

BAQTI DIYANANINGRUM

12820034

by yosadiprakoso 1

Submission date: 11-Aug-2020 07:57AM (UTC-0400)

Submission ID: 1368413742

File name: BAQTI_DIYANANINGRUM_12820034.docx (130.31K)

Word count: 5584

Character count: 31398

PERBANDINGAN METODE REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION (qRT-PCR) DENGAN KONVENSIONAL POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-PCR) TERHADAP SAMPEL ANTIGEN *Avian Influenza*

Penyakit flu burung yang disebabkan oleh virus *Avian Influenza* tipe A merupakan penyakit yang sering menyebabkan wabah berbahaya bagi unggas dan manusia. Lalu lintas komoditas unggas yang tinggi juga membutuhkan deteksi yang akurat dan cepat sebagai upaya pengendalian penularan dan penyebarannya. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbandingan sensitifitas dan lama waktu pengujian *Polymerase Chain Reaction* (PCR) Metode *Quantitative Real Time* dengan metode konvensional, sehingga ke depan dapat membantu untuk menentukan metode yang tepat untuk deteksi virus *Avian Influenza*. Data hasil uji penelitian menunjukkan bahwa kedua metode uji tersebut memiliki sensitivitas 100% atau dapat dikatakan tidak berbeda nyata, sehingga kedua metode tersebut dapat digunakan untuk mendeteksi virus *avian Influenza* yang disesuaikan dengan kebutuhan pengujian. Lama waktu rata-rata pengujian metode *Real Time* PCR adalah 2,5 jam, sedangkan lama waktu rata-rata metode Konvensional PCR adalah 5 jam.

Kata Kunci: *Real Time Polymerase Chain Reaction*, Konvensional, Antigen, *Avian Influenza*

¹⁵
**COMPARISON OF QUANTITATIVE REAL TIME POLYMERASE
CHAIN REACTION (qRT-PCR) METHOD WITH CONVENTIONAL
POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-PCR) METHOD TO ANTIGEN
SAMPLE of *Avian Influenza Avian***

Avian Influenza type A was a disease that often causes dangerous outbreaks for birds and human. High poultry commodity traffic also required the accurate and fast detection method as an effort to control transmission and spread. This research aims to compare the sensitivity and duration of testing the Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) method with Conventional Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) methods, so that in the future it will be able to help determining the appropriate method to detect of the Avian Influenza virus accurately and quickly. The data from the research test results have shown that both of test methods have 100% sensitivity or it could be said that it was not significantly different, so that both methods can be used to detect Avian Influenza viruses depend on the need of testing. The average time of testing Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) method was 2,5 hours, while average time of the Conventional Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) method was 5 hours.

⁴⁴
Keywords: Real Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR), Conventional Polymerase Chain Reaction , Antigen, Avian Influenza

1.1 Latar Belakang

Penyakit *Avian Influenza* tipe A yang mempunyai patogenitas tinggi dan sering menimbulkan wabah di dunia perunggasan dan *zoonosis* memerlukan tindakan antisipasi berupa deteksi dini sebagai upaya pencegahan terjadinya penyebaran dan penularan penyakit. Seiring banyaknya Permohonan pengujian Sampel uji PCR *Avian Influenza* dari komoditas lalulintas melalui Bandara Ir. H. Juanda Surabaya di Sidoarjo, Jawa Timur untuk beberapa daerah tujuan pengiriman yang mempersyaratkan pengujian AI dengan metode PCR mendorong laboratorium uji untuk melakukan pengujian dengan metode *Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction* (qRT-PCR), karena dinilai akurat, lebih cepat dalam mendeteksi antigen target dan sampel yang diuji juga lebih banyak bila dibandingkan dengan metode Konvensional PCR

Sesuai dengan SNI ISO/IEC 17025 : 2008 laboratorium harus memvalidasi metode yang tidak baku atau metode baku yang dikembangkan. Sedangkan untuk metode baku laboratorium harus memverifikasi metode untuk mengkonfirmasi bahwa metode itu sesuai untuk penggunaan yang dimaksudkan. Verifikasi metode bertujuan untuk memastikan dan mengkonfirmasi bahwa metode analisis tersebut sudah sesuai peruntukannya.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang dijabarkan di atas, maka perumusan masalah yang menjadi fokus dalam penelitian ini adalah:

- Apakah ada perbedaan antara metode *Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan metode Konvensional dalam mengetahui sensitifitas dan lama waktu pengujian

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang dan rumusan masalah yang telah diuraikan di atas, maka tujuan penelitian ini adalah:

Mengetahui akurasi, sensitifitas dan lama waktu pengujian target deteksi matrix *Avian Influenza* (AI) dengan metode pengujian *Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan metode Konvensional.

1.4 Manfaat Penelitian

Secara teori penelitian ini diharapkan Metode *Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan konvensional terhadap target deteksi matrix AI mempunyai sensitifitas yang tidak berbeda nyata, sehingga kedua metode tersebut dapat digunakan untuk mendeteksi RNA AI matrix pada sampel-sampel uji *Avian Influenza*.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Metoda *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Reaksi Polimerase Berantai atau dikenal sebagai *Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan proses melipatgandakan suatu sekuens nukleotida tertentu secara *in vitro* secara enzimatik. Metode ini dikembangkan pertama kali oleh Kary B. Mulis pada tahun 1985. Pada awal perkembangannya metode ini hanya digunakan untuk melipatgandakan molekul DNA, tetapi kemudian dikembangkan lebih lanjut sehingga dapat digunakan pula untuk melipatgandakan dan melakukan kuantitas molekul mRNA, sehingga metode ini sekarang telah banyak digunakan untuk berbagai macam manipulasi dan analisis genetik.

Kemampuan meningkatkan jumlah urutan DNA ribuan bahkan jutaan kali dari jumlah semula, sekitar 10⁶-10⁷ kali, dimana setiap urutan basa nukleotida yang diamplifikasi akan menjadi dua kali jumlahnya. Pada setiap siklus PCR akan diperoleh 2ⁿ kali banyaknya DNA target. Komponen sampel dalam jumlah yang sangat sedikit mampu diamplifikasi hanya pada urutan DNA target dan meminimalisir amplifikasi urutan non-target. Metode PCR dapat dilakukan dengan menggunakan, misalnya oligonukleotida yang digunakan hanya sekitar 1 mM dan reaksi ini biasa dilakukan dalam volume 50-100 μ l, DNA cetakan yang diperlukan hanya sekitar 5 μ g. Kelebihan lain dari metode ini DNA cetakan yang digunakan tidak perlu dimurnikan terlebih dahulu sehingga metode PCR dapat digunakan untuk melipatgandakan suatu sekuens DNA dalam genom bakteri.

PCR adalah reaksi polimerase berantai yang melibatkan enzim polimerase yang dilakukan secara berulang-ulang secara in vitro. Pengulangan berkali-kali pada proses pemisahan untai ganda DNA menjadi untai tunggal, hibridisasi primer untuk mengawali replikasi DNA dilanjutkan dengan proses penambahan basa pada cetakan DNA oleh enzim polimerase. Mesin *thermal cycler* merupakan suatu mesin yang mampu menaikkan dan menurunkan suhu dengan cepat dan bahan-bahan untuk membuat reaksi PCR pada pengujian ini membutuhkan tabung PCR yang bersifat responsif terhadap perubahan suhu. .

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan suatu reaksi enzimatik untuk melipatgandakan untai DNA secara selektif *in vitro* menggunakan sepasang primer oligonukleotida spesifik yang membatasi fragmen DNA tertentu. PCR memiliki beberapa macam jenis uji salah satunya *Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction* dan Konvensional. Aplikasi PCR konvensional mempunyai beberapa faktor keterbatasan untuk kuantitas jumlah awal konsentrasi DNA sampel.

Real-Time PCR mampu mendeteksi produk amplifikasi pada setiap siklus dalam proses penggandaan DNA. Enzim polimerase pada sistem *Real-Time PCR* memiliki aktivitas pada DNA yang memiliki fungsi *exonuclease* pada rantai DNA 5' menuju 3'. Molekul probes yang terikat pada untai tunggal DNA spesifik diuraikan oleh DNA sehingga dapat digunakan untuk deteksi ampikon pada target DNA yang spesifik. Oligonukleotida diikat oleh molekul probes dan akan mengikat sekuen DNA target. Probes ini terikat pada ujung 5'P dan pada ujung 3'.

Molekul probes ini memiliki bagian reporter dye pada ujung 5' yang dapat mengeluarkan floresensi sedangkan pada ujung 3' terdapat quencher yang dapat meredam floresensi pada *reporter dye*. Sehingga sebelum reaksi emisi dari *reporter dye* tidak dapat terbaca pada detector.

Real-Time PCR memiliki keunggulan daripada konvensional PCR yaitu pada Real-Time sistem pengukuran analisis menggunakan molekul probes yang dapat diukur pada tiap siklus reaksinya, pada konvensional PCR deteksinya memerlukan gel agarosa untuk proses elektroporesis DNA pada deteksi produk hasil amplifikasi DNA tersebut.

Pada PCR konvensional, deteksi amplicon berdasarkan pada visualisasi band pada agar elektroforesis akhir tahap. ²⁹ Deteksi tahap akhir menunjukkan hasil yang bervariasi sehingga dapat memberikan pembacaan yang kurang akurat. ⁵ Keterbatasan lain adalah batas deteksi atau batas kuantitasi kandungan DNA dalam sampel tidak cukup rendah dan rentang linearitas yang tidak cukup luas.

Real-time PCR atau qPCR, berbeda dengan PCR konvensional, pada *real-time PCR* tahap deteksi dan tahap penggandaan materi genetik dilakukan secara bersamaan (simultan). Hal ini menawarkan beberapa keunggulan yaitu: deteksi produk PCR dilakukan pada fase eksponensial sehingga hasil yang diperoleh berada pada rentang daerah dengan *repeatability* hasil tinggi. Selain itu, deteksi dilakukan menggunakan pelacak bertanda *fluoresense*. Pelacak adalah reagen yang menentukan kespesifikan hasil. Penggunaan *fluoresense* dalam tahap deteksi menawarkan sensitivitas yang tinggi. Dengan demikian, *real-time PCR* menawarkan sensitivitas yang tinggi dan rentang linearitas yang cukup luas

sehingga hasil penentuan kandungan DNA atau RNA di dalam spesimen menjadi sangat akurat (Zairenyanyok).

¹⁰ 2.2 Avian Influenza (AI)

Penyakit flu burung atau *Avian influenza* (AI) merupakan penyakit yang disebabkan oleh *virus influenza* yang menyerang burung / unggas / ayam. Salah satu tipe yang perlu diwaspadai adalah yang disebabkan oleh *virus influenza* dengan kode genetik H5N1 yang selain dapat menular dari burung ke burung ternyata dapat pula menular dari burung ke manusia. Penyakit pada hewan ini disebabkan virus flu burung tipe A (Badan Litbang Pertanian, 2013).

¹⁹ *Virus Influenza* secara umum terbagi atas Virus Influenza tipe A, B dan C. Ketiga virus ini termasuk dalam famili *Orthomyxoviridae* yang dapat dibedakan berdasarkan perbedaan antigenik yang terdapat pada nukleoprotein (NP) dan Matriks (M) (Horimoto and Kawaoka, 2001; Whittaker, 2011 at Maulana H. R).

² *Avian Influenza* adalah penyakit saluran pernafasan akut yang disebabkan oleh virus. Penularan Virus yang termasuk dalam *Emerging infectious diseases* ini melalui percikan air liur. *Virus influenza* terdiri dari tiga tipe yakni A dan B yang terdapat pada hewan dan manusia dan C yang hanya terdapat pada hewan. Virus influenza A mempunyai risiko lebih tinggi dibanding tipe B dan C, serta berpotensi menjadi endemik dan pandemik. Virus influenza A dibagi menjadi beberapa subtype tergantung glikoprotein pada permukaan, yaitu Hemagglutinin (HA) dan Neuramidase (NA). Antigen dari virus tersebut terdapat pada protein. Selubung protein *virus influenza* selalu berubah ubah, sehingga menyebabkan daya tularnya juga berubah-ubah. *Virus influenza* berupa partikel berdiameter 80 nm - 120 nm.

Gambaran khas dari virus ini adalah adanya tonjolan pad, lapisan luar yang berjumlah kurang lebih 500 tonjolan. Tonjolan ini merupakan glikoprotein (HA) yang mempunyai bentuk seperti batang dan Neuromidase (NA)

Penyakit *Avian Influenza* atau yang biasa kita kenal sebagai ²⁸Flu Burung merupakan penyakit yang disebabkan oleh *virus influenza* tipe A yang menginfeksi pada unggas. *Virus influenza A* dapat menginfeksi pada beberapa spesies burung dan mamalia, akan tetapi sampai saat ini dipercayai bahwa yang bertindak sebagai inang alamiah dan reservoir adalah unggas air liar yang termasuk di dalam ordo *Anseriformes* dan *Chadarioformes* (Rachman, 2011). Mutasi ³*virus Influenza* tipe A sangat mudah terjadi, terutama pada fragmen Hemaglutinin (HA) dan Neuraminidase (N). Sampai saat ini diketahui terdapat 16 sub tipe HA H1-H16 dan 9 Neuraminidase N1-N9, disebabkan karena virus ini mampu mengubah diri melalui proses *antigenic shift* dan *antigenic drift* (Rachmawati, K dan Nidom, CA, 2015)

Pada *virus influenza* tipe A, penentuan subtipe didasarkan pada antigen glikoprotein permukaan virus yaitu ³hemaglutinin (HA) dan neuraminidase (NA) (Hanief 2011). Sampai saat ini telah berhasil dikenali ada 16 subtipe HA (H1 - H16) dan 9 NA (N1 – N9) (Harimoto and Kawaoka, 2005). Di antara subtipe *virus influenza A*, subtipe H5, H7 dan H9 telah diketahui mempunyai patogenitas yang tinggi (HPAI) dan sering menimbulkan penyakit serius pada ternak unggas (Asmara, 2005). Subtipe H5 dan H7 merupakan subtipe yang harus paling diwaspadai, karena dilaporkan paling sering menyebabkan wabah penyakit baik hewan atau manusia. Berdasarkan pathogenitasnya atau kemampuan untuk

menyebabkan suatu penyakit pada unggas,²⁷ AI dibedakan menjadi dua yaitu *High Pathogenic Avian Influenza* (HPAI), dan *Low Pathogenic Avian Influenza* (LPAI). Meskipun virus HPAI lebih mendapatkan perhatian karena besarnya potensi menginfeksi manusia, namun strain virus LPAI ternyata dapat juga menyebabkan kejadian penyakit pada manusia seperti kasus LPAI H7N9 di Tiongkok (poultry Indonesia, 2018).

Virus AI tipe A subtype H5N1 termasuk virus single stranded (ss)-RNA, memiliki asam nukleatnya berantai tunggal familia *Orthomyxoviridae* dengan panjang 200-300 nm DAN diameter 80-120 nm. Bentuk virus ini spheris atau longitudinal dengan kutub negatif. Panjang rantai nukleotida⁶ kurang lebih 13.588 nukleotida yang tersusun dalam 8 segmen gen yang mengkode sekitar 10 jenis protein antara lain Hemagglutinin (HA), Neuraminidase (NA), Protein Nukleokapsid (NP), Protein matriks (M1 dan M2), Protein non struktural (NS1 dan NS2), Polimerase protein A (PA), Polimerase protein B1 dan B2 (PB1 dan PB2) (Ghedinet *et.al.*, 2005 at Maulana H.R, 2011). Subtipe H5N1 Avian influenza telah membahayakan unggas di Indonesia saat ini. Sejak clade 2.3.2 Avian influenza telah ditemukan di unggas air sejak tahun 2012, kematian unggas air telah terjadi sampai sekarang. Perubahan kondisi cuaca ekstrim dengan curah hujan dan banjir yang tinggi, unggas kecil yang tidak menerapkan biosecurity ketat dan tanpa program vaksinasi, dan penjualan berantai unggas pada pedagang dapat meningkatkan kasus dan penularan flu burung pada unggas (jurnal veteriner 2016)

Virus Influenza A mempunyai lapisan lemak yang berfungsi sebagai selubung dan mengandung glikoprotein. Virus ini tetap hidup suhu 0 °C dapat bertahan

hidup lebih dari 30 hari, dalam air pada suhu 20 °C selama 4 hari dan mampu hidup selama 7 hari pada suhu 20 °C serta masih tetap infeksi dalam feses pada suhu 4 °C selama 30-35 jam serta. Virus ini sensitif terhadap panas dan akan mati pada temperatur 56 °C selama tiga jam atau pada temperatur 60 °C selama 30 menit atau lebih. Virus tahan pada kondisi lingkungan yang kering atau pada kondisi yang non isotonik dan tahan pada kondisi pH asam. Deterjen akan merusak selubung virus, Zat-zat lain yang mampu merusak infektivitasnya secara cepat yaitu formalin, beta-propiolakton, agen yang bersifat oksidan, asam encer, Na-deoksikolat, eter, Nadedoksisulfat, hidroksilamin dan ion-ion ammonium serta senyawa iodium (Tabbu, 2000).

Berdasarkan surveilans penyakit *Avian Influenza* subtipe H5 di Propinsi Jawa Timur, Jawa Tengah, dan Daerah Istimewa Yogyakarta (DIY) pada tahun 2014 menunjukkan bahwa sejak akhir tahun 2012 virus yang dominan ditemukan pada unggas di Indonesia adalah H5N1 Clade 2.1.3 dan Clade 2.3.2. Virus Clade 2.3.2 menyebabkan infeksi pada itik lebih beresiko menderita infeksi akut, ganas dan menular (BBVET Wates, 2014). Antibodi dan viral RNA Clade 2.3.2 terdeteksi 5X lebih tinggi dibanding antibodi dan viral RNA Clade 2.1.3. Hasil ini mengindikasikan bahwa, pada itik, paparan infeksi virus AI subtipe H5 Clade 2.3.2 jauh lebih tinggi dibanding dengan paparan dan infeksi virus Clade 2.1.3.

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Pengujian telah dilakukan di laboratorium uji Karantina Hewan Balai Besar Karantina Pertanian Surabaya di Jl. Raya Bandara Ir. H. Juanda-Sidoarjo. Waktu pengujian akan dilakukan pada bulan Juni sampai dengan Agustus 2020.

3.2 Materi Penelitian

3.2.1 Peralatan Penelitian

Peralatan yang dibutuhkan untuk Pengujian Matrix AI Metode *Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction* (qRT-PCR) adalah: *Biosafety Cabinet*, *Laminar Air Flow* PCR, Centrifuse berpendingin, vortex, mikropipet dan *real time* PCR qRT-PCR, sedangkan alat yang dibutuhkan untuk pengujian metode konvensional antara lain: *Biosafety Cabinet*, *Laminar Air Flow* PCR, Centrifuse berpendingin, vortex, mikropipet, mesin *thermal cycler* konvensional, *chamber*, *comb*, mesin elektroforesis, dan *gel documentation*.

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang dibutuhkan untuk Pengujian Matrix AI Metode *Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction* (qRT-PCR) dan konvensional adalah: antigen *Avian Influenza clade 2.1.3* pusvetma, antigen *Avian Influenza clade 2.3.2* pusvetma, media transport, spuit 1 cc, PBS, *yellow tip*, *blue tip*, *shaker*, Nuclease Free Water (H₂O free), Trizol, chloroform, isopropanol-2, ethanol 75%, mikrotube, *thermomixer*, Superscript III RT-PCR, AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Reagents, plastik adhesive, gelas ukur, microplate real time PCR, Primer matrix AI, Agarose 1,5%, 1xTBE Buffer, sybr safe, DNA ladder dan *blue juice*

3.3 Metode Penelitian¹⁴

3.3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian observasi deskripsi dengan menggunakan sampel uji berupa antigen AI pusvetma *clade* 2.1.3 dan *clade* 2.3.2⁸

3.3.2 Teknik Persiapan Sampel

Teknik persiapan sampel yang dilakukan meliputi: Persiapan *stock* antigen dan pengenceran sampel. Untuk Persiapan *stock* antigen menggunakan stock Antigen *Avian Influenza* (kontrol positif) yang tersimpan dalam bentuk vial. *Stock* antigen tersebut diencerkan dengan 1 ml PBS ke dalam vial stock antigen *Avian Influenza*, kemudian dihomogenkan secara merata. Titer antigen *Avian Influenza* yang diperoleh adalah 2^8

Pengenceran sampel dilakukan dengan cara menyiapkan jumlah konsentrasi Antigen *Avian Influenza* yang akan ditambahkan ke dalam matriks sampel (*spike*), yaitu 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} pada *clade* 2.1.3 dan *clade* 2.3.2⁸. Selanjutnya menyiapkan larutan PBS sebanyak 900 μ l ke dalam tiap-tiap 10 (sepuluh) microtube 1,5 ml, kemudian ambil stock Antigen *Avian Influenza* dengan titer 2^8 sebanyak 100 μ l ke dalam tabung 1 (pertama) yang berisi 900 μ l PBS⁵⁰, lalu dihomogenkan hingga rata. Selanjutnya disebut larutan antigen *Avian Influenza* dengan konsentrasi 10^{-1} . Larutan antigen *Avian Influenza* dengan konsentrasi 10^{-1} diambil sebanyak 100 μ l, dan dicampurkan ke tabung sentrifus selanjutnya, lalu dihomogenkan hingga rata, lanjutkan hal serupa hingga tabung ke sepuluh (10) pada kedua *clade*. Selanjutnya disebut larutan antigen *Avian Influenza*

dengan konsentrasi 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} . Masing-masing konsentrasi akan diekstraksi sebagai sampel secara duplo.

3.4 Prosedur Penelitian

Melakukan pengujian deteksi RNA *Avian influenza* dengan metode *Real Time* PCR dan konvensional terhadap target deteksi matrix AI menggunakan sampel antigen AI *clade* 2.1.3 Pusvetma dan antigen AI *clade* 2.3.2 Pusvetma yang diencerkan 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10}

Matriks sampel antigen sebanyak masing-masing 10 suspensi sampel diuji secara duplo dengan metode *Quantitative Real Time* PCR dan konvensional. Analisis akan memperoleh 20 data pengujian *Quantitative Real Time* PCR dan 20 data pengujian konvensional. Pengujian *Quantitative Real Time* PCR menggunakan primer matrix *forward*, primer matrix *reverse* dan 10 data pengujian Konvensional-PCR yang juga dilakukan secara duplo menggunakan primer matrix *forward* dan primer matrix *reverse*.

3.4.1 Ekstraksi

Ekstraksi dilakukan untuk mendapatkan RNA virus dengan langkah pertama yaitu memasukan trizol 750 μ l ke dalam mikrotube steril. Kemudian menambahkan sampel 250 μ l kemudian vortex. Inkubasi selama 5 menit pada suhu ruang. Kemudian menambahkan chloroform 200 μ l kemudian vortex. Inkubasi selama 5 menit pada suhu ruang, kemudian centrifuge 12.000rpm suhu 4°C selama 15 menit. Supernatan diambil dan jangan sampai tercampur endapannya pindah ke mikrotube steril. Selanjutnya menambahkan isopropanol-2 500 μ l kemudian vortex. Inkubasi selama 10 menit kemudian centrifuge 12.000rpm suhu 4°C selama 10

menit. Buang supernatan dengan cara dituang pelan-pelan. Kemudian menambahkan etanol 75% 1000 μ l kemudian vortex. Sentrifuge 7500 rpm selama 5 menit 4⁰ c. Buang Supernatan, keringkan di suhu ruang dengan membuka tutup mikrotube selama 5-10 menit. Kemudian menambahkan H₂O free 20-50 μ l. Inkubasi pada suhu 56⁰ c selama 15 menit dan sampel siap untuk dilakukan master mix. Simpan sampel pada suhu Freezer (apabila tidak langsung diteruskan pengujiannya).

3.4.2 Master Mix

Master mix adalah suatu proses pembuatan resep dalam uji PCR. Pada penelitian ini ada 2 master mix antara lain: *Quantitative Real Time polymerase chain reaction* (qRT-PCR) dan Konvensional *Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR).

Master mix *Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction* (qRT-PCR) Pengujian ini menggunakan AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Reagents. Mastermix dengan resep 2x Buffer 12,5 μ l, 25X RT-PCR Enzyme Mix 0,5 μ l, Forward primer 1 μ l, Reverse primer 1 μ l, probe 0,5 μ l, H₂O free 4 μ l. Masukkan resep ke dalam mikrotube steril vortex. Ambil 20 μ l resep masukan ke dalam mikroplate. Tambahkan 5 μ l sampel ke dalam mikroplate. Tutup mikroplate dengan plastik adhesive. Centrifuse dengan kecepatan 2000 rpm selama 2 menit. Kemudian Masukan mikroplate ke dalam mesin qRT-PCR. Mesin yang digunakan AB *Applied Biosystems*[®]. Tahap berikutnya adalah amplifikasi menggunakan mesin qRT-PCR. Program mesin qRT-PCR yang digunakan aktivasi enzim 45°C selama 10 menit, Denaturasi 95°C selama 10 menit, annealing 60°C selama 1 menit dalam 40 siklus. Thermal cycler digunakan aktivasi enzim 45°C selama 10 menit, Denaturasi 95°C

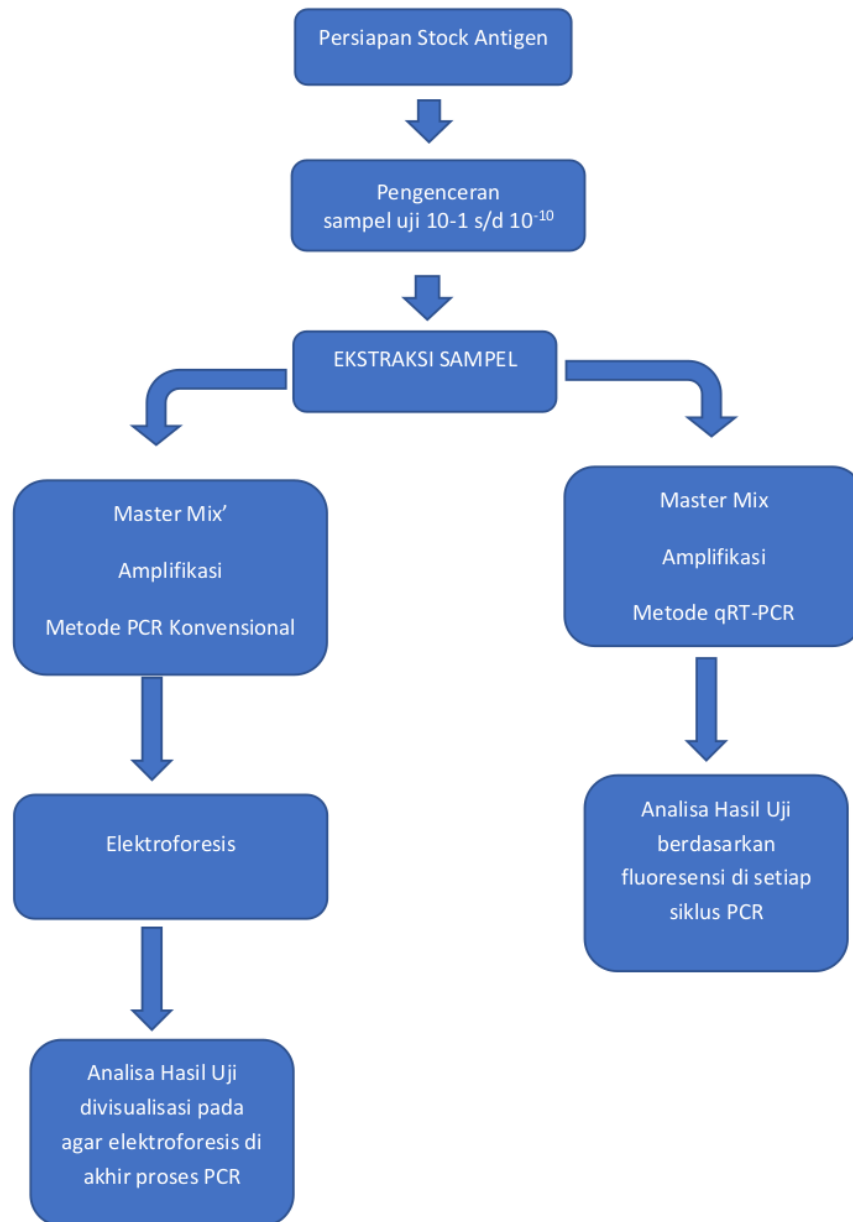
selama 15 menit, annealing 60°C selama 1 menit 15 detik dalam 40 siklus. Ekstensi atau pemanjangan untai DNA sesuai runutan yang terbelah, sehingga akan membentuk dua buah DNA tunggal DNA baru, proses ini terjadi pada suhu 72°C selama 10 menit. Hasil uji berdasarkan flourosensi setiap siklus dapat langsung terbaca. Adapun Susunan primer *Forward* yang kita gunakan adalah AGA TGA GTC TTC TAA CCG AGG TCG (Matrix). Reverse TGC AAA AAC ATC TTC AAG TCT CTG (Matrix).

Master mix Konvensional *Polymerase Chain Reaction* Pengujian ini menggunakan Superscript III RT-PCR Reagents. Master mix dengan resep 2x Buffer 12,5 ul, 25X RT-PCR Enzyme Mix 1 ul, *Foward* primer 1 ul, *Reverse* primer 1 ul, H₂O free 4,5 ul. Masukkan resep ke dalam mikrotube 1,5 ml steril vortex. Ambil 20 µl resep masukan ke dalam mikrotube 0,2 ml. Tambahkan 5 µl sampel ke dalam mikrotube. Tutup mikroube dan masukkan ke dalam mesin *thermal cyler verity*. Tahap selanjutnya adalah proses amplifikasi terbalik yang meliputi: denaturasi, annealing dan ekstensi. Hal ini dilakukan dengan cara memprogram mesin *thermal cyler* qRT-PCR yang digunakan aktivasi enzim 45°C selama 10 menit, Denaturasi 95°C selama 10 menit, annealing 60°C selama 1 menit dalam 40 siklus. Ekstensi atau pemanjangan untai DNA sesuai runutan yang terbelah, sehingga akan membentuk dua buah DNA tunggal DNA baru, proses ini terjadi pada suhu 72°C selama 10 menit. Selama sampel berada di dalam mesin, pembuatan agarose untuk tahap elektroforesis dapat dilakukan dengan cara menimbang 1,5 gr agarose, kemudian tambahkan ke dalam 100 ml TBE 1x dan tutup rapat dengan aluminium foil, homogenisasi dengan stirrer dan panaskan higgs mendidih dengan microwave

$\pm 1,5$ menit, homogenisasi kembali hingga suam-suam kuku. Tambahkan *sybr green* sebanyak $20 \mu\text{l}$ dan homogenisasi kembali. Pasang comb pada chamber elektroforesis, kemudian tuang agarose ke dalam chamber hingga dingin dan mengeras. Setelah mengeras ambil comb dan agarose siap digunakan. Sampel yang sudah diamplifikasi dapat disimpan pada suhu -20°C selama enam bulan atau dapat langsung dilanjutkan pada tahap elektroforesis.

Tahap elektroforesis dilakukan dengan mengeluarkan sampel dari mesin *thermal cycler verity*, siapkan blue juice sebanyak $2 \mu\text{l}$ untuk setiap sampel di atas kertas petrifilm. Ambil $8 \mu\text{l}$ sampel dan homogenisasi dengan *blue juice*, setelah homogen masukkan ke dalam *well* agarose yang sudah disiapkan sebelumnya. Lakukan hal yang sama hingga sampel terakhir. Setelah semua sampel dimasukkan ke dalam *well*, hubungkan *chamber* dengan mesin elektroforesis dan running selama 40 menit $1,5$ Amper. Setelah elektroforesis selesai, ambil agarose dan masukkan ke dalam gel documentation untuk dilakukan pembacaan hasil. Pembacaan hasil dilakukan sesegera mungkin setelah proses elektroforesis selesai.

3.5 Kerangka Penelitian



3.6 Analisis Data Hasil Pengujian

40

Data yang diperoleh dari hasil penelitian akan dianalisa menggunakan rumus sensitivitas dan spesifitas

14

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil

Hasil yang diperoleh pada pengujian deteksi RNA virus *Avian influenza* dengan metode qRT-PCR hasil ekstraksi matrik sampel yang positif akan muncul kenaikan grafik pada hasil pembacaan. Grafik naik pada siklus antara siklus ke 10–37, sedangkan pengujian deteksi RNA virus *Avian influenza* dengan metode Konvensional PCR hasil ekstraksi matriks sampel yang positif akan muncul band. Hasil verifikasi metode PCR AI qRT-PCR dilakukan secara duplo.

Tabel. 4.1 Data hasil uji sampel 1 antigen AI *clade* 2.3.2

Pengenceran	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
Hasil uji	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

$$\begin{aligned} \text{Sensitifitas: } & \frac{+ \text{ benar}}{+ \text{ benar} + - \text{ palsu}} \times 100 \% \\ : & \frac{4}{4+0} \times 100 \% \\ : & 100 \% \end{aligned}$$

Spesifitas: $\frac{- \text{benar}}{- \text{benar} + \text{palsu}} \times 100 \%$

$$: \frac{6}{6+0} \times 100\%$$

$$: 100\%$$

Tabel 4.2 Lama waktu pengujian sampel 1 antigen AI *clade* 2.3.2

[illegible]

56

4.2 Hasil uji

Tabel.4.3 Data hasil uji sampel 2 antigen AI clade 2.3.2

Pengenceran	10^{-0}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
Hasil uji	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

+ benar

+ benar+- palsu

x100 %

$$: \frac{4}{4+0} \times 100\%$$

: 100%

- benar

- benar ++ palsu

x100 %

$$: \frac{6}{6+0} \times 100\%$$

: 100%

Tabel 4.4 Lama waktu pengujian sampel 2 antigen AI *clade* 2.3.2

[illegible]

Hasil uji deteksi RNA virus *Avian influenza* metode qRT-PCR sampel 1 clade 2.1.3 diperoleh data sebagai berikut :

Gambar 4.3 Hasil uji qRT-PCR terhadap sampel 1 antigen AI *clade* 2.1.3

Tabel. 4.5 Data hasil uji sampel 1 antigen AI *clade* 2.1.3

Pengenceran	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰
Hasil uji	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Sensitifitas : $\frac{+ \text{ benar}}{+ \text{ benar} + - \text{ palsu}} \times 100\%$
: $\frac{2}{2+0} \times 100\%$
: 100%

Spesifitas : $\frac{- \text{ benar}}{- \text{ benar} + + \text{ palsu}} \times 100\%$
: $\frac{8}{8+0} \times 100\%$
: 100%

4.6 Lama waktu pengujian sampel 1 antigen AI *clade* 2.1.3

Sampel	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰
Lama waktu	2,5 jam	2,5 jam	2,5 jam	2,5 jam	2,5 jam	2,5 jam	2,5 jam	2,5 jam	2,5 jam	2,5 jam	2,5 jam
Rata2	2,5 jam										

Hasil uji deteksi RNA virus *Avian influenza* metode qRT-PCR sampel 2 antigen AI clade 2.1.3 diperoleh data sebagai berikut :

Gambar 4.4 Hasil uji qRT-PCR terhadap sampel 2 antigen AI *clade* 2.1.3

Tabel. 4.7 Data hasil uji sampel 2 antigen AI *clade* 2.1.3

Pengenceran	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰
Hasil uji	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

$$\begin{aligned} \text{Sensitifitas:} & \quad \frac{+ \text{ benar}}{+ \text{ benar} + - \text{ palsu}} \times 100 \% \\ & : \quad \frac{2}{2+0} \times 100 \% \\ & : 100 \% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Spesifitas:} & \quad \frac{- \text{ benar}}{- \text{ benar} + + \text{ palsu}} \times 100 \% \\ & : \quad \frac{8}{8+0} \times 100 \% \\ & : 100 \% \end{aligned}$$

Tabel 4.8 Lama waktu pengujian sampel 2 antigen AI *clade* 2.1.3

Sampel	10 ⁻⁷	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰
Lama waktu	2,5 jam	2,5 jam	2,5 jam	2,5 jam	2,5 jam	2,5 jam	2,5 jam	2,5 jam	2,5 jam	2,5 jam	2,5 jam
Rata2	2,5 jam										

Hasil uji sampel 1 antigen AI *clade* 2.3.2 metode PCR Konvensional sebagai berikut:

Gambar 4.5 Hasil uji Konvensional PCR sampel 1 antigen AI *clade* 2.3.2

Tabel 4.9 Data hasil uji sampel 1 antigen AI *clade* 2.3.2

Pengenceran	10 ⁻⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶		10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰
Hasil uji	+	+	+	+	+	-	-		-	-	-	-

$$\begin{aligned} \text{Sensitifitas:} & \quad \frac{+ \text{ benar}}{+ \text{ benar} + - \text{ palsu}} \times 100 \% \\ & : \quad \frac{4}{4+0} \times 100 \% \\ & : 100 \% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Spesifitas:} & \quad \frac{- \text{ benar}}{- \text{ benar} + + \text{ palsu}} \times 100 \% \\ & : \quad \frac{6}{6+0} \times 100 \% \\ & : 100 \% \end{aligned}$$

Tabel 4.10 Lama waktu pengujian sampel 1 antigen AI *clade* 2.3.2

Sampel	10 ⁻⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰
--------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	-------------------

[illegible]

Hasil uji sampel 2 antigen AI *clade* 2.3.2 metode PCR Konvensional sebagai berikut:

Gambar 4.6 Hasil uji Konvensional PCR sampel 2 antigen AI *clade* 2.3.2

Tabel 4.11 Data hasil uji sampel 2 antigen AI *clade* 2.3.2

Pengenceran	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰
Hasil uji	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

$$\begin{aligned} \text{Sensitifitas:} & \quad \frac{+ \text{ benar}}{+ \text{ benar} + - \text{ palsu}} \times 100 \% \\ : & \quad \frac{4}{4+0} \times 100\% \\ : & \quad 100\% \end{aligned}$$
$$\begin{aligned} \text{Spesifitas:} & \quad \frac{- \text{ benar}}{- \text{ benar}++ \text{ palsu}} \times 100 \% \\ & \quad : \quad \frac{6}{6+0} \times 100 \% \\ & \quad : 100 \% \end{aligned}$$

Tabel 4.12 Lama waktu pengujian sampel 2 antigen AI *clade* 2.3.2

[illegible]

Gambar 4.7 Hasil uji Konvensional PCR sampel 1 antigen AI *clade* 2.1.3

Pengenceran	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰
Hasil uji	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

$$\begin{aligned} \text{Spesifitas: } & \frac{-\text{benar}}{-\text{benar} + \text{palsu}} \times 100 \% \\ : & \frac{8}{8+0} \times 100\% \\ : & 100\% \end{aligned}$$

[illegible]

Gambar 4.8 Hasil uji Konvensional PCR sampel 2 antigen AI *clade* 2.1.3

Pengenceran	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
Hasil uji	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

$$\begin{aligned} \text{Spesifitas: } & \frac{-\text{benar}}{-\text{benar} + \text{palsu}} \times 100 \% \\ & : \frac{8}{8+0} \times 100 \% \\ & : 100 \% \end{aligned}$$

[illegible]

Mengutip dari hasil surveilans yang dilakukan oleh BBVET Wates sejak akhir tahun 2012 hingga 2014 bahwa antibodi dan viral RNA *Clade 2.3.2* terdeteksi 5x lebih tinggi dibanding antibodi dan viral RNA *Clade 2.1.3*. Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa antigen virus Avian Influenza *clade 2.3.2* masih dapat terdeteksi pada pengenceran 10^{-4} , sedangkan *clade 2.1.3* hanya terdeteksi hingga pengenceran 10^{-2} , namun penulis belum membuktikan apakah kadar RNA dalam antigen virus Avian Influenza *clade 2.3.2* lebih tinggi 5x lipat bila dibandingkan dengan kadar RNA dalam antigen virus Avian Influenza *clade 2.1.3*

4.2 Pembahasan

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan ada beberapa hal yang dapat dibahas bahwa ternyata sensitifitas metode *Real Time Polymerase Chain Reaction* dan metode Konvensional *Polymerase Chain Reaction* tidak berbeda nyata dalam mendeteksi virus Avian Influenza. Hal ini terlihat pada hasil uji sampel 1 antigen AI *clade 2.3.2* metode *Real Time* PCR, dimana hasil positif pada pengenceran 10^{-0} (digunakan sebagai kontrol positif), 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} dan 10^{-4} , hasil yang sama ditunjukkan dengan hasil positif pada pengenceran 10^{-0} (digunakan sebagai kontrol positif), 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} dan 10^{-4} terhadap hasil uji sampel 2 antigen AI *clade 2.3.2*.

Selanjutnya hasil uji metode *Real Time* PCR sampel antigen AI *clade 2.3.2* yang telah didapat dibandingkan dengan hasil uji sampel 1 antigen AI *clade 2.3.2* metode Konvensional PCR dimana menunjukkan hasil positif pada pengenceran 10^{-0} (digunakan sebagai kontrol positif), 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} dan 10^{-4} , kemudian dibandingkan juga dengan hasil uji sampel 2 antigen AI *clade 2.3.2* metode

Konvensional PCR dengan hasil positif pada pengenceran 10^{-0} (digunakan sebagai kontrol positif), 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} dan 10^{-4} .

Hasil uji sampel antigen AI clade 2.1.3 metode ¹⁸ *Real Time Polymerase Chain Reaction* dan metode Konvensional *Polymerase Chain Reaction* juga didapatkan hasil tidak berbeda nyata dalam mendeteksi virus *Avian Influenza*. Hal ini terlihat pada hasil uji sampel 1 antigen AI clade 2.1.3 metode *Real Time PCR*, dimana hasil positif pada pengenceran 10^{-0} (digunakan sebagai kontrol positif), 10^{-1} dan 10^{-2} , hasil yang sama ditunjukkan dengan hasil positif pada pengenceran 10^{-0} (digunakan sebagai kontrol positif), 10^{-1} dan 10^{-2} terhadap hasil uji sampel 2 antigen AI clade 2.1.3

Hasil uji metode *Real Time PCR* sampel antigen AI clade 2.1.3 yang telah didapat, kemudian dibandingkan dengan hasil uji metode Konvensional PCR. Hasil uji sampel 1 clade 2.1.3 menunjukkan hasil positif pada pengenceran 10^{-0} (digunakan sebagai kontrol positif), 10^{-1} dan 10^{-2} . Hasil ini dibandingkan juga dengan hasil uji metode Konvensional PCR sampel 2 clade 2.1.3 dengan hasil positif pada pengenceran 10^{-0} (digunakan sebagai kontrol positif), 10^{-1} dan 10^{-2}

Menurut Widayat., dkk. 2019 bahwa ¹¹ *Real Time Polymerase Chain Reaction* atau RT-PCR telah menjadi metode pengujian utama yang memiliki sensitivitas dan spesifitas yang tinggi, serta dapat mendeteksi sampel dalam jumlah yang banyak dan waktu yang singkat. Hasil tersebut sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan bahwa ⁴⁶ metode *Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction* (qRT-PCR) mempunyai sensitifitas dan spesifisitas 100% atau tidak berbeda nyata.

Proses pengujian *Real Time* PCR meliputi tahap ekstraksi, master mix, amplifikasi dan pembacaan membutuhkan waktu 2,5 jam untuk setiap sampel, sedangkan metode Konvensional PCR meliputi tahap ekstraksi, master mix dilanjutkan dengan amplifikasi di mesin *thermal cycler*, elektroforesis dan pembacaan membutuhkan waktu rata-rata 5 jam untuk setiap sampel. Tahapan uji metode konvensional PCR yang lebih Panjang ini mengakibatkan metode ini membutuhkan waktu 2,5 jam lebih lama bila dibandingkan dengan metode *Real Time* PCR. Hal ini sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Kurniawati dkk., 2019 yang menyebutkan bahwa metode PCR Konvensional dengan waktu 5 jam, sedangkan pada metode *Real Time* PCR dengan waktu 2,5 jam.

Jumlah sampel yang dapat dikerjakan dalam sekali *running* sampel, *Real time* PCR jelas lebih banyak, karena dalam satu plate terdapat 96 *well* yang artinya hampir empat kali lipat lebih banyak dari *well* chamber Konvensional PCR untuk proses elektroforesis yang hanya 24 *well*. Kenaikan siklus pada metode *Real Time* PCR dapat diketahui secara semi kuantitatif, sedangkan untuk metode Konvensional PCR hanya mempresentasikan hasil akhir berupa terbentuknya *band*.

Adapun biaya pengujian *Real Time* PCR per sampel lebih mahal sekitar Rp. 25.000 dibanding dengan metode Konvensional PCR, apabila pengujian dilakukan di laboratorium Karantina Pertanian, Hal ini tentunya sebanding dengan beberapa keunggulan yang dimiliki metode *Real Time* PCR, meskipun keduanya memberikan sensitifitas yang sama.

5.1 Kesimpulan

Dari uraian pembahasan di atas dapat disimpulkan bahwa metode uji *Real Time Polymerase Chain Reaction* dan metode Konvensional *Polymerase Chain Reaction* dalam mendeteksi virus *Avian Influenza* memiliki sensitifitas 100 % atau dapat dikatakan tidak berbeda nyata, sehingga keduanya dapat dipergunakan dengan menyesuaikan kebutuhan pengujian terkait dengan lama waktu pengujian metode *Real Time Polymerase Chain Reaction* yang terbukti lebih cepat dan jumlah sampel yang diuji juga lebih banyak, namun dari segi biaya metode ini sedikit lebih mahal, apabila dibandingkan dengan metode konvensional.

5.2 Saran

Demi pengembangan kinerja pengujian PCR agar meminimalisir kontaminasi lingkungan, sebaiknya tahap preparasi, ekstraksi dan master mix dilakukan di dalam *Biosafety Cabinet* / *PCR Laminar Air Flow*. Mengingat sensitifitas bahan/sampel terkait suhu refrigerator / freezer / ruangan, disarankan semua bahan/sampel disimpan sesuai suhu petunjuk penyimpanan. Dalam setiap pengujian harus disertakan kontrol positif sebagai acuan nilai positif dan kontrol negatif untuk menjamin bahwa pengujian yang dilakukan tidak terkontaminasi. Di samping beberapa hal yang telah disebutkan di atas performa alat yang digunakan harus selalu dimonitoring dengan dilakukan perawatan/kalibrasi rutin. Pelatihan atau *workshop* juga sangat diperlukan untuk meningkatkan kompetensi analis.

ORIGINALITY REPORT

30%

SIMILARITY INDEX

27%

INTERNET SOURCES

5%

PUBLICATIONS

17%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1

oby-apt.blogspot.com

Internet Source

2%

2

ejournal.litbang.depkes.go.id

Internet Source

2%

3

www.scribd.com

Internet Source

2%

4

edoc.pub

Internet Source

2%

5

art-kes.blogspot.com

Internet Source

2%

6

repository.ipb.ac.id

Internet Source

2%

7

adoc.tips

Internet Source

2%

8

id.123dok.com

Internet Source

1%

9

eprints.undip.ac.id

Internet Source

1%

10	fatahilla64.blogspot.com Internet Source	1 %
11	Submitted to Universitas Warmadewa Student Paper	1 %
12	Devi Ambarwati Oktavia, Singgih Wibowo. "Penapisan dan Identifikasi Bakteri Lipolitik yang Diisolasi dari Air Limbah Pengolahan Surimi dan Pengalengan Rajungan", Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan, 2017 Publication	1 %
13	avrianie.blogspot.com Internet Source	1 %
14	docplayer.info Internet Source	1 %
15	Submitted to IAIN Batusangkar Student Paper	1 %
16	sidoarjo88.blogspot.com Internet Source	<1 %
17	text-id.123dok.com Internet Source	<1 %
18	Submitted to Universitas Jenderal Soedirman Student Paper	<1 %
19	www.komnasfbpi.go.id Internet Source	<1 %

20	id.scribd.com Internet Source	<1 %
21	mafiadoc.com Internet Source	<1 %
22	repository.unhas.ac.id Internet Source	<1 %
23	pt.scribd.com Internet Source	<1 %
24	Ericka A. Pestana. "Disease Diagnosis Using Real-Time PCR Specific Procedures for Important Veterinary Pathogens", Early rapid and sensitive veterinary molecular diagnostics - real time PCR applications, 2009 Publication	<1 %
25	Submitted to Universitas Sebelas Maret Student Paper	<1 %
26	es.scribd.com Internet Source	<1 %
27	www.unggas-indonesia.com Internet Source	<1 %
28	Submitted to Universitas Islam Indonesia Student Paper	<1 %
29	zairenyayok.blogspot.com Internet Source	<1 %

30

Submitted to Cranfield University

Student Paper

<1 %

31

Isti Koesharyani, Lila Gardenia, Tatik Mufidah, Ayi Santka. "APLIKASI KUANTIFIKASI KOI HERPESVIRUS : REAL TIME – QUANTITATIVE POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-Q PCR) MENGGUNAKAN SYBR GREEN PADA IKAN MAS (Cyprinus carpio)", Media Akuakultur, 2017

Publication

<1 %

32

Siti Nur Arsih, Nony Puspawati, Rizal Maarif Rukmana. "Detection Detection Of Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) On The Patients Of RSUD Dr. Moewardi surakarta Using Culture Method And Polymerase Chain Reaction (PCR)", Biomedika, 2019

Publication

<1 %

33

dandry.files.wordpress.com

Internet Source

<1 %

34

www.docstoc.com

Internet Source

<1 %

35

Submitted to University of Leicester

Student Paper

<1 %

36

nabawitransport.com

Internet Source

<1 %

37	info.medion.co.id Internet Source	<1 %
38	Submitted to SUNY, College at Fredonia Student Paper	<1 %
39	pesquisa.bvsalud.org Internet Source	<1 %
40	digilib.uin-suka.ac.id Internet Source	<1 %
41	www.ncbi.nlm.nih.gov Internet Source	<1 %
42	medpub.litbang.pertanian.go.id Internet Source	<1 %
43	dspace.uii.ac.id Internet Source	<1 %
44	Submitted to Trisakti University Student Paper	<1 %
45	worldwidescience.org Internet Source	<1 %
46	www.aiha.org Internet Source	<1 %
47	journal.ipb.ac.id Internet Source	<1 %
48	Submitted to Univerza v Ljubljani Student Paper	<1 %

<1 %

49

Andi Parenrengi, Alimuddin Alimuddin, Sukenda Sukenda, Komar Sumantadinata, Andi Tenriulo. "KARAKTERISTIK SEKUEN cDNA PENGKODE GEN ANTI VIRUS DARI UDANG WINDU, *Penaeus monodon*", Jurnal Riset Akuakultur, 2016

Publication

<1 %

50

Submitted to IAIN Tulungagung

Student Paper

<1 %

51

www.contohjurnal.net

Internet Source

<1 %

52

e-journal.biologi.lipi.go.id

Internet Source

<1 %

53

Submitted to Surabaya University

Student Paper

<1 %

54

repository.unair.ac.id

Internet Source

<1 %

55

Elril T. Langi, Janno B. B. Bernadus, Greta J. P. Wahongan. "Perbandingan deteksi *Plasmodium falciparum* dengan metode pemeriksaan mikroskopik dan teknik real-time polymerase chain reaction", Jurnal e-Biomedik, 2016

Publication

<1 %

56

Submitted to Universitas Terbuka

Student Paper

<1 %

57

Submitted to Universitas Airlangga

Student Paper

<1 %

58

Submitted to Padjadjaran University

Student Paper

<1 %

59

Submitted to Sekolah Tinggi Sandi Negara

Student Paper

<1 %

Exclude quotes Off

Exclude matches Off

Exclude bibliography On

BAQTI DIYANANINGRUM 12820034

PAGE 1

PAGE 2

PAGE 3

PAGE 4

PAGE 5

PAGE 6

PAGE 7

PAGE 8

PAGE 9

PAGE 10

PAGE 11

PAGE 12

PAGE 13

PAGE 14

PAGE 15

PAGE 16

PAGE 17

PAGE 18

PAGE 19

PAGE 20

PAGE 21

PAGE 22

PAGE 23

PAGE 24

PAGE 25

PAGE 26

PAGE 27

PAGE 28

PAGE 29

PAGE 30
