

ISSN 0216-6461
e-ISSN 2354-6832

Terakreditasi Kemenristekdikti
SK Dirjen Risbang No. 21/E/KPT/2018

WARTAZOA

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

Volume 29
Nomor 2
Juni 2019



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

WARTAZOA

Buletin Ilmu Peternakan dan Kesehatan Hewan Indonesia

Volume 29 Nomor 2 Tahun 2019

ISSN 0216-6461

e-ISSN 2354-6832

Terakreditasi Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi

SK Dirjen Penguatan Riset dan Pengembangan No. 21/E/KPT/2018

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 Utama – Balai Besar Penelitian Veteriner – Patologi dan Toksikologi)

Anggota:

Dr. Ir. Atien Priyanti SP, MSc. (Peneliti Utama – Puslitbangnak – Ekonomi Pertanian)
Drh. Indrawati Sendow, MSc. (Peneliti Utama – Balai Besar Penelitian Veteriner – Virologi)
Dr. Ir. Chalid Talib, MSc. (Peneliti Utama – Balai Penelitian Ternak – Pemuliaan dan Genetika Ternak)
Dr. Nurhayati (Peneliti Utama – Balai Penelitian Ternak – Budidaya Tanaman)
Dr. Drh. Eny Martindah, MSc. (Peneliti Utama – Balai Besar Penelitian Veteriner – Parasitologi dan Epidemiologi)
Dr. Drh. Susan Maphiliandawati Noor, MVSc. (Peneliti Madya – Balai Besar Penelitian Veteriner – Bakteriologi)
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)

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)
Dr. Ir. VM Ani Nurgartiningih, MSc. (Universitas Brawijaya – Pemuliaan dan Genetika Ternak)

Penyunting Pelaksana:

Nandi Hendriana, ST, MKom.
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

Terbitan kali ini terdiri dari 3 naskah tentang teknik mendeteksi mikotoksin dan pengobatan yang baru karena adanya resistensi obat antiviral maupun obat antibakteri. Dua naskah lainnya berhubungan dengan gen yang bernilai ekonomis pada sapi potong dan sapi perah.

Mikotoksin fumonisin dibatasi keberadaannya baik dalam pangan maupun pakan karena adanya efek karsinogen tetapi batas maksimumnya bervariasi untuk berbagai ternak. Teknik deteksi fumonisin yang cepat dan tepat sangat diperlukan untuk pangan maupun pakan. *Molecularly imprinted polymer* (MIP) dapat diaplikasikan dengan baik untuk determinasi fumonisin secara komprehensif dari preparasi sampel sampai kuantifikasi sampel.

Vaksinasi dan pengobatan dengan antiviral merupakan pengendalian untuk mengatasi penyakit influenza termasuk avian influenza baik pada unggas maupun manusia. Saat ini, sudah ditemukan resistensi antiviral golongan M2 *blocker* dan *neuraminidase inhibitor* sehingga perlu dicari obat antiviral baru. Kombinasi antiviral M2 *blocker* dan *neuraminidase inhibitor* ternyata efektif untuk pengobatan influenza A (H5N1) yang telah resisten terhadap *neuraminidase inhibitor*.

Resistensi terhadap antibiotik enrofloksasin juga ditemukan. Residu antibiotik enrofloksasin pada produk hewan dapat menyebabkan efek negatif pada kesehatan manusia dan lingkungan, sehingga penggunaan antibiotik enrofloksasin perlu diawasi dan dievaluasi demi kesehatan hewan dan masyarakat.

Perbaikan sifat genetik yang berasosiasi dengan sifat pertumbuhan yang bernilai ekonomis sangat dibutuhkan dalam seleksi pada sapi potong. Gen melanocortin reseptor tipe 4 (MC4R) bertugas mengatur berbagai sifat pertumbuhan pada ternak ruminansia. Penggunaan gen MC4R sebagai marka molekuler dapat mempercepat seleksi bila diaplikasikan dalam mengoptimalkan strategi perbaikan mutu genetik pertumbuhan.

Peningkatan kualitas susu sapi mulai beralih kepada peningkatan kadar protein susu, karena alasan gizi dan ekonomi. Pendekatan seleksi berdasarkan gen pengontrol protein susu dapat dilakukan untuk menghasilkan sapi perah dengan keunggulan memiliki kandungan protein susu tinggi. Seleksi pada sapi perah dapat dilakukan dari sejak usia dini.

Demikian secara ringkas isi dari Wartazoa no 2, 2019. Selamat membaca dan semoga bermanfaat.

Bogor, Juni 2019

Ketua Dewan Penyunting

WARTAZOA

Buletin Ilmu Peternakan dan Kesehatan Hewan Indonesia

Volume 29 Nomor 2 (Juni 2019)

ISSN 0216-6461

e-ISSN 2354-6832

DAFTAR ISI	Halaman
Utilization of Synthetic Antibody for Fumonisin Determination in Feed and Food (Pemanfaatan Antibodi Sintetik untuk Determinasi Fumonisin dalam Pakan dan Pangan) Hasim Munawar, K Karim, SA Piletsky	051-060
Efikasi, Mekanisme dan Resistensi Antiviral <i>Neuraminidase Inhibitor</i> dan Adamantane pada <i>Avian Influenza</i> (Efficacy, Mechanism and Antiviral Resistance of Neuraminidase Inhibitors and Adamantane against Avian Influenza) Dyah Ayu Hewajuli, NLPI Dharmayanti	061-074
Penggunaan Antibiotik Enrofloksasin sebagai Obat Hewan dan Bahaya Residunya terhadap Kesehatan Masyarakat (The Use of Enrofloxacin Antibiotic as a Veterinary Drug and Its Residual Hazards on Public Health) Prima Mei Widiyanti, MB Sudarwanto, E Sudarnika, R Widiastuti	075-084
Gen <i>Melanocortin-4 Receptor</i> (MC4R) sebagai Gen Utama untuk Seleksi Pertumbuhan Cepat pada Sapi Potong (Melanocortin-4 Receptor (MC4R) Gene as the Main Gene for Rapid Growth Selection in Beef Cattle) Peni Wahyu Prihandini, D Maharani	085-096
Kandidat Gen Penyusun Protein Susu untuk Perbaikan Genetik Sapi Perah (Candidate Gene of Milk Protein for Genetic Improvement of Dairy Cattle) Santiananda Asmarasari, C Sumantri, A Gunawan, E Taufik, A Anggraeni	097-107

Utilization of Synthetic Antibody for Fumonisin Determination in Feed and Food

(Pemanfaatan Antibodi Sintetik untuk Determinasi Fumonisin dalam Pakan dan Pangan)

Hasim Munawar¹, K Karim², SA Piletsky²

¹Indonesian Research Center for Veterinary Science, IAARD-Ministry of Agriculture

²Department of Chemistry, University of Leicester

Corresponding author: seemunawar@gmail.com

(Diterima 4 April 2019 – Direvisi 27 Mei 2019 – Disetujui 4 Juni 2019)

ABSTRACT

Fumonisin contamination in food is limited around 2 – 4 ppm and in feed for different animals varies from 5 to 100 ppm. This regulation is to prevent animal and human from carcinogenic effect from fumonisins. Measurement of fumonisins frequently uses chromatography methods such as High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LCMS/MS); however, the sample preparation and analysis process for these methods are costly and time consuming. Immunoassays have also been employed for detecting fumonisins in food or feed. Unfortunately, the instability of antibody to harsh condition such as high temperature and pH becomes the drawback for immunoassay method. Currently, the technology based on molecularly imprinting, which is called synthetic antibody, has been established for replacing antibody functions. Therefore, the aim of this review is to describe development of molecularly imprinted polymer (MIP) in fumonisin analysis in feed and food. Herein, the composition and production of MIP were described comprehensively. Bulk polymerization and solid phase synthesis were methods for production of MIP in micro and nano sizes. The application of MIP was reported for sample preparation as solid phase extraction measured continuously by HPLC showing the high recovery (> 60%). Then, MIP replaced antibody in direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for quantifying fumonisins in maize with high recovery (>90%) and limit detection (2 – 6 pM). Lastly, MIP was also employed in electrochemical sensor application as receptor for recognizing fumonisin in milk and maize. In conclusion, the performance of MIP has been applied successfully for fumonisin analysis comprehensively from sample preparation and quantification. The MIP would be developed for wider application for other toxins in feed or food such as veterinary drug, heavy metals, or pesticides.

Key words: Molecularly imprinted polymer, fumonisin, preparation, quantification

ABSTRAK

Kontaminasi fumonisin dalam pangan dibatasi sekitar 2 – 4 ppm dan batas maksimum dalam pakan untuk berbagai ternak/hewan bervariasi dari 5 hingga 100 ppm. Aturan ini dibuat untuk mencegah hewan dan manusia dari efek karsinogenitas dari fumonisin. Pengukuran fumonisin seringkali menggunakan metode kromatografi seperti Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dan *Liquid chromatography tandem-mass spectrometry* (LCMS/MS). Tetapi, proses preparasi dan analisis sampel untuk metode kromatografi cukup mahal dan memerlukan waktu yang lama. Metode *immunoassay* juga sudah digunakan untuk mendeteksi fumonisin dalam pakan/pangan. Akan tetapi, ketidakstabilan antibodi terhadap kondisi suhu dan pH menjadi kendala dari metode *immunoassay*. Saat ini, teknologi berbasis *molecularly imprinting*, disebut juga antibodi sintetik, telah dikembangkan untuk mengganti fungsi dari antibodi. Oleh karena itu, tujuan dari penulisan artikel ini adalah untuk memaparkan pemanfaatan *molecularly imprinted polymer* (MIP) dalam analisis senyawa fumonisin dalam pakan dan pangan. Komposisi dan produksi MIP dijelaskan secara komprehensif. *Bulk polymerization* dan *solid phase synthesis* adalah metode untuk produksi MIP dengan ukuran mikro dan nano. Pemanfaatan MIP sudah digunakan untuk preparasi sampel sebagai *solid phase extraction* yang diukur lebih lanjut dengan KCKT yang menunjukkan hasil *recovery* yang tinggi (> 60%). Kemudian, MIP dapat menggantikan antibodi pada metode *direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) untuk mengkuantifikasi senyawa fumonisin dalam jagung dengan *recovery* yang tinggi (>90%) dan limit deteksi berkisar 2 – 6 pM. Selanjutnya, MIP juga digunakan pada aplikasi *electrochemical sensor* sebagai reseptor untuk mendeteksi fumonisin dalam susu dan jagung. Disimpulkan bahwa MIP dapat diaplikasikan dengan baik untuk mendeteksi fumonisin secara komprehensif dari preparasi sampel sampai kuantifikasi sampel sehingga MIP dapat diaplikasikan secara luas untuk senyawa racun lainnya dalam pakan dan pangan seperti obat hewan, logam berat atau pestisida.

Kata kunci: *Molecularly imprinted polymer*, fumonisin, preparasi, kuantifikasi

INTRODUCTION

Fumonisin is a fungal secondary metabolite produced mostly by *Fusarium moniliforme* and *F. proliferatum* (Gaspardo et al. 2012). International Agency for Research on Cancer categorises fumonisins as group 2B carcinogenic (IARC 2002); therefore, these toxins have a potential risk not only for human but also for animal health. Moreover, the maximum level of fumonisins recommended in food is 2–4 ppm and in feed of different animals varies from 5 to 100 ppm (FDA 2001; EC 2006; NSA 2009). Fumonisin B₁ (FB₁), which is the most common type of fumonisins, has been found in Indonesia since 1990s. It was reported that more than 50 % of analysed samples were contaminated with FB₁ (Yamashita et al. 1995; Ali et al. 1998; Maryam 2000; Tangendjaja et al. 2008; Martindah & Bahri 2016). For these reasons, FB₁ contamination of maize could be considered a substantial issue especially in Indonesia.

The examination of FB₁ in maize mainly uses chromatography, such as High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LCMS/MS), and immunoassay (ELISA) techniques. Despite that the chromatography has good accuracy and sensitivity; unfortunately, the sample preparation for chromatography methods still uses long protocol and high volume of solvent; therefore, it would be costly and time consuming. Besides that, HPLC or LC-MS/MS are high-tech instruments demanding a skillful user to operate the machine and process the data comprehensively. Because of these reasons, determination of FB₁ by chromatograph methods is not simple. Similarly, the ELISA method has several drawbacks because of the use of monoclonal or polyclonal antibodies. These antibodies have a role for recognising FB₁ and their reactions result a colour change after enzymatic reaction, such as horseradish peroxidase (HRP). However, the antibodies are costly because their productions use animals such as mice and rabbits. Moreover, the procedure for obtaining pure antibodies is time consuming. Besides that, the

characterisation of antibodies is unstable in harsh condition such as pH and temperature. Consequently, a better alternative approach will be required for determination of FB₁.

Recently, molecularly imprinted polymer (MIP) has been developed. These polymers could be more efficient than monoclonal or polyclonal antibodies in terms of the time of preparation, cost and stability. To generate MIP, it is not necessary to use animals. Also, the MIP can be obtained in a short time and have a long shelf life and resistance to high temperature and extreme pH, where antibody could be easily denatured. MIP is potential to replace antibodies in assay and sensor applications for the determination of fumonisins. Hence, MIP is called also as plastic antibody (Piloto et al. 2018). Therefore, the aim of this review is to report the application of MIP as plastic antibody for determination of fumonisin in animal feed and food including introduction, production, and application of MIP, and MIP application for other toxins in supporting food/feed safety in the future. This review is the first information on the application of MIP reported in this article.

MOLECULARLY IMPRINTED POLYMER (MIP) AS “THE SYNTHETIC ANTIBODY”

Molecularly imprinted polymer (MIP) is a synthetic polymer owning recognition sites formed covalently or incovalently from mix monomers solution using a target compound as a template for recognition sites formation through polymerisation reaction. Schematically, the illustration of MIP formation can be seen in Figure 1. Alexander et al. (2006) described that the template could be atom, ion, molecule, or micro-organisms. It seems that the application of MIP is versatile for many targets including fumonisins. Because of those, MIP is potential for replacing the function of antibody as molecular recognition. Historically, the research about MIP has been initiated by a Polyakov's article in 1931.

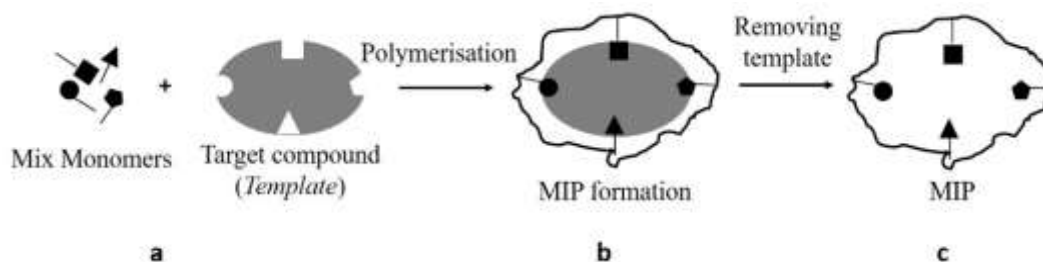


Figure 1. Illustration of molecularly imprinted polymer (MIP) formation: (a) Mixing all composition of MIP including functional monomers, crosslinkers, template, and solvent. (b) Generating MIP owning a specific cavity interacted covalently with template. (c) Removing a template to obtain MIP

This article mentioned the silica owning many pores because of the presence of the additive solvents such as benzene, toluene, and xylene (Alexander et al. 2006). This finding indicated that the silica might have the capability to uptake the additive agents and this phenomenon would become the first invention of molecular imprinting.

MIP COMPOSITION FOR FUMONISINS

The performance of MIP involves its composition role, including functional monomer, cross-linkers, initiator and solvent. All those materials are combined through polymerisation reaction surrounding the target compound in order to form the cavity of MIP. Also, the composition of MIP would affect the physical and chemical properties of MIP, such as particle size, solubility, selectivity, stability and rigidity. Therefore, in this part, the composition of MIP was mentioned in detail, including fumonisin as a target compound.

Fumonisin B₁ (FB₁), fumonisin B₂ (FB₂), and fumonisin B₃ (FB₃), have been used as a target for MIP production (De Smet et al. 2009; Smolinska-Kempisty et al. 2016; Munawar et al. 2018). This toxin has functional groups containing carboxyl (-CO₂H), hydroxyl (-OH), and primary amino (-NH₂) groups, as can be seen in Figure 2. These functional groups are the reactive sites of fumonisin and have the essential roles to cavity formation of MIP. Accordingly, the functional groups are one of the important factors considered for choosing the target compound.

Further, several functional monomers have been employed for initiating a cavity of MIP for fumonisin, such as 2-(diethylamino)ethyl methacrylate (DEAEM), 2-dimethylaminoethyl methacrylate (DMAEMA), methacrylic acid (MAA), Nisopropylacrylamide (NIPAm), ethylene glycol methacrylate phosphate (EGMP), and N-(3-Aminopropyl) methacrylamide

hydrochloride (NAPMA) (De Smet et al. 2009; Appell et al. 2014; Smolinska-Kempisty et al. 2016; Munawar et al. 2018). The high selectivity of the MIP for fumonisin could be affected by the strength of the fumonisin-monomer complex interaction involving the functionalities of functional monomers, such as hydroxyl, carbonyl, carboxyl, and amide. Because of having different functional groups, the functional monomers are divided regarding to pH (acid, base, and neutral) and charge (positive and negative). Besides that, the ratio of functional monomers to the template can affect the selectivity of the imprinted polymer (Andersson et al. 1999; Yilmaz et al. 1999). Hence, the formulation of functional monomers should be calculated correctly to obtain the higher selectivity of the imprinted polymer for fumonisins.

The crosslinker is a monomer/compound used to obtain the rigid matrix of the polymer to maintain the template-functional monomers interaction. These materials are like a glue that has two or more double bonds to form the rigid crosslinked network. For fumonisin cases, trimethylolpropane trimethacrylate (TRIM), ethylene glycol dimethacrylate (EDMA), N-tert-butylacrylamide (TBAm), and N,N'-methylene-bis-acrylamide (BIS) have been used (De Smet et al. 2009; Smolinska-Kempisty et al. 2016; Munawar et al. 2018; Munawar et al. 2019). The crosslinkers have at least three functions, controlling the morphology of polymer (swelling and mesh size) (Wong et al. 2015), stabilising the binding sites of the polymer (Mayes & Mosbach 1996; Yu & Mosbach 2000) and conveying the mechanical stability of matrix polymer (Mane et al. 2015). Thus, the performance of MIP could be affected by crosslinkers. However, not all of them can be compatible for generating the imprinted polymer. Thus, using the different type of crosslinkers would obtain the different performance of molecular imprinting.

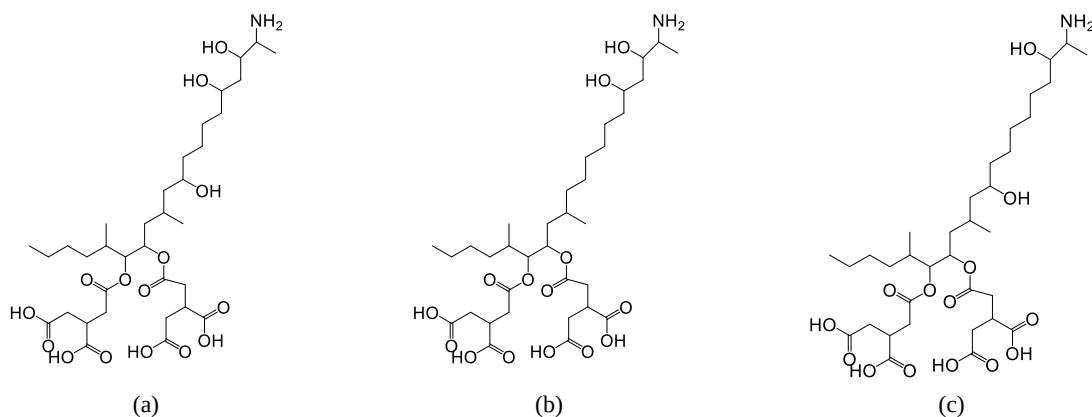


Figure 2. The structures of (a) fumonisin B₁ (FB₁), (b) fumonisin B₂ (FB₂), and (c) fumonisin B₃ (FB₃)

Source: Ren et al. (2011) with modification

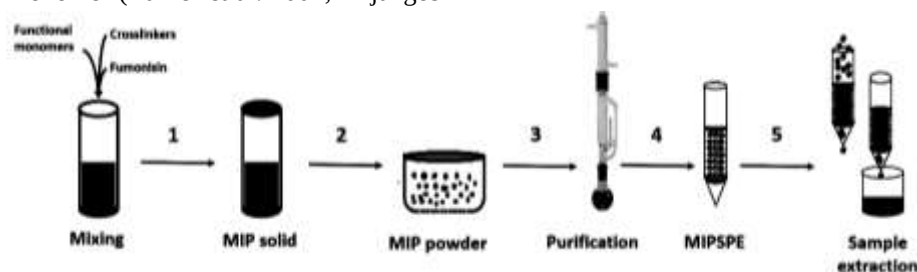
The initiator is an important part for initiating polymerisation of MIP production for fumonisin. For examples, ammonium persulfate (APS) and tetramethyl ethylene diamine (TEMED) (Munawar et al. 2018), and 2,2'-Azobis (2-methylpropionitrile) (AIBN) (De Smet et al. 2009; Zhang et al. 2017). The initiator is employed in propagation and termination on polymerisation reaction. These parts are a crucial moment for generating MIP. Commonly, the initiator can be working optimally under light, thermal, or chemical condition, and become a free radical component (Mijangos et al. 2006).

Finally, the solvent is the last component to generate the molecularly imprinting successfully. The solvent can facilitate a media for polymerisation reaction such as water, acetonitrile, and acetone (De Smet et al. 2009; Appell et al. 2014; Munawar et al. 2018). According to polarity, the type of solvent could be polar and nonpolar. Then, the polar solvent could be divided into protic and aprotic based on the abundance of O-H and N-H. Protic polar has more O-H and N-H than aprotic polar. This structure will impact to interaction with other components in polymerisation. The effect of those properties of solvent can influence binding capacity or interaction between the template and functional monomer (Turner et al. 2004; Mijangos

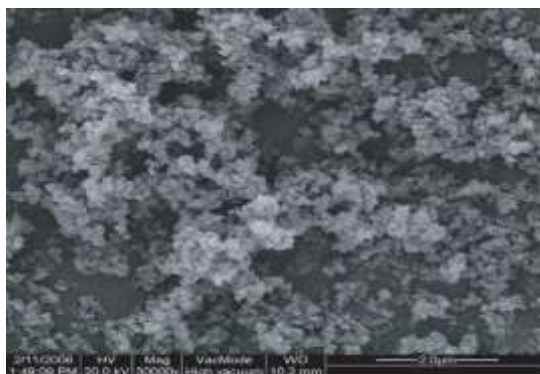
et al. 2006). Despite that there is lack of certain data, the solvent will impact the performance of the imprinted polymer. As previously stated, the solvent contributes to a mesh size of the polymer (Turner et al. 2004) because of the conformation of polymer to solvent.

MIP SYNTHESIS

The molecular imprinting is produced by polymerisation including initiation, propagation and termination. Unlike polyclonal and monoclonal antibodies, the MIP production does not need animal experiment and long procedures including animal immunization, culture cell and antibody purification as conducted by Ling et al. (2014). Despite that the MIP production is shorter straightforward than antibody production, the finding appropriate composition of MIP is not straightforward. For instance, Munawar et al (2018) need molecular modelling, which needs skillful capacity for operating it, for screening method to select a functional monomer. Another way, the best functional monomer for generating MIP can be selected by many experiments. This approach is not as expensive as the antibody studies.



(a)



(b)

Figure 3. (a) Production of MIP in micro size; (1) the mix materials such as functional monomers, cross-linkers, and fumonisin, are polymerized for solid MIP formation, (2) The produced MIP is ground, (3) the ground MIP is purified by soxhlet extraction, (4) the purified MIP is packed as MIPSPE (MIP-based solid phase extraction), (5) The MIPSPE is applied for sample extraction. (b) SEM image of MIP from bulk polymerisation on 30k magnification

Source: Modified from Chen et al. (2014) and De Smet et al. (2009)

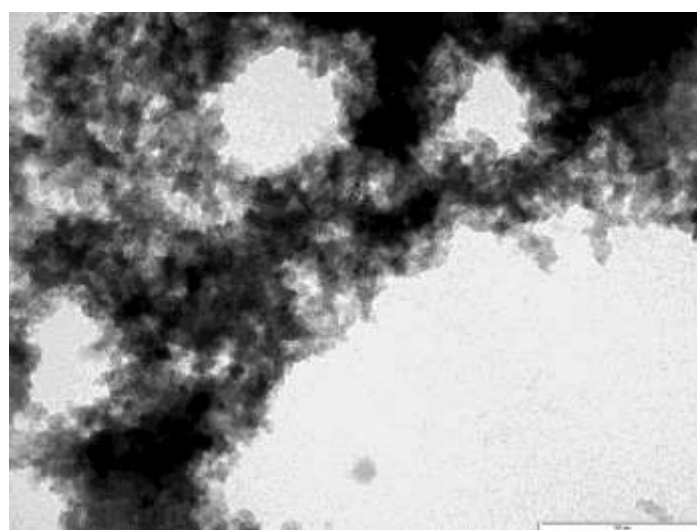
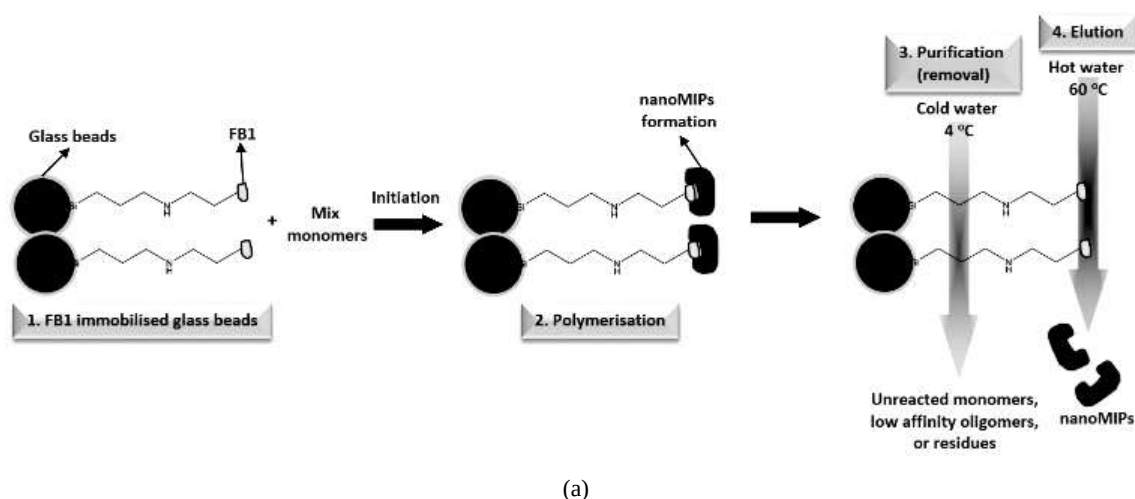


Figure 4. (a) production of MIP in nano size for FB₁: (1) FB₁ is bound on the glass beads, (2) the mix monomers are polymerized for nanoMIPs formation, (3) The residues, such as the low affinity MIP and unreacted monomers, are removed by cold water at 4°C and (4) The high-affinity nanoMIPs are collected by hot water at 60°C. (b) TEM image of nanoMIPs for FB₁ at 200k magnification

Source: Munawar et al. (2018)

De Smet et al. (2009) stated that the MIP for fumonisin was produced by bulk polymerisation. This simple procedure combines all materials in a vial glass. Afterward, the solution will be polymerized continuously being a solid polymer. This polymer will be ground to become powder. Finally, the MIP for fumonisin is used for binding fumonisin through solid phase extraction process (Figure 3(a)). The MIP produced by bulk polymerisation is in micro size. It seems that the MIP is visible clearly captured by scanning electron microscope (SEM). The image of the MIP for fumonisin B analogue is hard and random granular (Figure 3(b)). De Smet et al. (2009) showed that MIP is small anomalous polymer particles without circular particles.

Production of MIP in nano size can not be made by bulk polymerisation. Canfarotta et al. (2016) showed that solid phase synthesis method can be used for generating MIP in nano size, which is called nanoMIPs, using fumonisin-immobilised glass beads. These glass beads were employed for producing nanoMIPs through initiating the mix monomers to those glass beads. The thermal polymerisation was reached and its results had high affinity nanoMIPs, including monomer or compound residues. Consequently, cold water at 4°C was needed to remove the unknown materials and finally, hot water at 60°C was eluted to collect the nanoMIPs. Figure 4(a) illustrated the brief on how the nanoMIPs was produced by solid phase synthesis method. In addition, the image of MIP is different when MIP produced in

nano size. The image of nanoMIPs is usually seized by Transmission Electron Microscopy (TEM). Figure 4(b) is an example of the nanoMIPs for FB₂ appeared spherical and regular particles. Therefore, MIP can be more flexible size than antibody because the particle could be produced in either micro size or nano size. From this flexibility, MIP could be used for chemical or biological purposes.

MIP FOR FUMONISIN ANALYSIS IN ANIMAL FEED AND FOOD

MIP for sample preparation

The synthetic antibody or MIP has been used for extracting mycotoxin in rice, bell pepper, and maize by De Smet et al. (2009) and this material were called MISPE (molecularly imprinted solid-phase extraction). The performance of MISPE could be evaluated from the percentage of recovery signing the total of target compound extracted by MIP. Table 1 showed that the recovery of FB₁, FB₂, and FB₃ in rice and corn flakes is more than 60%; however, the high percentage of recovery >80% of those fumonisins is from bell pepper. Moreover, Bryła et al. (2013) reported that the percentage of recovery of fumonisin is higher than 90% in maize. These results are similar to previous experiment using clean-up column based on antibody and obtain the recovery percentage higher than 80% (De Girolamo et al. 2010). Accordingly, MIP based solid phase extraction enable to bind fumonisins with high selectivity and sensitivity.

Table 1. The percentage of recovery of FB₁, FB₂ and FB₃ from extraction sample of feed and food by molecularly imprinted based solid phase extraction (MISPE)

Samples	Recovery (%)	RSD (%)	References
Rice			De Smet et al. 2009
FB1	66 – 89	1 – 9	
FB2	62 – 75	1 – 8	
FB3	67	2	
Bell pepper			De Smet et al. 2009
FB1	81 – 86	1 – 5	
FB2	80 – 83	2 – 10	
FB3	80 – 81	4 – 6	
Corn flakes			De Smet et al. 2009
FB1	62 – 72	2 – 9	
FB2	71 – 75	2 – 8	
FB3	65 – 70	3 – 7	
Maize			Bryła et al. 2013
FB1	102 – 111	6 – 15	
FB2	91 – 101	13 – 20	
FB3	98 – 109	8 – 14	

De Smet et al. (2009) provided the powerful data for cross reactivity of produced MIP for fumonisins with other mycotoxins such as deoxynivalenol (DON), aflatoxin B₂ (AFB₂), aflatoxin G₂ (AFG₂), citrinin (CIT), T-2 toxin (T-2), ochratoxin A (OTA), zearalenone (ZEN) and HT-2 toxin (HT-2). Figure 5 showed that the comparison among MIP and commercial clean up columns such as C-18 and SAX cartridges are very competitive.

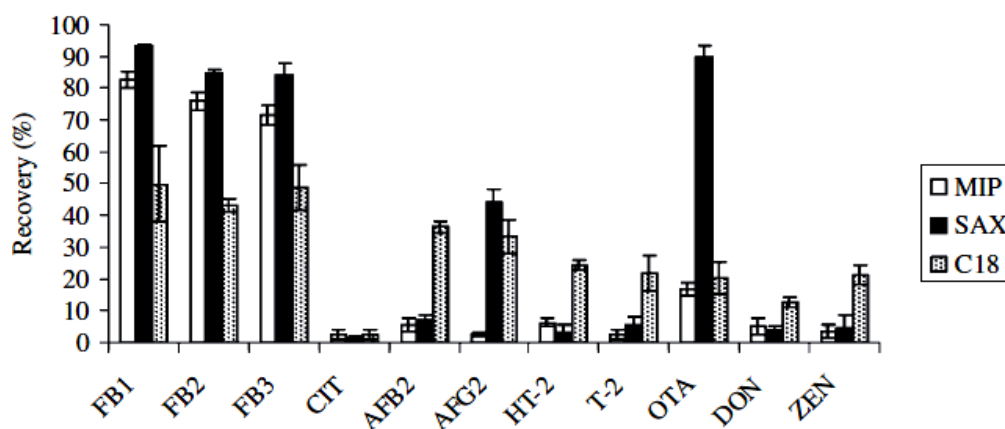


Figure 5. The percentage of recovery and cross reactivity of mycotoxins-spiked rice samples using MIP, C18 and SAX cartridges

Source: De Smet et al. (2009)

It means that MIP is reliable for sample extraction. Also, the interaction between MIP and other mycotoxins are negligible because the recovery percentage is lower than 20% in average for all mycotoxins. MIP could be employed alternatively for sample preparation and replacing the function of commercial materials.

MIP for fumonisin quantification

NanoMIP has been used for quantifying fumonisins. In the first application, nanoMIPs were replacing the function of antibody as molecular recognition for fumonisins in immunoassay system. Figure 6 illustrated how nanoMIPs was employed for replacing antibody in direct competitive assay. The MIP method for quantifying fumonisins is the same as the conventional ELISA including immobilisation, blocking reaction, enzyme-substrate addition, stopover process, and microplate reader measurement. Obviously, the MIP could be applied in immunoassays for quantifying fumonisins.

Munawar et al. (2018) reported that FB₁ can be detected in concentration range from 10 pM to 10 nM (Table 2). This interval was smaller than conventional ELISA based on antibody. Clearly, the sensitivity and selectivity of MIP in assay application were high, with recovery >90% (in maize samples) and detection limit was around 1.9 pM. Additionally, Smolinska-Kempisty et al. (2016) showed the same MIP application for fumonisin B2 (FB₂) (Table 2). Unfortunately, there was no data explaining the recovery percentage in the sample.

In addition, Munawar et al. (2019) mentioned that the correlation between Molecularly imprinted polymer nanoparticle-based assay (MINA) and other conventional methods (HPLC and ELISA) is relatively high even though the total of samples were limited (< 10 maize samples). MINA was positively correlated (0.5-0.9) with ELISA and HPLC (Figure 7). These results indicate that the performance of MINA is reliable for measuring FB₁ quantitatively. Unfortunately, this test needs more improvement because the data obtained from their study was few. Thus, it will be a challenge for other researchers for finding more information about the correlation between MINA and other conventional methods.

Next application, MIP could be used as receptor in electrochemical sensor platform. It was called MINES (molecularly imprinted polymer nanoparticles based electrochemical sensor) (Munawar 2018). Previously, Zhang et al. (2017) have used MIP for detecting fumonisin in milk and maize. The outstanding results were reported that the percentage recovery was higher than 90% and limit detection was 0.35 pg/mL in concentration interval from 0.001 to 100 ng/mL. Munawar (2018) stated that electrochemical sensor application has more benefits than immunoassays. For instance, the sensor system could be shorter in analysis time, easier in production, simpler in using chemical reagents, such as blocking solution, washing solution, enzymatic conjugate (Horseradish peroxidase-fumonisin complex), the enzymatic substrate (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)) and stop solution.

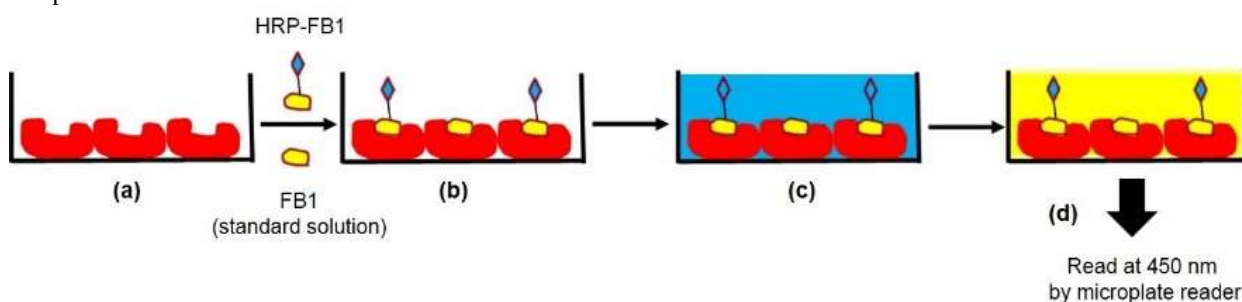


Figure 6. Illustration of MINA protocol; (a) NanoMIPs immobilisation, (b) HRP-FB₁ conjugate and FB₁ standard reaction competition, (c) Substrate addition. (d) stop solution addition, then measured the absorbance at 450 nm by microplate reader

Source: Munawar et al. (2018)

Table 2. The recovery of molecularly imprinted polymer based assays

Fumonisin	Concentration range	Recovery (%)	Limit detection	Samples	References
FB ₁	10 pM – 10 nM	108 – 113	1.9 pM	Maize	Munawar et al. (2018)
FB ₂	1 pM – 10 nM	NA*	6.1 pM	NA	Smolinska-Kempisty et al. (2016)

NA = not available

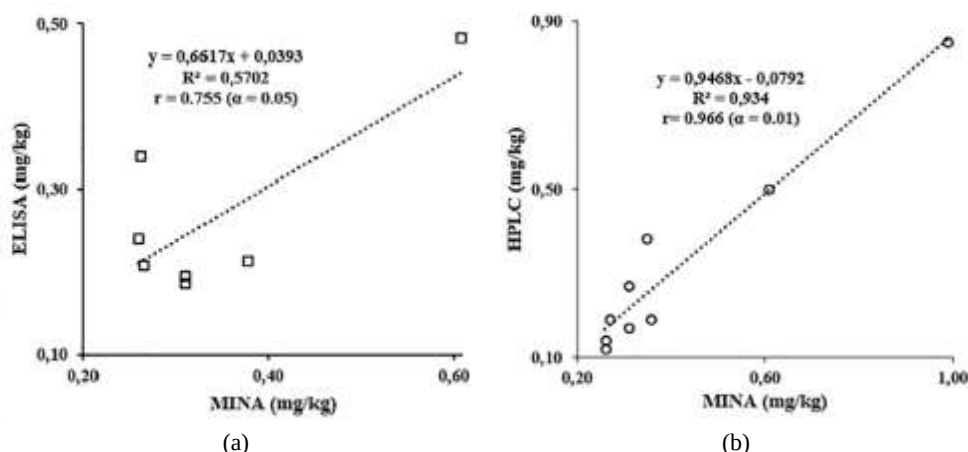


Figure 7. The correlation (a) between ELISA and MINA, and (b) between HPLC and MINA

Source: Munawar et al. (2019)

THE USE OF MIP FOR SUPPORTING FOOD/FEED SAFETY PROGRAMS

The MIP application is not only useful for fumonisin but also for other toxins in animal feed or food. Currently, the MIP technology could be used for supporting food/feed safety to prevent both human and animal health from contaminated food. By developing MIP, the innovation of detection techniques is more flexible, effective, and efficient than those based on antibody; therefore, developing the innovative detection techniques would be faster and these techniques would give a result immediately. Accordingly, the main purposes of food/feed safety program for maintaining animal and human healths would be achieved.

For the near future, Indonesian Research Centre for Veterinary Science will produce MIP to detect other toxins such as antibiotics, pesticides, and heavy metals for preventing toxicity in animal feed and products. Furthermore, MIP will also be applied in microbiology agents such as bacteria, fungal, virus, or other pathogen agents. Unfortunately, few MIP researchs have been reported in Indonesia and the obtained MIP is already made in micro size (Royani et al. 2012; Nurhamidah et al. 2017). Consequently, this issue will be a challenge for Indonesia, especially in Ministry of Agriculture to provide a facility and funding for producing MIP such as the software for finding the suitable composition of MIP and focus research on MIP development in nano scale for wider application both chemical and biological purposes for supporting feed/food safety program in Indonesia.

CONCLUSION

This review has demonstrated the application of MIP for fumonisin in feed and food comprehensively.

This article also illustrated how the MIP was produced in micro or nano sizes. The MIP benefits could be applied for sample preparation/extraction, such as molecularly imprinted solid phase synthesis (MISPE) for extracting rice, bell pepper, maize, and corn flakes with high recovery percentage. Furthermore, the MIP could be used for sample quantification such as molecularly imprinted polymer based assay (MINA) and sensing technologies with high recovery percentage and low detection limit compared to conventional methods (HPLC and Immunoassay). In future, MIP application for biological purposes will be useful to detect microorganism-based contamination in food.

REFERENCES

- Alexander C, Andersson HS, Andersson LI, Ansell RJ, Kirsch N, Nicholls IA, O'Mahony J, Whitcombe MJ. 2006. Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003. *J Mol Recognit.* 19:106-80.
- Ali N, Sardjono, Yamashita A, Yoshizawa T. 1998. Natural co-occurrence of aflatoxins and Fusarium mycotoxins (fumonisins, deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone) in corn from Indonesia. *Food Addit Contam.* 15:377-384.
- Andersson HS, Karlsson JG, Piletsky SA, Koch-Schmidt A-C, Mosbach K, Nicholls IA. 1999. Study of the nature of recognition in molecularly imprinted polymers, II: influence of monomer-template ratio and sample load on retention and selectivity. *J Chromatogr A.* 848:39-49.
- Appell M, Jackson MA, Wang LC, Ho C-H, Mueller A. 2014. Determination of fusaric acid in maize using molecularly imprinted SPE clean-up. *J Sep Sci.* 37:281-286. doi: 10.1002/jssc.201301065.

- Bryła M, Jędrzejczak R, Roszko M, Szymczyk K, Obiedziński MW, Sękul J, Rzepkowska M. 2013. Application of molecularly imprinted polymers to determine B1, B2, and B3 fumonisins in cereal products. *J Sep Sci.* 36:578-584. doi: 10.1002/jssc.201200753.
- Canfarotta F, Poma A, Guerreiro A, Piletsky S. 2016. Solid-phase synthesis of molecularly imprinted nanoparticles. *Nat Protocols.* 11:443-455.
- Chen J, Bai LY, Liu KF, Liu RQ, Zhang YP. 2014. Atrazine molecular imprinted polymers: Comparative analysis by far-infrared and ultraviolet induced polymerization. *Int J Mol Sci.* 15:574-587. doi: 10.3390/ijms15010574.
- De Girolamo A, Fauw DP, Sizoo E, Van Egmond H, Gambacorta L, Bouten K, Stroka J, Visconti A, Solfrizzo M. 2010. Determination of fumonisins B1 and B2 in maize-based baby food products by HPLC with fluorimetric detection after immunoaffinity column clean-up. *World Mycotoxin J.* 3:135-146.
- De Smet D, Dubruel P, Van Peteghem C, Schacht E, De Saeger S. 2009. Molecularly imprinted solid-phase extraction of fumonisin B analogues in bell pepper, rice and corn flakes. *Food Addit Contam.* 26:874-884.
- [EC] European Commission. 2006. Commission Recommendation of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding. *Off J Eur Union.* 49:7.
- [FDA] Food and Drug Administration. 2001. Guidance for industry: Fumonisin levels in human foods and animal feeds [Internet]. [accessed 11 December 2018]. Available from: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/guidance-industry-fumonisin-levels-human-foods-and-animal-feeds>
- Gaspardo B, Del Zotto S, Torelli E, Cividino SR, Firrao G, Della Riccia G, Stefanon B. 2012. A rapid method for detection of fumonisins B1 and B2 in corn meal using Fourier transform near infrared (FT-NIR) spectroscopy implemented with integrating sphere. *Food Chem.* 135:1608-1612. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.06.078.
- [IARC] International Agency for Research on Cancer. 2002. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. Lyon (France): WHO IARC. Vol. 82.
- Ling S, Pang J, Yu J, Wang R, Liu L, Ma Y, Zhang Y, Jin N, Wang S. 2014. Preparation and identification of monoclonal antibody against fumonisin B1 and development of detection by Ic-ELISA. *Toxicon.* 80:64-72.
- Mane S, Ponrathnam S, Chavan N. 2015. Effect of chemical cross-linking on properties of polymer microbeads: A review. *Can Chem Trans.* 3:473-485.
- Martindah E, Bahri S. 2016. Kontaminasi mikotoksin pada rantai makanan. *Wartazoa.* 26:115-124.
- Maryam R. 2000. Contamination of Fumonisins on raw materials and chicken feed in West Java. In: *Proceeding of National Seminar on Livestock and Veterinary.* Bogor (Indonesia): Indonesian Center for Animal Research and Development. p. 538-542.
- Mayes AG, Mosbach K. 1996. Molecularly imprinted polymer beads: suspension polymerization using a liquid perfluorocarbon as the dispersing phase. *Anal Chem.* 68:3769-3774.
- Mijangos I, Navarro-Villoslada F, Guerreiro A, Piletska E, Chianella I, Karim K, Turner A, Piletsky S. 2006. Influence of initiator and different polymerisation conditions on performance of molecularly imprinted polymers. *Biosens Bioelectron.* 22:381-387.
- Munawar H. 2018. Development of Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles Based Assay and Sensor for Fumonisin B1. University of Leicester.
- Munawar H, Safaryan AHM, Girolamo A De, Garcia-Cruz A, Marote P, Karim K, Lippolis V, Pascale M, Piletsky SA. 2019. Determination of Fumonisin B1 in maize using molecularly imprinted polymer nanoparticles-based assay. *Food Chem.* 298:125044. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.125044.
- Munawar H, Smolinska-Kempisty K, Cruz AG, Canfarotta F, Piletska E, Karim K, Piletsky SA. 2018. Molecularly imprinted polymer nanoparticle-based assay (MINA): Application for fumonisin B1 determination. *Analyst.* 143:3481-3488. doi: 10.1039/c8an00322j.
- [NSA] National Standardization Agency of the Republic Indonesia. 2009. Mycotoxin maximum level content on food. Jakarta (Indonesia): National Standardization Agency of the Republic Indonesia.
- Nurhamidah, Marinda P, Koeyanti E, Royani I. 2017. Pembuatan *Molecularly Imprinted Polymer* (MIP) melamin menggunakan metode cooling-heating. In: *Prosiding Seminar Nasional Fisika.* Jakarta (Indonesia): Universitas Negeri Jakarta. p. 45-50.
- Piloto AM, Ribeiro DSM, Rodrigues SSM, Santos C, Santos JLM, Sales MGF. 2018. Plastic antibodies tailored on quantum dots for an optical detection of myoglobin down to the femtomolar range. *Sci Rep.* 8:1-11. doi: 10.1038/s41598-018-23271-z.
- Ren Y, Zhang Y, Han S, Han Z, Wu Y. 2011. Simultaneous determination of fumonisins B1, B2 and B3 contaminants in maize by ultra high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta.* 692:138-145. doi: 10.1016/j.aca.2011.03.005.
- Royani I, Widayani, Abdullah M, Khairurrijal. 2012. Pembuatan polimer MIP (*Molecularly Imprinted Polymer*) atrazin untuk diaplikasikan sebagai material sensor. In: *Prosiding Seminar Nasional Material 2012.* Bandung (Indonesia): Institut Teknologi Bandung. p. 77-79.

- Smolinska-Kempisty K, Guerreiro A, Canfarotta F, Cáceres C, Whitcombe MJ, Piletsky S. 2016. A comparison of the performance of molecularly imprinted polymer nanoparticles for small molecule targets and antibodies in the ELISA format. *Sci Rep.* 6:37638. doi: 10.1038/srep37638.
- Tangendjaja B, Rachmawati S, Wina E. 2008. Mycotoxin contamination on corn used by feed mills in Indonesia. *Indones J Agric Sci.* 9:68-76.
- Turner NW, Piletska EV, Karim K, Whitcombe M, Malecha M, Magan N, Baggiani C, Piletsky SA. 2004. Effect of the solvent on recognition properties of molecularly imprinted polymer specific for ochratoxin A. *Biosens Bioelectron.* 20:1060-1067.
- Wong RSH, Ashton M, Dodou K. 2015. Effect of crosslinking agent concentration on the properties of unmedicated hydrogels. *Pharmaceutics.* 7:305-319.
- Yamashita A, Yoshizawa T, Aiura Y, Sanchez PC, Dizon EI, Arim RH, Sardjono. 1995. *Fusarium mycotoxins* (fumonisins, nivalenol, and zearalenone) and aflatoxins in corn from Southeast Asia. *Biosci Biotechnol Biochem.* 59:1804-1807.
- Yilmaz E, Mosbach K, Haupt K. 1999. Influence of functional and cross-linking monomers and the amount of template on the performance of molecularly imprinted polymers in binding assays. *Anal Commun.* 36:167-170.
- Yu C, Mosbach K. 2000. Influence of mobile phase composition and cross-linking density on the enantiomeric recognition properties of molecularly imprinted polymers. *J Chromatogr A.* 888:63-72.
- Zhang W, Xiong H, Chen M, Zhang X, Wang S. 2017. Surface-enhanced molecularly imprinted electrochemiluminescence sensor based on Ru@SiO₂ for ultrasensitive detection of fumonisin B1. *Biosens Bioelectron.* 96:55-61. doi: 10.1016/j.bios.2017.04.035.

Efikasi, Mekanisme dan Resistensi Antiviral Neuraminidase Inhibitor dan Adamantane pada Avian Influenza

(Efficacy, Mechanism and Antiviral Resistance of Neuraminidase Inhibitors and Adamantane against Avian Influenza)

Dyah Ayu Hewajuli dan NLP Indi Dharmayanti

Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl. R.E. Martadinata No. 30, Bogor 16114
Kontributor utama: dhewajuli@yahoo.com

(Diterima 22 Februari 2019 – Direvisi 29 April 2019 – Disetujui 4 Juni 2019)

ABSTRACT

Vaccination and antiviral drug are often used to control influenza. However, the effectiveness of vaccine was impaired due to the emergence of new variant of virus strain. Antiviral drug consists of prophylactic and curative substances, namely M2 ion channel inhibitors (adamantane; amantadine and rimantadine) and neuraminidase (NA) inhibitors (NAIs; oseltamivir, zanamivir, peramivir, laninamivir). The synthesis and modification of antiviral neuraminidase (NA) inhibitors (NAIs) and adamantanes increased the antiviral effectiveness. The mechanism of the neuraminidase inhibitor is to prevent influenza infection by inhibiting the release of the virus from internal cells. Adamantane is antiviral drug that selectively inhibits the flow of H⁺ ions through M2 protein to prevent the uncoating virus particles getting into the endosome. The substitution of (H275Y, S247N, I223L, K150N, R292K, I222T, R152K, R118K, E119V) on NA protein caused resistance of avian influenza virus against the neuraminidase inhibitor. The combination of mutations (S247N, I223L, K150N) increased the resistance of influenza A (H5N1) virus. The diffusion of adamantane resistance varies among HA subtypes, the species of host, the period of isolation, and region. Mutations at residues of 26, 27, 30, 31 or 34 transmembrane M2 protein caused adamantane resistance. The unique substitution (V27I) of M2 protein of clade 2.3.2 H5N1 subtype isolated in Indonesia in 2016 has been contributed to the amantadine resistance. Antiviral combination of M2 ion channel inhibitors and neuraminidase (NA) inhibitors is effective treatments for the resistance.

Key words: Adamantane, neuraminidase inhibitor, resistance, avian influenza

ABSTRAK

Vaksinasi dan pengobatan dengan antiviral merupakan pengendalian untuk mengatasi influenza. Kegagalan efektivitas vaksin sering terjadi karena munculnya varian *strain* virus. Terdapat dua jenis obat antiviral yaitu profilaktik dan kuratif yaitu *M2 ion channel inhibitors* (adamantane; amantadin dan rimantadin) dan *neuraminidase (NA) inhibitors* (NAIs; oseltamivir, zanamivir, peramivir, laninamivir). Sintesis dan modifikasi *neuraminidase (NA) inhibitors* (NAIs) dapat meningkatkan efikasi antiviralnya. Mekanisme *inhibitor* neuraminidase adalah mencegah infeksi dengan cara menghambat pelepasan virus dari sel inang. Adamantane merupakan obat antiviral yang menghambat secara selektif aliran ion H⁺ yang melalui saluran protein M2 sehingga mencegah partikel virus *uncoating* masuk ke dalam endosom. Substitusi H275Y, S247N, I223L, K150N, R292K, I222T, R152K, R118K, E119V pada protein NA menyebabkan resistensi virus avian influenza terhadap *neuraminidase inhibitor*. Kombinasi mutasi (S247N, I223L, K150N) meningkatkan resistensi virus influenza A (H5N1). Penyebaran resistensi adamantane dilaporkan bervariasi diantara subtype HA, spesies inang, periode isolasi, dan wilayah. Mutasi pada residu 26, 27, 30, 31 atau 34 protein M2 domain transmembran menyebabkan resistensi adamantane. Substitusi unik (V27I) pada protein M2 subtype H5N1 clade 2.3.2 yang diisolasi di Indonesia pada tahun 2016 berkontribusi terhadap resistensi amantadin. Kombinasi antiviral (*M2 ion channel inhibitors* dan *neuraminidase inhibitors* bersifat efektif untuk pengobatan influenza A yang telah resisten terhadap *neuraminidase inhibitor*.

Kata kunci: Adamantane, *neuraminidase inhibitor*, resistensi, avian influenza

PENDAHULUAN

Vaksinasi dan pengobatan dengan antiviral merupakan strategi yang sering digunakan untuk mengatasi penyakit influenza (Lee et al. 2015). Vaksinasi adalah program utama untuk pencegahan dan pengendalian epidemik influenza musiman. Selain itu,

terdapat dua kelas obat antiviral yang direkomendasikan untuk profilaktik dan pengobatan infeksi virus influenza yaitu *M2 ion channel inhibitors* (adamantane; amantadin dan rimantadin) dan *neuraminidase (NA) inhibitors* (NAIs; oseltamivir, zanamivir, peramivir, laninamivir). Namun demikian, resistensi virus influenza terhadap obat antiviral *M2 ion*

channel inhibitors dan *neuraminidase (NA) inhibitors* telah banyak dilaporkan akhir-akhir ini. Jumlah dan penyebaran virus influenza yang resisten terhadap adamantane bervariasi diantara sub tipe HA yang berbeda, spesies inang, tahun isolasi, dan wilayah geografis (Dong et al. 2015). Proses *shedding* virus AI yang berlangsung lama menyebabkan penularan virus AI yang resisten terhadap antiviral NAI kepada individu lainnya. Varian virus AI yang resisten terhadap obat antiviral dapat bereplikasi secara efisien dan dapat ditularkan dari satu individu ke individu lainnya tanpa menurunkan patogenitasnya. Resistensi virus AI terhadap obat antiviral NAI disebabkan oleh penggunaan antiviral secara terus menerus (Hu et al. 2013).

Pengobatan infeksi virus AI yang bertujuan untuk profilaksis di peternakan unggas secara intensif di beberapa wilayah di Cina berkontribusi terhadap peningkatan resistensi virus AI sub tipe H5N1 terhadap amantadin sampai 83,3 % (He et al. 2008). Virus AI sub tipe H5N1 yang mengalami mutasi dan resisten amantadin kemungkinan merupakan introduksi dari luar (Dharmayanti et al. 2014). Resistensi virus AI terhadap obat antiviral dapat disebabkan oleh mutasi virus pada protein M2 dan NA. Substitusi R299K pada protein NA yang diperoleh dari rekombinasi strain virus AI menimbulkan resistensi virus AI terhadap antiviral golongan NAIs tetapi tidak menyebabkan resistensi terhadap obat antiviral golongan *M2 ion channel inhibitor* (M2I) (Zhang et al. 2014).

Substitusi asam amino (I222K, I222R, I222T) protein NA menyebabkan penurunan sensitivitas virus AI terhadap antiviral golongan NAIs. Lebih lanjut, mutasi ganda I222K dan H274Y menyebabkan resistensi virus AI terhadap oseltamivir (NAIs) (Huang et al. 2014). Perubahan asam amino pada domain transmembran protein M2 (L26F, V27A, V27T, V27S, A30T, S31N, G34E) merupakan *marker* genetik resistensi amantadin. Sebagian besar virus influenza yang resisten terhadap amantadin dapat mempunyai satu atau lebih perubahan asam amino tersebut (Dharmayanti et al. 2010). Mutasi ganda V27A dan S31N dapat meningkatkan kadar resistensi virus AI terhadap amantadin (Durrant et al. 2015). Substitusi asam amino V27I pada domain transmembran protein M2 virus HPAI *clade* 2.3.2 asal Indonesia berperan terhadap resistensi amantadin (Hewajuli 2017). Mutasi

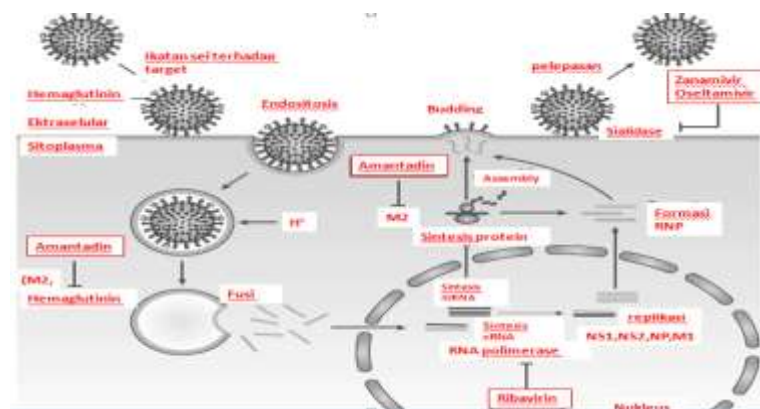
tunggal V27I atau ganda (V27I dan L26F) pada virus AI asal unggas dan manusia kemungkinan berpengaruh terhadap resistensi amantadin (Liang et al. 2016a).

Resistensi virus AI terhadap antiviral yang disebabkan mutasi pada protein M2 dan NA harus diperhatikan dan diwaspadai (Dong et al. 2015). Oleh karena itu, pengembangan kombinasi obat anti influenza sangat diperlukan dalam menghadapi epidemi influenza yang kemungkinan bisa terjadi di masa datang. Pengobatan dengan kombinasi antiviral *M2 ion channel inhibitor* (adamantadane) dan NAIs dipakai untuk menekan penyebaran resistensi virus AI terhadap antiviral. Tiga kombinasi antiviral amantadin, oseltamivir dan ribavirin efektif untuk terapi HPAI yang masih sensitif atau sudah resisten terhadap antiviral amantadin (Nguyen et al. 2012). Bahkan, efikasi tiga kombinasi tersebut lebih tinggi daripada pengobatan tunggal atau dua kombinasi antiviral (Hoopes et al. 2011).

Makalah ini bertujuan untuk mengkaji efikasi dan mekanisme obat antiviral golongan *M2 ion channel inhibitors* (adamantadane) dan NAIs untuk AI serta resistensi virus AI terhadap kedua golongan obat tersebut.

INFEKSI VIRUS AVIAN INFLUENZA PADA SEL INANG

Virus influenza menginfeksi sel epitel saluran pernafasan, meskipun demikian sel kekebalan seperti makrofag pada saluran pernafasan dan dendritik juga peka terhadap infeksi virus influenza (Short et al. 2012). Infeksi virus influenza pada sel diawali dengan tahap penempelan (*attachment*) glikoprotein HA virus pada asam sialat yang diekspresikan oleh glikoprotein dan glikolipid pada permukaan sel target. Mutasi pada protein HA dapat mengganggu stabilitas dan meningkatkan pH pada waktu fusi. Stabilitas dan aktivitas fusi HA berpengaruh terhadap penularan virus avian influenza H1N1 ke babi. Karakter fusi protein HA yang spesifik pada inang kemungkinan menjadi barrier penularan virus influenza dari unggas ke babi dan dari babi ke manusia (Baumann et al. 2016). Mekanisme infeksi virus influenza ke dalam sel dan target terapi ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Siklus hidup virus influenza dan target terapi

Sumber: Adaptasi dari Von Itzstein (2007)

Virus memasuki sel (*internalization*) melalui endositosis yang diperantarai reseptor (*receptor-mediated endocytosis*). Reseptor bersifat spesifik, tetapi identifikasi terhadap reseptor spesifik belum banyak dilaporkan (De Conto et al. 2011). Reseptor atau ligan virus influenza adalah *sialic acid-galactose* (*Sia-Gal*) atau asam sialat-galaktosa, terdiri dari asam sialat-galaktosa α 2,3 dan asam sialat-galaktosa α 2,6. Asam sialat-galaktosa α 2,3 lebih spesifik berikatan dengan virus influenza unggas tetapi asam sialat-galaktosa α 2,6 lebih spesifik berikatan dengan virus influenza manusia (Matrosovich et al. 1997). Reseptor asam sialat-galaktosa α 2,3 dan α 2,6 dapat dideteksi di saluran pernafasan (paru-paru dan bronkus) manusia. Unggas mempunyai reseptor asam sialat-galaktosa α 2,3 dan α 2,6 pada saluran pernafasan dan saluran pencernaan meskipun terdapat perbedaan jumlah diantara spesies. Spesifisitas reseptor asam sialat berpengaruh terhadap kerentanan infeksi dan *shedding* virus (Franca et al. 2013). Residu asam amino 158N dan 169N pada protein HA juga berperan sebagai reseptor virus avian influenza (Chen et al. 2012). Jumlah dan struktur N-glikan pada *receptor binding pocket* menentukan jenis inang dan patogenitas virus influenza (Wagner et al. 2000).

Faktor lain yang menentukan prevalensi, *shedding*, gejala penyakit yang ditimbulkan infeksi virus HPAI adalah inang dan *strain* virus (Franca et al. 2013). Virus AI yang bermutasi pada protein HA yang disebabkan adaptasi dengan mamalia berpotensi menular ke mamalia (Belser et al. 2018). Komposisi *receptor binding site* menentukan kemampuan prevalensi virus AI. Virus AI yang menyebabkan pandemik influenza mempunyai aviditas yang tinggi terhadap *human receptor* sehingga kemungkinan berpotensi menginfeksi manusia. Mutasi pada protein HA dari *avian receptor* menjadi *human receptor* akan menurunkan aviditasnya untuk berikatan dengan *avian receptor* (Vachieri et al. 2014). Meskipun demikian,

virus AI yang masih mengenal *avian receptor binding* beresiko rendah untuk menular ke manusia (Yang et al. 2015).

Virus AI yang sudah berikatan dengan reseptor akan melakukan fusi dengan membran sel endosom/endositosis. Endositosis pada sel dengan kondisi *non polar* dapat terjadi melalui *classical clathrin-mediated endocytic* (CME), *clathrin and caveolae-independent* dan *macropinocytosis* tetapi endositosis pada kondisi polar hanya dapat dilalui melalui *clathrin-mediated endocytic* serta memerlukan protein Eps15. Protein tersebut merupakan adaptor yang berinteraksi dengan Epsin1, AP180, dan *synaptojanin* melalui domain *Eps homology* (EH) dan membawa protein adaptor AP-2 menuju membran plasma (Zhang & Whittaker 2014). Internalisasi virus ke sel inang diperantarai oleh *coreceptor*. DC-SIGN dan L-SIGN adalah *CLR mannose-specific* merupakan faktor perekat yang mempengaruhi berbagai virus yang berbeda. Mutasi AA dan DEL dari DC-SIGN / L-SIGN tidak berpengaruh terhadap kemampuan pengikatan virus AI tetapi menurunkan kemampuan endositosis (Gillespie et al. 2016)

Proses endositosis dipengaruhi oleh pH. Kondisi endosom dengan pH 6 - 6,5 serta konsentrasi Na^+ tinggi dan K^+ rendah dapat mengaktifkan M2 *ion channel*, menyebabkan aliran proton dan K^+ dari partikel virus. M2 *ion channel* virus berperan dalam pengasaman partikel virus sehingga terjadi proses depolimerisasi protein M1 yang menyebabkan disosiasi protein M1 dari *viral ribonucleoprotein* (vRNPs). Endosom yang sudah matang mempunyai pH 5,4 - 6 serta konsentrasi Na^+ rendah dan K^+ tinggi kemudian K^+ mengalir melalui M2 *ion channel*. Konsentrasi K^+ tinggi dan pH rendah menyebabkan disosiasi protein M1 dari amplop virus dan *viral ribonucleoprotein* (vRNPs) (Stauffer et al. 2014).

Partikel vRNP dilepas ke nukleus dan terjadi transkripsi dan translasi. Replikasi genom virus dimulai

dengan sintesis mRNA ditranslasi menjadi beberapa protein. Perakitan virion terjadi pada permukaan sel kemudian terjadi pelepasan virion. Semua protein HA, NA, M2 dan M1 menyebabkan pelepasan *virus like particle* (VLP). Diantara beberapa protein virus, protein HA dan NA berperan pada awal terjadinya proses pelepasan partikel virus (Wang et al. 2010).

Protein HA dan NA mampu mengubah elastisitas membran. Kandungan lemak dalam protein HA dan NA berfungsi untuk mempengaruhi elastisitas membran yang akan mengawali proses pelepasan virus (Wang et al. 2010). Fungsi protein NA secara spesifik adalah memecah asam sialat, mencegah penempelan kembali virion pada sel membran serta mendorong pelepasan virion baru (Boulo et al. 2007). Virion progeni dilepaskan dengan mengkatalisis pembelahan residu terminal asam sialat dari protein seluler dan virus yang diperankan oleh protein NA sebagai enzim yang berfungsi sebagai sialidase yaitu enzim yang memecah reseptor. *N-Acetyl-2,3-dehydro-2-deoxyneuraminic acid* (Neu2enAc) dalam musin menunjukkan bahwa inang menghambat NA. Molekul Neu2enAc dihasilkan oleh aktivitas sialidase dalam saliva (Cohen et al. 2013).

PROTEIN NEURAMINIDASE DAN M2 PROTON CHANNEL

Protein neuraminidase virus influenza A adalah reseptor penghancur enzim yang berfungsi membelah asam sialat glikoprotein seluler yang diekspresikan dalam sel yang terinfeksi dan glikoprotein virus yang dirakit menjadi virion. Hal ini akan mencegah HA menempel pada partikel virus yang baru muncul di permukaan sel dan terjadi pelepasan virus (Palese et al. 1974). Struktur kompleks NA dengan 2-deoxy-2,3-dehydro-N-acetyl *neuraminic acid* (DANA) dapat digunakan untuk mengidentifikasi dan mengkarakterisasi bagian katalisis enzim. Domain tangkai bersifat variabel, berperan dalam adaptasi virus avian influenza dari unggas air ke unggas. Mutasi delesi asam amino pada bagian tangkai protein NA berpengaruh terhadap efisiensi replikasi virus AI (Li et al. 2010).

Asam sialat (Sia) sekunder dari bagian pengikat asam sialat hanya ditemukan di beberapa strain virus AI. Protein NA dari subtype tertentu virus AI seperti N9 mempunyai situs asam sialat sekunder dan situs *hemadsorption* (Hb) yang berperan sebagai perantara ikatan terhadap asam sialat. Protein NA dari virus subtype N9 yang mempunyai situs Hb aktif dapat meningkatkan ikatan terhadap reseptor asam sialat $\alpha_2,6$ di manusia sehingga kemungkinan dapat mempermudah penularan virus AI antar manusia (Benton et al. 2017).

Filamen virus AI berperan terhadap infeksi virus pada sel inang. Partikel virus AI yang berbentuk filamen mempunyai luas permukaan lebih besar daripada bentuk spiral. Strain virus yang berbentuk filamen akan berbuah secara gradual menjadi bentuk spiral apabila strain tersebut mengalami pasase berulang-ulang di telur ayam berembrio (Seladi-Schulman et al. 2013). Morfologi partikel virus AI berpengaruh terhadap aktivitas glikoprotein NA. Aktivitas NA yang lebih besar dapat meningkatkan kemampuan pelepasan virus AI dari sel yang terinfeksi kemudian menyebar ke sel target yang baru di saluran pernafasan (Seladi-Schulman et al. 2014).

Selain protein NA, protein M juga berfungsi terhadap penyebaran virus AI. Protein M2 influenza A adalah saluran ion proton yang membentuk proton tetramer selektif dan dipengaruhi pH. Kestabilan pembukaan dan penutupan saluran dipengaruhi oleh potensi membran, pH, ligan, aktivitas kinetik dan termodinamik, dan suhu (Gu et al. 2011). Virus dalam endosom dengan pH rendah akan mengaktifkan M2 ion channel sehingga proton mengalir ke dalam interior virus avian influenza (Thomaston et al. 2015).

Protein M2 terdiri dari 96 residu yang akan membentuk struktur *homotetrameric*. Struktur domain protein M2 virus avian influenza terdiri dari *extodomain* (ED), *transmembrane domain* (TMD) dan *C-terminal domain* (CTD) yang terdiri dari *amphiphatic helix* (APH) dan *cytoplasmic tail* (CT). Residu asam amino 45 - 62 pada CTD membentuk APH dan CT disusun oleh residu asam amino 63 - 97 (Thaa et al. 2011). M2 memiliki heliks transmembran tunggal yang tetramer untuk membentuk pori-pori konduksi. His37 terletak di dekat pusat heliks transmembran M2 yang berfungsi sebagai pH sensor yang mengaktifkan saluran dengan menurunkan pH mendekati 6,0. Trp41 yang terletak disamping His37 sebelum C terminal dan interior virus berfungsi sebagai pintu yang tergantung pH untuk konduksi proton (Hu et al. 2012).

Strain virus yang mampu mempertahankan anion halida di luar pori dapat mempertahankan tingkat konduksi proton yang stabil tanpa dipengaruhi massa konsentrasi anion (Dong et al. 2014). Semua tahap perpindahan proton dalam difusi proton terjadi melalui saluran M2 influenza A, termasuk protonasi atau deprotonasi His37. Kadar pH yang diturunkan secara bertahap membuka pintu Trp41 dan menurunkan deprotonasi penyaring His37 sehingga menyebabkan aktivasi saluran. Namun demikian, helik *amphipatic* pada C terminal tidak berpengaruh secara signifikan terhadap mekanisme konduksi proton pada saluran transmembran M2 influenza A tetapi 4 helik yang mengapit saluran transmembran M2 influenza A menentukan mekanisme konduksi proton (Liang et al. 2016b).

OBAT ANTIVIRAL GOLONGAN NEURAMINIDASE INHIBITOR

Beberapa jenis antiviral untuk pengobatan infeksi influenza telah tersedia di berbagai negara. Obat antiviral dibedakan menjadi dua golongan yaitu *Neuraminidase inhibitor* (NAI) dan *M2 ion channel inhibitors*. Golongan *neuraminidase inhibitor* terdiri dari oseltamivir, zanamivir dan peramivir. Obat antiviral amantadin dan rimantadin termasuk golongan *M2 ion channel inhibitors*. Obat klinik yang berfungsi melawan infeksi virus influenza adalah NA inhibitor influenza, *M2 ion channel inhibitor*, RNA-dependent RNA polymerase inhibitor dan protease inhibitor.

Obat antiviral golongan *neuraminidase inhibitor* seperti zanamivir, laninamivir, oseltamivir dan peramivir tersedia secara komersial dan telah direkomendasikan untuk pengobatan dan profilaksis infeksi virus influenza. Mekanisme obat ini adalah mencegah infeksi influenza dengan menghambat pelepasan virus dari sel inang (Russell et al. 2006). Golongan antiviral *neuraminidase inhibitor* yang digunakan untuk pengobatan dan profilaksis avian influenza ditunjukkan pada Tabel 1.

Tamiflu® (oseltamivir phosphate, 1) merupakan obat antiviral *neuraminidase inhibitor* yang biasanya diberikan secara per oral untuk pengobatan dan profilaksis influenza H5N1. Tamiflu® (oseltamivir

phosphate, 1) harus diberikan kepada pasien influenza selambat-lambatnya 36-48 jam setelah timbulnya gejala klinis dengan dosis 150 mg per hari. Derivat oseltamivir phosphonate bersifat lebih efektif melawan infeksi virus H1N1 dan H5N1 dibandingkan derivat oseltamivir. Sintesis tamiflu melalui pendekatan semisintetik dimulai dari (-) - asam shikimic, tetapi belum memenuhi kebutuhan pasar. Hasil sintesis sekitar 5-57% tergantung pada jumlah tahap dalam sintesis dan bahan dasar yang digunakan (Kalashnikov et al. 2013).

Obat antiviral golongan *neuraminidase inhibitor* yang bersifat sialidase, 4-guanidino-2,4-dideoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminic acid (4-guanidino-Neu5Ac2en) mampu menghambat pertumbuhan virus influenza A dan B yang bersifat sialidase dibandingkan dengan amantadin, rimantadin, dan ribavirin (Woods et al. 1993). Munculnya subtype H5N1 virus avian influenza (AIV) yang sangat patogenik dan tipe baru dari influenza manusia A (H1N1) menjadi pertimbangan untuk pengembangan obat anti-influenza yang lebih efektif untuk melawan virus yang telah resisten, yaitu 3- (p-tolyl) allyl-Neu5Ac2en yang efektif menghambat infeksi virus influenza sialidase. Obat antiviral 3- (p-tolyl) allyl-Neu5Ac2en mencegah ikatan dengan bagian aktif NA grup 1 yang telah resisten terhadap oseltamivir serta NA virus pandemik H1N1 2009 (09N1) (Rudrawar et al. 2010).

Tabel 1. Obat antiviral golongan *neuraminidase inhibitor* yang digunakan untuk pengobatan dan profilaksis avian influenza

Antiviral	Nama kode	Nama kimia	Nama dagang	Cara pemberian
Oseltamivir	GS4104	ethyl(3R,4R,5S)-4-acetamido-5-amino-3-pentan-3-yloxy-cyclohexene-1-carboxylate;phosphoric acid	Tamiflu [®]	Oral
Zanamivir	139110-80-8	2R,3R,4S)-3-acetamido-4-(guanidino)-2-[(1R,2R)-1,2,3-trihydroxypropyl]-3,4-dihydro-2H-pyran-6-carboxylic acid	Relenza [®]	Oral Inhalasi
Peramivir	BCX-1812 dan RWJ-270201	(1S,2S,3S,4R)-3-[(1S)-1-acetamido-2-ethylbutyl]-4-(diaminomethylideneamino)-2-hydroxycyclopentane-1-carboxylic acid	Rapivab [®]	Intravena
Laninamivir	R-125489	2R,3R,4S)-3-acetamido-4-(guanidino)-2-[(1R,2R)-2,3-dihydroxy-1-methoxypropyl]-3,4-dihydro-2H-pyran-6-carboxylic acid	Inavir [®]	Oral Inhalasi

Sumber: Kim et al. (1997); Von Itzstein et al. (1993); Babu et al. (2000); Yamashita et al. (2009)

Zanamivir disintesis pertama kali menggunakan asam sialat Neu5Ac. Awalnya Neu5Ac dikonversi menjadi etilester, yang diberi perlakuan asam anhidrid dalam asam asetat yang mengandung asam sulfur. Selain itu, zanamivir juga disintesis dengan bahan lain seperti *D-glucono- lactone*, *(E)-4-methoxybenzyloxy-2-butanal*. Dua turunan *C4-thiocarbamido* dapat disintesis dari zanamivir dengan metode ini (Zhu et al. 2012). Laninamivir (R-125489) adalah antiviral golongan *neuraminidase inhibitor* yang efektif untuk mengobati infeksi berbagai influenza. Struktur kimianya adalah *(2R, 3R, 4S) -3-acetamido-2 - ((1R, 2R) -2,3-dihidroksi-1-methoxypropyl) -4-guanidino-3,4-dihydro-2Hpyran-6-carboxylic acid*. Bentuk esterifikasi laninamivir (3- (O) -octanoyl laninamivir, R-125489-C8 (CS-8958) lebih efektif untuk pengobatan infeksi virus influenza A dan B serta virus yang resisten oseltamivir dibandingkan bentuk laninamivir lainnya (Yamashita et al. 2009).

Senyawa CS-8958 (Laninamivir) bersifat efektif terhadap virus influenza H5N1, bahkan virus yang resisten oseltamivir secara *in vitro* dan *in vivo*. Senyawa CS-8958 menghambat aktivitas protein NA virus influenza H5N1 baik yang sensitif maupun resisten oseltamivir secara *in vitro*. Senyawa R-125489-C8 (CS-8958) atau laninamivir mempunyai daya ikat yang lebih kuat terhadap NA dibandingkan peramivir. Replikasi virus H5N1 di otak tikus dapat dihambat oleh senyawa CS-8958. Senyawa CS-8958 (laninamivir) dapat digunakan sebagai profilaksis infeksi virus influenza H5N1 (Kiso et al. 2010).

Pengobatan infeksi virus influenza A dan B dengan CS-8958 memerlukan dosis tunggal sebesar 20-40 mg melalui inhalasi oral dengan menggunakan *dry powder inhaler*. Pemberian CS-8958 dengan dosis 40 mg dapat menurunkan *shedding* virus pada hari ke 3 pasca pengobatan dan gejala demam setelah 21,5 jam pengobatan (Watanabe et al. 2010). Senyawa obat antiviral lain memerlukan 75 mg 2 kali sehari selama 5 hari melalui aplikasi oral. Konsentrasi laninamivir ditemukan dalam plasma dan urin selama 144 jam atau kurang lebih 3 hari setelah pemberian tetapi waktu paruh CS-8958 dalam plasma sekitar 2 jam (Ishizuka et al. 2010). Hal ini menunjukkan bahwa CS-8958 yang diberikan secara inhalasi berpotensi menjadi alternatif lain untuk pengobatan influenza karena mempunyai masa kerja yang lama (Ishizuka et al. 2010).

Pengobatan infeksi influenza dengan antiviral peramivir yang diberikan melalui intravena atau intramuskular dapat menjadi alternatif pemberian bagi pasien yang tidak dapat diberi pengobatan zanamivir (inhalasi) dan oseltamivir (oral). Pemberian peramivir dengan dosis tunggal maupun ganda bersifat efektif untuk pengobatan infeksi virus avian influenza H1N1 yang resisten terhadap oseltamivir yang mengalami mutasi H275Y pada protein NA (Abed et al. 2012).

Lembaga *Food and Drug Administration* (FDA) merekomendasikan 3 jenis antiviral (*Neuraminidase*) yaitu oseltamivir (Tamiflu), Zanamivir (Relenza) dan peramivir (Rapivab) untuk penanganan infeksi influenza A dan B selama tahun 2017-2018 di Amerika. Pengobatan antiviral oseltamivir, zanamivir dan peramivir diberikan pada awal gejala klinis sampai 3-5 hari, sedangkan untuk profilaksis diberikan selama 7 hari tetapi tidak dianjurkan apabila infeksi terjadi lebih dari 48 jam (CDC 2018).

Pemberian obat antiviral dengan tujuan profilaksis dapat meningkatkan efektivitas vaksinasi karena obat antiviral efektif mencegah infeksi influenza sekitar 70-90%. Namun demikian, pemakaian obat antiviral secara rutin untuk tujuan profilaksis tidak dianjurkan karena dapat meningkatkan resistensi virus influenza terhadap antiviral (CDC 2018).

RESISTENSI ANTIVIRAL GOLONGAN NEURAMINIDASE INHIBITOR

Sebagian besar resistensi virus influenza terhadap oseltamivir berkaitan dengan substitusi protein NA. Sebagian besar virus influenza A (H1N1 pdm09, H3N2) dan virus influenza yang bersirkulasi di Jepang masih sensitif terhadap antiviral golongan NAI kecuali oseltamivir. Virus influenza A (H1N1) pdm09 mempunyai sensitivitas yang lebih tinggi dibandingkan virus influenza yang diisolasi tahun 2010-2011. Virus influenza A (H3N2) lebih sensitif terhadap NAI dibandingkan dengan virus yang diisolasi tahun 2012-2013. Sensitivitas virus influenza B lebih tinggi dibandingkan dengan virus yang diisolasi tahun 2012-2013. Sebagian besar virus tersebut sudah tidak sensitif terhadap oseltamivir (Ikematsu et al. 2015).

Semua virus H3N2 dan H1N1 yang ditemukan di Lebanon tahun 2010-2011 telah resisten terhadap amantadin tetapi virus tersebut sensitif terhadap antiviral golongan *neuraminidase inhibitor* (oseltamivir, zanamivir, peramivir, laninamivir). Namun demikian, virus yang bersirkulasi tahun 2011-2012 telah mengalami mutasi H275Y pada protein NA yang menyebabkan virus resisten terhadap oseltamivir. Sensitivitas terhadap oseltamivir berkurang menjadi 4 kali lipat pada virus yang mengalami mutasi H275Y (Zaraket et al. 2014). Mutasi H275Y pada protein NA virus influenza A (H1N1) pdm09 ditemukan di wilayah New South Wales dan Australia Barat. *Strain* virus yang telah resisten terhadap oseltamivir di daerah tersebut mempunyai genetik yang mirip sehingga kemungkinan resistensi virus berasal dari sumber virus yang sama (Hurt et al. 2012).

Virus H1N1 dengan mutasi H275Y menunjukkan reaksi antibodi yang lemah terhadap antigen virus H1N1 sehingga virus dengan residu 275Y bersifat kurang imunogenik dibandingkan dari virus dengan

residu 275H pada protein NA. Virus yang resisten terhadap oseltamivir mempunyai kemampuan menghindari dari sistem kekebalan dan bersifat toleran terhadap netralisasi antibodi (Wu et al. 2012). Respon antibodi terhadap virus yang resisten oseltamivir mulai terbentuk pada hari ke-21 setelah munculnya gejala klinis (Lin et al. 2014). Penggunaan antiviral *neuraminidase inhibitor* untuk pengobatan infeksi influenza yang semakin meningkat dari tahun ke tahun menyebabkan virus H1N1 pdm09 resisten terhadap oseltamivir (Wu et al. 2012).

Sebagian besar sekuen virus H1N1 pdm09 yang tersedia di GISAID mempunyai residu H275Y pada protein NA yang mengindikasikan virus H1N1 pdm09 yang bersirkulasi saat ini lebih resisten terhadap oseltamivir dibandingkan dengan virus H1N1 pdm09 yang diisolasi pertama kali pada tahun 2009 (Hurt et al. 2012). Selain mutasi H275Y, mutasi S247N yang menyebabkan resistensi oseltamivir atau zanamivir juga ditemukan pada protein NA virus H1N1 pdm09 di Australia dan Asia Pasifik. Mutasi ganda H275Y dan S247N pada H1N1pdm 09 dapat meningkatkan kadar resistensinya terhadap oseltamivir. Virus yang mempunyai mutasi ganda (H275Y dan S247N) memerlukan konsentrasi 6000 kali lebih tinggi dibandingkan dengan virus yang tidak bermutasi dan 10 kali lebih tinggi dibandingkan dengan virus yang mengalami mutasi tunggal (H275Y). Kombinasi mutasi (S247N, I223L, K150N) juga dikarakterisasi pada virus influenza A (H5N1). Triple mutasi ini dapat meningkatkan resistensi virus terhadap amantadine sebesar 77 kali lipat (Hurt et al. 2011).

Virus avian influenza sub tipe H6N2 yang menginfeksi unggas air bersifat resisten terhadap pengobatan oseltamivir 12 ug/L. Substitusi R292K pada protein NA dari virus tersebut berperan terhadap resistensi oseltamivir. Virus H6N2 yang resisten terhadap oseltamivir dapat ditularkan antar unggas air tanpa mengubah sifat dari virus tersebut. Virus yang mengalami substitusi R292K akan berkompetisi dengan virus yang tidak bermutasi dalam tubuh unggas sehingga substitusi R292K tidak ditemukan lagi dalam tubuh unggas (Gillman et al. 2015a). Tekanan evolusi lingkungan mempengaruhi peningkatan resistensi virus avian influenza terhadap oseltamivir karena sebagian besar metabolit oseltamivir *carboxylate* (OC) yang tidak terdegradasi pada waktu pengolahan limbah kemudian mengalir ke sungai yang merupakan tempat tinggal unggas air. Paparan oseltamivir dengan dosis rendah secara terus menerus melalui air minum pada unggas air yang diinfeksi virus avian influenza H7N9 menyebabkan virus bermutasi (I222T) pada protein NA yang berkontribusi terhadap resistensi oseltamivir dan

zanamivir. Dosis yang diperlukan untuk pengobatan infeksi virus resisten meningkat 8 kali lipat (oseltamivir) dan 2,5 kali lipat (zanamivir) (Gillman et al. 2015b).

Residu obat antiviral baru seperti peramivir dan laninamivir juga dideteksi pada air pengolahan limbah dan air sungai dengan kadar yang cukup tinggi. Konsentrasi peramivir 64 (air pengolahan limbah) dan 11 ng/L (air sungai), laninamivir 21 (air pengolahan limbah) dan 9 ng/L (air sungai). Perlakuan ozonisasi pada waktu proses pengolahan air limbah tidak mampu mendegradasi zat aktif dari antiviral tersebut sehingga resiko kontaminasi antiviral tersebut di lingkungan air sangat tinggi. Air lingkungan yang terkontaminasi antiviral berpotensi meningkatkan resistensi antiviral di unggas air liar (Azuma et al. 2015).

Mutasi R152K dan R118K pada protein NA virus avian influenza sub tipe N6 dan N9 yang diisolasi dari unggas air menyebabkan resistensi terhadap zanamivir. Mutasi E119V NA berperan terhadap peningkatan resistensi oseltamivir pada manusia dan unggas air. Namun demikian, mutasi E119V NA tidak menyebabkan resistensi oseltamivir yang permanen di unggas. Pemberian oseltamivir pada unggas memicu stabilitas mutasi virus avian influenza. Unggas air merupakan inang *reservoir* dari semua sub tipe virus avian influenza sehingga unggas air berkontribusi menularkan virus tersebut termasuk virus yang resisten oseltamivir ke spesies lain seperti manusia (Achenbach & Bowen 2013).

ANTIVIRAL GOLONGAN ADAMANTASE

Mekanisme kerja adamantane adalah memblokir aliran ion H^+ yang melalui saluran protein M2 menuju ke bagian dalam partikel virus sehingga mencegah *uncoating* partikel virus influenza ke dalam endosom (Liang et al. 2014). Amantadin dan rimantadin dapat digunakan sebagai obat antiviral alternatif yang lebih murah dibandingkan golongan neuraminidase inhibitor (Tabel 2). Pencegahan dan pengobatan alternatif dengan amantadin dan rimantadin bersifat efektif apabila virus influenza yang bersirkulasi masih sensitif terhadap obat antiviral M2 *inhibitor* (Alves Galvao et al. 2014).

Amantadine digunakan dalam bentuk garam amantadine hidroklorida (AMA-HCl) dengan nama dagang Virosol, Virofral, Symadine atau Symmetrel. Nama-nama dagang antiviral tersebut digunakan untuk pengobatan pada manusia di Eropa dan di Amerika Serikat lebih dari 30 tahun yang lalu (Douglas 1990).

Tabel 2. Obat antiviral golongan Adamantane yang digunakan untuk pengobatan dan profilaksis avian influenza

Golongan obat antiviral	Nama obat	Singkatan	Nama dagang	Penggunaan klinik	Mekanisme kerja obat	Tahun Rekomendasi
Adamantane	Amantadine	AMT	Symmetrel	Influenza virus A	Target protein M2 virus untuk menghambat <i>uncoupling</i> virus	1966
	Rimantadine	RIM	Humadine	Influenza virus A	Target protein M2 virus untuk menghambat <i>uncoupling</i> virus	1993

Sumber: Douglas 1990; Wright et al. 2016

Beberapa metode sintesis amantadine hidroklorida telah dilakukan dengan hasil persentase rata rata 45-58 %. Sintesis ini dimulai dari adamantane yang menggunakan 4 tahapan prosedur untuk menghasilkan amantadine hidroklorida. Sintesis amantadine hidroklorida dari *N-(1-adamantyl) acetamide* yang menggunakan 2 tahapan prosedur dapat meningkatkan prosentase hasil menjadi 67%. Prosedur sintesisnya dapat dioptimalisasi untuk meminimalkan penggunaan larutan dan reagen yang bersifat toksik, ramah lingkungan serta dapat digunakan untuk produksi amantadin hidroklorida dalam skala besar (Vu et al. 2017).

Penggunaan rimantadine baru mendapatkan persetujuan dari FDA untuk pengobatan infeksi influenza pada tahun 1990 (Prichard 1971). Rimantadine hidroklorida (*α -methyl-1-adamantane-methalamine hydrochloride*) menghambat konduktansi proton dari saluran ion M2. Perubahan kimia isotropik berpengaruh terhadap ikatan ke saluran proton. Interaksi kompleks antara (R) -rimantadine dan saluran proton M2 meningkatkan stabilitas obat antiviral di pori saluran (Wright et al. 2016). Rimantadine hidroklorida digunakan untuk terapi infeksi yang disebabkan oleh berbagai macam virus RNA, khususnya virus influenza A. Sintesis rimantadine *Schiff bases* (RSB) yaitu rimantadine-*salicylaldehyde* (RS), rimantadine-*o*-vanillin (ROV) dan rimantadine-4-*methoxy-salicylaldehyde* (RMS) mempunyai aktivitas biologis yang lebih baik (Liu et al. 2014).

Rimantadine (R) -enansiomer berikatan dengan pori protein M2 dengan afinitas yang lebih tinggi daripada (S) –enansiomer tetapi kedua enansiomer tersebut memiliki kemiripan dalam hal kemampuan penyumbatan saluran proton M2, afinitas, dan potensi antivirus. Rimantadine enantiomer (2-R dan 2-S) mempunyai kemampuan mengikat saluran proton M2, penyumbatan saluran dan aktivitas antiviral yang sama dengan amantadine yang bersifat efektif terhadap saluran proton M2 (Drakopoulos et al. 2017).

RESISTENSI ANTIVIRAL GOLONGAN ADAMANTASE

Amantadine merupakan penghambat saluran M2 H⁺ virus. Virus dapat menghindari dari penyumbatan antiviral pada saluran M2H⁺nya melalui dua rute alternatif yaitu: 1) saluran tidak lagi mengikat pemblokir sehingga pemblokir tidak bisa menggunakan fungsi penghambatannya; dan 2) pengikatan *blocker* dipertahankan, tetapi fungsi protein tidak berfungsi. Karakteristik diameter pori seperti penambahan ukuran saluran menunjukkan mekanisme molekuler munculnya resistensi virus baru. Meskipun obat mengikat saluran, obat antiviral tidak dapat memblokir pori-pori, karena diameter saluran telah membesar (Astrahan et al. 2004).

Terapi antiviral golongan adamantane pada unggas secara terus menerus dapat menjadi faktor timbulnya resistensi golongan adamantane. Adamantane adalah obat anti-influenza yang efektif sampai munculnya resistensi virus terhadap adamantane. Berdasarkan analisis asam amino, sebanyak 31.251 virus influenza A dengan sub tipe yang berbeda (H1-H17) yang diisolasi di dunia dari tahun 1902 hingga 2013 telah resisten terhadap adamantane. Resistensi tersebut mengalami peningkatan secara terus menerus. Sub tipe HA, spesies inang, tahun isolasi, dan wilayah geografis berpengaruh terhadap frekuensi munculnya varian influenza yang resisten terhadap adamantane. Mutasi gen M2 pada marker resistensi adamantane diidentifikasi pada virus influenza A sub tipe H1, H3, H5, H7, H9, dan H17 dalam jumlah yang sangat tinggi tetapi mutasi pada marker resistensi amantadin jarang ditemukan pada sub tipe H2, H4, H6, H10, dan H11. Namun demikian, sub tipe H8, H12, H13, H14, H15, H16 tidak menunjukkan resistensi terhadap adamantane (Dong et al. 2015).

Resistensi virus A (H1N1) terhadap adamantane dideteksi di sebagian besar negara di dunia dari tahun

2009–2012. Virus H7N9 yang mengalami mutasi pada *marker* resistensi adamantane hanya ditemukan di daratan Cina dan Taiwan pada tahun 2003. Sebagian besar sub tipe H5N1 yang resisten terhadap adamantane dilaporkan di Thailand, Kamboja, dan Vietnam (Dong et al. 2015). Mutasi Ser31Asn pada protein M2 virus AI dilaporkan di Indonesia (Smith et al. 2006). Virus avian influenza yang diisolasi di Indonesia sepanjang tahun 2003–2008 mengalami mutasi pada posisi 27 atau 31 (V27A atau S31N) sebesar 66,328% (91/146) dan bersifat resisten terhadap amantadin. Mutasi tunggal maupun ganda mampu menginduksi resistensi terhadap amantadin (Dharmayanti et al. 2010).

Mekanisme resistensi terhadap amantadin yang disebabkan mutasi S31N dapat digambarkan oleh *overlaying* struktur *lipidic cubic phase* (LCP) yang baru dengan struktur kristal M2 sebelumnya. Substitusi Ser31 menjadi Asn juga menyebabkan kelebihan atom hidrofilik pada situs yang berinteraksi dengan daerah hidrofobik amantadin (Thomaston & Grado 2016).

Virus AI sub tipe H5N1 *clade* 2.3.2 belum banyak bermutasi di posisi 26, 27, 30, 31 dan 34 protein M2. Virus AI sub tipe H5N1 yang mengalami mutasi L26I dan S31N dari Vietnam adalah *clade* 1.1 tetapi virus *clade* 2.3.2.1c tidak menunjukkan perubahan pada protein M2 yaitu 26L, 27V, 30A, 31S, dan 34G (Nguyen et al. 2016). Namun demikian, virus *clade* 2.3.2 mengalami mutasi pada posisi 27 (V27I). Sekuen asam amino protein M2 virus AI sub tipe H5N1 *clade* 2.3.2.1 dari Indonesia dan Vietnam mempunyai kemiripan (Dharmayanti et al. 2013; Dharmayanti et al. 2014).

Analisis filogenetik gen Matrik (M2) dari virus AI sub tipe H5N1 *clade* 2.3.2.1c asal Indonesia (Hewajuli 2017) berada dalam satu kelompok dengan virus AI sub tipe H5N1 *clade* 2.3.2 asal Vietnam, Cina dan Hongkong seperti virus AI sub tipe H5N1(A/magpie robbin/Hongkong/1097/2008, A/blackcrowned night hero/Hongkong/659/2008) yang diisolasi dari unggas air liar di Hongkong (Smith et al. 2009; Wan et al. 2011), virus H5N1 A/duck /Zhejiang/2244/2011 dari Cina dan sebagian besar virus H5N1 yang diisolasi dari unggas air di Vietnam (Naguib et al. 2015; Le & Nguyen 2014).

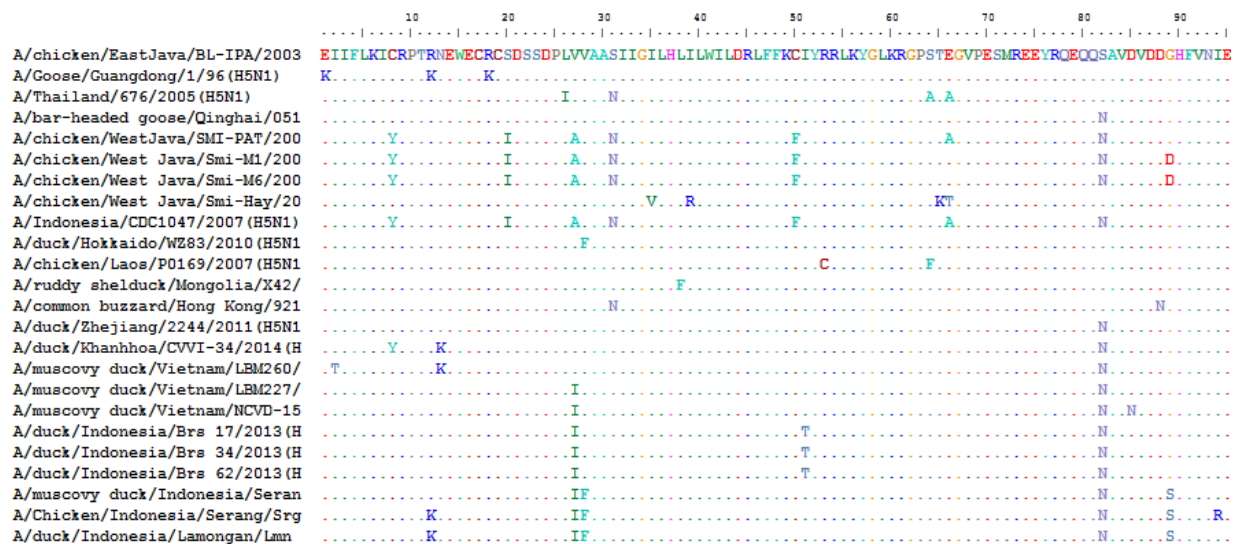
Virus AI sub tipe H5N1 *clade* 2.3.2 asal Indonesia yang diisolasi tahun 2016 mempunyai kedekatan dengan kelompok virus AI sub tipe H5N1 *clade* 2.3.2 asal Vietnam yang mempunyai residu V27I pada protein M2. Hasil *multiple sequence alignment* dan translasi protein M2 virus AI sub tipe H5N1 asal Indonesia menunjukkan residu V27I ditunjukkan pada Gambar 2 (Hewajuli 2017). Virus AI sub tipe H5N1 *clade* 2.3.2 yang diisolasi pada waktu wabah kematian itik (Dharmayanti et al. 2013) mempunyai karakter

perubahan asam amino V27I yang sama dengan virus AI sub tipe H5N1 *clade* 2.3.2 yang diisolasi tahun 2016. Hal ini menunjukkan bahwa perubahan asam amino virus AI sub tipe H5N1 *clade* 2.3.2 di Indonesia masih sama sampai dengan tahun 2016 (Hewajuli 2017). Virus *clade* 2.3.2.1 yang diisolasi dari Bulgaria juga tidak menunjukkan mutasi (26L, 27V, 30A, 31S, dan 34G) pada domain transmembran protein Matrik (Petkova et al. 2012).

Pola residu pada transmembran protein M2 virus AI sub tipe H5N1 *clade* 2.3.2 terlihat berbeda dari virus AI sub tipe H5N1 *clade* 2.1 karena sebagian besar virus *clade* 2.1 yang bersirkulasi di Asia Tenggara khususnya Indonesia mengalami substitusi tunggal maupun ganda pada residu *marker* resistensi amantadin (V27A dan S31N). Analisis genetik resistensi amantadin berdasarkan substitusi asam amino pada residu Leu26, Val27, Ala30, Ser31, Gly34, His37 dan Trp41 domain transmembran protein M2. Sebagian besar virus influenza yang resisten terhadap amantadin dapat mempunyai satu atau lebih perubahan asam amino karena substitusi tunggal atau ganda menyebabkan hilangnya sensitivitas *blocker* M2 (Cheung et al. 2006; Dharmayanti 2010).

Substitusi asam amino V27I pada protein M2 virus AI sub tipe H5N1 yang diisolasi pada tahun 2016 adalah unik pada *marker* resistensi virus AI terhadap amantadin karena biasanya virus AI sub tipe H5N1 yang resisten terhadap amantadin mempunyai substitusi asam amino V27A. Konfirmasi hasil molekuler analisis asam amino protein M2 dengan hasil uji invitro sangat penting dilakukan untuk mengetahui resistensi virus AI sub tipe H5N1 *clade* 2.3.2 asal Indonesia terhadap amantadin. Virus AI sub tipe H5N1 *clade* 2.3.2 asal Indonesia yang mempunyai substitusi V27I pada protein M2 bersifat resisten terhadap amantadin karena menyebabkan efek sitopatik dan virus tetap berkembang biak pada sel MDCK konfluen *monolayer* yang mengandung *amantadine hydrochloride* dengan konsentrasi tertinggi yang tidak toksik terhadap sel MDCK (Hewajuli 2017).

Novel marker genetik amantadin resisten pada gen M2 (V27I) juga diidentifikasi pada sebagian besar virus Vietnam yang diisolasi dari unggas air dari tahun 2012 sampai dengan 2015 berdasarkan analisis *multiple sequence alignment* dan translasi protein M2. Keberadaan substitusi V27I yang unik pada protein M2 kemungkinan berperan terhadap resistensi virus AI sub tipe H5N1 *clade* 2.3.2 terhadap amantadin (Hewajuli 2017). Mutasi Val27Ile pada *marker* resistensi amantadin virus AI sub tipe H5N1 *clade* 2.3.2 di Indonesia kemungkinan merupakan introduksi dari luar (Dharmayanti et al. 2014).



Gambar 2. Multiple sequence alignment dan translasi protein M2 virus AI subtype H5N1 clade 2.3.2 asal Indonesia dan beberapa virus H5N1 dari *genbank*

Sumber: Hewajuli (2017)

Pengobatan atau profilaksis infeksi virus AI di peternakan unggas dengan menggunakan antiviral dapat meningkatkan resistensi virus. Sebagian besar (83,3%) virus AI subtype H5N1 yang diisolasi dari unggas di Cina Utara telah resisten terhadap amantadin. Mutasi asam amino protein M2 pada marker yang resistensi amantadin ditemukan pada virus AI yang diisolasi dari unggas kemungkinan disebabkan oleh penggunaan amantadin yang bertujuan untuk profilaksis dan digunakan secara terus menerus (He et al. 2008).

KOMBINASI OBAT ANTIVIRAL

Sebagian besar virus influenza A yang bersirkulasi telah resisten terhadap adamantane (amantadin, rimantadin). Timbulnya resistensi *neuraminidase inhibitor* menyebabkan virus avian influenza mengalami resistensi ganda terhadap adamantane dan *neuraminidase inhibitor*. Pengembangan kombinasi obat antiviral diperlukan untuk meningkatkan efikasi pengobatan virus yang telah resisten terhadap golongan adamantane maupun *neuraminidase inhibitor*. Kombinasi obat bekerja secara sinergis pada tahap yang berbeda dalam siklus replikasi virus sehingga dapat mengurangi resiko perkembangan resistensi. Terapi kombinasi antiviral amantadine, oseltamivir, dan ribavirin mempunyai efikasi yang tinggi untuk pengobatan infeksi virus influenza yang sensitif maupun resisten terhadap antiviral serta dapat menurunkan angka kematian akibat infeksi virus influenza. Terapi kombinasi antiviral amantadine, oseltamivir, dan ribavirin bersifat efektif pada pasien

yang berisiko tinggi mengalami komplikasi serius akibat infeksi influenza (Nguyen et al. 2012). Faktor keamanan merupakan pertimbangan yang sangat penting diperhatikan ketika memberikan terapi kombinasi antiviral pada pasien yang immunosupresi. Pasien immunosupresi biasanya membutuhkan durasi pengobatan lebih lama karena tidak dapat merespon dengan cepat terapi. Selain faktor keamanan, interaksi yang sinergis diantara masing masing antiviral yang diberikan secara kombinasi merupakan faktor yang sangat penting untuk diperhatikan. Kombinasi antiviral amantadin, oseltamivir, dan ribavirin mempunyai efek farmakokinetik yang sama dengan antiviral tunggal, bersifat aman bagi pasien yang immunosupresi, lebih cepat menurunkan titer virus dalam tubuh serta dapat mencegah resistensi (Seo et al. 2013).

KESIMPULAN

Adamantane adalah obat yang efektif sampai munculnya resistensi virus terhadap adamantane. Sebagian besar virus avian influenza masih sensitif terhadap antiviral golongan *neuraminidase inhibitor* sehingga pengobatan dan pencegahannya mengandalkan antiviral golongan *neuraminidase inhibitor*. Resistensi antiviral golongan *M2 blocker* dan *neuraminidase* ditemukan pada virus avian influenza dari unggas dan manusia. Obat golongan *M2 blocker* dan *neuraminidase inhibitor* digunakan untuk pengendalian penyakit influenza pada manusia. Pengembangan kombinasi obat adamantane dan *neuraminidase inhibitor* dapat mengurangi resiko

resistensi karena kombinasi bekerja sinergis pada tahap pada siklus replikasi virus.

DAFTAR PUSTAKA

- Abed Y, Pizzorno A, Boivin G. 2012. Therapeutic activity of intramuscular peramivir in mice infected with are combinant influenza A/WSN/33(H1N1) virus containing the H275Y neuraminidase mutation. *Antimicrob Agents Chemother*. 56:4375-4380.
- Achenbach JE, Bowen RA. 2013. Effect of oseltamivir carboxylate consumption on emergence of drug-resistant H5N2 avian influenza virus in Mallard ducks. *Antimicrob Agents Chemother*. 57:2171-2181.
- Alves Galvão MG, Rocha Crispino Santos MA, Alves da Cunha AJL. 2014. Amantadine and rimantadine for influenza A in children and the elderly. *Cochrane Database Syst Rev*. 11:CD002745. doi: 10.1002/14651858.CD002745.pub4.
- Astrahan P, Kass I, Cooper MA, Arkin IT. 2004. A novel method of resistance for influenza against a channel-blocking antiviral drug. *Proteins*. 55:251-257.
- Azuma T, Ishiuchi H, Inoyama T, Teranishi Y, Yamaoka M, Sato T, Yamashita N, Tanaka H, Mino Y. 2015. Detection of peramivir and laninamivir, new anti-influenza drugs, in sewage effluent and river waters in Japan. *PLoS One*. 10:e0131412. doi: 10.1371/journal.pone.0131412.
- Babu YS, Chand P, Bantia S, Kotian P, Dehghani A, El-Kattan Y, Lin TH, Hutchison TL, Elliott AJ, Parker CD, Ananth LS, Horn LL, Laver GW, Montgomery JA. 2000. BCX-1812 (RWJ-270201): Discovery of a novel, highly potent, orally active, and selective influenza neuraminidase inhibitor through structure-based drug design. *J Med Chem*. 43:3482-3486.
- Baumann J, Kouassi NM, Foni E, Klenk H, Matrosovich M. 2016. H1N1 swine influenza viruses differ from avian precursors by a higher pH optimum of membrane fusion. *J Virol*. 9:1569-1577.
- Belser JA, Brock N, Sun X, Jones J, Zanders N, Hodges E, A. Pulit-Penaloza J, Wentworth D, Tumpey TM, Davis T, Maines TR. 2018. Mammalian pathogenesis and transmission of avian influenza A (H7N9) viruses, Tennessee, USA, 2017. *Emerg Infect Dis*. 24:149-152.
- Benton DJ, Wharton SA, Martin SR, McCauley JW. 2017. Role of neuraminidase in influenza A (H7N9) virus receptor binding. *J Virol*. 91:e02293-16. doi: 10.1128/JVI.02293-16
- Boulo S, Akarsu H, Ruigrok RW, Baudin F. 2007. Nuclear traffic of influenza virus proteins and ribonucleoprotein complexes. *Virus Res*. 124:12-21.
- [CDC] Centre for Disease Prevention and Control. Influenza Antiviral Medications: Summary for Clinicians | Health Professionals | Seasonal Influenza (Flu), 2018. Available from: <http://www.cdc.gov/flu/professionals>
- Chen W, Sun S, Li Z. 2012. Two glycosylation sites in H5N1 influenza virus hemagglutinin that affect binding preference by computer-based analysis. *PLoS One*. 7:e38794. doi: 10.1371/journal.pone.0038794.
- Cheung CL, Rayner RM, Smith GJD, Wang P, Naipospos TSP, Zhang J, Yuen KY, Webster RG, Peiris JSM, Guan Y, Chen H. 2006. Distribution of amantadine-resistant H5N1 avian influenza variants in Asia. *J Infect Dis*. 193:1626-1629.
- Cohen M, Zhang XQ, Senaati HP, Chen HW, Varki NM, Schooley RT, Gagneux P. 2013. Influenza A penetrates host mucus by cleaving sialic acids with neuraminidase. *Virol J*. 10:321.
- De Conto F, Covan S, Arcangeletti MC, Orlandini G, Gatti R, Dettori G, Chezzi C. 2011. Differential infectious entry of human influenza A/NWS/33 virus (H1N1) in mammalian kidney cells. *Virus Res*. 155:221-230.
- Dharmayanti NLPI, Ibrahim F, Soebandrio A. 2010. Amantadine resistant of Indonesian influenza H5N1 subtype virus during 2003-2008. *Microbiol Indones*. 5:11-16.
- Dharmayanti NLPI, Hartawan R, Hewajuli DA, Hardiman, Wibawa H, Pudjiatmoko. 2013. Karakteristik molekuler dan patogenesis virus H5N1 Clade 2.3.2. asal Indonesia. *JITV*. 18:99-113.
- Dharmayanti NLPI, Hartawan R, Pudjiatmoko, Wibawa H, Hardiman, Balish A, Donis R, Davis CT, Samaan G. 2014. Genetic characterization of Clade 2.3.2.1 Avian Influenza A (H5N1) Viruses, Indonesia, 2012. *Emerg Infect Dis*. 20:671-674.
- Dong H, Fiorin G, DeGrado WF, Klein ML. 2014. Proton release from the histidine-tetrad in the M2 channel of the influenza A virus. *J Phys Chem B*. 118:12644-12651.
- Dong G, Peng C, Luo J, Wang C, Han L, Wu B, Ji G, He H. 2015. Adamantane-resistant influenza A viruses in the world (1902-2013): Frequency and distribution of M2 gene mutations. *PLoS One*. 10:e0119115.
- Douglas Jr RG. 1990. Antimicrobial agents. In: Goodman Gilman A, Rall TW, Nies AS, Taylor P, editors. *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. New York (USA): Pergamon Press.
- Drakopoulos A, Tzitzoglaki C, Ma C, Freudenberger K, Hoffmann A, Hu Y, Gauglitz G, Schmidtke M, Wang J, Kolocouris A. 2017. Affinity of rimantadine enantiomers against influenza A/M2 protein revisited. *ACS Med Chem Lett*. 8:145-150.
- Durrant MG, Egget DL, Busath DD. 2015. Investigation of a recent rise of dual amantadine-resistance mutations in the influenza A M2 sequence. *BMC Genet*. 16:S3.
- Franca M, Stallknecht DE, Howerth EW. 2013. Expression and distribution of sialic acid influenza virus receptors in wild birds. *Avian Pathol*. 42:60-71.

- Gillespie L, Roosendahl P, Ng WC, Brooks AG, Reading PC, Londrigan SL. 2016. Endocytic function is critical for influenza A virus infection via DCSIGN and L-SIGN. *Sci Rep.* 6:19428. doi: 10.1038/srep19428
- Gillman A, Muradrasoli S, Mardnas A, So"derstro"m H, Fedorova G, Lowenthal M, Wille M, Daggfeldt A. 2015a. Oseltamivir resistance in influenza A (H6N2) caused by an R292K substitution in neuraminidase is not maintained in mallards without drug pressure. *PLoS One.* 10:e0139415.
- Gillman A, Nykvist M, Muradrasoli S, So" derstro"m H, Wille M, Daggfeldt A, Brojer C, Waldenstr"m J, Olsen B, J"rhult JD. 2015b. Influenza A (H7N9) virus acquires resistance-related neuraminidase I222T substitution when infected mallards are exposed to low levels of oseltamivir in water. *Antimicrob Agents Chemother.* 59:5196-5202.
- Gu RX, Liu LA, Wei DQ, Du JG, Liu L, Liu H. 2011. Free energy calculations on the two drug binding sites in the M2 proton channel. *J Am Chem Soc.* 133:10817-10825.
- He G, Qiao J, Dong C, He C, Zhao L, Tian Y. 2008. Amantadine-resistance among H5N1 avian influenza viruses isolated in Northern China. *Antiviral Res.* 77:72-76.
- Hewajuli DA. 2017. Sensitivitas virus avian influenza subtype H5N1 clade 2.3.2 asal Indonesia terhadap obat antiviral amantadin [Tesis]. [Bogor (Indonesia)]: Institut Pertanian Bogor.
- Hoopes JD, Driebe EM, Kelley E, Engelthaler DM, Keim PS, Perelson AS, Rong L, Went GT, Nguyen JT. 2011. Triple combination antiviral drug (TCAD) composed of amantadine, oseltamivir, and ribavirin impedes the selection of drug-resistant influenza A virus. *PLoS One.* 6:e29778. doi: 10.1371/journal.pone.0029778.
- Hu F, Schmidt-Rohr K, Hong M. 2012. NMR detection of pH-dependent histidine-water proton exchange reveals the conduction mechanism of a transmembrane proton channel. *J Am Chem Soc.* 134:3703-3713.
- Hu Y, Lu S, Song Z, Wang W, Hao P, Li J, Zhang X, Yen H, Shi B, Li T, Guan W, Xu L, Liu Y, Wang S, Zhang X, Tian D, Zhu Z, He J, Huang K, Chen H, Zheng L, Li X, Ping J, Kang B, Xi X, Zha L, Li Y, Zhang Z, Peiris M, Yuan Z. 2013. Association between adverse clinical outcome in human disease caused by novel influenza A H7N9 virus and sustained viral shedding and emergence of antiviral resistance. *Lancet.* 381:2273-2279.
- Huang L, Cao Y, Zhou J, Qin K, Zhu W, Zhu Y, Yan L, Wang D, Wei H, Shu Y. 2014. A conformational restriction in the influenza A virus neuraminidase binding site by R152 results in a combinational effect of I222T and H274Y on oseltamivir resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 58:1639-1645.
- Hurt AC, Lee RT, Leang SK, Cui L, Deng YM, Phuap SP, Caldwell N, Freeman K, Komadina N, Smith D, Speers D, Kelso A, Lin RT, Maurer-Stroh S, Barr IG. 2011. Increased detection in Australia and Singapore of a novel influenza A(H1N1)2009 variant with reduced oseltamivir and zanamivir sensitivity due to a S247N neuraminidase mutation. *Eurosurveillance* [Internet]. 16:19884. Available from: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19884>
- Hurt AC, Hardie K, Wilson NJ, Deng YM, Osbourn M, Leang SK, Lee RT, Iannello P, Gehrig N, Shaw R, Wark P, Caldwell N, Givney RC, Xue L, Maurer-Stroh S, Dwyer DE, Wang B, Smith DW, Levy A, Booy R, Dixit R, Merritt T, Kelso A, Dalton C, Durrheim D, Barr IG. 2012. Characteristics of a widespread community cluster of H275Y oseltamivir-resistant A (H1N1) pdm09 influenza in Australia. *J Infect Dis.* 206:148-157.
- Ishizuka H, Yoshida S, Okabe H, Yoshihara K. 2010. Clinical pharmacokinetics of laninamivir, a novel long-acting neuraminidase inhibitor, after single and multiple inhaled doses of its prodrug, CS-8958, in healthy male volunteers. *J Clin Pharmacol.* 50:1319-1329. doi: 10.1177/0091270009356297.
- Ikematsu H, Kawai N, Iwaki N, Kashiwagi S. 2015. In vitro neuraminidase inhibitory activity of four neuraminidase inhibitors against clinical isolates of influenza virus in the Japanese 2012-2013 season. *J Infect Chemother Off J Jpn Soc Chemother.* 21:39-42.
- Kalashnikov AI, Sysolyatin SV, Sakovich GV, Sonina EG, Shchurova IA. 2013. Facile method for the synthesis of oseltamivir phosphate. *Russ Chem Bull.* 62:163-170.
- Kim CU, Lew W, Williams MA, Liu H, Zhang L, Swaminathan S, Bischofberger N, Chen MS, Mendel DB, Tai CY, Laver WG, Stevens RC. 1997. Influenza neuraminidase inhibitors possessing a novel hydrophobic interaction in the enzyme active site: design, synthesis, and structural analysis of carbocyclic sialic acid analogues with potent anti-influenza activity. *J Am Chem Soc.* 119:681-690. doi: 10.1021/ja963036t.
- Kiso M, Kubo S, Ozawa M, Le QM, Nidom CA, Yamashita M, Kawaoka Y. 2010. Efficacy of the new neuraminidase inhibitor CS-8958 against H5N1 influenza viruses. *PLoS Pathog.* 6:e1000786.
- Le TH, Nguyen NT. 2014. Evolutionary dynamics of highly pathogenic avian influenza A/H5N1 HA Clades and vaccine implementation in Vietnam. *Clin Exp Vaccine Res.* 3:117-127.
- Lee N, Leo YS, Cao B, Chan PK, Kyaw WM, Uyeki TM, Tam WWS, Cheung CSK, Yung IMH, Li H, Gu L, Liu Y, Liu Z, Qu J, Hui DS. 2015. Neuraminidase inhibitors, superinfection and corticosteroids affect survival of influenza patients. *Eur Respir J.* 45:1642-1652.
- Li JH, Dohna Z, Anchell NL, Adams SC, Dao NT, Xing Z, Cardona CJ. 2010. Adaptation and transmission of a

- duck-origin avian influenza virus in poultry species. *Virus Res.* 147:40-46.
- Liang R, Li H, Swanson JM, Voth GA. 2014. Multiscale simulation reveals a multifaceted mechanism of proton permeation through the influenza A M2 proton channel. *Proc Natl Acad Sci USA.* 111:9396-9401. doi: 10.1073/pnas.1401997111.
- Liang L, Deng G, Shi J, Wang S, Zhang Q, Kong H, Gu C, Guan Y, Suzuki Y, Li Y, Jiang Y, Tian G, Liu L, Li C, Chen H. 2016a. Genetics, receptor binding, replication, and mammalian transmission of H4 avian influenza viruses isolated from live poultry markets in China. *J Virol.* 90:1455-1469.
- Liang R, Swanson JMJ, Madsen JJ, Hong M, DeGradoe WF, Voth GA. 2016b. Acid activation mechanism of the influenza A M2 proton channel. *Proc Natl Acad Sci USA.* 113:E6955-E6964. doi: 10.1073/pnas.1615471113.
- Lin PH, Chao TL, Kuo SW, Wang JT, Hung CC, Lin HC, Yang ZY, Ho SY, Chang CK, Huang MS, Chen HH, Chen YC, Lai HS, Chang SY, Chang SC, Yang PC. 2014. Virological, serological, and antiviral studies in an imported human case of Avian Influenza A (H7N9) Virus in Taiwan. *Clin Infect Dis.* 58:242-246.
- Liu B, Ma P, Wang X, Kong Y, Zhang L, Liu B. 2014. Synthesis of three rimantadine schiff bases and their biological effects on serum albumin. *Iran J Pharmaceu Res.* 13:1183-1190.
- Matrosovich MN, Gambaryan AS, Teneberg S, Piskarev VE, Yamnikova SS, Lvov DK, Robertson JS, Karlsson KA. 1997. Avian influenza A viruses differ from human viruses by recognition of sialyloligosaccharides and gangliosides and by a higher conservation of the HA receptor-binding site. *Virology.* 233:224-234.
- Naguib MM, Kinne J, Chen H, Chan K, Joseph S, Wong P, Woo PCY, Wernery R, Beer M, Wernery U, Harder TC. 2015. Outbreaks of highly pathogenic avian influenza H5N1 Clade 2.3.2.1c in hunting falcons and kept wild birds in Dubai implicate intercontinental virus spread. *J Gen Virol.* 96:3212-3222.
- Nguyen JT, Smee DF, Barnard DL, Julander JG, Gross M, Jong MD, Went GT. 2012. Efficacy of combined therapy with amantadine, oseltamivir, and ribavirin in vivo against susceptible and amantadine-resistant influenza A viruses. *PLoS One.* 7:e31006. doi: 10.1371/journal.pone.0031006.
- Nguyen TH, Than VT, Thanh HD, Hung VK, Nguyen DT, Kim W. 2016. Intersubtype reassortments of H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza viruses isolated from quail. *PLoS One.* 1-15. doi: 10.1371/journal.pone.0149608
- Palese P, Tobita K, Ueda M, Compans RW. 1974. Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase. *Virology.* 61:397-410.
- Petkova AM, Georgiev G, Seiler P, Darnell D, Franks J, Krauss S, Webby RJ, Webster RG. 2012. Spread of influenza virus A (H5N1) Clade 2.3.2.1 to Bulgaria in common buzzards. *Emerg Infect Dis.* 18:1596-1602.
- Prichard WW. 1971. Pharmaceutical compositions and methods of controlling influenza a virus infection utilizing substituted adamantanes and tricyclo (4.3.1.13. 8) undecanes. United States patent US 3,592,934.
- Rudrawar S, Dyason JC, Rameix-Welti MA, Rose FJ, Kerry PS, Russell RJ, van der Werf S, Thomson RJ, Naffakh N, von Itzstein M. 2010. Novel sialic acid derivatives lock open the 150-loop of an influenza A virus group-1 sialidase. *Nat Commun.* 1:113. doi: 10.1038/ncomms1114.
- Russell RJ, Haire LF, Stevens DJ, Collins PJ, Lin YP, Blackburn GM, Hay AJ, Gamblin SJ, Skehel JJ. 2006. The structure of H5N1 avian influenza neuraminidase suggests new opportunities for drug design. *Nature.* 443:45-49.
- Seladi-Schulman J, Steel J, Lowen AC. 2013. Spherical influenza viruses have a fitness advantage in embryonated eggs, while filament-producing strains are selected *in vivo*. *J Virol.* 87:13343-13353.
- Seladi-Schulman J, Campbell PJ, Suppiah S, Steel J, Lowen AC. 2014. Filament-producing mutants of influenza A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) virus have higher neuraminidase activities than the spherical wild-type. *PLoS One.* 9:e112462. doi: 10.1371/journal.pone.0112462.
- Seo S, Englund JA, Nguyen JT, Pukrittayakamee S, Lindegardh N, Tarning J, Tambyah PA, Renaud C, Went GT, deJong MD, Boeckh MJ. 2013. Combination therapy with amantadine, oseltamivir, and ribavirin for influenza A infection:safety and pharmacokinetics. *Antiviral Therapy.* 18:377-386.
- Smith GJD, Naipospos TSP, Nguyen TD, De Jong MD, Vijaykrishna D, Usman TB, Hassa SS, Nguyen TV, Dao TV, Bui NA, Leung YHC, Cheung CL, Rayner JM, Zhang JX, Zhang LJ, Poon LLM, Li KS, Nguyen VC, Hien TT, Farrar J, Webster RG, Chen H, Peiris JSM, Guan Y. 2006. Evolution and adaptation of H5N1 influenza virus in avian and human hosts in Indonesia and Vietnam. *Virology.* 350:258-268.
- Smith GJ, Vijaykrishna D, Ellis TM, Dyrting KC, Leung YH, Bahl J, Wong CW, Kai H, Chow MKW, Duan L, Chan ASL, Zhang LJ, Chen H, Luk GSM, Peiris JSM, Guan Y. 2009. Characterization of avian influenza viruses A (H5N1) from wild birds, Hong Kong, 2004–2008. *Emerg Infect Dis.* 15:402-407.
- Stauffer SY, Feng, Nebioglu F, Heilig R, Picotti P, Helenius A. 2014. Stepwise priming by acidic pH and ahigh K+ concentration is required for efficient uncoating of influenza A virus cores after penetration. *J Virol.* 88:13029-13046.
- Short KR, Brooks AG, Reading PC, Londrigan SL. The fate of influenza A virus after infection of human

- macrophages and dendritic cells. *J Gen Virol.* 93:2315-2325.
- Thaa B, Levental I, Herrmann A, Veit M. 2011. Intrinsic membrane association of the cytoplasmic tail of influenza virus M2 protein and lateral membrane sorting regulated by cholesterol binding and palmitoylation. *Biochem J.* 437:389-397.
- Thomaston JL, Alfonso-Prieto M, Woldeyes RA, Fraser JS, Klein ML, Fiorin G, DeGrado WF. 2015. High-resolution structures of the M2 channel from influenza A virus reveal dynamic pathways for proton stabilization and transduction. *Proc Natl Acad Sci USA.* 112:14260-14265. doi: 10.1073/pnas.1518493112.
- Thomaston JL, Grado WFD. 2016. Crystal structure of the drug-resistant S31N influenza M2 proton channel. *Prot Sci.* 25:1551-1554.
- Vachieri SG, Xiong X, Collins PJ, Walker PA, Martin SR, Haire LF, Zhang Y, McCauley JW, Gamblin SJ, Skehel JJ. 2014. Receptor binding by H10 influenza viruses. *Nature.* 511:475-477.
- Von Itzstein M, Wu WY, Kok GB, Pegg MS, Dyason JC, Jin B, Phan TV, Smythe ML, White HF, Oliver SW, Colman PM, Varghese JN, Ryan DM, Woods JM, Bethell RC, Hotham VJ, Cameron JM, Penn CR. 1993. Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication. *Nature.* 363:418-423. doi: 10.1038/363418a0.
- Von Itzstein M. 2007. The war against influenza: Discovery and development of sialidase inhibitors. *Nat Rev.* 6:967-974.
- Vu DB, Nguyen TV, Le ST, Phan CH. 2017. An improved synthesis of amantadine hydrochloride. *Org Process Res Dev.* 21:1758-1760.
- Wagner R, Wolff T, Herwig A, Pleschka S, Klenk HD. 2000. Interdependence of hemagglutinin glycosylation and neuraminidase as regulators of influenza virus growth: A study by reverse genetics. *J Virol.* 74:6316-6323.
- Wan X, Dong L, Lan Y, Long L, Xu C, Zou S, Li Z, Wen L, Cai Z, Wang W, Li X, Yuan F, Sui H, Zhang Y, Dong J, Sun S, Gao Y, Wang M, Bai T, Yang L, Li D, Yang W, Yu H, Wang S, Feng Z, Wang Y, Guo Y, Webby RJ, Shu Y. 2011. Indications that live poultry markets are a major source of human H5N1 influenza virus infection in China. *J Virol.* 85:13432-13438.
- Wang D, Harmon A, Jin J, Francis DH, Christopher-Hennings J, Nelson E, Montelaro RC, Li F. 2010. The lack of an inherent membrane targeting signal is responsible for the failure of the matrix (M1) protein of influenza A virus to bud into virus-like particles. *J Virol.* 84:4673-4681.
- Watanabe A, Chang SC, Kim MJ, Chu DW, Ohashi Y, MARVEL Study Group. 2010. Long-acting neuraminidase inhibitor laninamivir octanoate versus oseltamivir for treatment of influenza: a double-blind, randomized, noninferiority clinical trial. *Clin Infect Dis.* 51:1167-1175.
- Woods JM, Bethell RC, Coates JAV, Healy N, Hiscox SA, Pearson BA, Ryan DM, Ticehurst J, Tilling J, Walcott SM, Penn CR. 1993. 4-Guanidino-2,4-Dideoxy-2,3-Dehydro-N-Acetylneuraminic Acid is a highly effective inhibitor both of the sialidase (neuraminidase) and of growth of a wide range of influenza a and b viruses in vitro. *Antimicrob Agents Chemoth.* 37:1473-1479.
- Wright AK, Batsomboon P, Dai J, Hung I, Zhou H, Dudley GB, Cross TA. 2016. Differential binding of rimantadine enantiomers to influenza a M2 proton channel. *Cross J Am Chem Soc.* 138:1506-1509. doi: 10.1021/jacs.5b13129.
- Wu WL, Siu-Ying L, Yixin C, Genyan W, Bobo WM, Wen X, Pui W, Wenjun S, Tianwei L, Kwok-Hung C, Kwok-Yung Y, Chen H. 2012. The 2008–2009 H1N1 influenza virus exhibits reduced susceptibility to antibody inhibition: Implications for the prevalence of oseltamivir resistant variant viruses. *Antiviral Res.* 93:144-153.
- Yamashita M, Tomozawa T, Kakuta M, Tokumitsu A, Nasu H, Kubo S. 2009. CS-8958, a prodrug of the new neuraminidase inhibitor R-125489, shows long-acting anti-influenza virus activity. *Antimicrob Agents Chemother.* 53:186-192. doi: 10.1128/AAC.00333-08.
- Yang ZF, Mok CK, Peiris JS, Zhong NS. 2015. Human infection with a novel avian influenza A (H5N6) virus. *N Engl J Med.* 373:487-489. doi: 10.1056/NEJMc1502983.
- Zaraket H, Daput C, Ghanem S, Ali Z, Lteif M, Kondo H, Daput IC, Saito K, Kayali G, Suzuki H, Dbaiho G, Saito R. 2014. Characterization of human influenza viruses in Lebanon during 2010- 2011 and 2011-2012 post-pandemic seasons. *Intervirology.* 57:344-352. doi: 10.1159/000365758
- Zhang Y, Whittaker GR. 2014. Influenza entry pathways in polarized MDCK cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 450:234-239. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.05.095.
- Zhang X, Song Z, He J, Yen H, Li J, Zhu Z, Tian D, Wang W, Xu L, Guan W, Liu Y, Wang S, Shi B, Zhang W, Qin B, Cai J, Wan Y, Xu C, Ren X, Chen H, Liu L, Yang Y, Zhou X, Zhou W, Xu J, Zhang X, Peiris M, Hu Y, Yuan Z. 2014. Drug susceptibility profile and pathogenicity of H7N9 influenza virus (Anhui1 lineage) with R292K substitution. *Emerg Microbes Infect.* 3:e78. doi:10.1038/emi.2014.80.
- Zhu XB, Wang M, Wang SZ, Yao ZJ. 2012. Concise synthesis of zanamivir and its C4-thiocarbamido derivatives utilizing a 3 + 2-cycloadduct derived from D-glucono-delta-lactone. *Tetrahedron.* 68:2041-2044.

Penggunaan Antibiotik Enrofloksasin sebagai Obat Hewan dan Bahaya Residunya terhadap Kesehatan Masyarakat

(The Use of Enrofloxacin Antibiotic as a Veterinary Drug and Its Residual Hazards on Public Health)

Prima Mei Widiyanti^{1,2}, M B Sudarwanto³, E Sudarnika³, R Widiastuti²

¹Program Studi Kesehatan Masyarakat Veteriner, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor

²Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl RE Martadinata No.30 Bogor 16680

³Departemen Ilmu Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Jl. Agatis, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

Kontributor utama: primamw@gmail.com

(Diterima 22 Maret 2019 – Direvisi 8 Mei 2019 – Disetujui 13 Mei 2019)

ABSTRACT

The livestock sector can improve the community's economy and has a role in fulfilling food needs, especially animal protein. One of the problems in the livestock sector is the presence of infectious diseases that consequently need treatment using veterinary drugs. This paper describes the use of enrofloxacin antibiotics as veterinary drug and their residual hazards on public health. Enrofloxacin is an antibiotic from the family of fluoroquinolones (second generation of quinolone). Enrofloxacin is a broad-spectrum antibiotic that is effective to kill Gram positive and negative bacteria, so it was used for the treatment of various diseases in animals. Pharmacokinetically, enrofloxacin will be metabolized into ciprofloxacin and other metabolites. The improper use of enrofloxacin antibiotics caused residues in food products of animal origin, microbial resistance and toxicity, therefore the use of enrofloxacin needs to be monitored and evaluated for the sake of animal health and society.

Key words: Antibiotic, enrofloxacin, residue, resistance, public health

ABSTRAK

Sektor peternakan dapat meningkatkan perekonomian masyarakat dan berperan dalam pemenuhan kebutuhan pangan khususnya protein hewani. Salah satu permasalahan dalam sektor peternakan adalah adanya penyakit infeksius, sehingga memerlukan obat hewan. Makalah ini menguraikan tentang penggunaan antibiotik enrofloksasin sebagai obat hewan dan residunya terhadap kesehatan masyarakat veteriner. Enrofloksasin merupakan antibiotik golongan fluorokuinolon (generasi kedua kuinolon). Enrofloksasin efektif untuk membunuh bakteri Gram positif dan negatif, sehingga digunakan untuk pengobatan berbagai penyakit pada hewan. Secara farmakokinetik, enrofloksasin akan di metabolisme menjadi siprofloksasin dan metabolit lainnya. Penggunaan antibiotik enrofloksasin secara tidak tepat dapat menimbulkan residu pada produk pangan asal hewan, resistensi mikroba dan toksisitas, sehingga penggunaannya perlu diawasi dan dievaluasi demi kesehatan hewan dan masyarakat.

Kata kunci: Antibiotik, enrofloksasin, residu, resistensi, kesehatan masyarakat

PENDAHULUAN

Peternakan merupakan salah satu sektor penting dalam bidang perekonomian. Peternakan dapat meningkatkan pendapatan ekonomi masyarakat, memperluas kesempatan kerja dan berperan dalam pemenuhan kebutuhan pangan khususnya protein hewani (susu, daging, telur) (Dianawati & Mulijanti 2015; As et al. 2014).

Salah satu permasalahan di sektor peternakan adalah adanya penyakit infeksius pada hewan. Penyakit pada hewan dapat mempengaruhi penurunan produktivitas hingga menyebabkan kematian pada hewan. Penyakit pada hewan dapat disebabkan oleh

infeksi virus, bakteri, parasit dan lainnya. Pengobatan penyakit pada hewan yang disebabkan oleh infeksi bakteri dapat dilakukan dengan terapi antibiotik (kemoterapetik). Penyakit pada hewan yang dapat diterapi dengan menggunakan antibiotik antara lain mastitis, penyakit pernafasan, diare, penyakit reproduksi, persendian dan penyakit lainnya (De Briyne et al. 2014; Logue et al. 2017).

Antibiotik dapat digunakan untuk tujuan kemoterapetik dan profilaktik. Penggunaan antibiotik secara aman dan efektif harus diatur, karena antibiotik dapat menyebabkan residu pada produk pangan asal hewan. Pemberian antibiotik harus memperhatikan waktu henti obat, sehingga aman untuk dikonsumsi.

Pengendalian dan deteksi residu antibiotik pada pangan asal hewan dapat melindungi kesehatan manusia sebagai konsumen (Jayalakshmi et al. 2017; Moghadam et al. 2016).

Antibiotik yang dapat diberikan pada hewan salah satunya adalah antibiotik golongan fluorokuinolon. Penjualan fluorokuinolon mencapai 3,6 ton per tahun yang digunakan untuk pengobatan infeksi pada hewan di negara Perancis (Troughon & Lefebvre 2016). Fluorokuinolon dapat digunakan untuk penanganan penyakit pada unggas, sapi, kambing, domba, babi, kuda dan ikan. Fluorokuinolon merupakan antibiotik yang penting untuk pengobatan penyakit, karena dapat digunakan untuk pengobatan penyakit yang cukup serius dengan infeksi yang spesifik. *World Organisation for Animal Health* mengelompokkan fluorokuinolon ke dalam jenis antibiotik (antimikrobia) kriteria paling tinggi sebagai *critically important antimicrobials*, sehingga penggunaan dan residunya pada produk pangan asal hewan perlu mendapat perhatian (OIE 2018).

Enrofloksasin merupakan salah satu jenis antibiotik golongan fluorokuinolon yang banyak digunakan untuk terapi pada hewan. Antibiotik enrofloksasin merupakan antibiotik berspektrum luas, sehingga efektif untuk pengobatan penyakit yang disebabkan oleh infeksi bakteri Gram positif dan Gram negatif. Namun, antibiotik enrofloksasin dapat menyebabkan gangguan syaraf, kardiotoxik, kebutaan, kematian embrionik serta toksisitas pada lingkungan (ekotoksitas) (Troughon & Lefebvre 2016; Kang et al. 2019; Wei et al. 2018). Penggunaan antibiotik enrofloksasin pada hewan juga dapat menyebabkan residu dan resistensi mikroba, sehingga penggunaan antibiotik enrofloksasin harus diawasi dan dievaluasi demi keamanan pangan dan kesehatan manusia (Mansouri-najand et al. 2012; Moharana et al. 2015). Tulisan ini bertujuan untuk mengulas penggunaan antibiotik enrofloksasin sebagai obat hewan dan bahaya residunya terhadap kesehatan masyarakat veteriner.

ANTIBIOTIK ENROFLOKSASIN DAN MEKANISME KERJANYA

Enrofloksasin merupakan antibiotik golongan fluorokuinolon (generasi kedua kuinolon). Kuinolon pertama yaitu asam nalidiksik yang telah digunakan untuk pengobatan pada hewan sejak tahun 1980, sedangkan enrofloksasin merupakan fluorokuinolon yang pertama digunakan pada tahun 1984. Pada antibiotik fluorokuinolon terdapat penambahan atom

fluor pada posisi ke-6 yang dapat meningkatkan spektrum antibakterial.

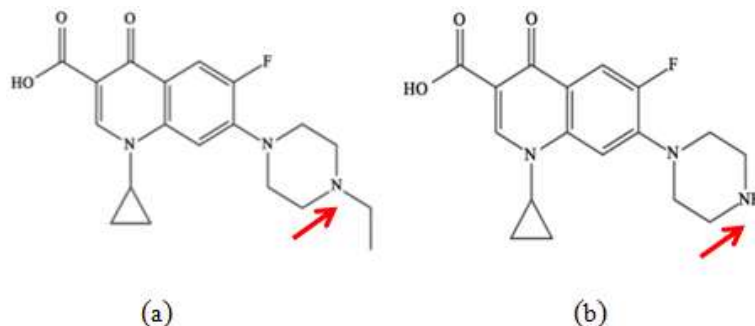
Mekanisme kerja antibiotik enrofloksasin

Enrofloksasin bekerja menghambat *deoxy ribonucleic acid* (DNA) *gyrase* (topoisomerase II) dan topoisomerase IV (topo IV) yang diperlukan oleh bakteri untuk replikasi DNA. Hambatan ini menghasilkan efek sitotoksik dalam sel target. Mekanisme kerja dari enrofloksasin berbeda dengan antimikroba lainnya seperti golongan beta laktam, makrolida, tetrasiklin dan aminoglikosida. Enrofloksasin mengandung ikatan fluor di tengah struktur kimianya. Gugus fluorida telah diketahui bersifat neurotoksik dan obat yang menempel pada gugus fluorida dapat berpenetrasi ke dalam jaringan yang sensitif termasuk otak. Kemampuan fluorida untuk menembus *blood-brain barrier*, membuat fluorida bersifat neurotoksik kuat. Fluorida juga mengganggu sintesa kolagen, dan dapat merusak sistem imun dengan menghabiskan persediaan energi dan menghambat pembentukan antibodi dalam darah (Babaahmady & Khosravi 2011; Raini 2016).

Farmakokinetik antibiotik enrofloksasin

Farmakokinetik obat menggambarkan perubahan konsentrasi obat setelah pemberian obat dengan dosis tertentu. Proses farmakokinetik antara lain absorpsi, distribusi, metabolisme dan eliminasi obat. Proses farmakokinetik tergantung dari rute administrasi, formulasi, spesies hewan, kondisi tubuh, umur hewan, dan status fisiologis. Obat masuk ke dalam tubuh dapat melalui per oral, intramuskular atau intravena, kemudian diabsorpsi ke sistem sirkulasi sistemik (Setiawan et al. 2019; López-Cadenas et al. 2013).

Enrofloksasin dimetabolisme di dalam hati melalui *de-ethylation* dari grup cincin piperazin. Dalam tubuh hewan, enrofloksasin menghasilkan metabolit siprofloksasin yang mempunyai gugus *ethyl* pada cincin piperazin (Gambar 1). Sipofloksasin bersifat lebih lipofilik daripada enrofloksasin pada pH 7,4. Metabolit lain dari enrofloksasin diketahui tidak bersifat sebagai antimikroba, metabolit tersebut antara lain *oxociprofloxacin*, *enrofloxacin amide*, *dioxociprofloxacin*, *desethylene ciprofloxacin*, *destethylene enrofloxacin*, *N-formyl ciprofloxacin*, *oxoenrofloxacin* dan *hydroxy oxoenrofloxacin* (Kumar 2012).



Gambar 1. Struktur kimia antibiotik enrofloksasin (a) dan siprofloksasin (b) sebagai metabolit utamanya

Sumber: Troughon & Lefebvre (2016) yang dimodifikasi

Pada ruminansia besar, enrofloksasin dimetabolisme menjadi siprofloksasin relatif besar (59-64%), namun pada unggas hanya <10% saja. Persentase metabolisme enrofloksasin menjadi siprofloksasin pada beberapa hewan dapat dilihat pada Tabel 1 (Troughon & Lefebvre 2016).

Tabel 1. Persentase siprofloksasin pada beberapa jenis hewan setelah pemberian enrofloxacin

Jenis hewan	Persentase siprofloksasin dalam plasma
Anjing	40
Sapi perah	59
Sapi pedaging	64
Ayam	<10
Babi	51
Kambing	34

Sumber: Troughon & Lefebvre (2016)

Setelah proses metabolisme, maka obat akan diekskresikan dan dieliminasi di dalam tubuh. Golongan fluorokuinolon (enrofloksasin) merupakan obat yang bersifat hidrofilik, akan mengalami proses eliminasi terutama di ginjal. Obat hidrofilik memiliki volume distribusi lebih kecil, karena sulit menembus jaringan adiposa dan intraseluler (Setiawan et al. 2019). Enrofloksasin dapat diekskresikan melalui feses, urin dan lainnya. Proses penurunan konsentrasi enrofloksasin pada tubuh ayam bagian daging paha lebih cepat dibandingkan dengan bagian dada, karena aktivitas otot paha lebih tinggi dibandingkan dengan daging dada (Widiastuti 2008; Troughon & Lefebvre 2016). Waktu henti obat (*withdrawal time*) antibiotik dengan dosis 2,5 mg/kg berat badan secara *intramuscular* adalah pada hari ke-6. Hal ini berarti pada hari ke-6 sudah tidak ditemukan lagi adanya residu antibiotik, sehingga produk pangan sudah aman untuk dikonsumsi kembali (Davis et al. 2007).

Farmakokinetik enrofloksasin pada sapi perah lebih cepat dibandingkan pada sapi jantan yang telah dikastrasi (*steer*), karena enrofloksasin lebih cepat

dimetabolisme menjadi siprofloksasin. Hal tersebut berkaitan dengan waktu paruh dan eliminasi obat yang lebih lama pada sapi jantan pedaging, namun tidak ada perbedaan ikatan enrofloksasin dengan protein plasma pada sapi perah dan sapi jantan pedaging (Idowu et al. 2010). Konsentrasi enrofloksasin di dalam plasma lebih tinggi dibandingkan konsentrasi di daging paha dan kulit (Kumar 2012).

Sapi yang diinjeksi dengan antibiotik enrofloksasin dengan dosis 2,5 mg/kg berat badan secara intravena, maka akan terdeteksi residunya setelah 15 menit penyuntikan. Konsentrasi tertinggi akan tercapai pada 42-78 menit sesudah diinjeksi. Siprofloksasin sebagai hasil metabolit enrofloksasin akan terdeteksi pada menit ke 300-480 setelah diinjeksi. Konsentrasi enrofloksasin pada plasma dan susu jumlahnya sama (López-Cadenas et al. 2013).

PENGUNAAN ANTIBIOTIK ENROFLOKSASIN PADA HEWAN

Produk antibiotik untuk hewan pertama kali diproduksi oleh laboratorium Bayer pada tahun 1991 dengan nama dagang Baytril® dan digunakan pada unggas secara oral. Pada saat sekarang, berbagai produk yang mengandung antibiotik enrofloksasin telah diproduksi oleh perusahaan dengan sediaan berupa tablet, bolus, maupun yang dapat diinjeksi. Jenis hewan yang dapat diberikan antibiotik enrofloksasin juga sudah beragam meliputi karnivora, hewan ternak dan hewan eksotis. Antibiotik enrofloksasin dapat digunakan untuk berbagai penyakit pada hewan yang disebabkan oleh bakteri Gram positif dan Gram negatif. Pengobatan yang utama pada infeksi respirasi, namun juga dapat digunakan untuk penyakit pencernaan, urinari, persendian, genital, mastitis dan penyakit kulit. Antibiotik enrofloksasin juga dapat digunakan pada akuakultur (perikanan) (Troughon & Lefebvre 2016). Antibiotik enrofloksasin digunakan untuk pengobatan penyakit yang sangat penting (*critically important*) antara lain septikemia, penyakit

respirasi dan pencernaan. Terapi enrofloksasin dapat digunakan untuk penanganan penyakit pada unggas, sapi, kambing, domba, kuda, kelinci, babi dan ikan (OIE 2018).

Enrofloksasin merupakan antibiotik yang diperbolehkan untuk pengobatan dan efektif untuk melawan mikroba yang sudah resisten terhadap antibiotik golongan aminoglikosida, betalaktam, makrolida dan tetrasiklin. Penggunaan antibiotik enrofloksasin dapat dilakukan pada sapi dengan dosis 2,5-5 mg/kg secara *subcutan* selama tiga hari atau 7,5-12,5 mg/kg secara *subcutan* dengan satu kali terapi. Penggunaan antibiotik enrofloksasin pada hewan dapat menimbulkan residu antibiotik pada produk hewan yang diproduksinya apabila tidak memperhatikan waktu henti obat (Mahmood et al. 2016).

RESIDU ANTIBIOTIK ENROFLOKSASIN TERHADAP KESEHATAN MASYARAKAT

Residu antibiotik enrofloksasin

Residu antibiotik merupakan sejumlah antibiotik atau hasil metabolit antibiotik pada jaringan atau produk hewan (daging, susu, telur dan lainnya), setelah hewan diberikan antibiotik. Residu antibiotik pada produk hewan dapat berdampak pada kesehatan masyarakat dan berimplikasi ke sektor perekonomian. Residu antibiotik dapat mengakibatkan reaksi alergi, resistensi mikroba, karsinogen, toksisitas dan penolakan produk (Asredie & Engdaw 2015).

Dalam jangka panjang, paparan residu antibiotik menyebabkan resistensi pada mikroflora di usus. Antibiotik berpotensi menjadi antigen atau hapten dan dapat menyebabkan alergi karena dapat merespon immunoglobulin E (IgE), sehingga menyebabkan urtikaria, bronkhospasmus, dan angioderma. Reaksi nonIgE dapat menyebabkan anemia hemolitik, trombositopenia, nefritis, eritema, *toxic epidermal necrolysis*. Pada aspek teknologi, keberadaan residu antibiotik dalam susu dapat mengganggu/menggagalkan

proses fermentasi produk susu yang menggunakan *starter*, antara lain yoghurt, keju, mentega, kefir, koumis, susu fermentasi dan lainnya. Efek residu antibiotik pada lingkungan dapat terjadi karena adanya pembuangan dari perusahaan obat, urin dan feses hewan yang diobati dengan antibiotik. Enrofloksasin dapat menyebabkan toksisitas pada ekosistem akuatik seperti algae, hewan vertebrata dan invertebrate. Ekskresi hewan (urin, feses) dapat mengandung 17-90% residu antibiotik karena tidak semua antibiotik diserap dalam saluran cerna. Berdasarkan hasil penelitian, konsentrasi residu antibiotik pada feses tergantung jenis antibiotik, dan waktu *sampling* pada hewan. Antibiotik juga dapat mencemari lingkungan perairan dan mengganggu ekosistem akuatik. Pembuangan limbah peternakan ke perairan dapat menyebabkan residu pada lingkungan yang dipengaruhi oleh jenis antibiotik, karakteristik tanah, temperatur, kelembaban dan iklim. Residu antibiotik dapat menyebabkan resistensi antimikroba. Gen resisten antibiotika/ *antibiotic resistance genes* (ARGs) telah dilaporkan di dunia (Jayalakshmi et al. 2017; Troughon & Lefebvre 2016).

Konsumsi pangan yang mengandung residu antibiotik enrofloksasin dapat membahayakan kesehatan manusia. Berdasarkan pengujian secara *in vitro* dapat menyebabkan resistensi bakteri pada kolon. *The European Medicines Agency* (EMA) menetapkan *Acceptable Daily Intakes* (ADI) untuk antibiotik enrofloksasin adalah 6,2 µg/kg berat badan karena lebih rendah dari batas toksik ADI yaitu 12 µg/kg berat badan yang telah dihitung berdasarkan faktor keamanan *No Observed Effect Level* (NOEL) dari 1,2 mg/kg berat badan per hari. Untuk melindungi kesehatan manusia banyak negara menetapkan batas maksimum residu antibiotik enrofloksasin pada produk hewan (Troughon & Lefebvre 2016). Menurut *The European Commission* (2010), batas maksimum residu (BMR) atau *maximum residue limit* (MRL) antibiotik enrofloksasin ditetapkan berdasarkan jenis hewan dan jenis produk pangan asal hewan (Tabel 2).

Tabel 2. Batas maksimum residu enrofloksasin (En) dan siprofloksasin (Si) dalam pangan

Residu	Jenis hewan	Daging	Lemak	Hati	Ginjal	Susu
BMR (µg/kg atau ppb)						
En dan Si	Sapi, kambing, domba	100	100	300	200	100
	Babi, kelinci	100	100	200	300	-
	Unggas	100	100	200	200	-

(-) = Tidak tersedia

Sumber: *The European Commission* (2010)

Penelitian yang dilakukan oleh Islam et al. (2016), menyatakan bahwa residu antibiotik enrofloksasin pada unggas secara berurutan paling tinggi konsentrasinya pada hati, kemudian ginjal, telur dan daging. Selain itu penelitian yang dilakukan oleh Widiastuti (2008) pada ayam yang diberi enrofloksasin dengan dosis 50 mg/kg berat badan menghasilkan residu dengan urutan konsentrasi tertinggi pada hati (117,47 ppb), daging dada (95,16 ppb) dan daging paha (71,40 ppb). Konsentrasi residu tertinggi pada hati karena hati merupakan pusat metabolisme.

Residu antibiotik enrofloksasin pada susu di India dilaporkan ada yang melebihi BMR. Sebanyak 100 sampel susu yang dianalisis, 19 sampel susu mengandung residu antibiotik enrofloksasin dan siprofloksasin, serta 2 sampel melebihi BMR (Srinivasu et al. 2017). Menurut Nirala et al. (2017), penelitian yang dilakukan di wilayah Bihar-India, terdapat 8 sampel susu yang mengandung residu antibiotik enrofloksasin dan siprofloksasin serta 3 sampel melebihi BMR dari total 250 sampel susu.

Hasil pengujian residu antibiotik di negara-negara Eropa seperti Cekoslovakia menunjukkan 150 susu sapi terdeteksi adanya residu enrofloksasin pada 115 sampel pada kisaran 1,7-18,6 ppb (Navrátilová et al. 2017). Pengujian terhadap 119 sampel susu segar di Kroasia yang dikumpulkan pada bulan Januari hingga Maret 2011 dan dianalisis secara *immunoassay* menunjukkan terdeteksinya residu tetrasiklin pada kisaran 0,02-49,5 ppb dan rata-rata 2,83 ppb, enrofloksasin pada kisaran 0,56-22,3 ppb (Bilandzic et al. 2011). Analisis pada 497 susu segar yang dikumpulkan dari peternak dan pengumpul di Makedonia pada bulan Oktober 2008 hingga April 2011, menunjukkan adanya residu fluorokuinolon pada kisaran 0,6-22,0 µg/kg (Dimitrieska-Stojkovic et al. 2011). Penelitian di negara India dengan HPLC menunjukkan 16,8% dari 125 sampel susu segar terdeteksi enrofloksasin dan 8% diantaranya melebihi batas maksimum residu (Moharana et al. 2015).

Antibiotik enrofloksasin pada telur lebih banyak ditemukan pada bagian putih telur dibandingkan kuning telur (Duan et al. 2014). Penelitian di Iran mengenai residu antibiotik enrofloksasin pada telur menunjukkan bahwa lebih dari 50% sampel positif dari total 150 sampel telur, dengan konsentrasi tertinggi 56,17 ppb. Telur dengan kadar residu antibiotik yang tinggi dapat beresiko terhadap mikroflora dalam usus, mengakibatkan bakteri yang resisten terhadap antibiotik dan reaksi hipersensitif (Mahmoudi & Norian 2015).

Metode deteksi antibiotik enrofloksasin

Beberapa residu antibiotik yang terdapat dalam produk pangan asal hewan antara lain tetrasiklin,

sulfonamide, fluorokuinolon, makrolida, linkosamid, aminoglikosida, betalaktam, sepalosporin dan lainnya. Deteksi residu antibiotik dapat dilakukan dengan beberapa metode antara lain *microbial inhibition test* (kualitatif atau semikuantitatif), biosensor, Charm II, *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA), *high performance liquid chromatography* (HPLC) dan *liquid chromatography mass spectrometry* (LC-MS) (Jayalakshmi et al. 2017; Priyanka et al. 2017).

Analisis residu antibiotik enrofloksasin secara kuantitatif dapat dilakukan dengan menggunakan HPLC (Trouchon & Lefebvre 2016). Penelitian mengenai residu antibiotik enrofloksasin pada susu telah dilakukan dengan menggunakan alat HPLC (Dimitrieska-Stojkovic et al. 2011; Moharana et al. 2015; Mohammed et al. 2016). Deteksi antibiotik enrofloksasin pada sampel susu dan plasma dengan menggunakan HPLC dapat dilakukan dengan detektor fluoresen (Idowu & Peggins 2004). Selain itu deteksi antibiotik enrofloksasin yang lebih sensitif juga dapat dilakukan dengan menggunakan LC-MS atau LC-MS/MS (Hermo et al. 2008).

Deteksi antibiotik enrofloksasin di Portugal secara simultan dengan beberapa jenis antibiotik lain dapat dilakukan menggunakan *ultra high performance liquid chromatography mass spectrometry* (UHPLC-MS/MS) dengan sensitivitas yang tinggi. Validasi metode sudah sesuai dengan aturan regulasi di Eropa sehingga dengan UHPLC-MS/MS dapat terdeteksi residu antibiotik enrofloksasin dengan konsentrasi 0,1-12 µg/kg (Santos et al. 2019).

BAHAYA RESIDU ANTIBIOTIK ENROFLOKSASIN

Residu antibiotik enrofloksasin dapat membahayakan bagi kesehatan masyarakat antara lain resistensi mikroba dan toksisitas.

Resistensi mikroba

Resistensi mikroba pada dekade saat ini merupakan permasalahan global yang berkaitan dengan kesehatan manusia dan hewan. Resistensi antibiotik terjadi ketika bakteri memperoleh gen resisten yang memungkinkan mikroba dapat bertahan hidup saat terpapar antibiotik (WHO 2017). Gen resisten pada bakteri dapat diwariskan atau diperoleh dari unsur genetik seluler seperti plasmid (Read & Woods 2014). Pemberian antibiotik dosis rendah (subterapetik), dapat meningkatkan perkembangan resistensi antibiotik yang memicu perubahan genetik, seperti perubahan ekspresi gen, terjadinya *horizontal gen transfer* (HGT), dan mutagenesis (Ventola 2015).

Antibiotik dapat mengganggu keseimbangan ekologi mikroba, sehingga terjadi kolonisasi bakteri yang resisten (Jernberg et al. 2010). Gen bakteri resisten tersebut mengakibatkan potensi resistensi dapat dipindahkan antara spesies bakteri yang berbeda (Smith et al. 2007). Bakteri resisten menyebar melalui seleksi alam saat antibiotik gagal menghentikan proses perkembangan bakteri tersebut, hal ini terjadi saat bakteri kompetitor tereliminasi akibat sensitif terhadap antibiotik (Read & Wood 2014).

Mekanisme gen resisten interseluler pada mikroba meliputi konjugasi, transduksi, dan transformasi. Konjugasi terjadi ketika molekul DNA yang bereplikasi sendiri/autonom (plasmid) memindahkan gen di antara bakteri yang belum tentu terkait erat. Transduksi dimediasi oleh bakteriofag, terjadi dengan cara DNA bakteri dimasukkan ke dalam partikel fag dan kemudian dipindahkan ke sel bakteri baru selama terjadinya infeksi. Transformasi terjadi ketika DNA yang dilepaskan dari satu sel diambil oleh sel penerima terdekat. Pada mekanisme intraseluler terjadi tranposisi, yaitu perpindahan gen dari satu lokasi DNA ke lokasi lain dan dari satu DNA ke DNA yang lain (Drlica & Perlin 2011).

Resistensi mikroba dari hewan ke manusia dapat terjadi melalui kontak langsung dengan hewan yang terinfeksi dengan mikroba yang sudah resisten atau transmisi melalui rantai pangan dari produk hewan yang terpapar dengan mikroba yang sudah resisten. Proses transfer genetik dari hewan ke manusia dapat terjadi dengan pola antara lain: (1) *Strain* bakteri yang sama pada hewan berpindah ke manusia, (2) Struktur genetik melewati satu atau lebih inang yang berbeda, berakhir di inang yang baru (manusia), dengan struktur DNA yang sama; (3) Inang dan gen plasmid berpindah ke lingkungan, mengalami perubahan kaset gen menjadi spesifik pada inang tertentu saja dengan persentase kesamaan DNA yang rendah atau inti plasmid tetap sama (Marshall & Levy 2011).

Penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa beberapa jenis bakteri sudah resisten terhadap antibiotik enrofloksasin (Tabel 3). Penelitian di Brasil dan Estonia menyatakan bahwa *Campylobacter* pada ayam sudah resisten terhadap antibiotik enrofloksasin (Panzenhagen et al. 2016; Roasto et al. 2007). Selain itu, penelitian yang dilakukan di Malaysia juga menunjukkan bahwa *Campylobacter* sudah resisten terhadap antibiotik enrofloksasin (Mansouri-najand et al. 2012). Menurut Li et al. (2017), bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* sudah resisten terhadap antibiotik enrofloksasin. Hasil penelitian menyatakan bahwa resistensi terjadi pada gen *gyrA*, *gyrB*, *gyrC* dan *parE*, sehingga penggunaan antibiotik enrofloksasin perlu pengawasan dan evaluasi.

Bakteri *Actinonobacillus* yang resisten terhadap enrofloksasin dapat terjadi karena adanya mutasi gen target dan membawa setidaknya satu mutasi dalam QRDR *gyrA* yang menyebabkan perubahan asam amino pada kodon 83 atau 87 (Wang et al. 2010).

Tabel 3. Bakteri yang resisten terhadap antibiotik enrofloksasin

Jenis bakteri yang resisten	Sumber
<i>Escherichia coli</i>	Niasono et al. (2019), Li et al. (2017), Piras et al. (2015)
<i>Salmonella typhimurium</i>	Li et al. (2017)
<i>Campylobacter</i> spp.	Mansouri-najand et al. 2012; Panzenhagen et al. 2016; Roasto et al. 2007
<i>Actinonobacillus</i> spp.	Wang et al. 2010

Toksisitas enrofloksasin

Efek samping obat golongan fluokuionolon dapat menyebabkan gangguan pada pencernaan yang meliputi mual, sakit perut, muntah dan diare serta reaksi inflamasi setelah penyuntikan obat khususnya pada babi. Antibiotik enrofloksasin dapat bersifat toksik pada mata kucing yaitu degenerasi retina dan kebutaan. Pada anjing apabila diberikan enrofloksasin dengan dosis tinggi dapat menyebabkan gangguan syaraf pusat antara lain lemah, nafsu makan menurun, hipersalivasi. Efek alergi yang dapat ditimbulkan enrofloksasin antara lain urtikaria dan angioderma. Enrofloksasin juga dapat menyebabkan toksisitas pada lingkungan (ekotoksitas). Ekskresi dari hewan (feses, urin) dapat mencemari lingkungan sehingga menyebabkan kontaminasi pada tanah, air dan biota di air. Enrofloksasin dalam manur hewan memiliki konsentrasi 0,3 - 1,421 mg/kg. Enrofloksasin di lingkungan dapat didegradasi melalui proses fotolisis, biodegradasi, dan oksidasi oleh mineral namun kurang sensitif dalam proses hidrolisis. Waktu yang dibutuhkan untuk degradasi enrofloksasin selama 1155 hari (Troughon & Lefebvre 2016; Wei et al. 2018).

Toksisitas antibiotik enrofloksasin dapat mempengaruhi mikroba dalam tanah. Penelitian membuktikan bahwa tanah yang diberi perlakuan antibiotik enrofloksasin akan berdampak pada populasi bakteri dalam tanah akan menurun jumlahnya (Wei et al. 2018). Antibiotik enrofloksasin juga bersifat toksik pada cacing tanah, karena dapat menghambat aktivitas enzim pencernaan khususnya selulase dan alkaline fosfatase (Zhang et al. 2019).

Toksisitas antibiotik enrofloksasin tergantung pada aplikasi obat dan jenis hewannya. Kelinci

memiliki letal dosis 50 (LD50) atau dosis yang dapat mematikan 50% hewan coba dengan dosis lebih rendah dibandingkan tikus dan mencit. Pemberian enrofloksasin secara intravena pada mencit memiliki LD50 lebih rendah dibandingkan dengan per oral. LD50 pada beberapa hewan dapat dilihat pada Tabel 4 (Babaahmady & Khosravi 2011).

Tabel 4. Letal Dosis 50 (LD50) enrofloksasin pada beberapa jenis hewan

Jenis hewan	Aplikasi	LD50 (mg/kg berat badan)
Tikus	Oral	≥5000
Mencit	Oral	≥5000
Mencit	Intravena	200
Kelinci	Oral	500-800

Sumber: Babaahmady & Khosravi 2011

Enrofloksasin dan marbofloksasin termasuk antibiotik golongan fluorokuinolon, namun enrofloksasin menunjukkan efek toksisitas yang lebih tinggi. Penelitian pada ayam menunjukkan telur yang diberi antibiotik enrofloksasin memperlihatkan penurunan daya tetas dan terjadi kematian embrionik, sedangkan beberapa ekor ayam yang menetas menunjukkan kelainan bentuk sendi. Enrofloksasin dapat bersifat kardiotosik karena dapat mempercepat denyut jantung embrionik (Hrubá et al. 2019).

PENGENDALIAN RESIDU ANTIBIOTIK

Residu antibiotik dalam pangan khususnya produk pangan asal hewan mendapat perhatian besar karena berkaitan dengan keamanan pangan dan kesehatan masyarakat. Residu antibiotik dalam produk hewan dapat berpengaruh terhadap sosial ekonomi dalam perdagangan internasional hewan dan produk hewan, sehingga perlu dilakukan pencegahan dan pengendalian terhadap residu antibiotik dalam pangan. Pencegahan dan pengendalian residu antibiotik dapat dilakukan dengan beberapa cara antara lain: mendorong kepedulian residu antibiotik pada individu, kelompok atau organisasi masyarakat melalui sosialisasi dari dokter hewan, institusi, pemerintah daerah dan pusat; pengembangan prosedur deteksi residu antibiotik secara cepat dalam produk hewan; pemanasan produk hewan (dimasak) sebelum dikonsumsi, antibiotik digunakan hanya untuk pengobatan pada hewan yang sakit saja sesuai dengan penyebabnya (Nisha 2008). Penerapan *hazard analysis and critical control point* (HACCP) pada industri pangan juga dapat meningkatkan kualitas produk pangan. Pada industri yang sudah menerapkan HACCP, dilakukan pengecekan adanya residu antibiotik serta kontaminan lainnya untuk memastikan hasil pangan yang aman

untuk dikonsumsi masyarakat (Mohammed et al. 2016).

Adanya dampak atau kerugian yang ditimbulkan akibat residu antibiotik dalam pangan, maka penting untuk memperhatikan *withdrawal time* pengobatan dengan antibiotik pada hewan dan rutin melakukan monitoring pemeriksaan antibiotik pada produk hewan. Selain itu penerapan praktek higiene dan manajemen dengan baik untuk menjamin keamanan pangan agar kesehatan masyarakat semakin meningkat (Jayalakshmi et al. 2017; Priyanka et al. 2017).

Pencegahan residu antibiotik di Indonesia dilakukan dengan penetapan Permentan No. 14/2017 mengenai Klasifikasi Obat Hewan, sejak 1 Januari 2018 pemerintah melarang penggunaan *antibiotic growth promoters* (AGP) dalam pakan. Pelarangan ini juga diperkuat dengan Permentan No. 22/2017 tentang Pendaftaran dan Peredaran Pakan, yang mensyaratkan pernyataan tidak menggunakan AGP dalam formula pakan yang diproduksi bagi produsen yang akan mendaftarkan pakan untuk diperdagangkan. Selain itu, pelarangan penggunaan antibiotik sebagai imbuhan pakan (*feed additive*) juga diharapkan dapat mencegah terjadinya residu antibiotik pada produk hewan. Penggunaan antibiotik untuk terapi pada hewan seharusnya dilakukan oleh dokter hewan atau tenaga kesehatan hewan di bawah pengawasan dokter hewan. Regulasi lain yaitu mengenai jaminan pangan aman, sehat, utuh dan halal (ASUH) berdasarkan Permentan No. 95 tahun 2012 tentang Kesehatan Masyarakat Veteriner dan Kesejahteraan Hewan. Apabila regulasi tersebut dapat diterapkan dengan baik, maka dapat tercipta produk pangan asal hewan yang terhindar dari residu antibiotik dan terjamin keamanan pangan untuk masyarakat.

Pengendalian residu antibiotik di Indonesia juga membutuhkan pendekatan *one health* dengan upaya kolaborasi dari berbagai pihak, kerjasama dengan berbagai Kementerian, Lembaga pemerintah pusat dan daerah, sektor swasta, akademisi, praktisi, organisasi profesi agar peningkatan kesehatan masyarakat veteriner melalui pengendalian residu antibiotik pada produk pangan asal hewan dapat tercapai dengan baik. Menurut Agungpriyono et al. 2014, agar tercipta kerjasama yang harmonis dan sinergis maka semua orang dan pihak yang terkait dalam kerjasama seharusnya memiliki kesamaan persepsi, kemampuan berkomunikasi, adaptasi, dan toleransi yang baik.

KESIMPULAN

Enrofloksasin merupakan antibiotik famili dari fluorokuinolon (generasi kedua kuinolon). Enrofloksasin efektif untuk membunuh bakteri Gram positif dan negatif, sehingga digunakan untuk pengobatan berbagai penyakit pada hewan.

Penggunaan antibiotik enrofloksasin secara tidak tepat dapat menimbulkan residu pada produk pangan asal hewan, resistensi mikroba dan toksisitas, sehingga penggunaannya perlu diawasi dan dievaluasi demi kesehatan hewan dan masyarakat.

DAFTAR PUSTAKA

- Agungpriyono S, Purnawarman T, Suprayogi A. 2014. Pengembangan kompetensi utama *one health* (*one health core competency*, OHCC) dalam kurikulum pendidikan kedokteran hewan. Prosiding Konferensi Ilmiah Veteriner Nasional ke-13. Palembang (Indonesia): PDHI. hlm. 169-171.
- As ZA, Hardiono, Syarifudin A. 2014. Percobaan produksi biogas dari kotoran sapi dan kotoran ayam dengan penambahan enzim papain. *J Kes Ling*. 11:177-183.
- Asredie T, Engdaw TA. 2015. Antimicrobial residues in cow and its public health significance. *J Dairy Food Sci*. 10:147-153.
- Babaahmady E, Khosravi A. 2011. Toxicology of baytril (enrofloxacin). *Afr J Pharm Pharmacol*. 5:2042-2045.
- Bilandzic N, Kolanovic BS, Varenina I, Jurković Z. 2011. Concentrations of veterinary drug residues in milk from individual farms in Croatia. *Mljekarstvo*. 61:260-267.
- [CODEX] Codex Alimentarius Commission. 2017. Information to the database on countries needs for MRLs [Internet]. [diunduh 18 Mei 2019]. Tersedia pada: http://www.fao.org/fao-who-odexalimentarius/shproxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FCircular%252520Letters%252FCircular%2525202016-42%252FCL16_42e.pdf.
- Davis JL, Foster DM, Papich MG. 2007. Pharmacokinetics and tissue distribution of enrofloxacin metabolite ciprofloxacin in calves. *J Vet Pharmacol Therap*. 30:564-571.
- De Briyne N, Atkinson J, Borriello SP, Pokludová L. 2014. Antibiotics used most commonly to treat animals in Europe. *Vet Rec*. 175:325. doi: 10.1136/vr.102462.
- Dianawati M, Mulijanti SL. 2015. Peluang pengembangan biogas di sentra sapi perah. *J Lit Pertanian*. 34:125-134.
- Dimitrieska-Stojkovic E, Hajrulai-Musliu Z, Stojanovska-Dimzoska B, Sekulovski P, Uzunov R. 2011. Screening of veterinary drug residues in milk from individual farms in Macedonia. *Mac Vet Rev*. 34:5-13.
- Drlica K, Perlin DS. 2011. Antibiotic resistance: understanding and responding to an emerging crisis. Saddle River (New Jersey): FT Press.
- Duan X, Ocen D, Wu F, Li M, Yang N, Xu J, Chen H, Huang L, Jin Z, Xu X. 2014. Purification and characterization of a natural antioxidant peptide from fertilized eggs. *Food Res Int*. 56:18-24.
- Hermo MP, Nemutlu E, Kir S, Barrón D, Barbosa J. 2008. Improved determination of quinolones in milk at their MRL levels using LC-UV, LC-FD, LC-MS and LC-MS/MS and validation in line with regulation 2002/657/EC. *Anal Chim Acta*. 613:98-107.
- Hrubá H, Abdelsalam EEE, Anisimov N, Bandouchova H, Havelkova B, Heger T, Kanova M, Kovacova V, Nemcova M, Piacek V, Sedlackova J, Vitula F, Pikula J. 2019. Reproductive toxicity of fluorokinolones in birds. *BMC Vet Res*. 15:1-8.
- Idowu OR, Peggs JO. 2004. Simple, rapid determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in bovine milk and plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Pharm Biomed Anal*. 35:143-153.
- Idowu OR, Peggs JO, Cullison R, Bredow JV. 2010. Comparative pharmacokinetics of enrofloxacin and ciprofloxacin in lactating dairy cows and beef steers following intravenous administration of enrofloxacin. *Res Vet Sci*. 89:230-235.
- Islam A, Saifuddin AKM, Al faruq A, Islam S, Shano S, Alam M, Hassan MM. 2016. Antimicrobial residues in tissues and eggs of laying hens at Chittagong, Bangladesh. *Int J One Health*. 2:75-80.
- Jayalakshmi K, Paramasivam M, Sasikala M, Tamilm TV, Sumithra A. 2017. Review on antibiotic residues in animal products and its impact on environments and human health. *J Entomol Zool Std*. 5:1446-1451.
- Jernberg C, Löfmark S, Edlund C, Jansson J. 2010. Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. *Microbiol*. 156:3216-3223.
- Kang JW, Hossain MA, Park HC, Kim YS, Lee KJ, Park SW. 2019. Pharmacokinetic and pharmacodynamic integration of enrofloxacin against *Salmonella enteritidis* after administering to broiler chicken by per-oral and intravenous routes. *J Vet Sci*. 20:e15. doi: 10.4142/jvs.2019.20.e15.
- Kumar VS. 2012. Residue profile of enrofloxacin and its primary metabolite ciprofloxacin in broiler chicken [Tesis]. [Chennai (India)]: University Chennai.
- Li J, Hao H, Cheng G, Wang X, Ahmed S, Shabbir MAB, Liu Z, Dai M, Yuan Z. 2017. The effects of different enrofloxacin dosages on clinical efficacy and resistance development in chickens experimentally infected with *Salmonella typhimurium*. *Sci Rep*. 7:11676.
- Logue CM, Barbieri NL, Nielsen DW. 2017. Pathogens of food animals: Sources, characteristics, human risk, and methods of detection. *Adv Food Nutr Res*. 82:277-365. doi: 10.1016/bs.afnr.2016.12.009.
- López-Cadenas C, Sierra-Vega M, García-Vieitez J, Díez-Liébana M, Sahagún-Prieto A, Fernández-Martínez N. 2013. Enrofloxacin: Pharmacokinetics and

- metabolism in domestic animal species. *Curr Drug Metab.* 14:1042-1058
- Mahmood T, Abbas M, Ilyas S, Fzal N, Nawaz R. 2016. Quantification of fluorokuinolone (enrofloxacin, norfloxacin and ciprofloxacin) residues in cow milk. *IJCBS.* 10:10-15.
- Mahmoudi R, Norian R. 2015. Determination of enrofloxacin residue in chicken eggs using FPT and ELISA methods. *JRH.* 5:159-164.
- Mansouri-najand L, Saleha AA, Wai SS. 2012. Prevalence of multidrug resistance *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in chickens slaughtered in selected markets, Malaysia. *Trop Biomed.* 29:231-238.
- Marshall BM, Levy SB. 2011. Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clin Microbiol Rev.* 24:718-733.
- Moghadam MM, Amiri M, Riabi HR, Riabi HR. 2016. Evaluation of antibiotic residues in pasteurized and raw milk distributed in the south of Khorasan-e Razavi province, Iran. *J Clin Diagn Res.* 10:31-35.
- Mohammed HA, Abdou AM, Eid AM, Zakaria AM. 2016. Rapid test for detection of enrofloxacin residues in liquid milk. *BVMJ.* 30:97-103.
- Moharana B, Venkatesh PK, Preetha SP, Selvasubramanian S. 2015. Quantitation of enrofloxacin residues in milk sample using RP-HPLC. *World J Pharm Pharmaceu Sci.* 4:1443-1450.
- Mourad G, Bettache G, Medjekal S. 2014. Composition and nutritional value of raw milk. *Issues Biol Sci Pharm Res.* 2:115-122.
- Navrátilová P, Vyhnálková J, Vorlová L. 2017. Detection of fluorokuinolone residues in milk using *Yersinia spp.* strains: Towards better sensitivity for flumequine determination. *J Vet Res.* 61:467-472.
- Niasono AB, Latif H, Purnawarman T. 2019. Resistensi antibiotik terhadap bakteri *Escherichia coli* yang diisolasi dari peternakan ayam pedaging di Kabupaten Subang, Jawa Barat. *J Vet.* 20:187-195.
- Nirala RK, Anjana K, Mandal KG, Jayachandran C. 2017. Persistence of antibiotic residue in milk under region of Bihar, India. *Int J Curr Microbiol App Sci.* 6:2296-2299.
- Nisha AR. 2008. Antibiotic residues - a global health hazard. *Vet World.* 1:75-377.
- [OIE] Office Internationale des Epizooties. 2018. OIE list of antimicrobials of veterinary importance [Internet]. [diunduh 13 Mei 2019]. Tersedia pada: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/AMR/A_OIE_List_antimicrobials_May2018.pdf.
- Panzenhagen PHN, Aguiar WS, Frasco BS, Pereira VLA, Abreu DLC, Rodrigues DP, Nascimento ER, Aquino MHC. 2016. Prevalence and fluorokuinolones resistance of *Campylobacter* and *Salmonella* isolates from poultry carcasses in Rio de Janeiro, Brazil. *Food Control.* 61:243-247.
- Papich MG. 2016. *Saunders handbook of veterinary drugs.* 4th ed. Amsterdam (Belanda): Elsevier BV.
- Piras C, Soggiu A, Greco V, Martino PA, Del Chierico F, Putignani L, Urbani A, Nally JE, Bonizzi L, Roncada P. 2015. Mechanism of antibiotic resistance to enrofloxacin in uropathogenic *Escherichia coli* in dog. *J Proteomics.* 127:365-376. doi: 10.1016/j.jprot.2015.05.040.
- Priyanka, Panigrahi S, Sheoran MS, Ganguly S. 2017. Antibiotic residues in milk- a serious public health hazard. *J Environ Life Sci.* 2:99-102.
- Raini M. 2016. Antibiotik golongan fluorokuinolone: Manfaat dan kerugian. *Media Litbangkes.* 26:163-174.
- Read AF, Woods RJ. 2014. Antibiotic resistance management. *Evol Med Public Health.* 2014:147. doi: 10.1093/emph/eou024.
- Roasto M, Juhkam K, Tamme T, Hörman A, Häkkinen L, Reinik M, Karu A, Hänninen ML. 2007. High level of antimicrobial resistance in *Campylobacter jejuni* isolated from broiler chickens in Estonia in 2005 and 2006. *J Food Prot.* 70:1940-1944.
- Santos L, Rosa J, Freitas A, Leston S, Barbosa J, Ramos F. 2019. Detection and quantification of 47 antibiotic residues in farmed European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) using a multi-class and multi-residue UHPLC-MS/MS method. *Food Addit Contam.* 36:561-570.
- Setiawan E; Widyati, Marpaung FR, Sukandar E, Susaniwati, Lukas DL, Wijono H, Warindra T, Kurniawan R, Wibowo T, Hendradi W, Costa MO, Aziz MHA, Roberts J. 2019. Kajian *narrative* terhadap profil farmakokinetik antibiotik pada pasien kritis: Implikasi terhadap ketercapaian target farmakokinetik-farmakodinamik. *Pharmaceu Sci Res.* 6:1-12. doi: 10.7454/psr.v6i1.4274.
- Smith JL, Drum DJV, Dai Y, Kim JM, Sanchez S, Maurer JJ, Hofacre CL, Lee MD. 2007. Impact of antimicrobial usage on antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* strains colonizing broiler chickens. *Appl Environ Microbiol.* 73:1404-1414.
- Srinivasu M, Ahmad AH, Kumar N, Pant D, Ahmad W. 2017. Screening of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin residues by high performance liquid chromatography in cow milk of district Udham Singh Nagar, Uttarakhand. *Int J Livest Res.* 7:140-145.
- The European Commission. 2010. Commission Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. Official Journal of the European Union. [Internet]. [diunduh 16 Mei 2019]. Tersedia pada: https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-5/reg_2010_37/reg_2010_37_en.pdf

- Trouchon T, Lefebvre S. 2016. A Review of enrofloxacin for veterinary use. *Open J Vet Med.* 6:40-58.
- Ventola CL. 2015. The antibiotic resistance crisis: Part 1: Causes and threats. *P T.* 40:277-283.
- Wang YC, Chan JPW, Yeh KS, Chang CC, Hsuan SL, Hsieh YM, Chang YC, Lai TC, Lin WH, Chen TH. 2010. Molecular characterization of enrofloxacin resistant *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates. *Vet Microbiol.* 142:309-312.
- Wei Z, Wang Jinhua, Zhu L, Wang Jun, Zhu G. 2018. Toxicity of enrofloxacin, copper and their interactions on soil microbial populations and ammonia-oxidizing archaea and bacteria. *Sci Rep.* 8:5828. doi: 10.1038/s41598-018-24016-8.
- Widiastuti R. 2008. Residu enrofloksasin dan siprofloksasin pada ayam pedaging pasca pencekokan enrofloksasin. *JITV.* 13:150-154.
- [WHO] World Health Organization. 2017. Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) report. [Internet]. [diunduh 18 Mei 2019]. Tersedia pada: <https://www.who.int/glass/resources/publications/early-implementation-report/en/>
- Zhang W, Zhang M, Chen K, Jin YH, Yan HY, Hu YM, Jin LS. 2019. Effects of enrofloxacin and Cu combined pollution on the activities of digestive enzymes of earthworm in soil. *J Appl Ecol.* 30:2049-2055.

Gen *Melanocortin-4 Receptor* (MC4R) sebagai Gen Utama untuk Seleksi Pertumbuhan Cepat pada Sapi Potong

(*Melanocortin-4 Receptor* (MC4R) Gene as the Main Gene for Rapid Growth Selection in Beef Cattle)

Peni Wahyu Prihandini, D. Maharani

Loka Penelitian Sapi Potong, Grati
Kontributor utama: syahada01@yahoo.com

(Diterima 11 Maret 2019 – Direvisi 5 Mei 2019 – Disetujui 7 Juni 2019)

ABSTRACT

Genetic improvement for economic traits such as growth is important in beef cattle selection program. This paper discusses melanocortin-4 receptor (MC4R) gene as a candidate gene for rapid growth based on its function, location and pathway, as well as its polymorphism and identified genotypes associated with economic traits, and its application as a marker-assisted selection. MC4R is a prominent gene encoding growth traits and has a critical role in mediating the effect of leptin in regulating food consumption and energy balance. Many identified MC4R gene polymorphisms are associated with growth traits. The MC4R gene, therefore, is considered as a functional candidate gene for growth traits and can be used as a marker in selection program based on molecular genetics. The use of molecular markers such as MC4R gene, therefore, can be applied in genetic improvement program for growth traits in cattle. By using MC4R gene, the efforts to build breeding system in small populations can be proposed. For instance, with an effective population size (N_e) of about 40 heads, the first generation (G1) will be obtained with a composition of GG 61.1%, CG 33.3% and CC 5.6% and male and female ratio of 178:11 and generates ideal N_e of 41 heads. In the third generation, therefore, GG composition will be 100%. The results of molecular analysis can be further used as a guideline in the development and genetic improvement strategies of beef cattle.

Key words: MC4R gene, weaning weight, *Bos javanicus*, beef cattle, selection

ABSTRAK

Perbaikan sifat genetik yang berasosiasi dengan sifat pertumbuhan yang bernilai ekonomis sangat dibutuhkan dalam seleksi pada sapi potong. Makalah ini membahas fungsi gen *melanocortin receptor* tipe 4 (MC4R), lokasi dan *pathway* gen MC4R, identifikasi polimorfisme gen MC4R dengan sifat ekonomis pertumbuhan dan aplikasinya dalam seleksi. Gen *melanocortin receptor* tipe 4 adalah gen utama yang bertugas mengatur berbagai sifat pertumbuhan dan pendukung pertumbuhan melalui interaksi dengan gen leptin untuk konsumsi pakan dan keseimbangan energi. Polimorfisme sudah banyak teridentifikasi pada gen ini dan berasosiasi dengan banyak sifat pertumbuhan. Oleh karena itu, penggunaan marka molekuler berupa gen MC4R untuk sifat pertumbuhan pada sapi potong dapat diaplikasikan dalam mengoptimalkan strategi perbaikan mutu genetik pertumbuhan sapi potong. Upaya membangun sistem *breeding* pada populasi kecil diajukan contoh dengan gen MC4R pada sapi potong dengan populasi yang efektif (N_e) sekitar 40 ekor akan mendapatkan hasil generasi pertama (G1) dengan komposisi GG 61,1%, CG 33,3% dan CC 5,6% dan perbandingan jantan dan betina 178:11 serta menghasilkan N_e ideal 41 ekor. Maka pada generasi ketiga, gen GG akan menjadi 100%. Hasil kajian molekuler tersebut diharapkan dapat dijadikan petunjuk dalam strategi pemanfaatan dan peningkatan mutu genetik pertumbuhan pada sapi potong.

Kata kunci: Gen MC4R, bobot sapih, *Bos javanicus*, sapi potong, seleksi

PENDAHULUAN

Sifat-sifat ekonomis ternak sebagian besar merupakan sifat poligenik yang dikendalikan oleh banyak gen. Sekuen DNA dari gen-gen pengkode sifat-sifat ekonomis sering dikenal sebagai *quantitative traits loci* (QTL) (Hradecka et al. 2008). Saat ini, pengetahuan tentang struktur molekuler sifat-sifat kuantitatif yang kompleks tersebut telah banyak diteliti pada beberapa ternak lokal di dunia, dan gen yang

berasosiasi dengan sifat ekonomis dapat diidentifikasi sebagai bagian kandidat gen utama untuk seleksi (Grisart et al. 2002). Dengan demikian, kandidat gen pengkode sifat-sifat yang menjadi kriteria seleksi potensial dapat diaplikasikan sebagai alat seleksi pada ternak.

Studi untuk memahami variasi genetik terhadap sifat pertumbuhan yang bernilai ekonomis sangat penting dalam seleksi. Seiring dengan metode seleksi konvensional yang telah mencapai hasil yang

Tabel 1. Beberapa gen pengkode sifat-sifat ekonomis pada sapi dan domba

Gen	SNP/Lokus	Bangsa ternak	Sifat yang berasosiasi	Pustaka
<i>Growth hormone</i> 1	g. 303 A>C	Sapi lokal Thailand	Bobot sapih	Supakorn et al. (2007)
<i>Growth hormone</i> 5	g. 208 G>A	Sapi lokal Thailand	Bobot sapih	Supakorn et al. (2007)
<i>Growth hormone</i> 5	g. 388 C>G	Sapi lokal Thailand	Bobot sapih	Supakorn et al. (2007)
<i>Growth hormone</i>	GH/AluI	Sapi Karan Fries	Pertumbuhan	Pal et al. (2004)
IGF1	IGF1/SnaBI	Sapi Mexico	Bobot sapih	De la Rosa Reyna et al. (2010)
<i>Growth hormone</i>	GH4.1	Sapi Brahman	Bobot sapih	Hernández et al. (2016)
Leptin	LEPg.978	Sapi Brahman	Bobot badan setahunan	Hernández et al. (2016)
<i>Growth hormone</i>	GH/HaeIII	Domba Awassi	Bobot lahir dan sapih	Al-Muhsen et al. (2018)
<i>Growth hormone</i>	GH/HaeIII	Domba ekor Gemuk	Bobot lahir, bobot sapih, kecepatan tumbuh	Malewa et al. (2014)
MC4R	g.1180C>T	Sapi Madura	Bobot badan	Prihandini (2018)
MC4R	g. 1069C>G	Sapi Nanyang	Bobot badan	Zhang et al. (2009)
MC4R	g. 1016 G>A	Domba Hu	Bobot badan	Seong et al. (2012)
MC4R	g. 1069 C>G	Sapi potong	Pertumbuhan	Du et al. (2013)
MC4R		Sapi Kanada dan Amerika	Lemak karkas	McLean & Schmutz (2011)
MC4R	g. 1069 C>G	Sapi lokal Korea	Keempukan daging	Lee et al. (2013)
MC4R	g. 129 A>G	Sapi Qinchuan	Berat karkas, eempukan lemak punggung, skor <i>marbling</i>	Liu et al. (2010)
MC4R	g. 1069 C>G	Sapi Simental	Keempukan lemak punggung	Huang et al. (2010)
MC4R	g. 1016 G>A	Sapi Hanwoo	Keempukan lemak punggung dan skor <i>marbling</i>	Seong et al. (2012)

signifikan, seleksi dengan bantuan marka genetik, melalui identifikasi gen kandidat pengkode sifat-sifat ekonomis, dapat meningkatkan efektivitas dalam program seleksi ternak (Chung & Kim 2005; Tizioto et al. 2012). Beberapa gen pengkode sifat-sifat pertumbuhan pada sapi dan domba ditampilkan pada Tabel 1. Berdasarkan berbagai gen yang mempengaruhi sifat pertumbuhan (Tabel 1) maka gen MC4R mempunyai pengaruh yang paling banyak untuk sifat-sifat pertumbuhan yang bernilai ekonomis (Seeley et al. 1997; Butler 2006; Zhang et al. 2009; Huang et al. 2010; Liu et al. 2010; McLean & Schmutz (2011); Seong et al. 2012; Du et al. 2013; Maharani et al. 2018; Alfieri et al. 2010; Roth et al. 2009). Tujuan penulisan ini membahas fungsi gen MC4R, lokasi dan *pathway* gen MC4R, identifikasi *polimorfisme* gen MC4R dengan sifat ekonomis pertumbuhan dan aplikasinya dalam seleksi.

FUNGSI GEN MELANOCORTIN-4 RECEPTOR

Gen *melanocortin receptor* terdiri dari lima anggota (MC1R, MC2R, MC3R, MC4R dan MC5R). Gen *melanocortin receptor* tipe 4 (MC4R) adalah gen utama yang bertugas mengatur asupan makanan dan keseimbangan energi. MC4R merupakan sepasang *receptor* protein G, diekspresikan pada inti hipotalamus, dan berperan penting dalam regulasi

homeostasis energi (Seeley et al. 1997; Benoit et al. 2000; Zhang et al. 2009; Wan et al. 2012). Protein ini mengatur perilaku asupan makanan dan pengeluaran energi (Huszar et al. 1997; Rosmond et al. 2001; MacKenzie 2006), dan juga dikenal sebagai gen yang bertanggung jawab pada respon obesitas terhadap hormon leptin pada vertebrata, termasuk manusia (Farooqi et al. 2003). Gen MC4R adalah substansi hereditas atau unit pewarisan sifat yang menerima rangsangan *alpha-melanocyte stimulating hormone* (α -MSH) yakni suatu hormon di nukleus paraventricular hipotalamus yang akan menyebabkan penurunan asupan makanan atau menghasikan sinyal kenyang. Gen MC4R mengatur asupan makanan dengan mengintegrasikan sinyal agonis (kenyang) yang disediakan oleh α -MSH dan sinyal antagonis (*orexigenic*) yang disediakan oleh *agouti-related protein* (AgRP). Selain itu, sejumlah studi menunjukkan bahwa MC4R menunjukkan aktivitas penghambatan asupan makanan, yang mana AgRP bertindak sebagai agonis terbalik (sifat lapar) (Horn et al. 2003; Haskell-Luevano et al. 2001; Lubrano-Berthelie et al. 2003).

Gen MC4R ditemukan pada semua hewan dan manusia (Dubern 2015). Respon kerja dari gen MC4R yang terdapat pada hewan dan manusia berbeda-beda. Hal ini dikarenakan ada perbedaan basa (SNP) di dalam gen MC4R pada masing-masing individu. Gen MC4R akan memberikan efek konsumsi pakan yang

tinggi apabila berikatan dengan hormon AgRP, sebaliknya apabila berikatan dengan hormon α MSH akan memberikan respon kenyang dan berhenti makan. *Melanocortin-4 receptor* utamanya diekspresikan pada hipotalamus, dan terlibat dalam kontrol konsumsi pakan (Dubern 2015). Lebih dari 70 jenis mutasi MC4R pada manusia dan ternak yang menyebabkan berkurang sampai hilangnya fungsi MC4R (Tao 2005). Apabila MC4R tidak berfungsi maka tidak ada pengisyarat kekenyangan pada otak sehingga terjadi peningkatan asupan pakan. Peningkatan nafsu makan yang tidak disertai dengan peningkatan penggunaan energi menyebabkan terjadinya penimbunan energi dan mengarah pada obesitas. Pada tikus, bila gen MC4R tersebut ditiadakan (*knock out*) maka tikus akan mengalami obesitas (Huszar et al. 1997). Demikian juga pada babi, adanya mutasi gen MC4R menyebabkan peningkatan ketebalan lemak punggung (Kim et al. 2000; Kuehn et al. 2007). Mutasi MC4R pada manusia menyebabkan obesitas (Rankinen et al. 2006).

Gen *melanocortin-4 reseptor* (MC4R) memainkan peran penting dalam mengatur asupan makanan dan bobot badan pada sapi asli Korea (cokelat, belang-belang, dan hitam) (Lee et al. 2013). Gen penyandi MC4R dilaporkan oleh Yeo et al. (1998) sebagai gen yang berkontribusi atau berkaitan dengan obesitas akibat dari adanya mutasi pada gen tersebut. Fungsi gen MC4R adalah sebagai hormon adrenokortikotropik (ACTH) dan alpha-beta serta gamma MSH yang berperan penting dalam homeostatis energi dan pertumbuhan somatik, atau sebagai reseptor pada inti heptapeptida. Pertumbuhan somatik mempunyai peranan penting dalam pertumbuhan sapi yang dikendalikan oleh sistem yang kompleks. Gen-gen yang menjalankan pertumbuhan somatik bertanggung jawab terhadap pertumbuhan setelah ternak lahir. Gen MC4R beraksi terhadap homeostatis energi yang dimediasi oleh Alpha-MSH (Wan et al. 2012; Dubern 2015).

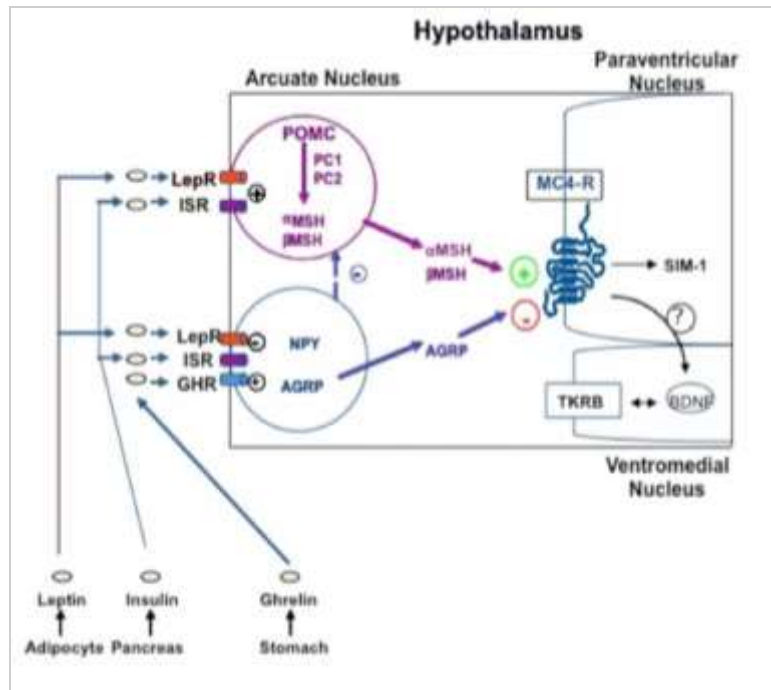
Eksresi gen MC4R juga erat kaitannya dengan gen leptin. Sekresi leptin diregulasi oleh jumlah cadangan lemak (Guyton & Hall 2006). Adanya jaringan adiposa yang banyak akan menstimulasi sekresi leptin sampai ke hipotalamus. Leptin tersebut berikatan dengan reseptor leptin pada dua kelas neuron. Kelas pertama adalah kelas neuron yang sensitif

terhadap leptin menghasilkan neuropeptida yang memicu nafsu makan (*orexigenic*) yaitu (neuropeptida Y (NPY) dan *agouti-related* protein (AgRP)). Kelas kedua adalah kelas neuron dengan reseptor leptin yang menghasilkan peptida yang menghambat nafsu makan (*anorexigenic*) yaitu hormon *alpha-melanocyte stimulating* (α -MSH) dan transkrip yang berhubungan dengan peptida *anoreksigenic* (CART).

LOKASI DAN PATHWAY GEN MC4R

Lokasi gen MC4R pada sapi adalah di kromosom nomor 24 yaitu pada posisi 59670121 sampai dengan 59671928. Panjang gen MC4R adalah 1808 *base pair* (bp) yang hanya terdiri dari 1 ekson yang merupakan daerah yang berisi kode genetik (*coding DNA sequence* = *coding region*). *CoDing Sequence* (CDS) diawali dengan kodon ATG pada posisi 214 dan diakhiri dengan kodon AAT pada posisi 1214 (GenBank Acc. No. AC_000181) (Zhang et al. 2009). Gen MC4R juga terdapat pada spesies kambing dan domba, dimana pada kambing lokasi gen MC4R juga berada pada kromosom nomor 24, namun posisinya beda yaitu terletak pada posisi 59345387 sampai dengan 59347443, selanjutnya panjang gen MC4R pada kambing dan domba adalah 2057 *base pair* (bp), serta hanya terdiri dari 1 ekson dengan GenBank Acc. No. NC_030831.1 (NCBI 2018).

Pathway dari gen MC4R dapat dilihat pada Gambar 1. Pada *pathway* tersebut dijelaskan bahwa ekspresi gen MC4R diawali oleh adanya populasi *neuron* di hipotalamus yang menyebarkan sinyal dari berbagai molekul (leptin, insulin, ghrelin) untuk mengontrol asupan makanan dan rasa kenyang. *Proopiomelanocortin* (POMC) neuron dalam *arcuate nucleus* diaktifkan oleh leptin dan insulin dan menghasilkan *melanocyte stimulating hormone* (α -MSH), kemudian mengaktifkan reseptor MC4R dalam inti *paraventricular*, sehingga menghasilkan sinyal kenyang. Selanjutnya, *neuropeptide Y* (NPY) dan *agouti-related* (AgRP) diaktifkan oleh LepR, ISR dan GHR menghasilkan hormon AgRP yang kemudian mengaktifkan reseptor MC4R dalam inti *paraventricular* menghasilkan sinyal lapar (Dubern 2015).



Gambar 1. Pathway Gen MC4R. POMC (proopiomelanocortin); LepR (reseptor leptin); ISR (reseptor insulin); GHR (reseptor ghrelin); NPY (neuropeptide Y); AGRP (agouti-related protein); SIM1 (single-minded 1); BDNF (brain-derived neurotropic factor); TRKB (tyrosine kinase receptor); PC 1 & 2 (proconvertase 1 & 2) (Dubern 2015)

IDENTIFIKASI POLIMORFISME GEN MC4R

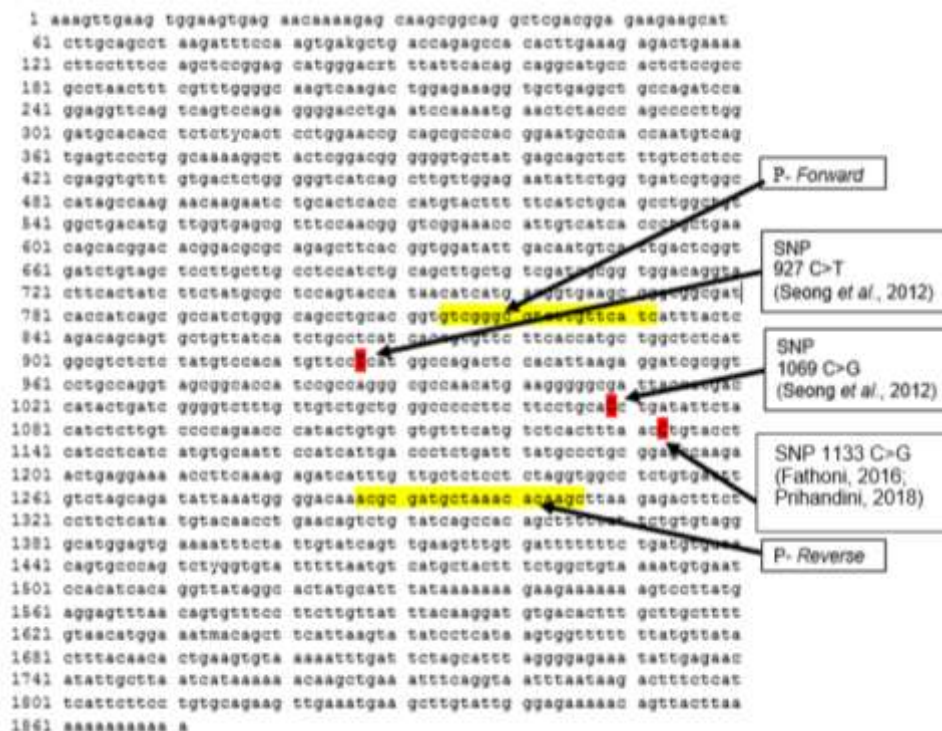
Polimorfisme adalah keberadaan dua atau lebih alel pada sebuah lokus pada populasi (Elrod & Stanfield 2002). Beberapa teknik untuk identifikasi polimorfisme suatu lokus gen telah ditemukan. Beberapa metode analisis untuk mengidentifikasi variasi genetik secara molekuler pada beberapa jenis spesies dapat dilakukan dengan *randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)*, *polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)*, analisis sidik jari (*finger printing*), minisatelit (VNTR atau *Variable Number Tandem Repeat*), mikrosatelit (STR atau *Short Tandem Repeat*) dan analisis DNA mitokondria, dan beberapa polimorfisme telah ditemukan pada gen MC4R sapi (Zhang et al. 2009; Haegeman et al. 2001; Thue et al. 2001; Valle et al. 2004). Variasi basa atau polimorfisme yang dihasilkan akibat adanya proses replikasi disebut *single nucleotide polymorphism (SNP)* yang dapat membedakan satu individu dengan lainnya (Zhang et al. 2009). Beberapa hasil penelitian tentang pasangan primer yang telah digunakan untuk *polymerase chain reaction (PCR)* gen MC4R beserta suhu annelingnya yang digunakan tersaji pada pada Tabel 2. Selanjutnya Tabel 3 menampilkan beberapa primer yang digunakan dan identifikasi SNP pada gen MC4R pada sapi dengan metode RFLP, sekuensing dan SSCP.

Identifikasi SNP pada gen MC4R digunakan untuk mendeteksi mutasi urutan nukleotida (polimorfisme) dalam DNA yang diamplifikasi (Amie-Marini et al. 2012) dan bagaimana pengaruhnya terhadap produktivitas ternak sapi. Pada Gambar 2 ditampilkan contoh dari referensi SNP berdasarkan penelitian Seong et al. (2016) yang menemukan 2 SNP (g. 927 C>T dan g. 1069 C>G) yang terletak pada ekson 1 gen MC4R (Genbank Acc. No. NC_007325). Selanjutnya, berdasarkan Fathoni (2016) dan Prihandini (2018) telah ditemukan 1 SNP g.1133 C>G berdasarkan Genbank Acc. No. EU366350.1.

Selanjutnya beberapa penelitian sapi lainnya menemukan beberapa SNP MC4R yaitu sebanyak lima SNP terdeteksi pada posisi 19 (C/A), 20 (A/T), 83 (T/C), 128 (G/A) dan 1069 (G/C)) pada delapan *breed* sapi (Simmental, Angus, Hereford, Charolais, Luxi, Jinnan, Qinchuan, dan Limousin), namun hanya lokus 1069 (G/C) yang merupakan lokus yang secara signifikan berasosiasi dengan ketebalan lemak (Huang et al. 2010). Beberapa polimorfisme telah ditemukan pada gen MC4R sapi Nanyang (Zhang et al. 2009); sapi Holstein merah (Haegeman et al. 2001); sapi hasil embrio transfer betina Limousin dan pejantan Charolais (Thue et al. 2001); sapi Angus, Charolais, Hereford, Limousin, Simmental, Holstein, Wagyu, Brahman (Valle et al. 2004).

Tabel 2. Primer dan suhu *annealing* program PCR gen MC4R (ekson 1) pada beberapa bangsa sapi

Rumpun sapi	Primer	Suhu <i>annealing</i>	Referensi
Sapi Qinchuan	F: 5'-TGACTCGGTGATCTGTAGC-3' R: 5'-TTCACCTCCATGCCCTACA-3'	58,9°C	Liu et al. 2010
Sapi Nanyang	F: 5'-AAAATCAGCAGCAGCGTC-3' R: 5'-ATTGGTGGGCATTCCGT-3'	65°C	Zhang et al. 2009
Tujuh bangsa sapi : sapi Nanyang, Qinchuan, Jinnan, Angus, Chinese Holstein, Luxi, dan Jiaxian	1: F: 5'-ACGGAATGCCCACCAATG-3' R: 5'-AACAAGACGCCCGACACC-3' 2: F: 5'-TGTTGGTGAGCGTTTC-3' R: 5'-ATGGTCAGGGTAATCG-3' 3: F: 5'-CATCACCGTGTCTTCA-3' R: 5'-GCAGGGCATAAATCAG-3'	63°C	Zhang et al. 2006
Sapi Kebumen	F: 5'-GTCGGGCGTCTTGTTCATC-3' R: 5'-GCTTGTGTTTAGCATCGCGT-3'	58°C	Maharani et al. 2018
Sapi Simmental	F: 5'-TGGAGCGCATAGAAGATAGTG-3' R: 5'-AAGTGAGAACAAAAGAGCAAGC-3'	59°C	Du et al. 2013
Sapi Hanwoo	F : 5'-GTCGGGCGTCTTGTTCATC-3' R : 5'-GCTTGTGTTTAGCATCGCGT-3'	56,4°C	Seong et al. 2012
Sapi persilangan Kanada dan Amerika	F: 5'-GCAAAGACCTGCATGCCTCCGACT-3' R: 5'-CTGTCTCTGAGAAACACACATAGT-3'	58,9°C	McLean & Schmutz 2011
Delapan bangsa sapi : sapi Simmental, Angus, Luxi, Hereford, Charolais, Jinnan, Qinchuan, dan Limousin	F: 5'-TTGCTTGAACAAATTAATCTCTCT-3' R: 5'-CTGTGTAGGGCATGGAGTGA-3'	65°C	Huang et al. 2010



Gambar 2. Hasil deteksi beberapa SNP berdasarkan studi referensi dari hasil penelitian Seong et al. (2012), Fathoni (2016) dan Prihandini (2018)

Tabel 3. Beberapa primer yang digunakan dan identifikasi SNP pada gen MC4R dengan metode RFLP, sekuensing dan SSCP

Primer	Bagian	Produk PCR (bp)	SNP	Bangsa sapi	GenBank	Pustaka
F: 5'-TGA CT CGGTGATCTGTAGC-3' R: 5'-TTC ACT CCATGCCCTACA-3'	Ekson I	741	g. 1069C>G	lokal Korean		Lee et al. (2013)
F: 5'-AAAATCAGCAGCAGCGTC-3' R: 5'-ATTGGTGGGCATTCCGT-3'	Ekson I	514	g.-293C>G	Nanyang	NW_930353	Zhang et al. (2009)
F: 5'-TGGAGCGCATAGAAGATAGTG-3' R: 5'-AAGTGAGAACAAAAGAGAGCAAGC-3'	Ekson I	731	g.-129A>G C.746G A	Sapi potong	AF265221.1	Du et al. (2013)
F: 5'-GCTCTTTGTCTCTCCCGAGG-3' R: 5'-GCCAGCATGGTGAAGAACAC-3'	Ekson I	1808	G709A	Korean	NC_007325	Seong et al. (2012)
F: 5'-AGCAGCAGCGTCTGACACTC-3' R: 5'-ATGGTTTCCGACCCGTTG-3'	5'- <i>Untranslated region</i> dan ekson	51,4	-293C>G	Qinchuan	NW_001494269	Liu et al. (2010)
	Ekson			Qinchuan		Liu et al. (2010)
F: 5'-TGA CT CGGTGATCTGTAGC-3' R: 5'-TTC ACT CCATGCCCTACA-3'	Ekson dan 3'- <i>flanking</i>	58,9	129 A>G	Qinchuan	NW_001494269	Liu et al. (2010)
F: 5'-TTGACCCTCTGATTTATGCC-3' R: 5'-AATCCCAAATTGCCTGTGAG-3'		59,8	1069 C>G		NW_001494269	
F: 5'-TTGCTTGAACAAATTAATCTCTCT-3' R: 5'-CTGTGTAGGGCATGGAGTGA-3'	Ekson I	573	G1069C 19 (C/A) 1069 (G/C)	Sapi	NW_001494269,2	Huang et al. (2010)

IDENTIFIKASI GENOTIP (*GENOTYPING*) DAN ASOSIASINYA DENGAN SIFAT EKONOMIS

Genotyping merupakan istilah yang digunakan untuk menggambarkan proses identifikasi genotip pada individu menggunakan penanda DNA pada suatu lokus tertentu dalam genom (Eenennaam 2009). *Genotyping* adalah suatu proses penentuan perbedaan genotip dari individu satu dengan individu lain dengan menggunakan urutan atau *marker* DNA dari suatu gen target sebagai alat molekuler. Hasil *genotyping* juga dapat digunakan untuk menggambarkan distribusi alel dalam populasi sehingga dapat dilihat keragaman genetik dari populasi yang diteliti. Disamping itu, *genotyping* juga dapat digunakan untuk menentukan apakah populasi yang diteliti berada dalam keseimbangan menurut *Hardy Weinberg Equilibrium* (HWE). Hasil *genotyping* menggunakan *marker* DNA suatu gen target juga dapat digunakan untuk menggambarkan genotip masing-masing ternak yang diteliti (Eenennaam 2009). Penentuan genotip salah satunya dengan menggunakan metode *restriction fragment length polymorphism* (PCR-RFLP). Penentuan enzim restriksi (RE) untuk SNP tertentu dengan menggunakan program NEBcutter V2.0 dan berdasarkan hasil program NEBcutter V2.0 diperoleh RE tertentu yang dapat memotong basa nukleotida pada posisi SNP target. Gambar 3 menampilkan contoh hasil PCR-RFLP pada gen MC4R di bagian ekson 1 pada sapi Madura menggunakan enzim restriksi HpyCH4IV (Prihandini et al. 2019).

Analisis RFLP adalah salah satu teknik yang digunakan untuk mendeteksi variasi pada tingkat sekuens DNA. Selanjutnya sifat-sifat fenotip dari ternak-ternak yang diteliti dapat dianalisis hubungannya dengan genotip ternak berdasarkan gen tertentu. Apabila terdapat asosiasi yang signifikan antara genotip dan fenotip, maka marka DNA tersebut dapat dijadikan sebagai alat untuk seleksi ternak berdasarkan kriteria sifat yang diteliti.

Pada populasi sapi Madura menunjukkan adanya 2 SNP yaitu SNP g.1133C>G dan g.1108C>T pada gen MC4R (Prihandini. 2018). Diantara kedua SNP tersebut, SNP g.1133 C>G mempunyai pengaruh signifikan ($P<0,05$) terhadap lingkar dada, bobot badan dan tinggi gumba. Sapi Madura jantan dan betina umur 365 hari dengan genotip GG memiliki rata-rata lingkar dada, bobot badan dan tinggi gumba yang lebih tinggi dibandingkan yang memiliki genotip CG dan CC. SNP g.1133 C>G pada gen MC4R terdeteksi merubah asam amino dari valin menjadi leusin. Berdasarkan hasil penelitian tersebut, maka SNP g.1133C>G pada gen MC4R dapat digunakan sebagai alat seleksi untuk sapi Madura berdasarkan sifat lingkar dada, bobot badan dan tinggi gumba. Penelitian mengenai hubungan gen MC4R dengan sifat-sifat pertumbuhan telah banyak

diteliti di berbagai ternak yaitu sapi dan domba (Tabel 1). Selanjutnya pada Tabel 4 ditampilkan hasil-hasil penelitian tentang efek gen MC4R terhadap sifat-sifat bobot badan pada sapi.

Tabel 4. Hasil-hasil penelitian tentang efek gen MC4R terhadap sifat-sifat bobot badan pada sapi

Spesies	Signifikansi Sifat	Referensi
Sapi Simmental	Pertambahan Bobot Badan (PBB)	Du et al. (2013)
Sapi China dan Angus	Bobot badan dan PBB	Zhang et al. (2009)
Sapi Madura	Bobot badan	Prihandini (2018)

Penelitian-penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa MC4R-C1069G merupakan SNP yang secara signifikan terkait dengan ketebalan lemak, berat hidup dan berat karkas pada berbagai breed sapi (Zhang et al. 2009; Liu et al. 2010; Huang et al. 2010; Gill et al. 2010; Seong et al. 2012) (Tabel 1). Ternak yg bergenotip GG mempunyai sifat ekonomis lebih tinggi dibandingkan yang bergenotip GC dan CC. Pada sapi di Korea breed Luxi yang bergenotip GG memperlihatkan sifat-sifat ekonomis yang lebih baik dibandingkan sapi bergenotip CC. Bobot hidup, bobot karkas, ketebalan lemak punggung genotip GG lebih tinggi dibandingkan CG dan CC (Huang et al. 2010). Hasil yang sama untuk genotip GG pada sapi Hanwoo umur dewasa siap potong mempunyai bobot hidup lebih tinggi dan nilai pemuliaan bobot badan umur dewasa juga lebih tinggi (Seong et al. 2012). Sapi PO Kebumen yang mempunyai genotip GG ($66,34 \pm 6,73$ cm) ukuran panjang badan lahirnya tertinggi dibandingkan dengan genotip CC ($65,43 \pm 7,21$ cm) dan GC ($59,47 \pm 5,77$ cm) (Maharani et al. 2018). Namun demikian, beberapa peneliti lain menemukan bahwa sapi bergenotip CG justru lebih baik dibandingkan yang bergenotip GG (Liu et al. 2010; Seong et al. 2012). Pada sapi Qinchuan menunjukkan bahwa frekuensi genotip CG (0,54) lebih tinggi dibandingkan genotip CC (0,28) dan GG (0,18) (Liu et al. 2010). Selanjutnya, pada sapi Korean (*brown*), frekuensi genotip sama hasilnya dengan sapi Qinchuan yaitu 0,42; 0,19; dan 0,39 untuk masing-masing genotip CG, CC, dan GG (Seong et al. 2012). Hasil yang sama pada sapi Nanyang dan Jiaxian, frekuensi genotip CG lebih tinggi dibandingkan CC, dan ternak yang bergenotip CG mempunyai rata-rata pertambahan bobot badan harian dan bobot lahir lebih tinggi dibandingkan CC (Zhang et al. 2006), sedangkan genotip GG pada penelitian Zhang et al. (2006) ini tidak dianalisis karena pada populasi pengamatan hanya ditemukan genotip GG sebanyak 4 ternak.

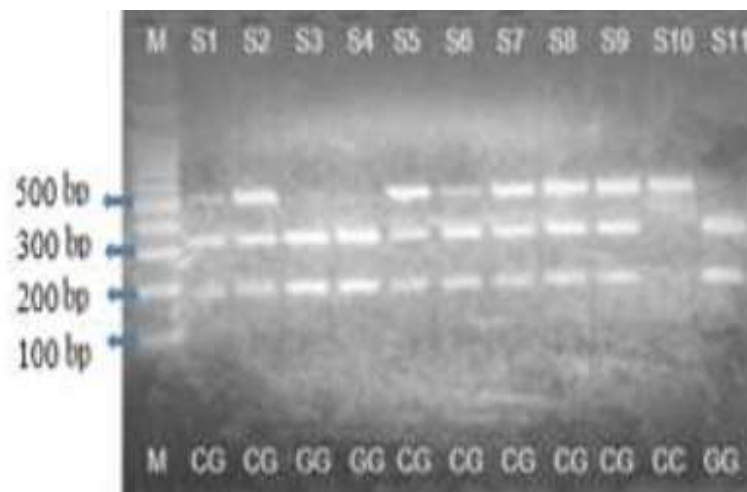
Beberapa penelitian menunjukkan ada perubahan asam amino pada polimorfisme gen MC4R yaitu asam amino valin (Val) menjadi metionin (Met) yang mempengaruhi sifat kualitas karkas pada sapi Hanwoo (Seong et al. 2012). Mutasi pada lisin menjadi alanin mempengaruhi sangat tinggi pada sifat produksi susu (Lacorte et al. 2006). Mutasi gen MC4R pada babi menyebabkan perubahan asam amino dari leusin menjadi valin yang mempengaruhi sifat pertumbuhan dan kualitas karkas (Huang et al. 2010). Selanjutnya, polimorfisme gen MC4R pada sapi Kebumen mempengaruhi sifat pertumbuhan panjang badan lahir (Fathoni 2016; Maharani et al. 2018). Oleh karena itu, efek gen MC4R terhadap sifat pertumbuhan menunjukkan bahwa gen MC4R dapat dijadikan sebagai kandidat gen untuk sifat-sifat pertumbuhan. Sebaran frekuensi genotip dan alel pada gen MC4R berbagai bangsa sapi disajikan pada Tabel 5.

APLIKASI GEN MC4R SEBAGAI SELEKSI MOLEKULER PADA SAPI

Aplikasi pemanfaatan gen MC4R pada sapi dapat dilakukan berdasarkan hasil identifikasi genotip gen MC4R pada suatu populasi ternak. Genotip yang telah teridentifikasi diasosiasikan dengan sifat-sifat pertumbuhan yang terdapat pada populasi sapi yang akan diseleksi. Apabila hasil analisis asosiasi positif

pada sifat pertumbuhan tertentu, maka sifat pertumbuhan tersebut digunakan atau direkomendasikan sebagai kriteria seleksi, dan apabila satu genotip menunjukkan rata-rata pertumbuhan yang paling baik dibandingkan dengan genotip yang lain, maka sapi tersebut sebaiknya digunakan untuk kelompok inti. Oleh karena itu, seleksi secara molekuler merupakan seleksi awal pada ternak sehingga tetap diperlukan uji performan dan uji zuriat apabila akan memproduksi pejantan unggul (Putra & Indrastuti 2017). Keterkaitan polimorfisme gen MC4R (SNP g.1133 C>G) dengan sifat-sifat pertumbuhan menunjukkan hasil genotip dengan sifat pertumbuhan terbukti sudah ada hubungan yang positif (Prihandini et al. 2019).

Ternak genotip GG, CG dan CC adalah ternak yang darahnya sudah dianalisis dengan metode PCR-RFLP menghasilkan 3 tipe genotip (CC, CG dan GG) dengan ukuran fragmen yang berbeda pada masing-masing genotip. Ternak dengan genotip GG mempunyai pertumbuhan lebih baik dibandingkan CG dan CC (Prihandini et al. 2019). Genotip GG adalah ternak yang mempunyai dua fragmen DNA yang berukuran 175 bp dan 318 bp. Genotip CG memiliki tiga fragmen DNA berukuran 175 bp, 318 bp dan 493 bp. Genotip CC memiliki satu fragmen yaitu sama besar dengan ukuran produk PCR-nya yaitu 493 bp (Gambar 3).



Gambar 3. Hasil PCR-RFLP. Genotip CG (heterozygotes) dan GG (homozygotes) pada gen MC4R. S 3, 4 dan 11 adalah genotip GG. S 1, 2, 5, 6, 7, 8, dan 9 adalah genotip CG. S 10 adalah genotip CC. Ukuran *Marker* yang digunakan M:100-1500 bp (Prihandini et al. 2018 yang dimodifikasi)

Tabel 5. Sebaran frekuensi genotipe dan alel pada gen MC4R berbagai bangsa sapi

Ternak	Spesies	N	Frekuensi genotip			Frekuensi alel	
			CC	CG	GG	C	G
Sapi lokal Korea ¹	Brown	281	0,271(76)	0,523(147)	0,206 (58)	0,532	0,468
	Brindle	111	0,216(24)	0,595(66)	0,189(21)	0,513	0,487
	Black	21	-	0,714(15)	0,286(6)	0,357	0,643
	Nanyang	240	0,28	0,64	0,09	0,6	0,4
	Qinchuan	68	0,27	0,49	0,24	0,51	0,49
	Jiaxian	146	0,38	0,43	0,19	0,6	0,4
	Jinnan	43	0,43	0,57	0	0,72	0,28
	Angus	36	1	0	0	1	0
	Holstein	61	0,92	0,08	0	0,96	0,04
Sapi potong ²	Simmental	118	0,3051	0,4407	0,2542	0,5254	0,4746
Sapi Korean ³	Hanwoo	57	45,5	54,5	0	72,7	27,3
	Angus	37	82,4	17,6	0	91,2	8,8
Sapi lokal Korea ⁴ (g. -129 A>G)	Qinchuan	2	0,29	0,51	0,2	0,55	0,45
	Luxi	77	0,31	0,46	0,23	0,54	0,46
	Nanyang	40	0,5	0,45	0,05	0,73	0,27
	Xianan	86	0,45	0,36	0,19	0,63	0,37
	Jiaxian Red	71	0,45	0,46	0,09	0,68	0,32
	Angus	55	0,64	0,27	0,09	0,77	0,23
	Anxi	36	0,97	0,03	0	0,99	0,01
Sapi lokal Korea ⁵ (g. 1069 C>G)	Qinchuan	2	0,28	0,54	0,18	0,55	0,45
	Luxi	77	0,21	0,35	0,44	0,38	0,62
	Nanyang	40	0,03	0,52	0,45	0,29	0,71
	Xianan	86	0,16	0,41	0,43	0,37	0,63
	Jiaxian Red	71	0,21	0,41	0,38	0,42	0,58
	Angus	55	0,13	0,4	0,47	0,33	0,67
	Anxi	36	0,65	0,25	0,1	0,77	0,23
Sapi ⁶	Simmental	103	34,95	46,6	18,45		
	Angus	36	38,89	50	11,11		
	Hereford	24	20,83	62,5	8,33		
	Charolais	21	23,81	33,33	42,86		
	Luxi	20	45	30	25		
	Jinnan	16	25	25	50		
	Qinchuan	15	26,67	33,33	40		
	Limousin	10	10	70	20		

Sumber: ¹Lee et al. (2013); ²Kim et al. (2000); ³Seong et al. (2012); ⁴Liu et al. (2010); ⁵Liu et al. (2010); ⁶Huang et al. (2010)

Pada aplikasi seleksi memerlukan jumlah populasi yang efektif. Ukuran populasi yang efektif dapat dihitung berdasarkan rumus (Hill 1979; Barton et al. 2007; Futuyma 2013; Nielsen & Slatkin 2013).

Berdasarkan hasil penelitian Prihandini (2018) diperoleh tiga kelas, namun yang digunakan pada contoh aplikasi gen molekuler sebagai seleksi molekuler sapi adalah dua kelas yaitu kelas A dan B.

Pada kelas A betina induk dengan genotip 100% GG dan kelas A jantan 66,6% GG; 33,4% CG; 0% CC. Sedangkan kelas B jantan digunakan 55,6% GG; 33,33% CG dan 11,11% CC. Hasil penelitian ini didapatkan dari materi 268 ekor dengan 11 ekor jantan (Prihandini 2018).

Berdasarkan dua kelas itu dan kemampuan populasi di lapangan, maka dapat dibangun sistem breeding dengan populasi kecil untuk populasi yang efektif (N_e) sekitar 40 ekor. Dengan sistem *breeding* ini, maka akan diperoleh generasi pertama (G_1) dengan komposisi ternak dengan genotip GG 61,13%, CG 33,36% dan CC 5,6% dengan perbandingan ternak jantan dan betina 178: 11 dan menghasilkan N_e ideal 41 ekor. Selanjutnya selama waktu berjalan, dalam generasi ke tiga program *breeding* ini akan menghasilkan ternak dengan genotip 100% GG.

KESIMPULAN

Penggunaan marka molekuler berupa gen MC4R untuk sifat pertumbuhan pada sapi potong dapat diaplikasikan dalam mengoptimalkan strategi perbaikan mutu genetik pertumbuhan. Upaya membangun sistem breeding pada populasi kecil dengan menggunakan gen MC4R pada generasi awal digunakan ideal populasi efektif yang mengurangi dampak negatif *inbreeding* dan pada generasi selanjutnya frekuensi gen dan frekuensi alel yang dituju akan dicapai 100% pada generasi ketiga. Hasil kajian molekuler tersebut diharapkan dapat dijadikan petunjuk dalam strategi pemanfaatan dan peningkatan mutu genetik pertumbuhan pada sapi potong.

DAFTAR PUSTAKA

- Alfieri A, Pasanisi F, Salzano S, Esposito L, Martone D, Tafuri D, Daniele A, Contaldo F, Sacchetti L, Zagari A, Buono P. 2010. Functional analysis of melanocortin-4-receptor mutants identified in severely obese subjects living in Southern Italy. *Gene*. 457:35-41.
- Amie-Marini AB, Aslinda K, Mohd-Hifzan R, Muhd-Faisal AB, Musaddin K. 2012. HaeIII-RFLP polymorphism of growth hormone gene in Savanna and Kalahari goats. *Malays J Anim Sci*. 15:13-19.
- Al-Muhsen FA, Al-Nassir HS, Mirza S, Mnati AA. 2018. Association of growth hormone gene polymorphism with birth and weaning weight of Nuimi and Awassi sheep at Kerbala province. *J Biochem Tech*. 9:27-30.
- Barton NH, Briggs DEG, Eisen JA, Goldstein DB, Patel NH. 2007. *Evolution*. 1st ed. New York (USA): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Benoit S, Schwartz M, Baskin D, Woods SC, Seeley RJ. 2000. CNS melanocortin system involvement in the regulation of food intake. *Horm Behav*. 37:299-305.
- Butler AA. 2006. The melanocortin system and energy balance. *Peptides*. 27:281-290.
- Chung ER, Kim WT. 2005. Association of SNP marker in IGF-I and MYF5 candidate genes with growth traits in Korean cattle. *Asian-Aust J Anim Sci*. 18:1061-1065.
- De la Rosa Reyna XF, Montoya HM, Castrellón VV, Rincón AMS, Bracamonte MP, Ver WA. 2010. Polymorphisms in the IGF1 gene and their effect on growth traits in Mexican beef cattle. *Genet Mol Res*. 9:875-883.
- Du X, Chen C, Yuan Z, Zhang L, Chen X, Wang Y, Gao X, Zhang L, Gao H, Li J, Xu S. 2013. Genetic polymorphisms of MC4R and IGF2 gene association with feed conversion efficiency traits in beef cattle. *J Pak Vet*. 33:418-422.
- Dubern B. 2015. MC4R and MC3R mutations. In: Frelut ML, editor. *The ECOG's eBook on child and adolescent obesity*. Available on ebook. *ecog-obesity*. eu 2-7.
- Eenennaam AV. 2009. *Basics of DNA markers and genotyping*. California (USA): Department of Animal Science, University of California.
- Elrod S, Stansfield W. 2002. *Genetika*. Diterjemahkan oleh Wulandari DT. Jakarta (Indonesia): Erlangga. hlm. 33-41.
- Farooqi IS, Keogh JM, Yeo GSH, Lank EJ, Cheetham T, O'rahilly S. 2003. Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. *New England J Med*. 348:1085-1095.
- Fathoni A. 2016. Estimasi parameter genetik sifat pertumbuhan dan identifikasi gen MC4R sapi Peranakan Ongole di Kabupaten Kebumen Jawa Tengah [Tesis]. [Yogyakarta (Indonesia)]: Universitas Gadjah Mada.
- Futuyma DJ. 2013. *Evolution*. 3rd ed. Massachusetts (USA): Sinauer Associates.
- Gill JL, Bishop SC, McCorquodale C, Williams JL, Wiener P. 2010. Associations between single nucleotide polymorphisms in multiple candidate genes and carcass and meat quality traits in a commercial Angus-cross population. *Meat Sci*. 86: 985-993.
- Grisart B, Coppieters W, Farnir F, Karim L, Ford C, Berzi P, Cambisano N, Mni M, Reid S, Simon P, Spelman R, Georges M, Snell R. 2002. Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: identification of a missense mutation in the bovine DGAT1 gene with major effect on milk yield and composition. *Genome Res*. 12: 222-231.
- Guyton AC, Hall JE. 2006. *Textbook of medical physiology*. 11th ed. Philadelphia (USA): Elsevier Saunders. p. 871-875.
- Haegeman AF, Coopman K, Jacobs M, Mattheeuws A, Van Zeveren L, Peelmann. 2001. Bovine melanocortin

- receptor 4:cDNA sequence, polymorphisms and mapping. *J Anim Genet.* 32:189-192.
- Haskell-Luevano C, Monck EK. 2001. Agouti-related protein functions as an inverse agonist at a constitutively active brain melanocortin-4 receptor. *Regul Pept.* 99:1-7.
- Horn F, Bettler E, Oliveira L, Campagne F, Cohen FE, Vriend G. 2003. GPCRDB informative system for G protein-coupled receptors. *Nucleic Acids Res.* 31:294-297.
- Hernández N, Martínez-González JC, Parra-Bracamonte GM, Sifuentes-Rincón AM, López-Villalobos N, Morris ST, Briones-Encinia F, Ortega-Rivas E, Pacheco-Contreras VI, Meza-García LA. 2016. Association of polymorphisms in growth hormone and leptin candidate genes with live weight traits of Brahman cattle. *Genet Mol Res.* 15:gm15038449.
- Hill WG. 1979. A note effective population size with overlapping generations. *Genetics.* 92:317-322
- Hradecka E, Čitek J, Panicke L, Řehout V, Hanusova L. 2008. The relation of GH1, GHR and DGAT1 polymorphisms with estimated breeding values for milk production traits of German Holstein sires. *Czech J Anim Sci.* 53:238-245.
- Huang M, Gao X, Li JY, Ren HY, Chen JB, Xu SZ. 2010. Polymorphisms in MC4R gene and correlations with economic traits in cattle. *J Mol Biol Rep.* 37:3941-3944.
- Huszar D, Lynch CA, Huntress FV, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR, Gu W, Kesterson RA, Boston BA, Cone RD, Smith FJ, Campfield LA, Burn P, Lee F. 1997. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell.* 88:131-141.
- Kuehn LA, Rohrer GA, Nonneman DJ, Thallman RM, Leymaster KA. 2007. Detection of single nucleotide polymorphisms associated with ultrasonic backfat depth in segregating Meishan x White Composite population. *J Anim Sci.* 85:1111-1119.
- Lacorte GA, Machado MA, Martinez ML, Campos AL, Maciel RP, Verneque RS, Teodoro RL, Peixoto MGCD, Carvalho MRS, Fonseca CG. 2006. DGAT1 K232A polymorphism in Brazilian cattle breeds. *Genet Mol Res.* 5:475-482.
- Lee Y, Park S, Kim H, Lee SK, Kim JW, Lee HK, Lee SJ. 2013. A C1069G SNP of the MC4R gene and its association with economic traits in Korean native cattle (brown, brindle and black). *Electron J Biotechnol.* 16:1-5.
- Li H, Deeb N, Zhou H, Mitchell AD, Ashwell CM, Lamont SJ. 2003. Chicken quantitative trait loci for growth and body composition associated with transforming growth factor- β genes. *Poult Sci.* 82:347-356.
- Liu H, Tian W, Zan L, Wang H, Cui H. 2010. Mutation of MC4R gene and its association with economic traits in Qinchuan cattle. *Mol Biol Rep.* 37:535-540.
- Lubrano-Berthelier C, Cavazos M, Duben B, Shapiro A, Stunff CL, Zhang S, Picart F, Govaerts C, Froguel P, Bougnères P, Clement K, Vaisse C. 2003. Molecular genetics of human obesity-associated MC4R mutations. *Ann NY Acad Sci.* 994:49-57.
- MacKenzie RG. 2006. Obesity-associated mutations in the human melanocortin-4 receptor gene. *Peptides.* 27:395-403.
- Maharani D, Fathoni A, Sumadi, Hartatik T, Khusnudin M. 2018. Identification of MC4R gene and its association with body weight and body size in Kebumen Ongole grade cattle. *J Ind Tropic Anim Agric.* 43:87-93.
- Malewa AD, Hakim L, Maylinda S, Husain MH. 2014. Growth hormone gene polymorphisms of Indonesia fat tailed sheep using PCR-RFLP and their relationship with growth traits. *Livest Res Rural Develop.* 26:115. Available from: <http://www.lrrd.org/lrrd26/6/male26115.htm>
- McLean KL, Schmutz SM. 2011. Melanocortin 4 receptor polymorphism is associated with carcass fat in beef cattle. *Can J Anim Sci.* 91:75-79.
- Nielsen R, Slatkin M. 2013. An introduction to population genetics: Theory and applications. London (UK): Macmillan Education.
- Pal A, Chakravarty AK, Bhattacharya TK, Joshi BK, Sharma A. 2004. Detection of polymorphism of growth hormone gene for the analysis of relationship between allele type and growth traits in Karan Fries cattle. *Asian-Aust J Anim Sci.* 17:1334-1337.
- Prihandini PW. 2018. Analisis potensi genetik sapi Madura di Kabupaten Pamekasan dan Loka Penelitian Sapi Potong Jawa Timur [Disertasi]. [Yogyakarta (Indonesia)]: Universitas Gadjah Mada.
- Prihandini PW, Sumadi, Suparta G, Maharani D. 2019. Melanocortin-4 Receptor (MC4R) gene polymorphism and its effect on growth traits in Madura cattle. *J Indones Trop Anim Agric.* 44:38-46.
- Putra WPB, Indriastuti R. 2017. Gen leptin sebagai gen potensial untuk seleksi molekuler pada sapi di Indonesia. *Wartazoa.* 3:105-116.
- Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Argyropoulos G, Walts B, Perusse L, Bouchard C. 2006. The human obesity gene map: the 2005 update. *J Obesity.* 14:529-644.
- Rosmond R, Chagnon M, Bouchard C, Bjorntorp P. 2001. A missense mutation in the human melanocortin-4 receptor gene in relation to abdominal obesity and salivary cortisol. *Diabetologia.* 44:1335-1338.
- Roth CL, Ludwig M, Woelfle J, Fan ZC, Brumm H, Biebermann H, Tao YX. 2009. A novel melanocortin-4 receptor gene mutation in a female patient with severe childhood obesity. *Endocrine.* 36:52-59.
- Seeley RJ, Yagaloff KA, Fisher SL, Burn P, Thiele TE, van Dijk G, Baskin DG, Schwartz MW. 1997.

- Melanocortin receptors in leptin effects. *Nature*. 390:349.
- Seong J, Lee HK, Suh DS, Kong HS, Park HD. 2012. Identification and analysis of MC4R polymorphisms and their association with economic traits of Korean cattle (Hanwoo). *Mol Biol Rep*. 5:3597-3601.
- Supakorn C, Mekchay S, Siripholvat V, Sopannarath P, Koonawootrittriron S, Tumwasorn S. 2007. Effect of genetic polymorphism of bovine growth hormone gene on preweaning growth traits in a Thai multibreed beef population. *Kasetsart J Nat Sci*. 41:484-492.
- Tao YA. 2005. Molecular mechanisms of the neural melanocortin receptor dysfunction in severe early onset obesity. *Mol Cell Endocrinol*. 239:1-14.
- Thue TD, Schmutz SM, Buchanan FC. 2001. A SNP in the cattle MC4R gene is used to map MC4R to BTA 24. *Anim Genet*. 32:390-391.
- Tizioto PC, Meirelles SL, Tulio RR, Rosa AN, Alencar MM, Medeiros SR, Siqueira F, Feijó GLD, Silva LOC, Torres Junior RAA, Regitano LCA. 2012. Candidate genes for production traits in Nelore beef cattle. *Genet Mol Res*. 11:4138-4414.
- Valle E, Habermann FA, Moore SS, Crews DH, Benkel BF. 2004. Genomic localization and SNP discovery in the bovine melanocortin receptor 4 gene (MC4R). *Anim Genet*. 35:351-352.
- Yeo GSH, Farooqi S, Aminian S, Halsall DJ, Stanhope RG, O'Rahilly S. 1998. A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. *Nat Genet*. 20:111-112.
- Zhang CL, Chen H, Wang YH, Lan XY, Zhang L, Zhang AL, Zhang RF. 2006. Association of a missense mutation of The MC4R gene with growth traits in cattle (brief report). *Archiv Fur Tierzucht*. 49:515-516.
- Zhang CL, Wang YH, Chen H, Lan XY, Lei CZ, Fang XT. 2009. Association between variants in the 50-untranslated region of the bovine MC4R gene and two growth traits in Nanyang cattle. *Mol Biol Rep*. 36:1839-1843.

Kandidat Gen Penyusun Protein Susu untuk Perbaikan Genetik Sapi Perah

(Candidate Gene of Milk Protein for Genetic Improvement of Dairy Cattle)

Santi Ananda Asmarasari¹, C Sumantri², A Gunawan², E Taufik², A Anggraeni³

¹Mahasiswa Pascasarjana Program Studi Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan,
Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor

²Departemen Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor

³Balai Penelitian Ternak
Kontributor utama: santi_ananda@yahoo.com

(Diterima 11 April 2019 – Direvisi 28 Mei 2019 – Disetujui 11 Juni 2019)

ABSTRACT

The objective of this paper is to explore some efforts to increase milk protein of dairy cows through a milk protein control gene selection approach. Improving the quality of cow's milk has shifted to increase milk protein levels, due to nutritional and economic interest. The breeding process in producing dairy cattle with the advantage of having high milk protein content is more effectively carried out by molecular biotechnology approaches. The content of cow's milk protein is controlled by cow's milk protein control genes. In the process to produce dairy cattle with the advantage of having high milk protein content, it can be done with a selection approach based on milk protein control genes, namely CSN1S1, CSN2, CSN1S2, and CSN3. Once known, the main controller gene that causes high levels of cow's milk protein, it will be easy to identify dairy cattle that have these advantages, so that the selection of dairy cattle can be done since at early age.

Key words: Milk protein, selection, protein control genes

ABSTRAK

Makalah ini ditulis dengan tujuan untuk mengupas upaya peningkatan protein susu sapi perah melalui pendekatan seleksi gen pengontrol protein susu. Peningkatan kualitas susu sapi mulai beralih kepada peningkatan kadar protein susu, karena alasan gizi dan ekonomi. Proses pemuliaan dalam menghasilkan ternak sapi perah yang memiliki keunggulan dengan kandungan protein susu yang tinggi lebih efektif dilakukan dengan pendekatan bioteknologi molekuler. Kandungan protein susu sapi dikontrol oleh gen-gen pengontrol protein susu. Dalam proses, untuk menghasilkan sapi perah dengan keunggulan memiliki kandungan protein susu tinggi, dapat dilakukan dengan pendekatan seleksi berdasarkan gen pengontrol protein susu, yaitu CSN1S1, CSN2, CSN1S2, dan CSN3. Setelah diketahui gen pengontrol utama yang menyebabkan tingginya kadar protein susu sapi, maka dapat diketahui sapi perah yang memiliki keunggulan tersebut, sehingga seleksi pada sapi perah dapat dilakukan dari sejak usia dini.

Kata kunci: Protein susu, seleksi, gen pengontrol protein

PENDAHULUAN

Peningkatan produksi dan komposisi susu selalu menjadi tujuan utama kegiatan pemuliaan ternak sapi perah. Susu sapi dengan kandungan protein tinggi diperlukan sebagai sumber nutrisi yang baik. Kandungan protein tinggi dalam susu juga diperlukan dalam proses pengolahan susu, untuk dapat menghasilkan produk olahan susu dengan kualitas tinggi. Perkembangan bioteknologi molekuler membuka peluang dilakukannya pemuliaan sapi perah yang memiliki kadar protein susu tinggi untuk mendukung kecukupan konsumsi protein di Indonesia. Anggraeni et al. (2017) menyatakan bahwa beberapa gen protein pada sapi perah diidentifikasi memiliki efek langsung terhadap kandungan protein susu, sehingga seleksi berbasis molekuler melalui identifikasi

polimorfisme genetik dari gen protein utama dapat digunakan untuk mendapatkan perbaikan genetik sapi perah dalam menghasilkan susu dengan kadar protein tinggi. Manfaat dari pengembangan sapi perah dengan kadar protein susu tinggi diharapkan mampu meningkatkan harga jual susu segar, sehingga mendukung peningkatan kesejahteraan para pelaku usaha pada industri ternak sapi perah, terutama para peternak.

Pada saat ini, sejumlah negara yang maju pada bidang industri sapi perah, dalam melakukan pengembangan ternak sapi perah, lebih mengutamakan pengembangan sapi perah dengan perbaikan genetik, dengan tujuan untuk meningkatkan kualitas susu berdasarkan kadar protein susu, bukan lagi berdasarkan lemak susu. Hal ini dikarenakan nilai dampak ekonomi yang diakibatkan oleh meningkatnya kadar protein susu

yang lebih berdampak pada peningkatan ekonomi untuk para pelaku industri yang terkait ternak sapi perah.

Botaro et al. (2009) melaporkan bahwa secara global, upaya peningkatan kualitas susu sapi dengan meningkatkan kandungan protein susu, atau bukan peningkatan kandungan lemak susu, dilaporkan telah mulai dilakukan, dengan menggunakan alasan aspek nutrisi dan ekonomi sebagai justifikasi utamanya. Dalam ilmu nutrisi manusia, sudah lama diyakini bahwa protein dalam susu sapi memiliki kualitas yang baik sebagai sumber nutrisi bagi tubuh, dikarenakan protein dari susu sapi mengandung semua asam amino esensial, serta unsur-unsur penting bagi tubuh yang tidak dapat diproduksi oleh tubuh manusia (Guetouache et al. 2014). Penting untuk diingat bahwa protein adalah zat gizi yang mensuplai terbentuknya bangunan dari semua jaringan makhluk hidup. Terlebih sebelumnya sudah dilaporkan bahwa protein susu mengandung proporsi yang baik dari semua asam amino yang penting untuk pertumbuhan dan pemeliharaan tubuh (Farrel et al. 2004). Hristov & Radoslavov (2015) menyatakan bahwa fokus peningkatan kualitas susu dengan mengutamakan peningkatan komposisi protein susu juga ditujukan untuk meningkatkan nilai ekonomi produk olahan susu, dimana protein menjadi faktor utama sebagai indikator utama penentu kualitasnya, seperti misalnya keju. Oleh karena itu, maka ke depan pengembangan sapi perah dengan kadar protein susu tinggi menjadi topik penelitian pemuliaan ternak perah yang potensial untuk dikembangkan di masa depan.

Komponen susu pada sapi perah dipengaruhi oleh faktor lingkungan dan genetik (Anggraeni 2012). Secara genetik, pada susu sapi terdapat enam protein spesifik utama, yaitu α 1-casein (CSN1S1), α 2-casein (CSN2), β -casein (CSN1S2), κ -casein (CSN3), α -lactalbumin, dan β -lactoglobulin, yang seluruhnya dikendalikan oleh gen pengontrol (Galila & Darwish 2008). Atas dasar tersebut di atas, untuk mendukung pengembangan sapi perah dengan kadar protein susu tinggi, perlu dikembangkan pemuliaan sapi perah dengan keunggulan memiliki kandungan protein susu tinggi, melalui pendekatan bioteknologi molekuler. Sebagai bagian dalam rangka mendukung hal tersebut, maka makalah ini ditulis, yaitu mengupas upaya peningkatan protein susu sapi perah melalui pendekatan seleksi gen pengontrol protein susu.

KOMPONEN UTAMA PROTEIN SUSU SPI PERAH

Farrel et al. (2004) menerangkan bahwa secara komposisi kimia, susu sapi mengandung 3,5% protein, dimana 78-82% berupa kasein dan 18-22% dalam bentuk *whey*. Sebagai komponen protein, Eskin et al. (1990) mengatakan bahwa kasein merupakan senyawa protein yang memiliki kandungan garam kalsium, fosfor dan sejumlah kecil magnesium serta sitrat, yang menjadi agregat makromolekul yang disebut kalsium fosfo-kaseinat atau misel kasein, dimana dengan karakteristik tersebut, akan menyebabkan terjadinya presipitasi oleh pengasaman pada pH 4,6 dengan suhu 20°C. Selain kasein, komponen lain protein adalah *whey*. *Whey* merupakan fraksi protein yang tidak mengalami presipitasi oleh pengasaman pada pH 4,6 dengan suhu 20°C (Eigel et al. 1984). Madureira et al. (2007) mengemukakan bahwa sebagian besar *whey* merupakan protein globular dengan struktur sekunder dan tersier sehingga mudah terdenaturasi pada pemanasan dengan suhu sekitar 60°C. Roginski (2003) dan Farrel et al. (2004) menjelaskan bahwa kasein terdiri atas empat jenis polipeptida, yaitu α 1-kasein, β -kasein, α 2- dan κ -kasein. Sedangkan, *whey* terdiri atas β -laktoglobulin, α -laktalbumin, serum albumin, immunoglobulin, laktoferin, laktoferoksidase dan glikomakropeptida (Farrel et al. 2004). Untuk melihat secara detail terkait komponen protein susu, maka pada Tabel 1 ditunjukkan konsentrasi, berat molekul dan fungsi biologis potensial dari komponen protein bioaktif utama dari kolostrum dan susu sapi.

Edwards et al. (2009) mengatakan bahwa sekitar 95% dari komponen protein susu disintesis dari asam amino, sedangkan 5% lainnya diproduksi dari sumber protein darah, komponen yang diproduksi dari sumber protein darah yaitu serum albumin dan immunoglobulin. Fraksi protein dalam susu yang dilaporkan berfungsi sebagai antimikroba yaitu immunoglobulin, laktoferin, lisozim, laktoperosidase dan glikomakropeptida yang merupakan kompleks protein yang berfungsi sebagai imunitas untuk melawan berbagai macam penyakit (Adlerova 2008). Konsentrasi protein antimikroba dalam kolostrum sangat tinggi yaitu mencapai 100 g/l dan secara cepat turun menjadi 1 g/l selama kurang dari satu minggu setelah sapi melahirkan (Roginski 2003).

Tabel 1. Komponen protein bioaktif utama dari kolostrum dan susu sapi perah

Protein	Konsentrasi (g/L) kolostrum susu		Berat molekul (Dalton)	Jumlah asam amino	% terhadap total protein	Aktivitas biologis
Kasein (α_{s1} -, β -, α_{s2} -, dan κ - kasein)	26	28	14.000- 22.000			Pembawa ion (Ca, PO ₄ , Fe, Zn, Cu), prekursor untuk imunomodulator peptida bioaktif
β -laktoglobulin	8,0	3,3	18.400	162	9,8	Pembawa vitamin, potensial antioksidan, prekursor untuk peptida bioaktif, berikatan dengan asam lemak
α -laktalbumin	3,0	1,2	14.200	123	3,7	Efektor sintesis laktosa pada kelenjar ambing, pembawa kalsium, imunomodulator, prekursor untuk peptida bioaktif.
Imunoglobulin	20- 150	0,5- 1,0	150.000- 1.000.000	0	2,1	Perlindungan kekebalan spesifik melalui antibodi dan sistem pelengkap, prekursor potensial untuk peptida bioaktif.
Glikomakro- peptida	2,5	1,2	8000	64	0	Antimikroba, antitrombotik, prebiotik, regulator hormon lambung
Laktoferrin	1,5	0,1	80.000	700	0,6	Antimikroba, antioksidatif, antikarsinogenik, anti peradangan, transportasi zat besi, regulasi pertumbuhan sel, prekursor peptida bioaktif, imunomodulator, stimulasi proliferasi osteoblas
Laktoperoksidase	0,02	0,03	78.000	612	0	Antimikroba, efek sinergis dengan imunoglobulin, laktoferin, dan lisozim
Lisozim	0,02	0,03	78.000			Antimikroba, efek sinergis dengan imunoglobulin, laktoferin, dan lisozim
Serum albumin	1,3	0,3	66.300	582	1,2	Prekursor untuk peptida bioaktif
Susu protein dasar	TD	NTD	10.000- 17.000			Stimulasi proliferasi osteoblas dan penekanan resorpsi tulang
Faktor pertumbuhan	50 μ g - 40 mg/L	<1 μ g - 2 mg/L	6400-30.000			Stimulasi pertumbuhan sel, perlindungan dan perbaikan sel intestinal, regulasi sistem kekebalan tubuh

TD= Tidak ada data

Sumber: Pihlanto & Korhonen (2003); Farrel et al. (2004)

GEN YANG BERPENGARUH TERHADAP PROTEIN SUSU

Identifikasi QTL (*Quantitative Trait Loci*) merupakan salah satu metode molekuler genetik yang berperan di dalam menemukan suatu wilayah di kromosom yang berpengaruh terhadap fenotipik tertentu dari ternak yang akan dilihat. Dalam hal ini sifat komposisi susu protein. Berdasarkan informasi database QTL pada sapi didapatkan 120.122 posisi lokus yang telah berhasil dipetakan dari 896 publikasi yang dilaporkan (Hu 2019). Pemetaan gen-gen yang berpengaruh terhadap persentase protein susu tersebar di semua kromosom. Letak gen-gen tersebut diperlihatkan pada Gambar 1.

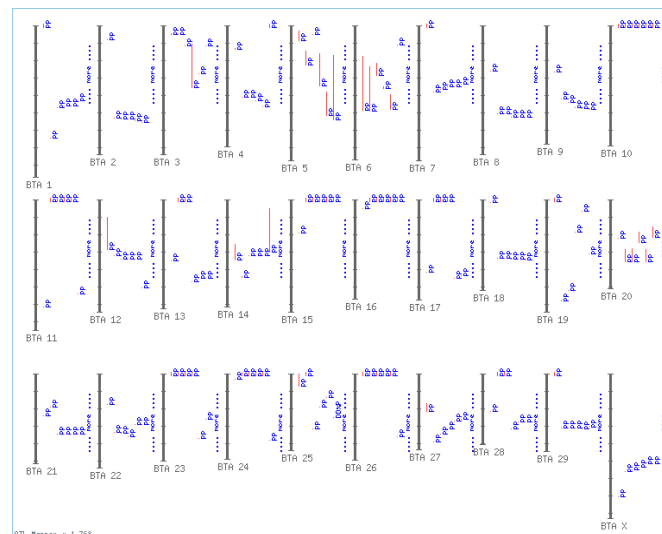
Secara umum sifat komposisi susu memiliki peranan penting. Hal ini terlihat dari jumlah QTL untuk sifat komposisi susu (lemak dan protein) menduduki peringkat kedua dan ketiga pada QTL *database* sapi berdasarkan sifat yang diamati. Sifat komposisi lemak susu yang berhasil dipetakan sebanyak 19.895 *marker* dan 17.677 *marker* untuk komposisi protein susu (Gambar 3). Pemetaan gen-gen pengontrol untuk kandungan persentase kasein (MCASP) tersebar pada kromosom ke-1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 23, 25, dan 26. Letak gen-gen tersebut diperlihatkan pada Gambar 2. Jenis-jenis gen tersebut dapat dilihat pada Tabel 2.

Studi QTL untuk sifat komposisi protein sapi telah banyak dilakukan di luar negeri. Sifat ini terbagi lagi ke dalam fraksi-fraksi protein seperti persentase α -kasein, rasio α -kasein dan β -kasein, persentase α -laktalbumin, persentase α s1-kasein, persentase α s2-kasein, persentase β -kasein, persentase β -laktoglobulin, kandungan total kasein susu, kasein index, produksi kasein, persentase κ -kasein, persentase laktoferrin dan

Tabel 2. Kandidat gen yang mempengaruhi sifat produksi susu dan protein susu berdasarkan *in silico analysis*

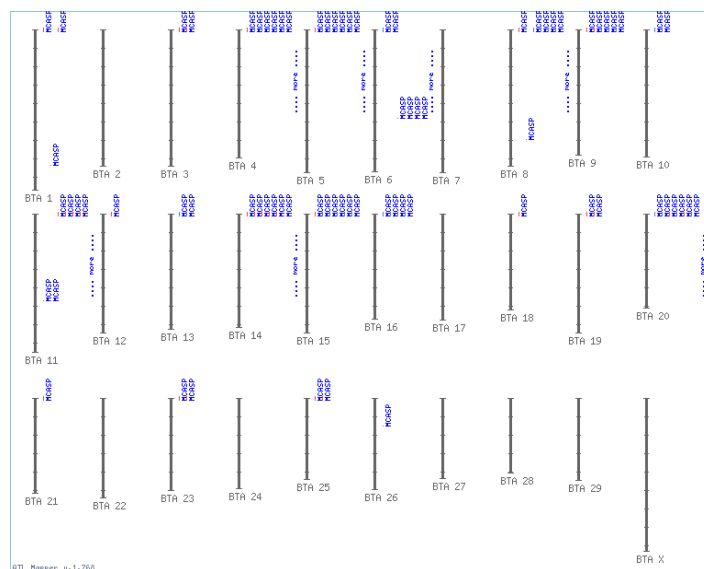
Gen	Nama Gen	Produksi susu (+)/ Protein susu (#)
ABCG2	<i>ATP-Biding Cassette, sub -family G (white), member 2</i>	+ + +
CSN1S1	<i>Casein alpha s1</i>	+ + +/ #
CSN1S2	<i>Casein alpha s2</i>	#
CSN2	<i>Casein beta</i>	#
CSN3	<i>Casein kappa</i>	+ + +/ #
LALBA	<i>Lactalbumin, alpha</i>	#
LGB	<i>Lactoglobulin, beta</i>	+ +
DGAT1	<i>Diacylglycerol O-acyltransferase 1</i>	+ + + + + +
GHR	<i>Growth Hormone Receptor</i>	+ + + +
LEP	<i>Leptin</i>	+ + +
PRL	<i>Prolactin</i>	+ +
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription 5A</i>	+ +
BoLA-DRB3	<i>Major histocompatibility complex, clas II, DRB 3</i>	+ + +
CCL2	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 20</i>	+
LTF	<i>Lactoferrin</i>	+ +

Sumber: diolah dari Ogorevc (2009)

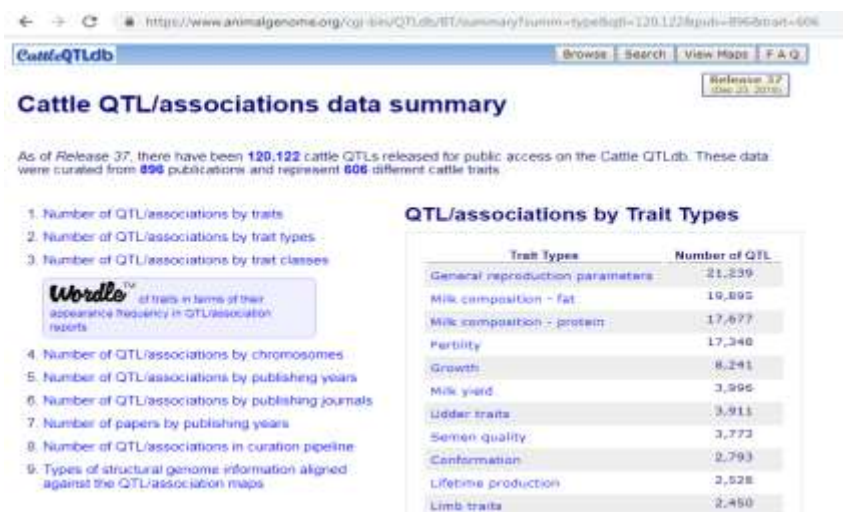


Gambar 1. Distribusi QTL untuk persentase protein (PP) pada sapi

Sumber: https://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/BT/traitmap?trait_ID=1041



Gambar 2. Distribusi QTL untuk persentase kasein (MCASP)



Gambar 3. Jumlah QTL atau asosiasi berdasarkan sifat-sifat pada sapi

Sumber: <https://www.animalgenome.org>

persentase *whey* protein. Farrell et al. (2004) melaporkan ada 14 major protein pada susu, tetapi sekarang hanya ada 9 variasi protein susu yang diketahui pada sapi perah dan hanya beberapa saja yang berpengaruh sangat nyata terhadap sifat komposisi susu.

POLIMORFISME GEN PROTEIN SUSU DAN ASOSIASINYA TERHADAP SIFAT KOMPONEN SUSU

Laporan studi yang dilaporkan oleh Rijnkels et al. (1997) dan Threadgill & Womack (1990) menjelaskan bahwa kasein susu dari sapi perah terdiri dari empat jenis kasein yang dikontrol oleh empat gen, dengan

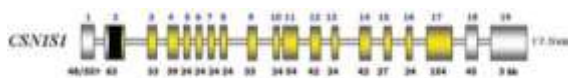
lokasi sangat berdekatan sepanjang 250 kb pada kromosom 6, BTA 6q31. Keempat gen memiliki urutan fisik CSN1S1, CSN2, CSN1S2, dan CSN3, yang masing-masing dikodekan sebagai α 1-CN, β -CN, α 2-CN, dan κ -CN. Hasil pengamatan Caroli et al. (2009) dan Azevedo et al. (2008) menunjukkan bahwa adanya keterkaitan lokasi yang sangat dekat dari famili gen kasein, menyebabkan pewarisan sifat sering bersifat sebagai klaster, hampir seperti lokus tunggal. Atas dasar tersebut, maka gen-gen kasein potensial untuk dieksplorasi dalam rangka menyeleksi sifat protein susu serta kualitas susu lainnya. Sementara itu, *whey* sebagai komponen protein lainnya, dilaporkan mengandung jenis protein yang lebih bervariasi, tetapi mempunyai dua jenis protein terbanyak, yaitu β -

laktoglobulin terletak pada kromosom 11 (BTA-11) (Vaiman et al. 1994) dan α -laktalbumin terletak pada kromosom 5 (BTA-5) (Eggen & Fries 1995). Beberapa gen dari *whey*, meskipun mensekresikan *whey* dalam jumlah kecil, dilaporkan penting dalam sistem pertahanan tubuh, seperti imunoglobulin, laktoferin, dan laktoferoksidase (Farrel et al. 2004).

Pengaruh genetik individual dan haplotipe protein susu memiliki pola yang jelas terhadap produksi, kadar, dan komposisi protein susu sapi perah. Heritabilitas dari setiap fraksi individual protein susu menunjukkan bahwa mereka dikontrol oleh faktor genetik yang tinggi, dengan nilai h^2 berkisar antara 0,25-0,80 (Schopen et al. 2009). Adanya perkembangan teknik molekular lebih jauh saat ini, telah menjadi studi menarik untuk melihat varian genetik pada jumlah sangat banyak mutasi nukleotida dari rangkaian sekuen basa, baik di dalam maupun di luar wilayah gen-gen protein susu. Hasil penelitian yang dilaporkan oleh Caroli et al. (2009) dan Huang et al. (2012) menunjukkan bahwa pada gen kasein, sampai saat ini telah diidentifikasi setidaknya terdapat varian genetik sebanyak 8 tipe untuk gen α_1 -CN, 12 tipe untuk β -CN, 4 tipe untuk α_2 -CN, dan 14 tipe untuk κ -CN. Varian genetik yang terjadi dalam jumlah besar dari gen-gen kasein susu (gen α_1 -CN = 8, β -CN = 12, α_2 -CN = 4, dan κ -CN = 11) dari sapi perah, ditabulasi secara lengkap.

Gen α_1 -CN (CSN1S1)

Gen α_1 -CN memiliki panjang sekitar 17,5 kb dengan alel yang paling umum ditemukan untuk sapi B dan C. Adanya varian genotipe dari gen ini menempatkan peringkat sapi dengan protein tinggi (BC>CC>BB), kadar protein (CC>BB>BC), produksi lemak (BC>BB>CC) dan kadar lemak (CC>BB>CC). Pada wilayah *non coding* gen α_1 -CN terdapat alel CSN1S1*G yang dikarakteristikan dengan 137 insersi di wilayah *non coding* ekson 19 (Rando et al. 1998). Gen α_1 -CN menjadi salah satu gen kasein potensial yang diamati varian SNP-nya, karena pengaruhnya paling dominan terhadap kasein susu. Sejumlah ekson dari gen ini diketahui memiliki tingkat polimorfisme genetik tinggi. Seperti misalnya, diperoleh alel CSN1S1*I untuk gen α_1 -CN ketika terjadi substitusi basa A > T pada ekson 11, yang menyebabkan substitusi Glu > Asp pada asam amino posisi 84 pada protein (Farrel et al. 2004). Pada Gambar 4 ditunjukkan struktur Gen CSN1S1.

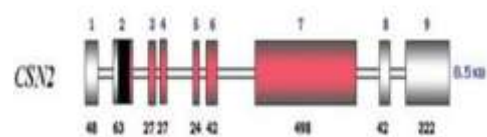


Gambar 4. Struktur Gen CSN1S1

Sumber: IGEM 2014

Gen β -CN (CSN2)

Laporan studi yang disampaikan oleh Schopen et al. (2011) dan Huang et al. (2012) menunjukkan bahwa gen-gen protein susu bersifat sangat polimorfik, serta mengandung polimorfisme SNP dalam jumlah sangat besar. Sebelumnya, Nilsen et al. (2009) mengatakan bahwa sebuah peta SNP resolusi tinggi telah dibangun pada wilayah kasein sapi untuk mengidentifikasi haplotipe struktur dan studi asosiasi dengan sifat-sifat susu pada sapi Merah Norwegia dimana diperoleh kesimpulan bahwa adanya hubungan langsung terhadap protein dan produksi susu dari kedua SNP tunggal dan haplotipe dalam CSN1S1-CSN2-CSN1S2 haplotipe blok. Sebaliknya, tidak terdapat hubungan signifikan untuk SNP tunggal atau haplotipe dalam blok CSN3. Ini membuktikan bahwa CSN2 (Gambar 5) dan CSN1S2 mengandung lokus paling tinggi dalam menimbulkan varian-varian DNA causative (SNP). Hasil paling signifikan ditemukan untuk CSN2_67 SNP alel C yang secara konsisten terkait dengan keunggulan protein dan produksi susu. SNP CSN2_67, sebagai substitusi C ke A, pada kodon 67 di gen β -CN, menyebabkan histidin menggantikan prolin dalam sekuen asam amino. Polimorfisme ini menentukan protein varian A1 / B (CSN2_67 alel A) vs. A2/A3 (CSN2_67 C alel). Hal tersebut memperlihatkan bahwa gen κ -CN tidak berevolusi apabila dibandingkan dengan ketiga gen kasein lainnya, yaitu α_1 -CN, α_2 -CN, dan β -CN. Atas dasar tersebut, maka disarankan pemisahan kluster CN menjadi 2 blok haplotipe, satu blok terdiri dari CSN1S1, CSN2, dan CSN1S2, dan satu lainnya CSN3 (Gambar 7).



Gambar 5. Struktur Gen CSN2

Sumber: IGEM 2014

Gen α_2 -casein (CSN1S2)

Rando et al. (1998) melaporkan bahwa alel CSN1S2*B terjadi pada gen α_2 -CN ketika terjadi perubahan A > T pada basa ke-17 dari ekson 3 yang menyebabkan substitusi Ser > Phe pada AA posisi 8 dari protein. Ketika AA posisi 136 adalah Thr pada gen κ -CN dinyatakan sebagai alel CSN3*A, sedangkan bila AA posisi 148 menjadi Ala maka diidentifikasi sebagai alel CSN3*B. Alel CSN1S1*G diketahui menyebabkan turunnya kandungan α_1 -CN pada susu sapi perah, disebabkan karena kestabilan mRNA selama bioproses protein susu di dalam tubuh (Rando et al. 1998). Struktur Gen CSN1S2 ditunjukkan pada Gambar 6.



Gambar 6. Struktur Gen CSN1S2

Sumber: IGEM 2014)

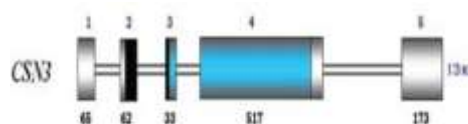
Gen K-casein (CSN3)

Gen K-casein (CSN3) berlokasi di kromosom 6q31 dengan panjang kurang lebih 13 kb (Gambar 7). Gen K-casein memiliki 5 ekson dan 4 intron dan kebanyakan sekuens coding pada protein K-casein berlokasi pada ekson 4 (Ferretti et al. 1990). Meskipun 9 varian telah ditemukan pada gen K-casein: A, B, C, E, F, G, H, I dan A1, varian alel yang sering ditemukan adalah A dan B (Deb et al. 2014). Varian A dan B terjadi pada asam amino posisi 136 dan 148 struktur primer. Azevedo et al. (2008) melaporkan bahwa pada asam amino 136 threonin (Thr) digantikan oleh isoleucine (Ile) sedangkan pada posisi asam amino 148 asam aspartat (Asp) digantikan oleh alanin (Ala). Alel CSN1S2*B terjadi pada gen α_2 -CN ketika terjadi perubahan A > T pada basa ke-17 dari ekson 3 yang menyebabkan substitusi Ser > Phe pada asam amino posisi 8 dari protein (Rando et al. 1998).

Varian genetika dari κ -casein gen telah menjadi perhatian serius oleh industri pengolahan susu. Hal ini karena κ -casein gen mempunyai peran penting dalam menentukan kandungan protein (kasein) susu segar yang dibutuhkan sebagai bahan baku untuk memproses dan mengolah susu menjadi produk olahan prima, seperti dalam pembuatan keju. Terdapat pengaruh

langsung genotipe BB (vs genotipe AA) κ -CN terhadap keunggulan kadar protein susu (Molina et al. 2006). Induk genotipe BB (vs genotipe AA) menghasilkan kadar protein susu lebih banyak 0,08% (Bovenhuis et al. 1992). Pengaruh varian gen κ -CN terhadap kadar protein kasar dan kasein susu memiliki urutan genotipe BB > AB > AA, dimana induk BB terhadap AA, unggul kadar protein susu antara 0,1 – 0,2/100 g susu (Ng-Kwai-Hang et al. 1990). Ng-Kwai-Hang et al. (2002) mengatakan bahwa kadar protein meningkat akibat penambahan kadar dan jumlah kasein. Sementara itu, Beata et al. (2008) melaporkan bahwa genotipe BB juga memberi hasil lebih baik bagi proses dan produk olahan susu, seperti pemendekan waktu pembentukan rennet dan kehalusan keju.

Studi yang dilaporkan Sumantri et al. (2005) menunjukkan bahwa konsistensi pengaruh genotipe BB pada gen κ -CN (CSN3) terhadap protein susu tinggi terbukti untuk sapi FH domestik di Indonesia. Frekuensi genotipe κ -CN berbeda pada sapi-sapi dengan perbedaan nilai pemuliaan (NP) protein susu. Genotipe BB dan AB muncul dalam frekuensi tinggi (0,64) pada NP protein tinggi. Sebaliknya, pada NP rendah, frekuensi genotipe AA κ -CN sangat tinggi (0,80). Selain itu, genotipe BB menghasilkan renet susu lebih baik dibandingkan genotipe AB dan AA.



Gambar 7. Struktur gen CSN3

Sumber: IGEM 2014

Tabel 3. Informasi polimorfisme SNP gen kasein terhadap kandungan protein dan fraksi protein

Fraksi protein (mg/100 μ L)	Signifikan SNP	Tipe III P-value	Genotipe (jumlah)	Estimasi Efek (SE)
α s-kasein	BTA6.88307280	<0,0001	AG (78) AA (184)	0,0578 $\pm$ 0,0130 0
β -kasein	BTA6.88426653	<0,0001	GG (31) AG (114)	0,0650 $\pm$ 0,0300 0,0817 $\pm$ 0,0184
κ -kasein	BTA6.88528997	<0,0001	AA (50) AC (150) CC (68)	0,2655 $\pm$ 0,0287 0,1013 $\pm$ 0,0119 0
β -laktoglobulin	BTA11.107169806	<0,0001	CC (44) CT (129) TT (92)	- 0,2379 $\pm$ 0,0146 - 0,1106 $\pm$ 0,0010 0
Total protein	BTA6.88378199	0,0007	CC (27) CT (107) TT (113)	0,2551 $\pm$ 0,0621 0,1361 $\pm$ 0,0467 0
	BTA6.88531650	0,0003	GG (43) AG (143) AA (61)	0,2551 $\pm$ 0,0621 0,1361 $\pm$ 0,0467 0
Rasio α s kasein dan β -kasein	BTA6.88307280	<0,0001	AG (78) AA (184)	0,0240 $\pm$ 0,0053 0

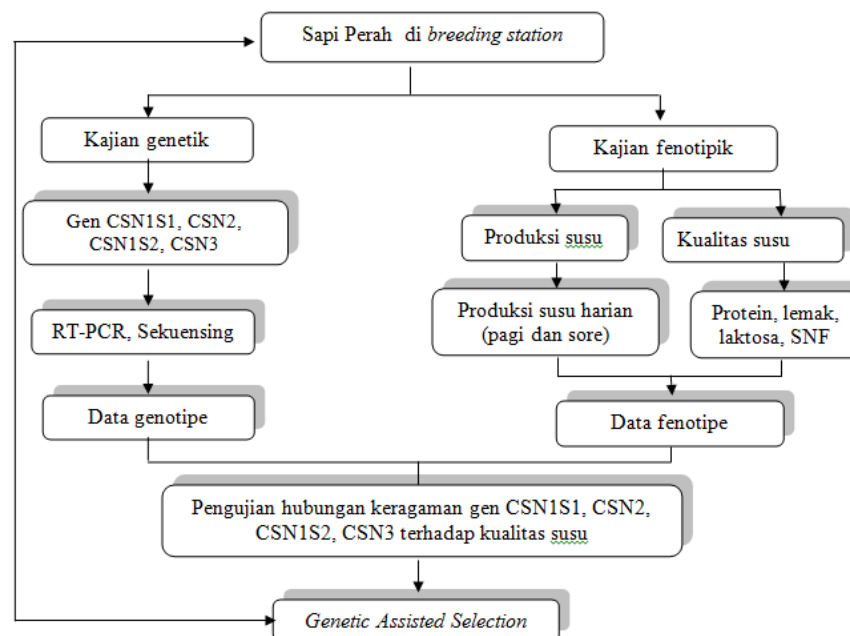
Sumber: Huang et al. (2012)

Penelitian yang dilakukan oleh Huang et al. (2012) mengenai asosiasi antara variasi gen protein susu dan komposisi protein susu pada sapi Holstein dan persilangannya menyatakan bahwa asosiasi paling signifikan untuk protein total adalah SNP BTA6.88531650 terletak di dalam gen CSN3. Sedangkan SNP BTA6.88307280 berada dalam gen CSN1S1 dan berasosiasi terhadap rasio α -kasein dan β -kasein serta konsentrasi α -kasein. Informasi polimorfisme SNP gen kasein terhadap kandungan protein dan fraksi protein disajikan pada tabel 3.

SELEKSI GEN UNTUK MENINGKATKAN KANDUNGAN PROTEIN SUSU SAPI PERAH

Anggraeni (2012) telah menjelaskan bahwa upaya dalam meningkatkan kandungan protein susu sapi perah dapat dilakukan melalui seleksi, dengan adanya perkembangan yang pesat di bidang bioteknologi molekuler sekarang ini, telah membuka peluang bagi para pemulia agar dapat melakukan seleksi pada taraf molekular, dengan menggunakan aplikasi *gene(s) assisted selection* (GAS), yaitu menggunakan gen-gen major sebagai gen-gen kandidat dalam proses seleksi. Proses seleksi dalam menghasilkan bibit sapi perah yang memiliki kelebihan dalam kadar protein susu yang tinggi, dapat dilakukan melalui upaya dengan cara mengidentifikasi polimorfisme genotipe dari famili gen protein susu. Diharapkan bahwa upaya ini akan sangat efektif karena kadar protein susu sapi perah dikontrol oleh dua famili gen, yaitu kasein dan *whey*.

Přibyl (1995) mengatakan bahwa gen-gen major tersebut jika dikorelasikan dengan sejumlah parameter produksi dapat menjelaskan sebagian keragaman genetik dan membantu dalam estimasi nilai pemuliaan, sehingga dapat dipakai sebagai pelengkap pada prosedur seleksi konvensional dan juga dapat memberikan perbaikan akurasi seleksi dan memperpendek selang generasi, sehingga respons seleksi diperoleh lebih cepat bila dibandingkan seleksi konvensional (Drögemüller et al. 2001). Pelaksanaan seleksi sapi perah yang memiliki keunggulan pada kadar protein susu dengan cara identifikasi polimorfisme genotipe famili gen protein susu, akan memiliki proses yang lebih sederhana dibandingkan seleksi konvensional terhadap sifat produksi susu. Penggunaan aplikasi seleksi molekuler dan perkawinan secara terarah dalam upaya membentuk galur sapi perah yang memiliki keunggulan pada kadar protein susu yang tinggi, akan dapat dicapai dalam waktu yang lebih singkat, apabila dibandingkan dengan jalan proses seleksi konvensional. Kegiatan seleksi pada sifat unggul protein susu, memungkinkan dapat dilakukan, meskipun program pemuliaan sapi perah di Indonesia, lebih banyak diarahkan pada peningkatan produksi susu. Upaya pemuliaan sapi perah dengan keunggulan memiliki kadar protein susu tinggi ke depan akan menjadi perhatian utama, seiring dengan semakin meningkatnya tingkat konsumsi susu masyarakat sebagai minuman sehat, serta meningkatnya produk-produk olahan susu sebagai "*functional food*".



Gambar 8. Tahapan proses seleksi sapi perah berkadar protein susu tinggi berbasis seleksi gen kasein

APLIKASI PEMANFAATAN GEN KASEIN PADA PROGRAM PEMULIAAN SAPI PERAH BERKADAR PROTEIN SUSU TINGGI

Teknik genetika molekuler dapat memberikan hasil yang lebih menguntungkan untuk program pemuliaan karena dapat menentukan potensi seekor ternak, sebelum fenotipenya diketahui. Polimorfisme gen mayor banyak dipelajari dan dimanfaatkan dalam kaitannya dengan sifat-sifat produksi pada ternak yang diwariskan. Gen penciri indikator sifat produksi dapat dimanfaatkan untuk melakukan seleksi dengan lebih efisien. Seleksi dapat dilakukan pada saat ternak masih belum menunjukkan kemampuan produksinya, sehingga dengan penciri genetik, potensi produksi ternak dapat diketahui secara lebih dini.

Seleksi dengan memanfaatkan penciri genetik yang berhubungan dengan sifat produksi dan komposisi susu akan mempermudah dalam melakukan seleksi pada sapi perah. Dengan kemajuan bioteknologi dan tersedianya fasilitas teknologi DNA maka identifikasi genotipe kasein dalam populasi dapat dilakukan, dan seleksi berdasar genotipe kasein merupakan salah satu alternatif yang dapat dilakukan. Seleksi dapat diterapkan pada jantan dan betina, dan identifikasi genotipe kasein pada pedet yang muda memungkinkan, serta bebas dari pengaruh efek lingkungan.

Hasinah & Tiesnamurti (2008) mengatakan bahwa penciri genetik gen kasein pada sapi dapat dipergunakan sebagai alat bantu dalam menseleksi produksi susu dan komposisi susu. Proses seleksi sapi perah berkadar protein susu tinggi berbasis seleksi gen kasein dilakukan dengan beberapa tahapan seperti ditunjukkan pada Gambar 8, yaitu (1) Identifikasi keragaman genetik gen kasein (α_{s1} -, β -, α_{s2} -, dan κ -kasein) pada sapi perah. (2) Menentukan performa fenotipe sapi perah, melalui koleksi data fenotipe meliputi kualitas susu (protein, lemak, SNF, laktosa) dan produksi susu. (3) Pengujian keragaman genetik gen kasein susu terhadap sifat kualitas susu dan produksi susu. Proses seleksi pembentukan sapi perah dengan kandungan protein susu tinggi tidak hanya dilakukan pada sapi betina, tetapi juga pada sapi jantan, untuk menentukan potensi sapi jantan yang digunakan sebagai pejantan, karena gen pengontrol protein susu dibentuk 50% dari jantan dan 50% betina.

Tahapan teknis dalam proses seleksi yang pertama adalah melakukan kajian fenotipik, yaitu melakukan koleksi data produksi susu harian dan kualitas susu bulanan pada periode laktasi I, II dan III untuk mendapatkan *phenotypic database*. Kedua, *genotyping* yaitu identifikasi genotipe gen kasein susu dengan teknik Real-Time PCR pada induk sapi perah di stasiun bibit yang menerapkan pola pemeliharaan intensif. Tujuan pengamatan di stasiun bibit adalah untuk meminimalisasi pengaruh lingkungan dan manajemen

pemeliharaan yang dapat mempengaruhi kualitas susu. Ketiga mengasosiasikan genotipe gen kasein susu dengan sifat kualitas susu, utamanya pada protein susu sapi perah. Dari hasil asosiasi ini akan diperoleh hubungan erat informasi sapi-sapi yang memiliki genotipe terpilih yang memiliki sifat protein susu tinggi. Proses di atas akan menghasilkan kesimpulan tentang sapi mana yang memiliki genotipe pengontrol utama protein susu. Seluruh proses di atas dilakukan pada sapi perah jantan dan betina, sehingga akan diperoleh informasi individu sapi perah jantan dan betina yang memiliki genotipe dengan kandungan protein susu tinggi. Sapi perah jantan dan betina terpilih selanjutnya dikembangkan dengan cara dikawinkan untuk menghasilkan keturunan sapi perah unggul yang memiliki kemampuan dalam menghasilkan susu sapi dengan kandungan protein tinggi.

KESIMPULAN

Kandungan protein susu sapi dikontrol oleh gen-gen pengontrol protein susu sapi yaitu CSN1S1, CSN2, CSN1S2, dan CSN3. Dalam proses, untuk menghasilkan ternak sapi perah dengan keunggulan memiliki kandungan protein susu tinggi, dapat dilakukan dengan pendekatan seleksi berdasarkan gen-gen pengontrol protein susu. Ada beberapa tahapan teknis dalam proses seleksi meliputi identifikasi keragaman genetik gen kasein, koleksi data fenotipe termasuk kualitas susu, mencari asosiasi antara genotipe gen kasein susu dengan kualitas susu. Kemudian dilanjutkan dengan seleksi pembentukan sapi perah pada genotipe dengan kandungan protein susu tinggi yang dilakukan pada sapi betina, maupun sapi jantan.

DAFTAR PUSTAKA

- Anggraeni A, Nury HS, Andreas E, Sumantri C. 2017. Genetic variants of κ -Casein and β -Lactoglobulin genes and their association with protein and milk components of Holstein Friesian cows at small farmers in Lembang, West Java. In: 2nd International Conference on Sustainable Agriculture and Food Security: A Comprehensive Approach, KnE Life Sciences. p. 86-94. doi: 10.18502/cls.v2i6.1023.
- Anggraeni A. 2012. Perbaikan genetik sifat produksi susu dan kualitas susu sapi Friesian Holstein melalui seleksi. Wartazoa. 22:1-11.
- Adlerova L, Bartoskova, Fadyana M. 2008. Lactoferrin: A review. Vet Med. 53:457-468.
- Azevedo ALS, Nascimento CS, Steinberg RS, Carvalho MRS, Peixoto MGCD, Teodoro RL, Verneque RS, Guimarães SEF, Machado MA. 2008. Genetic polymorphism of the kappa-casein gene in Brazilian cattle. Gen Mol Res. 7:623-630.

- Beata S, Wojciech N, Ewa W. 2008. Relations between kappa-casein polymorphism (CSN3) and milk performance traits in heifer cows. *J Cent Eur Agric*. 9:641-644.
- Botaro BG, Lima YVR, Cortinhas CS. 2009. Effect of the kappa-casein gene polymorphism, breed and seasonality on physicochemical characteristics, composition and stability of bovine milk. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 38:2447-2454.
- Bovenhuis H, Van Arendonk JAM, Korver S. 1992. Associations between milk protein polymorphisms and milk production traits. *J Dairy Sci*. 75:2549-2559.
- Caroli M, Chessa S, Erhardt GJ. 2009. Milk protein polymorphisms in cattle: Effect on animal breeding and human nutrition. *J Dairy Sci*. 92:5335-5352.
- Deb R, Singh U, Kumar S, Singh R, Sengar G, Sharma A. 2014. Genetic polymorphism and association of kappa-casein gene with milk production traits among Frieswal (HF × Sahiwal) cross breed of Indian origin. *Iranian J Vet Res*. 15:406-408.
- Drögemüller C, Bader A, Kuiper H, Leeb T, Williams JL, Dist O. 2001. Assignment of the bovine runt-related transcription factor 1 gene (RUNX1) to bovine chromosome 23q21 by fluorescence in situ hybridization and radiation hybrid mapping. *Cytogenet Cell Genet*. 94:248-249.
- Edwards PB, Creamer LK, Jameson GB. 2009. Milk proteins: From expression to food. In: Thompson, A, Boland M., Singh H, editors. London (UK): Elsevier Inc.
- Eggen A, Fries R. 1995. An integrated cytogenetic and meiotic map of the bovine genome. *Anim Genet*. 26:215-236.
- Eigel WN, Butler JE, Ernstrom CA, Farrell Jr HM, Harwalkar VR, Jenness R, Whitney RM. 1984. Nomenclature of proteins of cow's milk: Fifth revision. *J Dairy Sci*. 67:1599-1631.
- Eskin NAM, Handerson HM, Townsend RJ. 1990. *Biochemistry of foods*. New York (USA): Academic Press, Inc.
- Farrell HM Jr, Jimenez-Flores R, Bleck GT, Brown EM, Butler JE, Creamer LK, Hicks CL, Hollar CMKF, Ng-Kwai-Hang, Swaisgood HE. 2004. Nomenclature of the proteins of cows' milk-Sixth revision. *J Dairy Sci*. 87:1641-1674.
- Ferretti L, Leone P, Sgaramella V. 1990. Long range restriction analysis of the bovine casein genes. *Nucl Acids Res*. 18:6829-6833.
- Galila ASE, Darwish SF. 2008. A PCR-RFLP assay to detect genetic variants of kappa-casein in cattle and buffalo. *Arab J Biotech*. 11:11-18.
- Guetouache M, Bettache G, Samir M. 2014. Composition and nutritional value of raw milk. *Issues Biol Sci Pharm Res*. 2:115-122.
- Hasinah H, Tiesnamurti M. 2008. Identifikasi gen K-kasein Untuk seleksi pada sapi perah. Dalam: *Prosiding Semiloka Nasional Prospek Industri Sapi Perah Menuju Perdagangan Bebas – 2020*. hlm. 130-134.
- Hristov P, Radoslavov. G 2015. A review of methods for genotyping milk proteins in cattle. *J Adv Dairy Res*. 3:144.
- Hu ZL, Park CA, Reecy JM. 2019. Building a livestock genetic and genomic information knowledgebase through integrative developments of Animal QTLdb and CorrDB. *Nucleic Acids Res*. 47:D701-D710.
- Huang W, Penagaricano F, Ahmad KR, Lucey JA, Weigel KA, Khatib H. 2012. Association between milk protein gene variants and protein composition traits in dairy cattle. *J Dairy Sci*. 95:440-449.
- [IGEM] International Genetically Engineered Machine. 2014. The International Genetically Engineered Machine competition. [Internet]. [cited 1 September 2018]. Available from: http://2014.igem.org/Team:SF_Bay_Area_DIYbio/Parts.
- Madureira AR, Pereira CI, Gomes AMP, Pintado ME, Malcata FX. 2007. Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties. *Food Res Int*. 40:1197-1211.
- Molina LH, Kramm J, Brito C, Carrillo B, Pinto M, Ferrando A. 2006. Protein composition of milk from Holstein-Friesian dairy cows and its relationship with the genetic variants A and B of κ -casein and β -lactoglobulin (Part I.). *Int J Dairy Technol*. 59:183-187.
- Ng-Kwai-Hang KF, Otter DE, Lowe E, Boland MJ, Auldiss MJ. 2002. Influence of genetic variant of β -lactoglobulin on milk composition and size of casein micelles. *Milchwissenschaft*. 57:303-306.
- Ng-Kwai-Hang KF, Monardes HG, Hayes JF. 1990. Association between genetic polymorphism of milk proteins and production traits during three lactations. *J Dairy Sci*. 73:3414-3420.
- Nilsen H, Olsen HG, Hayes B, Sehested E, Svendsen M, Nome T, Meuwissen T, Lien S. 2009. Casein haplotypes and their association with milk production traits in Norwegian Red cattle. *Genet Sel Evol*. 41:24.
- Ogorevc J, Kunej T, Razpet A, Dovc P. 2009. Database of cattle candidate genes and genetic markers for milk production and mastitis. *Anim Genet*. 40:832-851. doi: 10.1111/j.1365-2052.2009.01921.x.
- Pihlanto A, Korhonen H. 2003. Bioactive peptides and proteins. *Adv Food Nutr Res*. 47:175-276.
- Příbyl J. 1995. A way of using markers for farm animals selection. *Živočišná Výroba*. 40:375-382.
- Rando A, Gregorio PD, Ramunno L, Mariani P, Fiorello A, Senese C, Marlett D, Masina P. 1998. Characterization of the CSN1A allele of the bovine α S1-casein locus by the insertion of a relic of a long interspersed element. *J Dairy Sci*. 81:1735-1742.

- Rijnkels M, Kooiman PM, deBoer HA, Pieper FR. 1997. Organization of the bovine casein gene locus. *Mammalian Gen.* 8:148-152.
- Roginski H. 2003. *Encyclopedia of dairy sciences*. London (UK): Academic Press.
- Schopen GC, Visker MH, Koks PD, Mullaart E, van Arendonk JA, Bovenhuis H. 2011. Whole-genome association study for milk protein composition in dairy cattle. *J Dairy Sci.* 94:3148-3158.
- Schopen GCB, Koks PD, van Arendonk JAM, Bovenhuis H. 2009. Whole-genome association study for milk protein composition in dairy cattle. *Anim Genet.* 40:524-537.
- Sumantri C, Maheswari RRA, Anggraeni A, Diwyanto K, Farajallah A. 2005. Pengaruh genotype kappa kasein (κ -kasein) terhadap kualitas susu pada sapi perah FH di BPTU Baturraden. Dalam: *Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner*. Bogor (Indonesia): Puslitbangnak. hlm. 358-365.
- Threadgill DW, Womack JE. 1990. Genomic analysis of the major bovine milk proteins genes. *Nucl Acids Res.* 18:6935-6942.
- Vaiman D, Mercier D, Eggen A, Bahri-Darwich I, Grohs C, Cribiu EP, Dolf G, Ousrty A, Guerin G, Leveziel H. 1994. A genetic and physical map of bovine Chromosome 11. *Mamm Genome.* 5:553-556.

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 (*ethical statement*) dan hak publikasi (*copyright transfer*) sebagaimana terlampir atau dapat diunduh di <http://medpub.litbang.pertanian.go.id/index.php/wartazoa/index>.

RUANG LINGKUP

Buletin ilmiah ini memuat tulisan hasil tinjauan, ulasan (*review*), kajian kebijakan dan gagasan serta pemikiran sistematis tentang peternakan dan veteriner. 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 5 (lima) 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 125-250 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** (apabila ada).
 10. **Daftar pustaka:**
 - a. Penulisan menggunakan Program Mendeley
 - b. Minimal 25 acuan, diutamakan menggunakan pustaka 10 tahun terakhir dan minimal 80% pustaka primer. Sitasi hasil penulisan sendiri paling banyak 30% dari total acuan.
 - c. Pustaka dari internet hanya diperbolehkan dari sumber yang dapat dipertanggungjawabkan seperti jurnal, instansi pemerintah atau swasta.
 - d. 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. Komposisi kimia susu kambing, sapi dan kerbau organik

Komposisi kimia (%)	Susu kambing ^a		Susu sapi ^b		Susu kerbau ^c	
	Organik	Konvensional	Organik	Konvensional	Organik	Konvensional
Lemak	3,6	5,4	3,7	3,8	8,5	8,3
Protein	3,5	3,4	3,3	3,4	4,6	4,5
Laktosa	4,9	4,8	4,7	4,7	4,7	4,7
BKTL	7,6	6,7	td	td	10,3	10,2
Total padatan	10,7	10,9	10,1	9,0	td	td

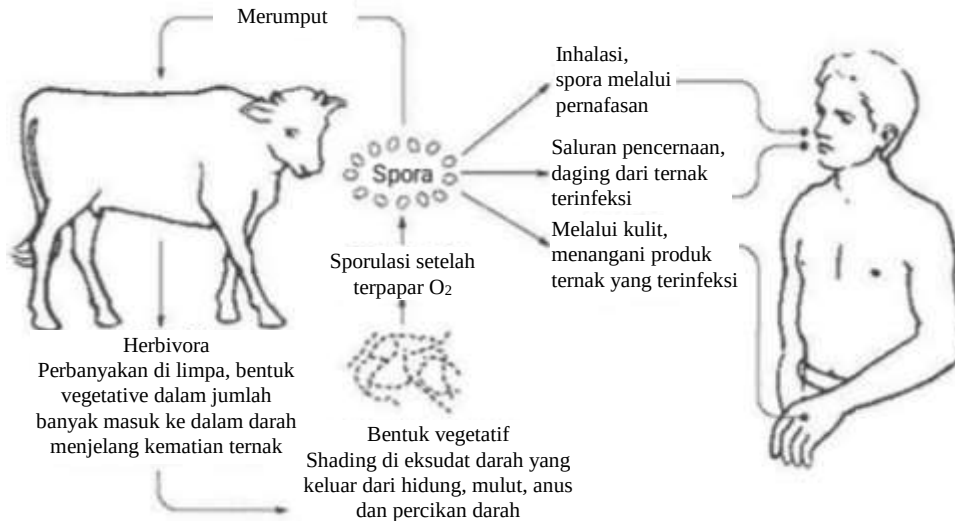
td: Data tidak tersedia; BKLT: Berat kering tanpa lemak

Sumber: ^aTsiplakou et al. (2010); ^bBattaglini et al. (2009); ^cDi Francia et al. (2007)

12. **Gambar/grafik:**

- Judul menggunakan *Times New Roman* dengan jarak 1 spasi dan font 11, berupa kalimat singkat dan jelas diletakkan di bawah gambar/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:



Gambar 1. Penularan penyakit antraks pada ternak dan manusia

Sumber: Qureshi (2012) 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 menggunakan Program Mendeley (<http://www.mendeley.com>) dengan gaya sitasi mengikuti Council of Science Editor (CSE) edisi ke-7 tahun 2006.
- Pustaka harus ditulis nama penulis terlebih dahulu, diikuti tahun, contoh: Martindah (2017) atau (Martindah 2017).
- Bila ada dua nama penulis dalam satu makalah, maka nama penulis harus ditulis semua, contoh: Putra & Indriastuti (2011) atau (Putra & Indriastuti 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: Wina et al. (2017) atau (Wina et al. 2017) dan di dalam daftar pustaka ditulis lengkap 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: (Sumanto 2012; Gunawan & Talib 2016; Wina et al. 2017).
- Pustaka dalam pustaka seperti contoh: Teleni dalam Widiawati (2012) tidak diperkenalkan.
- 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 cantumkan 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:

Widowati W, Sastiono A, Rumampuk RJ. 2008. Efek toksik logam pencegahan dan penanggulangan pencemaran. Yogyakarta (Indonesia): Penerbit Andi.

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.

Wina E. 2012. Saponins: Effect on rumen microbial ecosystem and metabolism in the rumen. In: Patra AK, editor. Dietary phytochemicals and microbes. Dordrecht (Germany): Springer. p. 311-350.

Internet:

WHO. 2017. Emergencies preparedness, response: Anthrax. World Health Organization [Internet]. [cited 12 February 2017]. Available from: <http://www.who.int/csr/disease/Anthrax/anthraxfaq/en/>

Prosiding:

Nuradji H, Adjid RMA, Nirmalasanti N, Khadijah S, Sekarwati HD, Widyasari D. 2017. Evaluasi Tiga Prosedur Penyiapan Sampel Daging untuk Deteksi Penyakit Mulut dan Kuku dengan Uji RT-PCR. Dalam: Puastuti W, Muharsini S, Inounu I, Tiesnamurti B, Kusumaningtyas E, Wina E, Herawati T, Hartati, Hutasoit R, penyunting. Teknologi Peternakan dan Veteriner Mendukung Diversifikasi Sumber Protein Asal Ternak. Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Bogor, 8-9 Agustus 2017. Bogor (Indonesia): Puslitbangnak. hlm. 158-165.

Skripsi/Tesis/Disertasi:

Roza E. 2013. Pengaruh penggunaan daun singkong sebagai pakan suplemen terhadap performans, produksi dan gejala reproduksi ternak kerbau yang dipelihara secara tradisional [Tesis]. [Padang (Indonesia)]: Universitas Andalas.

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>



To:
Editorial Office of WARTAZOA
Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan
Jl. Raya Pajajaran Kav. E-59, Bogor 16128

ETHICAL STATEMENT

Herewith, we submit a manuscript to be published in WARTAZOA:

Name :
Institution :
Title :

We declare that the proposed manuscript is written by ourselves or team work that:

- ☐ Provide original contents without any fabrication, falsification, plagiarism, duplication, fragmentation and violation of copyrights on the data/contents
- ☐ Agree to follow in peer review process based on WARTAZOA's procedures
- ☐ Should not be or under process of publishing elsewhere.

We declare that this ethical statement has been made by ourselves with honesty and high responsibility based on the decree of Head of Indonesian Institute of Science No. 06/E/2013 about Researcher Ethics Code.

....., 2018

Submitted by:

Co-author(s):

Name	Signature



COPYRIGHT TRANSFER

Title :

Author(s) : 1.
2.
3.

Institution : 1.
2.
3.

The manuscript is guaranteed for its originality and author(s) agree to transfer copyright to WARTAZOA when manuscript is accepted for publication by the Editorial Office.

Person(s) listed as author(s) have contributed significantly to its content and intellectual property along with responsibility to public. If in any case, there should be a violation of copyright rules, then it would be author(s) responsibility not obliged to WARTAZOA Editorial Office.

The manuscript has not been published or is not being submitted for publication elsewhere.

....., 2018

Approved by,
(Author or first author)

Co-author(s):

Name	Signature

To:

Editorial Office of WARTAZOA

Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan

Jl. Raya Pajajaran Kav. E-59, Bogor 16128

Telp.:(0251) 8322185; Fax. (0251) 8380588; E-mail: wartazoa@litbang.pertanian.go.id; wartazoa@yahoo.co.id

Website: <http://medpub.litbang.pertanian.go.id/index.php/wartazoa/index>

Registered in:

