

Karakterisasi Molekuler dan Studi Filogenetik Virus *African Swine Fever* pada Kejadian Wabah di Sumatera Utara Tahun 2019 - 2023

Molecular Characterization and Phylogenetic Study of African Swine Fever Virus in North Sumatra Outbreaks during 2019 - 2023

Ruben Hasiholan Panggabean^{1,3*}, Ni Luh Putu Ika Mayasari², Faisal³, I Wayan Teguh Wibawan²

¹Program Studi Ilmu Biomedis Hewan Sekolah Pascasarjana Insitut Pertanian Bogor

²Divisi Mikrobiologi Medik Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis Institut Pertanian Bogor

³Laboratorium Biologi Molekuler Balai Veteriner Medan

*Corresponding author, Email: ni_luhma@apps.ipb.ac.id

Naskah diterima: 23 Desember 2023, direvisi: 12 Januari 2024, disetujui: 5 Juli 2024

Abstract

African swine fever is a viral disease that causes hemorrhagic fever in domestic pigs and wild swine worldwide. The first case of ASF in Indonesia was reported in North Sumatra Province in September 2019. A total of 20 archival samples of positive ASF collected from the Animal Disease Investigation Center of Medan during the outbreak investigation took place from 2019 to 2023, were used in this study. This study aims to analyze changes in the character of the ASF virus circulating in North Sumatra Province. The partial B646L gene (p72), the full sequence of the E183L gene (p54) and the central variable region (CVR) of the B602L gene were amplified, purified, then sequenced. Web-based BLAST program and MEGA 7 software were used to analyze the nucleotide sequencing results. The results of molecular and phylogenetic characterization analysis revealed that the ASF virus that infected pigs in North Sumatra Province in 2019-2023 was belonged to genotype II. Analysis of the three genes (B646L, E183L and B602L) did not show changes in the nucleotide and amino acid sequences in the isolates in the last 5 years. No novel variants were found in the CVR gene B602L. CVR analysis showed that these ASF virus strain belonged to subgroup XXXII. The results of this study revealed that the ASF virus in North Sumatra Province has high homology with ASF virus isolates previously detected in China, Vietnam and East Leste in 2019.

Keywords: African swine fever; molecular characterization; North Sumatra; phylogenetic studies

Abstrak

African swine fever merupakan penyakit virus yang menyebabkan demam hemoragik pada babi domestik dan babi liar di dunia. Kasus pertama ASF di Indonesia dilaporkan pada Provinsi Sumatera Utara bulan September 2019. Sebanyak 20 sampel arsip positif ASF hasil koleksi Balai Veteriner Medan selama investigasi wabah berlangsung selama tahun 2019 sampai 2023, digunakan dalam penelitian ini. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis karakter virus ASF yang bersirkulasi di Provinsi Sumatera Utara. Gen B646L parsial (p72), sekuen penuh gen E183L (p54) dan wilayah bervariasi pusat (CVR) dari gen B602L diamplifikasi, dimurnikan, kemudian dilakukan sekuensing. Program BLAST berbasis web dan perangkat lunak MEGA 7 digunakan untuk menganalisis hasil sekuensing nukleotida. Hasil analisis karakterisasi molekuler dan filogenetik menunjukkan bahwa virus ASF yang menginfeksi babi di Provinsi Sumatera Utara tahun 2019-2023 termasuk dalam genotipe II. Analisis ketiga gen (*B646L*, *E183L* dan *B602L*) tidak menunjukkan perubahan sekuen nukleotida dan asam amino pada isolat dalam lima tahun terakhir. Tidak ada varian baru yang ditemukan pada CVR gen *B602L*. Analisis CVR menunjukkan bahwa *strain* virus ASF ini termasuk dalam subkelompok XXXII. Hasil penelitian ini mengungkapkan bahwa virus ASF di Provinsi Sumatera Utara memiliki homologi

yang tinggi dengan isolat virus ASF yang terdeteksi sebelumnya di negara China, Vietnam dan Timor Leste pada tahun 2019.

Kata kunci: *African swine fever*; karakterisasi molekuler; studi filogenetik; Sumatera Utara

Pendahuluan

Babi adalah salah satu sumber dari komoditi ekspor bidang peternakan yang mempunyai pangsa pasar cukup tinggi di Indonesia. Keberhasilan peternakan babi terletak dalam penguasaan pola manajemen, seperti perkandangan, pengendalian penyakit, pakan, dan pemasaran. Salah satu faktor yang menentukan keberhasilan usaha pengembangan ternak babi dari aspek manajemen adalah faktor kesehatan atau pengendalian penyakit. Ternak babi sangat peka dan rentan terhadap penyakit. Penyakit pada babi dapat menyebabkan kerugian ekonomi karena mortalitas dan morbiditas tinggi, mempengaruhi laju pertumbuhan, konversi makanan yang buruk, peningkatan biaya pengobatan dan gangguan kelanjutan produksi.

Salah satu penyakit infeksius yang menyerang ternak babi adalah penyakit demam babi Afrika (*African Swine Fever*). Wabah penyakit *African Swine Fever* (ASF) secara internasional dilaporkan pada akhir tahun 2018. Penyakit ASF dilaporkan mewabah di seluruh dataran Cina pada bulan Agustus tahun 2018 dan menjadi ancaman utama industri babi pada wilayah tersebut (Cheng dan Ward 2021). Penyakit ini menyebabkan tingkat mortalitas dan morbiditas yang tinggi pada peternakan babi, baik sektor peternakan rakyat (*backyard farm*) maupun peternakan komersial. Penyebaran penyakit ini sangat cepat melintasi berbagai negara bahkan mampu melewati batas alami geografi dalam waktu yang relatif sehingga penyakit ini sulit untuk dibendung. Penyakit akibat infeksi virus ASF menyebar secara masif dari Cina masuk ke wilayah Asia Tenggara pada awal tahun 2019 di Vietnam (Le *et al.*, 2019).

Organisasi Kesehatan Hewan Dunia (*World Organization of Animal Health: WOA*) melalui *Immediate Notification* pada bulan September 2019, menyatakan telah terjadi wabah *African Swine Fever* di Indonesia, yaitu pada 16 kabupaten / kota di Provinsi Sumatera Utara (OIE 2019). Angka kematian babi yang tinggi

serta masifnya penyebaran virus *African Swine Fever* mengakibatkan Kementerian Pertanian mengeluarkan Surat Keputusan No 820/KPTS/PK.320/M/12/2019 tentang Pernyataan Wabah Penyakit Demam Babi Afrika (*African Swine Fever*) di beberapa Kabupaten/Kota di Provinsi Sumatera Utara. Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan melaporkan bahwa sampai bulan Agustus 2020, virus ASF telah menginfeksi 82% wilayah Kabupaten/Kota di Provinsi Sumatera Utara dengan total kematian ternak babi sebesar 112.441 ekor (iSIKHNAS 2020). Kematian babi ini didominasi oleh jenis babi domestik pada peternakan rakyat yang bersifat *backyard farm*, disebabkan karena rendahnya pemahaman dan penerapan biosekuriti kandang.

Provinsi Sumatera Utara merupakan daerah dengan kejadian wabah virus ASF pertama di Indonesia. Beberapa upaya pengendalian dan pencegahan telah dilaksanakan melalui penerapan biosekuriti yang ketat, bantuan obat-obatan dan peningkatan sumber daya peternak. Kasus kematian babi akibat infeksi virus ASF sudah mulai berkurang pada pertengahan tahun 2021, namun kembali mewabah pada akhir tahun 2022 dengan laporan jumlah kematian babi berkisar 2000 ekor di Kabupaten Deli Serdang.

Hingga saat ini, data sekuen virus ASF di Indonesia masih sangat terbatas dan menyebabkan data tentang genotipe virus yang beredar di Indonesia khususnya di Sumatera Utara juga rendah. Hal ini sesuai dengan penelitian Primatika *et al.*, 2021, bahwa analisis sekuen nukleotida virus ASF sudah pernah dilakukan, namun belum tersedia banyak di publikasi ilmiah. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi, mengkarakterisasi dan menganalisis hubungan kekerabatan genetik melalui analisis filogenetik virus ASF yang beredar di Provinsi Sumatera Utara tahun 2019-2023. Protein p72 merupakan protein mayor kapsid yang menutupi masa virion ASF 31-33% sehingga digunakan sebagai genom

marker untuk deteksi genotipe ASF (Wang *et al.*, 2021). Namun dibutuhkan beberapa gen struktural lain yang bertujuan untuk meningkatkan resolusi genotipik ASF. Beberapa studi mengindikasikan bahwa penggunaan tiga *region* (wilayah) DNA virus ASF, yakni protein p72, p54 dan CVR (*central variable region*) untuk mengkaraktisasi virus ASF cukup memadai dibandingkan penanda lain (Gallardo 2011; Mazloun *et al.*, 2023).

Materi dan Metode

Penelitian ini dilaksanakan di Balai Veteriner Medan (BVet Medan). Pengujian sampel dan pengolahan data dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler Balai Veteriner Medan. Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan Juni sampai Desember 2023. Bahan yang digunakan adalah kit ekstraksi *DNeasy Blood & TissueTM* (Qiagen, Germany), kit *Mastermix 2x Universal Taqman Polymerase*, kit *Mastermix MyTaqTM HS red Mix Kit (Genotyping Kit)*, *agarose gel*, *Syber Safe DNA Gel Stain*, *DNA Ladder 100 bp*, *1x TAE buffer* dan pasangan primer dan *probe* untuk deteksi ASF (King *et al.*, 2003), serta pasangan primer untuk *genotyping* gen target (p72, p54 dan CVR).

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari sampel arsip positif ASF hasil koleksi Balai Veteriner Medan selama wabah berlangsung. Sampel yang digunakan berjumlah 20 yang terdiri atas 8 sampel organ limpa dan 12 darah EDTA dari babi yang mati akibat infeksi akut virus ASF di Provinsi Sumatera Utara tahun 2019 sampai 2023.

Pengujian sampel dilakukan dengan *real-time* PCR (qPCR) untuk deteksi ASF. Langkah pertama pengujian dimulai dengan mengekstraksi DNA dari sampel organ limpa dan darah babi dengan kit ekstraksi *DNeasy Blood & TissueTM* (Qiagen, Germany), penggunaan sesuai rekomendasi manufaktur. Langkah kedua adalah proses amplifikasi PCR. Amplifikasi virus ASF dengan qPCR dilakukan menggunakan penanda gen VP72 sesuai standar yang direkomendasikan WOH (2021). *Forward primer* yang digunakan yaitu 5'-CTGCTCATGGTATCAATCTTATCGA-3' (*positive strand*) dan *reverse primer* 5'-GATACCACAAGATCRGCCGT-3'

(*negative strand*) serta *fluorosen probe* sebagai berikut ([6-*carboxy-fluorescein* (FAM)] 5'-CCACGGGAGGAATACCAACCCAGTG-3' [6-*carboxytetramethylrhodamine* (TAMRA)]) (King *et al.*, 2003).

Komponen *master-mix* menggunakan kit *TaqMan Universal* dengan komposisi satu kali reaksi dengan total volume 25 µl yang terdiri dari *nuclease free water* 5 µl, *2x Taqman Universal* 12 µl, pasangan primer *forward* dan *reverse* dengan konsentrasi 18 pmol/µl sebanyak masing-masing 1 µl, *primer probe* dengan konsentrasi 5 pmol/µl, sebanyak 1 µl, serta DNA *template* sebanyak 5 µl. Tahapan amplifikasi qPCR DNA dilakukan menggunakan mesin *real-time* PCR ABI 7500TM dengan pre denaturasi 50 °C selama 2 menit, 45 × (denaturasi 95 °C selama 10 menit, diikuti dengan *annealing* 95 °C selama 15 detik dan 60 °C selama 1 menit) serta *hold* dalam suhu 4 °C. Hasil pembacaan ditampilkan dalam bentuk kurva amplifikasi dengan ambang batas nilai Ct (*cycle threshold*) < 38 dinyatakan sebagai positif virus ASF, sedangkan hasil negatif ditunjukkan dengan nilai Ct > 40; dengan nilai *cutoff* 0,1 (WOAH 2021).

Genotyping virus ASF dilakukan dengan menggunakan tiga gen penanda protein struktural yaitu gen *B646L* dan *E183L*, dan gen *B602L* yang merupakan wilayah bervariasi terpusat (CVR). Amplifikasi gen *B646L* yang mengkode wilayah terminal akhir (*C-end terminal*) protein p72 menggunakan dengan pasangan primer *forward* P72-U dan *reverse* P72-D dengan panjang amplicon 478 bp yang terletak pada posisi basa 86793 dan 88733 (Bastos *et al.*, 2003). Amplifikasi gen *E183L* yang mengkode protein p54 menggunakan pasangan primer *forward* PPA722 dan *reverse* PPA89 dengan panjang amplicon 676 bp yang terletak pada posisi basa 145413 dan 145964 (Gallardo *et al.*, 2009). Untuk meningkatkan resolusi genotipik ASF dengan tujuan mengkategorikan virus ASF dalam subgenotipe tertentu, dilakukan dengan mengamplifikasi wilayah variabel pusat (*central variable region*: CVR) pada gen *B602L* dengan pasangan primer *forward* ORF9L-R dan *reverse* ORF9L-R dengan panjang amplicon 233 bp (Nix *et al.*, 2006). Pasangan primer yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat dalam Tabel 1 di bawah.

Tabel 1. Primer gen sekuensing virus ASF

Gen. Target	Primer	Sekuen (5'-3')	Ukuran	Referensi
B646L	P72-U	GGCACAAGTTCGGACATGT	478 bp	Bastos et al. 2003
	P72-D	GTAAGTGAACGCAGCACAG		
E183L	PPA722	CGAAGTGCATGTAATAAACGTC	676 bp	Gallardo et al. 2009
PPA89				
B602L	ORF9L	AATGCGCTCAGGATCTGTAAATCGG	bervariasi	Nix et al. 2006
ORF9L		TCTTCATGCTCAAAGTGCGTATACCT		

Mastermix genotyping ASF menggunakan kit *MyTaq™ HS Mix* dengan komposisi satu kali reaksi, yaitu *nuclease free water* 6 µl, *MyTaq Enzyme* 12,5 µl, pasangan *forward* dan *reverse* primer dengan konsentrasi 0,2 pmol/µl masing-masing sebanyak 1 µl, serta DNA *template* sebanyak 5 µl. Total volume untuk satu reaksi adalah 25 µl.

Proses amplifikasi ketiga gen penanda ini dilakukan dalam mesin *thermalcycler* BioRad™. Amplifikasi gen *B646L* (p72) dan *B602L* (CVR) dilakukan menggunakan program suhu pre denaturasi 95 °C selama 1 menit, diikuti dengan 35 x (denaturasi pada suhu 95 °C selama 15 detik, *annealing* pada suhu 55 °C selama 15 detik, dan ekstensi pada suhu 72 °C selama 10 detik), serta *hold* dalam suhu 4 °C (Bastos et al., 2003, dan Nix et al., 2006). Amplifikasi gen *E183L* (p54) dilakukan dengan menggunakan program suhu pre denaturasi 95 °C selama 2,5 menit, diikuti dengan 35 x (denaturasi pada suhu 95 °C selama 15 detik, *annealing* pada suhu 55 °C selama 15 detik, dan ekstensi pada suhu 72 °C selama 10 detik, serta *hold* dalam suhu 4 °C (Gallardo et al., 2009).

Tahap visualisasi produk hasil amplifikasi dilanjutkan dengan elektroforesis pada *agarose gel* 1%, dengan DNA *ladder* 100bp sebagai *marker* dalam buffer 1x *Tris-Acetic acid-EDTA* (TAE) mengandung 0,5 µg/ml *syber green* pada mesin elektroforesis selama 60 menit. Pita hasil elektroforesis didokumentasikan menggunakan *UV Gel Imager*.

Hasil amplifikasi positif terhadap protein p72, p54 dan CVR selanjutnya dilakukan sekuensing nukleotida. Sekuensing dilakukan dengan metode *dideoxynucleotide Sanger Sequencing* menggunakan *Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Life Technologies) menggunakan primer dari segmen terminus

akhir gen *B646L* (P72-U dan P72-D), sekuen utuh (*full length*) gen *E183L* (PPA722 dan PPA89), serta CVR gen *B602L* (*ORF9L* dan *ORF9R*) (Tabel 1).

Data dianalisis secara deskriptif untuk menggambarkan hasil karakterisasi dan studi filogenetik virus ASF dari sampel yang dikoleksi selama tahun 2019 sampai 2023. Untuk analisis similaritas data dan hasil sekuensing dianalisis menggunakan perangkat lunak *BioEdit™* v.7.2 untuk penjejakan sekuens nukleotida sampel (Hall 2011). Kemiripan sekuens nukleotida sampel dengan data referensi di *GenBank*, dianalisis menggunakan *Standard Nucleotide BLAST* (*The Basic Alignment Search Tools*) dari situs *The National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Pohon filogenetik direkonstruksi menggunakan program perangkat lunak MEGA 7® (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (Tamura et al., 2021). Analisa sekuen gen *B646L* (p72) dan *E183L* (p54) dilakukan dengan menggunakan metode *neighbor-joining* dan *maximum-composite-likelihood*, serta secara statistik dievaluasi dengan metode *bootstrap* 1000 kali replikasi. Sekuen nukleotida gen *B602L* (CVR) diterjemahkan menjadi asam amino menggunakan situs *Expasy translate tool* (<https://web.expasy.org/translate/>) dengan pengaturan standar (*default*), yang selanjutnya dilakukan penjejakan nukleotida protein.

Hasil dan Pembahasan

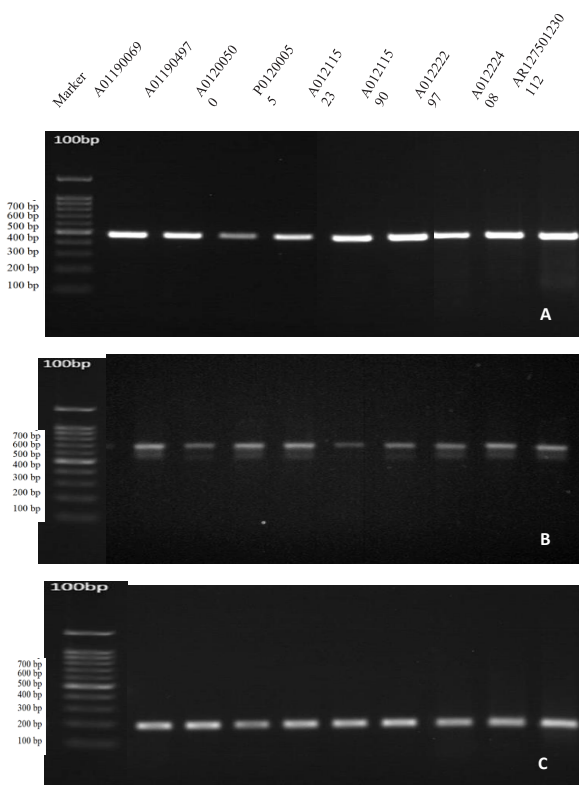
Sebanyak 20 sampel arsip positif virus ASF yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari sembilan kabupaten/kota di Provinsi Sumatera Utara yang mengalami wabah ASF dari tahun 2019-2023 (Tabel 2). Berdasarkan hasil investigasi lapangan, sampel berasal dari babi domestik yang mati dengan menunjukkan

gejala klinis dan ada yang sudah mati. Gejala klinis yang terlihat seperti demam tinggi (41-42 °C), anoreksia, letargi, gejala pernapasan dan gastrointestinal, sianosis pada kulit, ataksia serta perdarahan pada hidung dan mulut (Gambar 1). Delapan sampel darah utuh (EDTA) dikoleksi dari babi yang masih hidup sebelum mati, dan 12 organ limpa dikoleksi dari babi yang sudah mati, kemudian didistribusikan dengan rantai dingin sampai ke laboratorium.



Gambar 1. Babi yang menunjukkan gejala klinis akibat infeksi virus ASF. (A) Demam tinggi, letargi, anoreksia, sianosis kulit. (B) Organ limpa mengalami pembesaran yang dikoleksi dari babi mati akibat infeksi virus ASF (dokumentasi pribadi).

Berdasarkan hasil uji qPCR menunjukkan keseluruhan sampel berhasil dideteksi genom virus ASF dengan nilai *cycle threshold* (Ct) *values* dalam rentang antara 20,47 sampai 37,63



Gambar 2. Sembilan sampel yang diuji menunjukkan pita tunggal sesuai target : (A) gen B646L (p72) sebesar 478 bp, (B) gen E183L (p54) sebesar 670 bp dan 180 bp), dan (C) gen B602L (CVR).

(Tabel 2). Sebanyak sembilan sampel yang menunjukkan nilai Ct yang cukup baik, yakni < 25 dan mewakili setiap tahun dari koleksi dilanjutkan sekuensing untuk mengetahui urutan nukleotida virus. Keseluruhan sampel kemudian dilanjutkan dengan *genotyping*. Pengujian konvensional PCR digunakan untuk mengamplifikasi tiga *region* (wilayah) DNA virus ASF, yakni gen B646L dengan panjang 478 bp, gen E183L dengan panjang 676 bp dan gen B602L. Hasil elektroforesis masing-masing gen menunjukkan pita sesuai dengan panjang gen target (Gambar 2).

Penelitian ini menganalisis tiga gen yaitu gen B646L (p72), gen E183L (p54) dan B602L (CVR) menggunakan metode sekuensing. Protein p72 merupakan protein struktural kapsid utama yang menutupi 31-33% dari massa virion ASF, yang digunakan sebagai antigen mayor untuk mengklasifikasikan genotipe strain ASFV karena sifatnya yang konservatif atau lestari (Revilla *et al.*, 2018) dan relatif stabil (Qu *et al.*, 2022). Protein p72 berfungsi untuk membantu perlekatan virus dengan reseptor inang pada proses endositosis (Wang *et al.*, 2021 dan Hernandez *et al.*, 2016). Berdasarkan analisa secara parsial pada bagian terminus akhir wilayah sekuen protein p72 (Bastos *et al.*, 2003), sebanyak 24 genotipe ASF berhasil diidentifikasi sampai saat ini, dengan genotipe terakhir ditemukan di Ethiopia (Alkhamis *et al.*, 2018). Sebuah pohon filogeni yang dibentuk berdasarkan sekuen nukleotida yang sudah disejajarkan dapat digunakan untuk menentukan genotipe baru dari sebuah sampel (Mazloun *et al.*, 2023).

Analisa filogenetik secara parsial pada bagian terminus akhir wilayah sekuen gen B646L (p72) menunjukkan bahwa virus ASF yang bersirkulasi di Provinsi Sumatera Utara tahun 2019-2023 termasuk dalam genotipe II (Gambar 3). Hasil analisis filogenetik virus ASF berdasarkan metode *Neighbor-Joining* dengan Kimura 2-*parameter* + G pada studi ini menunjukkan kesamaan level nukleotida (nu) dan asam amino (aa) sebesar 83% identik pada keseluruhan sampel, dengan isolat virus ASF yang menyerang di negara Eropa, Asia dan Asia Tenggara((ASF/China/GX/2019/01), di Eropa (ASF/Georgia/2007) beberapa negara

Tabel 2. Informasi mengenai hasil *real-time* PCR (qPCR) dan *genotyping*

No	Nama Isolot	Tahun Koleksi	Jenis Sampel	Asal Sampel (Kab/ Kota)	qPCR (P72)		PCR Genotyping			Sequencing			Gene Bank Accession Number		
					Hasil	Nilai Ct	P72	P54	CVR	Sequencing	P72	P54	CVR		
1	ASF/Indo/Pig/North Sumatera/ A01190069/2019	2019	Limpa	Humbang Hasundutan	+	22,41	+	+	+	✓	OR428151	OR539714	OR453788		
2	ASF/Indo/Pig/North Sumatera/ A01190497/2019	2019	Limpa	Simalungun	+	20,47	+	+	+	✓	OR428152	OR539715	OR453789		
3	ASF/Indo/Pig/North Sumatera/ A01200500/2020	2020	Limpa	Serdang Bedagai	+	23,84	+	+	+	✓	OR428153	OR539716	OR453790		
4	ASF/Indo/Pig/North Sumatera/ A01200037/2020	2020	Darah EDTA	Labuhan Batu Utara	+	29,41	+	+	+	-	-	-	-		
5	ASF/Indo/Pig/North Sumatera/ P01200043/2020	2020	Darah EDTA	Deli Serdang	+	30,82	+	+	+	-	-	-	-		
6	ASF/Indo/Pig/North Sumatera/ P01200055/2020	2020	Limpa	Medan	+	21,36	+	+	+	✓	OR428154	OR539717	OR453796		
7	ASF/Indo/Pig/North Sumatera/ A01200090/2020	2020	Darah EDTA	Langkat	+	33,7	+	+	+	-	-	-	-		
8	ASF/Indo/Pig/North Sumatera/ A01211523/2021	2021	Limpa	Serdang Bedagai	+	24,62	+	+	+	✓	OR428155	OR539718	OR453791		
9	ASF/Indo/Pig/North Sumatera/ A01211590/2021	2021	Limpa	Serdang Bedagai	+	20,14	+	+	+	✓	OR428156	OR539719	OR453792		
10	ASF/Indo/Pig/North Sumatera/ P01211961/2021	2021	Darah EDTA	Deli Serdang	+	31,54	+	+	+	-	-	-	-		
11	ASF/Indo/Pig/North Sumatera/ A01221456/2022	2022	Darah EDTA	Sibolga	+	36,11	+	+	+	-	-	-	-		
12	ASF/Indo/Pig/North Sumatera/ A01221952/2022	2022	Darah EDTA	Simalungun	+	37,63	+	+	+	-	-	-	-		
13	ASF/Indo/Pig/North Sumatera/ A01222297/2022	2022	Limpa	Deli Serdang	+	21,58	+	+	+	✓	OR428157	OR539720	OR453793		
14	ASF/Indo/Pig/North Sumatera/ A01222408/2022	2022	Limpa	Humbang Hasundutan	+	24,98	+	+	+	✓	OR428158	OR539722	OR453794		
15	ASF/Indo/Pig/North Sumatera/ A01222330/2022	2022	Darah EDTA	Deli Serdang	+	29,03	+	+	+	-	-	-	-		
16	ASF/Indo/Pig/North Sumatera/ A01222447/2022	2022	Darah EDTA	Asahan	+	28,93	+	+	+	-	-	-	-		
17	ASF/Indo/Pig/North Sumatera/ A01222315/2022	2022	Darah EDTA	Medan	+	32,47	+	+	+	-	-	-	-		
18	ASF/Indo/Pig/North Sumatera/ P0122272/2022	2022	Darah EDTA	Medan	+	34,05	+	+	+	-	-	-	-		
19	ASF/Indo/Pig/North Sumatera/ AR127501230112/2023	2023	Darah EDTA	Asahan	+	24,32	+	+	+	✓	OR428159	OR539721	OR453795		
20	ASF/Indo/Pig/North Sumatera/ AR127501230114/2023	2023	Darah EDTA	Simalungun	+	30,07	+	+	+	-	-	-	-		

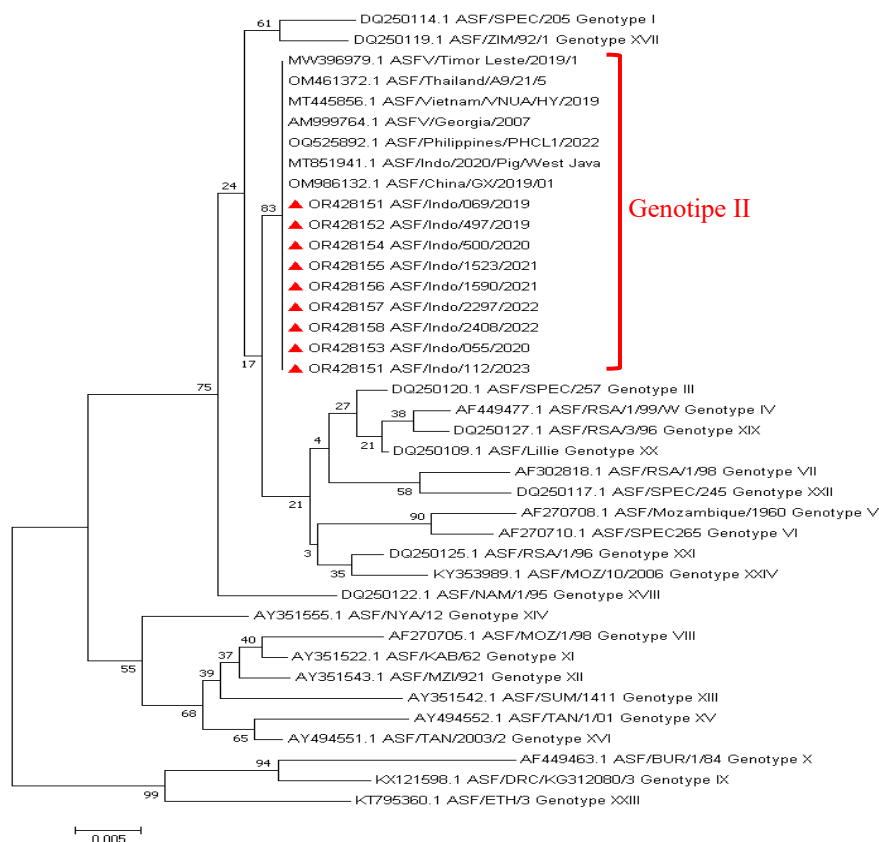
ASEAN (ASF /Vietnam/VNUA/HY/2019; ASF/Thailand/A9/21/5; ASF/Philippines/PHCL/2022; dan ASFV/Timor Leste/2019)), yang diikutkan dalam analisis studi ini.

Hasil ini sesuai dengan penelitian sebelumnya bahwa jenis genotipe ASF yang bertanggung jawab menimbulkan wabah di beberapa wilayah di Asia dan Asia Tenggara adalah ASF genotipe II (Qu *et al.*, (2022)). Hasil yang sama juga dilaporkan oleh Dharmayanti *et al.*, pada tahun 2021. Namun, penelitian ini tidak mengungkapkan perkembangan virus dari tahun ke tahun, mengingat penyakit ini masih mewabah di beberapa wilayah di Indonesia. Oleh karena itu, perlu dilakukan karakterisasi isolat ASF secara terus-menerus selama wabah penyakit untuk lebih memahami pola wabah penyakit ASF dan memetakan genotipe virus di wilayah geografis di mana virus tersebut beredar. Informasi mengenai isolat yang mewakili seluruh 24 genotipe ASF, serta nomor

aksesi berikutnya yang diperoleh dari *GenBank*, disajikan pada Gambar 3.

Penggunaan protein p72 sebagai *genom marker* penting membedakan virus ASF dalam beberapa genotipe, namun tidak memberikan hasil resolusi *typing* yang cukup atau kemampuan untuk membedakan antara virus dari genotipe biologis yang berbeda, terutama bila diterapkan pada populasi genotipe II yang saat ini beredar di Eurasia (Malogolovkin *et al.*, (2015)). Limitasi ini memerlukan penggunaan wilayah genetik alternatif dari genom virus, yang terdiri dari banyak variasi untuk membedakan lebih jauh sampel virus ASF baru dalam genotipe II (Qu *et al.*, (2023)).

Resolusi genotipik (*genotypic resolution*) dan karakterisasi genetik dengan tujuan mengklasifikasikan virus ASF telah dilakukan dengan penambahan beberapa gen target, salah satunya adalah gen *E183L* yang mengkode protein p54 (Gallardo *et al.*, (2009) dan wilayah



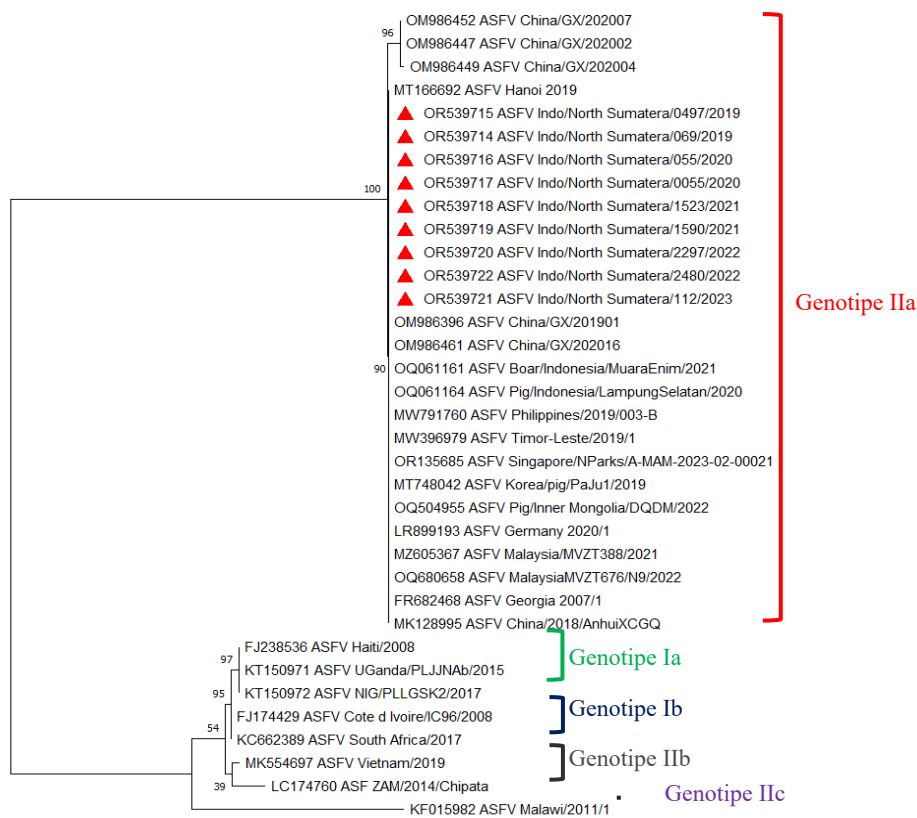
Gambar 3. Pohon filogenetik dibentuk berdasarkan sekuen parsial nukleotida gen B6464L(p72). Sejarah evolusi disimpulkan oleh metode *Neighbor-Joining* berdasarkan Kimura 2-*parameter* + G sebagai model terbaik dengan menggunakan *software* Mega XI®. Pohon filogeni disimpulkan dengan 1.000 kali replikasi *bootstrap*, dan nilai node menunjukkan persentase dukungan *bootstrap*. Sampel ASF dari Provinsi Sumatera Utara dikelompokkan dalam genotipe II, dan ditandai dengan lambang segitiga merah ().

variabel terpusat (*central variable region*, CVR) pada gen B602L (Nix *et al.*, 2006). Protein p54 adalah salah satu protein struktural pada amplop bagian dalam virus (*inner envelope*) yang membantu untuk proses perlekatan virus dan bersama dengan protein p72 yang menetralkan antibodi dengan memblokir perlekatan virus ASF dengan makrofag (Wang *et al.*, 2021). Protein p54 digunakan sebagai protein tambahan untuk menganalisa hubungan epidemiologi virus ASF dalam level subgenotipe (Gallardo 2009).

Analisis sekuen utuh gen *E183L* yang mengkode protein p54 pada studi ini mengkonfirmasi bahwa virus ASF yang menyebabkan wabah di beberapa wilayah di Provinsi Sumatera Utara pada tahun 2019 sampai 2023, termasuk dalam subgenotipe IIa (Gambar 4). Hasil analisa pohon filogenetik berdasarkan metode *Maximum - Likelihood* dengan Kimura 2-parameter, menunjukkan kesamaan karakter nukleotida 90-96% homolog dengan beberapa isolat virus ASF yang menyerang beberapa

negara di Eurasia. Hal ini menunjukkan bahwa hasil *genotyping* sekuen nukleotida dengan gen *B646L* (p72) dan *E183L* (p54) menghasilkan genotipe yang sama untuk strain virus ASF yang bersirkulasi di Provinsi Sumatera Utara.

Virus ASF tergolong dalam virus DNA nukleositoplasma besar (*nucleocytoplasmic large DNA viruses*: NCLDV) yang memiliki wilayah variabel pusat (*CVR*) dengan ukuran sekitar 400 bp dalam genom utuh yang relatif lestari, dan stabil secara evolusioner (Qu *et al.*, 2022). Peningkatan resolusi genotipik virus ASF telah dilakukan dengan melakukan menganalisis CVR pada gen *B602L* (Gallardo *et al.*, 2009). Hal ini ditunjukkan dalam analisis jumlah dan komposisi tetramer asam amino berulang (*tandem repeat sequences*: TRS) dalam CVR yang mungkin berguna untuk mengidentifikasi dan mengelompokkan isolat ASF. Analisa CVR membantu memberikan penjelasan mengenai introduksi epidemiologi virus ASF secara kontinu dalam suatu wilayah (Nix *et al.*, 2006).



Gambar 4. Pohon filogenetik dibentuk berdasarkan sekuen utuh nukleotida gen *E183L*(p54). Kekerabatan ditelusuri dengan metode *Maximum - Likelihood* berdasarkan parameter Kimura-2 sebagai model terbaik dengan menggunakan *software* Mega XI[®]. Pohon filogeni disimpulkan dengan 1.000 kali replikasi *bootstrap*, dan nilai node menunjukkan persentase dukungan *bootstrap*. Sampel ASF dari Provinsi Sumatera Utara dikelompokkan dalam genotipe IIa, dan ditandai dengan lambang segitiga merah (▲).

Accession No. / Isolate	Linise terminus	R	N	D	R	N	D	R	N	A	A	Carboxy terminus																																																																				
1. ASF Indo089/2019	-----	L	H	A	S	A	Y	T	C	A	D	T	N	V	D	T	C	A	S	M	C	A	D	T	N	V	D	T	C	A	S	T	C	T	S	T	E	Y	T	D	L	T	P	E	R																																			
2. ASF Indo0497/2019	-----	L	H	A	S	A	Y	T	C	A	D	T	N	V	D	T	C	A	S	M	C	A	D	T	N	V	D	T	C	A	S	T	C	T	S	T	E	Y	T	D	L	T	P	E	R																																			
3. ASF Indo500/2020	-----	L	H	A	S	A	Y	T	C	A	D	T	N	V	D	T	C	A	S	M	C	A	D	T	N	V	D	T	C	A	S	T	C	T	S	T	E	Y	T	D	L	T	P	E	R																																			
4. ASF Indo055/2020	-----	L	H	A	S	A	Y	T	C	A	D	T	N	V	D	T	C	A	S	M	C	A	D	T	N	V	D	T	C	A	S	T	C	T	S	T	E	Y	T	D	L	T	P	E	R																																			
5. ASF Indo1523/2021	-----	L	H	A	S	A	Y	T	C	A	D	T	N	V	D	T	C	A	S	M	C	A	D	T	N	V	D	T	C	A	S	T	C	T	S	T	E	Y	T	D	L	T	P	E	R																																			
6. ASF Indo1590/2021	-----	L	H	A	S	A	Y	T	C	A	D	T	N	V	D	T	C	A	S	M	C	A	D	T	N	V	D	T	C	A	S	T	C	T	S	T	E	Y	T	D	L	T	P	E	R																																			
7. ASF Indo2291/2022	-----	L	H	A	S	A	Y	T	C	A	D	T	N	V	D	T	C	A	S	M	C	A	D	T	N	V	D	T	C	A	S	T	C	T	S	T	E	Y	T	D	L	T	P	E	R																																			
8. ASF Indo2480/2022	-----	L	H	A	S	A	Y	T	C	A	D	T	N	V	D	T	C	A	S	M	C	A	D	T	N	V	D	T	C	A	S	T	C	T	S	T	E	Y	T	D	L	T	P	E	R																																			
9. ASF Indo112/2023	-----	L	H	A	S	A	Y	T	C	A	D	T	N	V	D	T	C	A	S	M	C	A	D	T	N	V	D	T	C	A	S	T	C	T	S	T	E	Y	T	D	L	T	P	E	R																																			
10. MK128995 ASF China/2018/Anhui/CXGQ	-----	L	H	A	S	A	Y	T	C	A	D	T	N	V	D	T	C	A	S	M	C	A	D	T	N	V	D	T	C	A	S	T	C	T	S	T	E	Y	T	D	L	T	P	E	R																																			
11. MN393477 ASF Wuhan 2019	-----	L	H	A	S	A	Y	T	C	A	D	T	N	V	D	T	C	A	S	M	C	A	D	T	N	V	D	T	C	A	S	T	C	T	S	T	E	Y	T	D	L	T	P	E	R																																			
12. UV01936 1 ASF Vietnam 2019	V	N	T	I	L	S	I	A	D	S	C	K	T	Q	T	Q	K	S	K	E	A	K	T	I	D	S	F	L	R	H	F	V	F	D	P	N	L	H	A	S	A	Y	T	C	A	D	T	N	V	D	T	C	A	S	M	C	A	D	T	N	V	D	T	C	A	S	T	C	T	S	T	E	Y	T	D	L	T	P	E	R
13. NT445957 ASF VNI/A/HY-ASF3 2020	V	N	T	I	L	S	I	A	D	S	C	K	T	Q	T	Q	K	S	K	E	A	K	T	I	D	S	F	L	R	H	F	V	F	D	P	N	L	H	A	S	A	Y	T	C	A	D	T	N	V	D	T	C	A	S	M	C	A	D	T	N	V	D	T	C	A	S	T	C	T	S	T	E	Y	T	D	L	T	P	E	R
14. MN631140 ASF Korea/Pju/Pju/1/2019	V	N	T	I	L	S	I	A	D	S	C	K	T	Q	T	Q	K	S	K	E	A	K	T	I	D	S	F	L	R	H	F	V	F	D	P	N	L	H	A	S	A	Y	T	C	A	D	T	N	V	D	T	C	A	S	M	C	A	D	T	N	V	D	T	C	A	S	T	C	T	S	T	E	Y	T	D	L	T	P	E	R
15. ACD12706 1 ASF Georgia 2007	V	N	T	I	L	S	I	A	D	S	C	K	T	Q	T	Q	K	S	K	E	A	K	T	I	D	S	F	L	R	H	F	V	F	D	P	N	L	H	A	S	A	Y	T	C	A	D	T	N	V	D	T	C	A	S	M	C	A	D	T	N	V	D	T	C	A	S	T	C	T	S	T	E	Y	T	D	L	T	P	E	R
16. WFG61331 1 ASF Serbia/SR9/2021/3382	V	N	T	I	L	S	I	A	D	S	C	K	T	Q	T	Q	K	S	K	E	A	K	T	I	D	S	F	L	R	H	F	V	F	D	P	N	L	H	A	S	A	Y	T	C	A	D	T	N	V	D	T	C	A	S	M	C	A	D	T	N	V	D	T	C	A	S	T	C	T	S	T	E	Y	T	D	L	T	P	E	R
17. LS478113 1 ASF Estonia 2014	V	N	T	I	L	S	I	A	D	S	C	K	T	Q	T	Q	K	S	K	E	A	K	T	I	D	S	F	L	R	H	F	V	F	D	P	N	L	H	A	S	A	Y	T	C	A	D	T	N	V	D	T	C	A	S	M	C	A	D	T	N	V	D	T	C	A	S	T	C	T	S	T	E	Y	T	D	L	T	P	E	R
18. MZ509435 ASF India 2021	V	N	T	I	L	S	I	A	D	S	C	K	T	Q	T	Q	K	S	K	E	A	K	T	I	D	S	F	L	R	H	F	V	F	D	P	N	L	H	A	S	A	Y	T	C	A	D	T	N	V	D	T	C	A	S	M	C	A	D	T	N	V	D	T	C	A	S	T	C	T	S	T	E	Y	T	D	L	T	P	E	R
19. OQ680659 ASF Malaysia 2023	V	N	T	I	L	S	I	A	D	S	C	K	T	Q	T	Q	K	S	K	E	A	K	T	I	D	S	F	L	R	H	F	V	F	D	P	N	L	H	A	S	A	Y	T	C	A	D	T	N	V	D	T	C	A	S	M	C	A	D	T	N	V	D	T	C	A	S	T	C	T	S	T	E	Y	T	D	L	T	P	E	R
20. MW396979 ASF Timor Leste 2019	V	N	T	I	L	S	I	A	D	S	C	K	T	Q	T	Q	K	S	K	E	A	K	T	I	D	S	F	L	R	H	F	V	F	D	P	N	L	H	A	S	A	Y	T	C	A	D	T	N	V	D	T	C	A	S	M	C	A	D	T	N	V	D	T	C	A	S	T	C	T	S	T	E	Y	T	D	L	T	P	E	R

Gambar 5. Hasil penjejarian sekuen CVR isolat virus ASF yang telah diterjemahkan menjadi asam amino di Provinsi Sumatera Utara pada sekuen baris 1 sampai 9 menunjukkan kesamaan dengan beberapa isolat virus ASF genotipe II pada beberapa negara di Eropa, Asia dan Asia Tenggara.

Beberapa peneliti telah menemukan bahwa ukuran amplicon CVR dapat bervariasi (180-686 bp), tergantung dari isolat ASF yang bersirkulasi di lapangan (Boschoff *et al.*, 2007 dan Phologane *et al.*, 2005). Hal ini mengakibatkan terdapat perbedaan informasi sekuen dan ukuran fragmen CVR antara strain ASF yang berbeda membuat CVR tidak cocok sebagai *genom marker* untuk deteksi genotipe; namun, *genotyping* CVR dianggap melengkapi *genotyping* gen *B646L* (p72) sebagai standar untuk intragenotipe virus ASF (Gallardo *et al.*, 2014). Terdapat beberapa jenis CVR yang diuraikan dalam literatur, yakni A = CAST/CVST/CTST/CASI, B = CADT/CTDT, C = GAST/GANT, D = CASM, F = CANT, G = CTNT, J = GTDT, K = CTSP, L = YTNT, M = NEDT, N = NVDT/NVGT, O = NANI/NADI/NASI, H = RAST, S = SAST, T = NVNT, U = NIDT/NTDT, V = NAST/NADT/NANT/NAVT, W = SADT/SVDT dan X = NTDI (Boschoff *et al.*, 2007, Nix *et al.*, 2006, dan Misinzo *et al.*, 2011).

Ukuran amplicon CVR dengan panjang 600 bp lebih ditemukan pada negara – negara di Benua Afrika di mana penyebaran ASF melibatkan caplak dalam siklus silvatik (Phologane *et al.*, 2005). Penyebaran ASF di Indonesia tidak melibatkan siklus silvatik, sehingga hal ini diduga mengakibatkan panjang sekuen CVR yang didapatkan dari isolat ASF di Provinsi Sumatera Utara relatif lebih pendek dibandingkan dengan negara – negara di Benua Afrika.

Hasil analisis sekuen CVR gen *B602L* menunjukkan bahwa isolat lapangan virus ASF

yang beredar di Provinsi Sumatera Utara memiliki kesamaan urutan nukleotida dan asam amino identik 100% dengan isolat ASF yang menginfeksi di negara Georgia (ASF/Georgia/2007) dan India (ASF/India/2021). Namun terdapat perbedaan asam amino pada gugus *carboxy terminus* sekuen asal Indonesia yakni asam amino Threonin (T) pada isolat ASF Sumatera Utara berbeda dengan isolat ASF beberapa negara seperti China, Vietnam, Korea, Serbia, Malaysia dan Timor Leste yang memiliki asam amino Arginin (A) (Gambar 5). Perbedaan ini dapat dijelaskan sebagai bentuk adaptasi bagian dari virus agar lebih sesuai untuk hidup dalam kondisi lingkungannya. Adaptasi ini memiliki pengaruh terhadap peningkatan virulensi, peningkatan kerentanan pada inang dari berbagai usia, dan kemampuan untuk menginduksi patologi (McCullers *et al.*, 2005).

Komposisi pengulangan asam amino tetramerik sebanyak 10 aa tetramer dalam CVR (BNDBNDBNAA), isolat virus ASF dalam penelitian ini diklasifikasikan ke dalam subkelompok XXXII, bersama dengan virus ASF yang beredar di Vietnam (2019), *strain* ASF China dari wabah pada tahun 2018-2019, dan *strain* pada beberapa daerah lainnya ((Tabel 3 dan Gambar 5)). Hasil ini mengungkapkan bahwa tidak terjadi perubahan genetik virus ASF yang bersirkulasi di Provinsi Sumatera Utara tahun 2019-2023.

Analisis parsial gen *B646L* (p72), sekuen utuh gen *E183L* (p54) dan wilayah variabel terpusat gen *B602L* (CVR) di Provinsi Sumatera Utara tidak menunjukkan perubahan pada karakter virus selama lima tahun terakhir,

Tabel 3. Sekuen asam amino tetramer dalam wilayah bervariasi terpusat (CVR) gen B602L pada sampel dan beberapa *strain* virus ASF genotipe II lainnya.

No	Nama Isolat	Accession number	Asal isolat	Sekuen Asam Amino (aa) tetramer	Jenis TRS	CVR Subgrup
1	ASF/Indo/69/2019	OR453788	Indonesia	BNDBNDBNAA*	Tet - 10a	XXXII
2	ASF/Indo/497/2019	OR453789	Indonesia	BNDBNDBNAA	Tet - 10a	XXXII
3	ASF/Indo/500/2020	OR453790	Indonesia	BNDBNDBNAA	Tet - 10a	XXXII
4	ASF/Indo/055/2020	OR453796	Indonesia	BNDBNDBNAA	Tet - 10a	XXXII
5	ASF/Indo/1523/2021	OR453791	Indonesia	BNDBNDBNAA	Tet - 10a	XXXII
6	ASF/Indo/1590/2021	OR453792	Indonesia	BNDBNDBNAA	Tet - 10a	XXXII
7	ASF/Indo /2297/2022	OR453793	Indonesia	BNDBNDBNAA	Tet - 10a	XXXII
8	ASF/Indo/2480/2022	OR453794	Indonesia	BNDBNDBNAA	Tet - 10a	XXXII
9	ASF/Indo/0112/2023	OR453795	Indonesia	BNDBNDBNAA	Tet - 10a	XXXII
10	ASF/China/2018/AnhuiXCGQ	MK128995	China	BNDBNDBNAA	Tet - 10a	XXXII
11	ASF/Wuhan/2019	MN393477	China	BNDBNDBNAA	Tet - 10a	XXXII
12	ASF/Vietnam/2019	UVI01936	Vietnam	BNDBNDBNAA	Tet - 10a	XXXII
13	ASF/VNUA/HY/2020	MT445957	Vietnam	BNDBNDBNAA	Tet - 10a	XXXII
14	ASF/Korea/Pig/Paju1/2019	MN631140	Korea	BNDBNDBNAA	Tet - 10a	XXXII
15	ASF/Georgia/2007	ACD12706	Georgia	BNDBNDBNAA	Tet - 10a	XXXII
16	ASF/Serbia/2021	WFG61331	Serbia	BNDBNDBNAA	Tet - 10a	XXXII
17	ASF/Estonia/2014	LS478113	Serbia	BNDBNDBNAA	Tet - 10a	XXXII
18	ASF/India/2021	MZ509435	India	BNDBNDBNAA	Tet - 10a	XXXII
19	ASF/Malaysia/2023	OC680659	Malaysia	BNDBNDBNAA	Tet - 10a	XXXII
20	ASF/Timor-Leste/2019	MW396979	Timor Leste	BNDBNDBNAA	Tet - 10a	XXXII

* Analisis urutan asam amino CVR pada isolat asal Indonesia diwakilkan oleh tanda * mengungkapkan pengulangan tetramerik yang telah diberi kode huruf tunggal yang sesuai untuk setiap jenis.

yang mengartikan bahwa virus ASF terus bersirkulasi tanpa ada perubahan sekuen. Hal ini dapat disebabkan beberapa faktor seperti tidak ditemukannya *host* caplak *Ornithodoros sp.* sebagai vektor virus ASF di wilayah di Indonesia. Beberapa jenis caplak *Ornithodoros sp.* seperti *Ornithodoros moubata*, *Ornithodoros erraticus*, dan *Ornithodoros verrucosus* dilaporkan sebagai vektor yang menimbulkan transmisi virus ASF antar babi liar di Benua Afrika, dan mengakibatkan perubahan susunan materi genetik ASF sebagai respon individu yang berbeda terhadap infeksi (Burrage *et al.* 2004; Jori *et al.*, 2023).

Iklim tropis di Indonesia yang hanya memiliki 2 musim mengakibatkan tidak terjadinya lonjakan suhu ekstrem sehingga virus relatif stabil dan kejadian mutasi virus sangat minim terjadi. Hal ini dilaporkan Zheng *et al.*, (2023) bahwa genom virus ASF tetap stabil dalam berbagai keadaan lingkungan. Faktor selanjutnya adalah virus ASF merupakan salah satu virus DNA yang memiliki ukuran genom

yang besar, dan hasil analisa sampel virus ASF selama 70 tahun mengungkapkan perkiraan tingkat evolusi dalam urutan 10^{-4} substitusi per nukleotida per tahun yang mengindikasikan perubahan sangat minim terjadi (Faburay 2022). Meskipun demikian, perubahan karakter virus ASF hanya dapat ditentukan dengan beberapa pendekatan seperti menggunakan analisis genom lengkap atau menambahkan genom *marker independent* lainnya seperti *multigene families* (MGF), TRS pada *intragenic region* (IGR), dan gen *K145R* secara parsial (Gallardo *et al.*, 2023).

Kesimpulan

Isolat lapang virus ASF yang dikoleksi selama wabah di Provinsi Sumatera Utara tahun 2019-2023, tergolong dalam genotipe II yang memiliki kesamaan karakter genetik dengan isolat virus ASF dari China. Analisis parsial gen *B646L* (p72), sekuen utuh gen *E183L* (p54) dan wilayah variabel terpusat gen *B602L* (CVR) pada virus ASF asal Provinsi Sumatera Utara

tidak menunjukkan perubahan karakter virus dan tetap stabil selama 5 tahun terakhir. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk melihat perubahan pada genom ASF secara lengkap (*whole genome sequencing*) untuk mengungkapkan informasi yang lebih banyak terkait mekanisme dan transmisi virus.

Daftar Pustaka

- Alkhamis, M.A., Gallardo, C., Jurado, C., Soler, A., Arias, M., Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2018). Phylodynamics and evolutionary epidemiology of African swine fever p72-CVR genes in Eurasia and Africa. *PLoS One*. 13 (2):e0192565.
- Bastos, A.D.S., Penrith, M.L., Cruciere, C. (2003). Genotyping field strains of African swine fever virus by partial p72 gene characterization. *Archives of Virology*. 148 (4):693–706.
- Boshoff, C.I., Bastos, A.D., Gerber, L.J., Vosloo, W. (2007). Genetic characterisation of African swine fever viruses from outbreaks in Southern Africa (1973-1999). *Veterinary Microbiology*. 121 (1-2):45-55.
- Burrage TG, Lu Z, Neilan JG, Rock DL, Zsak L. 2004. African swine fever virus multigene family 360 genes affect virus replication and generalization of infection in *Ornithodoros porcinus* ticks. *J Virol*. 78(5):2445-53. doi: 10.1128/jvi.78.5.2445-2453.2004.
- Cheng, J., Ward, M.P. (2022). Risk factors for the spread of African Swine Fever in China: A systematic review of Chinese-language literature. *Transboundary and Emerging Disease*. 69 (5):e1289-e1298..
- Cho, K.H., Yoo, D.S., Hong, S.K., Kim, D.Y., Jang, M.K., Kang, H.E., Kim, Y.H. (2023). Genetic profile of African swine fever viruses circulating at pig farms in South Korea during the outbreaks between 2022 and april 2023. *Viruses*. 15 (7):1552.
- Dharmayanti, N.I., Sendow, I., Ratnawati, A., Settypalli, T.B.K., Saepulloh, M., Dundon, W.G., Nuradji, H., Naletoski, I., Cattoli, G., Lamien, C.E. (2021). African swine fever in North Sumatra and West Java provinces in 2019 and 2020, Indonesia. *Transboundary and Emerging Disease*. 68 (5):2890-2896.
- Faburay B. 2022. Genome plasticity of african swine fever virus: implications for diagnostics and live-attenuated vaccines. *Pathogens*. 11(2):145. doi: 10.3390/pathogens11020145.
- Forth, J.H., Calvelage, S., Fischer, M., Hellert, J., Sehl-Ewert, J., Roszyk, H., Deutschmann, P., Reichold, A., Lange, M., Thulke, H.H., Sauter-Louis, C., Höper, D., Mandyhra, S., Sapachova, M., Beer, M., Blome, S. (2023). African swine fever virus - variants on the rise. *Emerging Microbes and Infections*. 12 (1):2146537.
- Gallardo, C., Mwaengo, D.M., Macharia, J.M., Arias, M., Taracha, E.A., Soler, A., Okoth, E., Martín, E., Kasiti, J., Bishop, R.P. (2009). Enhanced discrimination of African swine fever virus isolates through nucleotide sequencing of the p54, p72, and pB602L (CVR) genes. *Virus Genes*. 38 (1):85-95.
- Gallardo, C., Ademun, A.R., Nieto, R. (2011). Genotyping of African swine fever virus (ASFV) isolates associated with disease outbreaks in Uganda in 2007. *African Journal of Biotechnology*. 10(17):3488–3497.
- Gallardo, C., Fernández-Pinero, J., Pelayo, V., Gazaev, I., Markowska-Daniel, I., Pridotkas, G., Nieto, R., Fernández-Pacheco, P., Bokhan, S., Nevolko, O., Drozhzhe, Z., Pérez, C., Soler, A., Kolvasov, D., Arias, M. (2014). Genetic variation among African swine fever genotype II viruses, Eastern and Central Europe. *Emerging Infectious Diseases*. 20 (9):1544-7.
- Gallardo, C., Casado, N., Soler, A., Djadjovski, I., Krivko, L., Madueño, E., Nieto, R., Perez, C., Simon, A., Ivanova, E., Donescu, D., Milicevik, V., Chondrokouki, E., Nurmoja, I., Frant, M., Feliziani, F., Václavek, P., Pileviciene, S., Marisa, A. (2023). A multi gene-approach genotyping method identifies 24 genetic

- clusters within the genotype ii-european african swine fever viruses circulating from 2007 to 2022. *Frontier of Veterinary Sciences*. 10:1112850.
- Hall, T. (2011). BioEdit: an important software for molecular biology. *GERF Bulletin of Bioscience*. 2 (1):60-61.
- Hernández, B., Guerra, M., Salas, M.L., Andrés, G. (2016). African swine fever virus undergoes outer envelope disruption, capsid disassembly and inner envelope fusion before core release from multivesicular endosomes. *PLoS Pathology*. 12 (4):e1005595.
- Jori F, Bastos A, Boinas F, Van Heerden J, Heath L, Jourdan-Pineau H, Martinez-Lopez B, Pereira de Oliveira R, Pollet T, Quembo C, *et al.*, 2023. An updated review of *ornithodoros* ticks as reservoirs of african swine fever in sub-saharan africa and madagascar. *Pathogens*. 12(3):469. doi: 3390/pathogens12030469.
- Kementerian Pertanian. (2019). *Keputusan Menteri Pertanian Republik Indonesia Nomor 820 Tahun 2019 Tentang Pernyataan Wabah Penyakit Demam Babi Afrika Pada Beberapa Kabupaten / Kota Di Provinsi Sumatera Utara*. Jakarta: DITJENPKH.
- King, D.P., Reid, S.M., Hutchings, G.H., Grierson, S.S., Wilkinson, P.J., Dixon, L.K., Bastos, A.D., Drew, T.W. (2003). Development of a TaqMan PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus. *Journal of Virological Methods*. 107 (1):53-61.
- Le, V.P., Jeong, D.G., Yoon, S.W., Kwon, H.M., Trinh, T.B.N., Nguyen, T.L., Bui, T.T.N., Oh, J., Kim, J.B., Cheong, K.M., Van Tuyen, N., Bae, E., Vu, T.T.H., Yeom, M., Na, W., Song, D. (2019). Outbreak of African Swine Fever, Vietnam, 2019. *Emerging Infectious Diseases*. 25 (7):1433-1435.
- Malogolovkin, A., Burmakina, G., Titov, I., Sereda, A., Gogin, A., Baryshnikova, E., Kolbasov, D. (2015). Comparative analysis of African swine fever virus geno., Van Schalkwyk, A., Chernyshev, R., Igolkin, A., Heath, L., Sprygin, A. (2023). A guide to molecular characterization of genotype II African swine fever virus: essential and alternative genome markers. *Microorganisms*. 11 (3):642.
- McCullers JA, Hoffmann E, Huber VC, Nickerson AD. 2005. A single amino acid change in the C-terminal domain of the matrix protein M1 of influenza B virus confers mouse adaptation and virulence. *Virology*. 336 (2):318-26. doi: 10.1016/j.virol.2005.03.028.
- Misinzo, G., Magambo, J., Masambu, J., Yongolo, M.G., Van Doorselaere, J., Nauwynck, H.J. (2011). Genetic characterization of African swine fever viruses from a 2008 outbreak in Tanzania. *Transboundary Emerging Diseases*. 58 (1):86-92.
- Nix, R.J., Gallardo, C., Hutchings, G., Blanco, E., Dixon, L.K. (2006). Molecular epidemiology of African swine fever virus studied by analysis of four variable genome regions. *Archives of Virology*. 151 (12): 2475-94.
- Office International des Epizooties. (2019). Immediate Notification Report of North Sumatera Outbreak December 2019. OIE Press.
- Phologane, S.B., Bastos, A.D., Penrith, M.L. (2005). Intra- and inter-genotypic size variation in the central variable region of the 9RL open reading frame of diverse African swine fever viruses. *Virus Genes*. 31(3):357-60.
- Primatika, R.A., Sudarnika, E., Sumiarto, B., Basri, C. (2021). Tantangan dan kendala pengendalian African swine fever (asf). *Jurnal Sains veteriner*. 39 (1): 62-72.
- Qu, H., Ge, S., Zhang, Y., Wu, X., Wang, Z. (2022). A systematic review of genotypes and serogroups of African swine fever virus. *Virus Genes*. 58 (2):77-87.
- Revilla, Y., Pérez-Núñez, D., Richt, J.A. (2018). African swine fever virus biology and vaccine approaches. *Advances in Virus Research*. 100 :41-74.

- Tamura. K., Stecher, G., Kumar, S. 2013. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*. 38 (7):3022–3027.
- Wang, Y., Kang, W., Yang, W., Zhang, J., Li, D., Zheng, H. 2021. Structure of African swine fever virus and associated molecular mechanisms underlying infection and immunosuppression: a review. *Frontier in Immunology*. 12 (715581):1-17.
- World Organization of Animal Health. 2021. OIE Terrestrial Manual Chapter 3.9.1: African Swine Fever (Infection with African Swine Fever Virus). [internet]. [diacu 20 Maret 2023]. Tersedia di https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.09_01_ASF.pdf.
- Zheng W, Xi J, Zi Y, Wang J, Chi Y, Chen M, Zou Q, Tang C, Zhou X. 2023. Stability of African swine fever virus genome under different environmental conditions. *Vet Wor*. 16(11): 2374–2381. doi: 10.14202/vetworld.2023.2374-2381.