pada agarose ditambahkan 5 μ l SybrSafe dalam 100 ml agar.
7. Agarose gel dibiarkan sampai mengeras.
8. Setelah gel mengeras dimasukkan ke dalam elektroforesis chamber.
9. TBE Buffer 1X dituang sampai gel terendam seluruhnya.
10. Marker sebanyak 2 μ l ditambah dengan Loading Dye sebanyak 1 μ l dimasukkan ke dalam well agarose paling kiri.
11. Kontrol negatif, produk PCR dan kontrol positif sebanyak 5 μ l masing-masing dicampur dengan Loading Dye sebanyak 1 μ l dimasukkan ke dalam well agarose dimulai dari kontrol negatif kemudian sampel dan terakhir kontrol positif.
12. Membuat catatan urutan sampel untuk setiap well.
13. Chamber ditutup kemudian dihubungkan dengan power supply.
14. Power supply dinyalakan pada posisi 100 volt selama 30 – 45 menit, setelah itu dimatikan.
15. Komputer Gel Documentation, kamera dinyalakan.
16. Masukkan gel hasil running ke dalam Gel Documentation dan power dinyalakan.
17. UV pada Gel Documentation dinyalakan.
18. Klik "Capture" yang ada pada komputer untuk memotret hasil running gel.

4.2.4 Interpretasi Hasil

Hasil dikatakan positif apabila menunjukkan adanya band yang jelas pada posisi 328 bp.

5. UJI SEKUENSING VP1

5.1. Alat dan Bahan

Bahan

1. QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen).
2. SuperScript™ III One-Step RT-PCR Platinum® Taq High Fidelity (Invitrogen).
3. 100 bp DNA Ladder (Invitrogen). Agarose LE (Roche).
4. Sybr Safe (Invitrogen).
5. PCR Clean Up Gel Extraction (Macherey-Negel).
6. BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems).
7. BigDye XTerminator™ Purification Kit (Applied Biosystems).
8. SeqStudio™ Cartridge V2 (Applied Biosystems).
9. Primer FMD UNI-VP1F: 5'-TGTAACGACGGCCAGT AGYGCYGGYAARGAYTTTGA-3'.
Primer FMD UNI-VP1R: 5'- CAGGAAACAGCTATGAC CATGTCYTCTYGCATCTGGTT-3'.

Alat

BioSafety Cabinet, PCR Cabinet, Mikropipet, Sentrifus, Vortex, Spindown, Thermal cycler (ProFlex PCR System, Applied Biosystems), Gel Documentation/High Performance Ultraviolet Tranluminator (UVP), SeqStudio (Applied Biosystems).

5.2. Prosedur Uji

5.2.1 Ekstraksi RNA

1. *Buffer AVL* sebanyak 560 µl yang mengandung carrier RNA dengan perbandingan : volume *Buffer AVL* 0,56 ml + carrier RNA-AVE 5,6 µl dimasukkan ke dalam tube 1,5 ml.
2. Tambahkan sampel sebanyak 140 µl, vortex 15 detik.
3. Inkubasi pada suhu ruang selama 10 menit.
4. *Spin down* sebentar.
5. Kemudian ditambahkan 560 µl Ethanol absolut, divortex 15 detik, lalu dilakukan *spin down*.
6. Ambil 630 µl cairan dari step 5 lalu dimasukkan ke dalam *spin column* dan disentrifus dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit. Letakkan *spin column* pada tabung penampung yang bersih, dan buang tabung penampung yang mengandung filtrat.
7. Ulangi step 6.

8. Tambahkan 500 µl Buffer AW1 kemudian disentrifus dengan kecepatan 8.000 rpm selama 1 menit. Letakkan *spin column* pada tabung penampung yang bersih, dan buang tabung penampung yang mengandung filtrat.
9. Tambahkan 500 µl Buffer AW2 kemudian disentrifus dengan kecepatan 14.000 rpm selama 3 menit.
10. Rekomendasi: Letakkan *spin column* pada tabung penampung yang bersih, dan buang tabung penampung yang mengandung filtrat. Sentrifus dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit.
11. Letakkan *spin column* ke tube 1,5 ml dan buang tabung penampung yang mengandung filtrat.
12. Tambahkan 60 µl Buffer AVE dan diinkubasi pada suhu ruang selama 1 menit lalu disentrifus dengan kecepatan 8.000 rpm selama 1 menit.

5.2.2 Pembuatan PCR Reaction Mix, Penambahan Template dan Amplifikasi DNA

1. Pengerjaan pembuatan PCR Reaction Mix dilakukan di PCR Cabinet.
2. Tabung PCR disiapkan sejumlah sampel yang akan diuji ditambah dengan kontrol positif dan kontrol negatif.
3. Dalam pembuatan PCR Reaction Mix harus dalam keadaan dingin.
4. Tabung untuk PCR Reaction Mix disiapkan dan masukkan reagen 2X Reaction Mix sebanyak 12,5 µl dikalikan jumlah reaksi yang dikehendaki.
5. Tambahkan reagen nuclease-free water sebanyak 4,5 µl dikalikan jumlah reaksi yang dikehendaki.
6. Tambahkan primer Forward 10 µM sebanyak 1 µl dikalikan jumlah reaksi yang dikehendaki.
7. Tambahkan primer Reverse 10 µM sebanyak 1 µl dikalikan jumlah reaksi yang dikehendaki.
8. Tambahkan reagen Superscript III RT Platinum Taq Mix sebanyak 1 µl dikalikan jumlah reaksi yang dikehendaki.
9. PCR Reaction Mix sebanyak 20 µl dibagi ke sejumlah tabung PCR yang sudah disiapkan.
10. Tambahkan RNA template (sampel uji / kontrol positif / kontrol negatif) sebanyak 5 µl ke dalam tabung PCR yang sudah berisi PCR Reaction Mix 20 µl sehingga jumlah total menjadi 25 µl.
11. Vortex agar tercampur homogen.

12. Dilakukan spin down.

13. Masukkan ke dalam mesin thermal cycler dengan program sebagai berikut :

1x	suhu 50°C selama 30 menit
1x	suhu 95°C selama 2 menit
40x	suhu 95°C selama 15 detik, 55°C selama 30 detik dan suhu 68°C selama 1 menit
1x	suhu 68°C selama 5 menit
Hold	suhu 4°C ∞

5.2.3 Running Gel Elektroforesis

1. Timbang agarose sebanyak 1 gram.
2. Tuang ke dalam tabung / gelas erlenmeyer 250 ml.
3. Tambahkan 100 ml 1x TBE Buffer.
4. Dididihkan sampai larut dalam microwave selama $\pm$ 4 menit, sambil sesekali digoyang untuk meyakinkan terlarut dengan merata.
5. Agarose dituang dalam tray yang telah dipasang sisir.
6. Pada agarose ditambahkan 5 μ l SybrSafe dalam 100 ml agar.
7. Agarose gel dibiarkan sampai mengeras.
8. Setelah gel mengeras dimasukkan ke dalam elektroforesis chamber.
9. TBE Buffer 1X dituang sampai gel terendam seluruhnya.
10. Marker sebanyak 2 μ l ditambah dengan Loading Dye sebanyak 1 μ l dimasukkan ke dalam well agarose paling kiri.
11. Kontrol negatif, produk PCR dan kontrol positif sebanyak 5 μ l masing-masing dicampur dengan Loading Dye sebanyak 1 μ l dimasukkan ke dalam well agarose dimulai dari kontrol negatif kemudian sampel dan terakhir kontrol positif.
12. Membuat catatan urutan sampel untuk setiap well.
13. Chamber ditutup kemudian dihubungkan dengan power supply.
14. Power supply dinyalakan pada posisi 100 volt selama 30 – 45 menit, setelah itu dimatikan.
15. Komputer Gel Documentation, kamera dinyalakan.
16. Masukkan gel hasil running ke dalam Gel Documentation dan power dinyalakan.
17. UV pada Gel Documentation dinyalakan.
18. Klik "Capture" yang ada pada komputer untuk memotret hasil running gel.

5.2.4 Interpretasi Hasil

Hasil dikatakan positif apabila menunjukkan adanya band yang jelas pada posisi 856 bp.

5.2.5 Purifikasi Produk PCR

1. Gunakan scalpel bersih untuk memotong fragmen DNA dari gel agarose. Timbang berat potongan gel dan masukkan dalam tube bersih. Tambahkan 200 μ L Buffer NTI untuk tiap 100 mg gel agarose dengan konsentrasi kurang dari 2%. Inkubasikan selama 5-10 menit pada suhu 50°C dan lakukan vortex setiap 2-3 menit hingga potongan gel larut sempurna.
2. Pindahkan sampel ke NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Column. Lakukan sentrifus 11,000 g selama 30 detik.
3. Buang cairan pada tampungan dan tambahkan 700 μ L Buffer NT3 pada NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Column. Lakukan sentrifus 11,000 g selama 30 detik.
4. Sentrifus kembali pada 11,000 g selama 1 menit untuk menghilangkan Buffer NT3 secara sempurna.
5. Pindahkan NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Column pada tube 1,5 mL yang baru. Tambahkan 22,5 μ L Buffer NE dan inkubasikan pada suhu ruang selama 1 menit. Lakukan sentrifus 11,000 g selama 1 menit.

5.2.6 Cycle Sequencing

1. Pengerjaan pembuatan Mix dilakukan di PCR Cabinet.
2. Tabung PCR disiapkan sejumlah sampel yang akan diuji.
3. Dalam pembuatan Mix harus dalam keadaan dingin.
4. Tabung untuk Mix disiapkan dan masukkan reagen BigDye™ Terminator 3.1 Ready Reaction Mix sebanyak 10 μ L dikalikan jumlah reaksi yang dikehendaki.
5. Tambahkan reagen BigDye™ Terminator v1.1 & v3.1 5X Sequencing Buffer sebanyak 2 μ L dikalikan jumlah reaksi yang dikehendaki.
6. Tambahkan reagen nuclease-free water sebanyak 2 μ L dikalikan jumlah reaksi yang dikehendaki.
7. Tambahkan primer Forward atau primer Reverse 3,2 μ M sebanyak 1 μ L dikalikan jumlah reaksi yang dikehendaki.
8. Mix sebanyak 15 μ L dibagi ke sejumlah tabung PCR yang sudah disiapkan.
9. Tambahkan DNA template sebanyak 5 μ L ke dalam tabung PCR yang sudah berisi Mix 15 μ L sehingga jumlah total menjadi 20 μ L.
10. Vortex agar tercampur homogen.
11. Dilakukan spin down.
12. Masukkan ke dalam mesin thermal cycler dengan program sebagai berikut :

1x suhu 96°C selama 1 menit
25x suhu 96°C selama 10 detik, 50°C selama 5 detik
1x suhu 60°C selama 4 menit
Hold suhu 4°C ∞

5.2.7 Purifikasi Reaksi Sekuensing

1. Ambil SAM solution sebanyak 90 µL, lalu tambahkan 20 µL BigDye XTerminator™ bead solution.
2. Tambahkan 20 µL produk cycle sequencing.
3. Vortex selama 30 menit.
4. Sentrifus 1000 g selama 3 menit.

5.2.8 Sequencing

Masukkan sampel yang telah terpurifikasi sebanyak 10 µL ke dalam mikroplate, letakkan pada mesin sequencer, lalu running hingga selesai. Raw data berbentuk abi files selanjutnya dianalisa bioinformatika.

6. RETENSI DAN PEMUSNAHAN CONTOH UJI

- 6.1.** Contoh original (plasma, swab, Oesophageal-Pharyngeal (OP), jaringan epitel, daging, RNA dan cDNA) yang diterima di simpan di suhu -20°C (freezer) sampai contoh di uji.
- 6.2.** Contoh dengan hasil uji negatif dimusnahkan 6 (enam) bulan setelah pengujian. Apabila terdapat contoh dengan hasil positif maka dikoleksi dan disimpan pada -80°C (Deep Freezer) atau dimusnahkan sesuai dengan perjanjian.
- 6.3.** Contoh RNA hasil ekstraksi di simpan di freezer -20°C. Apabila terdapat contoh RNA dengan hasil uji positif maka dikoleksi dan disimpan di suhu -80°C (Deep Freezer).
- 6.4.** Musnahkan contoh original dengan autoclave dan incinerator

7. JAMINAN MUTU/QUALITY ASSURANCE

Setiap pengujian wajib menyertakan paling sedikit 1(satu) kontrol positif, 1 (satu) kontrol negatif dan 1 (satu) NTC (Non Template Control). Hasil pengujian dicatat dalam sebuah lembar kerja pengujian laboratorium dengan mencantumkan jenis kontrol positif dan negatif yang digunakan. Hasil kontrol positif dari setiap pengujian dicatat dan dievaluasi secara berkala apakah kontrol yang digunakan masih dapat di gunakan dalam pengujian atau harus diperbarui.

8. LAMPIRAN

Dalam lampiran ini dapat dituliskan formula cara pembuatan bahan yang diperlukan (bila ada)

9. DAFTAR PUSTAKA

OIE Terrestrial Manual Chapter 3.1.8 Foot and Mouth Disease (Infection with Foot and Mouth Disease Virus). 2021

Standar Sistem Manajemen Mutu dan Anti Penyuapan; SNI ISO 9001:2015, SNI ISO 37001:2016

Standar Sistem Manajemen Laboratorium Pengujian Mutu; ISO/IEC 17025:2017