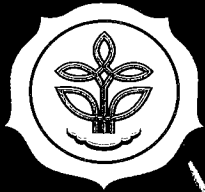


ISSN : 1411-9161

# VELABO

BULETIN LABORATORIUM VETERINER



KEMENTERIAN PERTANIAN  
DIREKTORAT JENDERAL PETERNAKAN DAN KESEHATAN HEWAN  
BALAI PENYIDIKAN DAN PENGUJIAN VETERINER  
REGIONAL III

VELABO

VOL. 27

NO. 01

Hlm : 1 - 20

Bandar Lampung  
Juni 2010

## **Pengantar Redaksi**

Puji dan syukur kita panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, karena berkat karunia-Nya Buletin Laboratorium Veteriner (VELABO) Volume 27, No. 01, Edisi Juni 2010, dapat diterbitkan dan kembali didapatkan pembaca sekalian.

Pada Velabo ini, pembaca dapat mengupas tentang hasil Pengembangan Diagnosa Penyakit Newcastle Disease (ND) menggunakan Teknik Polimerase Chain Reaction (PCR) Kajian Epidemiologi Eimeria Sp. Di wilayah Sumatera Bagian Selatan Tahun 2009 serta Pengembangan Metode Identifikasi Penyakit Brucellosis dengan menggunakan Teknik PCR (Polimerase Chain Reaction).

Harapan kami sajian Velabo ini dapat bermanfaat untuk pembaca, walaupun ada kekurangan disana-sini adalah hal yang wajar dalam proses belajar dan mohon untuk dimaklumi.

Redaksi

**ISSN : 1411 - 9161**

**Diterbitkan 2 kali setahun oleh :**

**BALAI PENYIDIKAN DAN PENGUJIAN VETERINER REGIONAL III  
DIREKTORAT JENDERAL PETERNAKAN, DEPARTEMEN PERTANIAN**

<b>VELABO</b>	<b>DAFTAR ISI</b>
<p><b>Buletin Laboratorium Veteriner</b></p> <p><b><u>Penanggung Jawab</u></b> Kepala Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner Regional III drh. Syamsul Ma'arif, M.Si.</p> <p><b><u>Pemimpin Redaksi</u></b> drh. Enny Saswiyanti</p> <p><b>Redaksi Pelaksana :</b> drh. Tri Guntoro</p> <p><b><u>Anggota Redaksi</u></b> drh. Sri Marfiatiningsih drh. IGNA Wisnu AŞ drh. A. Joko Siswanto drh. Rismayani SD, MTA. drh. Eko Agus S drh. Liza Angelya</p> <p><b><u>Sekretaris Redaksi</u></b> Sulistiowati</p> <p><b><u>Sirkulasi dan Distribusi</u></b> Tuti Mulyani</p> <p><b><u>Alamat Redaksi</u></b> Jl. Untung Suropati No. 2 Labuhan Ratu Kedaton, Bandar Lampung - 35412 Telp. 0721 - 701851 - 772894 Faxsimile 0721 - 772894</p>	<p><b>Pengantar Redaksi</b></p> <p><b>Daftar Isi</b></p> <p>Pengembangan Diagnosa Penyakit Newcastle Disease (ND) Menggunakan Teknik Polimerase Chain Reaction (PCR) di BPPV Reg. III Oleh Diyah Cahyaningsari, dkk. 1-5</p> <p>Kajian Epidemiologi Eimeria Sp Di Wilayah Sumatera Bagian Selatan Oleh IGNA. Wisnu Adi Saputra, dkk. 6-12</p> <p>Pengembangan Metode Identifikasi Penyakit Brucellosis dengan Menggunakan Teknik PCR (Polimerase Chain Reaction) Oleh Saswiyanti E, dkk. 13-19</p> <p>Panduan Penulisan Naskah 20-21</p>



## **Daftar Isi**

Pengembangan Diagnosa  
Penyakit Newcastle Disease (ND)  
Menggunakan Teknik Polimerase  
Chain Reaction (PCR) di BPPV Reg. III  
Oleh  
Diyah Cahyaningsari, dkk.  
1-5

Kajian Epidemiologi Eimeria Sp  
Di Wilayah Sumatera Bagian Selatan  
Oleh  
IGNA. Wisnu Adi Saputra, dkk.  
6-12

Pengembangan Metode Identifikasi  
Penyakit Brucellosis dengan  
Menggunakan Teknik PCR  
(Polimerase Chain Reaction)  
Oleh  
Saswiyanti E, dkk.  
13-16

# **PENGEMBANGAN DIAGNOSA PENYAKIT NEWCASTLE DISEASE (ND) MENGUNAKAN TEHNIK POLIMERASE CHAIN REACTION (PCR) DI BPPV REGIONAL III**

Cahyaningsari,D., Srihanto,E.A, Firwantoni, Wirdanila., Rumpaka ,R

## **ABSTRAK**

*Newcastle Disease merupakan penyakit pada unggas yang disebabkan oleh Paramyxovirus. Meskipun penyakit ini tidak bersifat zoonosis, tetapi dampak negatif yang ditimbulkan pada peternakan unggas sangat besar terutama pada sektor perekonomian. Saat ini, penyakit Newcastle Disease jarang terdeteksi dan hampir terlupakan karena adanya penyakit Avian Influenza yang mempunyai gejala klinis yang hampir sama dengan Newcastle Disease tetapi bersifat zoonosis. Salah satu cara untuk mendiagnosa penyakit Newcastle Disease adalah dengan teknik Polymerase Chain Reaction (PCR). Teknik PCR merupakan uji laboratorium yang sensitif dan spesifik untuk mendiagnosa suatu penyakit dengan cepat dan akurat. DNA virus penyebab Newcastle Disease terletak pada posisi 305 bp dengan menggunakan uji cPCR.*

*Kata kunci : Newcastle Disease, PCR*

## **ABSTRACT**

*Newcastle Disease is an infectious disease in poultry caused by Paramyxovirus. A virus does not cause problems in human but it gives bad effects in poultry such as high mortality. Recently, Newcastle Disease is not priority case because of an outbreak of Avian Influenza. The clinical signs of NDV are similar with Avian Influenza but the impacts of the diseases are little bit different. Avian Influenza could attack human while Newcastle Disease is not responsible problems in human. Based on the reason, we develop PCR assay to diagnose Newcastle Disease quickly and accurately. The position of DNA is on 305 base pair.*

*Key words : Newcastle Disease, PCR*

## **I. PENDAHULUAN**

Penyakit tetelo pertama kali ditemukan di Indonesia pada tahun 1926 di pulau Jawa. Sedangkan penyebaran penyakit ini hampir menyeluruh di dunia terutama di Asia, Amerika, Afrika dan sebagian Eropa. Hanya di negara-negara Oceania saja yang relatif bebas dari penyakit ini (Calnek, et.al, 1991).

Penyakit Tetelo (Newcastle Disease) dewasa ini merupakan salah satu penyakit yang jarang terdeteksi karena adanya outbreak Avian Influenza di Indonesia sejak tahun 2004. Keberadaan penyakit ini seakan terlupakan oleh kepopuleran Avian Influenza. Hal ini disebabkan karena Newcastle disease tidak dapat menyerang manusia (zoonosis) walaupun kerugian yang ditimbulk pada sektor peternakan unggas

tidak kalah besar bila dibandingkan dengan Avian Influenza. Angka mortalitas dan morbiditasnya hampir sama dengan penyakit Avian Influenza. Dari data laporan tahunan Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner Regional III Lampung tahun 2005-2009 tidak ditemukan adanya laporan tentang adanya virus ND. Tetapi hal ini tidak menggambarkan kondisi virus ND di lapangan karena tertutup oleh outbreak dan penanganan Avian Influenza yang penyebarannya semakin luas (Anonim, 2005-2009).

## II. TINJAUAN PUSTAKA

Newcastle Disease (ND) disebabkan oleh *Paramixovirus* yang termasuk famili *Paramixoviridae*. Virus ini termasuk golongan virus beramplop dengan genom yang terdiri atas RNA berserat tunggal (ssRNA), tidak bersegmen dan berpolarisasi negatif. Genom virus ND menyandi enam protein yaitu nukleokapsid (NP), matriks (M), phosphoprotein (P), Fusion (F), haemagglutinin-neuroamidase (HN) dan RNA polimerase (L).

Amplop virus ND terdiri atas dua macam *glikoprotein* yang sangat penting perannya dalam infeksi virus tersebut ke sel host yaitu HN dan F. Penggabungan kedua protein tersebut sangat menentukan dalam mekanisme infeksi virus ND. Protein HN berfungsi untuk melekatkan virion ke sel host sedangkan protein F berfungsi penetrasi virus ke dalam sel host, penghancuran sel target dan menginduksi terjadinya penggabungan membran (Horvath, et.al, 1992).

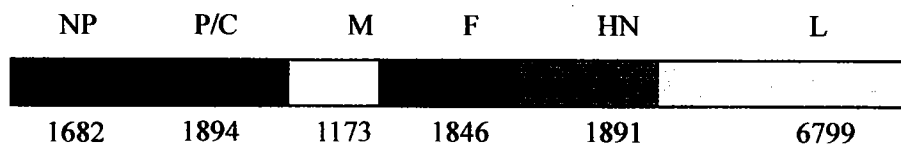
Panjang genomnya 15-16 kb (Fenner, et.al, 1993).

## III. MATERI DAN METODE

### A. Materi

Materi yang digunakan dalam pendiagnosaan adalah sebagai berikut :

1. Sampel berupa organ (paru-paru, trakhea, limpa)
2. Isolat sebagai kontrol positif



**Gambar 1. Skema Paramixovirus**

3. Purelink™ viral RNA/DNA mini kit cat.no. 12280-050
4. Alkohol absolut
5. Loading dye
6. DNA ladder 50 bp
7. Ethidium bromide
8. TAE 1x

Reagen yang digunakan untuk amplifikasi menggunakan reagen produk Invitrogen dengan label SuperScript III One Step RT-PCR with Platinum Taq cat.no. 12574-026

Sedangkan primer yang digunakan adalah sebagai berikut :

1. Forward: 5'-TACACCTCATCCCAGACAGG - 3'
  2. Reverse: 5-AGTCGGAGGATGTTGGCAGC - 3'
- (Primer berasal dari manual standart pengujian ND AAHL Gelong, Australia)

### B. Metode

Metode yang digunakan adalah One Step Reverse Transkriptase PCR. Adapun formulasi untuk master mix yang digunakan sebagai berikut :

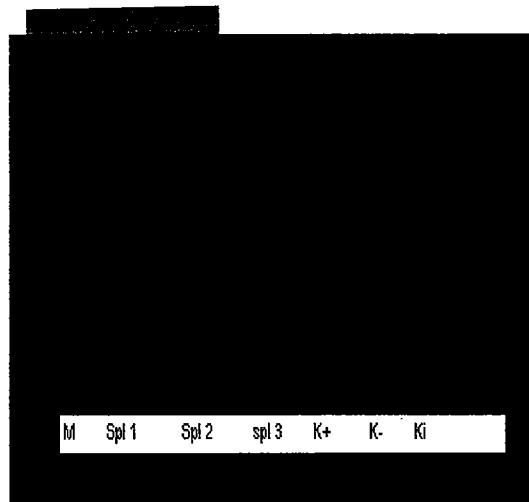
PCR 2x Mix	:	12,5	µl
SS III Platinum Taq	:	1	µl
Forward Primer	:	1	µl
Reverse Primer	:	1	µl
NFW	:	7	µl
t-RNA	:	2,5	µl

Program amplifikasi DNA adalah sebagai berikut :

- Siklus 1 : (1x) Step 1 : 50<sup>0</sup> C selama 30 menit
- Siklus 2 : (1x) Step 1 : 94<sup>0</sup> C selama 5 menit
- Siklus 3 : (35x) Step 1 : 94<sup>0</sup> C selama 40 detik  
Step 2 : 50<sup>0</sup> C selama 30 detik  
Step 3 : 72<sup>0</sup> C selama 1 menit
- Siklus 4 : (1x) Step 1 : 72<sup>0</sup> C selama 4 menit
- Siklus 5 : (1x) Step 1 : 4<sup>0</sup> C∞

### IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

Setelah amplifikasi dilakukan pembacaan hasil dibawah UVP Transiluminator. Hasil yang diperoleh adalah sebagai berikut :



Gambar 2: Hasil PCR Identifikasi Virus Newcastle Disease

Amplifikasi DNA virus ND menunjukkan hasil band di posisi 305 bp (Ukuran ladder 50 base pair). Primer

yang digunakan mengamplifikasi pada region gene F (Fusion).

Penyakit ND merupakan penyakit menular unggas yang sangat penting walaupun sekarang perannya kurang populer karena keberadaan Penyakit Avian Influenza. Penggunaan metode uji yang cepat dan mempunyai sensitifitas serta spesifisitas yang tinggi sangat diperlukan dalam upaya pencegahan dan pendiagnosaan penyakit. Penggunaan metode uji konvensional seperti inokulasi pada telur ayam bertunas dan identifikasi virus dengan uji haemaglutinasi atau hambatan haemaglutinasi masih dipakai dan diperlukan tetapi membutuhkan waktu yang relatif lama (Ali dan Reynold, 2000). Diagnosa dengan teknik konvensional (isolasi pada telur ayam bertunas yang dilanjutkan dengan uji HA dan HI) membutuhkan waktu yang relatif lebih lama (1 minggu), sehingga pengujian dengan pendekatan biologi molekuler seperti teknik PCR sekarang ini mulai dikembangkan dan dipakai untuk mendeteksi penyakit hewan seperti ND.

## V. KESIMPULAN

Newcastle Disease merupakan penyakit strategis pada unggas yang saat ini kurang mendapat perhatian karena adanya wabah Avian Influenza yang bersifat zoonosis. Pengujian dengan pendekatan biologi molekuler seperti teknik PCR sekarang ini mulai dikembangkan dan dipakai untuk mendeteksi penyakit hewan seperti ND. DNA virus penyebab Newcastle Disease terletak pada posisi 305 bp dengan menggunakan uji cPCR.

## VI. DAFTAR PUSTAKA

1. Anonim. Laporan Tahunan Penyakit Hewan BPPV Regional III Lampung. 2005-2010. Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner Regional III Lampung. Lampung;
2. Ali A, Reynold DL. 2000. A multiplex reverse transcription polymerase chain reaction assay for Newcastle disease virus and Avian pneumovirus (Colorado strain). *Avian Dis* 44: 938-943;

3. Calnek, BW, Barnes, HJ, Beard, CW, Reid, WM, Yoder Jr., HW. 1991. Disease of Poultry, 9<sup>th</sup> edition. Iowa State University Press. Iowa. 496-505;
4. Fenner, FJ, Gibbs, EPJ, Murphy, FA, Studdert, RRMJ, White, DO. 1993. Veterinary Virology. 2<sup>nd</sup> edition, Academic Press. Inc. 471-480;
5. Horvath CM, Paterson RG, Shaughnessy MA, Wood R, Lamb RA. 1992. Biological activity of paramyxovirus fusion proteins: Factors influencing formation of syncytia. *J Gen Virol* 66: 4564-4569;
6. Mirah AAA, Astawa NM, Putra KSA, Matsumoto Y. 2008. Deteksi Virus Penyakit Tetelo Isolat Lapangan dengan Metode *Nested Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*. *Jurnal Veteriner* Vol. 9 No 3,1-7.

# KAJIAN EPIDEMIOLOGI *Eimeria Sp.* DI WILAYAH SUMATERA BAGIAN SELATAN TAHUN 2009

Wisnu Adi Saputra, I G.N.A., Ediwan, Slamet

## ABSTRAK

Koksidiosis adalah suatu penyakit parasiter yang disebabkan oleh *Eimeria sp.* Tulisan ini hendak menggambarkan epidemiologi *Eimeria sp.* di Wilayah Sumatera Bagian Selatan tahun 2009. Metode yang digunakan adalah analisis deskriptis dari hasil pemeriksaan sampel feses di Laboratorium Parasitologi BPPV Regional III tahun 2009. Berdasarkan hasil uji feses penyebarannya meliputi sebagian kabupaten/kota di Wilayah Sumatera Bagian Selatan meliputi Provinsi Lampung sejumlah 32%, Sumatera Selatan 14%, Bengkulu 20% dan Kepulauan. Bangka Belitung 6%.

*Eimeria sp.* menyerang semua jenis hewan dengan populasi terbesar positif *Eimeria sp.* dari hasil pengujian Mc Master adalah pada ternak sapi sebesar 95%. Upaya Pencegahan harus terus dilakukan mengingat dampak dari penyakit yang ditimbulkan *Eimeria sp.* (Koksidiosis), bukan saja hewan mengalami diare yang kadang disertai darah namun juga mengalami gangguan pertumbuhan (kurang gizi) dan anemia serta akan mengganggu aktifitas performa umum hewan.

**Kata kunci:** Koksidiosis, *Eimeria sp.*, epidemiologi, Sumatera Bagian Selatan

## ABSTRACT

Coccidiosis is a parasitic disease caused by *Eimeria sp.* This article will describe the epidemiology of *Eimeria sp.* in areas of southern Sumatra in 2009. The method used is descriptive analysis of the results of faecal sample in the Parasitology Laboratory DIC Regional III in 2009. Based on the results of stool tests include the partial distribution districts in southern Sumatra area covers some 32% of Lampung, South Sumatra 14%, Bengkulu 20% and Bangka Belitung Islands 6%.

*Eimeria sp.* attack all kinds of animals with the largest population of positive *Eimeria sp.* from Mc. Master of test result is at 95% of cattle. Prevention efforts should continue to be done considering the impact of the disease caused *Eimeria sp.* (Coccidiosis), not just animals experiencing diarrhea which is sometimes accompanied by blood but also experienced growth retardation (malnutrition) and anemia as well as general performance activities will disturb the animals.

**Keywords:** Coccidiosis, *Eimeria sp.*, Epidemiology, Southern Sumatra.

## I. PENDAHULUAN

*Eimeria sp* merupakan filum *Apicomplexa*, kelas *Sporozoea*, subkelas *Coccidia*, ordo *Eucoccidiidae*, subordo *Eimeriina*, famili koksidiosis adalah suatu penyakit parasitik yang disebabkan oleh *Eimeria sp.* dan

genus *Eimeria*. Sedangkan koksidiosis adalah suatu penyakit parasitik yang disebabkan oleh *Eimeria sp.* Penyebab koksidiosis yang telah diidentifikasi ialah 8 spesies genus *Eimeria* yakni *Eimeria*



*debliecki*, *Eimeria perminuta*, *Eimeria suis*, *Eimeria polita*, *Eimeria neodebliecki*, *Eimeria porci*, *Eimeria scabra* dan *Eimeria spinosa* serta satu *Isospora* yakni *Isospora suis* (Chhabra dan Mafukidze, 1992).

Spesies *Eimeria sp.* dapat diidentifikasi berdasarkan sifat-sifat yang spesifik, yaitu lokasi lesi pada usus, gambaran lesi makroskopik, ukuran, bentuk dan warna oosista, ukuran skison dan merozoit, lokasi parasit di dalam jaringan (jenis sel sasaran), periode prepaten minimum pada infeksi buatan, waktu minimum untuk sporulasi dan sifat monogenisitas terhadap galur *Eimeria sp.* yang murni.

Siklus hidup dari semua anggota eimeria tidak jauh berbeda. Oosista yang keluar bersama tinja terdiri dari satu sel, sporon. Sel ini diploid yang selanjutnya akan menjadi haploid. Pertumbuhan oosista membutuhkan oksigen. Sporon membagi menjadi empat sporoblas, masing-masing akan menjadi sebuah sporokista, dan dua sporozoit akan terbentuk di dalamnya (Levine, 1994).

Spesies yang berbeda akan memberikan gejala klinis yang berbeda pula, gejala klinis yang ditimbulkan bervariasi pada infeksi bermacam spesies dan juga pada

jumlah koksidia yang banyak sedikitnya jumlah koksidia yang menginfeksi dan resistensi hospes. Spesies yang kurang patogen tidak atau sedikit menunjukkan gejala klinis. Gejala klinis dari penyakit ini adalah lesu, nafsu makan turun dan tinja bercampur darah. Diagnosis dari penyakit ini adalah dengan pemeriksaan tinja (feses), kerokan usus atau isi usus. Hewan yang sembuh dari koksidiosis akan mempunyai sejumlah antibodi yang bersifat sementara terhadap spesies *Eimeria* tertentu, kecuali jika hewan tersebut kontak lagi dengan *Eimeria sp.* yang sama.

Diagnosa koksidiosis berdasarkan pemeriksaan mikroskopik feses atau kerokan lesi spesifik, penilaian lesi (*lesion scoring*), penilaian feses (*droppings scoring*) dan histopatologi. Spesies *Eimeria* dapat diidentifikasi dari ukuran oosista, bentuk oosista, lokasi dalam pencernaan, lesi yang ditimbulkan, periode prepaten dan waktu sporulasi.

Ada tiga metode untuk menangani koksidiosis yang pertama adalah oosists dengan mengeliminasi dengan cara membersihkan dan mendisinfeksi kandang serta menjaga sanitasi.

Kedua dengan menggunakan obat- obat anti koksidia. Cara ini cukup berhasil dipakai pada peternakan ayam pedaging. Ketiga dengan menimbulkan kekebalan (vaksinasi). Kekebalan ayam dapat diperoleh dari infeksi alami maupun buatan (Ettinger, S. J. and Feldman, E.C., 1995; Fadilah, R dan Polana A., 2004).

Distribusi *Eimeria* sp. di Wilayah Sumatera Bagian Selatan (Provinsi Lampung, Sumatera Selatan, Bengkulu dan Kepulauan Bangka Belitung) pada tahun 2009 sangat menarik untuk dikaji. Pada tulisan ini, aspek epidemiologinya akan dibahas.

## II. MATERI DAN METODE

Sampel feses berasal dari seluruh provinsi di Wilayah Sumatera Bagian Selatan selama tahun 2009. Selanjutnya sampel feses dilakukan pemeriksaan dengan metode uji Mc. Master.

Pengamatan epidemiologi meliputi jenis hewan, lokasi serta data yang lengkap yang diperoleh melalui wawancara dengan peternak, petugas peternakan di kecamatan dan kabupaten, selanjutnya data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif.

## III. GAMBARAN EPIDEMIOLOGI

### *Eimeria* Sp.

Epidemiologi *Eimeria* sp. yang disampaikan adalah gambaran tentang distribusi dan determinan (faktor utama) terjadinya penyebaran *Eimeria* sp. dalam suatu populasi. Berdasarkan etiologi (kausa) suatu agen penyakit infeksi dan non infeksi, *Eimeria* sp. ini diklasifikasikan sebagai mikroorganisme penyebab penyakit yang dapat ditularkan (*Communicable Diseases-biological agents*).

Selama tahun 2009, Laboratorium Parasitologi BPPV Regional III telah melakukan pengujian terhadap 573 sampel feses yang berasal dari penerimaan sampel dan pengambilan sampel ke lapangan. Dari seluruh feses yang diuji dapat disajikan data pada tabel sebagai berikut :

**Tabel 1. Hasil Pengujian Feses di Provinsi Lampung Tahun 2009**

Provinsi	Kota/Kab	Kecamatan	Jenis Hewan	Øsample feses	Ø Eimeria sp.
L A M P U N G	Lampung Selatan	Sidomulyo	Sapi	9	4
	Lampung Barat	Ngambur	Sapi	22	14
	Lampung Tengah	Seputih Raman	Babi	1	1
	Metro	Metro Utara	Sapi	3	-
			Metro Selatan	Sapi	4
	Tulang Bawang	Menggala	Sapi	3	-
			Kambing	2	1
			Babi	1	-
	Tulang Bawang Tengah	Banjar Marga	Ayam	1	-
			Ayam	2	2
	Mesuji	Tanjung Raya	Sapi	5	-
			Seputih Pematang	Sapi	2
	Pringsewu	Sukoharjo	Sapi	14	3
	Way Kanan	Baradatu	Sapi	47	17
	Tanggamus	Pagelaran	Sapi	27	5
	Lampung Utara	Abung Timur	Sapi	1	-
Blambangan Pagar			Sapi	18	4
Sungkai Tengah			Babi	2	1
<b>JUMLAH</b>				<b>164</b>	<b>52</b>

**Tabel 2. Hasil Pengujian Feses di Provinsi Sumatera Selatan Tahun 2009**

Provinsi	Kota/Kab Sumsel	Kecamatan	Jenis Hewan	Øsampel feses	Ø Eimeria sp.	
S U M A T E R A  S E L A T A N	Lubuk Linggau	L.Linggau Selatan	Sapi	11	1	
		L. Linggau Timur	Sapi	6	-	
		L. Linggau Utara	Sapi	3	-	
		L. Linggau Barat	Sapi	1	-	
	Muara Enim	Gunung Megang	Sapi	28	5	
			Gelumbang	Sapi	1	-
	Banyu Asin	Banyu Asin III	Sapi	19	9	
	Musi Banyu Asin	Lais	Sapi	56	2	
	Ogan Ilir	Indralaya Utara	Sapi	4	-	
	Empat Lawang	Pendopo	Sapi	3	1	
			Lintang Kanan	Sapi	1	1
			Tebing Tinggi	Sapi	5	2
	Ogan Komering Ulu	Lubuk Batang	Sapi	16	1	
			Baturaja Timur	Sapi	18	-
	Ogan Komering Ulu Timur	Buay Madang	Sapi	7	3	
	Lahat	Lahat	Sapi	46	5	
	Pagar Alam	Dempo Utara	Sapi	16	5	
			Dempo Tengah	Sapi	1	-
			Pagar Alam	Ayam	6	-
			Pagar Alam Utara	Sapi	8	-
	Ogan Komering Ulu Selatan	Simpang	Sapi	4	1	
			Muara Dua	Sapi	14	4
	Musi Rawas	Sukakarya	Sapi	3	-	
Tuah Negeri			Sapi	2	-	
<b>JUMLAH</b>				<b>279</b>	<b>40</b>	

**Tabel 3. Hasil Pengujian Feses di Provinsi Bengkulu Tahun 2009**

Provinsi	Kota/Kab	Kecamatan	Jenis Hewan	Ósampil feses	Ó Eimeria sp.
B E N G K U L U	Bengkulu Selatan	Kedurang Ilr	Sapi	2	2
		Pino	Sapi	4	2
		Pasar Manna	Sapi	1	1
			Ayam	3	-
		Pino Raya	Ayam	1	-
	Bengkulu	Gading Cempaka	Sapi	1	-
		Selebar	Sapi	2	-
	Rejang Lebong	Sindang Kelingi	Sapi	9	1
		Selupu Rejang	Sapi	12	1
	Kaur	Kaur Utara	Sapi	2	-
		Lungkung Kule	Sapi	3	1
		Padang Guci Hulu	Sapi	3	2
		Kaur Selatan	Sapi	2	-
		Semidang Gumay	Sapi	1	-
	Muko-muko	Air Dikit	Sapi	1	1
		Ipoh	Sapi	1	-
	Bengkulu Tengah	Pondok Kelapa	Babi	1	-
		Talang Empat	Kambing	2	2
			Sapi	2	-
		Karang Tinggi	Sapi	5	-
		Taba Penanjung	Sapi	4	-
	Kaur	Kelam Tengah	Sapi	2	-
		Tanjung Kemuning	Sapi	2	-
<b>JUMLAH</b>				<b>66</b>	<b>13</b>

**Tabel 4. Hasil Pengujian Feses di Provinsi Kep. Bangka Belitung Tahun 2009**

Provinsi	Kota/Kab	Kecamatan	Jenis Hewan	Ósampil feses	Ó Eimeria sp.
K E P U L A U A N  B A B E L	Belitung Timur	Dandang	Sapi	3	1
		Gantung	Sapi	2	2
	Bangka Barat	Mentok	Ayam	2	-
		Pangkal Pinang	Bukit Intan	Sapi	17
	Gerunggang		Sapi	9	-
	Bangka Tengah	Pangkalan Baru	Sapi	1	-
		Sungai Selam	Sapi	1	-
	Bangka	Sungai Liat	Sapi	1	-
		Belinyu	Sapi	14	-
	Bangka Selatan	Toboali	Sapi	2	-
		Tukak Sadai	Sapi	6	-
	Belitung	Tanjung Pandan	Sapi	3	-
		Badoli	Sapi	1	-
		Membalong	Sapi	2	-
	<b>JUMLAH</b>				<b>64</b>

Dari tabel dapat diketahui persentase hasil positif *Eimeria sp.* dari total sampel yang diuji untuk Provinsi Lampung sejumlah 32%, Sumatera Selatan 14%, Bengkulu 20% dan Kep. Bangka Belitung 6%..

Sebaran hasil positif *Eimeria sp.* dari sampel yang diuji berdasarkan jenis ternak yang terserang adalah sapi 95%, kambing 3%, ayam 0% dan babi 2% (Anon., 2009).

#### IV. PEMBAHASAN

*Eimeria sp.* telah tersebar di sebagian kabupaten/kota di Wilayah Sumatera Bagian Selatan. Secara epidemiologik, Provinsi Lampung merupakan pintu masuk Pulau Sumatera yang juga merupakan jalur transportasi utama ternak dari Pulau Jawa menuju Pulau Sumatera atau sebaliknya. Tingginya persentase sampel positif *Eimeria sp.* di Lampung, selain karena lancarnya transportasi ternak juga karena populasi ternak di Lampung yang cukup tinggi serta tindakan biosekuriti dan sanitasi di peternak yang masih rendah.

Hampir semua jenis hewan ternak dapat terserang *Eimeria sp.*, dimana persentase tertinggi positif *Eimeria sp.* dari hasil uji sampel terdapat pada ternak sapi (95%).

Penularan yang paling penting adalah kontak langsung dari hewan sakit, bahan atau peralatan tercemar, petugas atau peternak yang pernah kontak dan berpindah-pindah. Mengingat penyakit yang disebabkan *Eimeria sp.* (Koksidiosis) cenderung tinggi pada musim penghujan, maka perlu diwaspadai terjadinya Koksidiosis pada bulan Januari-Februari. Saat musim penghujan dan suhu relatif serasi, *Eimeria sp.* menjadi relatif stabil disertai banyak hewan yang tidak memiliki antibodi protektif maka peluang terjadinya penyakit Koksidiosis sangat besar (Jawetz, Melnick, & Adelberg, 2001).

#### V. KESIMPULAN

Tulisan ini memberikan gambaran epidemiologi untuk melakukan pencegahan dan penanggulangan penyakit yang disebabkan oleh *Eimeria sp.* (Koksidiosis) di Wilayah Sumatera Bagian Selatan selama tahun 2009.

Walaupun prevalensi positif sampel *Eimeria Sp.* masih cukup rendah (19%) namun upaya pencegahan dan penanggulangan harus terus dilakukan agar prevalensinya dapat lebih diminimalkan.

pertumbuhan hewan dapat diminimalkan misalnya kurang gizi serta anemia yang sangat mempengaruhi performa hewan.

[www.taxonomy.nl/taxonomicon/TaxonTree.aspx?id=660](http://www.taxonomy.nl/taxonomicon/TaxonTree.aspx?id=660)

## VI. DAFTAR PUSTAKA

1. Anonim, 2009. Laporan Tahunan BPPV Regiona III Tahun 2009;
2. Chhabra, R.C dan Mafukidze, R.T. 1992. Prevalence of coccidia in pigs in Zimbabwe. *Vet Parasitol.* 41(1-2):1-5;
3. Ettinger, Stephen J.; Feldman, Edward C. 1995. *Textbook of Veterinary Internal;*
4. *Medicine* (4th ed.). Philadelphia: W.B. Saunders Company. Pp. 385;
5. Jawetz, Melnick, & Adelberg, 2001. *Medical Microbiology.* Diterjemahkan oleh Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Penerbit ;
7. Salemba Medika, Jakarta. Hal. 364-367;
8. Levine, N.D. 1994. *Parasitologi Veteriner*, terjemahan *Textbook of Veterinary ;*
9. *Parasitology.* Gadjah Mada University Press, Yogyakarta. Hal. 58-68;
10. Roni Fadilah dan Agustin Polana. 2004. *Aneka Penyakit pada Ayam & Cara Mengatasinya.* AgroMedia. Hal.102-104

# **PENGEMBANGAN METODE IDENTIFIKASI PENYAKIT BRUCELLOSIS DENGAN MENGGUNAKAN TEKNIK PCR (*Polymerase Chain Reaction*)**

*Saswiyanti, E., Srihanto, E.A, Cahyaningsari, D., Wirdanila, Firwantoni*

## **Abstrak**

*Telah dilakukan pengembangan metode identifikasi penyakit brucellosis dengan menggunakan teknik PCR. Pengujian dilakukan dengan menggunakan reagent kit khusus dan primer Brucella. Kontrol positif yang dipakai berasal dari bakteri Brucella abortus hasil isolasi. Selanjutnya diamplifikasi dengan membandingkan dengan kontrol positif.*

*Pengujian dilakukan menggunakan reagent kit khusus untuk bakteri Brucella abortus, sampel tersebut diamplifikasi untuk mendapatkan kopi DNA untuk dapat dianalisa dan primer BCSP 31. Dengan sensitifitas dan spesifisitas yang dimiliki PCR mampu mendeteksi target yang seminimal mungkin sehingga terjadinya positif palsu dapat dihindari.*

*Dari hasil pemeriksaan menunjukkan bands (pita) yang mengandung DNA bakteri Brucella abortus terletak pada posisi 223 bp. Baik primer BCSP 31 maupun kit khusus dapat mendeteksi adanya bakteri Brucella abortus. Oleh karena primer BCSP 31 belum spesifik mendeteksi spesies Brucella maka perlu pengembangan lebih lanjut dengan primer yang lebih spesifik.*

---

*Kata kunci : PCR, BCSP 31, Brucellosis*

## **Abstract**

*Development of the disease brucellosis identification method using PCR technique has been performed. Tests using a special kit reagents and primers Brucella. Positive control used Brucella abortus derived from the isolated bacteria. Furthermore, amplified by comparing with positive control.*

*Tests using reagent kits specifically for the bacteria Brucella abortus, the sample is amplified to obtain copies of DNA to be analyzed and primers BCSP 31. With sensitivity and specificity of PCR can detect the target possessed the minimum as possible so that the occurrence of false positive can be avoided.*

*From the results of the examination showed bands (bands) containing the bacteria Brucella abortus DNA located at position 223 bp. Both primary BCSP31 or kit can detect the existence of Brucella abortus. Therefore BCSP31 primary is not yet a specific primer is not able to detect the species of Brucella that further development with more specific primers.*

*Keywords : PCR, BCSP 31, Brucellosis*

## I. PENDAHULUAN

Brucellosis adalah penyakit hewan menular strategis yang ditandai dengan terjadinya keguguran sampai dengan kemajiran pada ternak. Penyakit ini termasuk penyakit zoonosis yang masuk dalam prioritas pemerintah untuk bebas Brucellosis.

Brucellosis disebabkan oleh Bakteri genus *Brucella*. Secara umum ada empat spesies *Brucella* tergantung dari inang atau *hostnya*, yaitu *Brucella abortus* yang biasa ditemukan pada sapi, *Brucella melitensis* yang biasa ditemukan pada kambing, *Brucella suis* yang biasa ditemukan pada babi dan *Brucella canis* yang biasa ditemukan pada anjing.

Bakteri ini bersifat gram negatip, aerob, tidak berspora dan berbentuk coccus/coccobacilli dengan diameter 0,5-0,7  $\mu\text{m}$  dengan panjang 1,5  $\mu\text{m}$ , hidup intra seluler tetapi kadang – kadang bias bereplikasi di RE (*Reticulo Endoplasmic*). Oleh karena itu infeksi oleh bakteri ini bersifat *carrier* atau *latent* dan sulit diatasi dengan antibiotic biasa. Pengendalian Brucellosis positif biasanya adalah *Test and Slaughter* terutama pada daerah dengan prevalensi rendah.

Telah banyak metode yang dikembangkan untuk mendiagnosa penyakit ini baik secara serologis (*RBPT* atau *Rose Bengal Plate Test*, *CFT* atau *Complement Fixation Test*, *ELSA*), kultur maupun biologi molekuler. Metode serologis paling banyak digunakan untuk diagnosa terutama untuk pengendalian kebijakan *Test and Slaughter* yaitu *RBPT* dan *CFT*. Walaupun demikian metode ini masih memiliki kelemahan yaitu kemungkinan cross reaksi dan sulitnya dibedakan hasil infeksi alam atau vaksinasi jika menggunakan strain S19. Pada kultur walaupun akurasi tinggi tetapi memerlukan waktu yang lama. Oleh karena itu perlu suatu pengembangan diagnosa yaitu secara biologi molekuler yaitu dengan PCR.

PCR (*Polimerase Chain Reaction*) sebagai salah satu metode uji yang menggunakan teknologi biologi molekuler sangat penting artinya bagi perkembangan diagnosa penyakit hewan baik yang disebabkan oleh virus, bakteri dan parasit. PCR sebagai salah satu metode uji mempunyai peranan yang sangat penting dalam membantu mendiagnosa penyakit dengan cepat dan lebih akurat. Kemampuan yang dimiliki oleh teknologi uji PCR dalam memperbanyak DNA target yang dicari secara spesifik, akan sangat bermanfaat dan dapat diandalkan

untuk diagnosa penyakit yang disebabkan oleh agen virus, bakterial dan agen infeksius lainnya.

Secara molekuler *Brucella* mengandung 2 kromosom yang sirkuler kromosom 1 terdiri dari 2.124.241 bp yang mengkode 2200 gen kromosom 2 terdiri dari 1.162.204 bp yang mengkode 1156 gen. Gen tersebut antara lain: capsules, fimbriae, exotoxins, cytolysins, resistance forms, antigenic variation, plasmids, or lysogenic phages (Bricker, 2002). Telah banyak publikasi yang diterbitkan tentang metode ini. Beberapa primer telah didesain untuk mendeteksi genus *Brucella* maupun spesifik *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella canis* ataupun *Brucella suis*. Beberapa contoh primer yang dapat digunakan primer BCSP 31 (6) atau 16S – rRNA (7) yang mendeteksi DNA fragment dari gen yang mengkode

5' TGGCTCGGTTGCCAATATCAA 3'  
*Brucella cell surface protein (BCSP31)*, OMP 2a atau OMP 2b yang mengkode outer membrane protein. Karena gen – gen yang mengkode *Brucella* lebih banyak didaerah tersebut dengan dua daerah 85 % homolog (Imaoka et al, 2007).

Spesimen yang dapat digunakan untuk uji PCR yaitu : *aborted fetus, fetal*

*membranes*, cairan vagina, susu, semen, cairan sendi. Untuk hewan dapat diambil organ – organ terutama *reticulo – endotelial system* seperti limfoglandula terutama *limfoglandula mammary* dan *genital* serta limpa.

## II. MATERI DAN METODE

### A. MATERI

1. Sebanyak 2 sampel *Brucella abortus* positif.
2. Kuman *Brucella abortus* hasil isolasi sebagai kontrol positif.
3. Reagen Kit untuk PCR lot – No. Ref.MK063 (Genekam)
4. Primer *Brucella abortus*  
FORWARD  
5'CGCGCTTGCCTTTCAGGT 3'  
REVERSE :  
5'TGGCTCGGTTGCCAATATCAA 3'

Materi yang lainnya :

- PureLink RNA/DNA Purification Kit cat.no. 12280-027
- Ethanol absolute cat.no. 1.00983.2500 (Merck)
- Agarose cat. no. 15510-027
- TAE cat.no. 161-0743
- Ethidium Bromide cat.no. 161-0433
- 100 bp DNA Ladder cat. no. 15628-019
- Loading Dye cat. no. G.2101

- Platinum Blue Supermix / Accuprime Supermix

## A. METODE

### B.1 Metode Ekstraksi

1. Ambil 200  $\mu$ l suspensi cairan abortus dari sapi dan masukkan ke dalam mikrotube 1,5 ml;
2. Masukkan 200  $\mu$ l lisis buffer kedalam mikrotube/ collection tube yang sudah berisi sample. Masukkan 25 $\mu$ l Proteinase K. Vortek sampai rata;
3. Inkubasikan di dalam waterbath dengan suhu 56<sup>0</sup>C selama 15 menit;
4. Tambahkan 250  $\mu$ l ethanol absolute ke dalam mikrotube tadi. Vortek dan inkubasikan pada suhu ruang selama 5 menit;
5. Pindahkan semua suspensi ke dalam spin column;
6. Sentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm selama 1 menit dengan suhu 4<sup>0</sup>C;
7. Buang supernatan, ganti dengan collection baru, masukkan 500  $\mu$ l Wash Buffer ke dalam spin column;
8. Sentrifuse dengan kecepatan 10.000 rpm selama 1 menit dengan suhu 4<sup>0</sup>C;
9. Buang supernatan, masukkan 500  $\mu$ l Wash Buffer ke dalam spin column;

10. Sentrifuse dengan kecepatan 10.000 rpm selama 1 menit dengan suhu 4<sup>0</sup>C;
11. Buang supernatan,; ganti dengan recovery tube, masukkan RNase Free Water sebanyak 50  $\mu$ l ke dalam spin column;
12. Sentrifuse dengan kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit dengan suhu 4<sup>0</sup>C
13. Buang spin column dan koleksi DNA, simpan dalam suhu -20<sup>0</sup>C.

### B.2 Metode Amplifikasi

Metode 1. (dari kit)

Amplifikasi DNA dengan volume 20  $\mu$ l

-	Reagent Kit Tube A	:	8	$\mu$ l
-	Reagent Kit Tube B	:	10	$\mu$ l
-	DNA sampel	:	2	$\mu$ l

Metode 2 (Primer Brucella)

Amplifikasi DNA

-	PCR Mix	:	21	$\mu$ l
-	Forward Primer	:	1	$\mu$ l
-	Reverse Primer	:	1	$\mu$ l
-	DNA	:	2	$\mu$ l

Untuk program Amplifikasi DNA (dari kit) :

Denaturasi Awal	(1X)	:	93°C	selama	5 menit
Amplifikasi	(35X)	:			
	Denaturasi	:	90°C	selama	60 detik
	Annealing	:	60°C	selama	30 detik
	Ekstensi	:	72°C	selama	60 detik
Ekstensi Akhir	(1X)	:	72°C	selama	7 menit

Kemudian dilakukan elektroforesis pada gel agarose dengan menggunakan voltase 110 volt dengan waktu 25 menit. Pembacaan hasil elektroforesis dilakukan dibawah sinar ultra violet pada alat UVP Transiluminator.

Untuk program Amplifikasi DNA (primer)

Denaturasi Awal	(1X)	:	95°C	selama	5 menit
Amplifikasi	(35X)	:			
	Denaturasi	:	95°C	selama	30 detik
	Annealing	:	53°C	selama	45 detik
	Ekstensi	:	72°C	selama	60 detik
Ekstensi Akhir	(1X)	:	72°C	selama	4 menit

### III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil dari pemeriksaan sampel dapat divisualisasikan sebagai berikut:



Keterangan gambar :

Hasil visualisasi PCR sampel yang diperiksa menunjukkan sebagai berikut :

Marker	:	Sebagai penanda ukuran dalam base pair
SplBru primer	:	Sampel <i>Brucella</i> pengujian menggunakan primer BCSP31
SplBru kit	:	Sampel <i>Brucella</i> pengujian menggunakan kit BCSP 31
K+ Br.	:	Kontrol positif dari bakteri <i>Brucella abortus</i> hasil isolasi menunjukkan letak 223 base pair
K-	:	Kontrol negatif

Dari hasil pengujian PCR didapatkan hasil bakteri *Brucella abortus* hasil isolasi menunjukkan letak di 223 base pair. Primer yang digunakan cocok dan bisa digunakan untuk mendiagnosa *Brucella*. Primer BCSP 31 ini belum spesifik untuk membedakan spesies *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* dan *Brucella suis* (Imaoka et al, 2007)

Pengujian menggunakan metode PCR ini dapat dijadikan alternative walaupun bukan satu – satunya metode mengingat *gold standard* pengujian Brucellosis adalah kultur. Mengingat kebutuhan lapangan yang perlu hasil diagnosa yang cepat dan akurat maka metode ini dapat dikembangkan lebih lanjut. Selain itu metode ini dapat juga digunakan untuk trace – back infeksi untuk mengetahui sumber penyakit. (Asmara, 2010)

Pengembangan lanjutan dari metode ini adalah dengan multiplex PCR, yaitu dengan membandingkan antar primer dan strain bakteri yang ingin dibedakan. Dapat digunakan bermacam – macam primer yang lebih spesifik seperti seperti outer membran protein 2a (omp 2a), omp 2b dan omp 31. Bakteri yang digunakan *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* dan *Brucella suis*. Selain itu dapat juga digunakan juga bakteri lain yang sering bereaksi silang *Brucella abortus* seperti : *Francisella tularensis*, *Vibrio cholerae* dan *Yersenia enterocolitica* atau dibandingkan dengan *Brucella* yang merupakan vaksin strain seperti S19 dan RB 51 dari berbagai daerah yang ada di Indonesia.

# PANDUAN PENULISAN NASKAH VALEBO

1. Velabo memuat tulisan/ karya ilmiah dalam bidang laboratorium medik veteriner khususnya dan bidang kesehatan hewan umumnya. Naskah dapat berupa hasil penelitian, pengamatan, pengujian, kasus lapangan dan tinjauan epidemiologik. *gagasan,*
2. Jadwal penerbitan adalah bulan Juni dan Desember.
3. Redaktur berhak melakukan penyuntingan untuk perbaikan penulisan. Untuk penulisan makalah diharapkan lebih dari 2000 kata atau minimal 4 halaman, termasuk tabel foto dan daftar kepustakaan.
4. Adapun standar dalam penulisan :
  - a. Naskah ditulis dengan jarak 2 spasi kecuali Judul, Abstrak, Judul Gambar, dan Lampiran diketik 1 spasi. Naskah diketik pada kertas ukuran A4 dengan jumlah lebih dari 2000 kata atau minimal 4 halaman termasuk tabel dan gambar yang diketik pada file terpisah dari teks.
  - b. Huruf standar yang digunakan untuk penulisan adalah Times New Roman 12.
  - c. Naskah diketik menggunakan program Microsoft Word, kecuali Tabel dan Grafik menggunakan program Microsoft Excel dan Gambar menggunakan format JPEG atau TIFF.
  - d. Naskah disusun dengan urutan judul, nama penulis, abstrak, pendahuluan, tinjauan pustaka, materi dan metode, hasil dan pembahasan, kesimpulan, ucapan terima kasih (kalau ada) serta daftar pustaka.
5. Adapun Tata Cara Penulisan Naskah :
  - a. ~~JUDUL~~ <sup>atau</sup> harus pendek, spesifik dan informatif dan ditulis dalam Bahasa Indonesia ~~dan~~ Inggris.
  - b. IDENTITAS PENULIS berisi nama lengkap penulis (hindari penggunaan singkatan) dan dibubuhi angka Arab secara berurutan untuk keterangan tentang penulis (bila lebih dari satu penulis).
  - c. ABSTRAK ditulis dalam Bahasa Indonesia dan Bahasa Inggris maksimal 300 kata disertai dengan 3-5 kata kunci.
  - d. PENDAHULUAN berisi latar belakang yang memuat arti penting dan tujuan penelitian, dan diakhiri dengan kegunaan dan/atau harapan hasil penelitian.



- e. TINJAUAN PUSTAKA berisi tentang pustaka yang mendukung dalam penulisan makalah tersebut (jurnal, buku, tesis, disertasi dll)
- f. MATERI DAN METODE Cara penelitian ditulis secara singkat dan disertai cara analisisnya.
- g. HASIL DAN PEMBAHASAN diuraikan secara rinci dan jelas diakhiri dengan kesimpulan penelitian pada alinea terakhir. Foto berwarna atau hitam putih dapat dikirim dengan ukuran maksimum 2R 16 x 21 cm ukuran format naskah (khusus foto mikroskopik disertakan angka scale bar perbesarannya).
- h. KESIMPULAN memuat kesimpulan dari keseluruhan naskah ditulis secara ringkas tetapi menggambarkan substansi hasil penelitian yang diperoleh.
- i. DAFTAR PUSTAKA menurut abjad tanpa nomor urut (lihat contoh). Nama jurnal harus singkat sesuai dengan singkatan yang berlaku.

6. Pustaka :

- a. Menggunakan referensi 10 tahun terakhir dengan proporsi pustaka jurnal di atas 50 %.
- b. Pengutipan pustaka dari internet hanya diperbolehkan dari sumber yang dapat dipertanggungjawabkan, seperti jurnal, instansi pemerintah atau swasta.
- c. Daftar pustaka memuat nama pengarang yang dirujuk dalam naskah, disusun menurut abjad pengarang dan tahun penerbitan. Penulisan pustaka berupa buku: dicantumkan semua nama penulis, tahun, judul buku, penerbit dan kota tempat terbit. Penulisan pustaka berupa jurnal : dicantumkan nama penulis, tahun, judul tulisan, nama jurnal, volume, nomor publikasi dan halaman. Artikel dalam buku dicantumkan nama penulis, tahun, editor, judul buku, penerbit dan tempat. Beberapa contoh sumber acuan adalah sebagai berikut :

Jurnal :

Godfrey, R.W., Collins, J.R., Hensley, E.L., Wheaton, J.E. 1999. Estrus synchronization and artificial insemination of hair sheep in the tropics. *Theriogenology* 51 : 985 – 987.

Buku:

Benjamin, M.M. 1978. *Outline of veterinary Clinical Pathology*, edisi ke-3. The Iowa state University Press, Ames, USA: 61-62.

Contoh terjemahan :

Frandsen, R.D. 1996. *Anatomy and Physiology of Farm Animals*. Edisi ke-4. Diterjemahkan oleh Srigondo, B. Prasena, Soedarsono. UGM Press.: 108 – 522.

Website:

Barendse, W. 2001. DNA markers for meat tenderness. Patent publication number WO02064820. <http://ep.espacenet.com/>. [ 9 Februari 2004].