

Identifikasi Virus *Infectious Laryngotracheitis* dan *Fowl Pox* di Kabupaten Sukabumi dengan Uji *Polymerase Chain Reaction*

(Identification of Infectious Laryngotracheitis Virus and Fowl Pox in Sukabumi District by Polymerase Chain Reaction)

Risza Hartawan, Dharmayanti NLPI

Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl. RE Martadinata No. 30, Bogor 16114
risza.hartawan@litbang.deptan.go.id; rjoss.dvm@gmail.com

ABSTRACT

Infectious laryngotracheitis (ILT) and fowl pox (FP) are infectious pathogens from DNA virus group that cause outbreaks in commercial poultry farms. The ILT and FP viruses cause significant economic loss in affected farms because of increasing mortality rate and reduction on productivity. Even though outbreak in commercial farms have been reduced significantly because of vaccination program, the diseases may emerge again because of virus mutation, persistent infection as well as revert virulence of vaccine strain. The main objective of this study was to identify the ILT and FP viruses by polymerase chain reaction (PCR). Results show that both viruses were successfully identified by amplifying gene targets. The target genes for the ILT were namely gE and TK. On the other hand, the 4b gene is chosen for the FP. Subsequently, the PCR tests were also successfully combined into multiplex platform (mPCR) that is more economic and efficient to perform screening test for large number of samples. Screening test of 36 pools of tracheal swab using mPCR demonstrated that the diseases were not detected in four commercial chicken farms in Sukabumi district in July 2013.

Key Words: DNA Viruses, Infectious Laryngotracheitis, Fowl Pox, Polymerase Chain Reaction

ABSTRAK

Infectious laryngotracheitis (ILT) dan *fowl pox* (FP) merupakan patogen infeksius dari kelompok virus DNA yang berpotensi menyerang peternakan ayam komersial. Virus ILT dan FP menyebabkan kerugian ekonomi yang sangat besar pada peternakan yang terserang akibat peningkatan angka kematian dan penurunan produktivitas. Meskipun kasus kedua penyakit ini sudah jarang terjadi akibat program vaksinasi pada peternakan ayam komersial, namun ancaman penyakit dapat muncul kembali karena faktor mutasi, infeksi persisten maupun kemungkinan kembalinya virulensi strain vaksin. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi virus ILT dan FP menggunakan *polymerase chain reaction* (PCR). Uji PCR terbukti sensitif dalam mengidentifikasi kedua virus tersebut dengan target gen gE dan TK (ILT) maupun gen 4b (FP). Lebih lanjut, uji PCR tersebut juga dapat dikombinasikan dalam *platform* multipleks (mPCR) sehingga lebih ekonomis dalam melakukan skrining untuk sampel dalam jumlah besar. Skrining pada 36 *pool swab* trakea dengan mPCR menunjukkan bahwa pada empat peternakan ayam komersial di Kabupaten Sukabumi pada bulan Juni 2013 tidak terdeteksi adanya kedua penyakit virus tersebut.

Kata Kunci: Virus DNA, *Infectious Laryngotracheitis*, *Fowl Pox*, *Polymerase Chain Reaction*

PENDAHULUAN

Industri peternakan ayam komersial telah mencapai kemajuan yang signifikan dan memegang peranan penting dalam memenuhi kebutuhan protein hewani masyarakat. Namun, berbagai macam patogen bersirkulasi di lapang dan berpotensi menjadi ancaman serius terhadap keberlangsungan peternakan ayam

komersial di Indonesia. Beberapa patogen tersebut diantaranya adalah virus *infectious laryngotracheitis* (ILT) dan *fowl pox* (FP) dari kelompok virus DNA yang berpotensi menimbulkan kerugian ekonomi yang signifikan pada peternakan yang terserang (Guy & Garcia 2008; Tripathy & Reed 2008).

Virus ILT (*Gallid herpesvirus* I) termasuk dalam genus *Iltovirus* dari subfamili

Alphaherpesvirinae (famili *Herpesviridae*) umumnya menginfeksi saluran pernafasan unggas (Nair et al. 2008). Gejala klinis dipengaruhi oleh patogenitas virus dan status vaksinasi (Tripathy & Reed 2008). Bentuk infeksi parah ditandai dengan depresi pernafasan, batuk dengan bercak darah sampai dengan tingginya angka kematian. Manifestasi infeksi ringan ditandai dengan gangguan pernafasan ringan seperti *mucoïd tracheitis*, sinusitis dan konjungtivitis. Meskipun kejadian penyakit dapat dikendalikan dengan penerapan vaksinasi menggunakan *modified live vaccine* namun ancaman kembalinya penyakit masih harus diwaspadai oleh adanya faktor infeksi persisten maupun kembalinya virulensi virus strain vaksin (Bagust 1986; Guy et al. 1991; Hughes et al. 1991; Williams et al. 1992).

Sementara itu, *fowl pox* merupakan penyakit yang umumnya menginfeksi unggas baik pada peternakan tradisional maupun komersial bahkan unggas liar (Smits et al. 2005; Biswas et al. 2011). Virus FP termasuk dalam genus *Avipoxvirus* dari famili *Poxviridae* (Skinner 2008). Gejala penyakit penyakit dibagi menjadi dua bentuk yaitu *cutaneous* dan *diphtheritic* (Tripathy & Reed 2008). Bentuk *cutaneous* ditandai dengan lesi bersifat nodular proliferasif pada bagian kulit yang tidak berbulu. Sementara itu, pada bentuk *diphtheritic* terjadi lesi nekrotik dan proliferasif pada membrana mukosa rongga mulut, faring, laring, esophagus dan trakea. Tingkat keparahan dan kematian lebih tinggi pada infeksi *diphtheritic* terutama jika kondisi lingkungan buruk (anomalia tinggi) dan terjadi infeksi sekunder.

Meskipun kejadian penyakit dapat dikendalikan dengan vaksinasi namun infeksi cenderung menjadi persisten dimana beberapa kasus penyakit telah dilaporkan pada *flock* yang divaksinasi (Singh et al. 2000). Beberapa varian virus baru teridentifikasi mengalami mutasi genomik oleh adanya insersi gen *long terminal repeat* dari virus *reticuloendotheliosis* yang diduga memicu terjadinya immunosupresi, infeksi persisten yang lebih lama dan peningkatan patogenitas sehingga vaksinasi menjadi tidak efektif (Fatunmbi & Reed 1996; Singh et al. 2000; 2003; Wang et al. 2006).

Peneguhan diagnosa penyakit melalui uji konfirmasi laboratoris untuk penyakit unggas sangat penting untuk dikembangkan dalam

rangka mendukung keberhasilan manajemen kesehatan unggas di lapang. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi virus ILT dan FP menggunakan pendekatan biologi molekuler melalui uji *polymerase chain reaction* (PCR) yang bersifat akurat, mudah dan cepat diaplikasikan. Selanjutnya, multipleks PCR (mPCR) juga dikembangkan untuk mengidentifikasi kedua penyakit tersebut secara bersamaan sehingga menjadi lebih murah, cepat dan efisien untuk melakukan skrining penyakit pada sampel dalam jumlah besar.

MATERI DAN METODE

Kontrol virus dan ekstraksi DNA

Isolat virus yang digunakan sebagai kontrol positif adalah *strain* vaksin LT BLEN (*fowl laryngotracheitis* strain T-20, Merial) dan DIFTOSEC CT (*fowl pox* strain DCEP₂₅, Merial) yang diperoleh dari sumber komersial yang ada di Indonesia (PT Romindo). Isolasi material genetik DNA dari kedua isolat tersebut dilakukan menggunakan kit komersial DNeasy[®] Blood & Tissue Kit (Qiagen). Hasil ekstraksi DNA kemudian disimpan pada freezer (-20°C) sampai dengan analisis lebih lanjut.

Uji PCR untuk virus ILT dan FP

Proses PCR untuk identifikasi virus ILT dan FP dilakukan menggunakan kit komersial HotStarTaq[®] Plus (Qiagen). Komposisi reagen PCR untuk setiap 20 µl nya mengandung dua kali HotStarTaq[®] Plus Master mix sebanyak 10 µl, *bovine serum albumin* (10 mg/ml) sebanyak 1 µl, 10 kali CoralLoad concentrate sebanyak 2 µl, masing-masing primer *forward* dan *reverse* (20 µM) sebanyak 0,5 µl dan templat DNA sebanyak 6 µl. Set primer *forward* dan *reverse* untuk mengamplifikasi gen target gE, TK dan 4b disintesis oleh Invitrogen. Set primer yang digunakan dalam penelitian disajikan pada Tabel 1.

Profil temperatur PCR untuk gen gE, TK dan 4b dioptimalkan pada suhu yang seragam yang terdiri atas denaturasi awal (95°C, 5 menit), amplifikasi sebanyak 40 siklus

Tabel 1. Set primer yang digunakan dalam uji PCR untuk virus ILT dan FP

Jenis virus	Gen target	Kode primer	Sekuen (5'-3')	Ukuran ampikon	Literatur
ILT	gE	gE3S	CGTATACCATCCTACAGACGGCA	219 bp	Chacón & Ferreira (2008)
		gE4AS	CGTACAATGGTTCGGTCTTGGA		
	TK	tk#1	CGTGGCTTCACCAGCAA	300 bp	Scholz et al. (1994)
		tk#2	CGAGTAAGTAATAGGCT		
FP	4b	4b.p1	CAGCAGGTGCTAAACAACAA	578 bp	Lee & Lee (1997)
		4b.p2	CGGTAGCTTAACGCCGAATA		

denaturasi (94°C, 30 detik), *annealing* (55°C, 90 detik) dan ekstensi (72°C, 2 menit) dan ekstensi akhir (72°C, 10 menit). Visualisasi produk PCR dilakukan dengan elektroforesis (100 volts/30 menit) pada agarose gel TBE 2% yang mengandung ethidium bromida. *Molecular weight* (MW) yang digunakan adalah *ladder* DNA 100 bp (Invitrogen). Hasil elektroforesis didokumentasikan dengan mesin Gel Doc (Vilber Lourmat).

Uji mPCR untuk virus ILT dan FP

Pengembangan uji PCR dengan *platform* multipleks (mPCR) dilakukan dengan cara mengkombinasikan uji PCR yang telah dioptimasi pada tahap sebelumnya. Kit yang dipergunakan untuk uji mPCR sama dengan tahapan sebelumnya. Komposisi reagen PCR untuk setiap 20 µl nya mengandung dua kali HotStarTaq® Plus Master mix sebanyak 10 µl, *bovine serum albumine* (10 mg/ml) sebanyak 1 µl, masing-masing primer *forward* dan *reverse* untuk setiap target gen (20 µM) sebanyak 0,5 µl dan templat DNA sebanyak 7 µl. Profil temperatur uji mPCR untuk identifikasi virus ILT dan FP sama seperti tahapan uji PCR sebelumnya. Visualisasi produk PCR juga dilakukan dengan elektroforesis (100 volts/30 menit) pada *agarose* gel TBE 2% yang mengandung ethidium bromida menggunakan *ladder* DNA 100 bp (Invitrogen) sebagai penanda ukuran molekuler. Dokumentasi hasil elektroforesis dilakukan pada mesin Gel Doc (Vilber Lourmat).

Aplikasi uji mPCR pada sampel lapang

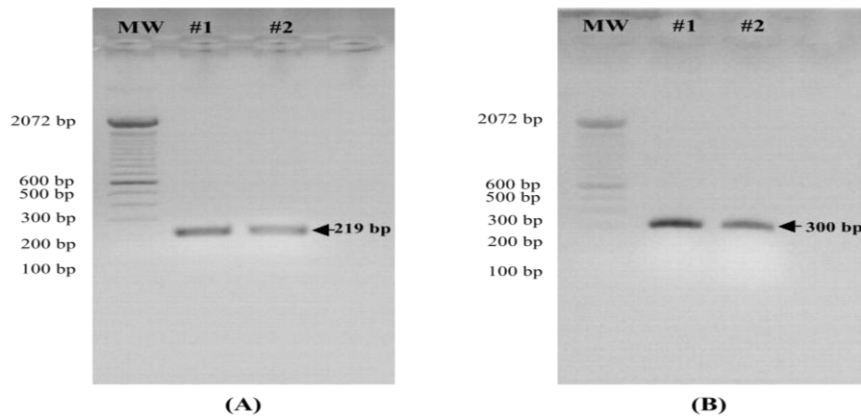
Sampel *swab* trakea ayam dikoleksi dari beberapa peternakan komersial di Kabupaten Sukabumi pada bulan Juli 2013 yang

berkoordinasi dengan Dinas Peternakan setempat. *Pooling* sampel dilakukan dengan jumlah sekitar 3-4 *swab*. Sampel ditempatkan pada tabung yang berisi media *dubbleco modified eagle medium* (DMEM) dan disimpan pada kontainer es *box* (4°C) untuk kemudian dibawa ke Laboratorium Virologi, BB Litvet. Ekstraksi DNA *swab* trakea dilakukan menggunakan kit DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen). Selanjutnya, skrining sampel lapang dengan mPCR dilakukan untuk mengidentifikasi keberadaan virus ILT dan FP.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi virus ILT dengan PCR

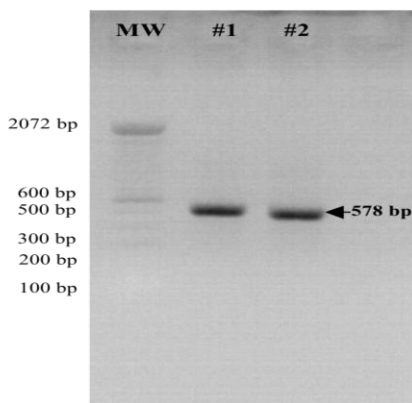
Identifikasi virus ILT dengan uji PCR berhasil dilakukan dengan mengamplifikasi gen target gE dan TK. Amplifikasi gen gE pada kontrol virus (LT BLEN, strain T-20, Merial) menghasilkan ukuran produk sekitar 219 bp sesuai dengan penelitian sebelumnya (Chacón & Ferreira 2008). Optimasi isolat virus *strain* lapang dan sampel lapang telah dilakukan pada penelitian tersebut. Analisis spesifitas uji juga telah dilakukan terhadap patogen lainnya seperti *Newcastle disease*, *metapneumovirus*, *Infectious bronchitis*, *Marek's disease*, *Turkey herpesvirus* maupun *Mycoplasma gallisepticum* dan *Mycoplasma sinoviae*. Sementara itu, amplifikasi gen TK berhasil dilakukan dengan ukuran produk sekitar 300 bp sesuai dengan penelitian sebelumnya (Scholz et al. 1994). Pada penelitian tersebut, uji PCR tidak bereaksi silang dengan *Newcastle disease*, *Infectious bronchitis*, *Adenovirus*, *Pox*, *Pacheco* dan *Marek's disease*. Dokumentasi hasil uji PCR untuk identifikasi virus ILT disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Uji PCR untuk identifikasi virus ILT pada kontrol virus (LT BLEN, strain T-20, Merial)
A: Target gen gE (219 bp); B: Target gen TK (300 bp)

Identifikasi virus FP dengan PCR

Identifikasi virus FP berhasil dilakukan dengan kontrol virus (DIFTOSEC CT, strain DCEP₂₅, Merial) dengan mengamplifikasi gen 4b dengan ukuran produk sekitar 578 bp sesuai dengan penelitian terdahulu (Lee & Lee 1997). Pada penelitian tersebut, protokol uji PCR ini tidak mengamplifikasi silang terhadap *Gallid herpesvirus 3 strain SB1*, *turkey herpesvirus* dan *haemorrhagic enteritis*. Dokumentasi hasil uji PCR untuk identifikasi virus FP disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Uji PCR untuk identifikasi virus FP pada kontrol virus (DIFTOSEC CT, strain DCEP₂₅, Merial) dengan target gen 4b (578 bp)

Identifikasi virus ILT dan FP dengan mPCR

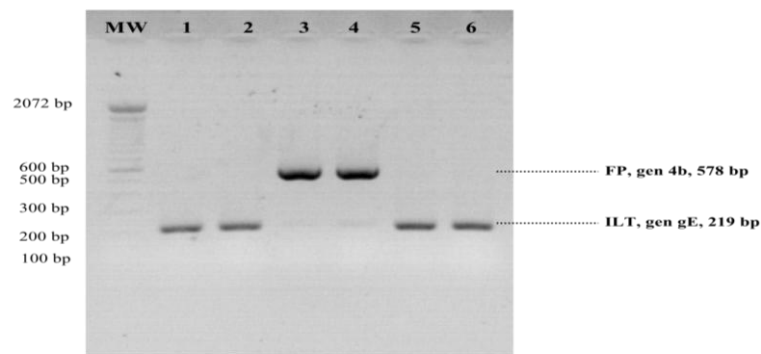
Uji mPCR untuk identifikasi virus ILT dan FP dilakukan dengan dua kombinasi set primer yang berbeda. Kombinasi I dilakukan dengan set primer untuk gen gE dan 4b. Kombinasi II dilakukan dengan menggunakan set primer untuk gen TK dan 4b. Hasil penelitian menunjukkan bahwa mPCR kombinasi I hanya berhasil mengamplifikasi gen target yaitu jika hanya terdapat satu macam templat DNA kontrol. Apabila ada dua macam templat DNA kontrol secara bersamaan (ILT dan FP) maka terjadi interferensi terhadap amplifikasi gen 4b dari virus FP. Dokumentasi hasil uji mPCR kombinasi I disajikan pada Gambar 3. Sementara itu, kombinasi II berhasil mengamplifikasi kedua target gen TK dan 4b secara bersamaan. Amplifikasi gen TK diidentifikasi dengan pita gen dengan ukuran sekitar 300 bp, sedangkan gen 4b pada virus FP diidentifikasi dengan produk berukuran 578 bp. Dokumentasi hasil uji mPCR kombinasi II disajikan pada Gambar 4.

Aplikasi uji mPCR pada sampel lapang

Sebanyak 36 *pool swab* trakea dikoleksi dari empat peternakan ayam komersial (tiga layer dan satu ayam Kampung) di Kabupaten Sukabumi pada bulan Juli 2013. Uji skrining

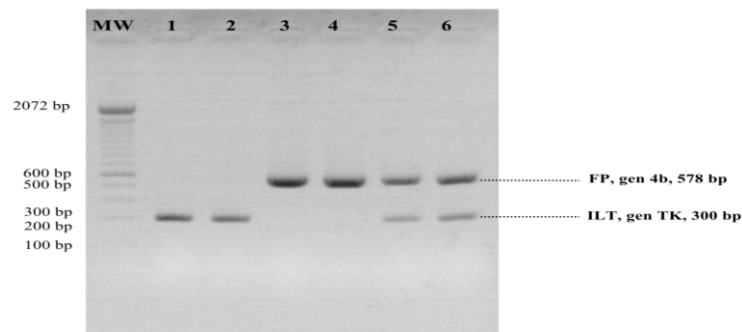
mPCR menunjukkan bahwa semua sampel bereaksi negatif terhadap virus ILT maupun FP dimana kontrol virus yang digunakan bekerja dengan baik. Informasi sampel lapang dan skrining mPCR untuk ILT dan FP disajikan pada Tabel 2 dan Gambar 5. Kondisi bebas penyakit ILT dan FP pada peternakan ayam komersial di Kabupaten Sukabumi pada bulan Juli 2013 kemungkinan merupakan hasil penerapan program vaksinasi yang baik dan tepat. Meskipun kasus kejadian penyakit ILT dan FP sudah lama tidak dilaporkan namun kemungkinan kembali timbulnya penyakit masih tetap perlu diwaspadai. Infeksi virus dapat bersifat laten ataupun persisten sehingga

sering kali tidak menimbulkan gejala klinis. Identifikasi terhadap adanya infeksi laten virus ILT dapat dilakukan dengan uji PCR namun diperlukan jenis sampel yang berbeda berupa organ trakea, paru-paru, konjungtiva sampai dengan jaringan ganglion syaraf trigeminal (Chacón et al. 2007; Chacon & Ferreira 2008). Penelitian Williams et al. (1992) menunjukkan bahwa predileksi utama virus ILT pada saat infeksi laten terdapat pada jaringan syaraf trigeminal sehingga virus tidak terdeteksi pada saluran respirasi ayam. Pengambilan sampel organ atau jaringan melalui proses nekropsi membutuhkan kesediaan peternak dan biaya kompensasi penggantian.



Gambar 3. Uji mPCR untuk virus ILT dan FP kombinasi I (gen gE dan 4b)

1-2: Kontrol virus ILT; 3-4: Kontrol virus FP; 5-6: Kontrol virus ILT dan FP

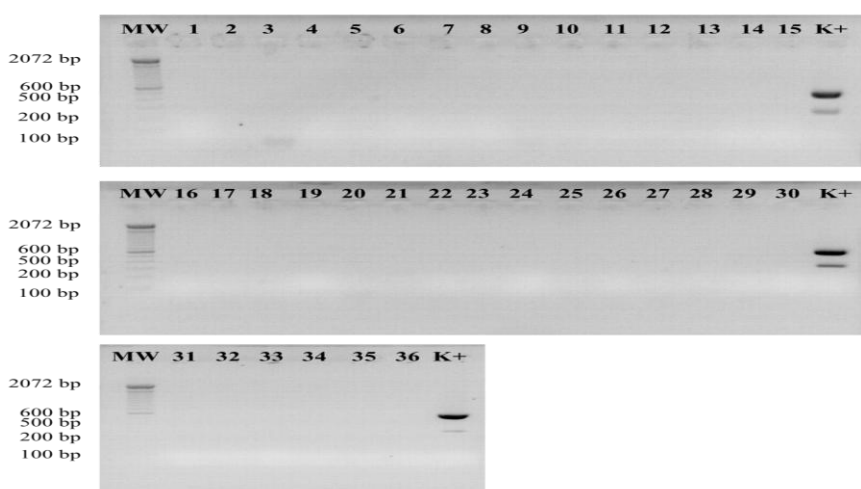


Gambar 4. Uji mPCR untuk virus ILT dan FP kombinasi II (gen TK dan 4b)

1-2: Kontrol virus ILT; 3-4: Kontrol virus FP; 5-6: Kontrol virus ILT dan FP

Tabel 2. Data sampel lapang (Sukabumi) dan skrining mPCR untuk virus ILT dan FP

Kode farm	Kode flock	Jenis ayam	Umur ayam	Kode sampel	Jenis sampel	mPCR untuk ILT dan FP
A	A1	Layer	22 minggu	1-3	Swab trakea	Negatif
	A2	Layer	44 minggu	4-6	Swab trakea	Negatif
	A3	Layer	69 minggu	7-9	Swab trakea	Negatif
	A4	Layer	53 minggu	10-12	Swab trakea	Negatif
	A5	Layer	28 minggu	13-15	Swab trakea	Negatif
B	B1	Layer	35 minggu	16-18	Swab trakea	Negatif
	B2	Layer	24 minggu	19-21	Swab trakea	Negatif
C	C1	Layer	34 minggu	22-24	Swab trakea	Negatif
	C2	Layer	44 minggu	25-27	Swab trakea	Negatif
	C3	Layer	54 minggu	28-30	Swab trakea	Negatif
D	D1	Ayam Kampung	8 minggu	31-33	Swab trakea	Negatif
	D2	Ayam Kampung	7 minggu	34-36	Swab trakea	Negatif

**Gambar 5.** Hasil uji mPCR untuk virus ILT dan FP pada 36 pool swab trakea dari peternakan ayam komersial di Kabupaten Sukabumi tahun 2013

KESIMPULAN

Identifikasi keberadaan virus ILT dan FP dapat dilakukan dengan uji PCR dengan target gen gE dan TK untuk virus ILT dan gen 4b untuk virus FP. Platform uji multipleks PCR (mPCR) berhasil dikembangkan untuk mendeteksi kedua penyakit tersebut secara bersamaan. Hasil skrining uji mPCR pada sampel lapang dari empat peternakan komersial asal Kabupaten Sukabumi bulan Juli 2013 tidak menunjukkan teridentifikasinya virus ILT maupun FP. Namun, *surveillance* situasi penyakit di lapang baik pada peternakan

tradisional, komersial maupun unggas liar perlu dilakukan secara berkala dan berkelanjutan dengan teknik diagnostik yang sesuai untuk mengantisipasi munculnya kembali kedua penyakit virus yang sangat merugikan tersebut.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh penelitian DIPA APBN BB Litvet tahun anggaran 2013 dengan kode 1806.020.011B. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Nana Suryana, Teguh Suyatno dan Ace Endang Supriatna atas

bantuan teknisnya dalam penelitian. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Dinas Peternakan Kabupaten Sukabumi atas bantuannya dalam pelaksanaan kegiatan lapang.

DAFTAR PUSTAKA

- Bagust TJ. 1986. Laryngotracheitis (Gallid-1) herpesvirus infection in the chicken. 4. Latency establishment by wild and vaccine strains of ILT virus. *Avian Pathol.* 15:581-595.
- Biswas SK, Jana C, Chand K, Rehman W, Mondal B. 2011. Detection of fowl poxvirus integrated with reticuloendotheliosis virus sequences from an outbreak in backyard chickens in India. *Vet Ital.* 47:147-153.
- Chacón J, Brandão P, Villarreal L, Gama N, Ferreira A. 2007. Survey of infectious laryngotracheitis outbreak in layer hens and differential diagnosis with other respiratory pathogens. *Rev Bras Ciência Avícola.* 9:61-67.
- Chacón JL, Ferreira AJP. 2008. Development and validation of nested-PCR for the diagnosis of clinical and subclinical infectious laryngotracheitis. *J Virol Methods.* 151:188-193.
- Fatunmbi OO, Reed WM. 1996. Evaluation of a commercial modified live virus fowl pox vaccine for the control of "variant" fowl poxvirus infections. *Avian Dis.* 40:582-587.
- Guy JS, Barnes HJ, Smith L. 1991. Increased virulence of modified-live infectious laryngotracheitis vaccine virus following bird-to-bird passage. *Avian Dis.* 35:348-355.
- Guy JS, Garcia M. 2008. Laryngotracheitis. In: Saif YM, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Swayne DE, editors. *Dis Poultry.* 12th ed. Iowa (US): Blackwell Publishing. p. 137-152.
- Hughes CS, Williams RA, Gaskell RM, Jordan FTW, Bradbury JM, Bennett M, Jones RC. 1991. Latency and reactivation of infectious laryngotracheitis vaccine virus. *Arch Virol.* 121:213-218.
- Lee LH, Lee KH. 1997. Application of the polymerase chain reaction for the diagnosis of fowl poxvirus infection. *J Virol Methods.* 63:113-119.
- Nair V, Jones RC, Gough RE. 2008. Herpesviridae. In: Mark P, Paul FM, Janet MB, Dennis JA, editors. *Poult Dis.* Philadelphia (PA): Edinburgh: WB Saunders. p. 258-275.
- Scholz E, Porter RE, Guo P. 1994. Differential diagnosis of infectious laryngotracheitis from other avian respiratory diseases by a simplified PCR procedure. *J Virol Methods.* 50:313-321.
- Singh P, Kim TJ, Tripathy DN. 2000. Re-emerging fowlpox: evaluation of isolates from vaccinated flocks. *Avian Pathol.* 29:449-455.
- Singh P, Schnitzlein WM, Tripathy DN. 2003. Reticuloendotheliosis virus sequences within the genomes of field strains of fowlpox virus display variability. *J Virol.* 77:5855-5862.
- Skinner MA. 2008. Poxviridae. In: Mark P, Paul FM, Janet MB, Dennis JA, editors. *Poult Dis.* 6th ed. Philadelphia (PA): Edinburgh: WB Saunders. p. 333-339.
- Smits JE, Tella JL, Carrete M, Serrano D, López G. 2005. An epizootic of avian pox in endemic short-toed larks (*Calandrella rufescens*) and Berthelot's pipits (*Anthus berthelotti*) in the Canary Islands, Spain. *Vet Pathol.* 42:59-65.
- Tripathy DN, Reed WM. 2008. Pox. In: Saif YM, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Swayne DE, editors. *Diseases Poultry.* 12th ed. Iowa (US): Blackwell Publishing. p. 291-308.
- Wang J, Meers J, Spradbrow PB, Robinson WF. 2006. Evaluation of immune effects of fowlpox vaccine strains and field isolates. *Vet Microbiol.* 116:106-119.
- Williams RA, Bennett M, Bradbury JM, Gaskell RM, Jones RC, Jordan FT. 1992. Demonstration of sites of latency of infectious laryngotracheitis virus using the polymerase chain reaction. *J Gen Virol.* 73:2415-2420.

DISKUSI

Pertanyaan:

Apakah dua gen yang digunakan sifatnya kontradiksi?

Jawaban:

Jika dimasukkan tiga gen, salah satu akan menghambat, tapi jika digunakan satu per satu fungsi tetap berjalan.