

ISSN 0216-6461

e-ISSN 2354-6832

Terakreditasi LIPI

Sertifikat Nomor: 644/AU3/P2MI-LIPI/07/2015

WARTAZOA

Buletin Ilmu Peternakan dan Kesehatan Hewan Indonesia
Indonesian Bulletin of Animal and Veterinary Sciences

Volume 26
Nomor 1
Maret 2016



**PUSAT PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN PETERNAKAN
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN PERTANIAN
KEMENTERIAN PERTANIAN**

WARTAZOA

Buletin Ilmu Peternakan dan Kesehatan Hewan Indonesia

Volume 26 Nomor 1 Tahun 2016

ISSN 0216-6461

e-ISSN 2354-6832

Terakreditasi LIPI

Sertifikat Nomor 644/AU3/P2MI-LIPI/07/2015
(SK Kepala LIPI No. 818/E/2015)

Diterbitkan oleh:

Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan
Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian
bekerjasama dengan
Ikatan Sarjana Peternakan Indonesia

Penanggung Jawab:

Kepala Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan

Dewan Penyunting:

Ketua:

Dr. Elizabeth Wina, MSc. (Peneliti Utama – Balai Penelitian Ternak – Pakan dan Nutrisi Ternak)

Wakil Ketua:

Drh. Rini Damayanti, MSc. (Peneliti Madya – Balai Besar Penelitian Veteriner – Patologi dan Toksikologi)

Anggota:

Prof. (Riset) Dr. Ir. Budi Haryanto, MSc. (Peneliti Utama – Balai Penelitian Ternak – Pakan dan Nutrisi Ternak)
Dr. Ir. Chalid Talib, MSc. (Peneliti Utama – Balai Penelitian Ternak – Pemuliaan dan Genetika Ternak)
Dr. Ir. Atien Priyanti SP, MSc. (Peneliti Utama – Puslitbangnak – Ekonomi Pertanian)
Dr. Drh. NLP Indi Dharmayanti, MSi. (Peneliti Utama – Balai Besar Penelitian Veteriner – Virologi)
Drh. Indrawati Sendow, MSc. (Peneliti Utama – Balai Besar Penelitian Veteriner – Virologi)
Dr. Nurhayati (Peneliti Madya – Balai Penelitian Ternak – Budidaya Tanaman)
Ir. Tati Herawati, MAg. (Peneliti Madya – Balai Penelitian Ternak – Sistem Usaha Pertanian)
Dr. Wisri Puastuti, SPT., MSi. (Peneliti Madya – Balai Penelitian Ternak – Pakan dan Nutrisi Ternak)
Dr. Drh. Eny Martindah, MSc. (Peneliti Madya – Balai Besar Penelitian Veteriner – Parasitologi dan Epidemiologi)

Mitra Bestari:

Prof. (Riset) Dr. Ir. Tjeppy D Soedjana, MSc. (Puslitbangnak – Ekonomi Pertanian)
Prof. Dr. Edy Rianto, MSc. (Universitas Diponegoro – Ilmu Ternak Potong dan Kerja)
Prof. Dr. Gono Semiadi (LIPI – Pengelolaan Satwa Liar)
Dr. Agr. Asep Anang, MPhil. (Universitas Padjadjaran – Pemuliaan Ternak)

Penyunting Pelaksana:

Linda Yunia, SE
Pringgo Pandu Kusumo, AMd.
Irfan R Hidayat, SPT.

Alamat:

Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan
Jalan Raya Pajajaran Kav. E-59, Bogor 16128 – Indonesia
Telepon (0251) 8322185; Faksimile (0251) 8380588
E-mail: wartazoa@litbang.pertanian.go.id; wartazoa@yahoo.co.id
Website: <http://medpub.litbang.pertanian.go.id/index.php/wartazoa>

Wartazoa diterbitkan empat kali dalam setahun pada bulan Maret, Juni, September dan Desember

KATA PENGANTAR

Benih adalah bagian tanaman yang digunakan untuk mengembangbiakkan tanaman. Sistem perbenihan TPT harus menghasilkan benih yang berkualitas tinggi dan berproduksi optimal. Penangkaran benih TPT yang telah dilakukan belum sebaik pada tanaman pangan, hortikultura maupun perkebunan. Sertifikasi benih dapat menjamin agar benih yang didistribusikan memiliki identitas genetik, murni dan berkualitas tinggi.

Minyak atsiri dari tanaman merupakan salah satu bahan pakan imbuhan yang dapat dianjurkan untuk menjadi alternatif pengganti antibiotik karena pengaruhnya sebagai agen antimikroba. Minyak atsiri dari tanaman juga mempunyai kemampuan untuk meningkatkan pencernaan nutrisi dan meningkatkan performans ternak ruminansia. Penelitian masih perlu dilakukan untuk meningkatkan efisiensi penggunaan minyak atsiri dari tanaman sebagai pakan imbuhan dan mempelajari fermentasi rumen dan ekologi.

Kejadian infeksi *Hantavirus* pada hewan dan manusia menunjukkan peningkatan kasus di berbagai negara. Oleh karena itu, informasi tentang *Hantavirus* dan aspek kesehatan secara komprehensif sangat diperlukan untuk mengantisipasi kejadian infeksi *Hantavirus* di Indonesia. Selain *Hantavirus*, penyakit zoonosis lainnya seperti virus AI masih membutuhkan perhatian. Virus HPAI menyebabkan disfungsi sistem saraf yang parah sehingga menyebabkan kematian pada unggas dan mamalia. Sitokin adalah mediator yang berfungsi untuk mengawali, memproliferasi dan mengatur peradangan untuk melawan infeksi virus. Diagnosis penyakit AI yang tepat pada daerah wabah sangat diperlukan sehingga dapat dilakukan langkah-langkah pemberantasan. Uji *point-of-care* merupakan salah satu uji cepat untuk mendeteksi virus HPAI H5N1 pada kasus klinis, namun demikian sensitivitas uji ini masih rendah. Oleh karena itu, diperlukan penelitian untuk meningkatkan sensitivitas.

Dewan penyunting menyampaikan terima kasih kepada para penulis, mitra bestari dan semua yang terlibat dalam publikasi ini.

Bogor, Maret 2016

Ketua Dewan Penyunting

WARTAZOA

Buletin Ilmu Peternakan dan Kesehatan Hewan Indonesia

Volume 26 Nomor 1 (Maret 2016)

ISSN 0216-6461

e-ISSN 2354-6832

DAFTAR ISI

Halaman

Revitalisasi Perbenihan Tanaman Pakan Ternak di Indonesia (Revitalization of Forage Seed Production in Indonesia) Nurhayati D Purwantari	001-008
The Use of Plant Essential Oils as Feed Additives for Ruminants (Pemanfaatan Minyak Atsiri dari Tanaman sebagai Imbuhan Pakan untuk Ternak Ruminansia) Muhamad N Rofiq	009-016
Infeksi <i>Hantavirus</i> : Penyakit Zoonosis yang Perlu Diantisipasi Keberadaannya di Indonesia (Hantavirus Infection: Anticipation of Zoonotic Disease in Indonesia) Indrawati Sendow, NLPI Dharmayanti, M Saepullah dan RMA Adjid	017-026
Disregulasi Sitokin pada Unggas dan Mamalia yang Terinfeksi Virus <i>Avian Influenza</i> (Cytokines Disregulation in Birds and Mammals Infected by Avian Influenza Virus) Dyah Ayu Hewajuli dan NLPI Dharmayanti	027-038
Peranan <i>Point-of-Care Test</i> dalam Pengendalian <i>Highly Pathogenic Avian Influenza</i> di Indonesia (The Role of Point-of-Care Test to Control Highly Pathogenic Avian Influenza in Indonesia) Simson Tarigan	039-050

Revitalisasi Perbenihan Tanaman Pakan Ternak di Indonesia

(Revitalization of Forage Seed Production in Indonesia)

Nurhayati D Purwantari

Balai Penelitian Ternak, PO Box 221, Bogor 16002
dias@indo.net.id

(Diterima 4 Februari 2016 – Direvisi 29 Februari 2016 – Disetujui 8 Maret 2016)

ABSTRACT

Forage plant has multipurposes as feed, cover crop, erosion control, remediation on heavy metal contaminated soil, medicine, as well as textile and food coloring. Seed is a part of plant used for plant multiplication. National seed system covers germplasm management, breeding, seed production and its distribution. Therefore, forage seed production is an important aspect to be concerned. Forage seed production system has to produce high quality seed with optimum yield. There has not been any forage seed producer which ensures the quality of seed produced in accordance to seed certification requirement as those in food crop, horticulture or estate crop. Seed quality aspect covers genetic, physiology and physical quality. Seed stock certification is to guarantee that the distributed seeds have genetic identity, pure and high quality.

Key words: Forage, seed, production, certification

ABSTRAK

Tanaman pakan ternak (TPT) mempunyai multifungsi sebagai sumber hijauan pakan ternak, tanaman penutup tanah, pupuk hijau, pengontrol erosi, remediasi lahan tercemar logam berat, tanaman obat, pewarna kain dan kue. Benih adalah bagian tanaman yang digunakan untuk memperbanyak atau mengembangkan tanaman. Sistem perbenihan nasional mencakup pengelolaan plasma nutfah, kegiatan pemuliaan, produksi benih dan distribusinya sehingga perbenihan TPT merupakan hal penting untuk diperhatikan. Sistem perbenihan TPT harus menghasilkan benih yang berkualitas tinggi dan berproduksi optimal. Penangkaran benih TPT yang telah dilakukan belum sebaik pada tanaman pangan, hortikultura, maupun perkebunan. Mutu benih mencakup kualitas genetik, fisiologi dan fisik. Sertifikasi benih bertujuan menjamin agar benih yang didistribusikan memiliki identitas genetik, murni dan berkualitas tinggi.

Kata kunci: Tanaman pakan ternak, benih, produksi, sertifikasi

PENDAHULUAN

Ketahanan pangan merupakan program nasional, maka penggunaan benih varietas unggul bersertifikat pada tanaman pangan, dapat berkontribusi secara signifikan dalam peningkatan produktivitas. Oleh karena itu, dalam rangka peningkatan penggunaan benih varietas unggul bersertifikat diperlukan sistem pengelolaan produksi benih yang baik, yaitu mampu menyediakan benih sesuai dengan kebutuhan petani dan pengguna lain (Ditjen Tanaman Pangan 2015).

Peternakan merupakan salah satu subsektor yang mendukung ketahanan pangan melalui ketersediaan protein hewani. Dalam usaha peternakan, tanaman pakan ternak (TPT) sebagai sumber hijauan pakan ternak merupakan salah satu komponen yang menentukan keberhasilan subsektor peternakan di Indonesia, namun peranannya belum optimal.

Petani menghadapi beberapa masalah antara lain kekeringan, banjir, gulma, hama, penyakit dan kondisi

tanah yang buruk dalam budidaya tanaman pertanian. Khusus untuk TPT, selain faktor-faktor tersebut, komoditas ini dianggap belum mempunyai nilai ekonomi. Tingkat keberhasilan produksi tanaman maupun ternak tergantung seberapa efektif faktor-faktor tersebut dapat dikontrol atau direayasa.

Salah satu faktor untuk keberhasilan produksi tanaman yang dapat dikontrol oleh petani adalah pemilihan benih untuk ditanam, walaupun biaya benih hanya sebagian kecil dari total biaya sarana produksi (saprodi), di dalam prakteknya, petani lebih memilih membeli benih yang berkualitas dengan harga lebih mahal dibandingkan dengan harga murah tetapi kualitas rendah. Sebagai contoh, produktivitas padi dengan benih bersertifikat lebih tinggi dibandingkan dengan non-sertifikat sehingga pendapatan bersih usaha tani lebih tinggi, tetapi tingkat adopsi petani terhadap benih bersertifikat lebih rendah dibandingkan dengan non-sertifikat (Dewi et al. 2013). Kondisi ini akan mempengaruhi produksi padi secara nasional. Benih

TPT belum diproduksi secara khusus dan juga belum ada penangkar benih yang melakukan kontrol terhadap kualitasnya. Dalam rangka mengantisipasi permintaan benih TPT, maka produksi dan pascapanen benih TPT perlu mendapat perhatian dari berbagai *stakeholder*.

Tujuan penulisan artikel ini adalah untuk memberikan gambaran dan pemahaman mengenai perbenihan tanaman pakan ternak di Indonesia saat ini.

SISTEM PERBENIHAN TANAMAN PAKAN TERNAK DI INDONESIA

Sistem perbenihan nasional mencakup pengelolaan plasma nutfah, kegiatan pemuliaan, produksi benih dan distribusinya. Kondisi perbenihan tanaman pakan ternak di Indonesia belum digarap secara serius. Perbenihan TPT perlu dibenahi sehingga dapat menghasilkan benih yang berkualitas dan berproduksi optimal. Sampai saat ini, belum ada penyedia (penangkar) benih TPT yang bisa menjamin kualitas benih sesuai dengan persyaratan sertifikasi, karena belum ada *quality control* seperti yang sudah dilakukan pada tanaman pangan, hortikultura, maupun perkebunan. Untuk mendapatkan benih yang prima (terjamin kemurnian dan kualitasnya) untuk memenuhi kebutuhan pengguna maupun sebagai bahan penelitian biasanya diimpor dari luar negeri dengan harga relatif mahal. Di Indonesia, biji TPT telah diproduksi sejak lama di beberapa Unit Pelaksana Teknis (UPT), di bawah Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan dan beberapa petani, walaupun belum menerapkan sistem perbenihan dengan kontrol kualitas. Di Nusa Tenggara Timur, beberapa jenis TPT yang telah diproduksi oleh petani antara lain *Clitoria ternatea* dan *Leucaena leucocephala* cv Tarramba, namun belum mengikuti prosedur produksi benih yang mengacu pada persyaratan sertifikasi. Produksi benih TPT di Indonesia, baru terbatas untuk memenuhi kebutuhan dalam negeri. Oleh karena itu, sudah saatnya sistem perbenihan TPT diarahkan dan didukung oleh teknologi dan kelembagaan yang memadai. Di Thailand, pemerintah berhasil berkerjasama dengan petani dalam bentuk kontrak untuk memproduksi benih TPT. Benih yang dihasilkan petani dibeli dan dipasarkan oleh pemerintah (Phaikaew et al. 1997).

PRODUKSI BENIH DAN PASCAPANEN TANAMAN PAKAN TERNAK

Faktor lingkungan

Produksi benih dipengaruhi oleh beberapa faktor lingkungan antara lain, panjang hari, intensitas cahaya, dan temperatur (Simon 1997). Produksi benih tertinggi *Calopogonium mucunoides* dicapai pada kisaran

intensitas cahaya 80-100%, telah dilaporkan oleh (Fanindi et al. 2010).

Kondisi yang ideal untuk produksi benih leguminosa pohon yaitu pada saat musim kemarau, karena suhu yang kering merupakan kondisi yang tepat untuk pembungaan, penyerbukan dan perkembangan biji. Kondisi iklim yang tidak mendukung selama periode penyerbukan dapat menghasilkan calon biji maupun hasil biji yang rendah. Atta-Krah (1987) melaporkan pada saat awal musim hujan yang bertepatan dengan fase pembungaan pada *Gliricidia* mengakibatkan bunga gugur dan pembentukan biji rendah.

Disamping faktor lingkungan, beberapa jenis TPT memerlukan serangga tertentu sebagai polinator dan iklim yang cocok dalam proses penyerbukannya. Ketika iklim tidak cocok, misalnya saat hujan lebat juga akan mempengaruhi proses penyerbukan (Chamberlain & Rajaselvam 1996). Dalam suatu area budidaya, Kaliandra perlu diintroduksi oleh polinator untuk menjamin terjadinya penyerbukan. Tanaman yang memerlukan penyerbukan oleh serangga dan *outcrossing*, seperti *Gliricidia* maka dalam memproduksi biji harus diisolasi dari jenis yang sama atau jenis yang masih berhubungan dalam jarak tertentu untuk menghindari penyerbukan silang. Jarak isolasi paling sedikit 200 m (Suttie 1989). Sedang jenis tanaman yang mempunyai sifat menyerbuk sendiri seperti *Leucaena* spp untuk memproduksi biji hanya dipisahkan dari tanaman sejenis beberapa meter saja untuk menghindari kontaminasi dalam penyerbukan (Ethiopian Standard Agency 2000).

Pemilihan lokasi

Keberhasilan produksi benih TPT juga ditentukan oleh pemilihan lokasi, pengelolaan dan pemanenan yang tepat. Pemilihan lokasi untuk tujuan produksi benih merupakan suatu tahapan yang sangat penting. Pertumbuhan tanaman yang baik, waktu awal pembungaan, anthesis dan perkembangan biji adalah kondisi yang krusial untuk mendapatkan produksi biji yang maksimum. Tanah yang subur dan drainase yang baik juga sangat cocok untuk produksi biji (Lambert & Delimini 2012).

Budidaya

Kerapatan populasi tanaman juga mempengaruhi produksi biji, dimana makin tinggi populasi tanaman maka produksi biji makin rendah. Di Afrika Barat, *Gliricidia* menghasilkan biji hingga 89 g/pohon/tahun atau 37 kg/ha/tahun (Sumberg 1985). Pemupukan dengan pupuk berimbang telah menghasilkan peningkatan produksi benih sorgum (Fanindi et al. 2005).

Malaviya et al. (2013) menyatakan bahwa penggunaan hormon pertumbuhan seperti IAA dapat mempercepat perkecambahan benih rumput *Panicum* dan pembentukan akar dari vegetatif rumput Gajah hibrid secara *in vitro* dan dapat menghasilkan *seedling* (tanaman muda) dalam waktu 10 hari. Teknologi ini akan mempermudah pengepakan dan pengangkutan vegetatif ke lokasi tujuan dengan tingkat daya hidup (*survival rate*) lebih dari 80% saat dipindah ke lapangan.

Pemanenan

Sistem pemanenan dapat mempengaruhi produksi benih sehingga perlu pengelolaan yang tepat. Misalnya tinggi potong 0,5 m di atas permukaan tanah pada *Gliricidia* setelah panen biji, menurunkan pembungaan dan hasil biji selama dua tahun dibandingkan dengan tanaman yang tidak dipotong (Atta-Krah 1987). Kondisi yang sama terjadi pada *Leucaena* spp, tinggi potong 1,2 m di atas permukaan tanah menghasilkan biji lebih tinggi dibandingkan yang dipotong dengan tinggi 0,6 m (Mohatkar & Relwani 1985).

Kualitas benih

Parameter kualitas benih TPT yang perlu diamati atau diukur meliputi, kemurnian benih, bahan padat lain yang ada dalam sampel benih, maksimum benih varietas/tanaman lain dalam sampel benih, biji gulma, minimum persentase daya kecambah, kadar air dalam benih dan kesehatan benih (Lattimore et al. 2010). Untuk menguji kualitas benih ada tiga kriteria yaitu kualitas genetik (kemurnian benih), kualitas fisiologi (daya kecambah, daya tumbuh, vigor) dan kualitas fisik (bahan padat lain yang ada dalam sampel benih, maksimum benih varietas/tanaman lain dalam sampel benih, biji gulma). Marka mikrosatelit telah berhasil digunakan untuk menguji kemurnian genetik jagung hibrida (Surahman et al. 2012). Marka molekuler biasanya digunakan bila seleksi secara konvensional menemui kesulitan (Surahman et al. 2012).

Salah satu faktor yang mempengaruhi daya kecambah benih leguminosa tanaman pakan ternak adalah temperatur (Butler et al. 2014). Tiap benih dari jenis leguminosa mempunyai variasi temperatur yang berbeda. Benih leguminosa tropik mempunyai daya kecambah >70% terjadi pada kisaran temperatur 15-30°C, daya kecambah akan menurun bila temperatur <15°C dan >25°C. Pada temperatur 5°C benih tidak akan berkecambah. *Lablab* spp untuk berkecambah secara maksimum mempunyai kisaran temperatur yang luas, yaitu 15-35°C sedang *burgundy bean* mempunyai kisaran temperatur 20-30°C. Ini berbeda dengan benih leguminosa dari daerah dingin (Butler et al. 2014), yaitu berkisar 10-25°C.

PASCAPANEN BENIH TANAMAN PAKAN TERNAK

Pascapanen benih meliputi pengemasan benih dan penyimpanan yang tepat, tahap ini sangat penting agar kualitas benih dapat dipertahankan.

Penyimpanan benih

Banyak faktor yang mempengaruhi kehidupan benih dan kualitas benih. Faktor yang paling penting adalah kandungan air benih dan temperatur selama penyimpanan. Kandungan air benih yang tinggi memberi kesempatan serangga dan mikroorganisme aktif yang mengakibatkan pemanasan, sehingga dapat mematikan benih (Herbage Seed Unit 1994). Benih TPT tidak peka terhadap kandungan air dan temperatur rendah. Benih dapat dikeringkan sampai kandungan airnya 6-8%, pada temperatur 20°C dapat disimpan dalam waktu yang pendek sedangkan untuk penyimpanan jangka panjang dilakukan pada temperatur 5°C atau -20°C (Harrington 1960).

Pada umumnya, benih dengan lapisan luar keras (*hard seed coat*), misalnya *Leucaena* spp dan *Sesbania* spp dapat disimpan dalam waktu yang lama tanpa perlakuan khusus. Bahkan daya kecambah biji *Leucaena* yang disimpan pada suhu ruang, dalam freezer atau dalam tanah yang kering di rumah kaca selama 12 bulan menghasilkan daya kecambah yang tidak berbeda dengan pada saat periode awal penyimpanan (Cobbina et al. 1990). Tetapi benih dengan kulit luar tidak keras seperti *Gliricidia sepium*, *Sesbania grandiflora*, *Calliandra calothyrsus* memerlukan kondisi penyimpanan khusus jika ingin mempertahankan viabilitas yang tinggi. Biji-biji dari jenis tanaman tersebut sebaiknya disimpan dalam wadah yang ditutup sedemikian rupa sehingga kelembaban biji mencapai kurang dari 10% dan pada suhu 4°C atau lebih rendah. Viabilitas biji *C. calothyrsus* tetap terjaga selama 2,5 tahun bila disimpan dalam pendingin dengan suhu 4°C dan viabilitas akan menurun 15% bila biji disimpan pada suhu kamar selama satu tahun (National Research Council 1983).

Penyimpanan benih dapat diperpanjang melalui beberapa cara, seperti yang disarankan yaitu: (1) Benih benar-benar sudah masak sempurna, melalui pengeringan sehingga kadar air mencapai <10% dan bersih; (2) Disemprot dengan insektisida untuk membunuh insekta; (3) Disimpan dalam wadah yang hampa udara; (4) Disimpan dalam suhu rendah (<4°C) dan kelembaban rendah (Thomson & Evans 1990). Biji yang dikoleksi dari alam dan disimpan dalam kondisi dingin dapat bertahan kualitasnya sampai tiga tahun dibandingkan dengan dalam suhu ruang (Haslgruber et al. 2014).

Beberapa jenis rumput maupun leguminosa mempunyai sifat dormansi setelah dipanen. Dormansi benih merupakan kondisi dimana benih tidak mempunyai kemampuan untuk berkecambah dan memproduksi kecambah yang normal pada kondisi yang optimal (Simpson 1990). Dormansi benih *Brachiaria hybrid* cv Mulato II secara cepat terpatahkan bila benih disimpan pada temperatur kamar dan dormansi akan bertahan setelah tiga tahun disimpan dalam pendingin (Hare et al. 2008). Dormansi rumput Mulato II dan leguminosa *Ubon stylo* tidak dapat dipatahkan dan bertahan sampai dua tahun bila disimpan dalam ruang pendingin sedangkan dormansi rumput Mombasa dan rumput *Tanzania guinea* akan patah oleh penyimpanan dalam ruang pendingin (Hare et al. 2014). Pemecahan dormansi pada rumput tahunan *Elymus sibiricus* (rumput *temperate*) dilakukan antara lain dengan perlakuan KNO_3 , *cytokinin* maupun asam gibrelin (Zhang & Wang 2015). Cara lain pemecahan dormansi biji telah dilaporkan oleh Wang & Hanson (2008), dormansi pada *Sesbania sesban* disebabkan oleh lapisan luar biji yang bersifat tidak dapat ditembus oleh air (*water-impermeable*). Oleh karena itu, perlu perlakuan melalui dua tahap yaitu perendaman dalam air pada suhu 80°C selama delapan menit dan sisa biji-biji yang belum berkecambah dilakukan skarifikasi untuk memecah dormansinya. Pemecahan dormansi untuk *Vigna species*, dapat menggunakan asam sulfat (Wang et al. 2007), perlakuan asam sulfat dapat mengurangi sifat kerasnya lapisan biji sehingga meningkatkan daya kecambah. Pada perendaman selama 15 menit dapat meningkatkan daya kecambah dari 36% menjadi 85%.

Temperatur penyimpanan juga akan mempengaruhi daya hidup benih dan bervariasi antar jenis tanaman bahkan antar varietas. Penyimpanan benih rumput *Brachiaria hybrid* Mulato II, *Tanzania guinea* (*Panicum maximum*), *Mombasa guinea* (*P. maximum*) dan *Paspalum atratum*, mempunyai daya hidup sangat pendek 8-12 bulan dan setelah 12 bulan penyimpanan, semua benih sudah tidak hidup. Namun, bila disimpan dalam ruang pendingin daya hidup benih dapat bertahan sampai dua tahun untuk Mulato II. Sedangkan *Ubon paspalum* dan *Ubon stylo* dapat bertahan hidup sampai 20 bulan setelah itu daya kecambah akan menurun (Hare et al. 2014).

Pengemasan

Jenis-jenis kemasan benih yang telah dilaporkan, kebanyakan untuk tanaman pangan dan hortikultura. Benih kedelai yang disimpan dalam karung plastik, kantong semen, jerigen plastik atau kaleng akan menurun daya tumbuhnya setelah bulan keenam penyimpanan pada suhu ruang (Arifin et al. 2013). Daya kecambah benih yang disimpan dalam nilon dan

kantong kertas pada temperatur kamar akan mengalami penurunan dengan cepat dibandingkan bila benih disimpan dalam kantong plastik (Hare et al. 2008).

Untuk mempertahankan daya berkecambah benih bawang daun selama empat bulan dapat menggunakan kemasan kertas, plastik atau aluminium foil, sedangkan untuk penyimpanan lebih dari empat bulan harus menggunakan kemasan aluminium foil (Waluyo et al. 2014).

BENIH RECALCITRANT VERSUS ORTHODOX

Berdasarkan tingkat kepekaannya terhadap pengeringan dan suhu, maka benih dikelompokkan menjadi tiga, yaitu: (1) Benih *orthodox*; (2) Benih *recalcitrant*; dan (3) Benih *intermediate*. Benih *orthodox* adalah benih yang pada saat masak panen memiliki kandungan kadar air yang relatif rendah. Kelompok benih ini dapat disimpan pada keadaan kandungan air benih rendah dan suhu rendah. Sedangkan benih yang bersifat *recalcitrant* atau *drying sensitive* adalah benih yang sangat peka terhadap pengeringan dan akan mengalami kemunduran pada kadar air dan suhu yang rendah. Jika saat masa panen memiliki kandungan air yang relatif tinggi berarti benih akan mati dengan kekeringan dan kelembaban rendah. Kelembaban benih 12-30%, merupakan nilai kritis untuk benih *recalcitrant* dan tidak tahan pada temperatur di bawah 20°C. Pada kondisi temperatur tersebut, benih dapat luka karena adanya kondisi beku (*freezing injury*), sehingga tidak dapat disimpan dalam jangka panjang. Mungkin beberapa benih masih hidup tetapi vigoritas akan terpengaruh. Sedangkan benih *intermediate* adalah benih yang mempunyai sifat di antara benih *orthodox* dan *recalcitrant*. Benih ini dapat dikeringkan sampai batas kadar air yang aman untuk benih *orthodox* tanpa mempengaruhi viabilitas benih. Namun, benih yang kering akan mudah rusak bila disimpan pada suhu rendah, terutama pada kadar air di bawah 10% (Risasmoko 2006). Oleh karena itu, sangat krusial untuk mengetahui suatu benih, termasuk dalam kelompok *orthodox*, *recalcitrant* atau *intermediate* sehingga penyimpanan dapat dilakukan dengan tepat. Kebanyakan benih TPT dikategorikan benih *orthodox*, sehingga penyimpanan pada pascapanen toleran terhadap kandungan air dan suhu yang rendah.

SERTIFIKASI BENIH TANAMAN PAKAN TERNAK

Tujuan sertifikasi benih adalah menjaga/ mempertahankan dan menjadikan tersedianya benih untuk publik yang berkualitas tinggi dan sebagai bahan perbanyakan tanaman dan varietas yang ditanam dan jika didistribusikan terjamin identitas genetik dan

kemurnian genetiknya. Sertifikasi juga dirancang untuk mencapai standar yang dipersyaratkan. Benih bersertifikat adalah benih yang proses produksinya melalui sertifikasi benih, sertifikasi sistem manajemen mutu dan/atau sertifikasi produk. Sedangkan yang dimaksud dengan sertifikasi sistem manajemen mutu adalah proses yang menjamin bahwa sistem manajemen diterapkan untuk mengarahkan dan mengendalikan organisasi dalam hal mutu (SNI 9001:2008). Sertifikasi benih adalah proses pemberian sertifikat benih tanaman setelah melalui pemeriksaan lapangan dan/atau pengujian, pengawasan serta memenuhi semua persyaratan dan standar benih bina. Benih berkualitas diperoleh dari proses sertifikasi melalui pemeriksaan lapangan dan pengujian laboratorium. Penerapan sertifikasi akan memberikan jaminan mutu kepada pengguna benih. Jaminan mutu dimaksud mencakup mutu genetis (kebenaran dan keaslian varietas), mutu fisiologis (daya berkecambah dan vigor tinggi), mutu patologis (benih sehat) dan tidak tercampur dengan benih gulma (Ditjen Rehabilitasi Lahan dan Perhutanan Sosial 2007).

Sertifikasi benih di Indonesia untuk tanaman pangan maupun hortikultura sudah tertata dengan baik walaupun belum sepenuhnya menerapkan peraturan sertifikasi internasional. Di dalam perdagangan benih internasional mengacu pada program *Organization of Economic Co-operation Development (OECD) seed scheme* (skema benih OECD). Sistem sertifikasi benih yang diterapkan di Indonesia tersebut sepenuhnya mengadopsi *OECD scheme* untuk pengawasan di lapangan tercakup dalam *ISTA 1971* dan *ISTA rules* untuk pengujian di laboratorium mengacu pada *ISTA 1985* terutama untuk kelas benih dasar, benih pokok dan benih sebar. Untuk kelas benih penjenis (*breeder seed*), sistem pengelolaan masih di bawah kontrol pemulia pemilik varietas (Hidajat 2005).

Peraturan Menteri Pertanian No. 02/Permentan/SR-120/1/2014 (Permentan 2014) telah mengatur Produksi, Sertifikasi dan Peredaran Benih Bina Tanaman Perkebunan, Tanaman Pangan dan Tanaman Pakan Ternak. Di dalam Permentan tersebut, benih bina adalah benih dari varietas unggul yang telah dilepas, yang produksi dan peredarannya diawasi. Implementasi dari Permentan ini, untuk mendapatkan sertifikasi benih, varietas TPT harus dilakukan pelepasan dahulu. Untuk itu, hingga menunggu adanya varietas unggul yang dilepas maka perlu pembenahan sistem pengelolaan produksi benih yang baik, sehingga mampu menyediakan benih di tingkat lapangan sesuai dengan kebutuhan petani ataupun pengguna lainnya yaitu benih dengan varietas, mutu, jumlah, waktu, lokasi dan harga yang tepat (Ditjen Tanaman Pangan 2015).
Terbitnya Permentan No. 61/Permentan/OT.140/10/2011 (Permentan 2011), tentang Pengujian, Penilaian, Pelepasan dan Penarikan

Varietas, termasuk varietas TPT akan mendorong penerapan sertifikasi benih TPT.

Usaha membangun sistem perbenihan dan pelepasan varietas tanaman pakan ternak, di Indonesia mulai dirintis sejak tahun 2009 (Prawiradiputra et al. 2009). Mulai tahun 2013 telah dirintis adanya sertifikasi benih TPT. Institusi Ditjen Peternakan dan Kesehatan Hewan melalui UPT Balai Pengujian Mutu Pakan Ternak (BPMPT) diberi mandat untuk melakukan sertifikasi benih TPT. Oleh karena itu, perlu segera dilakukan pengadaan sarana prasarana, kesiapan sumber daya manusia dan penetapan standar nasional untuk kualitas benih TPT bersertifikat.

Produksi biji TPT oleh institusi pemerintah BPTHMT sudah dilakukan sejak lama, walaupun akhirnya mandat UPT berubah bukan sebagai penghasil benih. Namun, pada tahun 2013 semua UPT perbibitan di bawah Ditjen PKH, mempunyai mandat tambahan menjadi Balai Perbibitan Ternak Unggul dan Hijauan Pakan Ternak (BPTU-HPT). Dengan adanya mandat ini maka BPTU-BPTU dituntut selain menyediakan bibit unggul ternak sesuai mandat juga menyediakan benih TPT untuk kebutuhan internal maupun pihak-pihak lain yang membutuhkannya. Oleh karena itu, BPTU-HPT secara bertahap perlu menerapkan tata cara produksi benih menuju benih bersertifikat.

Manfaat adanya sertifikasi benih adalah: (1) Sistem sertifikasi benih menjamin kultivar unggul terjaga kemurniannya dan tidak terkontaminasi oleh tipe tanaman yang tidak unggul dan gulma; (2) Menjamin pelabelan yang benar; (3) Menyediakan pelayanan pemeriksaan benih tanaman; (4) Mengidentifikasi benih dalam suatu jumlah tertentu; (5) Menyediakan pelayanan yang dapat dipercaya dalam pengambilan sampel dan uji benih; dan (6) Mendorong tumbuhnya penangkar benih TPT. Selain manfaat, beberapa hal yang menjadi kendala sertifikasi benih, antara lain: (1) Peraturan sertifikasi yang harus diikuti produser benih akan membatasi pilihan sistem pengelolaan benih; (2) Harus mengisi formulir; (3) Ada kemungkinan terlambatnya operasional produksi benih karena menunggu petugas yang melakukan pemeriksaan tanaman di lapangan; (4) Ada biaya yang harus dibayarkan ke institusi yang mengeluarkan sertifikat; dan (5) Biaya produksi benih bertambah dengan adanya sistem produksi yang harus diikuti (Cameron 2003).

KOMERSIALISASI BENIH TANAMAN PAKAN TERNAK

Penyediaan benih berkualitas bertujuan untuk melindungi dan memberikan jaminan kepada konsumen termasuk petani, agar benih yang digunakan dapat mencapai produktivitas dan mutu hasil panen yang optimal. Di Indonesia, TPT belum dianggap komoditas strategis dan belum menjadi komoditas yang

mempunyai nilai ekonomi tinggi seperti halnya tanaman pangan, tanaman hortikultura, tanaman perkebunan maupun tanaman kehutanan. Sehingga benih TPT juga belum dijadikan komoditas unggulan. Benih TPT yang beredar di pasaran dalam negeri, belum melalui kontrol kualitas sehingga belum ada jaminan benih memenuhi standar mutu dan jenisnya sangat terbatas. Namun, kebutuhan benih TPT dalam beberapa tahun terakhir meningkat dengan adanya perluasan perkebunan kelapa sawit, kebutuhan akan tanaman untuk fitoremediasi lahan bekas tambang dan yang saat ini sedang merupakan isu global untuk menggantikan sumber energi fosil dengan energi biomassa. Rumput *Pennisetum purpureum* (rumput Gajah) dan rumput *Panicum virgatum* merupakan tanaman pakan ternak yang digalakkan di beberapa negara dijadikan sumber energi biomassa (Flores et al. 2012; Brown 2015). Substitusi konsentrat dengan konsentrat nabati merupakan tantangan untuk memproduksi benih tanaman leguminosa. Kondisi tersebut akan mendorong produksi benih dan tumbuhnya bisnis benih TPT yang berkualitas.

Tantangan sistem suplai benih TPT di Indonesia sampai saat ini masih terbatas dalam lingkup institusi pemerintah. Oleh karena itu, keterlibatan peran swasta perlu didorong dalam sistem rantai suplai benih TPT. Kegunaan benih TPT perlu diperluas untuk berbagai keperluan selain sebagai sumber hijauan pakan ternak atau dengan kata lain sifat TPT yang multifungsi perlu dioptimalkan, misalnya untuk rehabilitasi lahan tambang, penutup tanah, rehabilitasi lahan terdegradasi, bahan sumber energi terbarukan, bahkan untuk bahan kosmetik, sebagai obat, tanaman hias dan pewarna kain dan kue.

Prospek pasar benih TPT sangat terbuka lebar. Tanaman pakan ternak memiliki multifungsi baik daun maupun bijinya sebagai pakan, pewarna alami (Lemmens & Cardon 2005), ataupun obat. Kebutuhan TPT sebagai tanaman penutup tanah di perkebunan, tanaman reklamasi area yang terdegradasi, tanaman pengontrol erosi dan lain-lain makin meningkat, sehingga kebutuhan akan benih juga meningkat. Pertambahan luas kebun kelapa sawit di Indonesia yang sangat cepat sejak tahun 2008 berkisar 6,92%, yaitu 7.363.703 menjadi 7.873.384 ha (Ditjenbun 2011) dan sampai tahun 2014 mencapai 10,9 juta ha (Ditjenbun 2014) merupakan peluang bisnis benih TPT karena penutup tanah (*cover crop*) di perkebunan sawit adalah TPT dari kelompok leguminosa TPT. Perusahaan tambang yang akan melakukan reklamasi lahan bekas tambang, biasanya menggunakan TPT baik rumput maupun leguminosa.

Beberapa tanaman leguminosa dapat dijadikan sebagai pewarna alami, misalnya tanaman *Indigofera* spp dan *C. ternatea*. *Clitoria ternatea*, selain sebagai sumber hijauan ternak berkualitas juga merupakan

komoditas untuk obat herbal (Daisy & Rajathi 2009), antara lain bersifat diuretik, melancarkan sistem pencernaan, mempercepat pematangan bisul, pembersih mata dan menyembuhkan mata merah, menghitamkan dan menguatkan rambut dan pewarna alami pembuatan makanan (Hartono 2013), hasil ekstraksi daun mempunyai antimikroba untuk penyakit pada ikan (Ponnusamy et al. 2010), ekstrak akar mengandung zat antiasmatik (Taur & Patil 2011).

KESIMPULAN

Perbenihan TPT di Indonesia perlu dibenahi, baik secara kelembagaan maupun teknis produksi. Kebutuhan benih TPT semakin meningkat untuk berbagai kegunaan, antara lain sebagai sumber hijauan pakan ternak, tanaman penutup tanah, rehabilitasi lahan terdegradasi, maupun sebagai fitoremediasi. Pembenihan meliputi proses produksi benih, sarana prasarana untuk pengujian benih dan kelembagaan serta sumber daya manusia yang melakukan sertifikasi.

Implikasi adanya Permentan No. 02/Permentan/SR.120/1/2014 yang telah mengatur produksi, sertifikasi dan peredaran benih bina tanaman perkebunan, tanaman pangan dan tanaman pakan ternak adalah benih TPT yang akan diperjual belikan harus disertifikasi terlebih dahulu.

Komersialisasi dan pasar benih TPT untuk berbagai peruntukan saat ini mulai terbuka lebar. Untuk sementara, pemerintah dapat berperan sebagai pembeli dan membantu pemasaran, sedangkan untuk jangka panjang peran pihak swasta perlu ditingkatkan dalam memproduksi benih TPT yang berkualitas.

DAFTAR PUSTAKA

- Arifin Z, Dewi IR, Setyorini D. 2013. Pengaruh pemupukan terhadap hasil dan daya tumbuh benih kedelai dalam kemasan simpan. Dalam: Prosiding Seminar Nasional: Menggagas Kebangkitan Komoditas Unggulan Lokal Pertanian dan Kelautan. Madura (Indonesia): Fakultas Pertanian Universitas Trunojoyo Madura. hlm. 614-622.
- Atta-Krah AK. 1987. Flowering and seed production of *Gliricidia sepium*. In: Withington D, Glover N, Brewmbaker JL, editors. *Gliricidia sepium* (Jacq) Walp: management and improvement. Hawaii (US): NFTA Special Publication 87-01. p. 142-145.
- Brown P. 2015. Elephant grass could offer viable alternative to coal. Clim News Netw [Internet]. [cited 2016 Feb 15]. Available from: <http://climatenetwork.net/elephant-grass-could-offer-viable-alternative-to-coal/>
- Butler TJ, Celen AE, Webb SL, Krstic D, Interrante SM. 2014. Temperature affects the germination of forage legume seeds. Crop Sci. 54:2846-2853.

- Cameron AG. 2003. Certified seed. Northern Territory (AUS): Department Primary Industry Fisheries and Mines.
- Chamberlain JR, Rajaselvam RJ. 1996. *Calliandra calothyrsus* pollinator behavior and seed production. In: Evans DO, editor. Proceeding International Workshop on the Genus *Calliandra*. Bogor, 23-27 January 1996. Morrilton (US): Winrock International Institute for Agriculture Development. p. 34-40.
- Cobbina J, Kolawale GL, Atta-Krah AN. 1990. *Leucaena* and *Gliricidia* seed viability and germination influenced by storage conditions. *Leucaena Res Reports*. 11:91-93.
- Daisy P, Rajathi M. 2009. Hypoglycemic effects of *Clitoria ternatea* Linn (*Fabaceae*) in alloxan-induced diabetes in rats. *Trop J Pharm Res*. 8:393-398.
- Dewi NK, Yudono P, Jamhari. 2013. Tingkat adopsi petani terhadap benih padi (*Oryza sativa* L) bersertifikat dan non-sertifikat di Kecamatan Kalasan, Kabupaten Sleman. *Vegetalika*. 2:74-86.
- Ditjen Rehabilitasi Lahan dan Perhutanan Sosial. 2007. Petunjuk teknis pengujian mutu fisik-fisiologi benih. Peraturan Direktur Jenderal Rehabilitasi Lahan dan Perhutanan Sosial Nomor: p.13 /v-pth/2007. Jakarta (Indonesia): Direktorat Jenderal Rehabilitasi Lahan dan Perhutanan Sosial, Kementerian Kehutanan.
- Ditjen Tanaman Pangan. 2015. Pedoman teknis pemberdayaan penangkar benih. Jakarta (Indonesia): Direktorat Jenderal Tanaman Pangan, Kementerian Pertanian.
- Ditjenbun. 2011. Statistik perkebunan 2009-2011: Kelapa sawit. Jakarta (Indonesia): Direktorat Jenderal Perkebunan, Kementerian Pertanian.
- Ditjenbun. 2014. Statistik perkebunan Indonesia, komoditas kelapa sawit 2013-2015. Jakarta (Indonesia): Direktorat Jenderal Perkebunan, Kementerian Pertanian.
- Ethiopian Standard Agency. 2000. *Leucaena* seed-specification. Ethiopian Standard Agency [Internet]. [cited 2016 Mar 26]. Available from: <https://law.resource.org/pub/et/ibr/et.443.2000>
- Fanindi A, Prawiradiputra BR, Abdullah L. 2010. Pengaruh intensitas cahaya terhadap produksi hijauan dan benih Kalopo (*Calopogonium mucunoides*). *JITV*. 15:205-214.
- Fanindi A, Yuhaeni S, Wahyu H. 2005. Pertumbuhan dan produktivitas tanaman sorgum (*Sorghum bicolor* (L) Moench dan *Sorghum sudanense* (Piper) Stapf) yang mendapatkan kombinasi pemupukan N, P, K dan Ca. Dalam: Mathius IW, Bahri S, Tarmudji, Prasetyo LH, Triwulanningsih E, Tiesnamurti B, Sendow I, Suhardono, penyunting. Inovasi Teknologi Peternakan untuk Meningkatkan Kesejahteraan Masyarakat dalam Mewujudkan Kemandirian dan Ketahanan Pangan Nasional. Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Bogor, 12-13 September 2005. Bogor (Indonesia): Puslitbangnak. hlm. 872-878.
- Flores RA, Urquiaga S, Bruno JRA, Leonardo SC, Robert MB. 2012. Yield and quality of elephant grass biomass produced in the cerrados region for bioenergy. *Eng Agríc*. 32:831-839.
- Hare MD, Phengphet S, Songsiri T, Sutin N, Stern E. 2014. Germination of tropical forage seeds stored in ambient and controlled temperature and humidity conditions. *Trop Grasslands*. 2:74-75.
- Hare MD, Tatsapong P, Phengphet S. 2008. Effect of storage duration, storage room and bag type on seed germination of *Brachiaria hybrid* cv Mulato. *Trop grasslands*. 42:224-228.
- Harrington JF. 1960. Thumb rubs of drying seed. *Crop Soils*. 13:16-17.
- Hartono MA. 2013. Pemanfaatan ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea*) sebagai pewarna alami es lilin [Thesis]. [Yogyakarta (Indonesia)]: Universitas Atma Jaya Yogyakarta.
- Haslgruber P, Krautser B, Blaschka A, Graiss W, Potsch EM. 2014. Influence of different storage conditions of on quality characteristics of material from semi-natural grassland. *J Br Grassl Soc*. 70:549-556.
- Herbage Seed Unit. 1994. Forage seed production. Addis Ababa (Ethiopia): International Livestock Centre for Africa.
- Hidajat JR. 2005. Perbenihan dan pelepasan varietas tanaman pakan ternak. Dalam: Subandriyo, Diwyanto K, Inounu I, Prawiradiputra BR, Setiadi B, Nurhayati, Priyanti A, penyunting. Prosiding Lokakarya Nasional Tanaman Pakan Ternak. Bogor, 16 September 2005. Bogor (Indonesia): Puslitbangnak. hlm. 45-54.
- Lambert, Delimini. 2012. Seed production and training manual. Berlin (Germany): FAO/Germany Cooperative Programme for Ministry of Agriculture, Forestry and Food Security.
- Lattimore MA, Christie J, McCormic L. 2010. Pasture varieties used in New South Wales 2010-2011. New South Wales (AUS): I&I NSW and the Grassland Society of NSW Inc.
- Lemmens RHMJ, Cardon D. 2005. *Indigofera arrecta*. Jansen PCM, Cardon D, editors. Wageningen (Netherlands): Plant Resources of Tropical Africa.
- Malaviya DR, Vijay D, Gupta CK. 2013. Forage seed research-Innovations at IGFRI. In: Malaviya DR, Vijay D, Bahukhandi D, Gupta CK, Kumar V, Pandey HC, editors. Quality seed production and seed standards in forage crops and range grasses: Challenges, advances and innovations. Jhansi (India): Indian Grassland and Fodder Research Institute.
- Mohatkar LC, Relwani LL. 1985. Effect of plant population, stubble height and number of cuttings on the growth, seed, forage and firewood production of *Leucaena* K8. *J Leucaena Res Rep*. 6:40-41.

- National Research Council. 1983. Calliandra: A versatile mall tree for the humid tropics. Washington DC (US): National Academic Press.
- Permentan. 2011. Peraturan Menteri Pertanian No 61/Permentan/OT.140/10/2011 tentang Pengujian, Penilaian, Pelepasan dan Penarikan Varietas. Jakarta (Indonesia): Balitbangtan.
- Permentan. 2014. Peraturan Menteri Pertanian No. 02/Permentan/SR.120/1/2014 tentang Produksi, Sertifikasi dan Peredaran Benih Bina. Jakarta (Indonesia): Kementerian Pertanian.
- Phaikaew C, Guodao L, Abdullah A, Tuhulele M, Magboo E, Bouahom B, Stur W. 1997. Tropical forage seed production in Southeast Asia: Current status and prospects. In: Proceedings XVIII IGC. International Grassland Congress. Winnepeg (Canada): The Forage and Grassland Foundation, IGC and IRC. p. 2-7.
- Ponnusamy S, Gnanaraj WE, Antonisamy JM, Selvakumar V, Nelson J. 2010. The effect of leaves extracts of *Clitoria ternatea* Linn against the fish pathogens. Asian Pac J Trop Med. 3:723-726.
- Prawiradiputra BR, Setiadi B, Fanindi A. 2009. Membangun sistem perbenihan dan pelepasan tanaman pakan ternak. Bogor (Indonesia): Puslitbangnak.
- Risasmoko. 2006. Pengaruh kadar air awal, wadah dan periode penyimpanan terhadap viabilitas benih Suren (*Toona sureni* Merr) [Skripsi]. [Bogor (Indonesia)]: Institut Pertanian Bogor.
- Simon U. 1997. Environmental effects on seed production of forage legumes. In: Proceedings XVIII IGC. International Grassland Congress. Winnepeg (Canada): The Forage and Grassland Foundation, IGC and IRC. p. 455-460.
- Simpson GM. 1990. Seed dormancy in grasses. Cambridge (UK): Cambridge University Press.
- Sumberg JE. 1985. Note on flowering and seed production in a young *Gliricidia sepium* seed orchard. Trop Agric. 62:17-19.
- Surahman M, Giyanto, Takdir A, Hipi A. 2012. Evaluasi kemurnian genetik dengan marka mikrosatelit dan aplikasi rizobakteria untuk meningkatkan produksi dan mutu benih jagung hibrida. J Ilmu Pertanian Indonesia. 17:22-34.
- Suttie JM. 1989. *Gliricidia sepium* (Jacq). Rome (Italy): FAO.
- Taur DJ, Patil RY. 2011. Evaluation of antiasthmatic activity of *Clitoria ternatea* L roots. J Ethnopharmacol. 136:374-376.
- Thomson L, Evans DO. 1990. Seed production of parennial *Sesbania* species. In: Evans DO, Macklin B, editors. Parennial *Sesbania* production and use. Hawaii (US): NFTA. p. 29-32.
- Waluyo N, Azmi C, Kirana R. 2014. Pengaruh jenis kemasan terhadap mutu fisiologis benih bawang daun (*Allium fistulosum* L) selama periode simpan. Agrin. 18:148-157.
- Wang YR, Hanson J, Mariam YW. 2007. Effect of sulfuric acid pretreatment on breaking hard seed dormancy in diverse accessions of five wild *Vigna* species. Seed Sci Tech. 35:550-559.
- Wang YR, Hanson J. 2008. An improved method for breaking dormancy in seeds of *Sesbania sesban*. Exp Agric. 44:185-195.
- Zhang JQ, Wang YR. 2015. Breaking dormancy in freshly matured seeds of *Elymus sibiricus*, an important forage grass in the Tibetan plateau. Genet Mol Res. 14:11109-11118.

The Use of Plant Essential Oils as Feed Additives for Ruminants (Pemanfaatan Minyak Atsiri dari Tanaman sebagai Imbuhan Pakan untuk Ternak Ruminansia)

Muhamad N Rofiq

Pusat Teknologi Produksi Pertanian, Deputi Bidang TAB, BPPT
LAPTIAB Gedung 612 Kawasan Puspiptek Serpong, Tangerang Selatan
nasir.rofiq@bppt.go.id

(Diterima 30 November 2015 – Direvisi 1 Maret 2016 – Disetujui 8 Maret 2016)

ABSTRACT

Public awareness of health risk and environmental problem caused by inappropriate use of antibiotics and hormones resulted in prohibition of antibiotics in feed since 2003 in European Union. The regulation stated that ruminant feed additives should not have an adverse effect on animal health, human health and environment. Plant essential oils are recommended for animal feed additive because of their antimicrobial effects. The major bioactive compounds of essential oils as rumen manipulator have not been yet evaluated on *in vitro* and *in vivo* studies. Some plants essential oils showed their function to increase dry matter digestibility, VFA, N-NH₃ and reduce methane production in the *in vitro* study. The studies still have not enough yet to prove the use of essential oils as ruminant feed additive to increase nutrient digestibility and mitigate rumen methane production. Combination of some plant essential oils or some of their main active components may be more advantageous because of their synergistic effects.

Key words: Feed additive, plant essential oils, methane, ruminant, performance

ABSTRAK

Kesadaran masyarakat terhadap potensi risiko kesehatan dan masalah lingkungan yang disebabkan oleh penggunaan antibiotik dan hormon berlebihan dalam pakan imbuhan menyebabkan larangan penggunaan beberapa antibiotik sejak tahun 2003 di negara-negara Eropa. Peraturan tersebut menyatakan bahwa penggunaan pakan imbuhan untuk ternak ruminansia tidak boleh memiliki efek buruk terhadap kesehatan hewan, kesehatan manusia dan lingkungannya. Minyak atsiri dari tanaman merupakan salah satu bahan pakan imbuhan yang dapat dianjurkan karena pengaruhnya sebagai agen antimikroba. Minyak atsiri dari tanaman dan komponen senyawa utama bioaktifnya masih belum banyak dievaluasi efeknya secara *in vitro* dan *in vivo* sebagai manipulator rumen. Minyak atsiri dari tanaman mempunyai kemampuan untuk meningkatkan pencernaan nutrisi, VFA, N-NH₃ dan menurunkan produksi metana dalam penelitian secara *in vitro*. Penelitian yang telah dilakukan belum cukup untuk membuktikan hal ini. Kombinasi dari beberapa minyak atsiri dari tanaman atau dari komponen aktifnya akan lebih bermanfaat karena adanya efek sinergistik.

Kata kunci: Imbuhan pakan, minyak atsiri dari tanaman, metana, ruminan, performans

INTRODUCTION

Feed additives for animal was prohibited to be included in the feed since 1998 in European Union because of their potential health risk and environmental problem. The European parliament and the council has raised a regulation No. 1831/2003 on additives for use in animal nutrition, about definition, monitoring, categories and application of using animal feed additives (European Commission 2003). The regulation mentioned about the condition for authorisation feed additive, which it shall not have an adverse effect on animal health, human health or the environment. It shall not be presented in a manner which may mislead the user and not harm the consumer by impairing the

distinctive features of animal products or mislead the consumer which regard to the distinctive features of animal products.

Some material were categorized as feed additive for animal in the annex 1 of EC 1831/2003, that feed additives were grouped as technological additives, sensory additives, nutritional additives, and zoo-technical additives (European Commission 2003). Dietary additives which have favourable effect on the environment, had been an interesting focus since the Green House Gas (GHG)'s emission from livestock was reported increasing. The IPCC estimates that 13.5% of global GHG emission is attributed from the agricultural sector (IPCC 2007), but emission of CH₄ and N₂O increased globally by nearly 17% from 1990

to 2005 (Smith et al. 2007). Enteric CH₄ fermentation accounted for about 32% of total non-CO₂ emission from agriculture in 2005 (Smith et al. 2005). Methane emission mitigation from livestock sector, especially from rumen enteric methane was assessed by some experiments using ration manipulation, feed additives or biotechnological intervention.

Researchers tried to find the substances for EC recommended animal feed additive including plant essential oils. Plant essential oils are volatile, aromatic compounds with an oily appearance, are obtained from plants, famous as antimicrobial agent were assessed for categorized to zoo-technical additives group (European Commission 2003). The following functional zoo-technical additives group are included digestion enhancer, gut flora stabilisers, substance which favourable affect the environment, and others (European Commission 2003). Essential oils or their major bioactive compounds such as clove (Eugenol), cinnamon (Cinnamaldehyde), orange peel (Limonene), garlic (Diallyldisulfide), mint (Carvacrol), and thyme (Carvacrol, Thymol) have been evaluated for *in vitro* rumen methane reducer, associated rumen fermentation effect, and *in vitro* anti-methanogenesis bacterial agents. They have been also evaluated on ruminant as performance enhancer and enteric methane emission reducer. *In vivo* experiments using plant essential oils were mostly conducted on cattle and a few of them were conducted on goats. Economically, using essential oils as ruminants methane reducer still had no equivalent cost exist for CO₂ equivalent trading compared with using yeast and fumaric acid as ruminants methane reducer which had equivalent cost 50% and less than 1% for CO₂ equivalent trading.

For all the reasons, the experiments still have not yet enough for establish the use of essential oils as feed additive, especially as ruminants feed additive. They need more information on the major components of plant essential oils which have specially effects on rumen fermentation and rumen ecology (Franz et al. 2010). Some researchers started with rumen methanogenesis database and tested some plant essential oils for anti-methanogenesis effect. The potential effect of essential oils on reducing rumen CH₄ production should also consider their potential effect on animal performance.

PLANT ESSENTIAL OILS

Plant essential oils (EO) are one of plant secondary metabolites obtained from volatile fraction of plants distillation process (Gershenzon & Croteau 1991) which are versatile and consist of several chemical constituents with the basic building elements being primarily carbon, hydrogen, and oxygen (Mathe 2009). The main group of constituents found in EO

include: (1) Alcohol; (2) Aldehyde; (3) Esters; (4) Ethers; (5) Ketones; (6) Phenols; and (7) Terpenes which can be broken down into numerous smaller components (Mathe 2009).

There are two chemical groups of essential oils, terpenoids and phenylpropanes. Terpenoids are the more numerous and diversified group of plant secondary metabolites. These compounds are characterized by its basic structure of 5 carbons (C₅H₈). Within terpenoids, the most important components of essential oils of the majority of plants belong to the monoterpene and sesquiterpene families (Carvacrol, Thymol, Terpinen 4-ol). Phenylpropanoids are not the most common compounds of essential oils. The term phenylpropanoid refers to compounds with a chain of 3 carbons bound to an aromatic ring of 6 carbons (Calsamiglia et al. 2007). The biosynthesis of main plants extract including EO was obtained from glucose and pentose metabolism. Some important plants with their essential oils were presented in Table 1 (Calsamiglia et al. 2007).

Diallyl disulfide (DADS) with molecular formula C₆H₁₀S₂ is an organosulfur compound derived from garlic and a few other genus *Allium* plants (Block 2010). It is a yellowish liquid which is soluble in water and has a strong garlic odor. It is produced during the decomposition of allicin, which is released upon crushing garlic and other plants of the *Alliaceae* family. DADS had molar mass 146.28 g/mol, density 1.01 g/cm³ with boiling point 108°C and soluble in water, ethanol and oils (PubChem 2016). Diallyl disulfide also was known as detoxification agent of the cells because of its effect on increasing enzyme glutathione S-transferase (GST) and had antimicrobial effects by increasing bacterial membrane permeability (Tsao & Yin 2001).

Table 1. The main chemical composition of EO from some plants

Essential oils of	Name	Active Component
<i>Allium sativum</i>	Garlic	Allilcin, Diallyl sulfide
<i>Cytrus cynensis</i>	Orange	Limonene
<i>Cinnamomum cassia</i>	Cassia	Cinnamaldehyde
<i>Juniperus oxycedrus</i>	Juniper	Cardinene, Pinene
<i>Origanum vulgare</i>	Oregano	Carvacrol, Thymol
<i>Pinpinella anisum</i>	Anise (anason)	Anethol
<i>Syzygium aromaticum</i>	Clove	Eugenol
<i>Thymus vulgaris</i>	Thyme	Tyhme, Carvacrol
<i>Zingiber officinale</i>	Ginger	Zingiberene
<i>Origanum mintiflorum</i>	Turkish oregano	Carvacrol
<i>Funiculum vulgare</i>	Fennel	Trans anethol
<i>Mentha longifolia</i>	Mint	cis-piperitone

Source: Calsamiglia et al. (2007)

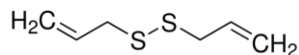


Figure 1. Molecular structure of DADS

Cinnamaldehyde (C_9H_8O) is the organic compound that gives cinnamon its flavor and odor. It appears as yellow oil. It has 132.16 g/mol of molar mass, 1.05 g/ml of density and 248°C of boiling point (PubChem 2016). The essential oil of cinnamon bark is about 90% cinnamaldehyde.

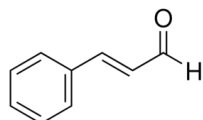


Figure 2. Molecular structure of Cinnamaldehyde

Source: PubChem (2016)

Limonene or Dipentene has molecular formula $C_{10}H_{16}$, is a colourless liquid hydrocarbon classified as a cyclic terpene. Limonene takes its name from the lemon, like other citrus fruits, contain considerable amount of this compound, which contributes to their odor. It has 136.24 g/mol of molar mass, 0.8411 g/cm³ of density and 176 °C of boiling points.

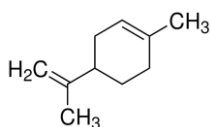


Figure 3. Molecular structure of Limonene (Dipentene)

Limonene is common in cosmetic products, food manufacturing, medicines, botanical insecticides, hand cleaners and also was considered for biofuel. Limonene could be used as antibacterial agent especially Gram⁺ bacteria because it has a mechanism to inhibit microbial growth by changing the bacterial permeability (Dabbah et al. 1970). Pasqua et al. (2006) found a change in long chain fatty acid profile in the membranes of *E. coli* grown in the presence of limonene or cinnamaldehyde. The changes in fatty acid composition can affect surviving ability of microorganisms.

Eugenol is a member of the phenylpropanoids class of chemical compounds. It is a clear to pale yellow oily liquid extracted from certain essential oils especially from leaves or flower buds. It is slightly soluble in water and soluble in organic solvents. It has spicy, clove-like aroma (Dorman & Deans 2000). Its chemical properties are $C_{10}H_{12}O_2$ molecular formula, 164.20 g/mol molar mass, 1.06 g/cm³ density and

254°C boiling point. Eugenol was found as anti-bacterial agent against 24 different genera of bacteria, included animal and plant pathogens, food poisoning and spoilage bacteria (Dorman & Deans 2000).

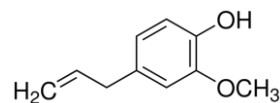


Figure 4. Molecular structure of Eugenol

Pulegone ($C_{10}H_{16}O$) is a naturally occurring organic compound obtained from the essential oils of a variety of plants including Mint plants (*Mentha longifolia* or *Mentha piperita*). It is classified as a monoterpene which is a clear colorless oily liquid and has a pleasant odor similar to peppermint. It was also used in flavoring agents in perfumery, and in aromatherapy (Asekun et al. 2006). It has 152.23 g/mol of molar mass, 0.9346 g/cm³ of density, 224°C of boiling point and it is insoluble in water.

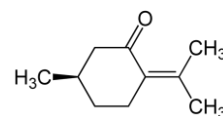


Figure 5. Molecular structure of Pulegone

Thymol (also known as 2-isopropyl-5-methylphenol, IPMP) is a natural monoterpene phenol derivative of cymene, $C_{10}H_{14}O$, isomeric with carvacrol, found in oil of thyme, and extracted from *Thymus vulgaris* (common thyme). It has aromatic odor and strong antiseptic properties (Dorman & Deans 2000). Derivatives of thymol and carvacrol with increased antimicrobial activities have been developed. Their strong antimicrobial characteristic is due to their phenolic structure and their ability on cell wall membrane disruption (Dorman & Deans 2000; Trombetta et al. 2005). *Thymus vulgaris*, containing 57.7% of thymol, had strong antimicrobial activity on some pathogenic bacterial such as *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *E. coli* O157:H7, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. flexneri*, *S. sonnei*, *S. aureus* and *Y. enterocolitica* (Rota et al. 2008).

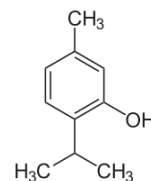


Figure 6. Molecular structure of Thymol

ROLE OF PLANT ESSENTIAL OILS ON RUMINANT

Plant essential oils were analyzed for rumen manipulator used meta-analysis (Calsamiglia et al. 2007; Patra 2010) as its chemical bioactive component was studied for chemical feed additive substitution. Some plant essential oils were tested as ruminant feed additives both of *in vitro* and *in vivo* experiments.

Garlic oils affected dry matter digestibility *in vitro* (Yang et al. 2007; García-González et al. 2008) and increasing NDF digestibility (Patra et al. 2010). Garlic oils decreased methane production *in vitro* (Busquet et al. 2005; 2006) and inhibited deamination (Cardozo et al. 2004) and decreased total VFA production (Cardozo et al. 2005). Methane production was decreased by means of reducing protozoa number when garlic oil was added in the *in vitro* studies (Patra et al. 2010). Recent studies have not yet reported about the capability of garlic oils on increasing of milk production from ruminants (Yang et al. 2007; Gorgulu et al. 2010).

The major components of clove oil are eugenol and β -caryophyllene which increased milk production (Kung et al. 2008). Eugenol reduced rumen pH and methane production (Patra 2010), N-NH_3 (Bach et al. 2007), increased propionic acid (Kung et al. 2008) and reduced butyric and acetic acid. Patra (2010) reported that methane was reduced 85.6% on volume basis by feeding with clove oils 0.5 ml/30 ml rumen. Its capability for decreasing methane is still need further research with some doses. Benchaar et al. (2011) reported that 50 mg/kg DMI dose of eugenol for primiparous lactating cows may have low potential as feed additive. The effect of eugenol (i.e antimicrobial effect) is neither pH nor diet dependent (Pandima et al. 2010).

Major components of *Thymus vulgare* are carvacrol 57% and gamma-terpinene 21.2% (Gorgulu et al. 2010). However, Rota et al. (2008) reported that the compounds were thymol (57.7%), p-cymene (18.7%) and carvacrol (2.8%). Thyme oils increased dry matter, organic matter digestibility of feed containing wheat straw and soybean meal (Gorgulu et al. 2010), contrast to the report from Benchaar et al. (2007) that it reduced dry matter and NDF digestibility *in vitro*. Thyme oils have no effect to pH (Benchaar et al. 2007; Gorgulu et al. 2010), although it increased pH *in vitro* (Macheboeuf et al. 2008). Thyme oils have been reported to act as deaminase inhibitor *in vitro* (van Nevel & Demeyer 1996). Benchaar et al. (2007) and Macheboeuf et al. (2008) reported that it reduced VFA and N-NH_3 production in the *in vitro*. Evans & Martin (2000) reported that thyme oils 0.4 g/l added to *in vitro* system reduced methane production as much as 94%. However, 108 ppm of thyme oil added as feed additive

in total mixed ration has no effect on milk production (Gorgulu et al. 2010).

Cinnamon oil from *Cinnamomum* variety has eugenol and cinnamaldehyde as the major compounds. In the leaf part of the plant, eugenol (69.57%) is the major component of essential oils (Gorgulu et al. 2010), but in the inner bark part of plant, cinnamaldehyde (60%) is the major one. Some *in vitro* digestibility and gas test experiments reported that Cinnamon oils at different doses influenced VFA production, protozoa population, $\text{NH}_3\text{-N}$, and methane production. 250 mg/l leaf oil of cinnamon reduced methane and propionic acid (Chaves et al. 2008). Similarly, Fraser et al. (2007) reported that it also reduced total VFA production, propionic acid concentration, protozoa number and pH rumen both in rusitec and dual flow system. Cinnamon oils at 3-10 mM also reduced methane (Macheboeuf et al. 2008). Cinnamon oils at 50, 100 and 150 ppm increased dry matter, NDF and the level of *in vitro* organic matter digestibility (Gorgulu et al. 2010). Cinnamaldehyde given at the level of 1 g/day/head to the lactating Holstein cow has no effect on milk production and milk fatty acid composition (Benchaar & Chouinard 2009). Cinnamaldehyde at high dose (800 and 1,600 mg/day/head) given to beef heifer reduced feed digestibility and increased protozoa number *in vivo* (Yang et al. 2007).

Major component of orange peel oil is limonene 95.77% (Gorgulu et al. 2010) or 91.5% (Chaoa et al. 2000). Less experiment on the use orange peel oils as rumen modifier was reported. Benchaar et al. (2007) reported that it has no beneficial effect on VFA, $\text{NH}_3\text{-N}$ and rumen pH *in vitro* with batch culture system but it can increase dry matter, organic matter and NDF digestibility at doses of 50, 100 and 150 ppm using wheat straw as substrate (Gorgulu et al. 2010). Other experiment reported that orange peels oil or limonene could inhibit the growth of pathogenic bacteria (Callaway et al. 2008; Malecky et al. 2009).

Mint oils from *Mentha longifolia* contain Pulegone as the major component 72.09% and D-isomenthone 15.6% (Gorgulu et al. 2010). It could be used as rumen modifier and could increase dry matter, organic matter and NDF *in vitro* digestibility at doses of 100 and 150 ppm using wheat straw as substrate (Gorgulu et al. 2010). Mint-alpha oils with cyclodextrin (CD) 20 mg/60 ml can reduce propionic acid and protozoa number in the *in vitro* method (Tatsuoka et al. 2008).

Combination EO or their contents in mix blend might have more advantage as rumen manipulator. The combination may result in additive and/or synergistic effects that may enhance efficiency of rumen microbial fermentation and nutrient utilization in ruminants. Supplementation of monoterpene blend containing

linalool 45,2 mol, p-cymene 36,7 mol, 16 mol α -pinene and 2,2 mol β -pinene in 100 mol terpene (95% terpene in mix blend) in goats had no effect on ruminal digestion of dietary constituents or on milk yield how the supplementation level (0.043 g/kg DMI and 0.43 g kg/DMI) because of extensive ruminal degradation of each terpene (Malecky et al. 2009).

Combination of cinnamon leaf oil (250 mg/l) and eugenol (800 mg/l) had no effect on deaminative activity of rumen bacteria and ammonia N concentration *in vitro* (Benchaa et al. 2008). But Cardozo et al. (2006) reported that combination between cinnamaldehyde and eugenol (180 mg/day cinnamaldehyde + 90 mg/day eugenol; 660 mg/day cinnamaldehyde + 300 mg/day of eugenol) affected N metabolism in the rumen by increasing the concentration of small peptide plus amino acid N and decreasing ammonia N concentration. Some commercial mixed or blend oils (AGOLIN[®] and CRINA SA[®]) were tested *in vitro* and *in vivo* experiments and were reported to have an effect on volatile acid production, increased total volatile fatty acid production with stimulation in propionate, decreased methane production (Hart et al. 2008).

The blend of EO (AGOLIN[®]) contained eugenol, geranyl acetate and coriander as major components which was provided to lactating dairy cows (1 g/cow/day) increased fat milk production but did not affect milk production due to an energetic shift away from body condition gain to milk fat output (Santos et al. 2010). The blend of EO (CRINA[®]) contained thymol, eugenol, vanillin, guaiacol, and limonene which was provided to lactating cows 0.6 g/day increased dry matter intake (DMI) and 3.5% FCM production due to increasing of molar proportion of propionate (Kung et al. 2008).

Combination of some essential oils (garlic, clove, orange peel, and cinnamon) at 300 ppm doses still have advantage on *in vitro* gas production and *in vitro* digestibility, and *in vivo* CH₄ production. Using clove, cinnamon and orange peel in combination at 300 ppm or 1.8 g/day in dairy goat under feeding condition of 60/40 concentrate/roughage ratio in the relatively low yielding dairy goats or using one time of oral infusion of essential oils (Rofiq 2013) did not give any beneficial effect.

MAIN ACTION MECHANISM OF PLANT EO'S AS RUMEN MANIPULATOR

Generally, the main action mechanism of plant essential oils as rumen manipulator is the antimicrobial activity of essential oils. It was reported that cell membrane disruption would occur due to plant EO's active compounds by inhibiting of electron transport, ion gradients, protein translocation, phosphorylation

and other enzyme-dependent reactions (Dorman & Deans 2000; Ultee et al. 2002).

Devi et al. (2010) reported that the primary action mechanism of Eugenol is disruption of the cytoplasmic membrane, which increase its non-specific permeability. Thus, the hyper-permeability is followed by leakage of ions and extensive loss of other cellular contents, including the intracellular proteins and ultimately results in cell death (Figure 7).

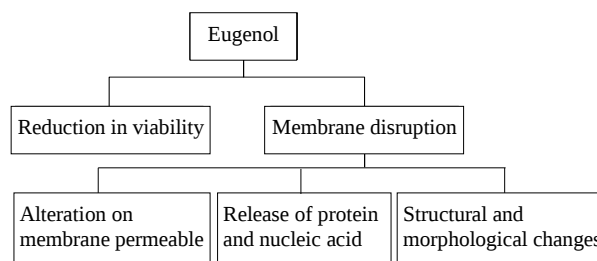


Figure 7. Antibacterial activity and mechanism of action of eugenol

Source: Devi et al. (2010)

Other mode of action of EO is their inhibition on hyper ammonia producing bacteria that involved in amino acid deamination (McIntosh et al. 2003; Newbold et al. 2005). Ruminal peptide N accumulation decreased that was consistent with a decrease in proteolysis in the presence of EO (Castillejos et al. 2006). Hellander et al. (1998) showed that thymol and carvacrol both disrupted the cell membrane thereby decreased the intracellular ATP pool and increased the extra cellular ATP pool in *E. coli*. The schematic of the mechanism is explained in Figure 8.

OPPORTUNITY OF PLANT ESSENTIAL OILS ON RUMINANT IN INDONESIA

Indonesia has a lot of variety of plants that produce some essential oils. They are used as herb medicine, food addition and cosmetics. Lemon grass/*serai*, turmeric, ginger, clove, garlic, and others produce a lot of essential oils for export to other countries. Indonesia exported 2,633 tons of *serai wangi* (*Cymbopogon nardus* L) essential oils in 2007. *Serai wangi* plant (*Cymbopogon nardus* L) has some major active compounds as essential oils, geraniol, citronellol, geranyl acetate and citronellal acetate (Sukamto et al. 2011). They are also potential as organic feed additive that increases animal performances but the study on the use of these essential oils is very limited. It is a good opportunity to study the use of these compounds for increasing animal performance. Anti-bacterial effect of leaf extract of *sirih* (*Piper betle* L) to *Staphylococcus aureus* was shown at concentration of 10% that not significantly different with concentration of 2.5% and

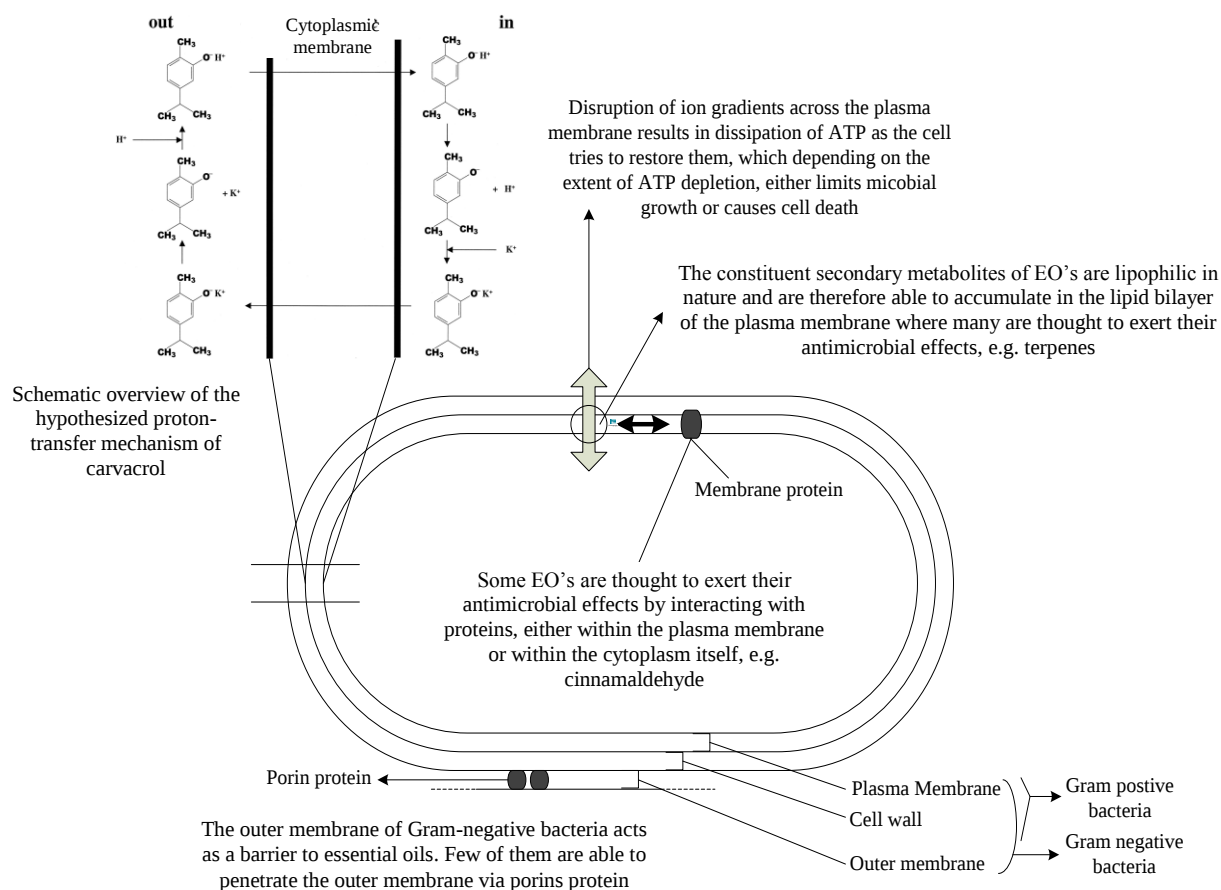


Figure 8. Scheme of antimicrobial mechanism of essential oils

Source: Ultee et al. (2002) modified

5% (Hermawan et al. 2007). Some essential oils (groundnut oil, corn oil, and fish oil) in oil-mineral complex has non significant ($P>0.05$) effect on ration fermentation and digestibility *in vitro*, but oil-mineral in ration has highest effect in daily gain of sheep (Tanuwirya et al. 2006).

CONCLUSION

Plant essential oils are potential substance for feed additives because of no negative risk for animal health, human and it is safe for the environment. Their main role as rumen manipulator and ruminant performance enhancer is required to be more evaluated with *in vivo* studies. Some plants essential oils showed their function to increase dry matter digestibility, rumen VFA products, N-NH₃ and reduce rumen methane production in the *in vitro* study. Main action of plant EO's as rumen manipulator is their antimicrobial effect in the rumen. Combination of some plant essential oils or some of their main active components may be more advantageous because of their synergistic effects.

REFERENCES

- Asekun OT, Grierson DS, Afolayan AJ. 2006. Effects of drying methods on the quality and quantity of the essential oil of *Mentha longifolia* L subsp. *Capensis*. Food Chem. 101:995-998.
- Bach A, Calsamiglia S, Stern MD. 2007. Nitrogen metabolism in the rumen. J Dairy Sci. 88:413-419.
- Benchaar C, Chaves AV, Fraser GR, Beauchemin KA, McAllister TA. 2007. Effects of essential oils and their components on *in vitro* rumen microbial fermentation. Can J Anim Sci. 87:413-419.
- Benchaar C, Chouinard PY. 2009. Assessment of the potential of cinnamaldehyde, condensed tannins and saponins to modify milk fatty acid composition of dairy cows. J Dairy Sci. 92:3392-3396.
- Benchaar C, McAllister TA, Chouinard PY. 2008. Digestion, ruminal fermentation, ciliate protozoal populations, and milk production from dairy cows fed cinnamaldehyde, quebracho condensed tannin, or *Yucca schidigera* saponin extracts. J Dairy Sci. 91:4765-4777.

- Benchaa C, Greathead H. 2011. Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. *Anim Feed Sci Technol.* 166-167:338-355.
- Block E. 2010. Garlic and other alliums: The role and the science. Cambridge (UK): The Royal Society of Chemistry.
- Busquet M, Calsamiglia S, Ferret A, Cardozo PW, Kamel C. 2005. Effects of cinnamaldehyde and garlic oil on rumen microbial fermentation in a dual flow continuous culture. *J Dairy Sci.* 88:2508-2516.
- Busquet M, Calsamiglia S, Ferret A, Kamel C. 2006. Plant extracts affect *in vitro* rumen microbial fermentation. *J Dairy Sci.* 89:761-771.
- Callaway TR, Carroll JA, Arthington JD, Pratt C, Edrington TS, Anderson RC, Galyean ML, Ricke SC, Crandall P, Nisbet DJ. 2008. Citrus products decrease growth of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* in pure culture and in fermentation with mixed ruminal microorganisms *in vitro*. *Foodborne Pathog Dis.* 5:621-627.
- Calsamiglia S, Busquet M, Cardozo PW, Castillejos L, Ferret A. 2007. Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *J Dairy Sci.* 90:2580-95.
- Cardozo PW, Calsamiglia S, Ferret A, Kamel C. 2004. Effect of natural plant extract on ruminal protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. *J Anim Sci.* 82:3230-3236.
- Cardozo PW, Calsamiglia S, Ferret A, Kamel C. 2005. Screening for the effects of natural plant extracts at different pH on *in vitro* rumen microbial fermentation of a high-concentrate diet for beef cattle. *J Anim Sci.* 83:2572-2579.
- Cardozo PW, Calsamiglia S, Ferret A, Kamel C. 2006. Effects of alfalfa extract, anise, capsicum, and a mixture of cinnamaldehyde and eugenol on ruminal fermentation and protein degradation in beef heifers fed high concentrate diet. *J Anim Sci.* 83:2572-2579.
- Castillejos L, Calsamiglia S, Ferret A. 2006. Effect of essential oil active compounds on rumen microbial fermentation and nutrient flow in *in vitro* systems. *J Dairy Sci.* 89:2649-2658.
- Chaoa SC, Younga DG, Obergb CJ. 2000. Screening for Inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. *J Essent Oil Res.* 12:639-649.
- Chaves A V., Stanford K, Dugan MER, Gibson LL, McAllister TA, Van Herk F, Benchaa C. 2008. Effects of cinnamaldehyde, garlic and juniper berry essential oils on rumen fermentation, blood metabolites, growth performance, and carcass characteristics of growing lambs. *Livest Sci.* 117:215-224.
- Dabbah R, Edwards VM, Moats WA. 1970. Antimicrobial action of some citrus fruit oils on selected food-borne bacteria. *Appl Microbiol.* 19:27-31.
- Devi KP, Nisha SA, Sakthivel R, Pandian SK. 2010. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *J Ethnopharmacol.* 130:107-115.
- Dorman HJ, Deans SG. 2000. Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol.* 88:308-316.
- European Commission. 2003. Regulation (EC) No. 1831/2003 of the European parliament and of the council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition (Text with EEA relevance). *Off J L.* 268:29-43.
- Evans JD, Martin SA. 2000. Effects of thymol on ruminal microorganisms. *Curr Microbiol.* 41:336-340.
- Franz C, Baser K, Windisch W. 2010. Essential oils and aromatic plants in animal feeding-A European perspective. A review. *Flavour Fragr J.* 25:327-340.
- Fraser GR, Chaves A V, Wang Y, McAllister TA, Beauchemin KA, Benchaa C. 2007. Assessment of the effects of cinnamon leaf oil on rumen microbial fermentation using two continuous culture systems. *J Dairy Sci.* 90:2315-2328.
- García-González R, López S, Fernández M, Bodas R, González JS. 2008. Screening the activity of plants and spices for decreasing ruminal methane production *in vitro*. *Anim Feed Sci Technol.* 147:36-52.
- Gershenzon J, Croteau R. 1991. Terpenoids. In: Rosenthal GA, Berenbaum MR, editors. *Herbivores: Their interaction with secondary plant metabolites*. California (US): Academic Press. p. 165-219.
- Gorgulu M, Özogul F, Yildiz E. 2010. Bazı bitki uçucu yağlarının enerji, protein ve lif kaynağı yemlerde *in vitro* gerçek kuru madde, ham protein ve NDF sindirilebilirliğine ve yüksek verimli süt sığırlarında süt verimi ve süt kompozisyonlarına etkileri. Final Report Project No. 1070822. Ankara (Turkey): Tubitak.
- Hart KJ, Yanez-Ruiz DR, Duval SM, McEwan NR, Newbold CJ. 2008. Plant extracts to manipulate rumen fermentation. *Anim Feed Sci Technol.* 147:8-35.
- Hellander IM, Alakomi HL, Latva-Kala K, Mattila-Sandholm T, Pol L, Smid EJ, Gorris LGM, Von Wright A. 1998. Characterization of the action of selected essential oils components on Gram negative bacteria. *J Agric Food Chem.* 46:3590-3595.
- Hermawan A, Eliyani H, Tyasningsih W. 2007. Pengaruh ekstrak daun sirih (*Piper betle* L) terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dengan metode difusi disk. Surabaya (Indonesia): Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- IPPC. 2007. Climate change 2007: Synthesis report. A report of the intergovernmental panel on climate change. Pachauri RK, Reisinger A, editors. Geneva (Switzerland): UNEP and WMO.
- Kung L, Williams P, Schmidt RJ, Hu W. 2008. A blend of essential plant oils used as an additive to alter silage

- fermentation or used as a feed additive for lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 91:4793-4800.
- Macheboeuf D, Morgavi DP, Papon Y, Mousset JL, Arturo-Schaan M. 2008. Dose-response effects of essential oils on *in vitro* fermentation activity of the rumen microbial population. *Anim Feed Sci Technol.* 145:335-350.
- Malecky M, Fedele V, Broudiscou LP. 2009. *In vitro* degradation by mixed rumen bacteria of 17 mono- and sesquiterpenes typical of winter and spring diets of goats on *Basilitica rangelands* (southern Italy). *J Sci Food Agric.* 89:531-536.
- Mathe A. 2009. Essential oils–biochemistry, production and utilisation. In: Steiner T, editor. *Phytogenic in animal nutrition: Natural concepts to optimize gut health and performance*. Nottingham (UK): Nottingham University Press.
- McIntosh FM, Williams P, Losa R, Wallace RJ, Beever DA, Newbold CJ. 2003. Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. *Appl Environ Microbiol.* 69:5011-5014.
- Newbold CJ, Lopez S, Nelson N, Ouda JO, Wallace RJ, Moss AR. 2005. Propionate precursors and other metabolic intermediates as possible alternative electron acceptors to methanogenesis in ruminal fermentation *in vitro*. *Br J Nutr.* 94:27-35.
- Pandima DK, Nisha SA, Sakthivel R, Pandian SK. 2010. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *J Ethnopharmacol.* 130:107-115.
- Pasqua RD, Hoskins N, Betts G, Mauriello G. 2006. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. *J Agric Food Chem.* 54:2745-2749.
- Patra AK, Kamra DN, Agarwal N. 2010. Effects of extracts of spices on rumen methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feeds *in vitro*. *J Sci Food Agric.* 90:511-520.
- Patra AK. 2010. Meta-analyses of effects of phytochemicals on digestibility and rumen fermentation characteristics associated with methanogenesis. *J Sci Food Agric.* 90:2700-2708.
- PubChem. 2016. Open chemistry database. National Center for Biotechnology Information [Internet]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/>
- Rofiq MN. 2013. The effects of some essential oils on milk yield, milk composition and methane production in goat [Dissertation]. [Adana (Turkey)]: University of Cukurova.
- Rota MC, Herrera A, Martinez RM, Sotomayor JA, Jordan MJ. 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control.* 19:681-687.
- Santos MB, Robinson PH, Williams P, Losa R. 2010. Effects of addition of an essential oil complex to the diet of lactating dairy cows on whole tract digestion of nutrients and productive performance. *J Anim Feed Sci Technol.* 157:64-71.
- Smith P, Andr  n O, Karlsson T, Per  la P, Regina K, Rounsevell M, Van Wesemael B. 2005. Carbon sequestration potential in European croplands has been overestimated. *Glob Chang Biol.* 11:2153-2163.
- Smith P, Martino D, Cai Z, Gwary D, Janzen H, Kumar P, McCarl B, Ogle S, O'Mara F, Rice C, et al. 2007. Policy and technological constraints to implementation of greenhouse gas mitigation options in agriculture. *Agric Ecosyst Environ.* 118:6-28.
- Sukanto, Djazuli M, Suheryadi D. 2011. Seraiwangi (*Cymbopogon nardus* L) sebagai penghasil minyak atsiri, tanaman konservasi dan pakan ternak. Dalam: Kamawati E, Prastowo B, Soetopo D, Hartati RS, penyunting. *Inovasi Teknologi Mendukung Peningkatan Nilai Tambah, Daya Saing dan Ekspor Perkebunan*. Prosiding Seminar Nasional Inovasi Teknologi Perkebunan. Bogor (Indonesia): Puslitbangbun. hlm. 175-180.
- Tanuwiria UH, Budinuryanto DC, Darodjah S, Putranto WS. 2006. Studi suplemen kompleks mineral minyak dan mineral-organik dan pengaruhnya terhadap fermentabilitas dan pencernaan ransum *in vitro* serta pertumbuhan pada domba jantan. *J Protein.* 14:167-176.
- Tatsuoka N, Hara K, Mikuni K, Hara K, Hashimoto H, Itabashi H. 2008. Effects of the essential oil cyclodextrin complexes on ruminal methane production *in vitro*. *Anim Sci J.* 79:68-75.
- Trombetta D, Castelli F, Sarpietro MG, Venuti V, Cristani M, Daniele C, Saija A, Mazzanti G, Bisignano G. 2005. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob Agents Chemother.* 49:2474-2478.
- Tsao S, Yin M. 2001. *In vitro* activity of garlic oil and four diallyl sulphides against antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 47:665-670.
- Ultee A, Bennik M, Moezelaar R. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol.* 68:1561-1568.
- van Nevel CJ, Demeyer DI. 1996. Effect of pH on biohydrogenation of polyunsaturated fatty acids and their Ca-salts by rumen microorganisms *in vitro*. *Arch Anim Nutr.* 49:151-157.
- Yang WZ, Benchaar C, Ametaj BN, Chaves AV, He ML, McAllister TA. 2007. Effects of garlic and juniper berry essential oils on ruminal fermentation and on the site and extent of digestion in lactating cows. *J Dairy Sci.* 90:5671-581.

Infeksi *Hantavirus*: Penyakit Zoonosis yang Perlu Diantisipasi Keberadaannya di Indonesia

(Hantavirus Infection: Anticipation of Zoonotic Disease in Indonesia)

Indrawati Sendow, NLPI Dharmayanti, M Saepullah dan RMA Adjid

Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl. RE Martadinata No. 30, Bogor 16114
indrawati.sendow@yahoo.com

(Diterima 22 Januari 2016 – Direvisi 7 Maret 2016 – Disetujui 8 Maret 2016)

ABSTRACT

Recently, the evidence of Hantavirus infection in human and animals is increasing, and new Hantavirus strain has been identified. The disease causes clinical renal and lung disorders and fatal to human. The presence of new Hantavirus strain, lack of available quick and accurate diagnostic tool, asymptomatic clinical signs and paucity of disease information, will inhibit disease control especially in the developing countries. The paper describes Hantavirus disease and its epidemiology in developed and developing countries, including Indonesia and its recommendation for disease prevention and control.

Key words: Hantavirus, zoonosis, rodents, epidemiology

ABSTRAK

Kejadian infeksi *Hantavirus* pada hewan dan manusia mulai meningkat akhir-akhir ini dan *strain* baru telah diidentifikasi. Penyakit ini cukup fatal pada manusia, karena dapat mengakibatkan gangguan fungsi pada ginjal dan paru-paru. Munculnya *strain* baru dari *Hantavirus*, tidak tersedianya perangkat diagnosis yang cepat dan akurat serta informasi yang kurang lengkap akan menghambat pengendalian penyakit tersebut, terutama di negara berkembang. Tulisan ini membahas penyakit yang disebabkan oleh *Hantavirus*, epidemiologi penyakit, serta pencegahan dan pengendaliannya di beberapa negara maju dan berkembang, termasuk di Indonesia.

Kata kunci: *Hantavirus*, zoonosis, rodensia, epidemiologi

PENDAHULUAN

Infeksi *Hantavirus* merupakan salah satu zoonosis yang ditularkan oleh hewan rodensia (hewan pengerat) ke manusia yang mengakibatkan gangguan bagi kesehatan masyarakat, terutama di negara berkembang. Gangguan kesehatan pada manusia dapat berupa kelainan ginjal dan paru-paru, dimulai dengan demam, bintik perdarahan pada muka, sakit kepala, kemudian hipotensi, oliguria (sedikit buang air kecil), lalu diuretik (sering buang air kecil). Angka kematian dapat mencapai 12% (Vapalahti et al. 2003; Goeijenbier et al. 2015).

Penyakit ini diketahui setelah ditemukannya kasus infeksi *Hantavirus* pada lebih dari 3.000 tentara Amerika di Korea pada tahun 1951-1954 dan kemudian menyebar ke Amerika, yang menyebabkan banyak kematian akibat gagal jantung (Lee et al. 1978). Sejak saat itu infeksi *Hantavirus* menarik perhatian dunia. *Hantavirus* pertama kali diisolasi pada tahun 1976, yang kemudian dapat diidentifikasi beberapa *strain/galur/serotype Hantavirus* lainnya. Sebanyak 22 *Hantavirus* bersifat patogen bagi manusia, serta terdiri

dari dua tipe penyakit, yaitu tipe *Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome* (HFRS) dan tipe *Hantavirus Pulmonary Syndrome* (HPS) (MacNeil et al. 2011; Goeijenbier et al. 2015). Tipe HFRS sering pula disebut sebagai *Korean Hemorrhagic Fever* (KHF), *Epidemic Hemorrhagic Fever* (EHF) dan *Nephropathia Epidemica* (NE). Tipe HPS lebih banyak menyebabkan kematian daripada tipe HFRS, karena mengakibatkan tidak berfungsinya otot miokardium dan terjadinya *hypoperfusion*, sehingga sering disebut sebagai *Hantavirus Cardiopulmonary Syndrome* (HCPS) (Plyusnina et al. 2009; MacNeil et al. 2011). Oleh sebab itu, penyakit ini menjadi sangat penting bagi kesehatan masyarakat (Willemann & Oliveira 2014). Berdasarkan penyebarannya, HPS lebih mendominasi Amerika, sedangkan HFRS lebih menyebar ke Asia dan Eropa (Vapalahti et al. 2003; Johansson et al. 2010; Olsson et al. 2010).

Rodensia merupakan hewan pengerat yang paling banyak ditemui, terutama di negara berkembang. Rodensia tikus banyak berkeliaran di sekitar rumah atau di daerah persawahan. Nurisa & Ristyanto (2005) melaporkan bahwa beberapa agen penyakit yang dapat

ditularkan melalui tikus di Indonesia antara lain bakteri riketsia, virus, jamur, protozoa atau cacing. Penyakit yang sering muncul antara lain seperti leptospirosis, pes, salmonellosis, schistosomiasis, *eosinophilic meningitis* dan infeksi *Hantavirus*. Penyakit ini biasanya muncul pada saat banjir, dimana tikus keluar dari sarangnya sambil mengeluarkan urin atau feses yang mungkin mengandung agen infeksius yang kemudian dapat menginfeksi dan menyebabkan sakit pada manusia (Kosasih et al. 2011).

VIRUS DAN KARAKTER GENETIK

Infeksi *Hantavirus* disebabkan oleh virus Hanta genus *Hantavirus*, famili *Bunyaviridae*. Virus ini memiliki *single stranded* RNA, yang mempunyai tiga segmen (Nichol et al. 2005), berbentuk sferikal dengan diameter 80-120 nm dan panjang mencapai 170 nm (Vapalahti et al. 2003). *Hantavirus* beramplop sehingga tidak tahan terhadap pelarut lemak, seperti deterjen, pelarut organik dan hipoklorit, dapat juga dinaktifasi dengan pemanasan dan sinar ultra violet (Kraus et al. 2005).

Berdasarkan analisis filogenetik, terdapat beberapa serotipe *Hantavirus* yang beredar seperti Hanta yang ditemukan di China, Seoul dan Indonesia (Plyusnina et al. 2009). Hasil penelitian Plyusnina et al. (2009) menunjukkan bahwa *Hantavirus strain Serang* asal Indonesia yang diisolasi dari tikus *Rattus* berbeda dengan *Hantavirus* yang diisolasi dari rodensia, tikus *Bandicota indica* yang kekerabatannya lebih dekat dengan *Hantavirus* asal Thailand. Berdasarkan spesifisitas induk semang dan kriteria gejala klinis yang dibuat oleh *International Committee of Taxonomy of Viruses*, hingga saat ini telah diidentifikasi ada 22 spesies *Hantavirus*, antara lain adalah virus *Hantaan*, *Dobrava-Belgrage*, *Seoul*, *Sin Nombre*, *Monongahela*, *New York*, *Black Creek*, *Bayou*, *Choclo*, *Andes*, *Bermejo*, *Lechiguanas*, *Maciel*, *Oran*, *Laguna Negra*, *Araraquara* dan *Juquitiba* (Nichol et al. 2005; Jonsson et al. 2010).

Beberapa serotipe *Hantavirus* dapat menyebabkan kasus yang parah antara lain serotipe virus *Hantaan* (HTNV) dari Tiongkok, virus *Thailand* (THAIV), virus *Seoul* (SEOV) dan virus *Dobrava* (DOBV) dari Yugoslavia yang dapat menyebabkan kematian hingga 12% (Vapalahti et al. 2003; Goeijenbier et al. 2015). Sedangkan virus *Puumala* (PUUV) menyebabkan kasus ringan di Eropa, SEOV menyebabkan kasus sedang yang dapat terdeteksi di Asia, Eropa, Amerika dan Afrika (Vapalahti et al. 2003). Sementara serotipe yang berkaitan erat dengan infeksi *Hantavirus* tipe HPS antara lain virus *Sin Nombre* (SNV), virus *New York* (NYV), virus *Monongahela* (MONV), virus *Bayou* (BAYV) dan virus *Black Creek Canal* (BCCV), virus *Andes* (ANDV), virus *Languna Negra* (LNV) dan

beberapa *strain* virus *Hantavirus* yang diisolasi dari Argentina dan Brazil (Padula et al. 2000). Meskipun terdapat beberapa macam *strain Hantavirus* yang telah dilaporkan pada rodensia, namun yang dapat menyebabkan gejala klinis pada manusia terdapat dua serotipe yaitu HTNV dan SEOV (Zhang et al. 2010).

Dalam beberapa tahun terakhir ini *Hantavirus strain* baru telah dilaporkan keberadaannya, seperti virus *Kenkeme* yang terdeteksi dari *Sorex roratus* di Rusia (Kang et al. 2010). Adanya temuan beberapa *strain Hantavirus* ini, tentunya akan menambah keragaman *strain Hantavirus* di dunia dan sekaligus menimbulkan pergeseran paradigma baru bahwa tidak semua *strain* Hanta berasal dari tikus, meskipun masih berdampak terhadap kesehatan manusia. Infeksi *Hantavirus* menjadi isu hangat bagi kesehatan masyarakat di dunia sehingga perlu mendapat perhatian serius agarantisipasi penyakit ini dapat dimaksimalkan.

PROSES PENULARAN

Pada kebanyakan kelompok *bunyaviridae* seperti *Arbovirus*, penularan penyakit terjadi melalui vektor serangga. Namun, pada *Hantavirus* cara penularan penyakit berbeda dengan *Arbovirus* lain, *Hantavirus* tidak ditularkan melalui vektor serangga melainkan melalui tikus dan rodensia lainnya. Penularan *Hantavirus* ke manusia dapat terjadi baik melalui kontak dengan hewan reservoir rodensia yang terinfeksi atau kontak dengan ekskresinya seperti saliva, urin atau feses. Ektoparasit seperti kutu atau caplak dapat berperan penting sebagai sumber penularan *Hantavirus* baik dari hewan ke hewan maupun dari hewan ke manusia (Houck et al. 2001).

Kontak dengan ekskresi rodensia dapat terjadi melalui area yang terkontaminasi atau melalui gigitan hewan reservoir yang terinfeksi. Penularan pada manusia juga dapat terjadi melalui aerosol dari debu atau benda-benda yang telah terkontaminasi oleh urin dan feses rodensia yang mengandung *Hantavirus* (Jonsson et al. 2010). Penularan melalui aerosol dari ekskresi rodensia ke hewan lain seperti anjing dan kucing dilaporkan oleh Dobly et al. (2012), sedangkan penularan secara vertikal melalui intra-transplasental dan air susu tidak terjadi (Botten et al. 2002). Penularan dari manusia ke manusia juga belum pernah dilaporkan. Periode viremia *Hantavirus* pada manusia sangat singkat sehingga sulit untuk dideteksi keberadaannya dalam darah.

HEWAN RENTAN

Hantavirus dapat menginfeksi jenis rodensia, dari subfamili *Murinae*, *Arvicolinae* dan *Sigmodontinae*. Hewan tertular tersebut merupakan reservoir beberapa serotipe *Hantavirus* seperti HNTV, DOBV, SSAAV,

PUUV, SNV dan SEOV yang dapat menyebabkan kasus klinis tipe HFRS (Jonsson et al. 2010). *Hantavirus* telah berhasil diisolasi dari beberapa spesies tikus, seperti Hanta serotipe Serang (SERV) dari *Rattus* sp (Plyusnina et al. 2009), SEOV dari *Rattus norvegicus* yang penyebarannya ditemukan di negara lain (Plyusnina et al. 2004), Gou virus dari Tiongkok terdeteksi dari *Rattus rattus* dan Thai virus dari *Bandicota indica* (Plyusnina et al. 2009).

Telah dilaporkan bahwa *Turkish microtus voles* terbukti dapat mengandung antibodi terhadap salah satu serotipe *Hantavirus*, virus Puumala (Laakkonen et al. 2006). *Apodemus agrarius* dan *Myodes glareolus* telah terbukti sebagai reservoir *Hantavirus* di Eropa (Sironen et al. 2005; Zeimes et al. 2012). Beberapa spesies rodensia yang dapat bertindak sebagai reservoir bagi *Hantavirus* antara lain *Apodemus agrarius*, *Apodemus flavicollis*, *Apodemus peninsulae*, *Clethrionomys glareolus*, *Peromyscus maniculatus*, *Peromyscus leucopus*, *Peromyscus maniculatus nubiterrae*, *Oryzomys palustris*, *Sigmodon hispidus*, *Calomys laucha*, *Oligoryzomys longicaudatus*, *Oligoryzomys fulvescens*, *Neacomys spinosus*, *Bolomys lasiurus*, *Bolomys obscurus*, *Oligoryzomys nigripes* dan *Peromyscus maniculatus* (Jonsson et al. 2010; de Oliveira et al. 2014). Lebih lanjut, di Rusia, *Hantavirus* Ken Keme telah berhasil dideteksi pada hati dan paru-paru pada beberapa spesies *Shrews* (Ordo *Soricomorpha*, famili *Soricidae*), seperti *Sorex daphaenodon*, *Sorex minutissimus*, *Sorex roboratus*, *Sorex tundrensis* dan *Sorex araneus* (Kang et al. 2010).

Reservoir *Hantavirus* merupakan spesies spesifik, artinya masing-masing serotipe *Hantavirus* cenderung mempunyai satu spesies induk semang reservoir. Sebagai contoh di Tiongkok, HTNV hanya diperoleh pada rodensia spesies tikus *Apodemus agrarius* dan *A. peninsulae* yang dapat menyebabkan infeksi *Hantavirus* tipe HFRS yang parah. Sedangkan serotipe SEOV yang berhasil dideteksi dari tikus *Rattus norvegicus*, *R. rattus*, *R. flavipectus*, *R. losea* dan *R. nitidus*, menghasilkan tipe HFRS yang ringan (Zhang et al. 2010). Beberapa strain *Hantavirus* yang secara filogenetik sama, dapat ditemukan di beberapa spesies rodensia (Johansson et al. 2010).

Selain pada rodensia, antibodi terhadap *Hantavirus* dapat ditemukan pada karnivora domestik seperti anjing dan kucing di Belgia (Dobly et al. 2012). Prevalensi pada kucing lebih tinggi dari pada prevalensi pada anjing. Anjing dan kucing tersebut berada di lokasi dekat hutan, sehingga kemungkinan kucing dan anjing terekspose oleh ekskresi urin atau feses rodensia disekitar hutan, mengingat *Hantavirus* merupakan patogen yang penularan utamanya melalui rodensia (Arai et al. 2008).

Indonesia memiliki kekayaan fauna yang sangat bervariasi dari Sabang hingga Merauke, termasuk

diantaranya spesies tikus yang dapat berperan sebagai induk semang reservoir infeksi *Hantavirus*. Meskipun data spesies rodensia yang membawa *Hantavirus* belum teridentifikasi secara menyeluruh, namun dengan perubahan iklim dan ekologi, maka tidak menutup kemungkinan penularan *Hantavirus* antar spesies tikus yaitu dari spesies tikus yang telah teridentifikasi ke spesies yang baru teridentifikasi yang berperan sebagai induk semang reservoir *Hantavirus*. Untuk itu diperlukan kerjasama penelitian lintas kementerian sehingga dapat diketahui spesies rodensia yang baru sebagai pembawa *Hantavirus* atau pembawa virus zoonosis lainnya. Telah dilaporkan pula *Hantavirus* pada kelelawar (Weiss et al. 2012). Hal ini menambah daftar penyakit zoonosis pada kelelawar.

Selain pada kelelawar, Chen et al. (2011) juga melaporkan ditemukannya antibodi terhadap *Hantavirus* Seoul pada orang utan Bornean yang dipelihara di Taiwan sebagai hewan piaraan (*pet animal*) dengan uji *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) dan *Immunofluorescence Assay* (IFA). Ini merupakan laporan pertama terdeteksinya antibodi terhadap *Hantavirus* pada orang utan. Reservoir alami *Hantavirus* adalah rodensia. Hal ini mungkin dapat terjadi karena perubahan ekosistem di Kalimantan baik akibat oleh penebangan liar maupun kebakaran hutan yang marak terjadi, sehingga populasi tikus hutan berpindah ke daerah dimana populasi orang utan berada atau sebaliknya. Akibatnya kontak dengan ekskresi tikus terjadi dan orang utan dapat terinfeksi. Data ini mengindikasikan bahwa selain rodensia, hewan lainnya dapat terinfeksi. Orang utan Kalimantan termasuk dalam spesies hewan yang dilindungi. Apabila kasus ini dibiarkan maka tidak menutup kemungkinan terjadinya penyebaran infeksi Hanta ke manusia dan terjadinya penurunan populasi orang utan akibat terserang penyakit, mengingat perburuan hewan langka untuk dijadikan peliharaan banyak terjadi di Indonesia. Dengan diketahuinya spesies reservoir yang potensial untuk *Hantavirus*, maka akan dapat diantisipasi penyebaran *Hantavirus* yang lebih luas serta kejadian infeksi *Hantavirus* dari hewan ke manusia.

GEJALA KLINIS

Secara umum, *Hantavirus* menyebabkan infeksi kronis yang persisten pada rodensia, sehingga rodensia tersebut dapat menularkan penyakit ini secara terus menerus melalui sekresinya ke manusia, meskipun tanpa gejala klinis. Infeksi Hanta menyebabkan *Haemorrhagic Fever and Renal Syndrome* (HFRS) dan *Haemorrhagic Pulmonary Syndrome* (HPS) pada manusia. Meskipun demikian, patogenezisnya masih belum sepenuhnya diketahui (Easterbrook et al. 2007; MacNeil et al. 2011).

Masa inkubasi penyakit Hanta berkisar antara 2-8 minggu. Tahapan klinis tipe HFRS biasanya terjadi lima tahap yaitu fase *febris*, hipotensi, oliguria (sedikit buang air kecil), fase diuretik (sering buang air kecil) dan fase *convalescence*. Fase *febris* (berlangsung selama 3-6 hari) memperlihatkan gejala demam tinggi mencapai $>39^{\circ}\text{C}$, terkadang disertai dengan bintik perdarahan pada konjungtiva dan wajah, sehingga wajah terasa panas, sakit kepala, tidak nafsu makan dan nyeri pada bola mata. Fase kedua yaitu fase hipotensi, berlangsung selama 1-2 hari, pasien mengalami hipotensi dan *shock* karena permeabilitas vaskuler meningkat sehingga dapat menyebabkan oedema paru dan peritonial (Jonsson et al. 2010; Goeijenbier et al. 2015). Fase oliguria, berlangsung 3-5 hari, pada fase ini, oliguria dan anuria mulai terjadi dan disertai dengan perdarahan, fase ini merupakan fase yang kritis dimana kematian paling sering terjadi. Oleh karena itu, pasien akibat infeksi *Hantavirus* perlu mendapat penanganan yang intensif. Apabila pasien dapat melalui fase oliguria (jarang kencing), maka proses persembuhan dapat terjadi. Di dua fase berikutnya proses persembuhan dimulai. Fase diuretik (sering kencing) berlangsung lebih lama, yaitu berkisar antara 1-2 minggu. Pada fase ini mulai tampak perubahan atau persembuhan, namun komplikasi pada fase ini sering terjadi seperti tensi darah menurun, kadar elektrolit tubuh tidak normal, perdarahan pada alat pencernaan dan terganggunya sistem pernafasan dan susunan syaraf. Fase *convalescence* berlangsung lebih lama yaitu 3-6 minggu. Pada fase ini proses penyembuhan mulai tampak dengan cepat, namun penderita mengalami kelemahan otot, menurunnya daya tahan tubuh dan stamina, disertai dengan poliuria (sering kencing). Proses penyembuhan biasanya berlangsung dua bulan (Jonsson et al. 2010; Goeijenbier et al. 2015). Pada tipe hemoragik ini, kelainan pada paru-paru jarang terjadi, kecuali yang disebabkan oleh PPUV, dimana selain dalam bentuk HFRS, juga ditemukan pneumonia (Seitsonen et al. 2006). Berdasarkan pengamatan Jonsson et al. (2010), tidak semua infeksi *strain* Hanta menyebabkan gejala klinis yang sama sehingga mortalitasnya akan berbeda.

Tipe HPS mempunyai masa inkubasi yang lebih pendek, yaitu berkisar antara 14-17 hari dan terbagi dalam tiga stadium, yaitu stadium *febrile prodome*, *cardiacpulmonary* dan *convalescence*. Stadium *febrile prodome* terjadi selama 3-6 hari dengan gejala *myalgia* (sakit kepala), *malaise* dan demam tanpa batuk dan pilek. Stadium ini berlanjut menjadi stadium *cardiacpulmonary* yang dikarakterisasi dengan pembendungan paru, sehingga batuk mulai nampak, dan sering disertai dengan gastritis. Pembendungan tersebut disebabkan karena virus tersebut biasanya menyerang *endothelium microvasculair* paru-paru yang menyebabkan kebocoran pada *microvasculair* tersebut

(MacNeil et al. 2011). Setelah mengganggu sistem pernafasan, virus ini mulai menyerang otot jantung sehingga menyebabkan miokarditis dan sistem peredaran darah terganggu, akibatnya terjadi hipotensi atau tekanan darah mulai menurun disertai dengan takhikardia (denyut jantung cepat). Gejala tersebut menjadi karakteristik tipe HPS. Berdasarkan pemeriksaan laboratorium kimia darah, terjadi trombositopenia (penurunan kadar trombosit) dan leukositosis (peningkatan leukosit). Pada stadium lanjut, lemahnya otot jantung dapat menyebabkan kematian, sehingga pada tipe HPS, meskipun kasus klinis lebih sedikit, tetapi mortalitasnya lebih tinggi dibandingkan dengan tipe HFRS, yaitu dapat mencapai 40% (Raboni et al. 2005; MacNeil et al. 2011). Virus *Sin Nombre* (SNV) dan virus *Andes* (ANDV) teridentifikasi sebagai penyebab utama kasus *Hantavirus* tipe HPS di Amerika (MacNeil et al. 2011).

SITUASI INFEKSI HANTAVIRUS DI DUNIA

Infeksi *Hantavirus* dengan tipe gangguan ginjal /HFRS mulai dikenal pada abad ke-20 dan banyak ditemukan di dunia, seperti di Asia, Eropa dan Amerika yang merupakan negara endemis Hanta, tetapi mortalitasnya rendah (Jonsson et al. 2010; MacNeil et al. 2011). Penyebaran infeksi *Hantavirus* dengan gejala klinis pada manusia ini ditemukan banyak di Tiongkok dan Korea. Tiongkok merupakan negara terendemis untuk penyakit Hanta, hal ini terlihat dari laporan Zhang et al. (2004) yang menyatakan bahwa 70-90% kasus infeksi Hanta di dunia terjadi di Tiongkok, sementara urutan kedua terdapat di Korea hingga tahun 1996. Pemberian vaksinasi telah dimulai tahun 1991 di Korea, yang berdampak sangat signifikan dengan penurunan kasus yang sangat drastis di tahun 1998 (Baek et al. 2006).

Kasus juga dilaporkan di wilayah Rusia meskipun dalam jumlah yang lebih sedikit (Yashina et al. 2000). Di Jepang, wabah penyakit Hanta terjadi tahun 1960an dan tahun 1985 tidak ada lagi laporan kasus Hanta pada manusia di Jepang, meskipun secara serologis, tikus *R. norvegicus* mengandung antibodi terhadap *Hantavirus* (Lokugamage et al. 2004). Selain di Asia (Johansson et al. 2010), virus ini juga ditemukan di beberapa negara di Eropa (Mailles et al. 2005; Zeimes et al. 2012), Rusia (Klempa et al. 2008), Afrika (Klempa et al. 2012; Sumibcay et al. 2012) dan Amerika (Firth et al. 2012; de Oliveira et al. 2015).

Kasus infeksi *Hantavirus* telah dilaporkan pada manusia di beberapa negara Asia, antara lain Tiongkok, Hongkong, Taiwan, Korea, Federasi Rusia, Jepang (sebelum tahun 1985), India, Malaysia, Singapura, Thailand dan Sri Lanka (Zhang et al. 2010; Hooper et al. 2013). Sedangkan secara serologis, antibodi juga ditemukan di Israel, Kuwait, Laos, Filipina dan

Vietnam. Di Kamboja pernah dilaporkan antibodi *Hantavirus* pada rodensia hingga 8%, tetapi tidak ditemukan kasusnya pada manusia (Reynes et al. 2003). Pada manusia, kasus klinis Hanta lebih banyak ditemukan di negara berkembang, terutama di daerah dengan kondisi sanitasi dan perumahan yang buruk, kebersihan lingkungan yang tidak memadai dimana banyaknya populasi tikus disekitar rumah (Zhang et al. 2010). Sebaliknya kasus klinis pada rodensia tidak ditemukan meskipun antibodi dan *Hantavirus* dapat dideteksi pada rodensia.

Selain di Asia, kasus klinis dan terdeteksinya antibodi terhadap *Hantavirus* pada manusia juga ditemukan di beberapa negara di Eropa (Olsson et al. 2010; Oncul et al. 2011). Selain antibodi terhadap *Hantavirus*, kasus yang didominasi oleh virus *Puumala* pada manusia dan hewan juga dilaporkan di Eropa, virus ini menyebabkan *Nephropathia Epidemica* (NE) dan *hemorrhagic fever* disertai *renal syndrome* (Dobly et al. 2012; Zeimes et al. 2012). Selain virus *Puumalla*, *Dobrava* dan *Saaremaa* merupakan *strain* virus yang sering ditemukan di Eropa (Zeimes et al. 2012). Pertanyaan yang muncul adalah apakah *strain Dobrava* dan *Saaremaa viruses* ini telah berada pada tubuh rodensia pada akhir-akhir ini atau memang telah berada ratusan tahun sebelumnya. *Strain Hantavirus* baru telah ditemukan dan diidentifikasi sebagai virus *KenKeme* di Eurasia dan Amerika Utara yang berasal dari *Sorex roboratus* (Kang et al. 2010).

SITUASI HANTAVIRUS DI INDONESIA

Keberadaan *Hantavirus* di Indonesia, baik pada hewan maupun manusia belum banyak diketahui, meskipun sudah ada laporan kasus Hanta pada manusia. Beberapa publikasi menyatakan adanya infeksi *Hantavirus* dan virus *Seoul* pada manusia di Indonesia (Ibrahim et al. 1996; Plyusnina et al. 2004; Suharti et al. 2009; Wibowo 2010). Kasus infeksi Hanta pada manusia sering dikacaukan atau bersamaan dengan infeksi virus *Dengue*, terutama pasien pada awalnya diduga terinfeksi oleh virus *Dengue* (Groen et al. 2002; Praseno & Nirwati 2008; Suharti et al. 2009). Pada rodensia, keberadaan antibodi terhadap *Hantavirus* asal Korea, telah dilaporkan pada tikus di beberapa wilayah Indonesia (Ibrahim et al. 1996; Plyusnina et al. 2009; Wibowo 2010).

Lebih lanjut, *Hantavirus* baru (*Novel Hantavirus*) juga berhasil dideteksi dari tikus rumah (*Rattus tanezumi*) yang berasal dari Kota Serang, Provinsi Banten, sehingga virus ini dinamakan Hanta *strain* Serang (SERV) (Plyusnina et al. 2009). Hasil penelitiannya secara molekuler menunjukkan bahwa virus tersebut berbeda dengan virus Hanta lainnya, tetapi masih serumpun, sehingga diberikan nama Serang virus. Wibowo (2010) melaporkan bahwa

prevalensi reaktor pada rodensia di beberapa kota pelabuhan di Indonesia bervariasi mulai dari 7,9-40,3%. Pada rodensia, prevalensi reaktor hanya ditemukan pada spesies rodensia tertentu saja. Sedangkan prevalensi antibodi terhadap *Hantavirus* pada manusia antara 1,1-28,9%, terkecuali yang ditemukan di Maumere mencapai 28,9%. Adapun spesies *Hantavirus* yang ditemukan saat ini adalah virus *Hantaan*, *Seoul* dan *Puumala*.

Penelitian yang dilakukan oleh Ibrahim et al. (2013) menunjukkan bahwa tikus yang ditangkap di daerah Kepulauan Seribu menunjukkan hasil positif dengan uji IFA dan juga positif dengan uji *Polymerase Chained Reaction* (PCR). Hasil sekuen genom menunjukkan bahwa virus tersebut termasuk virus *Seoul*, namun tidak dilaporkan adanya antibodi pada manusia. Ibrahim et al. (2013) juga melaporkan terdapat peningkatan prevalensi reaktor *Hantavirus* pada tikus *Rattus norvegicus* dan *R. tanezumi* di daerah Kepulauan Seribu pada tahun 2009 (33,9%) jika dibandingkan dengan prevalensi pada tahun 2005 (15,9%). Selanjutnya, jenis rodensia yang dideteksi mengandung antibodi terhadap *Hantavirus* adalah *R. ratus*, *R. norvegicus*, *R. exulans*, *R. tanezumi*, *M. musculus*, *B. indica* dan *S. murinus* (Plyusnina et al. 2009; Wibowo 2010; Ibrahim et al. 2013).

Berhubung *Hantavirus* penularannya melalui ekskresi rodensia atau tikus yang berkeliaran dan banyak ditemui di lingkungan sekitar pemukiman manusia, hutan dan persawahan, maka perilaku dan jenis pekerjaan atau kegiatan manusia berpengaruh terhadap tingkat kejadian infeksi *Hantavirus* misalnya pekerja di hutan yang tidak menggunakan sepatu dan masker, orang yang tidur di rerumputan, orang yang tinggal di pemukiman yang rawan banjir, para pembajak sawah atau para petani yang sehari-harinya bekerja di sawah tanpa menggunakan pelindung. Hal ini didukung oleh penelitian Oldal et al. (2014b) yang menemukan antibodi terhadap virus *Dobrava-Belgrade* (DOBV) dan *Puumala* (PUUV) pada pekerja hutan di Hongaria. Dari informasi tersebut di atas dapat diasumsikan bahwa infeksi *Hantavirus* akan terus meningkat sejalan dengan perubahan pola hidup manusia tak terkecuali kondisi serupa juga dapat terjadi di Indonesia.

PENGARUH PERUBAHAN IKLIM

Iklm dan cuaca ikut berperan terhadap terjadinya suatu penyakit terutama penyakit-penyakit yang penularannya oleh vektor atau reservoir, seperti diulas oleh Bahri & Syafriati (2011) dan Sendow (2013). Perubahan iklim akan berdampak pada populasi nyamuk sebagai vektor *Arbovirus* yang dapat menimbulkan wabah penyakit baik *emerging* maupun *re-emerging disease*. Oleh karena itu, perubahan iklim

atau lingkungan yang kondusif untuk pertumbuhan populasi vektor atau reservoir, baik yang disebabkan oleh alam maupun buatan manusia, diduga mempunyai dampak terhadap kesehatan manusia dan hewan, baik secara langsung maupun tidak langsung (Mills et al. 2010; Sendow 2013). Perubahan iklim memiliki hubungan terhadap ekosistem yang berdampak pada populasi induk semang, reservoir atau vektor. Hal yang sama tampak pada kasus Nipah di Malaysia, dimana induk semang reservoir Nipah yaitu kalong pemakan buah dapat bermigrasi ke daerah dimana persediaan makanan terpenuhi (Chua et al. 2000).

Kejadian wabah *Hantavirus* di beberapa negara, biasanya berhubungan dengan populasi rodensia yang meningkat secara drastis. Hal ini dapat disebabkan oleh beberapa faktor seperti perubahan fungsi hutan menjadi tempat pemukiman yang menyebabkan perubahan ekologi lingkungan. Selain itu, kondisi perumahan dan sanitasi yang buruk, kebakaran hutan atau terganggunya fungsi hutan sebagai sumber makanan bagi rodensia, menyebabkan rodensia bermigrasi ke tempat sumber makanan banyak ditemukan (Bahri & Syafriati 2011; Sendow 2013).

Prevalensi infeksi *Hantavirus* tergantung pada ketersediaan lahan sebagai tempat rodensia, induk semang (rodensia) dan *Hantavirus* itu sendiri. Perubahan salah satu komponen tersebut dapat mengakibatkan penurunan atau peningkatan infeksi di daerah tersebut. Sebagai contoh, perubahan iklim dan lingkungan yang disebabkan oleh penggundulan hutan, beralihnya fungsi hutan, atau perubahan tata kota, dapat menyebabkan penurunan keanekaragaman spesies rodensia yang ada di daerah tersebut dan terjadinya perpindahan spesies rodensia ke daerah baru (Koch et al. 2007; Willemann & Oliveira 2014). Kondisi tersebut dapat mengakibatkan interaksi rodensia dalam satu spesies akan meningkat, sehingga penularan antar rodensia dapat menginfeksi ke manusia juga meningkat. Makin banyak populasi vektor atau reservoir maka semakin tinggi peluang terjadinya infeksi pada manusia. Hal ini dapat menyebabkan infeksi campuran *strain Hantavirus* dalam satu spesies (Mills 2006; Mills et al. 2010).

DIAGNOSIS PENYAKIT

Infeksi *Hantavirus* berdampak sangat signifikan bagi kesehatan masyarakat, sehingga perlu mendapat perhatian serius. Diagnosis yang tepat dan akurat sangat diperlukan untuk menangani kasus tersebut. *Hantavirus* jika ditinjau dari aspek keselamatan hayati (*biosafety*), termasuk dalam kategori kelompok risiko 4, yaitu virus ini dapat menyebabkan sakit pada hewan dan manusia dengan akibat yang fatal, serta dapat menyebar pada komunitasnya dengan cepat dan belum ada cara pencegahan yang efektif (Fleming 2006).

Menurut Childs et al. (1993) penanganan virus ini dalam skala laboratorium harus dilakukan di laboratorium dengan fasilitas *biosafety* level 4 (BSL4). Meskipun demikian, pengerjaan *Hantavirus* di laboratorium dapat pula dilakukan di *biosafety* level 3 (BSL3) dengan menggunakan tata laksana seperti pada BSL4. Hal ini tergantung dari hasil analisis risiko yang dilakukan terhadap pekerjaan dan penanganan yang akan dilakukan di laboratorium (Paragas & Endy 2006).

Diagnosis penyakit Hanta pada manusia ditentukan berdasarkan gejala klinis, epidemiologi penyakit dan dari hasil pemeriksaan laboratorium. Sebagian besar infeksi *Hantavirus* menghasilkan gejala subklinis atau gejala atipikal, sehingga diagnosis berdasarkan gejala klinis sulit diketahui dengan pasti, tergantung dari *strain* virus Hanta yang menginfeksi. Demikian pula tingkat keparahan yang ditimbulkan (Goeijenbier et al. 2015).

Pemeriksaan laboratorium mencakup pemeriksaan hematologi, serologi dan virologi. Pemeriksaan hematologi sering dilakukan sebagai rujukan untuk menentukan adanya infeksi virus meskipun tidak spesifik ke arah *Hantavirus*. Seperti dikemukakan pada penelitian Suwandono et al. (2011) bahwa trombositopenia dan leukopenia merupakan parameter akurat untuk diagnosis infeksi *Dengue* sesudah demam hari ketiga. Kemungkinan parameter ini dapat pula dijadikan patokan bagi infeksi virus lainnya. Selain lebih mudah pelaksanaannya, kedua hasil ini dapat diperoleh dari pengujian di semua laboratorium standar, rumah sakit bahkan beberapa puskesmas besar melakukan kedua uji tersebut dengan biaya yang jauh lebih murah dibandingkan dengan uji deteksi antibodi atau virologi lainnya. Konfirmasi serotipe virus yang menginfeksi dapat dilakukan dengan uji virologik seperti PCR yang dilanjutkan dengan analisis sekuen genom (Kramski et al. 2007).

Pemeriksaan serologi dapat dilakukan dengan uji IFA dan *plaque reduction, hemagglutination inhibition* dan uji ELISA dan *Western blotting* (Kramski et al. 2007; Kucinskaite-Kodze et al. 2011; Oldal et al. 2014a). Uji ELISA banyak diaplikasikan di rumah sakit untuk mendeteksi IgM atau IgG pada pasien. Sedangkan uji virologi pada umumnya mencakup isolasi virus dan deteksi antigen virus. Sampel yang dapat digunakan adalah darah dan urin serta organ paru (untuk hewan). Uji deteksi virus dapat dilakukan dengan uji PCR (Machado et al. 2009; Oldal et al. 2014a), *real time* PCR dan imunohistokimia (Kucinskaite-Kodze et al. 2011; Németh et al. 2011). Konfirmasi *strain* atau serotipe *Hantavirus* dapat dilakukan dengan analisis sekuen (Sironen et al. 2005; Kramski et al. 2007; Klempa et al. 2012). Untuk isolasi, *Hantavirus* dapat ditumbuhkan pada biakan jaringan *Mongolian Gerbil kidney cell*, *Gold hamster kidney cell* (Dong et al. 2005) dan menghasilkan *cytopathic effect* (CPE)

(Vapalahti et al. 2003). Pada hewan coba, *Hantavirus* dapat tumbuh pada bayi tikus (Dong et al. 2005).

DIAGNOSIS DIFERENSIAL

Gejala klinis infeksi Hanta jenis hemorhagis sering dikelirukan dengan infeksi penyakit lain seperti leptospirosis, rickettsiosis, *Murine Typhus*, *Dengue* dan *Hemorrhagic Fever* lainnya, plaque, sepsis dan pneumonia, karena gejala klinis yang dihasilkan hampir sama (Goeijenbier et al. 2015). Untuk itu pemeriksaan penunjang diperlukan untuk konfirmasi infeksi Hanta.

PENGENDALIAN PENYAKIT

Pada manusia, kasus klinis Hanta lebih banyak ditemukan di daerah dengan kondisi lingkungan dan perumahan yang buruk, serta banyaknya populasi tikus di sekitar rumah. Oleh karena itu, perbaikan sistem perumahan dan sanitasi lingkungan mutlak diperlukan untuk pencegahan penyakit ini.

Childs et al. (1993) merekomendasikan cara untuk mengurangi kontak dengan rodensia diantaranya dengan memasang kawat kasa agar tikus tidak masuk ke rumah, memasang perangkap tikus, tidak menyediakan makanan bagi tikus terutama di tempat sampah tanpa tutup. Di daerah endemis Hanta, sosialisasi mengenai penyakit Hanta sebaiknya sering dilakukan, termasuk program bagaimana cara menekan populasi tikus, melakukan surveilans dan program vaksinasi pada manusia. Cara penanganan dan pencegahan infeksi *Hantavirus* yang komprehensif, peningkatan kesadaran masyarakat akan bahaya penyakit ini seperti halnya yang telah dilakukan di Tiongkok (Zhang et al. 2010).

Vaksinasi dinilai masih efektif untuk pencegahan infeksi *Hantavirus*, sehingga akhir-akhir ini telah dikembangkan vaksin multi *valent* rekombinan yang terdiri dari beberapa *strain*/serotipe *Hantavirus* yang dapat mencegah infeksi *Hantavirus* (Hooper et al. 2013). Vaksin Hanta yang berasal dari jaringan ginjal garbil dan hamster telah banyak diproduksi. Di Tiongkok dan Korea, pemberian vaksinasi *Hantavirus* dapat menurunkan kasus infeksi pada manusia secara drastis (Dong et al. 2005; Zhang et al. 2010).

DAMPAK DAN ANTISIPASI INFEKSI HANTA DI INDONESIA

Meskipun keberadaan penyakit Hanta telah dilaporkan di Indonesia baik pada rodensia maupun pada manusia, namun tampaknya pemerintah belum

menanggapi secara serius jika dibandingkan dengan perhatian terhadap penyakit zoonosis lainnya seperti *Avian Influenza*, Rabies dan Antraks. Indonesia mempunyai banyak spesies hewan liar yang bermukim di hutan, baik rodensia maupun kelelawar. *Hantavirus* mempunyai induk semang reservoir pada beberapa spesies tikus dan kelelawar. Timbulnya penyakit baru (*emerging disease*) maupun yang akan muncul kembali (*re-emerging disease*) dari beberapa penyakit zoonosis tidak dapat diabaikan bila pemerintah tidak melakukan antisipasi secara menyeluruh dengan melibatkan peran serta kementerian terkait.

Salah satu bukti pemerintah belum menaruh perhatian penuh terhadap infeksi Hanta adalah hingga saat ini hanya sedikit laporan klinis dan serologis yang cenderung menyebabkan kejadian luar biasa pada manusia. Selanjutnya, data mengenai spesies hewan liar yang ada di Indonesia masih terbatas, sehingga identifikasi reservoir Hanta juga belum banyak dilaporkan. Untuk itu, penelitian lebih lanjut dan menyeluruh perlu dilakukan untuk mengidentifikasi spesies rodensia dan kelelawar yang bertindak sebagai reservoir untuk penyakit zoonosis.

IMPLIKASI KEBIJAKAN

Peran Komisi Nasional Zoonosis (Komnas Zoonosis) seperti pada PP Nomor 30/11 tentang Pengendalian Zoonosis telah disebutkan bahwa ancaman zoonosis di Indonesia dan dunia cenderung meningkat. Salah satu zoonosis dalam hal ini penyakit yang disebabkan *Hantavirus* sudah terdeteksi pada tikus sebagai vektor dari virus ini. Dengan demikian, meskipun data terbatas, maka sudah saatnya dilakukan langkah antisipasi mencegah menyebarnya *Hantavirus* di Indonesia. Langkah-langkah komprehensif dan terpadu dari pemerintah pusat sampai daerah, peran lembaga riset, universitas serta peran organisasi profesi seperti IDI dan PDHI sudah saatnya digerakkan. Sesuai yang diamanatkan oleh PP Nomor 30/11, Komnas Zoonosis harus mengambil peran dalam sistem komando pengendalian nasional yang terintegrasi dalam rangka mengantisipasi dan menanggulangi situasi kedaruratan jika terjadi wabah zoonosis termasuk *Hantavirus*.

Peran lembaga riset seperti Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian yang mempunyai UPT Balai Besar Penelitian Veteriner yang merupakan laboratorium rujukan penyakit hewan nasional berperan aktif dalam melakukan riset terkait vektor dan reservoir *Hantavirus*. Dukungan SDM, fasilitas, dana, serta kerjasama lintas kementerian akan memperlancar kegiatan riset serta *output* data yang dibutuhkan untuk pengendalian zoonosis di Indonesia.

KESIMPULAN

Infeksi *Hantavirus* pada manusia dapat bersifat fatal, mengakibatkan kesakitan dan bahkan kematian. *Hantavirus* telah tersebar di banyak negara, termasuk di Indonesia. Perubahan iklim akan mempengaruhi penyebaran dan dinamika kejadian penyakit termasuk infeksi *Hantavirus* yang ditularkan oleh rodensia. Dengan demikian, faktor lingkungan akan menjadi penyebab utama penyebaran penyakit *Hantavirus* baik antar rodensia maupun dari rodensia ke manusia. Membasmi rodensia melalui perbaikan lingkungan sekitar perumahan penduduk menjadi faktor penting dalam pengendalian infeksi *Hantavirus* pada manusia. Dengan ditemukannya antibodi terhadap *Hantavirus* pada rodensia, kelelawar dan orang utan Kalimantan, meskipun datanya masih terbatas, tetapi perlu diantisipasi penyebaran infeksi *Hantavirus* antar hewan liar tersebut, disamping untuk menjaga kelangsungan populasi hewan liar juga mencegah penyebaran penyakitnya ke manusia di sekitarnya.

Kesiapan perangkat diagnosis menjadi kunci utama dalam pendeteksian penyakit disamping tindakan preventif menggunakan vaksin pada daerah dengan kasus tinggi. Kejadian infeksi *Hantavirus* di Indonesia belum banyak diketahui. Oleh karena itu, penelitian tentang *Hantavirus* dan aspek kesehatan masyarakat perlu dilakukan untuk mendapatkan informasi situasi penyakit yang lengkap. Diperlukan informasi sebaran penyakit dan hewan reaktornya, terutama di daerah padat populasi dengan lingkungan yang memungkinkan reaktor penyakit berkeliaran dan sejauh mana dampak penyakit bagi kesehatan masyarakat. Hal ini akan menjadi dasar dalam menetapkan program antisipatif untuk pencegahan dan pengendalian penyakit secara efektif dan efisien. Untuk jangka pendek, sosialisasi penyakit perlu dilakukan kepada masyarakat dan petugas kesehatan di tingkat kecamatan/puskesmas, sehingga masyarakat memahami dan dapat melakukan pencegahan penyakit di lingkungan setempat/keluarga dan puskesmas dapat memberikan pertolongan awal pada kejadian infeksi *Hantavirus*.

DAFTAR PUSTAKA

- Arai S, Ohdachi SD, Asakawa M, Kang HJ, Mocz G, Arikawa J, Okabe N, Yanagihara R. 2008. Molecular phylogeny of a newfound *Hantavirus* in the Japanese shrew mole (*Urotrichus talpoides*). *Proc Natl Acad Sci*. 105:16296-16301.
- Baek LJ, Kariwa H, Lokugamage K, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I, Kang J Il, Moon SS, Chung SY, Kim EJ, et al. 2006. Soochong virus: An antigenically and genetically distinct *Hantavirus* isolated from *Apodemus peninsulae* in Korea. *J Med Virol*. 78:290-297.
- Bahri S, Syafriati T. 2011. Mewaspadai munculnya beberapa penyakit hewan menular strategis di Indonesia terkait dengan pemanasan global dan perubahan iklim. *Wartazoa*. 21:25-39.
- Botten J, Mirowsky K, Ye C, Gottlieb K, Saavedra M, Ponce L, Hjelle B. 2002. Shedding and intracage transmission of Sin Nombre *Hantavirus* in the deer mouse (*Peromyscus maniculatus*) model. *J Virol*. 76:7587-7594.
- Chen CC, Pei KJC, Yang CM, Kuo MD, Wong ST, Kuo SC, Lin FG. 2011. A possible case of *Hantavirus* infection in a Borneo orangutan and its conservation implication. *J Med Primatol*. 40:1-4.
- Childs JE, Kaufmann AF, Peters CJ, Ehrenberg RL. 1993. *Hantavirus* infection-Southwestern United States: Interim recommendations for risk reduction. *MMWR Recomm Rep*. 42:1-13.
- Chua KB, Bellini WJ, Rota PA, Harcourt BH, Tamin A, Lam SK, Ksiazek TG, Rollin PE, Zaki SR, Shieh W, et al. 2000. Nipah virus: A recently emergent deadly paramyxovirus. *Science*. 288:1432-1435.
- de Oliveira RC, Guterres A, Fernandes J, D'Andrea PS, Bonvicino CR, de Lemos ERS. 2014. *Hantavirus* reservoirs: Current status with an emphasis on data from Brazil. *Viruses*. 6:1929-1973.
- de Oliveira SV, Fonseca LX, de Araújo Vilges KM, Maniglia FVP, Pereira SVC, de Caldas EP, Tauil PL, Gurgel-Gonçalves R. 2015. Vulnerability of Brazilian municipalities to *hantavirus* infections based on multi-criteria decision analysis. *Emerg Themes Epidemiol*. 12:15-22.
- Dobly A, Cochez C, Goossens E, De Bosschere H, Hansen P, Roels S, Heyman P. 2012. Sero-epidemiological study of the presence of *hantaviruses* in domestic dogs and cats from Belgium. *Res Vet Sci*. 92:221-224.
- Dong GM, Han L, An Q, Liu WX, Kong Y, Yang LH. 2005. Immunization effect of purified bivalent vaccine to haemorrhagic fever with renal syndrome manufactured from primary cultured hamster kidney cells. *Chin Med J*. 118:766-768.
- Easterbrook JD, Zink MC, Klein SL. 2007. Regulatory T cells enhance persistence of the zoonotic pathogen Seoul virus in its reservoir host. *Proc Natl Acad Sci*. 104:15502-15507.
- Firth C, Tokarz R, Simith DB, Nunes MRT, Bhat M, Rosa EST, Medeiros DBA., Palacios G, Vasconcelos PFC, Lipkin WI. 2012. Diversity and distribution of *Hantaviruses* in South America. *J Virol*. 86:13756-13766.
- Fleming DO. 2006. Risk assesment of biological hazards. In: Flemming DO, Hunt DL, eds. *Biological safety: Principles and Practices*. 4th Ed. Washington DC (US): AMS Press. p. 81-92.
- Goeijenbier M, Verner-Carlsson J, van Gorp ECM, Rockx B, Koopmans MPG, Lundkvist, van der Giessen JWB, Reusken CBEM. 2015. Seoul *Hantavirus* in brown rats in the Netherlands: Implications for physicians

- epidemiology, clinical aspects, treatment and diagnostics. *Neth J Med*. 73:155-160.
- Groen J, Suharti C, Koraka P, van Gorp EC, Sutaryo J, Lundkvist A, Osterhaus AD. 2002. Serological evidence of human Hantavirus infections in Indonesia. *Infection*. 30:326-327.
- Hooper JW, Josleyn M, Ballantyne J, Brocato R. 2013. A novel Sin Nombre virus DNA vaccine and its inclusion in a candidate pan-Hantavirus vaccine against hantavirus pulmonary syndrome (HPS) and hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS). *Vaccine*. 31:4314-4321.
- Houck M a, Qin H, Roberts HR. 2001. Hantavirus transmission: potential role of ectoparasites. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 1:75-79.
- Ibrahim IN, Shimizu K, Yoshimatsu K, Yunianto A, Salwati E, Yasuda SP, Koma T, Endo R, Arikawa J. 2013. Epidemiology of Hantavirus infection in Thousand Islands Regency of Jakarta, Indonesia. *J Vet Med Sci*. 75:1003-1008.
- Ibrahim IN, Sudomo M, Morita C, Uemura S, Muramatsu Y, Ueno H, Kitamura T. 1996. Seroepidemiological survey of wild rats for Seoul virus in Indonesia. *Jpn J Med Sci Biol*. 49:69-74.
- Johansson P, Yap G, Low H-T, Siew C-C, Kek R, Ng L-C, Bucht G. 2010. Molecular characterization of two hantavirus strains from different rattus species in Singapore. *Virol J*. 7:15-23.
- Jonsson CB, Figueiredo LTM, Vapalahti O. 2010. A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. *Clin Microbiol Rev*. 23:412-441.
- Kang HJ, Arai S, Hope AG, Cook JA, Yanagihara R. 2010. Novel Hantavirus in the flat-skulled shrew (*Sorex roboratus*). *Vector Borne Zoonotic Dis*. 10:593-597.
- Klempa B, Tkachenko EA, Dzagurova TK, Yunicheva Y V., Morozov VG, Okulova NM, Slyusareva GP, Smirnov A, Kruger DH. 2008. Hemorrhagic fever with renal syndrome caused by 2 lineages of Dobrava hantavirus, Russia. *Emerg Infect Dis*. 14:617-625.
- Klempa B, Witkowski PT, Popugaeva E, Auste B, Koivogui L, Fichet-Calvet E, Strecker T, ter Meulen J, Kruger DH. 2012. Sangassou virus, the first Hantavirus isolate from Africa, displays genetic and functional properties distinct from those of other murinae-Associated Hantaviruses. *J Virol*. 86:3819-3827.
- Koch DE, Mohler RL, Goodin DG. 2007. Stratifying land use/land cover for spatial analysis of disease ecology and risk: An example using object-based classification techniques. *Geospat Heal*. 2:15-28.
- Kosasih H, Ibrahim IN, Wicaksana R, Alisjahbana B, Hoo Y, Yo IH, Antonjaya U, Widjaja S, Winoto I, Williams M, Blair PJ. 2011. Evidence of human Hantavirus infection and zoonotic investigation of Hantavirus prevalence in rodents in Western Java, Indonesia. *Vector-Borne Zoonotic Dis*. 11:709-713.
- Kramski M, Meisel H, Klempa B, Krüger DH, Pauli G, Nitsche A. 2007. Detection and typing of human pathogenic Hantaviruses by real-time reverse transcription-PCR and pyrosequencing. *Clin Chem*. 53:1899-1905.
- Kraus AA, Priemer C, Heider H, Krüger DH, Ulrich R. 2005. Inactivation of Hantaan virus-containing samples for subsequent investigations outside biosafety level 3 facilities. *Intervirology*. 48:255-261.
- Kucinskaite-Kodze I, Petraityte-Burneikiene R, Zvirbliene A, Hjelle B, Rafael A, Medina RA, Gedvilaite A, Razanskiene A, Schmidt-Chanasit J, Mertens M, et al. 2011. Characterization of monoclonal antibodies against Hantavirus nucleocapsid protein and their use for immunohistochemistry on rodent and human samples. *Arch Virol*. 156:443-456.
- Laakkonen J, Kallio-Kokko H, Oktem MA, Blasdel K, Plyusnina A, Niemimaa J, Karataş A, Plyusnin A, Vaheri A, Henttonen H. 2006. Serological survey for viral pathogens in Turkish rodents. *J Wildl Dis*. 42:672-676.
- Lee HW, Lee PW, Johnson KM. 1978. Isolation of the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever. *J Infect Dis*. 137:298-308.
- Lokugamage N, Kariwa H, Lokugamage K, Iwasa MA, Hagiya T, Yoshii K, Tachi A, Ando S, Fukushima H, Tsuchiya K, et al. 2004. Epizootiological and epidemiological study of Hantavirus infection in Japan. *Microbiol Immunol*. 48:843-851.
- Machado AM, de Figueiredo GG, Sabino dos Santos Jr G, Figueiredo LTM. 2009. Laboratory diagnosis of human Hantavirus infection: Novel insights and future potential. *Future Virol*. 4:383-389.
- MacNeil A, Nichol ST, Spiropoulou CF. 2011. Hantavirus pulmonary syndrome. *Virus Res*. 162:138-147.
- Mailles A, Sin MA, Ducoffre G, Heyman P, Koch J, Zeller H. 2005. Larger than usual increase in cases of Hantavirus infections in Belgium, France and Germany, June 2005. *Euro Surveill*. 10:E050721.4.
- Mills JN, Gage KL, Khan AS. 2010. Potential influence of climate change on vector-borne and zoonotic diseases: A review and proposed research plan. *Environ Health Perspect*. 118:1507-1514.
- Mills JN. 2006. Biodiversity loss and emerging infectious disease: An example from the rodent-borne hemorrhagic fevers. *Biodiversity*. 7:9-17.
- Németh V, Madai M, Maràczy A, Bérczi B, Horvath G, Oldal M, Kisfali P, Bányai K, Jakab F. 2011. Detection of Dobrava-Belgrade Hantavirus using recombinant-nucleocapsid-based enzyme-linked immunosorbent assay and SYBR green-based real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Arch Virol*. 156:1655-1660.
- Nichol ST, Beaty BJ, Elliott RM, Goldbach R, Plyusnin A, Schmaljohn CS, Tesh RB. 2005. Bunyaviridae. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, editors. *Virus taxonomy: Eighth report of*

- the International Committee on Taxonomy of Viruses. Amsterdam (Netherlands): Elsevier Academic Press. p. 695-716.
- Nurisa I, Ristyanto. 2005. Penyakit bersumber rodensia (tikus dan mencit) di Indonesia. *J Ekol Kesehat*. 4:308-319.
- Oldal M, Németh V, Madai M, Kemenesi G, Dallos B, Péterfi Z, Sebo k J, Wittmann I, Bányai K, Jakab F. 2014a. Identification of hantavirus infection by Western blot assay and TaqMan PCR in patients hospitalized with acute kidney injury. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 79:166-170.
- Oldal M, Németh V, Madai M, Pinter R, Kemenesi G, Dallos B, Kutas A, Sebok J, Horvath G, Bányai K, Jakab F. 2014b. Serosurvey of pathogenic Hantaviruses among forestry workers in Hungary. *Int J Occup Med Environ Health*. 27:766-773.
- Olsson GE, Leirs H, Henttonen H. 2010. Hantaviruses and their hosts in Europe: Reservoirs here and there, but not everywhere? *Vector Borne Zoonotic Dis*. 10:549-561.
- Oncul O, Atalay Y, Onem Y, Turhan V, Acar A, Uyar Y, Caglayik DY, Ozkan S, Gorenek L. 2011. Hantavirus infection in Istanbul, Turkey. *Emerg Infect Dis*. 17:303-304.
- Padula PJ, Colavecchia SB, Martinez VP, Gonzalez Della Valle MO, Edelstein A, Miguel SDL, Russi J, Morea Riquelme J, Colucci N, Almiron M, Rabinovich RD. 2000. Genetic diversity, distribution, and serological features of Hantavirus infection in five countries in South America. *J Clin Microbiol*. 38:3029-3035.
- Paragas J, Endy TP. 2006. Viral agents of human disease: biosafety concerns. In: Flemming DO, Hunt DL, eds. *Biological safety; Principles and Practices*. 4th Ed. Washington DC (US): AMS Press. p. 179-207.
- Plyusnina A, Ibrahim IN, Plyusnin A. 2009. A newly recognized hantavirus in the Asian house rat (*Rattus tanezumi*) in Indonesia. *J Gen Virol*. 90:205-209.
- Plyusnina A, Ibrahim IN, Winoto I, Porter KR, Gotama IBI, Lundkvist A, Vaheri A, Plyusnin A. 2004. Identification of Seoul Hantavirus in *Rattus norvegicus* in Indonesia. *Scand J Infect Dis*. 36:356-359.
- Praseno, Nirwati H. 2008. Hantavirus infection in clinically suspected dengue fever patients. *Berkala Ilmu Kedokteran*. 40:132-135.
- Raboni SM, Rubio G, Borba LDE, Zeferino A, Skraba I, Goldenberg S, Dos Santos CN. 2005. Clinical survey of Hantavirus in southern Brazil and the development of specific molecular diagnosis tools. *Am J Trop Med Hyg*. 72:800-804.
- Reynes JM, Soares JL, Hüe T, Bouloy M, Sun S, Krüy SL, Marie FFS, Zeller H. 2003. Evidence of the presence of Seoul virus in Cambodia. *Microbes Infect*. 5:769-773.
- Seitsonen E, Hynninen M, Kolho E, Kallio-Kokko H, Pettilä V. 2006. Corticosteroids combined with continuous veno-venous hemodiafiltration for treatment of Hantavirus pulmonary syndrome caused by Puumala virus infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 25:261-266.
- Sendow I. 2013. *Bovine ephermal fever*, penyakit hewan manular yang terkait dengan perubahan lingkungan. *Wartazoa*. 23:76-83.
- Sironen T, Vaheri A, Plyusnin A. 2005. Phylogenetic evidence for the distinction of Saaremaa and Dobrava Hantaviruses. *Virol J*. 2:90-95.
- Suharti C, van Gorp EC, Dolmans WM, Groen J, Hadisaputro S, Djokomoeljanto RJ, D M E OA, van der Meer JW. 2009. Hantavirus infection during dengue virus infection outbreak in Indonesia. *Acta Med Indones*. 41:75-80.
- Sumibcay L, Kadjo B, Gu SH, Kang HJ, Lim BK, Cook JA, Song JW, Yanagihara R. 2012. Divergent lineage of a novel Hantavirus in the banana pipistrelle (*Neoromicia nanus*) in Côte d'Ivoire. *Virol J*. 9:34.
- Suwandono A, Nurhayati I, Parwati PIF, Rudiman, Wisaksana R, Kosasih H, Alisjahbana B. 2011. Perbandingan Nilai diagnostik trombosit, leukosit, antigen NS1 dan antibodi IgM antidengue. *J Indonesia Med Assoc*. 61:362-332.
- Vapalahti O, Mustonen J, Lundkvist Å, Henttonen H, Plyusnin A, Vaheri A. 2003. Hantavirus infections in Europe. *Lancet Infect Dis*. 3:653-661.
- Weiss S, Witkowski PT, Auste B, Nowa K, Weber N, Fah J, Mombouli JV, Wolfe ND, Drexler JF, Drosten C, et al. 2012. Hantavirus in bat, Sierra Leone. *Emerg Infect Dis*. 18:159-161.
- Wibowo. 2010. Epidemiologi Hantavirus di Indonesia. *Bul Penelitian Kesehatan*. Supl:44-49.
- Willemann MCA, Oliveira S V. 2014. Risk factors associated with Hantaviriosis fatality: A regional analysis from a case-control study in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 47:47-51.
- Yashina LN, Patrushev NA, Ivanov LI, Slonova RA, Mishin VP, Kompanez GG, Zdanovskaya NI, Kuzina II, Safronov PF, Chizhikov VE, et al. 2000. Genetic diversity of Hantaviruses associated with hemorrhagic fever with renal syndrome in the far east of Russia. *Virus Res*. 70:31-44.
- Zeimes CB, Olsson GE, Ahlm C, Vanwambeke SO. 2012. Modelling zoonotic diseases in humans: Comparison of methods for Hantavirus in Sweden. *Int J Health Geogr*. 11:39.
- Zhang YZ, Xiao DL, Wang Y, Wang HX, Sun L, Tao XX, Qu YG. 2004. The epidemic characteristics and preventive measures of hemorrhagic fever with syndromes in China. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. 25:466-469.
- Zhang YZ, Zou Y, Fu ZF, Plyusnin A. 2010. Hantavirus infections in humans and animals, China. *Emerg Infect Dis*. 16:1195-1203.

Disregulasi Sitokin pada Unggas dan Mamalia yang Terinfeksi Virus Avian Influenza

(Cytokines Disregulation in Birds and Mammals Infected by Avian Influenza Virus)

Dyah Ayu Hewajuli dan NLPI Dharmayanti

Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl. RE Martadinata No. 30, Bogor 16114
dhewajuli@yahoo.com

(Diterima 28 Agustus 2015 – Direvisi 19 Februari 2016 – Disetujui 8 Maret 2016)

ABSTRACT

Highly Pathogenic Avian Influenza (HPAI) virus causes severe dysfunction in nervous system lead to mortality in birds and mammals. The innate immunity plays an important role as initial barrier against the infection that stimulated by recognition of pathogens through Toll like Receptor (TLR). Toll like Receptor activates Nuclear Factor-kappa B cascade pathway. Cytokines are mediators to initiate, proliferate and regulate inflammation against the virus infection. They are classified according to their activities or target cells, such as interferons, interleukins, chemokines, colony stimulating factor, and tumor necrosis factors. The gene expression of cytokine was found in different organs of chicken and mammals infected with HPAI and Low Pathogenic Avian Influenza (LPAI) virus to express immune response against infection. The HPAI and LPAI viruses cause up-regulated and down-regulated cytokines, disruption of cell mediated immune response lead to increased AI virus pathogenicity. The objective of this review is to describe disregulation mechanism of cytokines that increase AI virus pathogenicity in birds and mammals.

Key words: Avian influenza, cytokines, disregulation

ABSTRAK

Virus *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) menyebabkan disfungsi sistem saraf yang parah sehingga menyebabkan kematian pada unggas dan mamalia. Sistem kekebalan bawaan (*innate immunity*) berperan sebagai barier untuk melawan infeksi virus yang diawali dengan pengenalan patogen melalui *Toll like Receptor* (TLR). Reseptor tersebut mengaktifkan jalur kaskade *Nuclear Factor-kappa B*. Sitokin adalah mediator yang berfungsi untuk mengawasi, memproliferasi dan mengatur peradangan untuk melawan infeksi virus. Sitokin diklasifikasikan berdasarkan aktivitas atau sel target. Beberapa jenis sitokin yaitu interferon, interleukins, chemokines, *colony stimulating factor* dan *tumour necrosis factors*. Ekspresi gen sitokin ditemukan pada berbagai organ ayam dan mamalia yang terinfeksi virus HPAI maupun *Low Pathogenic Avian Influenza* (LPAI) sehingga ekspresi ini mengindikasikan respon kekebalan tubuh untuk melawan infeksi. Virus HPAI sub tipe H5N1 dan LPAI menyebabkan *up-regulated* dan *down-regulated* sitokin yang menyebabkan rusaknya respon imun *cell mediated* sel sehingga meningkatkan patogenisitas virus AI. Tujuan makalah ini adalah membahas tentang mekanisme disregulasi oleh sitokin yang meningkatkan keganasan virus AI pada unggas dan mamalia.

Kata kunci: Avian influenza, sitokin, disregulasi

PENDAHULUAN

Virus *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) sub tipe H5N1 pertama kali diisolasi dari unggas air (angsa lokal) dari Provinsi Guangdong, Tiongkok pada tahun 1996 (Xu et al. 1999). Unggas spesies *Gallinaceus* sangat peka terhadap infeksi, tetapi ayam kampung dan unggas air liar lebih resisten (Ellis et al. 2004). Penyakit *Avian Influenza* (AI) yang bersifat akut pada unggas akan menunjukkan gejala klinis disfungsi yang parah pada sistem saraf sampai kematian. Virus ini dapat ditularkan antar unggas secara efisien karena virus ini dapat diisolasi dengan titer yang sangat tinggi pada air minum unggas dan unggas lain di sekitarnya (Sturm-Ramirez et al. 2004).

Sistem kekebalan bawaan (*innate immunity*) akan berperan sebagai barier untuk melawan invasi suatu patogen yang diawali dengan pengenalan patogen oleh reseptor seperti *Toll like Receptor* (TLRs) (Akira et al. 2000). Molekul detektor ini mengaktifkan jalur domain sitoplasmik TLR dan mengaktifkan faktor transkripsi *Nuclear Factor-kappa B* (NF-kB) untuk memulai ekspresi gen yang menandai molekul untuk berproliferasi dan mengatur inflamasi dan kekebalan lain (sitokin dan interferon) (Baek et al. 2009). Golongan sitokin interleukin (IL-12) adalah stimulator utama peradangan, IL-5 sebagai perantara pada aktivasi sel limfosit T *helper*, diferensiasi sel B, produksi IL-13, dan *Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor* (GM-CSF) dan IL-5 sebagai regulator pada

diferensiasi dan proliferasi sel kekebalan (Avery et al. 2004).

Virus HPAI subtype H5N1 yang bersifat virulen menghambat ekspresi mRNA α -interferon (IFN α) atau β -interferon (IFN β) pada sel embrio ayam sehingga patogenitas virus ayam dipengaruhi oleh kemampuannya untuk melawan respon interferon dari inang (Li et al. 2006b). Perbedaan karakter genetik virus HPAI akan menstimulasi ekspresi sitokin yang berbeda. Virus HPAI *clade* 2.1.1 dan 2.1.3 menunjukkan ekspresi sitokin IFN γ yang tidak berlebihan, mengalami perbedaan ekspresi sitokin IFN γ dan tidak menginduksi ekspresi sitokin TNF α (Dharmayanti et al. 2014). Perubahan asam amino di posisi 191-195 protein NS1 virus HPAI mampu menyebabkan virus ini menjadi tidak virulen (Zhu et al. 2008). Protein non-struktural 1 (NS1) berperan dalam meningkatkan patogenitas virus HPAI karena mengganggu respon kekebalan inang dalam mensekresikan IFN dan antiviral (Mibayashi et al. 2007). Protein non-struktural (NS) virus subtype H5N1 dalam virus *reassortant* H1N1 menstimulasi *up-regulated* sitokin pro-inflamasi seperti IFN γ , kemokin KC, IL1 α , IL1 β dan IL-6 pada organ paru-paru mencit dan babi sehingga berkontribusi secara langsung dalam meningkatkan virulensi virus HPAI. Namun demikian, infeksi virus *reassortant* H1N1 yang mengandung protein NS virus H5N1 menurunkan konsentrasi sitokin IL10 (*down-regulated* IL-10) pada organ paru-paru mencit dan babi (Lipatov et al. 2005).

Wasilenko et al. (2009) melaporkan bahwa replikasi virus HPAI yang sangat efisien terjadi di paru-paru dan limpa serta diikuti dengan *up-regulated* dari antivirus sitokin seperti IFN α , IFN γ dan gen resisten *orthomyxovirus* 1 (Mx1) sehingga kematian pada ayam berlangsung dengan cepat. Ekspresi antivirus mRNA dan sitokin meningkat pada 24 jam pasca-infeksi, tetapi menurun secara tiba-tiba 32 jam pasca-infeksi. Pada *Low Pathogenic Avian Influenza* (LPAI), ekspresi antivirus *messenger* RNA (mRNA) dan sitokin meningkat 24 jam pasca-infeksi, tetapi ekspresi ini baru menurun 48 jam pasca-infeksi (Suzuki et al. 2009). Ueda et al. (2010) melaporkan bahwa virus HPAI subtype H5N1 menginduksi apoptosis *duck embryonic fibroblast* (DEF) lebih besar daripada virus LPAI. Permeabilitas membran luar dan hilangnya potensi transmembran mitokondria DEF yang diinfeksi virus HPAI menyebabkan disfungsi mitokondria yang akan memicu kematian sel inang secara bertahap. Respon kekebalan inang yang tidak normal akan berpengaruh terhadap keganasan virus (Kobasa et al. 2007). Makalah ini membahas disregulasi (*up-regulated* dan *down-regulated*) sitokin yang akan berpengaruh terhadap keganasan virus AI pada unggas dan mamalia.

PATTERN RECOGNITION RECEPTORS PADA SISTEM KEKEBALAN BAWAAN UNGGAS DAN MAMALIA

Respon kekebalan bawaan bersifat spesifik, diawali oleh reaksi reseptor yang dikenali oleh mikroorganisme. Reseptor tersebut adalah *Pattern Recognition Receptors* (PRRs) dan *Pathogen Associated Molecular Patterns* (PAMPs) (Akira et al. 2000). Reseptor PRRs yang lain, *Toll like Receptors* (TLR), *Nucleotide Binding Oligomerization Domain Proteins* (NOD), RNA *helicases* seperti *Retinoic Acid Inducible Gen 1* (RIG-1) atau MDA5, *lectin* tipe C mampu menghambat respon sinyal intraseluler untuk mengaktifkan gen yang memproduksi sitokin. Kombinasi TLR2 dan NOD2, TLR5 dan NOD2, TLR5 dan TLR3 serta TLR5 dan TLR 9 menunjukkan sinergisme yang baik dalam memproduksi sitokin sedangkan kombinasi TLR4 dan TLR2, TLR4 dan Dectin-1, TLR2 dan TLR9 serta TLR3 dan TLR2 menghambat produksi sitokin (Timmermans et al. 2013).

Respon kekebalan bawaan memiliki sel efektor seperti neutrofil atau heterofil, sel *Natural Killer* (NK) dan *Dendritic Cell* (DC), menghasilkan sitokin dan kemokin yang mendorong respon inflamasi dan respon fase akut, mempengaruhi respon kekebalan adaptif, serta menyajikan antigen patogen pada respon kekebalan adaptif yaitu *Major Histocompatibility Complex* (MHC) melalui *Antigen Presenting Cell* (APC) (Iwasaki & Medzhitov 2010). Inang pertama kali merespon infeksi mikroba melalui pengenalan komponen virus dengan PRRs yang ditemukan pada sel kekebalan bawaan seperti sel dendritik, makrofag, limfosit, sel endotel, sel epitel mukosa dan fibroblas (Iqbal et al. 2005). Reseptor ini berikatan dengan antigen eksogen dan endogen serta PAMPs yang diekspresikan pada permukaan patogen, seperti lipopolisakarida (LPS), asam lipoteikoat, flagellin dan peptidoglikan atau patogen asam nukleat, seperti RNA untai tunggal (ssRNA), RNA untai ganda (dsRNA) atau CpG DNA (Liu et al. 2008). Beberapa PRRs ditemukan pada sitosol. *Toll like Receptor*, *RIG-I like receptor* (RLR) dan *NOD like receptor* (NLR), yang berperan penting dalam pengenalan virus dsRNA, ssRNA dan DNA dalam sitosol (Kanneganti et al. 2007).

Berdasarkan fungsinya, PRRs terbagi atas sinyal PRRs dan *endocytic* PRRs atau menurut lokasi yaitu PRRs terikat membran atau PRRs sitoplasma. Permukaan sel inang mengekspresikan TLRs yang mengenal komponen permukaan sel patogen, sedangkan vesikel endositik terutama mengekspresikan molekul yang mengenali patogen asam nukleat. *Toll like receptor* adalah PRR terikat membran yang mengenal

lipid patogen, protein dan asam nukleat. *Toll like receptor* dan RLR berperan penting untuk produksi interferon tipe I (IFN) dan berbagai sitokin (Yoneyama et al. 2004), sedangkan NLR berfungsi dalam pengaturan interleukin-1 β (IL-1 β) (Kanneganti et al. 2007).

Toll like Receptor adalah jenis protein transmembran I yang terdiri dari domain N-terminal ekstraseluler yang mengandung *Leucine Rich Repeat* (LRR) yang sebagai perantara untuk deteksi PAMPs, domain transmembran dan domain intraseluler *Tol-interleukin 1 (IL-1) receptor* (TIR) yang berfungsi dalam transduksi sinyal (Rock et al. 1998). Reseptor TLRs merupakan keluarga PRRs yang telah dikarakterisasi dengan baik. Ayam memiliki beberapa TLRs yang mirip (ortholog) terhadap manusia dan TLRs spesifik yang bersifat seperti TLRs pada mamalia dalam merespon infeksi mikroba (Kogut et al. 2006). Beberapa TLRs pada ayam yang spesifik terhadap ligannya ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. TLRs pada ayam dan ligannya

TLRs ayam	Ligan
TLR1LA/B	Lipoprotein
TLR2A/B	Lipoprotein dan peptidoglikan
TLR3	ds RNA, poly I : C
TLR4	Lipopolisakarida (LPS)
TLR5	Flagelin
TLR7	ssRNA
TLR15	<i>Yeast</i> (jamur)
TLR21	dsRNA, CpG oligodeoksinukleotida

Sumber: Gupta et al. (2014)

Lima TLR unggas (chTLR2, 4, 5 dan 7) bersifat ortholog terhadap gen mamalia (chTLR2a dan chTLR2b), tetapi chTLR1La dan chTLR1Lb hanya spesifik pada unggas. Gen TLR5 unggas yang polimorfik merupakan molekul yang kemungkinan berhubungan dengan pertahanan unggas atau kerentanan unggas terhadap penyakit infeksius (Ruan et al. 2012). Sampai saat ini, TLR15 telah ditemukan pada genom beberapa unggas seperti ayam, angsa dan burung puyuh pada jantung, hati, usus, bursa, sumsum tulang, otot dan limpa (Ramasamy et al. 2012). *Toll like Receptor* 15 (TLR15) unggas berperan dalam kekebalan tubuh inang melawan virus (Jie et al. 2013). Gen chTLR2, 3, 4 dan 21 yang berada pada sel CD4 + T, serta transkrip chTLR2 dan chTLR3 ditemukan dalam jumlah yang banyak pada ayam (Paul et al. 2012). Sel CD4 + T unggas berperan untuk melawan infeksi virus (Iqbal et al. 2005).

Infeksi virus HPAI subtype H5N1 menyebabkan *up-regulation* ekspresi MdTLR3 yang mirip dengan

TLR3 secara signifikan di otak itik pada 48 jam pasca-infeksi (pi), menyebabkan *down-regulation* MdTLR3 di limpa dan paru (Jiao et al. 2012). Ekspresi TLR3 diregulasi di otak burung merpati yang terinfeksi virus HPAI subtype H5N1 sedangkan korelasi ekspresi TLR3 dengan replikasi virus di paru-paru berbanding terbalik (Hayashi et al. 2011). *Toll like Receptor* 7 atau 8 peka terhadap virus *single stranded RNA* (ssRNA). *Toll like Receptor* 7 (TLR7) ortholog telah ditemukan pada genom ayam dan burung zebra finch (Temperley et al. 2008). Ekspresi goTLR7, MyD88 dan molekul antivirus lainnya diregulasi di paru-paru pada awal fase infeksi virus HPAI subtype H5N1. Virus HPAI subtype H5N1 dapat mengaktifkan goTLR7 melalui jalur yang tergantung pada *myeloid differentiation factor* 88 (MyD88), serta goTLR7 dalam respon kekebalan bawaan (Wei et al. 2013).

Retinoic Acid Induce-ible Gene I (RIG-I) like Receptor (RLR) terdiri dari tiga kelompok yaitu RIG-I, *melanoma differentiation associated* gen 5 (MDA5) dan laboratorium genetika dan fisiologi 2 (LGP2). *Retinoic acid induce-ible* gen 1 termasuk dalam keluarga IFN stimulated gen (ISG) dan diekspresikan dalam jumlah besar di sitoplasma. Gen RIG-I mendeteksi asam nukleat virus dalam sitosol dan mengaktifasi sinyal kaskade serta memulai respon sebagai antivirus dengan memproduksi IFN (Yoneyama et al. 2004). *Retinoic acid induce-ible* gen 1 berikatan secara spesifik dengan virus RNA tetapi tidak berikatan dengan virus dsDNA (Samanta et al. 2006). Virus HPAI subtype H5N1 menyebabkan *up-regulation* ekspresi RIG-1 pada paru-paru itik, tetapi ekspresi RIG-1 tidak ditemukan pada itik yang diinfeksi virus HPAI subtype H5N2 (Barber et al. 2010). *Melanoma differentiation associated* gen 5 dan RIG-1 merupakan PRRs sitosolik utama yang mendeteksi asam nukleat virus dan menyebabkan aktivasi sistem interferon. Aktivasi MDA5 dan RIG-1 memulai transduksi sinyal yang menyebabkan sekresi IFN tipe I dan sitokin lainnya (Pichlmair et al. 2006).

SITOKIN

Sitokin adalah mediator peptida yang disekresikan oleh sel *hematopoietic* atau *non-hematopoietic* yang dapat menghambat atau meningkatkan proliferasi, diferensiasi, aktivasi dan pergerakan sel, serta berperan penting dalam kekebalan dan produksi sitokin lainnya (Timmermans et al. 2013). Respon yang ditimbulkan oleh sitokin tergantung pada jenis sitokin dan sel target. Penamaan produk sitokin oleh sel penghasilnya adalah limfokin yang dihasilkan oleh sel limfosit dan monokin yang dihasilkan oleh makrofag dan monosit aktif sedangkan penamaan produk sitokin berdasarkan fungsinya seperti interferon, *growth factor* dan *colony stimulating factor*. Beberapa jenis sitokin yaitu

interferon, interleukins, chemokines, *colony stimulating factor* dan *tumour necrosis factors* (Tisoncik et al. 2012). Beberapa jenis sitokin telah diidentifikasi berdasarkan aktivitas atau fungsinya seperti yang ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Tipe dan fungsi sitokin

Jenis	Fungsi
Interferon	Regulasi kekebalan bawaan, aktivasi komponen antivirus efek antiproliferatif
Interleukin	Perkembangan dan diferensiasi leukosit, serta proinflamasi
Kemokin	Mengontrol kemotaksis, rekrutmen leukosit dan proinflamasi
<i>Colony stimulating factor</i>	Stimulasi hematopoietik, proliferasi dan diferensiasi sel progenitor
<i>Tumor necrosis factor</i>	Proinflamasi, aktivasi sel limfosit T sitotoksik

Sumber: Tisoncik et al. (2012)

INTERFERON

Interferon dibedakan atas interferon tipe I yaitu IFN α , IFN β , IFN ω dan IFN τ . Interferon tipe 2 yaitu IFN γ . Infeksi virus menyebabkan sebagian besar *Dendritic Cell* (pDC) yang distimulasi oleh TLR7 atau TLR9 memproduksi IFN tipe I melalui jalur sinyal MyD88 (Kawai et al. 2004). Sel makrofag, dendritik, fibroblas diinduksi RNA *cytoplasmic* untuk memproduksi IFN tipe I melalui jalur sinyal yang diperantarai RLR atau distimulasi oleh TLR3 atau TLR4 (Kato et al. 2005).

Respon interferon tipe I memerlukan reseptor kompleks yaitu *Interferon α Receptor 1* (IFNAR1) dan *Interferon α Receptor 2* (IFNAR2) (Leyva et al. 2005), melalui aktivasi IFN tipe I melalui *Janus kinase* (JAK) 1 dan Tyk2 tirosin kinase. *Janus kinase 1* dan Tyk2 kinase mengaktifkan beberapa kaskade sinyal pada respon IFN tipe I (de Weerd et al. 2007). Interferon tipe I (α dan β) yang tersekresikan berikatan dengan reseptor IFN tipe I kemudian mengaktifasi kinase yang berikatan dengan reseptor JAK1 dan Tyk2 yang sebagai transduksi sinyal fosforilat dan aktivator transkripsi *phosphorylation of signal transducer and activator of transcription* (STAT) 1 dan 2 (Goodbourn et al. 2000).

Protein phosphorylation of signal transducer and activator of transcription membentuk suatu kompleks dengan IRF9 yang merupakan protein IFN *regulatory factor* lalu membentuk IFN *stimulated* gen 3 (ISGF3). Produk IFN *stimulated* gen (ISG) akan menghasilkan

antivirus dalam sel target yang akan memblokir replikasi virus. Produksi IFN akan melindungi sel dan mencegah replikasi dan pertumbuhan virus lebih lanjut (Krishnamurthy et al. 2006). Ikatan IFN tipe I dengan reseptornya akan mengaktifkan jalur kaskade yang menyebabkan fosforilasi STAT 1 dan STAT 2 (Brierley & Fish 2005). Ikatan IFN α dengan reseptor IFN tipe I akan mengaktifasi p38 MAP kinase jalur substrat pada transkripsi gen. Protein p38 merupakan golongan *Mitogen Activated Protein* (MAP) kinase yang berperan pada berbagai macam sinyal (Katsoulidis et al. 2005).

Reseptor IFN tipe II yang terdiri dari subunit *Interferon γ Receptor* (IFNGR) 1 dan IFGR2 juga berhubungan dengan JAK1 dan JAK2 yang mengaktifkan IFN tipe II yang tergantung jalur JAK-STAT untuk menghasilkan respon IFN γ . Tingkat ekspresi IFNGR2 yang rendah pada membran sel T berfungsi merespon terhadap IFN γ serta menstimulasi proliferasi sel tetapi tidak memicu jalur apoptosis. Tingkat ekspresi IFNGR2 yang tinggi pada permukaan sel T mampu menginduksi sinyal apoptosis (Bernabei et al. 2001).

Interferon tipe III atau IFNs lambda (IFN λ), IFN baru yang mengandung antivirus untuk melawan infeksi virus influenza tipe A (Mordstein et al. 2008). Interferon λ dibedakan menjadi tiga sub tipe yaitu IFN- λ 1, - λ 2 dan - λ 3, atau yang dikenal sebagai interleukin-29 (IL-29), IL-28A dan IL-28B. Interferon λ dan IFN tipe I menginduksi transduksi sinyal yang sama melalui jalur sinyal JAK-STAT. Namun, IFN tipe III memiliki fungsi yang berbeda dengan IFN tipe I karena IFN tipe III berikatan dengan kompleks reseptor yang berbeda dari kompleks reseptor IFN tipe I (Zhou et al. 2007). Interferon dapat mencegah replikasi virus, mengaktifkan diferensiasi, pertumbuhan, pengekspresian antigen permukaan dan imunoregulasi sel (Zhu et al. 2005).

Virus dapat menghambat produksi IFN, mengganggu jalur sinyal IFN serta menghambat protein antivirus yang diinduksi oleh IFN. Beberapa antagonis IFN telah dapat diidentifikasi dari virus RNA maupun DNA (Gotoh et al. 2003). Protein NS1 virus AI dapat menghambat fungsi protein antivirus sitoplasma yaitu 2'-5'-oligoadenylate synthetase (OAS) (Min & Kfrug 2006) dan dsRNA-dependent *serine/threonine protein kinase* R (PKR) (Min et al. 2007). Ikatan protein NS virus influenza tipe A dengan PKR mengganggu aktivitas atau replikasi dsRNA (Li et al. 2006a).

INTERLEUKIN

Interleukin (IL) berfungsi untuk diferensiasi dan aktivasi sel kekebalan, terdiri dari pro atau anti-inflamasi yang menimbulkan berbagai macam respon

seperti semua sitokin lainnya (Brockner et al. 2010). Interleukin-1 (IL-1) dibedakan menjadi tiga bentuk yaitu IL-1 α , IL-1 β dan IL-1 Ra . Interleukin 1 α dan IL-1 β berdasarkan aktivitasnya yang menyebabkan peradangan pada jaringan tubuh (Dinarello 2005).

Interleukin α disekresikan oleh sel yang mengalami apoptosis serta berfungsi sebagai faktor transkripsi (Carmi et al. 2009). *Inflammasomes* merupakan kompleks makromolekul sitosolik yang terdiri dari golongan *nucleotide-binding domain and leucine rich repeat containing receptor* (NLR) yang memproduksi IL-1 β dan IL-18 dalam melawan patogen serta aktivitasnya diregulasi oleh IFN tipe I (Guarda et al. 2011). Aktivitas IL-1 diperantarai oleh IL-1 *receptor* (IL-1RI) yang berperan dalam memberikan sinyal. Interleukin 1 β (IL-1 β) adalah sitokin pro-inflamasi yang dihasilkan oleh sel *Natural Killer* (NK), sel B, sel dendritik, fibroblast dan sel epitel (Ben-sasson et al. 2009). Interleukin 1 β disintesis sebagai suatu prekursor yang dipecah oleh *caspase1* yang diaktivasi oleh *inflammasome* (Ravikumar et al. 2009). Interleukin 1 β berfungsi sebagai kemoatraktan terhadap granulosit untuk meningkatkan perkembangan dan diferensiasi sel T CD4 khususnya sel yang memproduksi IL-17 dan IL-4 (Ben-sasson et al. 2009). Interleukin 1 β menimbulkan respon fase akut dan meningkatkan respon kekebalan (Schmitz et al. 2005).

Respon fase akut ditandai oleh aktivasi sel fagosit sekitar area peradangan dan sel non-kekebalan (*fibroblast* dan epitel) untuk memproduksi sitokin pro-inflamasi yang mengawali respon kekebalan serta sitokin anti-inflamasi yang diproduksi di akhir respon kekebalan. Tubuh akan membatasi respon dengan kematian sel atau apoptosis (Kroemer et al. 2009) lalu menginduksi sitokin anti-inflamasi seperti TGF β , IL-10 (Freire-de-Lima et al. 2006). Interleukin 18 dapat meringankan demam yang diinduksi oleh IL-1 β karena IL-18 menggunakan jalur MAPK p38 untuk menghambat jalur sinyal NF- κ B MAPK p38 yang digunakan oleh IL-1 β (Lee et al. 2004) dan bekerja pada sel T-*helper* 1 (Bryson et al. 2008) yang menginduksi IFN- γ . Interleukin 18 disintesis menjadi bentuk bioaktif yang matang dan bersama dengan IL-12 akan menstimulasi sel T dan NK (Lee et al. 2004).

Interleukin 12 dihasilkan oleh monosit, makrofag dan APC lainnya, terdiri dari subunit p40 dan p35 dengan sinyal heterodimer melalui reseptor IL12 (IL12R). Interleukin 12 menginduksi *Tumor Necrosis Factor* (TNF) dan IFN- γ dengan menstimulasi Th1 (Vasconcellos et al. 2011). Interleukin 12 menstimulasi aktivitas non-reseptor JAK2 dan Tyk2 yang menghasilkan STAT terutama STAT4. Interleukin 23 juga mengaktivasi JAK dan molekul sinyal STAT seperti IL-12 (Parham et al. 2002) dan IFN γ dan mengaktivasi sel T untuk melawan infeksi. Sitokin TGF β , IL-1 dan IL-6 menginduksi ekspresi *retinoic*

acid receptor-related orphan receptor- γ (ROR γ t) yaitu suatu faktor transkripsi yang mempromosikan ekspresi IL23R (Ivanov et al. 2006).

Interleukin 6 mengatur proses inflamasi selama perbaikan jaringan dalam respon kekebalan serta metabolisme (Scheller et al. 2011). Interleukin ini mempromosikan diferensiasi sel B menjadi sel plasma, mengaktivasi sel T sitotoksik serta mengatur homeostasis, merupakan *endogenous pyrogen* yang menstimulasi demam dan produksi protein pada fase akut (Barkhausen et al. 2011). Sinyal yang ditimbulkan oleh IL-6 menyebabkan rekrutmen monosit ke daerah inflamasi (Hurst et al. 2001), mempromosikan sel Th17 serta menghambat apoptosis sel T. Sinyal IL-6 berperan sebagai perantara dalam menghambat apoptosis serta regenerasi sel epitel saluran pencernaan (Scheller et al. 2011). Selain itu, IL-6 merupakan sitokin terlarut yang disintesis pada retikulum endoplasma serta mengawali akumulasi di *aparatus golgi* setelah empat jam stimulasi oleh makrofag (Manderson et al. 2007).

KEMOKIN

Ikatan kemokin dan reseptor menginduksi sinyal yang diperantarai oleh *transmembrane* G-protein *coupled receptors* (GPCRs) sehingga menyebabkan kemotaksis, induksi degranulasi leukosit dan fagositosis serta *respiratory burst* (Carrillo et al. 2003). Kemokin dibedakan menjadi sub-famili berdasarkan susunan dasar residu *cysteine* pada N terminal yang *conserved* yaitu CXC, CC, C dan CX3C. Kemokin CXC seperti monokin yang diinduksi oleh IFN- γ menghambat perkembangan sel kanker dan metastasis (Iwakiri et al. 2009). Kemokin berfungsi sebagai kemoatraktan untuk mengontrol perpindahan sel sistem kekebalan (Boldajipour et al. 2008) serta berkontribusi dalam proses embriogenesis, perkembangan dan fungsi kekebalan bawaan dan adaptif serta metastasis kanker (Iwakiri et al. 2009).

Gangguan fisiologis seperti stres dapat menginduksi ekspresi beberapa mRNA kemokin seperti motif C-C *ligand 1 inflammatory* (CCLi1), motif C-C *ligand 2 inflammatory* (CCLi2), motif C-C *ligand 5* (CCL5), motif C-C *ligand 16* (CCL16), motif C-X-C *ligand 1 inflammatory* (CXCLi1), motif C-X-C *ligand 2 inflammatory* (CXCLi2), CXC *chemokine receptor 1* (CXCR1) dan CXC *chemokine receptor 4* (CXCR4) pada sel heterofil dan limfosit perifer ayam (Shini et al. 2010). Sel endotel juga mengekspresikan kemokin CC seperti CCR2 yaitu kemokin pro-inflamasi yang berperan penting sebagai mediator *neovascularization* pada angiogenesis (Keeley et al. 2008).

Sebagian besar kemokin adalah pro-inflamasi yang disekresikan oleh sel dalam merespon infeksi

virus atau mikroba lainnya. Sekresi kemokin pro-inflamasi kemungkinan disebabkan oleh infeksi oleh organisme patogen atau stimulasi sitokin seperti IL-1 β , TNF dan IFN γ . Pelepasan kemokin pro-inflamasi menyebabkan rekrutmen sel sistem kekebalan yaitu neutrofil, monosit atau makrofag dan limfosit ke daerah infeksi. Kemokin biasanya menarik sel sistem kekebalan spesifik yang berperan dalam pemulihan luka (Ishida et al. 2008) dan melawan infeksi virus (Li et al. 2000).

COLONY STIMULATING FACTOR

Colony Stimulating Factor (CSFs) disebut juga faktor pertumbuhan *haemopoietic* yang mengatur produksi sel-sel sumsum tulang seperti sel darah merah, sel darah putih dan platelet. *Colony Stimulating Factor* berfungsi untuk diferensiasi sel *progenitor haemopoietic* atau *stem cell*. Salah satu regulator penting dari makrofag homeostasis adalah makrofag *colony stimulating factor* atau CSF 1 yang berfungsi sebagai faktor-faktor pertumbuhan *haemopoietic* untuk menstimulasi perkembangan makrofag di sumsum tulang. *Colony Stimulating Factor*-1 juga dapat diproduksi makrofag yang direkrutnya sendiri (Irvine et al. 2006) dan berfungsi juga untuk meningkatkan jumlah makrofag yang memproduksi sitokin di area yang mengalami peradangan serta menjadi bagian dari reaksi kaskade yang berfungsi untuk memperpanjang reaksi inflamasi atau peradangan (Tisoncik et al. 2012). *Macrophage Colony Stimulating Factor* (M-CSF) atau CSF-1 dan GM-CSF menginduksi profil sitokin yang berbeda. *Macrophage Colony Stimulating Factor* menginduksi ekspresi gen *Interferon Regulated Factor* 4 (IRF4), tetapi GM-CSF menstimulasi ekspresi gen *Interferon Regulated Factor* 5 (IRF5) (Lacey et al. 2012).

TUMOR NECROSIS FACTOR

Tumor Necrosis Factor α merupakan glikoprotein dengan 185 asam amino yang mampu menginduksi nekrosis pada tumor dan berperan penting dalam *septic shock*. Sitokin ini dalam hipotalamus menstimulasi pelepasan hormon yang mengeluarkan *corticotropic* dan menginduksi demam. *Tumor Necrosis Factor* menginduksi vasodilatasi dan hilangnya permeabilitas vaskuler yang menyebabkan infiltrasi sel limfosit, neutrofil dan monosit. Virus LPAI maupun HPAI menyebabkan limfopenia dan peningkatan sekresi sitokin pro-inflamasi seperti TNF α , IL-6 dan CCL2. Sekresi sitokin pro-inflamasi yang berlebihan berpengaruh pada keparahan gejala klinis yang ditimbulkan oleh virus HPAI antara lain menyebabkan peradangan pada paru-paru (Salomon et al. 2007).

Ekspresi sitokin TNF α ditemukan dalam jumlah besar pada 3-5 hari pasca-infeksi virus LPAI atau HPAI, tetapi ekspresi sitokin menurun pada lebih dari lima hari pasca-infeksi virus HPAI sehingga ekspresi TNF α berkontribusi terhadap patogenisitas yang ditimbulkan virus HPAI pada awal infeksi (Tumpey et al. 2000). *Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis-Inducing Ligand* (TRAIL) dikarakterisasi menjadi *Death Receptor Ligands* (DRLs), TNF α dan Fas ligand (FasL). *Death Receptor* dan ligannya berperan penting dalam respon kekebalan bawaan dan dapatan melawan patogen dengan mengatur kematian dan survival sel. Induksi ekspresi mRNA TNF α dan TRAIL tergantung pada replikasi virus. Infeksi virus AI sub tipe H5N1 meningkatkan kepekaan sel T terhadap apoptosis yang diinduksi oleh TNF α , TRAIL dan FasL. *Related Apoptosis-Inducing Ligand* yang dihasilkan oleh sel makrofag yang diinfeksi virus HPAI bersifat sitotoksik dan kekekaannya tinggi terhadap apoptosis yang diinduksi oleh DRL sehingga TRAIL berkontribusi pada patogenisitas yang ditimbulkan oleh infeksi virus HPAI (Zhou et al. 2006).

UP-REGULATED DAN DOWN-REGULATED CYTOKINE

Fenotipe *up-regulated* dan *down-regulated* IFN dipengaruhi oleh karakter virus AI dan protein penyusunnya (Lipatov et al. 2005). *Up-regulated* dan *down-regulated* sitokin yang disebabkan oleh infeksi virus diperantarai oleh PRRs seperti TLR dan RIG 1 *like receptors* (MDA5 dan RIG 1). Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa virus HPAI bereplikasi dengan cepat dan titer yang tinggi pada unggas (Suzuki et al. 2009). Selain replikasi virus, ekspresi sitokin yang berlebihan (*up-regulated*) selama infeksi virus HPAI juga berkontribusi terhadap kematian (Karpala et al. 2011a; Moulin et al. 2011). Gangguan respon kekebalan yang disebabkan oleh virus HPAI merupakan salah satu faktor yang berkontribusi dalam patogenisitas virus HPAI (Tumpey et al. 2000). Respon sitokin pro-inflamasi yang berlebihan menyebabkan respon kekebalan yang diperantarai sel menjadi terganggu dan berkontribusi dalam meningkatkan patogenisitas virus HPAI (Cornelissen et al. 2013). *Down-regulated cytokine* juga menyebabkan gangguan respon kekebalan dalam melawan infeksi virus AI (Schmitz et al. 2005).

Up-regulated cytokine

Virus AI dapat dideteksi pada *dendritic cell* (DCs) paru-paru, yang berperan penting sebagai penghubung antara sistem kekebalan bawaan dan dapatan yang berfungsi untuk membunuh virus. Infeksi virus AI pada

DC akan menginduksi pematangan dan aktivasi DCs yang kemudian menimbulkan respon kekebalan bawaan dan didapat dalam melawan virus AI. Virus AI dapat menginduksi mediator antivirus terutama IFN tipe I yang pertama kali berfungsi untuk membatasi replikasi virus AI. Sekresi sitokin inflamasi seperti IL-6 dan TNF α yang berkontribusi untuk rekrutmen DCs dan sel inflamasi lainnya menuju ke arah bagian infeksi serta melakukan *up-regulation* MHC II, CD40, CD83, CD86, CCR7 yang sangat diperlukan untuk migrasi DCs serta menstimulasi perkembangan sel T dan B naïve (Thitithanyanont et al. 2007).

Dendritic cell berkontribusi pada terjadinya sekresi sitokin yang berlebihan yang menyebabkan gejala klinis yang parah (de Jong et al. 2006). Infeksi virus *reassortant* (avian H5N1 dan H1N1) meningkatkan aktivasi *porcine* GM-CSF-induced DCs sehingga menyebabkan respon *up-regulated* IFN tipe 1, MHC II dan NF-kB. Aktivasi DCs yang meningkat mempunyai kerugian atau keuntungan. Stimulasi respon kekebalan bawaan yang berlebihan menyebabkan kerusakan jaringan yang parah atau terganggunya respon kekebalan tubuh dalam melawan infeksi virus AI *reassortant* yang mengandung gen PB2 (Ocaña-Macchi et al. 2012). Subset DC berdasarkan fungsinya dibedakan menjadi dua yaitu *conventional dendritic cell* (cDC) dan *plasmacytoid dendritic cell* (pDC). *Plasmacytoid dendritic cell* merupakan tipe sel yang spesifik untuk memproduksi IFN. Subset DC mempunyai karakter fenotipe yang sama pada beberapa mamalia seperti kambing, mencit dan manusia (Contreras et al. 2010). Frekuensi pDC yang meningkat pada jaringan limfoid mamalia diasumsikan mempunyai pola yang sama pada sistem kekebalan ayam dalam menimbulkan respon kekebalan sistemik. *Plasmacytoid dendritic cell-like leukocytes* dalam sistem kekebalan ayam menyebabkan respon *up-regulated* IFN selama infeksi virus HPAI subtype H5N1. Beberapa organ seperti paru-paru, plasma dan limpa yang terinfeksi virus HPAI mensekresikan IFN dengan titer tinggi (*up-regulated* IFN) (Moulin et al. 2011).

Eksresi gen sitokin ditemukan pada berbagai organ ayam yang terinfeksi virus HPAI subtype H5N1 sehingga ekspresi ini mengindikasikan respon kekebalan tubuh dalam melawan infeksi. Virus HPAI subtype H5N1 menyebabkan *up-regulated* sitokin IL-12 dan IFN γ yang berhubungan T helper 1 (Th1) pada organ ayam (Karpala et al. 2011a). Virus LPAI menimbulkan respon sitokin pro-inflamasi seperti IL1 β , IL 6 dan IFN yang berbeda pada berbagai spesies. Infeksi virus LPAI subtype H11N9 menyebabkan *up-regulated* IL1 β dan IL 6 pada *peripheral blood mononuclear cells* (PBMC) ayam dan mamalia tetapi tidak menstimulasi sekresi sitokin tersebut pada PBMC itik. Ekspresi IFN γ lebih tinggi pada PBMC ayam daripada itik, tetapi ekspresi

IL2 lebih tinggi pada PBMC itik daripada ayam. Interferon α diekspresikan dengan titer yang sama pada PBMC ayam dan itik (Adam et al. 2009).

Namun demikian, hasil penelitian lain menunjukkan bahwa ayam yang diinfeksi virus AI mengalami *up-regulated* IFN β dan IFN γ . *Up-regulated* IFN menyebabkan titer virus AI menjadi rendah dan periode shedding virus menjadi singkat (Lipatov et al. 2005). Barber et al. (2010) melaporkan ayam yang tidak memiliki reseptor RIG1 mengalami gejala klinis yang sangat parah disebabkan oleh infeksi virus HPAI, tetapi Karpala et al. (2011b) melaporkan *up-regulated* reseptor MDA 5 selama infeksi virus HPAI pada ayam. Molekul reseptor MDA 5 dapat berfungsi sebagai pengganti RIG1 dalam memulai respon kekebalan melawan infeksi virus HPAI pada ayam (Liniger et al. 2012). Molekul TLR7 dan MHC I ditemukan pada ayam, itik dan mamalia, tetapi MHC II hanya ditemukan pada itik dengan titer yang sangat kecil. Ekspresi beberapa sitokin juga dipengaruhi oleh masa inkubasi virus. Virus LPAI menginduksi IL-2 ayam dengan titer sangat tinggi (*up-regulated*) pada awal infeksi (Adam et al. 2009). Infeksi virus HPAI menyebabkan *up-regulated* sitokin pro-inflamasi seperti IFN β , IFN γ , TLR3 dan MDA 5 pada ayam setelah satu hari infeksi, tetapi infeksi virus menyebabkan *down-regulated* sitokin IL-6, IL1 β , iNOS yang diikuti dengan hambatan aktivasi respon TLR7, RIG 1, MDA 5 dan IFN γ pada itik setelah delapan jam infeksi (Cornelissen et al. 2013).

Down-regulated cytokine

Beberapa organ seperti paru-paru, plasma dan limpa yang terinfeksi virus LPAI hanya mensekresikan IFN dalam jumlah kecil (*down-regulated* IFN) (Moulin et al. 2011). Virus LPAI hanya menginduksi IL-2 itik dengan titer yang rendah (*down-regulated*) pada akhir infeksi (Adam et al. 2009). Infeksi virus LPAI subtype H11N9 menyebabkan *down-regulated* IFN β pada PBMC itik (Adam et al. 2009). Noah et al. (2003) juga melaporkan bahwa ekspresi IFN- β diidentifikasi lebih tinggi pada ayam daripada itik, tetapi IFN γ diekspresikan dengan titer yang sama pada kedua spesies tersebut. *Down-regulated* IFN β itik disebabkan oleh adanya ekspresi NS1A yaitu suatu imunomodulator yang dikode virus AI yang akan menekan ekspresi IFN β pada sel epitel (Noah et al. 2003).

Down-regulated IFN berhubungan dengan titer virus AI yang tinggi dan masa *shedding* virus lebih lama (Lipatov et al. 2005). Mekanisme respon *down-regulated* IFN tipe 1 pada sel epitel saluran pernafasan yang terinfeksi virus HPAI subtype H5 dan H7 diduga sebagai salah satu faktor penyebab patogenisitas virus HPAI karena *down-regulated* IFN tipe 1 dapat

menghambat respon kekebalan tubuh sehingga virus HPAI dapat bereplikasi dengan cepat di sel saluran pernafasan (Kobasa et al. 2007). *Down-regulated* IL1 β berkontribusi dalam menimbulkan keparahan gejala klinis karena IL-1 menginduksi respon kekebalan bawaan melalui aktivasi sel limfosit T CD4 di organ limfoid sekunder kemudian bermigrasi ke paru-paru yang terinfeksi virus HPAI. Interleukin 1 berikatan dengan reseptor IL-1R1 untuk memulai aktivitasnya, lalu memicu peradangan akut pada paru-paru inang (Schmitz et al. 2005).

Virus HPAI sub tipe H5N1 menurunkan jumlah limfosit CD4 dan CD8 melalui apoptosis sehingga menyebabkan *down-regulated* IFN γ , IL1 β dan protein makrofag pro-inflamasi. *Lymphopenia* merupakan gejala yang sering ditemukan akibat infeksi virus HPAI sub tipe H5N1. *Lymphopenia* merupakan abnormalitas sel limfosit dan leukosit dengan jumlah yang sangat kecil dalam darah. Virus HPAI sub tipe H5N1 menyebabkan apoptosis sel epitel alveolar. Kerusakan sel epitel alveolar menyebabkan peradangan paru-paru serta apoptosis leukosit. Penurunan jumlah sel limfosit dan leukosit sebagai akibat apoptosis merupakan mekanisme yang berkontribusi dalam patogenisitas virus HPAI sub tipe H5N1 (Uprasertkul et al. 2007). Virus HPAI menyebabkan *down-regulated cytokine intracytoplasmic factor* GATA 3 (Karpala et al. 2011a).

KESIMPULAN

Sitokin (interleukin, *chemokine*, CSF dan TNF) adalah mediator penting dalam kekebalan tubuh yang bertanggung jawab untuk memulai, memperbanyak dan mengatur peradangan dalam melawan infeksi virus AI. Interferon berfungsi untuk regulasi kekebalan bawaan, aktivasi komponen antivirus dan efek proliferasi. Interleukins berperan sebagai stimulator perkembangan dan diferensiasi leukosit serta pro-inflamasi. *Chemokines* berfungsi untuk mengontrol kemotaksis, rekrutmen leukosit dan pro-inflamasi. *Colony Stimulating Factor* berperan sebagai stimulator hematopoietik, proliferasi dan diferensiasi sel progenitor. *Tumour Necrosis Factors* berfungsi untuk pro-inflamasi dan aktivasi sel limfosit T sitotoksik. Virus AI dapat menyebabkan *up-regulated* dan *down-regulated cytokine*. *Up-regulated* dan *down-regulated* sitokin dipengaruhi oleh karakter virus AI dan protein penyusunnya serta spesies inang dan menyebabkan gangguan respon kekebalan yang diperantarai sel sehingga berkontribusi untuk meningkatkan patogenisitas virus AI.

DAFTAR PUSTAKA

Adam SC, Xing Z, Li J, Cardona CJ. 2009. Immune-related gene expression in response to H1N1 low

pathogenic avian influenza virus infection in chicken and Pekin duck peripheral blood mononuclear cells. *Mol Immunol*. 46:1744-1749.

Akira S, Hoshino K, Kaisho T. 2000. The role of Toll-like Receptors and MyD88 in innate immune responses. *J Endotoxin Res*. 6:383-387.

Avery S, Rothwell L, Degen WD, Schijns VE, Young J, Kaufman J, Kaiser P. 2004. Characterization of the first nonmammalian T2 cytokine gene cluster: The cluster contains functional single-copy genes for IL-3, IL-4, IL-13, and GM-CSF, a gene for IL-5 that appears to be a pseudogene, and a gene encoding another cytokine like transcript. *J Interf Cytokine Res*. 24:600-610.

Baek Y-S, Haas S, Hackstein H, Bein G, Hernandez-Santana M, Lehrach H, Sauer H, Seitz H. 2009. Identification of novel transcriptional regulators involved in macrophage differentiation and activation in U937 cells. *BMC Immunol*. 10:10-18.

Barber MR, Aldridge JRJ, Webster RG, Magor KE. 2010. Association of RIG-I with innate immunity of ducks to influenza. *Proc Natl Acad Sci*. 107:5913-5918.

Barkhausen T, Tschernig T, Rosenstiel P, VanGriensven M, Vonberg RP, Dorsch M, Mueller-Heine A, Chalaris A, Scheller J, Rose-John S, et al. 2011. Selective blockade of interleukin-6 trans-signaling improves survival in murine polymicrobial sepsis model. *Crit Care Med*. 39:1407-1413.

Ben-sasson SZ, Hu-Li J, Quiel J, Cauchetaux S, Ratner M, Shapira I, Dinarello CA, Paul WE. 2009. IL-1 acts directly on CD4 T cells to enhance their antigen-driven expansion and differentiation. *Proc Natl Acad Sci*. 106:7119-24.

Bernabei P, Coccia EM, Rigamonti L, Bosticardo M, Forni G, Pestka S, Krause CD, Battistini A, Novelli F. 2001. Interferon- γ receptor 2 expression as the deciding factor in human T, B, and myeloid cell proliferation or death. *J Leukoc Biol*. 70:950-960.

Boldajipour B, Mahabaleshwar H, Kardash E, Reichman-Fried M, Blaser H, Minina S, Wilson D, Xu Q, Raz E. 2008. Control of Chemokine-guided cell migration by ligand sequestration. *Cell*. 132:463-473.

Brierley MM, Fish EN. 2005. Stats: Multifaceted regulators of transcription. *J Interf Cytokine Res*. 25:733-744.

Brocker C, Thompson D, Matsumoto A, Nebert DW, Vasiliou V. 2010. Evolutionary divergence and functions of the human interleukin (IL) gene family. *Hum Genomics*. 5:30-55.

Bryson KJ, Wei XQ, Alexander J. 2008. Interleukin-18 enhances a Th2 biased response and susceptibility to *Leishmania mexicana* in BALB/c mice. *Microbes Infect*. 10:834-839.

Carmi Y, Voronov E, Dotan S, Lahat N, Rahat MA, Fogel M, Huszar M, White MR, Dinarello CA, Apte RN. 2009. The role of macrophage-derived IL-1 in induction and maintenance of angiogenesis. *J Immunol*. 183:4705-4714.

- Carrillo JJ, Pediani J, Milligan G. 2003. Dimers of class A G protein-coupled receptors function via agonist-mediated trans-activation of associated G proteins. *J Biol Chem.* 278:42578-42587.
- Contreras V, Urien C, Guiton R, Alexandre Y, Vu Manh T-P, Andrieu T, Crozat K, Jouneau L, Bertho N, Epardaud M, et al. 2010. Existence of CD8 α -like dendritic cells with a conserved functional specialization and a common molecular signature in distant mammalian species. *J Immunol.* 185:3313-3325.
- Cornelissen JBWJ, Vervelde L, Post J, Rebel MJM. 2013. Differences in highly pathogenic avian influenza viral pathogenesis and associated early inflammatory response in chickens and ducks. *Avian Pathol.* 42:347-64.
- de Jong MD, Simmons CP, Thanh TT, Hien VM, Smith GJD, Chau TNB, Hoang DM, Chau NVV, Khanh TH, Dong VC, et al. 2006. Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. *Nat Med.* 12:1203-1207.
- Dharmayanti NLPI, Rillah UD, Syamsiah F, Indriani R. 2014. Ekspresi sitokin *Tumor Necrosis Factor* (TNF- α) dan interferon (IFN- γ) pada sel MDCK yang diinfeksi virus *Avian Influenza* sub tipe H5N1 asal Indonesia. *J Biol Indonesia.* 10:47-54.
- Dinareello C a. 2005. Blocking IL-1 in systemic inflammation. *J Exp Med.* 201:1355-1359.
- Ellis T, Bousfield R, Bissett L, Dyrting K, Luk G, Tsim ST, Sturm-Ramirez K, Webster RG, Guan Y, Peiris JSM. 2004. Investigation of outbreaks of highly pathogenic H5N1 avian influenza in waterfowl and wild birds in Hong Kong in late 2002. *Avian Pathol.* 33:492-505.
- Freire-de-Lima CG, Yi QX, Gardai SJ, Bratton DL, Schiemann WP, Henson PM. 2006. Apoptotic cells, through transforming growth factor- β , coordinately induce anti-inflammatory and suppress pro-inflammatory eicosanoid and NO synthesis in murine macrophages. *J Biol Chem.* 281:38376-38384.
- Goodbourn S, Didcock L, Randall RE. 2000. Interferons: Cell signalling, immune modulation, antiviral responses and virus countermeasures. *J Gen Virol.* 81:2341-2364.
- Gotoh B, Takeuchi K, Komatsu T, Yokoo J. 2003. The STAT2 activation process is a crucial target of Sendai virus C protein for the blockade of alpha interferon signaling. *J Virol.* 77:3360-3370.
- Guarda G, Braun M, Staehli F, Tardivel A, Mattmann C, Förster I, Farlik M, Decker T, Du Pasquier RA, Romero P, Tschopp J. 2011. Type I interferon inhibits interleukin-1 production and inflammasome activation. *Immunity.* 34:213-223.
- Gupta SK, Deb R, Dey S, Chellappa MM. 2014. Toll-like receptor-based adjuvants: Enhancing the immune response to vaccines against infectious diseases of chicken. *Expert Rev Vaccines.* 13:909-925.
- Hayashi T, Hiromoto Y, Chaichoune K, Patchimasiri T, Chakritbudsabong W, Prayoonwong N, Chaisilp N, Wiriyarat W, Parchariyanon S, Ratanakorn P, et al. 2011. Host cytokine responses of pigeons infected with highly pathogenic Thai Avian Influenza viruses of subtype H5N1 isolated from wild birds. *PLoS One.* 6:e23103.
- Hurst SM, Wilkinson TS, McLoughlin RM, Jones S, Horiuchi S, Yamamoto N, Rose-John S, Fuller GM, Topley N, Jones SA. 2001. IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. *Immunity.* 14:705-714.
- Iqbal M, Philbin VJ, Smith AL. 2005. Expression patterns of chicken Toll-like receptor mRNA in tissues, immune cell subsets and cell lines. *Vet Immunol Immunopathol.* 104:117-127.
- Irvine KM, Burns CJ, Wilks AF, Su S, Hume DA, Sweet MJ. 2006. A CSF-1 receptor kinase inhibitor targets effector functions and inhibits pro-inflammatory cytokine production from murine macrophage populations. *FASEB J.* 20:1921-1923.
- Ishida Y, Gao J-L, Murphy PM. 2008. Chemokine receptor CX3CR1 mediates skin wound healing by promoting macrophage and fibroblast accumulation and function. *J Immunol.* 180:569-579.
- Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR. 2006. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+T helper cells. *Cell.* 126:1121-1133.
- Iwakiri S, Mino N, Takahashi T, Sonobe M, Nagai S, Okubo K, Wada H, Date H, Miyahara R. 2009. Higher expression of chemokine receptor CXCR7 is linked to early and metastatic recurrence in pathological stage I nonsmall cell lung cancer. *Cancer.* 115:2580-2593.
- Iwasaki A, Medzhitov R. 2010. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science.* 327:291-295.
- Jiao PR, Wei LM, Cheng YQ, Yuan RY, Han F, Liang J, Liu WL, Ren T, Xin CA, Liao M. 2012. Molecular cloning, characterization, and expression analysis of the Muscovy duck Toll-like receptor 3 (MdTLR3) gene. *Poult Sci.* 91:2475-2481.
- Jie H, Lian L, Qu LJ, Zheng JX, Hou ZC, Xu GY, Song JZ, Yang N. 2013. Differential expression of Toll-like receptor genes in lymphoid tissues between Marek's disease virus-infected and noninfected chickens. *Poult Sci.* 92:645-654.
- Kanneganti TD, Lamkanfi M, Nunez G. 2007. Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. *Immunity.* 27:549-559.
- Karpala AJ, Bingham J, Schat KA, Chen LM, Donis RO, Lowenthal JW, Bean AGD. 2011a. Highly pathogenic (H5N1) avian influenza induces an inflammatory T

- helper type 1 cytokine response in the chicken. *J Interferon Cytokine Res.* 31:393-400.
- Karpala AJ, Stewart C, McKay J, Lowenthal JW, Bean AG. 2011b. Characterization of chicken Mda5 activity: regulation of IFN-beta in the absence of RIG-I functionality. *J Immunol.* 186:5397-5405.
- Kato H, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Uematsu S, Matsui K, Tsujimura T, Takeda K, Fujita T, Takeuchi O, Akira S. 2005. Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity.* 23:19-28.
- Katsoulidis E, Li Y, Mears H, Platanias LC. 2005. The p38 mitogenactivated protein kinase pathway in interferon signal transduction. *J Interf Cytokine Res.* 25:749-756.
- Kawai T, Sato S, Ishii KJ, Coban C, Hemmi H, Yamamoto M, Terai K, Matsuda M, Inoue J, Uematsu S, Takeuchi O, Akira S. 2004. Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nat Immunol.* 5:1061-1068.
- Keeley EC, Mehrad B, Strieter RM. 2008. Chemokines as mediators of neovascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 28:1928-1936.
- Kobasa D, Jones SM, Shinya K, Kash JC, Copps J, Ebihara H, Hatta Y, Kim JH, Halfmann P, Hatta M, et al. 2007. Aberrant innate immune response in lethal infection of macaques with the 1918 influenza virus. *Nature.* 445:319-323.
- Kogut MH, Swaggerty C, He H, Pevzner I, Kaiser P. 2006. Toll-like receptor agonists stimulate differential functional activation and cytokine and chemokine gene expression in heterophils isolated from chickens with differential innate responses. *Microbes Infect.* 8:1866-1874.
- Krishnamurthy S, Takimoto T, Scroggs RA, Portner A. 2006. Differentially regulated interferon response determines the outcome of Newcastle disease virus infection in normal and tumor cell lines. *J Virol.* 80:5145-5155.
- Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny M V, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, et al. 2009. Classification of cell death. *Cell Death Differ.* 16:3-11.
- Lacey DC, Achuthan A, Fleetwood AJ, Dinh H, Roiniotis J, Scholz GM, Chang MW, Beckman SK, Cook AD, Hamilton JA. 2012. Defining GM-CSF and macrophage-CSF-dependent macrophage responses by *in vitro* models. *J Immunol.* 188:5752-5765.
- Lee JK, Kim SH, Lewis EC, Azam T, Reznikov LL, Dinarello CA. 2004. Differences in signaling pathways by IL-1 β and IL-18. *Proc Natl Acad Sci.* 101:8815-8820.
- Leyva L, Fernández O, Fedetz M, Blanco E, Fernández VE, Oliver B, León A, Pinto-Medel MJ, Mayorga C, Guerrero M, et al. 2005. IFNAR1 and IFNAR2 polymorphisms confer susceptibility to multiple sclerosis but not to interferon-beta treatment response. *J Neuroimmunol.* 163:165-171.
- Li QJ, Lu S, Ye RD, Martins-Green M. 2000. Isolation and characterization of a new chemokine receptor gene, the putative chicken CXCR1. *Gene.* 257:307-317.
- Li S, Min JY, Krug RM, Sen GC. 2006. Binding of the influenza A virus NS1 protein to PKR mediates the inhibition of its activation by either PACT or double-stranded RNA. *Virology.* 349:13-21.
- Li Z, Jiang Y, Jiao P, Wang A, Zhao F, Tian G, Wang X, Yu K, Bu Z, Chen H. 2006. The NS1 gene contributes to the virulence of H5N1 avian influenza viruses. *J Virol.* 80:11115-11123.
- Liniger M, Summerfield A, Zimmer G, McCullough KC, Ruggli N. 2012. Chicken cells sense influenza A virus infection through MDA5 and CARDIF signaling involving LGP2. *J Virol.* 86:705-717.
- Lipatov AS, Andreansky S, Webby RJ, Hulse DJ, Reh JE, Krauss S, Perez DR, Doherty PC, Webster RG, Sangster MY. 2005. Pathogenesis of Hong Kong H5N1 influenza virus NS gene reassortants in mice: the role of cytokines and B and T-cell responses. *J Gen Virol.* 86:1121-1130.
- Liu L, Botos I, Wang Y, Leonard JN, Shiloach J, Segal DM, Davies DR. 2008. Structural basis of toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA. *Science.* 320:379-381.
- Manderson AP, Kay JG, Hammond LA, Brown DL, Stow JL. 2007. Sub-compartments of the macrophage recycling endosome direct the differential secretion of IL-6 and TNFalpha. *J Cell Biol.* 178:57-69.
- Mibayashi M, Martinez-Sobrido L, Loo YM, Cardenas WB, Gale MJ, Garcia-Sastre A. 2007. Inhibition of retinoic acid-inducible gene I-mediated induction of beta interferon by the NS1 protein of influenza A virus. *J Virol.* 81:514-524.
- Min JY, Krug RM. 2006. The primary function of RNA binding by the influenza A virus NS1 protein in infected cells: Inhibiting the 29-59 oligo (A) synthetase/RNase L pathway. *Proc Natl Acad Sci.* 103:7100-7105.
- Min JY, Li S, Sen GC, Krug RM. 2007. A site on the influenza A virus NS1 protein mediates both inhibition of PKR activation and temporal regulation of viral RNA synthesis. *Virology.* 236:236-243.
- Mordstein M, Kochs G, Dumoutier L, Renauld JC, Paludan SR, Klucher K, Staeheli P. 2008. Interferon- λ contributes to innate immunity of mice against influenza A virus but not against hepatotropic viruses. *PLoS Pathog.* 4:1-7.
- Moulin HR, Liniger M, Python S, Guzylack-Piriou L, Ocàa-Macchi M, Ruggli N, Summerfield A. 2011. High interferon type I responses in the lung, plasma and spleen during highly pathogenic H5N1 infection of chicken. *Vet Res.* 42:6-12.

- Noah DL, Twu KY, Krug RM. 2003. Cellular antiviral responses against influenza A virus are countered at the posttranscriptional level by the viral NS1A protein via its binding to a cellular protein required for the 3' end processing of cellular pre-mRNAs. *Virology*. 307:386-395.
- Ocaña-Macchi M, Ricklin ME, Python S, Monika GA, Stech J, Stech O, Summerfield A. 2012. Avian influenza A virus PB2 promotes interferon type I inducing properties of a swine strain in porcine dendritic cells. *Virology*. 427:1-9.
- Parham C, Chirica M, Timans J, Vaisberg E, Travis M, Cheung J, Pflanz S, Zhang R, Singh KP, Vega F, et al. 2002. A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *J Immunol*. 168:5699-5708.
- Paul MS, Barjesteh N, Paolucci S, Pei Y, Sharif S. 2012. Toll-like receptor ligands induce the expression of interferon-gamma and interleukin-17 in chicken CD4⁺T cells. *BMC Res Notes*. 5:616.
- Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, Naslund TI, Liljestrom P, Weber F, Reis e Sousa C. 2006. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science*. 314:997-1001.
- Ramasamy KT, Reddy MR, Verma PC, Murugesan S. 2012. Expression analysis of turkey (*Meleagris gallopavo*) Toll-like receptors and molecular characterization of avian specific TLR15. *Mol Biol Rep*. 39:8539-8549.
- Ravikumar B, Futter M, Jahreiss L, Korolchuk VI, Lichtenberg M, Luo S, Massey DC, Menzies FM, Narayanan U, Renna M, Jimenez-Sanchez, M Sarkar S, Underwood B, Winslow A RD. 2009. Mammalian macro autophagy at a glance. *J Cell Sci*. 122:1707-1711.
- Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF. 1998. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* toll. *Proc Natl Acad Sci*. 95:588-593.
- Ruan W, Wu Y, Zheng SJ. 2012. Different genetic patterns in avian Toll-like receptor (TLR)5 genes. *Mol Biol Rep*. 39:3419-3426.
- Salomon R, Hoffmann E, Webster RG. 2007. Inhibition of the cytokine response does not protect against lethal H5N1 influenza infection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 104:12479-12481.
- Samanta M, Iwakiri D, Kanda T, Imaizumi T, Takada K. 2006. EB virus-encoded RNAs are recognized by RIG-I and activate signaling to induce type I IFN. *EMBO J*. 25:4207-4214.
- Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. 2011. The pro and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 1813:878-888.
- Schmitz N, Kurrer M, Bachmann MF, Kopf M. 2005. Interleukin-1 is responsible for acute lung immunopathology but increases survival of respiratory influenza virus infection. *J Virol*. 79:6441-6448.
- Shini S, Shini A, Kaiser P. 2010. Cytokine and chemokine gene expression profiles in heterophils from chickens treated with corticosterone. *Stress*. 13:185-194.
- Sturm-Ramirez KM, Ellis T, Bousfield B, Bissett L, Dyrting K, Rehg JE, Poon L, Guan Y, Peiris M, Webster RG. 2004. Reemerging H5N1 influenza viruses in Hong Kong in 2002 are highly pathogenic to ducks. *J Virol*. 78:4892-4901.
- Suzuki K, Okada H, Itoh T, Tada T, Mase M, Nakamura K, Kubo M, Tsukamoto K. 2009. Association of increased pathogenicity of Asian H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses in chickens with highly efficient viral replication accompanied by early destruction of innate immune responses. *J Virol*. 83:7475-7486.
- Temperley ND, Berlin S, Paton IR, Griffin DK, Burt DW. 2008. Evolution of the chicken Toll-like receptor gene family: A story of gene gain and gene loss. *BMC Genomics*. 9:62.
- Thitithanyanont A, Engering A, Ekchariyawat P, Wiboon-Ut S, Limsalakpetch A, Yongvanitchit K, Kum-Arb U, Kanchongkittiphon W, Utaisincharoen P, Sirisinha S, et al. 2007. High susceptibility of human dendritic cells to avian influenza H5N1 virus infection and protection by IFN-alpha and TLR ligands. *J Immunol*. 179:5220-5227.
- Timmermans K, Plantinga TS, Kox M, Vaneker M, Scheffer GJ, Adema GJ, Joosten LAB, Netea MG. 2013. Blueprints of signaling interactions between pattern recognition receptors: Implications for the design of vaccine adjuvants. *Clin Vaccine Immunol*. 20:427-432.
- Tisoncik JR, Korth MJ, Simmons CP, Farrar J, Martin TR, Katze MG. 2012. Into the eye of the cytokine storm. *Microbiol Mol Biol Rev*. 76:16-32.
- Tumpey T, Lu X, Morken T, Zaki S, Katz J. 2000. Depletion of lymphocytes and diminished cytokine production in mice infected with a highly virulent influenza A (H5N1) virus isolated from humans. *J Virol*. 74:6105-6116.
- Ueda M, Daidoji T, Du A, Yang CS, Ibrahim MS, Ikuta K, Nakaya T. 2010. Highly pathogenic H5N1 avian influenza virus induces extracellular Ca²⁺ influx, leading to apoptosis in avian cells. *J Virol*. 84:3068-3078.
- Uprasertkul M, Kitphati R, Puthavathana P, Kriwong R, Kongchanagul A, Ungchusak K, Angkasekwinai S, Chokephaibulkit K, Srisook K, Vanprapar N, Auewarakul P. 2007. Apoptosis and pathogenesis of avian influenza A (H5N1) virus in humans. *Emerg Infect Dis*. 13:708-712.
- Vasconcellos R, Carter NA, Rosser EC, Mauri C. 2011. IL-12p35 subunit contributes to autoimmunity by

- limiting IL-27-driven regulatory responses. *J Immunol.* 187:3402-3412.
- Wasilenko JL, Sarmiento L, Pantin-Jackwood MJ. 2009. A single substitution in amino acid 184 of the NP protein alters the replication and pathogenicity of H5N1 avian influenza viruses in chickens. *Arch Virol.* 154:969-979.
- de Weerd NA, Samarajiwa SA, Hertzog PJ. 2007. Type I interferon receptors: Biochemistry and biological functions. *J Biol Chem.* 282:20053-20057.
- Wei L, Jiao P, Yuan R, Song Y, Cui P, Guo X, Zheng B, Jia W, Qi W, Ren T, Liao M. 2013. Goose Toll-like receptor 7 (TLR7), myeloid differentiation factor 88 (MyD88) and antiviral molecules involved in anti-H5N1 highly pathogenic avian influenza virus response. *Vet Immunol Immunopathol.* 153:99-106.
- Xu X, Subbarao K, Cox NJ, Guo Y. 1999. Genetic characterization of the pathogenic influenza A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1) virus: Similarity of its hemagglutinin gene to those of H5N1 viruses from the 1997 outbreaks in Hong Kong. *Virology.* 261:15-19.
- Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Akira S, Fujita T. 2004. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol.* 5:730-737.
- Zhou J, Law HK, Cheung CY, Ng IH, Peiris JS, Lau YL. 2006. Functional tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand production by avian influenza virus-infected macrophages. *J Infect Dis.* 193:945-953.
- Zhou Z, Hamming OJ, Ank N, Paludan SR, Nielsen AL, Hartmann R. 2007. Type III interferon (IFN) induces a type I IFN-like response in a restricted subset of cells through signaling pathways involving both the Jak-STAT pathway and the mitogen-activated protein kinases. *J Virol.* 81:7749-7758.
- Zhu H, Butera M, Nelson DR, Liu C. 2005. Novel type I interferon IL-28A suppresses hepatitis C viral RNA replication. *Virol J.* 2:80.
- Zhu Q, Yang H, Chen W, Cao W, Zhong G, Jiao P, Deng G, Yu K, Yang C, Bu Z, et al. 2008. A naturally occurring deletion in its NS gene contributes to the attenuation of an H5N1 swine influenza virus in chickens. *J Virol.* 82:220-228.

Peranan *Point-of-Care Test* dalam Pengendalian *Highly Pathogenic Avian Influenza* di Indonesia

(The Role of *Point-of-Care Test* to Control *Highly Pathogenic Avian Influenza* in Indonesia)

Simson Tarigan

Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl. RE Martadinata No. 30, Bogor 16114
simsont@me.com

(Diterima 11 Mei 2015 – Direvisi 16 Februari 2016 – Disetujui 8 Maret 2016)

ABSTRACT

Rapid diagnosis followed by stamping out protocol has proven to be the most effective means of eradicating Highly Pathogenic Avian Influenza (HPAI) H5N1. The standard of AI tests are PCR and virus isolation, however their results often take times to initiate rapid eradication protocol. For that reason, a point-of-care (POC) test which is a rapid test used at the location of outbreak (where mortality and morbidity of poultry occur), to help field officer for identification of AI. This paper describes several techniques for detection of HPAI H5N1 virus, POC test and principal mechanism of lateral flow immunoassay which has been generally used in POC test. At present, POC test for HPAI H5N1 rather low sensitivity and expensive, therefore, further research is needed to improve its sensitivity of the tool.

Key words: H5N1, point-of-care test, lateral flow immunoassay

ABSTRAK

Penanggulangan *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) yang paling efektif adalah mendeteksi keberadaan penyakit dengan cepat diikuti dengan tindakan pemusnahan unggas tertular atau tersangka. Hasil uji standar AI, PCR dan isolasi virus, sering memakan waktu relatif lama untuk memulai langkah pemberantasan cepat. Oleh karena itu, uji *point-of-care* (POC) yang merupakan tes cepat dapat digunakan di lokasi wabah, dimana mortalitas dan morbiditas unggas sudah terjadi untuk membantu petugas lapang mengidentifikasi AI. Makalah ini menguraikan beberapa teknik untuk mendeteksi virus HPAI H5N1, uji diagnostik POC dan prinsip kerja *lateral flow immunoassay* yang banyak dipakai untuk uji POC. Saat ini, sensitivitas uji POC HPAI H5N1 masih kurang baik dan harganya mahal. Oleh karena itu, diperlukan penelitian lebih jauh untuk meningkatkan sensitivitas alat uji.

Kata kunci: H5N1, *point-of-care test*, *lateral flow immunoassay*

PENDAHULUAN

Pada akhir tahun 2003 masyarakat dunia dikejutkan dengan kemunculan penyakit *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) H5N1 yang menimbulkan kerugian sangat besar karena menyebabkan kematian jutaan ekor unggas dan ketakutan karena dapat menular pada manusia dengan *case fatality rate* yang tinggi (Sims et al. 2005). Dalam waktu singkat 63 negara tertular penyakit tersebut tetapi sebagian besar berhasil memberantasnya dan menjaga negara tersebut tetap bebas penyakit hingga sekarang (FAO 2013). Kunci keberhasilan tersebut terletak pada deteksi penyakit dengan cepat diikuti pemusnahan semua unggas yang tertular atau dicurigai tertular dan memonitor penularan lanjutan. Semua tindakan diatas membutuhkan keterampilan dalam mengenali penyakit dengan cepat dan akurat, serta

ditentukan oleh ketersediaan alat diagnosis yang dapat memberikan hasil dengan cepat dan akurat. Tulisan ini membahas penyebaran penyakit HPAI H5N1 akibat kegagalan diagnosis dan tindakan penanggulangan cepat dimulai dari awal munculnya di Provinsi Guangdong Tiongkok dan pada awal munculnya di Indonesia. Pembahasan didominasi oleh alat diagnosis terutama yang dapat dilakukan di tempat kejadian penyakit secara cepat.

PEMUNCULAN DAN PENYEBARAN VIRUS HPAI SUBTIPE H5N1

Virus penyebab panzootik HPAI H5N1 berasal dari Provinsi Guangdong Tiongkok. Penampakan pertama virus ini berupa wabah penyakit pada peternakan angsa di Provinsi Guangdong, Tiongkok

Selatan pada tahun 1996 dengan gejala perdarahan, gangguan saraf dan kematian sekitar 40% pada peternakan yang tertular. Virus influenza sub tipe H5N1 belum pernah diisolasi di daerah tersebut sebelumnya (Wan 2012; Guan & Smith 2013). Asal mula virus tersebut tidak diketahui dengan pasti tetapi diduga dari suatu galur *Low Pathogenic Avian Influenza* (LPAI) yang diintroduksi oleh burung migrasi yang singgah di tempat tersebut dan kemudian mengalami reasortan sedemikian rupa sehingga patogen pada angsa.

Setelah bersirkulasi selama beberapa tahun pada angsa, virus menyebar ke itik. Hal ini diketahui dari hasil suatu investigasi tahun 2000 dimana virus H5N1 banyak diisolasi dari itik di Tiongkok Selatan (Guan et al. 2002; Neumann et al. 2010). Virus HPAI H5N1 Guangdong, yang direpresentasikan oleh A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1), mengalami reasortan dengan virus LPAI yang terdapat pada itik dan menghasilkan beberapa galur yang sangat patogen pada ayam (Guan & Smith 2013). Hal ini terbukti dengan munculnya wabah HPAI H5N1 dengan mortalitas tinggi pada tahun 2002 di Tiongkok Selatan (Neumann et al. 2010). Setelah itu, virus menyebar dengan cepat sehingga pada waktu yang hampir bersamaan (Desember 2003-Januari 2004) wabah terjadi di delapan negara Asia Timur dan Tenggara (Sims et al. 2005). Dalam beberapa tahun, penyakit tersebut menyebar di 63 negara yang menimbulkan 400 juta kematian ayam dengan kerugian ekonomi ditaksir sebesar US\$ 20 milyar (FAO 2012).

Sampai bulan Desember 2015, HPAI H5N1 telah menelan korban sebanyak 167 jiwa di Indonesia dari 199 total kasus yang terkonfirmasi dan 449 orang korban dari 844 kasus diseluruh dunia. Tiga tahun belakangan ini kasus penyakit di Indonesia menurun drastis, hanya 2-3 kasus per tahun yang dilaporkan ke WHO (WHO 2016). Kasus pada unggas juga mengalami penurunan yang signifikan, yakni dari 2.293 kasus yang tercatat pada tahun 2009 menjadi 123 kasus pada tahun 2015.

Seandainya penyebab wabah pada angsa di Guangdong dapat diidentifikasi dan penyakit diberantas tuntas dengan cepat maka panzootik dengan kerugian yang sangat besar tersebut bisa dihindarkan. Bahkan biaya yang dikeluarkan untuk memberantas tuntas pada awal wabah sangat kecil dan mudah dibandingkan dengan kerugian yang harus ditanggung banyak negara dan kesulitan yang dihadapi mengendalikan penyakit setelah menjadi panzootik. Penyebab tidak diberantasnya penyakit saat masih pada stadium terbatas pada angsa di Guangdong karena beberapa faktor dan salah satu diantaranya mungkin keterlambatan diagnosis. Jeda antara timbulnya wabah dan penyebab diketahui dengan pasti cukup panjang, yakni sekitar tujuh bulan, karena wabah pada angsa mulai terjadi sekitar bulan Februari 1996 dan penyebab

penyakit baru dilaporkan pada tanggal 6 Oktober 1996 di suatu pertemuan ilmiah nasional Tiongkok. Pada pertemuan tersebut penyebab penyakit dilaporkan virus influenza sub tipe H5N4 tetapi setelah di-*typing* ulang dinyatakan sebagai H5N1. Jeda yang panjang tersebut cukup membuat virus beradaptasi di itik menjadi patogen pada ayam dan menyebar di wilayah yang lebih luas (Wan 2012).

Penyebaran virus HPAI H5N1 ke Indonesia diduga berasal dari Provinsi Hunan melalui introduksi tunggal di Jawa Timur yang diperkirakan terjadi beberapa saat setelah bulan November 2002. Virus menyebar dari Jawa Timur ke tempat lain di Pulau Jawa dan keluar Pulau Jawa (Wang et al. 2008; Sonenberg et al. 2013). Sama seperti kejadian di Tiongkok saat munculnya HPAI H5N1, jeda antara munculnya wabah dan teridentifikasinya penyebab penyakit sangat panjang (Forster 2009). Kejadian tersebut seharusnya tidak terlampaui sulit diantisipasi karena negara lain di Asia Timur dan Tenggara sudah lebih dahulu mengidentifikasinya dan keterlambatan tersebut menimbulkan korban manusia dan kerugian ekonomi yang sangat besar (Sims et al. 2005).

Wabah penyakit yang dicurigai HPAI H5N1 mulai diberitakan di media massa pada bulan Juli 2003 tetapi pemerintah baru mendeklarasikan secara resmi pada tanggal 25 Januari 2004 setelah penyakit menyebar secara luas di pulau Jawa, Bali, Kalimantan dan Sumatera Selatan (Forster, 2009; Wibawan, 2012). Pada awal wabah, para pakar dan praktisi kesehatan hewan di Indonesia belum sepakat mengenai penyebab penyakit, sebagian menduga HPAI H5N1 tetapi sebagian lagi meyakini *very virulent Newcastle Disease* (Forster 2009). Kesulitan penentuan penyebab penyakit pada awal terjadinya wabah kemungkinan akibat beberapa kendala dan salah satu diantaranya adalah belum diterimanya metode biologi molekuler dalam mengidentifikasi virus wabah dan belum tersedianya alat diagnosis yang praktis saat itu.

DIAGNOSIS HPAI H5N1

Definisi kasus

Gejala klinis HPAI dapat dikelirukan dengan *Newcastle Disease* (ND) dan *Infectious Bursal Disease* (IBD) *virulent* dan kedua penyakit ini juga endemik pada ayam buras di Indonesia (Alders et al. 2009). Disamping itu, gejala klinis HPAI juga bisa mengalami perubahan mengikuti tingkat patogenitas virus dan status imunologis populasi ayam. Perubahan gejala klinis ini jelas terlihat pada ayam terinfeksi H5N1 di Indonesia pada saat puncak wabah tahun 2006 dan setelahnya (Wibawan 2012). Pengamatan gejala klinis diperlukan untuk mengarahkan pemeriksaan laboratoris. Sejumlah gejala klinis yang dapat dipakai

sebagai kriteria untuk menduga atau mengarahkan kepada pemeriksaan lebih lanjut disebut sebagai *clinical case definition* atau definisi kasus. Definisi kasus untuk HPAI H5N1 yang disepakati di Indonesia pada awal program *Participatory Disease Surveillance and Response* (PDSR) adalah kematian ayam secara mendadak, empat jam atau lebih awal sejak munculnya gejala klinis. Kematian mendadak merupakan satu-satunya gejala klinis yang konsisten untuk HPAI H5N1 pada ayam yang tidak memiliki kekebalan. Jadi, definisi kasus tersebut diatas ditujukan hanya untuk unggas sektor 4 (ayam buras dan itik yang dipelihara secara ekstensif) yang tidak divaksin. Gejala klinis berupa *petechiae* atau *cyanosis* pada jengger, *petechiae* di kulit dada atau paha, pembengkakan kepala, salivasi, eksudat pada hidung, gejala syaraf, anoreksia dan penurunan produksi telur digunakan untuk memperkuat definisi kasus tetapi tidak dipakai sebagai definisi kasus karena pada banyak kasus HPAI H5N1 gejala tersebut tidak muncul (Robyn et al. 2012; Wibawan 2012). Diagnosis yang dibuat petugas lapang PDSR berdasarkan definisi kasus diikuti dengan alat tes cepat (produksi Korea) menghasilkan diagnosis dengan sensitivitas yang cukup memuaskan (84%) dan spesifisitas yang mendekati sempurna ($\approx 100\%$) (Robyn et al. 2012). Definisi kasus HPAI H5N1 dapat digunakan untuk unggas baik yang divaksin ataupun tidak setelah disempurnakan menjadi: (1) Kematian mendadak pada satu ekor ayam atau lebih (sektor 4) yang tidak divaksin dalam satu kandang dengan atau tanpa gejala klinis; (2) Kematian pada ayam komersial yang tidak divaksin tanpa diketahui penyebabnya, di atas 1% dalam waktu dua hari; dan (3) Kematian, penyakit parah atau penurunan produksi pada ayam komersial yang menerapkan program vaksinasi H5N1 (OIE 2014a).

Isolasi virus

Isolasi virus dilakukan dengan cara menumbuhkan virus yang terdapat pada spesimen ulas kloaka atau orofarings atau organ pada telur ayam tertunas atau biakan sel. Isolasi virus merupakan cara konfirmasi diagnosis yang paling akurat dan karenanya dipakai sebagai *golden standard test* (Spackman et al. 2008). Kelemahan utama isolasi virus sebagai alat diagnosis adalah panjangnya waktu yang diperlukan untuk mendapatkan hasil yakni antara 1-2 minggu, mahal, membutuhkan laboratorium BSL-3 dan tenaga yang terampil (Spackman et al. 2008). Walaupun demikian, isolasi virus tidak bisa digantikan teknik lain karena hasil yang diperoleh dari isolasi bukan saja diagnosis akurat tetapi virus yang diisolasi tersebut selanjutnya dapat dianalisis lebih detail seperti untuk *pathotyping*, analisis molekular epidemiologis, dijadikan sebagai bahan pembuatan alat diagnosis atau vaksin (Spackman

et al. 2008). Protokol pelaksanaan isolasi virus beserta bahan dan peralatan yang dibutuhkan telah diuraikan secara lengkap (Terregino & Capua 2009; OIE 2014b).

Polymerase chain reaction

Polymerase chain reaction (PCR) adalah teknik yang sangat sensitif untuk mendeteksi keberadaan material genetik virus karena menggandakan secara eksponensial segmen nukleotida virus sehingga jumlahnya berlipat triliunan kali. Disamping sangat sensitif, hasil pemeriksaan juga dapat diperoleh dalam hitungan jam. Disamping itu, PCR juga dapat dimodifikasi untuk mendapatkan informasi lebih banyak. Misalnya, PCR dapat dikembangkan menjadi tes *multiplex* sehingga deteksi beberapa subtype virus influenza atau beberapa penyakit dapat dideteksi sekaigus (Phan et al. 2005; Zou et al. 2007). Masalah utama PCR adalah spesifisitas yang sering rendah karena kesulitan menghindari kontaminasi silang sampel yang diperiksa. Sumber utama kontaminasi adalah produk amplifikasi pemeriksaan sebelumnya atau *carryover contamination* (Aslanzadeh 2004). Masalah tersebut dapat dikurangi secara signifikan dengan *real time reverse transcriptase* PCR (RRT PCR) karena hasil amplifikasi secara langsung dianalisis oleh mesin *thermal cyclernya*. Disamping itu, sensitivitas dan spesifisitas RRT PCR lebih tinggi dibandingkan dengan *reverse transcriptase* PCR biasa, bahkan dilaporkan mendekati virus isolasi, yakni di atas 90% (Cattoli et al. 2004; Roa et al. 2011). Selain sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi, waktu yang diperlukan untuk mendapatkan hasil juga lebih singkat (Roa et al. 2011). Oleh karena itu, RRT PCR sering dipakai sebagai standar konfirmasi dan bahkan sering dipakai sebagai *golden standard test* untuk penentuan sensitivitas dan spesifisitas *immunochromatographic rapid test* (Loth et al. 2008; Al Johani et al. 2011). Protokol standar pelaksanaan PCR, baik *reverse transcriptase* PCR maupun *real time reverse transcriptase* PCR, secara lengkap telah tersedia (Cattoli & Monne 2009; Terregino & Capua 2009; OIE 2014b). Protokol standar dengan RRT PCR sudah umum digunakan dengan mengambil sampel darah dari lapang dan dibawa ke laboratorium untuk dianalisis apakah unggas terinfeksi oleh virus HPAI H5N1.

POINT-OF-CARE TESTING

Point-of-care (POC) *test* adalah uji diagnostik yang pemakaiannya di tempat pasien, hasil pemeriksaan diperoleh dalam waktu singkat (<60 menit), hasilnya mudah diinterpretasi dan langsung dipakai untuk menentukan tindakan terhadap pasien (Pai et al. 2012). *Point-of-care test* di bidang kedokteran sudah banyak

dipakai, tetapi dibidang veteriner masih jarang. *Pen-side test* atau *flock-side test* adalah istilah yang sering digunakan pada bidang veteriner sebagai pengganti istilah POC atau *bed-side test* (Manzoor et al. 2008; Soliman et al. 2010). Manfaat utama dari *pen-side test* adalah tindakan penanggulangan dapat dilakukan dengan segera sehingga penyebaran penyakit dapat dicegah. Karena tujuannya untuk mengambil tindakan cepat maka pelaksanaan pengujian di tempat kejadian penyakit sangat penting. Bila pengujian harus dilakukan di laboratorium, sekalipun dengan tes cepat, hasil pemeriksaan biasanya agak lama sampai kepada pelaksana pengambil tindakan penanggulangan penyakit. Dengan demikian, pengujian yang dilakukan di laboratorium, sekalipun dilakukan dengan alat diagnosis cepat tidak dapat dikategorikan sebagai POC testing (Pai et al. 2012).

Pentingnya uji POC untuk penanggulangan penyakit pada manusia sangat besar. Sebagai contoh, penggunaan sebuah uji POC sederhana di Afrika untuk menentukan diagnosis seorang anak terinfeksi bakteri dapat menyelamatkan sekitar 150.000 anak dari kematian setiap tahun (Lim et al. 2006). Menyadari pentingnya uji POC, berbagai negara dan yayasan seperti *Bill & Melinda Gates Foundation*, *US National Institutes of Health*, *Wellcome Trust*, *UK Department of International Development* dan *European Commission* telah menyediakan dana yang sangat besar untuk pengembangan uji POC yang dapat dipakai untuk penanggulangan penyakit menular di negara-negara berkembang (Peeling & Mabey 2010).

Kriteria uji POC yang ideal sesuai rekomendasi WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (WHO/TDR) tahun 2003 adalah sebagai berikut: (1) *Affordable*, harganya terjangkau; (2) *Sensitif*; (3) *Spesifik*; (4) *User friendly*, penggunaannya mudah yakni hanya beberapa tahapan saja dan dapat digunakan oleh personel tanpa atau setelah menjalani pelatihan singkat; (5) *Rapid and robust*, *reagen* untuk tes dapat disimpan dalam suhu ruangan dan hasil pemeriksaan dapat diperoleh dalam waktu kurang dari 30 menit; (6) *Equipment-free*, alat tes mudah dibawa dan pemakaiannya tidak membutuhkan fasilitas yang biasanya tidak tersedia di lapang seperti aliran listrik, air dan ruangan khusus; dan (7) *Deliverable to the users*, dapat disalurkan kepada pemakai dengan mudah (Kettler et al. 2004). Kriteria di atas, yang disingkat ASSURED (*Affordable, Sensitive, Specific, User friendly, Robust, Rapid, Equipment-free, Deliverable*) adalah kriteria yang ideal tetapi dalam kenyataannya jarang sekali ada uji POC yang dapat memenuhi kriteria tersebut dengan lengkap (Peeling & Mabey 2010).

Uji POC untuk penyakit influenza

Penyakit influenza adalah salah satu penyakit menular yang memiliki uji POC paling banyak. Di Amerika Serikat saja terdapat belasan produk uji POC komersial yang sudah mendapat lisensi dari *Food and Drug Administration* (FDA) (CDC 2012; 2015). Minimal terdapat dua penyebab mengapa uji POC begitu banyak untuk influenza. Pertama, penyakit influenza pada manusia prevalensinya tinggi. Secara global, sebanyak 500.000-1.000.000 orang meninggal akibat influenza setiap tahun (Layne et al. 2001). Kedua, penyakit influenza, tidak seperti kebanyakan penyakit viral lain, dapat diobati. Jika pengobatan dilakukan 36-48 jam setelah munculnya gejala klinis, hasilnya sangat memuaskan. Oleh karena itu, ketersediaan uji POC sangat penting (Gavin & Thomson 2003).

Performans uji POC untuk influenza pada manusia beragam tetapi umumnya mempunyai spesifisitas tinggi dengan sensitivitas relatif rendah (Tabel 1). Implikasi dari spesifitas tinggi tersebut adalah kemungkinan kekeliruan diagnosis sangat rendah apabila hasil uji positif. Sedangkan implikasi dari sensitivitas yang rendah adalah tidak dapat mengesampingkan kemungkinan pasien tidak terkena influenza bila hasil uji negatif. Walaupun performans dari uji POC beragam, target deteksi dari hampir semua uji POC adalah sama, yakni *nucleoprotein*, protein struktural virus influenza yang relatif *conserved* (de Boer et al. 1990; Gavin & Thomson 2003). Variasi dari sensitivitas analitis uji POC tersebut kemungkinan akibat dari keragaman afinitas atau aviditas antibodi terhadap *nucleoprotein* yang digunakan (CDC 2012).

Sensitifitas diagnostik dari uji POC selain ditentukan oleh sensitifitas analitik juga ditentukan oleh kandungan antigen virus dalam sampel dan kandungan antigen dalam sampel ditentukan oleh stadium penyakit, jenis spesimen dan umur penderita (Gavin & Thomson 2003). Kandungan antigen tertinggi terdapat pada sampel yang diambil antara 24-72 jam setelah munculnya gejala klinis dan pada jenis sampel berupa aspirat nosofarings atau sputum dan terendah pada sampel ulas tenggorokan (CDC 2012). Kandungan antigen pada spesimen dari anak-anak lebih tinggi dibandingkan dari yang dewasa (Gavin & Thomson 2003).

Uji POC influenza untuk unggas dan hewan jumlahnya jauh lebih sedikit dibandingkan dengan yang diperuntukkan untuk manusia, namun dibandingkan dengan penyakit hewan lain, AI merupakan salah satu penyakit hewan yang memiliki uji POC paling banyak. Sensitivitas dan spesifisitas

Tabel 1. Uji POC influenza pada manusia

Nama tes	Jumlah dan jenis spesimen	Sensitivitas	Spesifitas	Sumber
<i>Directigen EZ (Becton Dickinson)</i>	81, <i>nasal wash</i>	75%	100%	Atmar et al. (1996)
<i>Directigen EZ (Becton Dickinson)</i>	100, <i>respiratory sputum</i>	96%	100%	Barger et al. (2005)
<i>Directigen EZ (Becton Dickinson)</i>	175, <i>ulas nasofaring</i>	73,3%	100%	Leonardi et al. (2013)
<i>Flu-OIA (BioStar Inc.)</i>	100, <i>respiratory sputum</i>	48-100%	93-97%	Barger et al. (2005)
<i>Flu-OIA (BioStar Inc.)</i>	145, <i>respiratory sputum</i>	52-56%	97%	Hindiyeh et al. (2000)
<i>Flu-OIA (BioStar Inc.)</i>	404, <i>ulas alat pernafasan atas</i>	80%	73%	Covalciuc et al. (1999)
<i>Flu-OIA (BioStar Inc.)</i>	146, <i>ulas faring</i>	54%	74%	Boivin et al. (2001)
<i>Quidel quick vue</i>	122, <i>ulas hidung</i>	78-85%	97-98%	Agoritsas et al. (2006)
<i>Quidel quick vue</i>	175, <i>ulas nasofaring</i>	73,3%	96%	Leonardi et al. (2013)
<i>Quidel quick vue</i>	1092, <i>ulas nasofaring</i>	77%	96%	Simmerman et al. (2007)
<i>Remel X-pect</i>	100, <i>respiratory sputum</i>	94%	100%	Barger et al. (2005)
<i>Wampole clear view</i>	100, <i>respiratory sputum</i>	75%	100%	Barger et al. (2005)
<i>Sofia</i>	175, <i>ulas nasofaring</i>	80%	100%	Leonardi et al. (2013)
<i>Binax now flu A</i>	455, <i>nasal wash</i>	65%	98%	Fader (2005)

berbagai uji POC untuk AI disajikan dalam Tabel 2. Sama seperti yang diuraikan sebelumnya pada influenza manusia, sensitivitas uji POC relatif rendah dibandingkan dengan uji yang lain seperti PCR atau isolasi virus. Nilai sensitivitas diagnostik uji POC ditentukan oleh spesies unggas, jenis spesimen dan waktu pengambilan spesimen. Sensitivitas uji POC jauh lebih tinggi pada ayam dibandingkan pada itik karena *shedding* virus pada itik jauh lebih rendah (Chua et al. 2007). Apakah jumlah virus yang terkandung lebih banyak pada *ulas orofaring* dibandingkan dengan *kloaka* atau sebaliknya masih menjadi perdebatan. Sebagian peneliti melaporkan kandungan virus lebih tinggi pada *ulas kloaka* (Spackman et al. 2009) tetapi sebagian yang lain melaporkan sebaliknya (Chua et al. 2007). Uji POC hanya sensitif pada sampel yang diambil sekitar 2-4 hari pascainfeksi (Spackman et al. 2009) dan biasanya tidak sensitif untuk sampel yang diambil dari unggas yang terinfeksi secara subklinis (Chua et al. 2007). Pengaruh patogenitas virus terhadap jumlah virus yang diekskresikan belum diketahui dengan pasti. Woolcock & Cardona (2005) melaporkan bahwa jumlah *shedding* virus pada unggas yang diinfeksi dengan *low pathogenic H6N2* berada di bawah deteksi uji POC untuk semua stadium infeksi. Hal serupa belum pernah dilaporkan pada infeksi HPAI. Rendahnya sensitivitas uji POC, selain akibat yang diuraikan di atas, mungkin juga disebabkan oleh mutasi virus atau perbedaan homologi protein virus.

Dampak rendahnya sensitivitas uji POC pada unggas tidak separah pada manusia. Pada manusia, hasil pemeriksaan digunakan menentukan diagnosis dan tindakan pengobatan pada level individu,

sedangkan pada unggas diagnosis dan tindakan pada level *flock* bukan individu. Sensitivitas diagnosis untuk level *flock* dapat ditingkatkan dengan menambah jumlah unggas sakit/mati yang diperiksa (Loth et al. 2008). Jadi, uji POC tidak dapat melacak keberadaan virus AI pada unggas yang secara klinis sehat.

Peranan uji POC untuk pemberantasan HPAI di Indonesia

Pada saat pemerintah Indonesia mendeklarasikan keberadaan HPAI H5N1 awal tahun 2004, penyakit sudah tersebar luas, di Pulau Jawa, Bali, Kalimantan dan Sumatera. Karena HPAI H5N1 sudah menyebar luas, cara penanggulangannya dengan *stamping out* tidak mungkin lagi dilakukan, maka pemerintah memutuskan melakukan vaksinasi massal untuk seluruh unggas. Unggas pada sektor 1, 2 dan 3 dilakukan oleh pemilik usaha sedang unggas sektor 4 dilakukan oleh pemerintah. Kriteria untuk masing-masing sektor unggas dibuat berdasarkan kesepakatan bersama negara-negara anggota FAO (FAO 2006). Vaksinasi pada sektor 1, 2 dan 3 berjalan dengan baik dan dapat menekan kematian dan penyakit klinis (Siregar et al. 2007). Akan tetapi, vaksinasi massal pada unggas sektor 4 tidak fisibel dilakukan karena kekebalan yang diperoleh dari vaksinasi tidak memuaskan dan biaya untuk pelaksanaannya sangat tinggi (USAID Indonesia 2011). Program vaksinasi massal pada unggas sektor 4 dilaksanakan hanya selama dua tahun dan itu pun tidak pernah mencapai target (Siregar et al. 2007).

Tabel 2. Uji POC influenza pada unggas

Nama tes	Jenis unggas	Jumlah dan jenis spesimen	Sensitivitas	Spesifitas	Sumber
Anigen™	Ayam ras dan buras	164, ulas orofaring dan kloaka	76%	97%	Boland et al. (2006)
Anigen™	Ayam buras	65, ulas orofaring	70%	93%	Soliman et al. (2010)
Anigen™	Ayam buras	65, ulas kloaka	76,5%	87,5%	Soliman et al. (2010)
Anigen™	Ayam buras	65, <i>feather</i>	65,1%	92%	Soliman et al. (2010)
Anigen™	Ayam buras	174, ulas orofaring	69%	98%	Loth et al. (2008)
Quidel quick vue	Ayam buras	65, ulas orofaring	70%	93%	Soliman et al. (2010)
Quidel quick vue	Ayam buras	65, ulas kloaka	75%	100%	Soliman et al. (2010)
Quidel quick vue	Ayam buras	65, ulas kloaka	65,1%	92%	Soliman et al. (2010)
Flu detect	Ayam buras	174, ulas orofaring	71%	98%	Loth et al. (2008)
Biota flu	Ayam ras dan buras	164, ulas orofaring dan kloaka	70%	90%	Boland et al. (2006)
Directigen (EZ, BD)	kalkun	232, ulas trakea	88,9%	95,7%	Cattoli et al. (2004)
Directigen (EZ, BD)	Ayam ras dan buras	144, ulas orofaring dan kloaka	63%	97%	Boland et al. (2006)

Sebagai pengganti program vaksinasi massal, pemerintah Indonesia dengan bantuan FAO dan sejumlah negara-negara donor, menerapkan program PDSR sebagai program pengendalian HPAI H5N1 pada unggas sektor 4. Program ini diawali dengan program *Participatory Disease Surveillance* (PDS) dan *Participatory Disease Response* (PDR) secara terpisah tetapi kemudian digabungkan menjadi satu PDSR.

Uji POC, Anigen™ yang digunakan oleh setiap petugas PDSR untuk mengkonfirmasi kasus yang memenuhi definisi kasus, hanyalah salah satu komponen kecil dari proyek PDSR. Sebagian besar tempat kejadian wabah jauh dari laboratorium diagnostik, seperti Balai Pengujian Veteriner (BPVet), laboratorium tipe B atau C, sehingga bila konfirmasi harus dilakukan di laboratorium tersebut dibutuhkan waktu yang sangat lama sampai tindakan pengendalian dapat dilakukan. Dengan diperlengkapinya staf PDSR dengan uji POC, Anigen™, selang waktu antara laporan masyarakat sampai tindakan pengendalian penyakit dilaksanakan sangat singkat rata-rata hanya 1,5 hari (Hawkes et al. 2014).

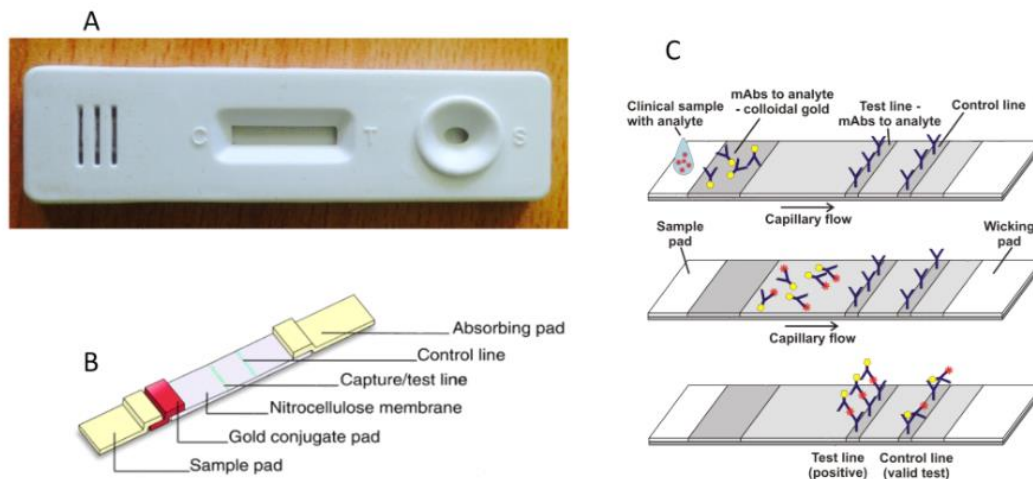
Lateral flow immunoassay

Lateral flow immunoassay (LFIA) atau *immunochromatographic assay* adalah jenis uji imunologis yang banyak dipakai untuk uji POC. *Lateral flow immunoassay* pertama kali diproduksi pada pertengahan tahun 1970an sebagai alat uji kehamilan dan hingga saat ini masih digunakan di seluruh dunia (Rivas et al. 2014). Sukses LFIA untuk uji kehamilan menginspirasi pengembangan LFIA

untuk bidang kedokteran, veteriner, makanan, pakan dan lingkungan. Pasar global LFIA pada tahun 2010 adalah sebesar US\$ 3,36 milyar dengan pertumbuhan pasar 7% per tahun maka tahun 2015 nilai pasar global untuk LFIA ditaksir sebesar US\$ 4,675 milyar (O'Farrell 2013). Nilai pasar yang begitu besar merupakan bukti bahwa LFIA merupakan jenis uji POC sesuai dengan kebutuhan konsumen. Sekalipun cocok dipakai sebagai uji POC, harga tes LFIA komersial sangat mahal. Bahkan, menurut sebuah perhitungan di Italia, biaya pemeriksaan AI dengan Directigen™ (*Becton Dickinson*) mencapai €19,43 per sampel, lebih mahal dua kali lipat dibandingkan dengan *real time* PCR yang hanya €9,53 per sampel (Cattoli et al. 2004).

Komponen dan prinsip kerja LFIA

Komponen LFIA terdiri dari *sample pad*, *conjugate pad*, *membrane strip*, *adsorbent pad* dan rumahan atau *plastic cassette* (Gambar 1). *Sample pad* pada umumnya terbuat dari selulosa dan berfungsi mengkondisikan sampel dengan cara mengontrol kecepatan aliran, kekentalan dan pH sampel sedemikian rupa sehingga analit (material yang dideteksi) bereaksi secara optimum dengan antibodi konjugat dan antibodi penahan (*capture antibody*). *Conjugate pad* biasanya terbuat dari *cross-linked silica* berfungsi memberikan ruang dan kondisi yang optimum untuk analit bereaksi dengan antibodi konjugat dan melepasnya ke dalam *membrane strip* dengan efisien. *Membrane strip* yang biasanya terbuat



A: Lateral flow immunoassay plastic cassette; B: Isi LFIA plastic cassette¹⁾; C: Prinsip kerja LFIA²⁾

Gambar 1. Lateral flow immunoassay

Sumber: ¹⁾Department of Analytical Chemistry (2010); ²⁾UNSM (2015)

dari membran nitroselulosa mempunyai dua sifat penting, yakni mempunyai pori sehingga cairan yang mengandung analit dapat mengalir dari *sample pad* ke *absorption pad* dengan gaya kapiler dan dapat mengikat protein sehingga di dalamnya dapat diimobilisasi *capture antibodies*. Ada dua antibodi yang diimobilisasi dalam bentuk garis tegak lurus terhadap lintasan sampel pada membran strip yakni antibodi terhadap analit dan antibodi antispesies terhadap antibodi konjugat. *Absorption pad* biasanya terbuat dari selulosa dan berfungsi sebagai penyerap cairan dari membran strip sehingga memperbesar volume cairan yang dapat mengalir melalui membran strip.

Sampel yang akan diperiksa, seperti supernatan ulas trakea atau kloaka, ditetaskan pada lubang sampel yang di bawahnya terdapat *sample pad* (Gambar 1A dan 1B). Sampel merembes ke *conjugate pad*, yang berisi antibodi terhadap analit yang telah dikonjugasikan dengan nanopartikel seperti *gold*, *polystyrene* berwarna atau karbon. Jika sampel yang diperiksa mengandung analit maka analit akan berikatan dengan antibodi. Analit bersama konjugat merembes ke membran strip dengan gaya kapiler menuju *absorption pad* (Gambar 1C).

Berdasarkan jenis analit yang dideteksi, dikenal dua format LFIA, format *sandwich* dan *competitive*. Format *sandwich* dipakai untuk analit yang memiliki sekurang-kurangnya dua epitope, satu epitope untuk antibodi konjugat dan satu lagi untuk *capture antibody* yang diimobilisasi pada membran strip. Bila sampel mengandung analit, analit tersebut akan berikatan dengan antibodi konjugat dan kompleks analit-antibodi-konjugat ini akan tertahan (di-*captured*) oleh *captured*

antibody yang diimobilisasi pada membran strip. Oleh karena itu, reaksi positif pada format ini ditandai dengan terbentuknya garis pada *captured antibody* atau *test line* (Gambar 1C). Format *competitive* digunakan untuk analit molekul kecil yang hanya memiliki satu epitope. Berbeda dengan format *sandwich*, pada membran strip diimobilisasi senyawa yang sama dengan yang dideteksi dan antibodi antispesies. Bila sampel tidak mengandung analit yang dideteksi maka antibodi konjugat akan tertahan pada senyawa yang diimobilisasi. Dengan demikian, hasil negatif ditandai dengan terbentuknya garis pada *test line* (kebalikan dengan format *sandwich*). Bila sampel mengandung analit, analit akan berikatan dengan antibodi konjugat sehingga antibodi konjugat tidak dapat lagi berikatan dengan senyawa yang diimobilisasi, akibatnya garis tidak terbentuk pada *test line* (O'Farrell 2009).

Keunggulan uji POC terletak pada pelaksanaan tes yang mudah, dapat dilakukan di tempat kejadian penyakit dan membutuhkan waktu kurang dari 30 menit. Cepatnya pelaksanaan uji LFIA karena tidak memerlukan tahapan inkubasi dan pencucian, berbeda dengan tes imunologis pada umumnya seperti ELISA, immunoblot dan sebagainya.

Antibodi yang diperlukan untuk LFIA influenza ada tiga macam yaitu: (1) Antibodi terhadap *nucleoprotein* yang dikonjugasikan dengan *gold nanoparticle* dan akan ditempatkan pada *conjugate pad*; (2) Antibodi terhadap *nucleoprotein* tetapi mengenali epitope yang berbeda dengan antibodi pertama; dan (3) Antibodi antispesies terhadap antibodi pertama. Kualitas antibodi yang digunakan yang dinyatakan oleh afinitas dan spesifisitas antibodi

tersebut terhadap target antigen yang dideteksi. Biaya untuk antibodi tersebut sangat tergantung apakah diproduksi sendiri atau dari sumber komersial.

Produksi uji POC influenza dalam negeri

Satu satunya cara mengatasi persoalan mahal nya uji POC adalah dengan memproduksi sendiri dalam negeri. Bahan habis pakai, kecuali antibodi, harganya murah dan mesin-mesin untuk produksi massal telah tersedia secara komersial.

Kendala terbesar untuk memproduksi LFIA adalah ketidaktersediaan sumber monoklonal antibodi untuk HPAI. Sekalipun antibodi poliklonal dapat saja digunakan untuk LFIA (Jiang et al. 2011), penggunaan antibodi monoklonal memiliki berbagai keuntungan. Uji yang menggunakan antibodi monoklonal mempunyai *repeatability* dan *reproducibility* jauh lebih tinggi dibandingkan dengan yang menggunakan poliklonal. Mengingat Indonesia belum mempunyai pengalaman yang memadai dalam memproduksi antibodi monoklonal, maka pemerintah melalui lembaga riset baik di lingkungan kementerian maupun universitas dapat mendukung riset produksi monoklonal antibodi untuk pemenuhan reagen uji diagnostik terutama untuk penyakit strategis.

Kualitas monoklonal antibodi yang memenuhi syarat untuk LFIA influenza tipe A antara lain memiliki afinitas yang tinggi, berikatan dengan epitope yang merupakan domain yang *conserved* pada *nucleoprotein* atau protein M1 virus influenza dan hibridoma yang menghasilkannya stabil. Sejumlah publikasi yang mudah diakses tentang produksi antibodi monoklonal terhadap virus influenza seharusnya sangat bermanfaat untuk program produksi antibodi monoklonal dalam negeri (Bhat et al. 2013; He et al. 2013).

Aptamer sebagai alternatif antibodi monoklonal

Sejumlah penelitian membuktikan bahwa aptamer dapat dipakai sebagai pengganti antibodi monoklonal dalam *immunoassay* (Toh et al. 2015). Aptamer adalah sintetik *oligonucleotida* sepanjang 25-80 basa (RNA atau DNA) utas tunggal yang dapat berikatan dengan molekul target dengan afinitas dan spesifisitas tinggi layaknya antibodi dengan antigen. Oleh karena itu, aptamer disebut juga sintetik antibodi (Toh et al. 2015). Aptamer diproduksi secara *in vitro* dengan teknik yang disebut *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment* (SELEX). Secara ringkas prosedur SELEX meliputi sintesis *pool library oligonucleotida*. *Library* tersebut direaksikan dengan target molekul yang diimobilisasi pada *solid support*. Nukleotida yang terikat kepada molekul target diamplifikasi dengan PCR. Setelah proses pengikatan target dan amplifikasi

diulangi sebanyak 8-15 kali, diharapkan diperoleh *nucleotida* yang memiliki afinitas dan spesifisitas yang tinggi. Selanjutnya, *nucleotida* disekuens dan diproduksi secara sintetik menjadi aptamer (Song et al. 2008; Kedzierski et al. 2013).

Aptamer mempunyai banyak keunggulan dibandingkan dengan antibodi. Aptamer lebih stabil dibandingkan dengan antibodi yang dapat mengalami denaturasi yang ireversibel. Aptamer dapat dihasilkan untuk target yang lebih beragam bahkan untuk molekul yang kecil seperti logam, sedangkan antibodi hanya dapat dihasilkan terhadap target yang imunogenik. Berbeda dengan antibodi yang dihasilkan secara *in vivo*, aptamer dihasilkan secara sintesis sehingga lebih mudah dikontrol untuk memperoleh hasil dengan reproduktibilitas dan kemurnian yang jauh lebih tinggi (Song et al. 2008; Toh et al. 2015).

Aptamer yang dapat mengenali hemagglutinin virus influenza dari berbagai sub tipe, H5N1, H1N1 dan H3N2 dengan afinitas yang tinggi telah berhasil diproduksi (Shiratori et al. 2014). Aptamer yang spesifik terhadap hemagglutinin sub tipe H5 dan H7, sub tipe *highly pathogenic* atau berpotensi menjadi *highly pathogenic*, juga telah diproduksi (Suenaga & Kumar 2014). Aptamer dengan spesifisitas yang sangat tinggi yakni hanya mengenali hemagglutinin dari sub tipe H5N1 dan tidak ada reaksi silang bukan saja dengan hemagglutinin dari sub tipe non-H5 tetapi juga dengan hemagglutinin H5 non-H5N1 (H5N2, H5N3 atau H5N9) juga telah dihasilkan (Wang et al. 2013). Aptamer yang disebutkan terakhir ini memiliki spesifisitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan monoklonal antibodi (Wang et al. 2013).

Mengingat potensinya sebagai bahan utama pengembangan alat diagnostik yang sangat besar, usaha untuk memproduksi aptamer dalam negeri seharusnya juga segera dimulai. Sampai saat ini, penelitian ke arah produksi aptamer dalam negeri belum dilakukan. Penelitian aptamer di negara lain di Asia seperti Tiongkok, Jepang, Korea dan Singapura sudah sangat maju, bahkan, berdasarkan publikasi yang dihasilkan, penelitian aptamer di Malaysia juga berkembang pesat (Omar et al. 2013; Toh et al. 2015).

Uji POC influenza di masa depan

Kelemahan utama uji POC influenza yang ada saat ini, seperti telah diuraikan di depan adalah sensitivitasnya yang relatif rendah. Rendahnya sensitivitas tersebut dalam berbagai kondisi mengharuskan konfirmasi lebih lanjut dengan alat diagnosis *standard* seperti RRT PCR atau isolasi virus. Usaha yang ditempuh untuk meningkatkan sensitivitas dan spesifisitas uji POC adalah dengan cara miniaturisasi dari uji standar. Miniaturisasi PCR sehingga dapat dipakai sebagai uji POC adalah dengan

teknik amplifikasi *isothermal* tanpa menggunakan *thermal cycler* tetapi dengan inkubator portabel kecil bertenaga baterai kecil yang disebut *loop-mediated isothermal amplification methods* (LAMP) (Imai et al. 2007; Niemz et al. 2011). Miniaturisasi PCR yang lebih canggih lagi adalah miniaturisasi menggunakan teknologi mikrofluidik. Dengan teknologi ini semua tahapan PCR, mulai dari preparasi sampel sampai analisis hasil dilakukan dalam sebuah *chip* kecil sehingga disebut juga *lab-on-a-chip* (Park et al. 2011; Su et al. 2015). Pelaksanaan PCR dalam *chip* ini memungkinkan pelaksanaan tes lebih cepat dan reagen yang digunakan jauh lebih sedikit tetapi hasilnya akurat (Park et al. 2011; Su et al. 2015). Walaupun saat ini harga *chip* tersebut masih mahal tetapi dengan berkembangnya teknologi material atau teknologi nano suatu saat di masa depan harganya diharapkan dapat terjangkau.

KESIMPULAN

Penanggulangan HPAI yang paling efektif adalah mendeteksi keberadaan penyakit dengan cepat diikuti dengan tindakan pemusnahan unggas tertular atau tersangka. Deteksi dan pemberantasan penyakit yang cepat hanya dapat terlaksana bila petugas lapangan dilengkapi dengan alat diagnosis POC. Alat diagnosis POC dipakai untuk mengkonfirmasi di tingkat lapang dugaan keterlibatan virus AI pada kejadian mortalitas dan morbiditas pada unggas sehingga tindakan penanggulangan dapat diambil dengan cepat. Alat diagnosis POC HPAI yang merupakan barang impor, harganya sangat mahal. Untuk menjamin penanggulangan HPAI H5N1 di Indonesia yang berkelanjutan maka produksi uji POC influenza dalam negeri harus diupayakan.

DAFTAR PUSTAKA

- Agoritsas K, Mack K, Bonsu BK, Goodman D, Salamon D, Marcon MJ. 2006. Evaluation of the quidel quickVue test for detection of influenza A and B viruses in the pediatric emergency medicine setting by use of three specimen collection methods. *J Clin Microbiol.* 44:2638-2641.
- Al Johani SM, Al Balawi M, Al Alwan B, Al Hefdh R, Hajeer A. 2011. Validity of two rapid point of Care Influenza tests and direct fluorescence assay in comparison of real time PCR for swine of origin influenza virus. *J Infect Public Health.* 4:7-11.
- Alders RG, Bagnol B, Brum E, Lubis AS, Young MP. 2009. Continuing education in the prevention and control of HPAI: A case study on Indonesia. *Worlds Poult Sci J.* 65:529-531.
- Aslanzadeh J. 2004. Brief review: Preventing PCR amplification carryover contamination in a clinical laboratory. *Ann Clin Lab Sci.* 34:389-396.
- Atmar RL, Baxter BD, Dominguez E a, Taber LH. 1996. Comparison of reverse transcription-PCR with tissue culture and other rapid diagnostic assays for detection of type A influenza virus. *J Clin Microbiol.* 34:2604-2606.
- Barger W, Vestal D, Engler HD, Body BA. 2005. Evaluation of lateral flow and membrane flow immunoassay for the rapid detection of influenza A and influenza B viruses. In: 21st Annual Clinical Virology Symposium. Daytona Beach, 8-11 May 2005. Florida (US): American Society for Microbiology.
- Bhat S, Bhatia S, Sood R, Bhatnagar H, Pateriya A, Venkatesh G. 2013. Production and characterization of monoclonal antibodies against nucleoprotein of avian influenza virus. *Monoclon Antibodies Immunodiagn Immunother.* 32:413-418.
- de Boer GF, Back W, Osterhaus AD. 1990. An ELISA for detection of antibodies against influenza A nucleoprotein in humans and various animal species. *Arch Virol.* 115:47-61.
- Boivin G, Hardy I, Kress A. 2001. Evaluation of a rapid optical immunoassay for influenza viruses (FLU OIA test) in comparison with cell culture and reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol.* 39:730-732.
- Boland P, Weaver J, Usman TB, Andrew M, Selleck P. 2006. Field evaluation of rapid antigen tests for highly pathogenic avian influenza. In: Proc 11th International Symposia on Veterinary Epidemiology and Economics. Cairns (Australia): International Symposia on Veterinary Epidemiology and Economics.
- Cattoli G, Drago A, Maniero S, Toffan A, Bertoli E, Fassina S, Terregino C, Robbi C, Vicenzoni G, Capua I. 2004. Comparison of three rapid detection systems for type A influenza virus on tracheal swabs of experimentally and naturally infected birds. *Avian Pathol.* 33:432-437.
- Cattoli G, Monne I. 2009. Molecular diagnosis of avian influenza. In: Capua I, Alexander DJ, editors. *Avian influenza and newcastle disease. A field and laboratory manual.* Milan (Italy): Springer-Verlag. p. 87-112.
- CDC. 2012. Evaluation of 11 commercially available rapid Influenza diagnostic tests-United States, 2011-2012. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 16. Georgia (US): Centers for Disease Control and Prevention.
- CDC. 2015. Guidance for clinicians on the use of rapid influenza diagnostic tests. *Centres of Disease Control and Prevention* [Internet]. [cited 2015 Mar 20]. Available from: <http://www.cdc.gov/flu/professionals/diagnosis/clinician-guidance>
- Chua T-H, Ellis TM, Wong CW, Guan Y, Ge SX, Peng G, Lamichhane C, Maliadis C, Tan S, Selleck P, et al.

2007. Performance evaluation of five detection tests for avian influenza antigen with various avian samples. *Avian Dis.* 51:96-105.
- Covalciuc KA, Webb KH, Carlson CA. 1999. Comparison of four clinical specimen types for detection of influenza A and B viruses by optical immunoassay (FLU OIA test) and cell culture methods. *J Clin Microbiol.* 37:3971-3974.
- Department of Analytical Chemistry. 2010. Laboratory of bioanalytical chemistry. Laboratory of Bioanalytical Chemistry [Internet]. [cited 2015 Feb 10]. Available from: <http://www.chimicabioanalitica.unito.it/>
- Fader RC. 2005. Comparison of the Binax NOW flu A enzyme immunochromatographic assay and R-mix shell vial culture for the 2003-2004 influenza season. *J Clin Microbiol.* 43:6133-6135.
- FAO. 2006. A strategic framework for HPAI prevention and control in Southeast Asia, Emergency Centre for Transboundary Animal Diseases (ECTAD). Bangkok (Thailand): FAO.
- FAO. 2012. H5N1 HPAI Global overview, January–March 2012. FAO [Internet]. [cited 2015 Apr 16]. Available from: <http://www.fao.org/docrep/015/an388e/an388e.pdf>
- FAO. 2013. Lessons from HPAI-A technical stocktaking of outputs, outcomes, best practices and lessons learned from the fight against highly pathogenic avian influenza in Asia 2005-2011. Rome (Italy): FAO.
- Forster P. 2009. The political economy of avian influenza in Indonesia. Brighton (UK): STEPS Centre.
- Gavin PJ, Thomson RB. 2003. Review of rapid diagnostic tests for influenza. *Clin Appl Immunol Rev.* 4:151-172.
- Guan Y, Peiris M, Kong KF, Dyrting KC, Ellis TM, Sit T, Zhang LJ, Shortridge KF. 2002. H5N1 influenza viruses isolated from geese in Southeastern China: Evidence for genetic reassortment and interspecies transmission to ducks. *Virology.* 292:16-23.
- Guan Y, Smith GJD. 2013. The emergence and diversification of panzootic H5N1 influenza viruses. *Virus Res.* 178:35-43.
- Hawkes P, Echalar R, Budiharta S, Soenarjo S. 2014. USAID/Indonesia avian and pandemic influenza (API) program evaluation: 2009–2014. GH Tech Project Bridge IV, Report No. 14-B4-009. Jakarta (Indonesia): USAID.
- He JL, Hsieh MS, Chiu YC, Juang RH, Wang CH. 2013. Preparation of monoclonal antibodies against poor immunogenic avian influenza virus proteins. *J Immunol Methods.* 387:43-50.
- Hindiyeh M, Goulding C, Morgan H, Kenyon B, Langer J, Fox L, Dean G, Woolstenhulme D, Turnbow A, Billetdeaux E, et al. 2000. Evaluation of BioStar flu OIA assay for rapid detection of influenza A and B viruses in respiratory specimens. *J Clin Virol.* 17:119-126.
- Imai M, Ninomiya A, Minekawa H, Notomi T, Ishizaki T, Van Tu P, Tien NTK, Tashiro M, Odagiri T. 2007. Rapid diagnosis of H5N1 avian influenza virus infection by newly developed influenza H5 hemagglutinin gene-specific loop-mediated isothermal amplification method. *J Virol Methods.* 141:173-180.
- Jiang T, Liang Z, Ren WW, Chen J, Zhi XY, Qi GY, Liu XT, Cai XP. 2011. A simple and rapid colloidal gold-based immunochromatographic strip test for detection of FMDV serotype A. *Virol Sin.* 26:30-39.
- Kedzierski S, Khoshnejad M, Caltagirone GT. 2013. Synthetic antibodies: The emerging field of aptamers. *Bioprocess J.* 717:46-49.
- Kettler H, White K, Hawkes S. 2004. Mapping the landscape of diagnostics for sexually transmitted infections. Geneva (Switzerland): WHO/TDR.
- Layne SP, Beugelsdijk TJ, Patel CK, Taubenberger JK, Cox NJ, Gust ID, Hay AJ, Tashiro M, Lavanchy D. 2001. A global lab against influenza. *Science.* 293:17-29.
- Leonardi GP, Wilson AM, Zuretti AR. 2013. Comparison of conventional lateral-flow assays and a new fluorescent immunoassay to detect influenza viruses. *J Virol Methods.* 189:379-382.
- Lim Y-W, Steinhoff M, Giroi F, Holtzman D, Campbell H, Boer R, Black R, Mulholland K. 2006. Reducing the global burden of acute lower respiratory infections in children: The contribution of new diagnostics. *Nature.* 444:9-18.
- Loth L, Prijono WB, Wibawa H, Usman TB. 2008. Evaluation of two avian influenza type A rapid antigen tests under Indonesian field conditions. *J Vet Diagnostic Investig.* 20:642-644.
- Manzoor R, Sakoda Y, Sakabe S, Mochizuki T, Namba Y, Tsuda Y, Kida H. 2008. Development of a pen-site test kit for the rapid diagnosis of H7 highly pathogenic avian influenza. *J Vet Med Sci.* 70:557-562.
- Neumann G, Green MA, Macken CA. 2010. Evolution of highly pathogenic avian H5N1 influenza viruses and the emergence of dominant variants. *J Gen Virol.* 91:1984-1995.
- Niemz A, Ferguson TM, Boyle DS. 2011. Point-of-care nucleic acid testing for infectious diseases. *Trends Biotechnol.* 29:240-250.
- O'Farrell B. 2009. Evolution in lateral flow-based immunoassay systems. In: Wong RC, Tse HY, editors. *Lateral flow immunoass.* New York (US): Springer. p. 1-34.
- O'Farrell B. 2013. Lateral flow immunoassay systems: Evolution from the current state of the art to the next generation of highly sensitive, quantitative rapid assays. In: Wild D, editor. *The immunoassay*

- handbook, theory and applications of ligand binding, ELISA and related techniques. 4th ed. Amsterdam (Netherlands): Elsevier. p. 89-107.
- OIE. 2014a. OIE Regional workshop on enhancing influenza A viruses national surveillance systems. In: The OIE/JTF project for controlling zoonoses in Asia under one health concept [Internet]. Tokyo, 26-28 August 2014. Paris (France): The World Organisation for Animal Health. Available from: <http://www.rr-asia.oie.int>
- OIE. 2014b. Avian influenza. In manual of diagnostic tests and vaccines for the terrestrial animals, chapter 2.3.4. The World Organisation for Animal Health [Internet]. [cited 2015 Mar 11]. Available from: <http://www.oie.int/international>
- Omar N, Loh Q, Tye GJ, Choong YS, Noordin R, Glokler J, Lim TS. 2013. Development of an antigen-DNAzyme based probe for a direct antibody-antigen assay using the intrinsic DNAzyme activity of a daunomycin aptamer. *Sensors*. 14:346-355.
- Pai NP, Vadnais C, Denkinger C, Engel N, Pai M. 2012. Point-of-care testing for infectious diseases: Diversity, complexity, and barriers in low- and middle-income countries. *PLoS Med*. 9:e1001306.
- Park S, Zhang Y, Lin S, Wang TH, Yang S. 2011. Advances in microfluidic PCR for point-of-care infectious disease diagnostics. *Biotechnol Adv*. 29:830-839.
- Peeling RW, Mabey D. 2010. Point-of-care tests for diagnosing infections in the developing world. *Clin Microbiol Infect*. 16:1062-1069.
- Phan TG, Nguyen TA, Yan H, Okitsu S, Ushijima H. 2005. A novel RT-multiplex PCR for enteroviruses, hepatitis A and E viruses and influenza A virus among infants and children with diarrhea in Vietnam. *Arch Virol*. 150:1175-1185.
- Rivas L, Escosura-Muniz ADL, Pons J, Merkoci A. 2014. Lateral flow biosensor based on gold nanoparticles. In: Valcárcel M, López-Lorente AI, editors. *Gold Nanoparticles in Analytical Chemistry Comprehensive Analytical Chemistry*. Amsterdam (Netherlands): Elsevier. p. 569-605.
- Roa PL, Catalán P, Giannella M, de Viedma DG, Sandonis V, Bouza E. 2011. Comparison of real-time RT-PCR, shell vial culture, and conventional cell culture for the detection of the pandemic influenza A (H1N1) in hospitalized patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 69:428-431.
- Robyn M, Priyono WB, Kim LM, Brum E. 2012. Diagnostic sensitivity and specificity of a participatory disease surveillance method for highly pathogenic avian influenza in household chicken flocks in Indonesia. *Avian Dis*. 56:377-380.
- Shiratori I, Akitomi J, Boltz DA, Horii K, Furuichi M, Waga I. 2014. Selection of DNA aptamers that bind to influenza A viruses with high affinity and broad subtype specificity. *Biochem Biophys Res Commun*. 443:37-41.
- Simmerman JM, Chittaganpitch M, Erdman D, Sawatwong P, Uyeki TM, Dowell SF. 2007. Field performance and new uses of rapid influenza testing in Thailand. *Int J Infect Dis*. 11:166-171.
- Sims LD, Domenech J, Benigno C, Kahn S, Kamata A, Lubroth J, Martin V, Roeder P. 2005. Origin and evolution of highly pathogenic H5N1 avian influenza in Asia. *Vet Rec*. 157:159-64.
- Siregar SE, Darminto, Weaver J, Bouma A. 2007. The vaccination programme in Indonesia. *Dev Biol*:151-158.
- Soliman M, Selim A, Coward VJ, Hassan MK, Aly MM, Banks J, Slomka MJ. 2010. Evaluation of two commercial lateral flow devices (LFDs) used for flockside testing of H5N1 highly-pathogenic avian influenza infections in backyard gallinaceous poultry in Egypt. *J Mol Genet Med*. 4:247-251.
- Song S, Wang L, Li J, Fan C, Zhao J. 2008. Aptamer-based biosensors. *TrAC-Trends Anal Chem*. 27:108-117.
- Sonnberg S, Webby RJ, Webster RG. 2013. Natural history of highly pathogenic avian influenza H5N1. *Virus Res*. 178:63-77.
- Spackman E, Pantin-Jackwood MJ, Swayne DE, Suarez DL. 2009. An evaluation of avian influenza diagnostic methods with domestic duck specimens. *Avian Dis*. 53:276-280.
- Spackman E, Suarez DL, Senne DA. 2008. Avian influenza diagnostics and surveillance methods. In: Swayne DE, editor. *Avian influenza*. Carlton (Australia): Blackwell Publishing Asia.
- Su W, Gao X, Jiang L, Qin J. 2015. Microfluidic platform towards point-of-care diagnostics in infectious diseases. *J Chromatogr A*. 1377:13-26.
- Suenaga E, Kumar PKR. 2014. An aptamer that binds efficiently to the hemagglutinins of highly pathogenic avian influenza viruses (H5N1 and H7N7) and inhibits hemagglutinin-glycan interactions. *Acta Biomater*. 10:1314-1323.
- Terregino C, Capua I. 2009. Conventional diagnosis of avian influenza. In: Capua I, Alexander DJ, editors. *Avian influenza and newcastle disease. A field and laboratory manual*. Milan (Italy): Springer-Verlag.
- Toh SY i, Citartan M, Gopinath SCB, Tang TH. 2015. Aptamers as a replacement for antibodies in enzyme-linked immunosorbent assay. *Biosens Bioelectron*. 64:392-403.
- UNSM. 2015. University of Nevada School of Medicine. University of Nevada School of Medicine [Internet]. [cited 2015 Feb 10]. Available from: <http://medicine.nevada.edu/>
- USAID Indonesia. 2011. Operational research in Indonesia for more effective control of highly pathogenic avian influenza. Final report. USAID project cooperative

- agreement No. 497-A-00-07-00021-00. Jakarta (Indonesia); USAID.
- Wan XF. 2012. Lessons from emergence of A/Goose/Guangdong/1996-Like H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses and recent influenza surveillance efforts in Southern China. *Zoonoses Public Health*. 59:32-42.
- Wang J, Vijaykrishna D, Duan L, Bahl J, Zhang JX, Webster RG, Peiris JS, Chen H, Smith GJ, Guan Y. 2008. Identification of the progenitors of Indonesian and Vietnamese avian influenza A (H5N1) viruses from Southern China. *J Virol*. 82:3405-3414.
- Wang RH, Zhao JJ, Jiang TS, Kwon YM, Lu HG, Jiao PR, Liao M, Li YB. 2013. Selection and characterization of DNA aptamers for use in detection of avian influenza virus H5N1. *J Virol Methods*. 189:362-369.
- WHO. 2016. Influenza. Geneva (Switzerland): World Health Organization.
- Wibawan IWT. 2012. Manifestasi subklinik *Avian Influenza* pada unggas: Ancaman kesehatan dan penanggulangannya. Orasi ilmiah guru besar tetap Fakultas Kedokteran Hewan. Bogor (Indonesia): Institut Pertanian Bogor.
- Woolcock PR, Cardona CJ. 2005. Commercial immunoassay kits for the detection of influenza virus type A: evaluation of their use with poultry. *Avian Dis*. 49:477-481.
- Zou S, Han J, Wen L, Liu Y, Cronin K, Lum SH, Gao L, Dong J, Zhang Y, Guo Y, Shu Y. 2007. Human influenza A virus (H5N1) detection by a novel multiplex PCR typing method. *J Clin Microbiol*. 45:1889-1892.

PEDOMAN BAGI PENULIS

KETENTUAN UMUM

Naskah yang dikirim belum pernah diterbitkan dan dalam waktu yang bersamaan tidak disampaikan kepada media publikasi lain. Perlu menandatangani surat pernyataan tentang keaslian naskah dan hak publikasi.

RUANG LINGKUP

Buletin ilmiah ini memuat tulisan hasil tinjauan, ulasan (*review*), kajian kebijakan dan gagasan serta pemikiran sistematis. Topik yang dibahas berupa informasi baru dan/atau memperkuat hasil temuan sebelumnya. Buletin ini diterbitkan 4 (empat) kali dalam setahun pada bulan Maret, Juni, September dan Desember.

PENGIRIMAN NASKAH

Naskah ditulis dalam bahasa Indonesia atau bahasa Inggris, ditulis dengan jarak 1,5 spasi, kecuali 1 spasi untuk Judul, Abstrak, Tabel, Gambar dan Lampiran. Jumlah halaman dalam naskah maksimum 20 halaman. Batas tepi kiri 4 cm dan masing-masing 3 cm untuk batas tepi kanan, atas dan bawah. Naskah diketik dengan jenis huruf *Times New Roman* dan ukuran (*font*) 12, menggunakan program *Microsoft Word*, kecuali program *Microsoft Excel* untuk tabel dan grafik serta format JPEG atau TIFF pada gambar (dalam format yang dapat diedit). Naskah lengkap dikirim melalui email dengan alamat wartazoa@yahoo.co.id. Bagi naskah yang diterima, penulis berhak menerima 1 (satu) buletin asli dan 10 (sepuluh) eksemplar cetak lepas.

TATA CARA PENULISAN NASKAH

1. **Judul** ditulis singkat, jelas, spesifik dan informatif yang mencerminkan isi naskah serta tidak lebih dari 15 kata.
2. **Nama** penulis tanpa gelar dan lembaga/institusi ditulis lengkap di bawah judul, disertai dengan alamat lengkap dan alamat e-mail penulis korespondensi.
3. **Abstrak** ditulis dalam bahasa Indonesia dan bahasa Inggris dan merupakan intisari naskah, masing-masing tidak lebih dari 250 dan 200 kata yang dituangkan dalam satu paragraf dengan jarak satu spasi.
4. **Kata kunci** (*key words*) dalam bahasa Indonesia dan Inggris, boleh kata tunggal dan majemuk, serta terdiri atas tiga sampai dengan lima kata.
5. **Pendahuluan** terdiri dari latar belakang, permasalahan atau rumusan masalah, serta tujuan dan manfaat ulasan (*review*).
6. **Isi pokok bahasan** menyajikan dan membahas secara jelas pokok bahasan dengan mengacu kepada tujuan penulisan.
7. **Kesimpulan** merupakan substansi pokok bahasan yang menjawab permasalahan serta tujuan penulisan dan bukan merupakan tulisan ulang atau ringkasan dari pembahasan.
8. **Saran** (apabila ada) dapat berisi rekomendasi, tindak lanjut atau implikasi kebijakan atas kesimpulan yang diperoleh.
9. **Ucapan terima kasih** (kalau ada).
10. **Daftar pustaka:**
 - a. Minimal 25 acuan, diutamakan menggunakan pustaka 10 tahun terakhir dan minimal 80% pustaka primer. Sitasi hasil penulisan sendiri paling banyak 30% dari total acuan.
 - b. Pustaka dari internet hanya diperbolehkan dari sumber yang dapat dipertanggungjawabkan seperti jurnal, instansi pemerintah atau swasta.
 - c. Nama pengarang disusun secara alfabetis dan tahun penerbitan.
11. **Tabel:**
 - a. Huruf standar yang digunakan adalah *Times New Roman* dengan jarak satu spasi dan *font* 11.
 - b. Judul adalah kalimat singkat, jelas, dapat dimengerti tanpa harus membaca naskah.
 - c. Setiap kolom dari tabel harus memiliki tajuk (*heading*). Unit harus dipisahkan dari judul dengan koma dalam kurung atau di bawahnya.
 - d. Keterangan tabel ditulis di bawah tabel dengan jarak 1 spasi dan *font* 11. Sumber data dituliskan di bawah tabel atau di dalam tabel pada tajuk sendiri.
 - e. Garis pemisah dibuat dalam bentuk horisontal.

Contoh tabel:

Tabel 1. Respons kambing terhadap berbagai bentuk fisik pakan komplit

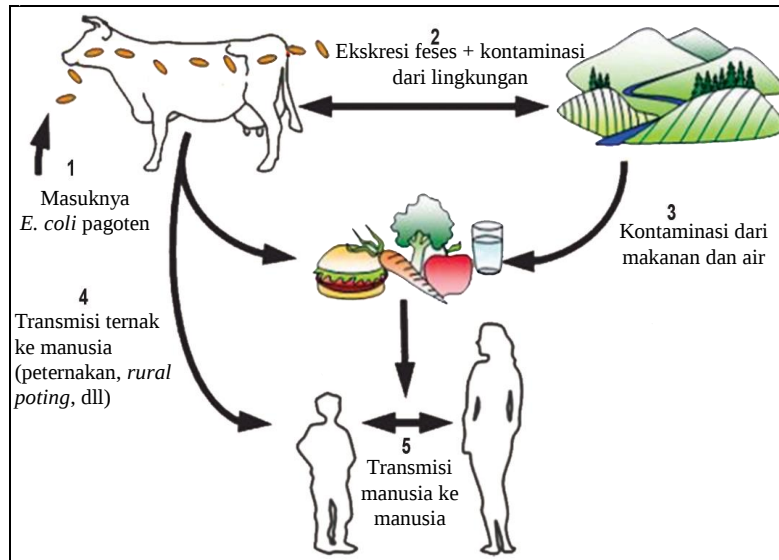
Bentuk pakan komplit	Genotipe kambing	Umur (bulan)	Konsumsi (% BB)	PBBH (g)	NKR ^{a)}	Kecernaan (%)	Sumber
Pelet	Jamunapari	24-27	3,0-4,0	154-192	5,2-8,4	65	Srivastava & Sharma (1998)
Cacah ^{b)}	Alpine	9-36	4,4	102	11,0	tt	Galina et al. (1995)
Cacah	Nubian	9-36	4,1	85	11,0	tt	Galina et al. (1995)
Tepung kasar	Boerka	3-6	3,9-4,9	71-89	11,2	62-81	Ginting et al. (2007)
Tepung kasar	Afrika	16-18	5,8	50-58	10-13	68-78	Areghero (2000)

^{a)}NKR: Nilai konversi ransum (konsumsi/PBBH; g/g); ^{b)}Pakan dasar dalam bentuk cacahan dan konsentrat dalam bentuk tepung; tt: Data tidak tersedia

12. **Gambar dan grafik:**

- Judul menggunakan *Times New Roman* dengan jarak 1 spasi dan *font* 11, berupa kalimat singkat dan jelas diletakkan di bawah gambar dan grafik.
- Garis pada grafik harus secara jelas terlihat perbedaan satu dengan yang lain apabila terdapat lebih dari satu kurva.
- Gambar dengan kontras yang jelas dengan ukuran yang proporsional dan beresolusi tinggi agar dapat tampil baik untuk penampilan terbaik.
- Tuliskan sumber gambar/grafik di bawah judul.

Contoh gambar dan grafik:



Gambar 3. Food borne disease *E. coli* O157:H7

Sumber: Scieh (2001) yang dimodifikasi

13. **Satuan pengukuran:** dipergunakan sistem internasional (SI).

14. **Penulisan angka desimal:** untuk bahasa Indonesia dipisahkan dengan koma (.), untuk bahasa Inggris dengan titik (.).

15. **Penulisan pustaka dalam teks:**

- Penulisan pustaka mengacu pada Council of Science Editor (CSE) edisi ke-7 tahun 2006.
- Pustaka harus ditulis nama penulis terlebih dahulu, diikuti tahun, contoh: Diwyanto (2007) atau (Diwyanto 2007).
- Bila ada dua nama penulis dalam satu makalah, maka nama penulis harus ditulis semua, contoh: Albenzio & Santilo 2011.
- Bila ada lebih dari dua nama penulis dalam satu makalah, maka harus ditambah et al. (huruf tegak dan diberi titik di belakang huruf), contoh: Jayanegara et al. (2012) atau (Jayanegara et al. 2012), dan di dalam daftar pustaka ditulis hingga penulis kesepuluh serta diakhiri dengan et al..
- Bila ada lebih dari satu pustaka untuk satu pernyataan, maka harus ditulis urutan dari tahun yang tertua dan urutan alfabet nama penulis bila tahunnya sama, contohnya: (Diwyanto et al. 2007; Jayanegara et al. 2012; Wina 2012).
- Pustaka dalam pustaka seperti contoh: Teleni dalam Widiawati (2012) tidak diperkenankan.
- Bila suatu pernyataan diperoleh dari komunikasi pribadi, perlu dicantumkan "nama orang yang dihubungi" dan diikuti dengan (komunikasi pribadi) di belakangnya.
- Memuat nama penulis yang dirujuk dalam naskah.
- Jika penulis yang sama menulis lebih dari satu artikel dalam tahun yang sama dapat dibubuhi huruf kecil.
- Disusun secara alfabetis dan tahun penerbitan menurut nama penulis.

16. **Cara penulisan pustaka di dalam Daftar Pustaka:**

- Setiap pustaka yang disebut di dalam tulisan harus dimasukkan ke dalam Daftar Pustaka yang ditulis di bagian akhir makalah.
- Pustaka yang dirujuk harus dipublikasi dalam kurun waktu 10 tahun terakhir dengan proporsi pustaka jurnal minimum 80%.
- Pengutipan pustaka dari internet hanya diperbolehkan dari sumber yang dapat dipertanggungjawabkan seperti jurnal, instansi pemerintah atau swasta. Wikipedia tidak dapat dijadikan sumber pustaka.
- Pustaka dengan "Anonimus" tidak diperbolehkan.
- Bila tidak disebut nama penulisnya, maka yang di dicantumkan adalah nama institusi atau penerbit.
- Makalah yang sudah diterima tetapi masih dalam proses pencetakan, harus ditulis (*in press*) pada akhir pustaka.
- Beberapa contoh penulisan sumber acuan adalah sebagai berikut:

Buku:

Stiglitz JE. 2010. Free fall. New York (US): WW Norton and Company Inc.

Jurnal:

Kostaman T, Yusuf TL, Fahrudin M, Setiadi MA, Setioko AR. 2014. Pembentukan *germline chimera* ayam Gaok menggunakan *primordial germ cells* sirkulasi segar dan beku. JITV. 19:17-25.

Artikel dalam Buku:

Prawiradiputra BR. 2012. Tanaman penutup tanah untuk perkebunan kelapa sawit. Dalam: Tiesnamurti B, Inounu I, penyunting. Inovasi pengembangan sapi sistem integrasi sapi sawit. Jakarta (Indonesia): IAARD Press. hlm. 159-187.

Hanotte O, Han J. 2006. Genetic characterization of livestock population and its use in conservation decision making. In: Sannino J, Sannino A, editors. The role of biotechnology in exploring and protecting agriculture genetic resources. Rome (Italy): Food and Agriculture Organization of the United Nations. p. 89-96.

Internet:

Aldrich B, Minott S, Scott N. 2005. Feasibility of fuel cells for biogas energy conversion on dairy farm. Manure Management Program [Internet]. [cited 21 July 2005]. Available from: http://www.manure_management.Cornell.edu.

Prosiding:

Rohaeni ES, Ismadi D, Darmawan A, Suryana, Subhan A. 2004. Profil usaha peternakan ayam lokal di Kalimantan Selatan (Studi kasus di Desa Murung Panti Kecamatan Babirik. Kabupaten Hulu Sungai Utara dan Desa Rumintin Kecamatan Tambangan, Kabupaten Tapin). Dalam: Thalib A, Sendow I, Purwadaria T, Tarmudji, Darmono, Triwulanningsih E, Beriajaja, Natalia L, Nurhayati, Ketaren PP, et al., penyunting. IPTEK sebagai Motor Penggerak Pembangunan Sistem dan Usaha Agribisnis Peternakan. Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Bogor, 4-5 Agustus 2004. Bogor (Indonesia): Puslitbangnak. hlm. 555-562.

Skripsi/Tesis/Disertasi:

Jatmiko. 2005. Studi fenotipe ayam Pelung untuk seleksi tipe ayam penyanyi [Tesis]. [Bogor (Indonesia)]: Institut Pertanian Bogor.

Laporan:

Balitvet. 2004. Dinamika penyakit Avian Influenza di Indonesia. Laporan APBN Balai Penelitian Veteriner. Bogor (Indonesia): Balai Penelitian Veteriner.

Jurnal elektronik:

Huber I, Campe H, Sebah D, Hartberger C, Konrad R, Bayer M, Busch U, Sing A. 2011. A multiplex one-step real-time RT-PCR assay for influenza surveillance. Eurosurveillance [Internet]. 16:1-7. Available from: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19798>

Registered in:

