

VELABO

BULETIN LABORATORIUM VETERINER

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

VELABO	VOL. 24	NO. 02	Hlm : 1 - 20	Bandar Lampung Desember 2007
--------	---------	--------	--------------	---------------------------------

Pengantar Redaksi

Puji dan syukur kita panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, karena berkat karunia-Nya Buletin Laboratorium Veteriner (VELABO) Volume 24, No. 02 Edisi Desember 2007 dapat diterbitkan dan kembali dihadapkan pembaca sekalian.

Pada Velabo ini, pembaca dapat mengupas tentang keberadaan virus Avian Influenza pada ayam buras (*Gallus domesticus*) di Pasar Tradisional Kota Bandar Lampung. Tidak jauh-jauh dari Avian Influenza, pada edisi ini juga diulas tentang penggunaan metode múltipleks PCR untuk mendiagnosa Avian Influenza sub tipe H5N1.

Yang tak kalah menarik adalah ulasan tentang perubahan patologi pada rusa totol (*Axis axis*) yang terserang cacing hati yang diuji pada Laboratorium Patologi BPPV Regional III.

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



Diterbitkan 2 kali setahun oleh :

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

VELABO

Buletin Laboratorium Veteriner

Penanggung Jawab
Kepala Balai Penyidikan dan Pengujian
Veteriner Regional III

Pemimpin Redaksi
Drh. Mardiatmi

Redaktur Pelaksana
Drh. I G.N.A. Wisnu Adi Saputra

Anggota Redaksi
Drh. Sri Marfatuningsih
Drh. Sulinawati

Sekretaris Redaksi
Surtiawati
Sulistiwati

Sirkulasi dan Distribusi
Tuti Mulyani

Alamat Redaksi
Jl. Untung Suropati No. 2 Labuhan Ratu
Kedaton Bandar Lampung - 35412
Telp (0721) 701851 - 772894
Fax (0721) 772894

DAFTAR ISI

Pengantar Redaksi

Daftar Isi

Investigasi Keberadaan Virus Avian Influenza
Pada Ayam Buras (*Gallus domesticus*) di Pasar
Tradisional Kota Bandar Lampung

Oleh : Rismayani Saridewi
1 - 6

Perubahan Patologi Pada Rusa Totol (*Axis axis*)
Yang terserang Cacing Hati Yang Diuji Pada
Laboratorium Patologi BPPV Regional III

Oleh : I G.N.A. Wisnu A.S., dkk
7 - 12

Diagnosa Virus Avian Influenza Subtipe H5N1
Menggunakan Metode Multiplex PCR

Oleh : Srihanto, E.A., dkk
13 - 20

Panduan Penulisan Naskah



INVESTIGASI KEBERADAAN VIRUS AVIAN INFLUENZA PADA AYAM BURAS (*Gallus domesticus*) DI PASAR TRADISIONAL KOTA BANDAR LAMPUNG

Rismayani Saridewi

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian tentang keberadaan virus Avian Influenza pada ayam buras (*Gallus domesticus*) di pasar tradisional kota Bandar Lampung untuk mengetahui seberapa jauh tingkat infeksi virus Avian Influenza di pasar tradisional kota Bandar Lampung.

Pengambilan sampel berasal dari lima pasar tradisional berdasarkan rayon wilayah kota Bandar Lampung melalui uji HI untuk sampel serum darah dan uji PCR untuk sampel swab kloaka.

Hasil yang diperoleh dengan uji HI bahwa pasar Panjang, pasar Tamin, dan pasar Koga memiliki titer antibodi. Sedangkan melalui uji PCR diperoleh hasil bahwa kelima pasar tradisional kota Bandar Lampung (pasar Way Halim, pasar Panjang, pasar Tamin, pasar Smep, dan pasar Koga) terinfeksi virus Avian Influenza tipe A dan dua pasar tradisional kota Bandar Lampung (pasar Way Halim dan pasar Smep) terinfeksi virus Avian Influenza subtype H5.

PENDAHULUAN

Kasus AI di Lampung pertama sekali ditemukan pada bulan September 2003 di kabupaten Tulang Bawang kemudian menyebar di kabupaten/kota dengan kematian unggas 977.718 ekor. Pada tahun 2004 di 9 kabupaten/kota (kecuali kabupaten Way Kanan tidak ada kasus) dengan kematian 1.835.218 ekor unggas. Lalu tahun 2005 di 4 kabupaten/kota (Tanggamus, Tulang Bawang, Bandar Lampung dan Lampung Barat) dengan kematian 4.355 ekor unggas.

Menyusul sampai dengan Februari 2006 di dua kabupaten/kota (Bandar Lampung dan Lampung Selatan) dengan kematian 840 ekor unggas yaitu ayam buras dan burung puyuh (Anonymous, 2007).

Berdasarkan data di atas maka dilakukanlah penelitian ini dengan tujuan untuk mengetahui seberapa jauh tingkat infeksi virus Avian Influenza di pasar tradisional kota Bandar Lampung dengan pengambilan sampel berdasarkan rayon wilayah kota Bandar Lampung melalui uji serologis yaitu



uji *Haemagglutination Inhibition* (uji HI) dan uji biologi molekuler yaitu uji *Polimerase Chain Reaction* (uji PCR).

MATERI DAN METODE

Penelitian diawali dengan pengambilan sampel di lima pasar tradisional kota Bandar Lampung, selanjutnya sampel diperiksa di Laboratorium Virologi dan Bioteknologi Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner Regional III Bandar Lampung pada bulan Maret sampai Mei 2007.

Bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini terdiri dari 150 serum ayam buras (*Gallus domesticus*) dan 150 swab kloaka, diambil dari lima pasar tradisional kota Bandar Lampung (Bandar Lampung Timur diwakili pasar A, Bandar Lampung Selatan diwakili pasar B), Bandar Lampung Barat diwakili pasar C, Bandar Lampung Pusat diwakili pasar D, dan Bandar Lampung Utara diwakili pasar E).

Sampel yang diambil berupa swab kloaka dan serum darah masing-masing 10 ekor setiap pasar dengan tiga kali pengambilan/ulangan (Tabel 1).

Tabel 1. Wilayah dan Jumlah Pengambilan Sampel.

No.	Wilayah Pengambilan Sampel	Ulangan	Kode Pasar	Kode Sampel	Jumlah Serum	Jumlah Swab Kloaka
1.	Pasar Way Halim	I	A1	A1.1-A1.10	10	10
2.		II	A2	A2.1-A2.10	10	10
3.		III	A3	A3.1-A3.10	10	10
4.	Pasar Panjang	I	B1	B1.1-B1.10	10	10
5.		II	B2	B2.1-B2.10	10	10
6.		III	B3	B3.1-B3.10	10	10
7.	Pasar Tamin	I	C1	C1.1-C1.10	10	10
8.		II	C2	C2.1-C2.10	10	10
9.		III	C3	C3.1-C3.10	10	10
10.	Pasar Smep	I	D1	D1.1-D1.10	10	10
11.		II	D2	D2.1-D2.10	10	10
12.		III	D3	D3.1-D3.10	10	10
13.	Pasar Koga	I	E1	E1.1-E1.10	10	10
14.		II	E2	E2.1-E2.10	10	10
15.		III	E3	E3.1-E3.10	10	10
	Jumlah				150	150
	Jumlah Keseluruhan Sampel				300	

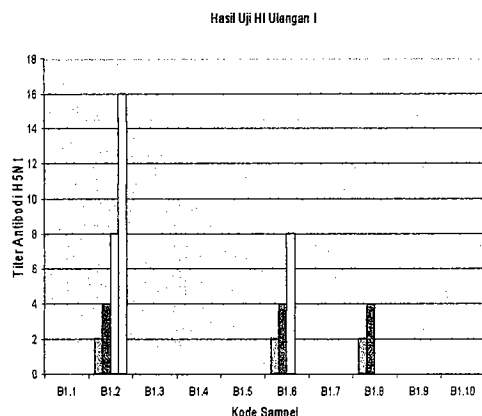


HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel diambil dari lapangan dengan tiga kali ulangan. Ulangan pertama adalah pengambilan sampel pada lima pasar tradisional kota Bandar Lampung sejumlah 50 sampel serum darah dan 50 sampel swab kloaka, ulangan II pengambilan sampel dengan jumlah yang sama, demikian juga ulangan III. Jumlah keseluruhan sampel adalah 300 sampel terdiri dari 150 sampel serum darah dan 150 sampel swab kloaka.

Uji *Haemagglutination Inhibition* (HI)

Gambar 1. Hasil Uji HI Ulangan I dari Pasar B.



Keterangan:

B1.1 sampai B1.10: Kode Sampel

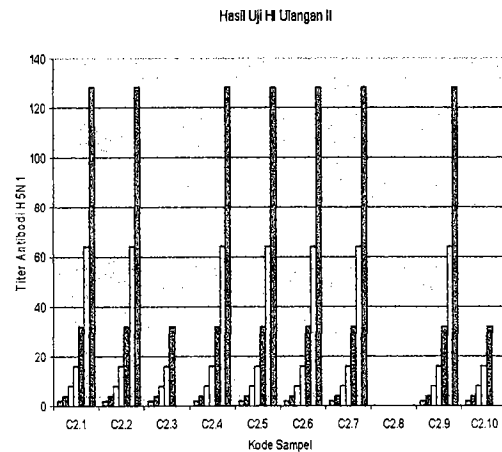
0 sampai 18: Titer Antibodi H5N1

B1.2 : Titer Antibodi H5N1 2, 4, 8, dan 16

B1.6 : Titer Antibodi H5N1 2, 4, dan 8

B1.8 : Titer Antibodi H5N1 2 dan 4

Gambar 2. Hasil Uji HI Ulangan II dari Pasar C.



Keterangan:

C2.1 sampai C2.10 : Kode Sampel

0 sampai 140 : Titer Antibodi H5N1

C2.1 : Titer Antibodi H5N1 2, 4, 8, 16, 32, 64, dan 128

C2.2 : Titer Antibodi H5N1 2, 4, 8, 16, 32, 64, dan 128

C2.4 : Titer Antibodi H5N1 2, 4, 8, 16, 32, 64, dan 128

C2.5 : Titer Antibodi H5N1 2, 4, 8, 16, 32, 64, dan 128

C2.6 : Titer Antibodi H5N1 2, 4, 8, 16, 32, 64, dan 128

C2.7 : Titer Antibodi H5N1 2, 4, 8, 16, 32, 64, dan 128

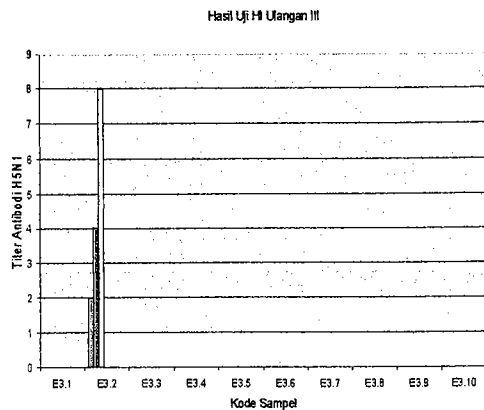
C2.9 : Titer Antibodi H5N1 2, 4, 8, 16, 32, 64, dan 128

C2.3 : Titer Antibodi H5N1 2, 4, 8, 16, dan 32

C2.10 : Titer Antibodi H5N1 2, 4, 8, 16, dan 32



Gambar 3. Hasil Uji HI Ulangan III dari Pasar E.



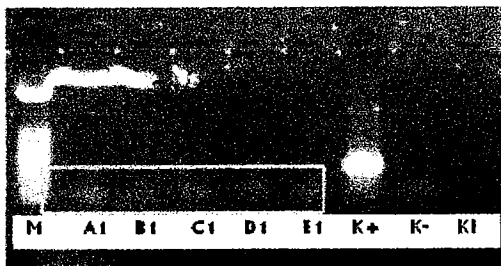
Keterangan:

B1.1 sampai B1.10 : Kode Sampel
0 sampai 9 : Titer Antibodi H5N1
E3.2 : Titer Antibodi H5N1 2, 4, dan 8

Uji Polimerase Chain Reaction (PCR)

1. Uji Matriks

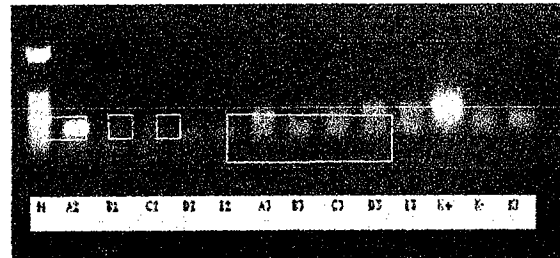
Gambar 4. Uji PCR Ulangan I; Matriks.



Keterangan:

M : Matriks
A1 : Pasar A Ulangan I (Pasar Way Halim)
B1 : Pasar B Ulangan I (Pasar Panjang)
C1 : Pasar C Ulangan I (Pasar Tamin)
D1 : Pasar D Ulangan I (Pasar Smep)
E1 : Pasar E Ulangan I (Pasar Koga)
K+ : Kontrol Positif
K- : Kontrol Negatif
KI : Kontrol Internal
Positif Matriks

Gambar 5. Uji PCR Ulangan II dan III; Matriks.



Keterangan:

M : Matriks
A2 : Pasar A Ulangan II (Pasar Way Halim)
B2 : Pasar B Ulangan II (Pasar Panjang)
C2 : Pasar C Ulangan II (Pasar Tamin)
D2 : Pasar D Ulangan II (Pasar Smep)
E2 : Pasar E Ulangan II (Pasar Koga)
A3 : Pasar A Ulangan III (Pasar Way Halim)
B3 : Pasar B Ulangan III (Pasar Panjang)
C3 : Pasar C Ulangan III (Pasar Tamin)
D3 : Pasar D Ulangan III (Pasar Smep)
E3 : Pasar E Ulangan III (Pasar Koga)
K+ : Kontrol Positif
K- : Kontrol Negatif
KI : Kontrol Internal
Positif Matriks

2. Uji H5

Gambar 6. Uji PCR Ulangan I; H5.

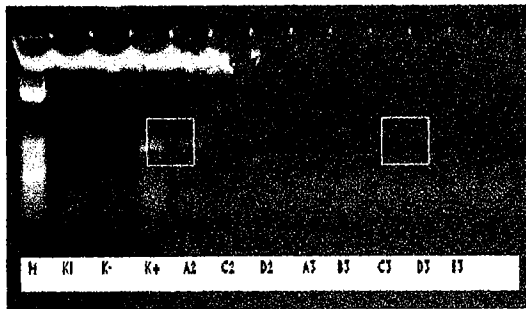


Keterangan:

A1 : Pasar A Ulangan I (Pasar Way Halim)
B1 : Pasar B Ulangan I (Pasar Panjang)
C1 : Pasar C Ulangan I (Pasar Tamin)
D1 : Pasar D Ulangan I (Pasar Smep)
E1 : Pasar E Ulangan I (Pasar Koga)
K+ : Kontrol Positif
K- : Kontrol Negatif
M : Matriks H5
KI : Kontrol Internal



Gambar 7. Uji PCR Ulangan II dan III; H5.



Keterangan:

M : Matriks H5
KI : Kontrol Internal
K- : Kontrol Negatif
K+ : Kontrol Positif

A2 : Pasar A Ulangan II (Pasar Way Halim)
C2 : Pasar C Ulangan II (Pasar Tamin)
D2 : Pasar D Ulangan II (Pasar Smep)
A3 : Pasar A Ulangan III (Pasar Way Halim)
B3 : Pasar B Ulangan III (Pasar Panjang)
C3 : Pasar C Ulangan III (Pasar Tamin)
D3 : Pasar D Ulangan III (Pasar Smep)
E3 : Pasar E Ulangan III (Pasar Koga)
H5 : Positif H5

Hasil keseluruhan sampel yang berasal dari lima pasar tradisional kota Bandar Lampung dengan uji HI dan Uji PCR dirangkum pada Tabel 2.

Tabel 2. Rangkuman Hasil Uji HI dan PCR dari lima pasar tradisional Kota Bandar Lampung.

No.	Pasar	Titer Antibodi Uji HI			Uji PCR					
					Matriks			H5		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
1.	Way Halim	-	-	-	+	+	+	-	+	-
2.	Panjang	+	-	-	+	-	+	-	-	-
3.	Tamin	-	+	-	+	+	+	-	-	-
4.	Smep	-	-	-	+	+	+	-	-	+
5.	Koga	-	-	+	+	-	+	-	-	-
	Jumlah	1	1	1	5	3	5	0	1	1
	Jumlah Keseluruhan	3			13			2		

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

1. Virus Avian Influenza ditemukan di lima pasar tradisional kota Bandar Lampung yaitu pasar Way Halim, pasar Panjang, pasar Tamin, pasar Smep, dan pasar Koga.

2. Uji PCR dapat meneguhkan diagnosa keberadaan virus avian influenza khususnya H5N1 di pasar tradisional kota Bandar Lampung.

3. Melalui uji PCR diketahui bahwa kelima pasar tradisional di kota Bandar Lampung terinfeksi virus Avian Influenza tipe A,



dan ada dua pasar yang terinfeksi subtipe H5N1 yaitu pasar Way Halim dan pasar Smeper.

Saran

1. Perlu kerjasama antar instansi terkait untuk melaksanakan program vaksinasi avian influenza secara periodik (setiap tiga bulan) dan merata di propinsi Lampung khususnya kota Bandar Lampung.
2. Perlu kerjasama antara pedagang dan instansi terkait untuk mencegah penularan virus avian influenza di pasar, misalnya dengan sanitasi atau mengosongkan pasar unggas secara periodik guna penyemprotan desinfektan di tempat penjualan ayam hidup.
3. Dianjurkan untuk menjual ayam dalam bentuk karkas atau ayam yang telah dipotong.
4. Perlu diwaspadai lalu lintas ternak terutama yang berasal dari Lampung Selatan.
5. Unggas yang terinfeksi avian influenza disarankan untuk dimusnahkan.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonimous. 2007. http://disnakkeswan-lampung.go.id/index.php?option=com_content&task=view&id=114&Itemid=9. Diakses: Jumat, 3 Maret 2007.
- Horimoto, T dan Kawaoka, 2001. *Clinical Microbiology Reviews*, January 2001, p. 129-149, Vol. 14, No. 1
- OIE (Office International des Epizootica). 2000. *Highly Pathogenic Avian Influenza. Manual of standard diagnostic tests and vaccine*. www.oie.int. pp. 1-16 [28 Agustus 2003].
- Rahardjo, Y. 2004. Avian Influenza, Pencegahan, Pengendalian, dan Pemberantasannya: Hasil Investigasi kasus Lapangan (Dilengkapi SK Mentan dan SK Dirjen Bina Produksi Peternakan. Diedit oleh C. A. Nidom. Gita Pustaka, Jakarta.
- Swayne, D.E. and Suarez, D.L. 2000. *Highly pathogenic Avian Influenza*. In: Disease of poultry world trade and public health implications. Beard C.W. and McNulty MS (eds.). *Rev. Sci. Tech. Int. Epiz.* 19(2): 463-482.
- WHO. 2006. *Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1) Reported to WHO 5 May 2006* www.who.int.



PERUBAHAN PATOLOGI PADA RUSA TOTOL (*Axis axis*) YANG TERSERANG CACING HATI YANG DIUJI PADA LABORATORIUM PATOLOGI BPPV REGIONAL III

I G.N.A. Wisnu Adi Saputra, A. Joko Siswanto, Selamat Nuryadi

ABSTRAK

*Rusa totol (*Axis axis*), jenis kelamin betina, umur 1 tahun, milik Gubernur Lampung asal dari penangkaran Rusa totol Istana Bogor. Populasi rusa 13 ekor terjadi kematian 1 ekor dengan gejala klinis : nafsu makan/minum turun, terjadi diare selama 4 hari. Hasil pengujian patologi anatomi dan histopatologi menunjukkan rusa totol tersebut didiagnosa sirrosis hepatis.*

PENDAHULUAN

Rusa totol (*Axis axis*) merupakan salah satu hewan ruminansia liar yang berprospek baik sebagai alternatif pengganti usaha peternakan di masa datang dengan produk utama daging dan ranggah. Selain sebagai penghasil daging dan ranggah, rusa totol juga dijadikan sebagai salah satu hewan peliharaan karena keindahan bulunya yang bertotol putih dan bertekstur halus bila dibandingkan dengan rusa lainnya (Semiadi dan Taufik, 2004).

Inounu (2005) mengatakan rusa totol sebagai satwa langka yang dilindungi. Rusa totol, menurut Smith et al (1972), dikenal dengan temperamen yang paling giras, nervous dan mudah panik di antara rusa tropis lainnya yang berpengaruh negatif terhadap pertahanan tubuhnya dari serangan penyakit.

Rusa totol hidup di daerah hutan berkayu dan tepi sungai daerah hutan dimana mereka bisa memperoleh makanan berupa rerumputan dan dedaunan (Anon, 2005). Pengembalaan pada lingkungan yang habitatnya kurang sesuai dan sanitasinya kurang baik dapat pula mengakibatkan beberapa penyakit terjadi pada rusa totol, khususnya yang disebabkan oleh parasit.

Cacing hati termasuk dalam parasit Kelas Trematoda, Sub Kelas Digenia, Ordo Echinostomida dan Famili Fasciolidae (Noble and Noble, 1982). Spesies cacing hati yang umum menyerang ternak adalah *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica* dan *Fascioloides magna*. *Fasciola hepatica* umumnya menyerang pada domba. Juga menyerang sapi, kuda, rusa, kambing, kelinci, babi, anjing dll.



Organ yang diserang adalah hati, gall bladder atau empedu. *Fasciola gigantica* umumnya menyerang sapi dan ruminasia lainnya di Asia dan Africa. Sedangkan *Fascioloides magna* adalah parasit yang umum pada rusa namun juga dapat menyerang sapi, domba dan kuda dengan target pada organ hati yang berhubungan dengan saluran empedu.(Georgy,1974).

Gejala klinis infestasi cacing hati pada pada hewan bervariasi tergantung derajat infestasi parasitnya. Pada infestasi berat terlihat bulu kusam, diare sampai konstipasi, anemia,kelemahan dan emasiiasi (Galloway,1974).

Tujuan penulisan ini adalah untuk memberikan gambaran mengenai perubahan patologi secara makro (patologi anatomi) dan mikro (histopatologi) pada rusa totol yang terserang cacing hati.

TINJAUAN PUSTAKA

Diagnosa secara tepat sangat diperlukan dalam mengendalikan dan memberantas penyakit hewan. Salah satu cara yang digunakan untuk mendiagnosa penyakit hewan adalah dengan menguji secara patologi anatomi dan histopatologi (Ressang, 1984).

Beberapa perubahan patologi pada infestasi cacing hati tergantung jumlah dan tingkat perkembangan parasitnya. Pada infestasi berat timbul reaksi inflamasi pada kejadian akut ditandai oleh sakit pada abdomen dengan kesulitan bergerak yang sering diikuti oleh kematian beberapa hari kemudian (Georgy, 1974)

Georgy (1974) juga mengatakan, bila dilakukan nekropsi/bedah bangkai pada kejadian akut sering ditemukan eksudat pada rongga abdomen (ascites) yang kadang bercampur dengan darah. Hati mengalami pembengkakan/membesar, rapuh dan kadang dilapisi oleh fibrin.

Beberapa cacing muda dapat ditemui pada irisan hati.

Pengujian histopatologi didasarkan pada sebuah kenyataan bahwa hewan yang terkena penyakit akan mengalami perubahan-perubahan pada tingkat sel maupun jaringan yang terjadi secara morfologi dan fisiologi. Gangguan yang terjadi dapat mengakibatkan sel dan jaringan bereaksi terhadap pengaruh yang berlawanan dengan cara beradaptasi, mengalami perubahan sementara atau tetap yang dapat pula berakhir dengan kematian (Robbins et al,1994).



Materi pengujian ini adalah bangkai rusa totol (*Axis axis*) jenis kelamin betina, umur 1 tahun, milik Gubernur Lampung yang berasal dari penangkaran Rusa totol Istana Bogor.

Di Lampung, rusa ini telah dipelihara selama $\pm$ 8 bulan. Populasi rusa dalam satu lokasi penangkaran 13 ekor dengan kematian 1 ekor. Gejala klinis : nafsu makan dan minum menurun, terjadi diare selama 4 (empat) hari sampai kemudian mati.

Pengujian dilakukan di Laboratorium Patologi BPPV Regional III Lampung dengan menggunakan Metode Diagnosa Bedah Bangkai (Nekropsi) untuk melihat perubahan patologi anatominya dan Metode Histopatologi dengan memakai pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE).

Ditemukannya cacing hati pada pemeriksaan nekropsi (irisan hati) dijadikan dasar utama diagnosa.

HASIL

Dalam pengujian ini, yang diamati adalah organ dalam rusa totol secara patologi anatomi (makro) dan dilanjutkan dengan histopatologi (mikro).

Perubahan Patologi Anatomi ~>

1. Konjunktiva : *anemis*
2. Usus halus dan ginjal : *kongesti*
3. Paru-paru :



kongesti dan edema di lobus cardiacus

4. Rongga perut :



penuh terisi eksudat/cairan



5. Hati :



hati bengkak dan mengeras, ditemukan cacing hati dan nodul-nodul putih

Perubahan Histopatologi ~>

1. Usus halus : kongesti dan infiltrasi sel radang
2. Ginjal : kongesti
3. Paru-paru : kongesti, edema dan akumulasi sel radang
4. Hati : terbentuk jaringan fibrosis, infiltrasi sel radang dan makrofag juga terdapat perdarahan dan nekrosa

PEMBAHASAN

Pada infestasi cacing hati banyak terjadi kerusakan parenkim hati oleh cacing muda, sehingga struktur hati normal sangat terganggu. Sering terlihat adanya radang hemoragik yang terdiri dari sel-sel R.E.S., fibrin, eritrosit-eritrosit, leukosit-leukosit dan detritus sel-sel. Parenkim yang

rusak diganti oleh jaringan granulasi yang akhirnya membentuk jaringan ikat. Adanya parasit-parasit ini sering menimbulkan hepatitis kronika interstitialis parasitaria multiplek di dalam hati, berarti di dalam hati dijumpai sarang-sarang multipel yang terdiri dari jaringan parut.

Jika jaringan parut meluas rata maka akan terbentuk hepatitis diffusa dengan seluruh atau sebagian hati memperlihatkan sirrosis yang mengakibatkan fungsi hati terganggu. Dalam hal ini tanda klinik yang menonjol adalah emiasi karena gangguan metabolisme lemak, anemia, ikterus dan edema (Ressang, 1963). Kematian hewan biasanya terjadi akibat emiasi (Galloway, 1974).

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Berdasarkan perubahan Patologi Anatomi dan Histopatologinya dapat disimpulkan bahwa rusa totol tersebut mengalami Sirrosis Hepatis.



Saran

Cara pencegahan dan pemberantasan cacing hati nampaknya sangat sulit. Disarankan untuk mencegah masuknya siput sebagai vektor masuk ke kompleks penangkaran rusa atau sumber hijauan tercemar siput dengan memasukkan obat-obatan anti siput seperti senyawa copper sulfate (Georgy, 1974), garam natrium (sodium pentachlorophenate) dan frescon. Semua rusa yang baru masuk area penangkaran harus diperiksa terlebih dahulu terhadap cacing hati dan bila diantaranya ada yang positif harus segera diobati.

Pengobatan dengan anthelmintic seperti Carbon tetrachlorida sangat berisiko, karena hati sebagai organ utama yang bertanggung jawab untuk detoksifikasi bahan kimia, sedangkan hati pada kasus ini sedang terserang penyakit. Obat-obatan yang dapat dipakai mengandung senyawa bromsalans, clioxanide, oxyclozanide, rafoxanide, brotianide, nitroxylnil, albendazole dan benzensulfonamides.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonymous (2005). Chital. <http://en.wikipedia.org/wiki/chital>. (20 Juli 2005)
- Anonymous (2005). Spotted deer/Chital (Axis axis). http://www.Wildlywise.com/art_contrib. (20 Juli 2005)
- Galloway, J.H. (1974). Farm Animal Health and Disease Control. Lea & Febiger-Philadelphia. Pp. 373
- Georgy, J.R. (1974). Parasitology for Veterinarians. W.B. Saunders Company. Pp. 316-318
- Inounu, I. (2002). Budidaya Rusa. Alternatif Usaha Peternakan Rakyat. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Bogor.
- Noble E.R., Noble G.A. (1982). Parasitology. The Biology of Animal Parasites. Lea & Febiger-Philadelphia. Fifth Edition. Pp. 171-174
- Ressang, A.A. (1963). Patologi Khusus Veteriner. Departemen Urusan Research Nasional Republik Indonesia. Hal. 647.



- Ressang, A.A. (1984). Patologi Khusus
Veteriner. Edisi Kedua. Percetakan
Bali. Hal. 237-239.
- Robbin, S.L., R.S. Cotran, dan V. Kumar
(1994). Dasar Patologi Penyakit.
Jilid I. Binarupa Aksara. Jakarta
- Semiadi, G. Dan P.N. Taufik (2004).
Panduan Pemeliharaan Rusa Tropis.
LIPI. Bandung.
- Smith, A.T., T.C. Jones., dan R.D. Hunt
(1972). Veterinary Pathology.
International Copyright Union
Philadelphia. Pp. 1100-1110.



DIAGNOSA VIRUS AVIAN INFLUENZA SUBTIPE H5N1 MENGUNAKAN METODE MULTIPLEKS PCR

Srihanto,E.A., Cahyaningsari,D., Faizah

ABSTRAK

Perkembangan teknologi PCR sudah maju dengan pesat. Berbagai macam penyakit yang disebabkan oleh virus, bakteri dan parasit dapat didiagnosa dengan menggunakan metode PCR. Perkembangan penyakit Avian Influenza di Indonesia belum terlihat adanya tanda-tanda akan berakhir, bahkan penularan ke manusia semakin banyak terjadi. Pada bulan tahun 2007 saja tercatat 107 orang positif terinfeksi virus Avian Influenza 87 orang diantaranya meninggal dunia.

Untuk mempercepat pendiagnosaan virus Avian Influenza, PCR merupakan metode pemeriksaan yang banyak digunakan. Selain hasil ujinya cepat juga mempunyai sensitifitas dan spesifisitas yang tinggi Untuk lebih mengembangkan dan mempercepat pengujian digunakan metode multiplek konvensional PCR. Metode ini merupakan pengembangan metode konvensional PCR dengan menggunakan dua atau lebih primer yang spesifik dalam satu kali proses amplifikasi yang dibantu oleh enzim dengan suhu dan waktu tertentu. Hasil yang didapat lebih cepat, murah dan efisien dengan menguji beberapa sub tipe dalam satu kali pengerjaan.

PENDAHULUAN

Polimerase Chain Reaction (PCR) merupakan suatu metode uji *in-vitro* untuk membuat asam inti DNA dengan menggunakan 2 primer spesifik (forward dan reverse) yang akan membentuk pasangan di seberangnya. Selanjutnya primer tersebut diperbanyak (*amplifikasi*) dengan perantara enzim polimerase DNA (DNA *polymerase*) dalam media yang mengandung deoxynukleotida (dNTP) dan difasilitasi oleh ion Mg^{2+} .

Apabila virus target yang dicari terdapat dalam spesimen yang diperiksa maka primer akan berikatan (*annealing*) dengan nukleotida pada

DNA virus. Kemudian pada ikatan tersebut dimulai perpanjangan primer (*elongasi*) sampai jutaan kali sehingga cukup untuk dapat divisualisasi pada proses elektroforesis. Sebelum mengalami proses penggandaan, virus Avian Influenza yang merupakan virus RNA akan mengalami suatu proses *reverse transcriptase* yang bertujuan untuk mengubah t-RNA menjadi c-DNA dengan bantuan enzim *revertase*.

Saat ini PCR merupakan salah satu metode uji molekuler yang paling cepat dan akurat yang dimiliki oleh Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner (BPPV) Regional III khususnya Laboratorium Bioteknologi dalam mendiagnosa virus Avian Influenza.



Laboratorium Bioteknologi BPPV Regional III telah mampu mendiagnosa virus Avian Influenza sampai ke tingkat subtype N1. Pada masa-masa mendatang uji molekuler ini juga dapat dilakukan untuk mendiagnosa penyakit hewan lainnya seperti Rabies, MCF (Malignant Cattharal Fever), Brucellosis, Salmonellosis, Toxoplasmosis dan sebagainya.

Multipleks konvensional PCR merupakan pengembangan metode PCR konvensional. Dalam mendiagnosa suatu penyakit multipleks konvensional PCR menggunakan dua atau lebih primer spesifik dalam satu kali reaksi amplifikasi.

MATERI DAN METODE

A. Materi

Materi pemeriksaan molekuler dengan menggunakan metode PCR dapat dibagi menjadi dua bagian, yaitu : sampel dan reagen yang digunakan.

Sampel yang biasanya digunakan untuk uji molekuler antara lain :

1. Swab kloaka dan atau trachea
2. Organ segar (hati, limpa, paru-paru, trachea dan ginjal)
3. Feses

4. Serum
5. Telur
6. Vaksin
7. Isolat virus

Isolat virus yang digunakan berupa isolat hasil sumbangan dari Balai Besar Veteriner (BBVet) Wates, Yogyakarta.

Reagen yang digunakan untuk amplifikasi menggunakan produk dari Invitrogen dengan label One Step RT-PCR with Platinum Taq

Sedangkan Primer yang digunakan yaitu:

- H5 Forward (5' ACA CAT GCY CAR GAC ATA CT 3')
- H5 Reverse (5' CTY TGR TTY AGT GTT GAT GT 3')
- N1 Forward (5' GTT TGA GTC TGT TGC TTG GTC 3')
- N1 Reverse (5' TGA TAG TGT CTG TTA TTA TGCC 3')

Untuk ekstraksi t-RNA menggunakan reagen dari Qiagen. Adapun reagen-reagen yang dibutuhkan antara lain :

- β - Mercaptoetanol
- Buffer RLT
- Wash buffer RW1
- Wash buffer RPE
- Ethanol 70%
- RNase Free Water (NFW) atau Nuclease Free Water



Materi lain yang digunakan antara lain :

- TAE 1x (No. catalog 161-0733)
- Agarose (No. catalog La10101)
- Ethidium Bromide (No. catalog 161-0433)

Untuk ekstraksi dengan menggunakan Qiagen kit dibutuhkan peralatan tambahan berupa *RNeasy spin column* steril 2 ml sebagai alat untuk mengkoleksi RNA total.

B. Metode

Sebelum proses amplifikasi, dilakukan proses ekstraksi t-RNA dari sampel yang akan kita periksa. Langkah-langkah kerjanya sebagai berikut :

1. Campur 6 μ l β -Mercaptoethanol, 600 μ l buffer RLT dan 100 μ l sampel virus (dalam bentuk gerusan organ/swab (*cloaca* dan *trachea*)/feses/cairan allantois/vaksin) kedalam satu tabung mikrotube 2 ml. Vortek dan diinkubasikan pada suhu ruang selama 5 menit.
2. Tambahkan 600 μ l ethanol 70 % dan campur dengan pipet sampai merata.
3. Tempatkan *RNeasy spin column* 2 ml dan diisi dengan hati-hati sebanyak 700 μ l sampel dengan hati-hati (jangan menyentuh dinding *spin column*). Sentrifuse dengan kecepatan 8.000 g

(10.000 rpm) selama 15 detik dengan suhu 15 $^{\circ}$ C.

4. Buang cairan yang terdapat pada mikrotube 2 ml yang terdapat dibagian bawah. Masukkan sisa sampel ke dalam *RNeasy spin column* 2 ml dan sentrifuse pada kecepatan 8.000 g (10.000 rpm) selama 15 detik dengan suhu 15 $^{\circ}$ C.
5. Buang cairan yang terdapat pada mikrotube 2 ml yang terdapat dibagian bawah. Tambahkan 700 μ l wash buffer RW1 ke dalam *spin column* 2 dan disentrifuse dengan kecepatan 8.000 g (10.000 rpm) selama 15 detik dengan suhu 15 $^{\circ}$ C.
6. Pindahkan *RNeasy spin column* ke dalam mikrotube steril berukuran 2 ml yang steril lainnya. Tambahkan 500 μ l wash buffer RPE ke dalam *spin column* dan sentrifuse dengan kecepatan 8000 g (10.000 rpm) selama 15 detik dengan suhu 15 $^{\circ}$ C.
7. Buang cairan yang terdapat pada mikrotube 2 ml yang terdapat di bagian bawah. Tambahkan 500 μ l wash buffer RPE ke dalam *spin column* dan sentrifuse dengan kecepatan 13.000 rpm selama 2 menit dengan suhu 15 $^{\circ}$ C.



8. Pindahkan *spin column* ke dalam mikrotube steril berukuran 1,5 ml. Masukkan 50 μ l RNase Free water (NFW) langsung ke dalam *spin column*. Tutup dan sentrifuse dengan kecepatan 8.000 g (10.000 rpm) selama 1 menit untuk mendapatkan/melarutkan RNA total.
9. Simpan larutan RNA total pada suhu -20°C atau -70°C .

Proses amplifikasi.

Proses amplifikasi ini bertujuan untuk membalik dari t-RNA ke c-DNA dengan proses *reverse transcription* yang selanjutnya akan mengalami proses pengkopian dan pemanjangan. Proses ini dibantu oleh enzim *reverse transcriptase*.

Setelah proses *reverse transcription* dan menghasilkan c-DNA selesai, proses PCR dilanjutkan. Proses ini dibagi menjadi 3 tahap meliputi :

- Proses Denaturasi
- Proses Annealing
- Proses Extention/Elongation
-

Proses Denaturasi

Proses awal dari PCR adalah proses *denaturasi*. Pada tahap ini rantai DNA akan memisah dan dengan bantuan enzim *Taq DNA Polimerase*. Proses ini membutuhkan suhu $90 - 97^{\circ}\text{C}$ dan

dibutuhkan waktu sekitar 2 – 7 menit supaya kerja dari enzim tersebut dapat berjalan dengan sempurna.

Proses Annealing

Proses *annealing* (penempelan/ perlekatan primer yang spesifik terhadap untai tunggal DNA virus target yang sesuai). Pada proses ini kedua primer *forward* dan *reverse* bekerja secara bersama-sama dan menempel pada daerah yang sesuai dengan pasangan masing-masing primer tersebut. Temperatur optimal untuk proses *annealing* umumnya 25°C di bawah suhu untuk proses denaturasi yang berdasarkan variasi panjang nukleotidanya. Proses *annealing* ini berjalan pada suhu sekitar $37 - 72^{\circ}\text{C}$ dengan membutuhkan waktu 30 – 60 detik

Proses Elongasi/Ekstensi

Proses terakhir dari tehnik PCR adalah *extention/elongation*. Proses ini merupakan proses pemanjangan primer dan pengkopian yang bekerja pada ujung 5' ke ujung 3'. Umumnya suhu yang dibutuhkan sekitar 72°C , karena pada suhu tersebut enzim *Taq DNA Polimerase* bekerja secara optimal untuk menyintesa DNA. Sedangkan lamanya waktu yang dibutuhkan tergantung pada panjangnya fragmen DNA target yang akan diamplifikasi. Semakin panjang fragmen DNA yang



diampifikasi semakin lama waktu yang dibutuhkan untuk proses *extention*. Tahap proses PCR ini yang merupakan satu kesatuan biasanya dilakukan pengulangan 25 – 45 siklus.

Proses Elektroforesis

Proses elektroforesis dilakukan untuk mendapatkan fragmen DNA hasil amplifikasi pada kedudukan tertentu yang disesuaikan dengan marker pada ukuran yang sudah ditentukan. Proses ini dengan bantuan agarose 1,5 % yang dilarutkan pada 1X TBE/TAE selanjutnya dididihkan dan ditambahkan 3-6 µl Ethidium bromide. Ethidium bromide ini akan menyisip pada fragmen DNA sehingga akan membantu memberikan visualisasi pada proses elektroforesis. Sebagai pemberat supaya DNA tidak ikut larut pada saat proses elektroforesis digunakan *Loading dye*.

Proses elektroforesis ini memerlukan waktu sekitar 30 – 45 menit dengan daya 100 volt dan 50 Ampere. Elektroda berjalan dari kutub negatif ke kutub positif. Sebagai penghantar arus listrik digunakan larutan TAE 1x. Partikel yang mempunyai berat molekul lebih rendah akan berjalan lebih cepat dibandingkan dengan partikel yang mempunyai berat molekul yang lebih tinggi. Partikel yang mempunyai berat

molekul yang lebih rendah biasanya berasal dari DNA hasil amplifikasi.

Proses Visualisasi

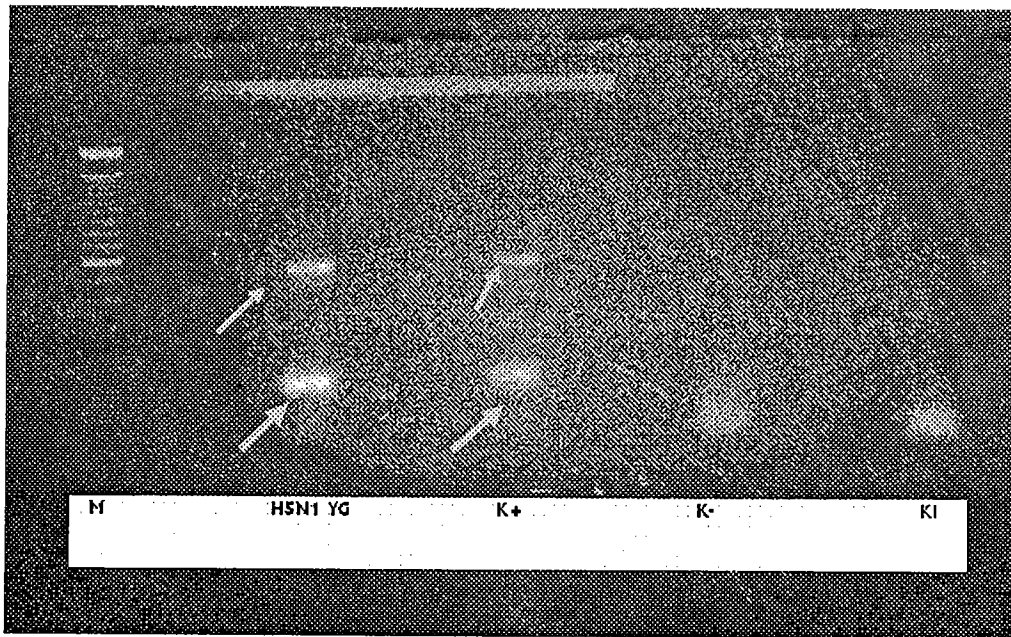
Untuk melihat hasil elektroforesis digunakan alat UVP High Performance Transiluminator yang dilengkapi dengan sinar UV dan kamera untuk mendokumentasikan gel hasil elektroforesis. Hasil yang didapat berupa garis terang (*band*) yang spesifik dan terletak pada kedudukan tertentu dengan ukuran *base pair* (bp). Ukuran ini diperoleh dengan membandingkan hasil DNA virus target dengan DNA kontrol positif dan ukuran yang sudah ditentukan. Panjang-pendeknya ukuran (*base pair*) suatu DNA target tergantung dari posisi penyusunan kedua primer (*forward* dan *reverse*).

Hasil elektroforesis dimasukkan ke dalam UVP High Performance Transiluminator, selanjutnya sinar ultra violet akan menyinari hasil elektroforesis tersebut sehingga akan terlihat hasil visualisasi dengan menggunakan *soft ware* (Doc-It LS Image Aquisition Soft Ware) hasil visualisasi dapat didokumentasikan dan disimpan ke dalam *hard ware*.



HASIL DAN PEMBAHASAN

Adapun hasil dari multipleks konvensional PCR untuk virus Avian Influenza subtype H5N1 adalah sebagai berikut :



Keterangan :

- Panah atas menunjukkan posisi H5 pada 565 bp
- Panah bawah menunjukkan posisi N1 pada 131 bp

Keuntungan menggunakan metode multipleks konvensional PCR adalah :

- Waktu yang dibutuhkan lebih singkat sehingga hasil dapat lebih cepat diketahui →

Dengan menggunakan metode multipleks konvensional PCR ini waktu pengerjaan sampel dapat dipersingkat dibandingkan

dengan menggunakan metode yang biasa (single).

- Penggunaan bahan/reagen yang lebih hemat →

Penggunaan reagen untuk amplifikasi dapat di hemat separuh dari biasanya. Hanya saja perlu penambahan enzim Taq DNA Polimerase yang agak banyak untuk membantu proses



amplifikasi dapat berjalan maksimal. Sedangkan reagen pendukung lainnya tetap sesuai aturan.

- Dapat mendeteksi lebih dari 1 (satu) macam subtype →
Dengan menggunakan metode multiplex konvensional PCR ini kita dapat mendeteksi beberapa subtype virus Avian Influenza dalam satu kali reaksi. Untuk mendeteksinya kita harus mengetahui panjang base pair (bp) dari primer yang kita punyai. Untuk mendeteksi beberapa subtype sebaiknya panjang base pair (bp) mempunyai jarak yang agak panjang sehingga pada waktu visualisasi hasil yang didapatkan dapat dibedakan.

Untuk proses amplifikasi dalam satu reaksi dengan volume 50 µl dibutuhkan:

Reaksi 2x PCR Mix	: 25 µl
SS III (enzim)	: 4 µl
Primer Forward H5	: 2 µl
Primer Reverse H5	: 2 µl
Primer Forward N1	: 2 µl
Primer Reverse N1	: 2 µl

• t-RNA sampel	: 5 µl
• MgSO ₄	: 0,5 µl
• Nuklease Free Water	: 7,5 µl

Penggunaan setiap pasangan primer dalam satu kali reaksi multiplex PCR harus mempunyai konsentrasi yang sama. Sedangkan untuk membantu agar proses amplifikasi dapat berjalan sempurna perlu dilakukan penambahan enzim Taq DNA Polimerase.

Metode amplifikasi DNA virus Avian Influenza subtype H5N1 menggunakan program :

- * Siklus 1 : (1x)
 - Step 1 : 60⁰ C selama 30 menit
- * Siklus 2 : (1x)
 - Step 1 : 94⁰ C selama 4 menit
- * Siklus 3 : (40x)
 - Step 1 : 94⁰ C selama 40 detik
 - Step 2 : 50⁰ C selama 45 detik
 - Step 3 : 72⁰ C selama 1 menit
- * Siklus 4 : (1x)
 - Step 1 : 72⁰ C selama 4 menit
- * Siklus 5 : (1x)
 - Step 1 : 4⁰ C



KESIMPULAN

Dengan menggunakan metode multiplek konvensional PCR, bahan atau reagen yang digunakan akan lebih hemat. Selain itu waktu yang dibutuhkan untuk mengerjakan sampel lebih singkat daripada metode konvensional PCR serta dapat langsung diketahui subtype Avian Influenza dalam satu kali proses amplifikasi tanpa mengurangi keakuratan hasil.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonimous, 1989, Technology : Principles and Amplifications for DNA Amplification, Ed : H.E. Erlich, New York, London, Tokyo
- Faizah, 2005, Peranan Metode PCR dalam Diagnosa Penyakit Hewan Akibat Infeksi Virus, Velabo edisi Juni 2005, Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner Regional III Bandar Lampung, Lampung.
- Invitrogen, www.invitrogen.com
- Suwarno, 2006, Penggunaan Teknik PCR untuk Diagnosa Virologik, Laboratorium Virologi dan Imunologi, Bagain Mikrobiologi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga.
- Suwarno, 2006, Polymerase Chain Reaction (PCR) dan Sequensing DNA, Virologik, Laboratorium Virologi dan Imunologi, Bagain Mikrobiologi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga.
- Wuryastuti, H., 1996, Polymerase Chain Reaction dan Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction : teknik dasar dan aplikasi diagnostic, PAU Bioteknologi UGM, Yogyakarta.

