

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 3

September 2019



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

WARTAZOA

Buletin Ilmu Peternakan dan Kesehatan Hewan Indonesia

Volume 29 Nomor 3 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 Ahli Utama – Balai Penelitian Ternak – Pakan dan Nutrisi Ternak)

Wakil Ketua:

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

Anggota:

Dr. Ir. Atien Priyanti SP, MSc. (Peneliti Ahli Utama – Puslitbangnak – Ekonomi Pertanian)
Drh. Indrawati Sendow, MSc. (Peneliti Ahli Utama – Balai Besar Penelitian Veteriner – Virologi)
Dr. Ir. Bess Tiesnamurti, MSc. (Peneliti Ahli Utama – Puslitbangnak – Pemuliaan dan Genetika Ternak)
Ir. Mariyono, MSi. (Peneliti Ahli Madya – Loka Penelitian Sapi Potong – Pakan dan Nutrisi Ternak)
Dr. Drh. Eny Martindah, MSc. (Peneliti Ahli Utama – Balai Besar Penelitian Veteriner – Parasitologi dan Epidemiologi)
Dr. Drh. Susan Maphiliandawati Noor, MVSc. (Peneliti Ahli Madya – Balai Besar Penelitian Veteriner – Bakteriologi)
Ir. Juniar Sirait, MSi. (Peneliti Ahli Madya – Loka Penelitian Kambing Potong – Pakan dan Nutrisi Ternak)
Dr. Wisri Puastuti, SPt., MSi. (Peneliti Ahli 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.
Ivoni Christyani Sembiring, SSos.
Pringgo Pandu Kusumo, AMd.
Muhamad Indra Fauzy, AMd.

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

Penyakit zoonosis merupakan penyakit yang sangat menakutkan karena dapat menular pada hewan dan manusia. Salah satunya adalah penyakit Glanders yang disebabkan oleh bakteri *Burkholderia mallei*. Status glanders di Indonesia sampai saat ini masih dinyatakan bebas, namun terdeteksi antibodi positif terhadap *B. mallei* pada kuda. Etiologi dan ekologi glanders pada kuda perlu dipelajari untuk meningkatkan kewaspadaan *emerging* glanders. Penyakit zoonosis lainnya adalah penyakit *West Nile* yang disebabkan oleh virus *West Nile* yang merupakan virus RNA. Data penelitian penyakit *West Nile* di Indonesia masih sangat terbatas sehingga diperlukan penelitian lebih lanjut untuk dapat memprediksi, mencegah dan mengendalikan infeksi virus *West Nile* di Indonesia. Penyakit lain yang umum terjadi pada unggas tapi belum mendapat perhatian adalah penyakit koksidiosis pada sapi. Oleh sebab itu, perlunya diuraikan tentang penyakit koksidiosis yang disebabkan oleh protozoa *Eimeria* spp. pada sapi, ditinjau dari aspek etiologi, faktor predisposisi, metode diagnosis dalam upaya penanggulangan penyakit.

Produktivitas ternak ditentukan oleh reproduksi ternak betina dan pejantannya. Salah satu kualitas sperma yaitu motilitas merupakan parameter yang sangat penting karena menentukan keberhasilan kebuntingan ternak betina. Penilaian motilitas spermatozoa dapat dilakukan dengan manual (subyektif) atau dengan Computer-assisted *sperm analysis* (CASA). Ada beberapa faktor yang perlu diketahui karena mempengaruhi penilaian motilitas sperma bila menggunakan CASA. Ketersediaan dan kualitas lahan untuk hijauan pakan ternak di Indonesia menentukan produktivitas ternak. Ketersediaan lahan bekas tambang batubara cukup menjanjikan tetapi perlu dievaluasi apakah layak untuk menghasilkan hijauan yang aman dengan kualitas yang baik bagi ternak.

Demikianlah informasi singkat mengenai isi Wartazoa no 3 dan semoga informasi ini bermanfaat untuk kewaspadaan kita semua terhadap penyakit-penyakit hewan terutama yang zoonosis dan juga bermanfaat untuk pengembangan ternak sapi di Indonesia.

Bogor, September 2019

Ketua Dewan Penyunting

WARTAZOA

Buletin Ilmu Peternakan dan Kesehatan Hewan Indonesia

Volume 29 Nomor 3 (September 2019)

ISSN 0216-6461

e-ISSN 2354-6832

DAFTAR ISI	Halaman
Kewaspadaan terhadap Munculnya Penyakit Glanders pada Kuda di Indonesia (Awareness of Emerging Glanders in Horses in Indonesia) Susan M Noor dan T Ariyanti	109-118
Karakteristik Biologis Virus West Nile dan Keterkaitannya dengan Perkembangan Obat Antiviral dan Vaksin (Biological Characteristics of West Nile Virus and Its Correlation with the Development of Antiviral Drugs and Vaccines) Diana Nurjanah dan NLPI Dharmayanti	119-132
Penyakit Koksiidosis pada Sapi di Indonesia dan Perkembangan Teknik Diagnosisnya (Coccidiosis Disease in Cattle in Indonesia and Development of Diagnostic Techniques) Fitrine Ekawasti dan AH Wardhana	133-144
Faktor-faktor yang Mempengaruhi Analisis Motilitas Spermatozoa dengan Menggunakan CASA (Factors Affecting Spermatozoa Motility Analysis Using CASA) Dian Ratnawati, N Isnaini, T Susilawati	145-152
Pengembangan Tanaman Pakan Ternak di Lahan Bekas Tambang Batubara dalam Mendukung Usaha Peternakan (Forage Development on Ex-Coal Mining Land to Support of Livestock Business) Harmini	153-160

Kewaspadaan terhadap Munculnya Penyakit Glanders pada Kuda di Indonesia

(Awareness of Emerging Glanders in Horses in Indonesia)

Susan M Noor dan T Ariyanti

Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl. RE Martadinata No. 30, Bogor 16114
Kontributor utama: susan_yurismono@yahoo.com

(Diterima 22 Juli 2019 – Direvisi 5 September 2019 – Disetujui 6 September 2019)

ABSTRACT

Glanders is a zoonotic disease that is highly contagious in animals and humans, caused by the *Burkholderia mallei*. The clinical manifestations of glanders in horses are in the form of skin, nose and lungs. Horses play a role in transmitting glanders to healthy animal populations around them due to latent infections. Infection of glanders in humans is acute causing respiratory failure and could be fatal without proper treatment. Recently re-emerging glanders is reported in several countries that have eradicated diseases such as in India, Germany and China. The status of glanders in Indonesia is declared free, but surveillance showed positive antibodies to *B. mallei* in horses, as had been reported in 1939 and in 2018 in Jakarta. Glanders has a negative impact on a country's economy resulting in restrictions on international trade. Prevention of emerging glanders to Indonesia needs to be alerted because there is no effective treatment, no vaccines available and the economic impacts. This paper aims to discuss glanders in horses, countermeasures through monitoring and surveillance, early detection in order to increase awareness of emerging glanders in Indonesia.

Key words: Glanders, *Burkholderia mallei*, horses, emerging, Indonesia

ABSTRAK

Glanders adalah zoonosis yang sangat menular pada hewan dan manusia, disebabkan oleh bakteri *Burkholderia mallei*. Manifestasi klinis glanders pada kuda ada dalam bentuk kulit, hidung dan paru-paru. Kuda berperan menularkan glanders pada populasi hewan sehat disekitarnya karena infeksi laten. Glanders pada manusia bersifat akut menyebabkan kegagalan pernapasan dan berakibat fatal tanpa pengobatan yang tepat. *Re-emerging* glanders (muncul kembali penyakit) banyak dilaporkan di beberapa negara yang sudah melakukan eradikasi penyakit seperti India, Jerman dan Cina. Status glanders di Indonesia sampai saat ini masih dinyatakan bebas, namun antibodi positif terhadap *B. mallei* pada kuda pernah dilaporkan pada tahun 1939 dan 2018 di Jakarta dari hasil surveilans penyakit. Glanders berdampak negatif pada perekonomian suatu negara yang berakibat pada pembatasan perdagangan internasional. Pencegahan masuknya glanders ke Indonesia perlu diwaspadai mengingat tidak ada pengobatan yang efektif dan belum tersedia vaksin untuk pencegahan serta dampak ekonomi yang ditimbulkan. Tulisan ini bertujuan untuk membahas glanders pada kuda, strategi penanggulangan melalui monitoring dan surveilans penyakit, perangkat deteksi dini termasuk biosekuriti untuk meningkatkan kewaspadaan terhadap munculnya penyakit glanders di Indonesia.

Kata kunci: Glanders, *Burkholderia mallei*, kuda, *emerging*, Indonesia

PENDAHULUAN

Glanders atau di Indonesia dikenal sebagai penyakit ingus jahat pada kuda bersifat zoonosis yang sangat menular yang disebabkan oleh bakteri *Burkholderia mallei* (Malik et al. 2010; Burtnick et al. 2012; Khan et al. 2013a; OIE 2019). Glanders merupakan salah satu penyakit tertua di dunia seperti dijelaskan oleh Aristoteles pada abad ke-3 dan dikenal sebagai malleus (Marr & Malloy 1996). Bakteri *B. mallei* pertama kali diisolasi oleh Loeffler dan Schutz di Jerman pada tahun 1882 (Colahan et al. 1999).

Manifestasi klinis glanders pada kuda ditandai dengan kombinasi lesi pada kulit, hidung dan paru-paru

(Radostits et al. 2007). Jika lesi terbentuk pada nostril, glandula submaksiliaris dan paru-paru maka disebut penyakit glanders, namun jika lesi terbentuk pada permukaan anggota badan atau kulit maka disebut farcy (Timoney 2013). Gejala umum glanders pada hewan adalah demam, malaise, depresi, batuk, anoreksia, dan penurunan berat badan. Kuda positif glanders harus dimusnahkan untuk mencegah penyebaran penyakit sehingga sangat sulit untuk mengetahui angka morbiditas dan mortalitas penyakit ini, tetapi diduga mencapai tingkat fatalitas kasus 95% atau lebih pada kondisi septikemia dan 90-95% dalam bentuk paru-paru. Glanders bentuk akut menyebabkan kematian dalam beberapa hari hingga 1-4 minggu, sedangkan

bentuk kronis biasanya dapat bertahan hingga bertahun-tahun.

Glanders endemik di Afrika, Asia, Mongolia, Timur Tengah, Amerika Tengah dan Selatan. Sebagian besar negara maju telah melakukan eradikasi glanders, namun dilaporkan penyakit ini muncul kembali (*re-emerging*) dan menjadi wabah baru, seperti di Bahrain, Jerman dan Cina (Elschner et al. 2016; Scholz et al. 2014). Hewan karier dan infeksi laten glanders tidak menunjukkan gejala klinis spesifik namun memainkan peran penting dalam penyebaran infeksi.

Status penyakit glanders pada kuda di Indonesia masih dinyatakan bebas, namun dalam era globalisasi sekarang ini memungkinkan penyakit ini muncul di Indonesia melalui berbagai sarana dan prasarana yang dapat berdampak pada pembatasan perdagangan internasional. Seropositif antibodi terhadap glanders pada kuda di Indonesia pernah dilaporkan oleh Veterinary Institute Buitenzorg, Java pada tahun 1939 (Blieck 1911). Pada tahun 2018 terdeteksi seropositif glanders pada kuda di Jakarta berdasarkan hasil surveilan penyakit dalam pembentukan kompartemen bebas penyakit kuda (*Equine Disease Free Zone /EDFZ*) dalam rangka penyelenggaraan kompetisi berkuda pada Asean Games ke-18 di Jakarta (Dirkeswan 2018). Tulisan ini bertujuan untuk mengulas penyakit glanders pada kuda dan strategi pencegahan dan pengendalian penyakit termasuk tindakan biosekuriti untuk mewaspadaai munculnya glanders di Indonesia.

GLANDERS PADA KUDA

Glanders merupakan penyakit hewan lintas batas dan berdampak ekonomi pada perdagangan hewan internasional dan produk sampingnya. Glanders mudah menyebar secara luas ketika sejumlah besar hewan berada dalam populasi yang berdekatan. Faktor predisposisi seperti kekurangan gizi atau kondisi buruk mempermudah terjangkitnya penyakit.

Etiologi

Glanders disebabkan oleh infeksi bakteri *Burkholderia mallei* yang termasuk ordo *Burkholderiales*, Famili *Burkholderiaceae*, Genus *Burkholderia*. Bakteri ini bersifat intraseluler, berbentuk batang (*bacillus*), Gram negatif, tidak motil,

tidak berkapsul dan tidak membentuk spora dengan panjang bakteri 1–5 µm dan lebar 0,3–1 (Sprague & Neubauer 2004).

Spesies *Burkholderia mallei* terkait erat dengan *B. pseudomallei* penyebab melioidosis, tetapi secara fenotipik dan genetik ke dua spesies tersebut banyak perbedaan (Galyov et al. 2010). *Burkholderia mallei* awalnya dikenal sebagai *Pseudomonas mallei*, *Malleomyces mallei*, *Actinomyces mallei*. Genus *Burkholderia* diusulkan pada tahun 1992 berdasarkan urutan 16S *ribosomal ribonucleic acid* (rRNA), homologi DNA, komposisi seluler lipid dan asam lemak serta karakteristik fenotipik (Yabuuchi et al. 1992).

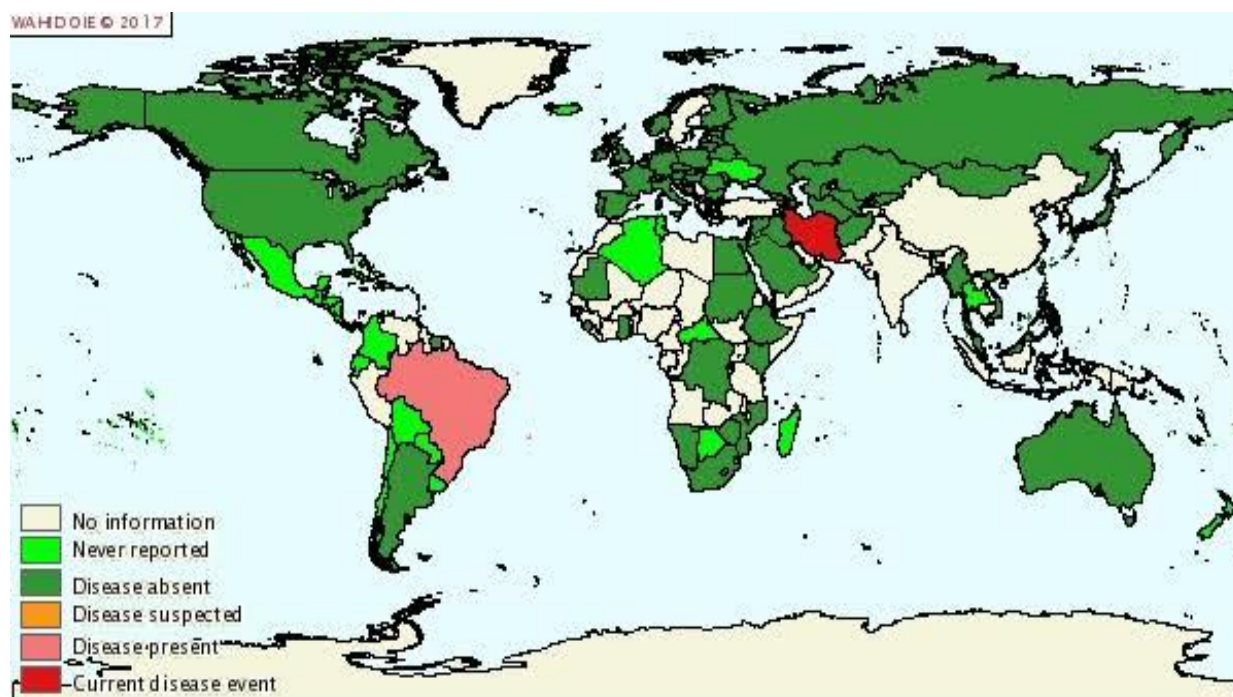
The Centers for Disease Control (CDC) mengkategorikan *B. mallei* sebagai salah satu *selected agent* kategori B (Rotz et al. 2002; Gilad et al. 2007; Khan et al. 2013b), yaitu agen yang cukup mudah disebarkan, menghasilkan tingkat morbiditas dan mortalitas yang lebih rendah dari kategori A, dan membutuhkan kapasitas diagnostik spesifik dan peningkatan pengawasan penyakit.

Bakteri *B. mallei* pernah dipakai sebagai agen senjata biologi oleh Jerman dan Jepang pada perang dunia 1 dan 2 (Darling & Woods 2004), karena sangat infeksius dan fatal serta mudah menginfeksi melalui rute inhalasi/ aerosol. (Gilad et al. 2007; Ricketti et al. 2011; Anderson & Bokor 2012; Burtneck et al. 2012).

Epidemiologi

Kuda sangat rentan terhadap infeksi *B. mallei* dan merupakan reservoir alami (Neubauer et al. 2005). Selain kuda, glanders juga dapat menginfeksi bagal, keledai dan hewan lain termasuk keluarga kucing dan singa, anjing, beruang, serigala, hyena, unta, domba dan kambing, sedangkan babi, sapi dan burung tahan terhadap infeksi (CFSPH 2015; Verma et al. 2014).

Secara geografis distribusi glanders sulit untuk ditentukan secara tepat karena *B. mallei* secara serologis dapat bereaksi silang dengan *B. pseudomallei* penyebab melioidosis. Glanders pada awalnya menyebar di seluruh dunia, tetapi sekarang telah diberantas dari sebagian besar daerah seperti Eropa Barat, Australia dan Amerika Utara (Wittig et al. 2006; Slater 2013; Van Zandt et al. 2013). Status glanders di dunia berdasarkan OIE (2019) seperti terlihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Status glanders di dunia (OIE 2019)

Glanders masih menjadi ancaman bagi industri secara global karena penyakit ini endemis di Timur Tengah, Asia, Afrika, dan beberapa negara di Amerika Selatan (Khan et al. 2013a; OIE 2019). Beberapa negara yang bebas glanders adalah Eropa Barat, Kanada, Australia, Amerika Utara dan Jepang. Glander tetap dilaporkan secara sporadis di sejumlah negara Asia, Afrika, Timur Tengah, dan Amerika Selatan (OIE 2019). Wabah glander telah dilaporkan di Turki, Uni Emirat Arab, Irak, Iran, Pakistan, Cina, Brasil, Bahrain dan India (Al-Ani et al. 1998; Arun et al. 1999; Bazargani et al. 1996; Elschner et al. 2009; Malik et al. 2010). Terjangkitnya kembali glanders pada kuda dilaporkan di India tahun 2006 (Malik et al. 2010; Malik et al. 2012), Jerman pada tahun 2014 dan di Cina pada tahun 2018.

Penularan penyakit

Glanders pada hewan disebarkan melalui kontak langsung atau tidak langsung terutama dengan kuda, keledai atau bagal yang terinfeksi dalam bentuk akut atau kronis. Rute paparan bakteri yang paling umum adalah melalui pakan yang terkontaminasi atau air yang mengandung sekresi dari pernapasan. Karnivora dilaporkan merupakan hewan yang paling sering terinfeksi akibat mengkonsumsi daging yang terkontaminasi bakteri *B. mallei* (Timoney 2015; Verma et al. 2014; CSFPH 2015).

Burkholderia mallei menyebar melalui kulit yang luka, selaput lendir, inhalasi aerosol atau kontak

melalui fomite (tali kekang kuda atau alat perawatan) yang terkontaminasi. Hewan terinfeksi akan shedding bakteri ke dalam tinja, urin, air liur dan air mata. Pada kuda shedding bakteri terjadi secara sporadis atau terus-menerus. Faktor predisposisi penyebaran glanders pada hewan dipengaruhi oleh kepadatan hewan dalam kandang, kedekatan dengan hewan terinfeksi dan stress yang tinggi terhadap kondisi lingkungan (OIE 2013; Timoney 2013). Vektor biologis lalat (*Musca domestica*) dapat membawa *B. mallei* dari hewan sakit ke hewan sehat (Lopez et al. 2003).

Infeksi glanders pada manusia terjadi melalui kontak langsung dengan hewan yang sakit, fomite, jaringan atau kultur bakteri. Bakteri akan masuk ke dalam tubuh melalui luka atau lecet pada kulit, konsumsi atau inhalasi. Sebagian besar infeksi glanders pada manusia didapat di laboratorium terjadi selama penanganan dan pemrosesan kultur *B. mallei* atau sampel hewan terinfeksi (CDC 2000; Gilad et al. 2007; CSFPH 2015).

Gejala klinis

Masa inkubasi glanders berkisar dari beberapa hari hingga 6 minggu, dan menurut OIE inkubasi penyakit selama 6 bulan (OIE 2016). Gejala klinis glanders akut pada kuda terlihat dalam tiga bentuk yaitu nasal, paru-paru dan kulit yang dapat muncul secara individual atau kombinasi. (Radostits et al. 2007; Malik et al. 2012). Kuda bisa terinfeksi secara laten dan sebagai carrier penyakit (Khan et al. 2013b).

Manifestasi klinis glanders bentuk nasal ditandai dengan demam tinggi dan kehilangan nafsu makan, batuk, keluar lendir hijau kekuningan dan lengket, leleran mata. Terlihat bisul dan nodul di saluran hidung serta terjadi ulkus berkeropeng (Khan et al. 2013a). Glanders bentuk paru-paru adalah yang paling umum, membutuhkan waktu lebih lama untuk berkembang daripada bentuk nasal, namun masih bersifat akut. Manifestasi klinis kulit merupakan bentuk kronis glanders dimana infeksi dimulai dengan tanda-tanda ringan hingga tidak terlihat yang mengarah ke kondisi lemah dengan gejala klinis yang dominan adalah batuk, demam, terlihat nodul pada kulit yang pecah dan menjadi borok, pembengkakan kelenjar getah bening dan sendi (Malik et al. 2012).

Teknik diagnosis

Glanders pada hewan dapat didiagnosis dengan deteksi antigen (biakan kuman/kultur dan deteksi molekuler/PCR) dan respon kekebalan dengan (uji serologis dan uji mallein) (OIE 2018). Glanders pada hewan dapat didiagnosis dengan deteksi antigen (biakan kuman/ kultur dan deteksi molekuler/PCR) dan respon kekebalan dengan (uji serologis dan mallein) (OIE 2018). Pemilihan teknik diagnosis glanders dilakukan tergantung pada maksud dan tujuan, apakah untuk surveilan, konfirmasi penyakit atau program eradikasi. Ringkasan teknik diagnosis glanders pada hewan untuk berbagai tujuan deteksi seperti tercantum pada Tabel 1.

Isolasi bakteri berbasis kultur merupakan prosedur standar baku emas (*gold standard*) untuk diagnosis genus *Burkholderia* (Blue et al. 1998). namun untuk mengisolasi bakteri ini sangat sulit bahkan pada sampel segar yang dikoleksi secara steril (Wernery 2009). Isolat *B. mallei* dapat diisolasi dari lesi pada kulit, sampel darah, eksudat saluran hidung dan saluran

pernapasan bagian atas. Bakteri *B. mallei* sangat lambat pertumbuhannya dan berpotensi mudah terkontaminasi bakteri lain sehingga diperlukan media yang spesifik dengan penambahan enrichment media, seperti gliserol.

Ukuran koloni *B. mallei* pada media agar darah atau agar serum Loeffler sekitar diameter 1 mm, berwarna putih, semi-translusen, kental dan akan berubah menjadi kuning pada koloni. Kultur bakteri pada media gliserin-kentang akan terlihat lapisan seperti madu pada hari ketiga dan kemudian berubah menjadi coklat kemerahan atau coklat (Naureen 2006).

Teknik deteksi molekuler glanders dengan uji *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dapat mengurangi risiko paparan bakteri pada manusia dan lingkungan. Melalui uji PCR (*restriction fragment length polymorphism, pulse-field gel electrophoresis, 16S rRNA sequencing*) dapat dibedakan species *B. mallei* dengan *B. pseudomallei* (Lowe et al. 2014; Obersteller et al. 2016). Metode deteksi glanders lain yang telah banyak digunakan adalah lateks aglutinasi, imunofluoresensi (OIE 2018).

Deteksi antibodi glanders pada kuda dapat dilakukan dengan uji serologis *Complement Fixation Test* (CFT) dan *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Uji CFT dan ELISA dapat digunakan untuk deteksi glanders hewan lain, termasuk unta dan kucing tetapi CFT tidak dapat dipakai untuk deteksi glanders pada keledai. Uji CFT merupakan metode yang direkomendasikan oleh OIE 2019 untuk skrining glanders pada kuda dalam perdagangan internasional. Uji CFT memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang bervariasi tergantung dari pada antigen dan metodologi yang dipakai (Elschner et al. 2011; Khan et al. 2012). Permasalahan yang ditemui pada uji serologis CFT dan ELISA dalam mendiagnosis glanders adalah positif palsu dan negatif palsu, selain itu, juga tidak mampu membedakan antara antibodi *B. mallei* dan *B. pseudomallei* (Elschner et al. 2011).

Tabel 1. Teknik diagnosis glanders pada hewan

Metode deteksi	Tujuan deteksi				
	Populasi bebas infeksi	Individu bebas infeksi	Program eradikasi	Konfirmasi kasus klinis	Prevalensi-surveilans
Identifikasi antigen					
PCR	-	-	-	+	-
Kultur bakteri	-	-	-	+	-
Deteksi respon kekebalan					
CFT	++	++	+++	+	+++
ELISA	+	+	++	+	++
Mallein Test	+	+	+	+	+
Western blotting	+	+	++	+	++

Keterangan: +++ (metode yang direkomendasikan), ++ (metode yang cocok)

Sumber: (OIE 2018)

Uji *westernblot* lebih spesifik dibandingkan CFT (Elschner et al. 2011; Khan et al. 2012) dan lebih efisien dalam pendeteksian serologis glanders (Katz et al. 1999). Uji ini sangat menjanjikan untuk deteksi glanders dan dapat dikombinasikan dengan uji lainnya. Penggunaan uji *westernblot* dilakukan untuk konfirmasi CFT karena (1) CFT tidak dapat diandalkan untuk uji serum hewan dengan aktivitas anti-komplemen atau bereaksi sendiri dengan antigen normal (Hagebock et al. 1993); (2) CFT tidak dapat mendeteksi antibodi selambat-lambatnya 40 hari sejak timbulnya penyakit/negatif palsu (Gilad et al. 2007) dan (3) CFT bereaksi silang dengan serum yang terinfeksi strangles di daerah endemis yang berakibat positif palsu (Sprague et al. 2009).

Pencegahan dan kontrol penyakit

Glanders telah berhasil dieliminasi dari sebagian besar negara melalui pemusnahan hewan positif uji mallein yang ketat. Peran karantina dalam pengujian kuda sebelum dilalulintaskan merupakan komponen yang sangat penting untuk pengendalian penyakit. Glanders merupakan salah satu penyakit yang harus dilaporkan oleh OIE (2019). Tidak ada vaksin untuk pencegahan glanders pada hewan. Penelitian pengembangan vaksin glanders saat ini difokuskan pada manusia untukantisipasi penggunaan *B. mallei* sebagai instrumen bioterorisme.

Desinfektan yang sesuai sangat diperlukan untuk melakukan dekontaminasi area terpapar glanders karena *B. mallei* dapat bertahan/ resisten pada lingkungan yang lembab dan basah selama 3-5 minggu, dalam air bersih hingga 4 minggu dan sekitar 6 minggu dalam kandang yang terkontaminasi (Silva & Dow 2013). Resistensi *B. mallei* terhadap beberapa kondisi lingkungan seperti tercantum pada Tabel 2.

Table 2. Resistensi bakteri *B. mallei* terhadap beberapa kondisi lingkungan

Kondisi	Resistensi
Temperatur	Mati pada pemanasan 55°C (131°F) selama 10 menit atau iradiasi sinar ultraviolet
Desinfektan	Tahan terhadap desinfektan iodin, merkuri klorida dalam alkohol, potasium permanganat, benzalkonium klorida (1/2000), sodium hipoklorit (500 ppm). Alkohol 70%, glutaraldehid 2%
Daya tahan hidup	Tahan pada kondisi kering tetapi sensitif terhadap sinar matahari dan inaktif pada penyinaran langsung kurun waktu 24 jam. Dapat bertahan hidup lebih dari 6 minggu pada area yang terkontaminasi dan 1 bulan pada air keran

Sumber: OIE (2018)

Resistensi *B. mallei* pada lingkungan yang sesuai dikarenakan adanya kapsul polisakarida yang merupakan faktor virulensi bakteri yang memperpanjang daya hidup bakteri. Menurut Ribolzi et al. (2016) ada hubungan yang kuat antara karakteristik tanah, kekeruhan air dan kelangsungan hidup patogen di lingkungan yang dapat meningkatkan risiko paparan/ penularan. Bakteri *B. mallei* telah terbukti dapat bertahan hidup di tanah dan palung air di kandang (Coenye & Vandamme 2003) dan sifat fisikokimia tanah dan vegetasi di sekitarnya dapat mempengaruhi kelangsungan hidup bakteri (Limmathurotsakul et al. 2010).

Pemberantasan glanders pada kuda yang telah dilakukan di beberapa negara menggunakan uji mallein dengan mengamati hasil reaksi hipersensitivitas di sekitar suntikan. Aplikasi uji mallein dapat dilakukan dengan 3 cara yaitu penyuntikan fraksi protein dari *B. mallei* pada kelopak mata (intradermo-palpebral), diberikan dalam tetes mata, atau disuntikkan secara subkutan pada daerah selain mata. Penyuntikan pada intradermo-palpebral dianggap sebagai versi paling andal dan sensitif. Hasil uji mallein dinyatakan positif jika terjadi pembengkakan pada kelopak mata setelah 1-2 hari pasca penyuntikan. Pengujian Mallein dapat menyebabkan positif palsu dan reaksi hipersensitivitas dapat menjadi permanen jika hewan diuji berulang kali dan uji ini dapat memberikan hasil dubius pada kondisi glanders akut, atau pada tahap akhir penyakit kronis (OIE 2019).

Antibiotik mungkin efektif untuk pengobatan glanders pada hewan, namun pada umumnya tidak dianjurkan, karena infeksi dapat menyebar ke manusia dan hewan lain sehingga hewan yang terinfeksi harus di eutanasi. Selain itu pengobatan antibiotika dapat menyebabkan hewan carrier tidak menunjukkan gejala klinis yang simptomatis.

Pencegahan glanders jika terjadi wabah di daerah non-endemis dilakukan pemusnahan hewan positif glanders, area tempat glanders positif dikarantina dan dibersihkan dengan didesinfeksi. Karkas, alas tidur dan makanan yang terkontaminasi harus dimusnahkan secara aman (dibakar atau dikubur) dan semua peralatan harus didesinfeksi. Untuk daerah endemis glanders, hewan yang rentan harus dijauhkan dari area tempat pakan dan minum karena wabah glanders sering terjadi ketika hewan berkumpul. Pengujian glanders secara rutin dan eutanasia pada hewan yang terinfeksi dapat memberantas penyakit atau mengurangi kejadiannya. Daging dari kuda yang terinfeksi tidak boleh diumpankan ke hewan lain atau dikonsumsi manusia.

GLANDERS SEBAGAI ZONOSIS

Penularan glanders langsung dari kuda ke manusia jarang terjadi, dan jika terjadi penularan maka biasanya gejala klinis yang terlihat ringan atau tidak nampak (CFSPH 2015) karena untuk timbulnya infeksi diperlukan dosis infeksius yang tinggi (Van Zandt et al. 2013). Sejumlah besar kasus glanders pada manusia dilaporkan di Rusia selama dan setelah Perang Dunia I. Pada 1793, Kasus glanders pada manusia dilaporkan pertama kali pada tahun 1793 oleh dokter hewan Prancis Dr. Charles Vial de Sainbel, Kepala Sekolah Tinggi London Veterinary College (Hunting 1913; Wilkinson 1981). Infeksi glanders pada manusia mengakibatkan kegagalan fungsi pernafasan, septicemia dan kematian mencapai 95% (CFSPH 2015). Pada manusia, glanders terutama merupakan penyakit terkait dengan pekerjaan seperti dokter hewan, peternak dan pekerja laboratorium yang memiliki kontak dekat dengan hewan yang terinfeksi (Neubauer et al. 1997; CFSPH 2015; Gilad et al. 2007). Infeksi glanders pada manusia secara sistemik dan tingkat kematian kasus di atas 50% dengan pengobatan antibiotik secara tradisional (CDC 2012).

Masa inkubasi glanders akut pada manusia adalah 1 - 14 hari dan sebagian besar kasus glanders pada manusia terlokalisasi. Manifestasi klinis glanders pada manusia dalam empat tipe penyakit: septicemia, infeksi paru-paru, infeksi lokal akut atau infeksi kronis (Van Zandt et al. 2013). Kombinasi sindrom ke empat tipe tersebut dapat terjadi. Glanders tipe septicemia ditandai dengan demam, menggigil, mialgia dan nyeri dada pleuritik yang berkembang secara akut. Gejala lain yang mungkin terlihat adalah eritoderma, kekuningan, fotofobia, lakrimasi, diare dan lesi granulosomata atau nekrotikans. Takikardia, adenopati serviks dan hepatomegali ringan atau splenomegali juga dapat terlihat. Kematian biasanya terjadi dalam 7 hingga 10 hari (Gregory & Waag 2007).

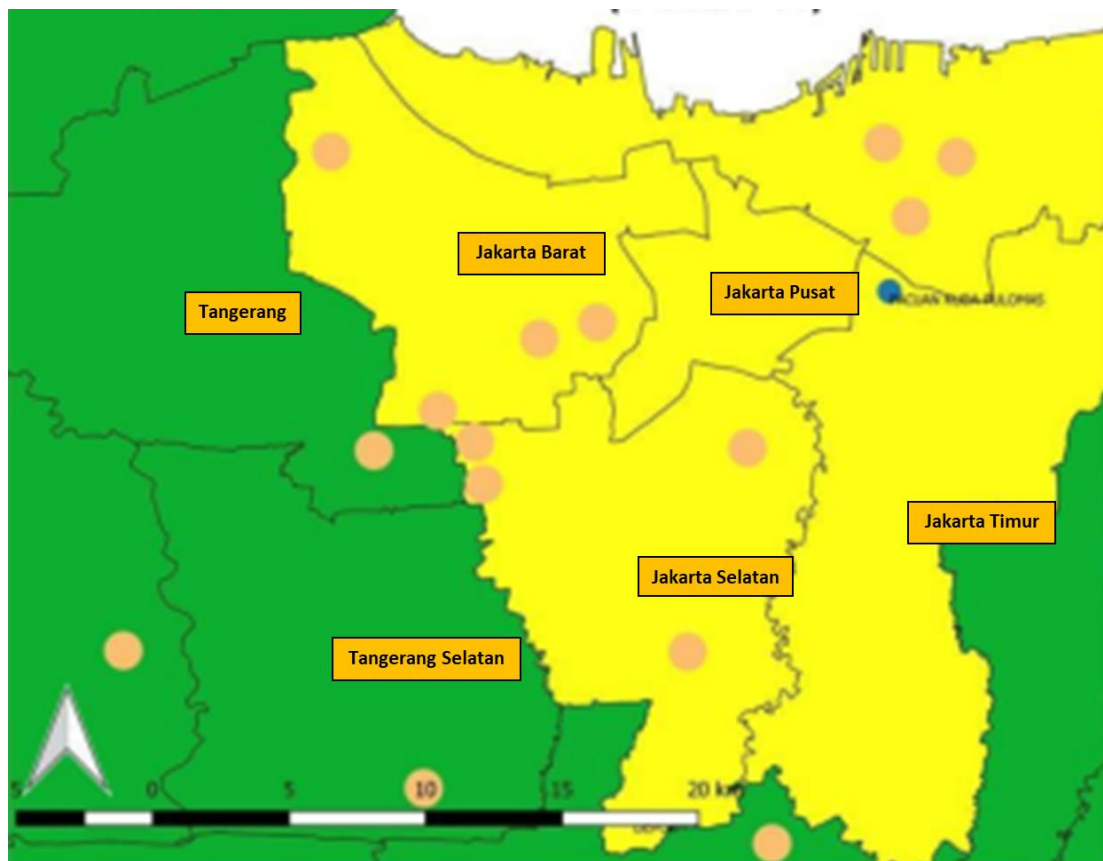
Glanders tipe paru ditandai dengan gejala pneumonia, abses paru dan infus pleura. Batuk, demam, dispnea, dan keluarnya mukopurulen mungkin terlihat. Abses kulit terkadang berkembang setelah beberapa bulan (CFSPH 2015). Infeksi yang terlokalisasi ditandai oleh nodul, abses, dan bisul pada membran mukosa, kulit, pembuluh limfatik dan atau jaringan subkutan. Leleran mukopurulen dan berdarah dapat terlihat pada selaput lendir. Pembengkakan kelenjar getah bening dapat terjadi. Infeksi pada mukosa atau kulit dapat menyebar; gejala infeksi yang menyebar meliputi ruam papular atau pustular, abses pada organ internal (terutama hati dan limpa) dan lesi paru (Wernery et al. 2012). Infeksi diseminata berhubungan dengan syok septik dan mortalitas tinggi. Dalam bentuk kronis, beberapa abses, nodul atau bisul dapat dilihat di kulit, hati, limpa atau otot.

MEWASPADAI EMERGING GLANDERS DI INDONESIA

Kasus wabah Glanders pada kuda telah meningkat terus selama dekade terakhir. Glanders adalah salah satu penyakit zoonosis menular yang harus dilaporkan (notifiable diseases) berdasarkan pedoman OIE (2019). Badan Karantina menggolongkan glanders sebagai hama dan penyakit hewan karantina (HPHK) golongan I yang harus dicegah masuk ke dalam, tersebar di dalam dan keluar dari wilayah negara Indonesia (Kementan 2009).

Situasi glanders di Indonesia saat ini masih dinyatakan bebas. Antisipasi emerging glanders perlu dilakukan karena antibodi terhadap glanders pada kuda pernah dilaporkan pada jaman penjajahan Belanda tahun 1939 berdasarkan laporan dari Veeartsenijkundid Institute Buitzorg, Java oleh Blicke (1911). Pada tahun 2018, positif glanders pada kuda di Jakarta juga terdeteksi dengan uji CFT oleh Balai Besar Penelitian Veteriner ketika dilakukan surveilans dalam rangka pembentukan EDFZ sesuai dengan pedoman OIE (2018). Kuda seropositif glanders tersebut telah dimusnahkan dan dinyatakan negatif berdasarkan hasil pemeriksaan patologis dan bakteriologis. Hasil surveilans glanders pada kuda di sekitar Jakarta, Bogor, Tangerang dan Depok (Jabotabek) telah dilakukan dengan hasil tidak terdeteksi seroprevalensi glanders pada kuda-kuda yang di uji (Gambar 2). Untuk mewaspadaai emerging glanders di Indonesia dana untuk mempertahankan status bebas glanders, pemerintah perlu melakukan surveilans penyakit yang berkelanjutan dan menerapkan strategi pencegahan dan kontrol penyakit melalui deteksi dini penyakit, tindakan karantina yang ketat, pengujian dan pemusnahan hewan suspek dan disinfeksi tempat yang terinfeksi.

Deteksi dini glanders pada kuda perlu dilakukan dengan menggunakan metode deteksi yang akurat dan handal karena diagnosis klinis dan bakteriologis sulit dilakukan pada tahap awal penyakit, hewan carrier dan infeksi laten. Hampir 90% infeksi glanders pada kuda dalam bentuk nonklinis atau laten. Uji CFT dipakai secara luas untuk diagnosis glanders dan direkomendasikan oleh OIE untuk perdagangan internasional, namun memiliki keterbatasan positif palsu dan negatif palsu (Neubauer et al. 2005; Kettle & Wernery 2016). Positif palsu menjadi masalah bagi pemilik kuda dan otoritas veteriner, sedangkan negatif palsu dapat memungkinkan *re-emerging B. mallei* ke dalam daerah bebas glanders. Hasil positif palsu menyebabkan kerugian finansial bagi pemilik hewan, dan hasil negatif palsu dapat mengubah risiko menjadi kemungkinan ancaman karena pergerakan hewan pembawa (*carrier*) tanpa gejala klinis yang spesifik akan menyadai sumber penyebaran penyakit jika tidak dilakukan skrining yang tepat (Khan et al. 2013b).



Gambar 2. Surveilans glanders pada kuda di Jabodetabek dengan hasil negatif (Dirkeswan 2018)

Peraturan sanitasi Internasional untuk memusnahkan hewan positif glanders harus dilakukan untuk menghentikan penyebaran *B. mallei* dan untuk menghindari perpindahan penyakit dari hewan ke manusia (Sprague & Neubauer 2004). Penerapan karantina yang ketat termasuk pengujian serologis terhadap hewan sebelum transportasi dapat mengurangi risiko impor dari daerah tertular glanders ke daerah bebas. Untuk impor kuda dari negara terinfeksi glanders dan daerah bebas glanders harus mengikuti persyaratan dari OIE (OIE 2019). Selain itu masyarakat dan pemilik ternak harus diberikan edukasi tentang sifat penyakit menular, pembatasan perawatan, langkah-langkah sanitasi yang perlu diadopsi dan melaporkan jika terlihat gejala suspek glanders pada kuda. Pendekatan *one health* untuk melawan *emerging* dan *re-emerging zoonosis* penyakit menular dan ancaman zoonosis perlu diterapkan dari semua aspek untuk memerangi glanders (Kahn et al. 2007; Dhama et al. 2013).

KESIMPULAN

Glanders pada hewan dapat muncul kembali walaupun telah dilakukan eradikasi. Kesenjangan

pemahaman epidemiologi glanders, infeksi laten/ karier dan kelemahan uji diagnostik menjadi faktor risiko utama penyebaran agen infeksi dalam konteks pergerakan kuda internasional. Mewaspadaai masuknya glanders ke Indonesia perlu strategi penanggulangan melalui monitoring dan surveilans penyakit, didukung dengan perangkat deteksi dini, karantina yang ketat dan penerapan biosekuriti terhadap kuda-kuda yang masuk ke Indonesia serta edukasi terhadap masyarakat dan pemilik ternak.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Ani FK, Al-Rawashdeh OF, Ali AH, Hassan FK. 1998. Glanders in horses: Clinical, biochemical and serological studies in Iraq. *Vet Arch.* 68:155-162.
- Anderson PD, Bokor G. 2012. Bioterrorism: Pathogens as weapons. *J Pharm Practice.* 25:521-529.
- Arun S, Neubauer H, Gürel A, Ayyildiz G, Kuşçu B, Yesildere T, Meyer H, Hermanns W. 1999. Equine glanders in Turkey. *Vet Rec.* 144:255-258.
- Bazargani TT, Tadjbakhs H, Badii A, Zahraei T. 1996. The outbreak of glanders in some racehorses in three states of Iran. *J Equine Vet Sci.* 16:232-236.

- Blieck De L. 1911. Kwadedroes-infectie in verband met de conjunctivale malleinatie en agglutinate. Java: Veeartsenijkundige Mededeeling Van Het Department Van Landboue, Veterinary Institute Buitenzorg. 3:1-20.
- Blue SR, Pombo DJ, Woods ML. 1998. Glanders and melioidosis. In: Palmer SR, Soulsby L, DIH Simpson, editors. Zoonoses: Biology, clinical practice and public health control. 2nd ed. Oxford (UK): Oxford University Press. p. 105-113.
- Burntack MN, Heiss RA, Roberts HP. Schweizer P, Azadi, Brett PJ. 2012. Development of capsular polysaccharide-based glycoconjugates for immunization against melioidosis and glanders. *Front Cell Infect Microbiol.* 2:108. doi: 10.3389/fcimb.2012.00108.
- [CDC] Centers for Disease Control and Prevention. 2000. Laboratory-acquired human glanders—Maryland, Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR). 49:532–535.
- [CDC] Centers for Disease Control and Prevention. 2012. Information for health care workers. Glanders [Internet]. [diakses pada 19 September 2018]. Tersedia dari: <http://www.cdc.gov/glanders/health-care-workers.html>.
- [CFSPH] The Center for Food Security and Public Health. 2015. Glanders [Internet]. [diakses pada 19 September 2019]. Tersedia dari: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/glanders.pdf>.
- Coenye T, Vandamme P. 2003. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environ Microbiol.* 5:719-729.
- Colahan PT, Mayhew IG, Merritt AM, Moore JN. 1999. Manual of equine medicine and surgery. Missouri (USA): Mosby, Inc. p. 17-22.
- Darling P, Woods J. 2004. US Army Medical Research Institute of Infectious Diseases Medical Management of Biological Casualties Handbook. 5th ed. Fort Detrick, MD (USA): USAMRIID.
- Dhama K, Chakraborty S, Kapoor S, Tiwari R, Kumar A, Deb R, Rajagunalan S, Singh R, Vora K, Natesan S. 2013. One world, one health veterinary perspectives. *Adv Anim Vet Sci.* 1:5-13.
- [Dirkeswan] Direktorat Kesehatan Hewan. 2018. Self-Declaration of an Equine Disease Free Zone in Jakarta, Indonesia, for the purpose of facilitating the equestrian competitions in the framework of the 18th Asian Games 2018. Jakarta (Indonesia): Direktorat Kesehatan Hewan, Kementerian Pertanian.
- Elschner MC, Klaus CU, Liebler-Tenorio E, Schmoock G, Wohlsein P, Tinschmann O, Lange E, Kaden V, Klopffleisch R, Melzer F, Rassbach A, Neubauer H. 2009. *Burkholderia mallei* infection in a horse imported from Brazil. *Equine Vet Educ.* 21:147-150.
- Elschner MC, Scholz HC, Melzer F, Saqib M, Marten P, Rassbach A, Dietzsch M, Schmoock G, de Assis Santana VL, de Souza MM. 2011. Use of a Western blot technique for the serodiagnosis of glanders. *BMC Vet Res.* 7:4. doi: 10.1186/1746-6148-7-4.
- Elschner MC, Liebler TE, Brüggemann M, Melzer F, Neubauer H. 2016. Re-appearance of glanders into Western Europe –clinical, laboratory and pathological findings in a German horse. *OIE Sci Technol Rev Bull.* 1:76-79.
- Galyov EE, Brett PJ, DeShazer D. 2010. Molecular insights into *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* pathogenesis. *Ann Rev Microbiol.* 64:495-517.
- Gilad J, Harary I, Dushnitsky T, Schwartz D, Amsalem Y. 2007. *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* as bioterrorism agents: National aspects of emergency preparedness. *Israeli Med Assoc J.* 9:499-503.
- Gregory BC, Waag DM. 2007. Glanders. In: Dembek ZF, editor. Medical aspects of biological warfare. Washington DC (USA): Borden Institute. p. 121-146.
- Hagebock JM, Schlater LK, Frerichs WM, Olson DP. 1993. Serologic responses to the mallein test for glanders in solipeds. *J Vet Diagn Invest.* 5:97-99.
- Hunting W. 1913. Glanders. In: Hoarse EW, editor. A system of veterinary medicine. London (UK): Balliere Tindall and Cox.
- [Kementan] Kementerian Pertanian. 2009. Keputusan Menteri Pertanian Nomor 3238/Kpts/PD.630/9/2009 tentang penggolongan jenis-jenis hama penyakit hewan karantina, penggolongan dan klasifikasi media pembawa. Berita Negara RI tahun 2009 Nomor 307. Jakarta (Indonesia): Kementerian Pertanian.
- Katz JB, Chieves LP, Hennager SG, Nicholson JM, Fisher TA, Byers PE. 1999. Serodiagnosis of equine piroplasmosis, dourine, and glanders using an arrayed immunoblotting method. *J Vet Diagn Invest.* 11:292-294.
- Kahn LH, Kaplan B, Steele JH. 2007. Confronting zoonoses through closer collaboration between medicine and veterinary medicine (as 'one medicine'). *Vet Italiana.* 43:5-19.
- Kettle ANB, Wernery U. 2016. Glanders and the risk for its introduction through the international movement of horses. *Equine Vet J.* 48:654-658.
- Khan I, Wieler LH, Butt MA, Elschner MC, Cheema AH, Sprague LD, Neubauer H. 2012. On the current situation of glanders in various districts of the Pakistani Punjab. *J Equine Vet Sci.* 32:783-787.
- Khan I, Wieler LH, Melzer F, Elschner C, Muhammad G, Ali S, Sprague LD, Neubauer H, Saqib M. 2013a. Glanders in animals: A review on epidemiology, clinical presentation, diagnosis and countermeasures. *Transbound Emerg Dis.* 60:204-221.
- Khan I, Ali S, Gwida M, Elschner MC, Ijaz, M, Anjum AA, Neubauer H. 2013b. Prevalence of *Burkholderia*

- mallei* in Equids of Remount Depot Sargodha, Pakistan. Pak J Zool. 45:1751-1756.
- Limmathurotsakul D, Wuthiekanun V, Chantratita N, Wongsuvan G, Amornchai P, Day NP, Peacock SJ. 2010. *Burkholderia pseudomallei* is spatially distributed in soil in northeast Thailand. PLoS Negl Trop Dis. 4:e694. doi: 10.1371/journal.pntd.0000694.
- Lopez J, Copps J, Wilhelmsen C, Moore R, Kubay J, St-Jacques M, Halayko S, Kranendonk C, Toback S, DeShazer D, Fritz DL, Tom M, Woods DE. 2003. Characterization of experimental equine glanders. Microb Infect. 5:1125-1131.
- Lowe W, March JK, Bunnell AJ, O'Neill KL, Robinson RA. 2014. PCR-based methodologies used to detect and differentiate the *Burkholderia pseudomallei* complex: *B. pseudomallei*, *B. mallei*, and *B. thailandensis*. Curr Issues Mol Biol. 16:23-54.
- Malik P, Khurana SK, Dwivedi SK. 2010. Re-emergence of glanders in India: Report of Maharashtra state. Indian J Microbiol. 50:345-348.
- Malik P, Singha H, Khurana SK, Kumar R, Kumar S, Raut AA, Riyesh T, Vaid RK, Virmani N, Singh BK, Pathak SV, Parkale DD, Singh B, Pandey SB, Sharma TR, Chauhan BC, Awasthi V, Jain S, Singh RK. 2012. Emergence and re-emergence of glanders in India: A description of outbreaks from 2006 to 2011. Vet Ital. 48:167-178.
- Marr JS, Malloy CD. 1996. An epidemiologic analysis of the ten plagues of Egypt. Caduceus. 12:7-24.
- Naureen A, Saqib M, Faqeer M, Ahmad R, Muhammad G, Asi MN, Hussain MH, Lodhi LA, Khan MS, Thibault FM. 2010. Antimicrobial susceptibility of 41 *Burkholderia mallei* isolates from outbreaks of equine glanders in Punjab, Pakistan. J Equine Vet Sci. 30:134-140.
- Neubauer H, Meyer H, Finke EJ. 1997. Human glanders. Rev Int Serv Sante Forces Armees. 70:258-265.
- Neubauer H, Sprague LD, Zacharia R, Tomaso H, Al Dahouk S, Wernery R, Wernery U, Scholz HC. 2005. Serodiagnosis of *Burkholderia mallei* infections in horses: state-of-the-art and perspectives. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 52:201-205.
- Obersteller S, Neubauer H, Hagen RM, Frickmann H. 2016. Comparison of five commercial nucleic acid extraction kits for the PCR-based detection of *Burkholderia pseudomallei* DNA in formalin-fixed, paraffinembedded tissues. Eur J Microbiol Immunol. 6:244-252.
- [OIE] World Organization for Animal Health. 2013. Glanders: Technical disease card [Internet]. [diakses pada 19 September 2018]. Tersedia dari: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/GLANDERS.pdf.
- [OIE] World Organization for Animal Health. 2016. Chapter 12.10: Glanders, Terrestrial Animal Health Code [Internet]. [diakses pada 19 September 2018]. Tersedia dari: http://www.oie.int/index.php?id=169&L=0&htmfile=chapitre_glanders.htm
- [OIE] World Organization for Animal Health. 2018. Glanders and melioidosis [Internet]. [diakses pada 19 September 2018]. Tersedia dari: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.05.11_GLANDERS.pdf.
- [OIE] World Organization for Animal Health. 2019. Glanders. Information on aquatic and terrestrial animal diseases [Internet]. [diakses pada 19 September 2018]. Tersedia dari: <https://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/animal-diseases/Glanders/>.
- Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD. 2007. Veterinary medicine – a textbook of diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. 10th ed. Philadelphia (USA): WB Saunders Elsevier.
- Ribolzi O, Rochelle-Newall E, Dittrich S, Auda Y, Newton PN, Rattanavong S, Knappik M, Soullieuth B, Sengtaheuanghoung O, Dance DA. 2016. Land use and soil type determine the presence of the pathogen *Burkholderia pseudomallei* in tropical rivers. Environ Sci Pollut Res Int. 23:7828-7839.
- Ricketti AJ, Cunha BA, Cleri DJ, Shenk SH, Vemaleo JR, Unkle DW. 2011. Biological terrorism and the allergist's office practice. Allergy Asthma Proc. 32:272-287.
- Rotz LD, Khan AS, Lillibridge SR, Astroff SM, Hughes JM. 2002. Public health assessment of potential biological terrorism agents. Emerg Infect Dis. 2:225-230.
- Scholz HC, Pearson T, Hornstra H, Projahn M, Terzioğlu R, Wernery R, Georgi E, Riehm JM, Wagner DM, Keim PS. 2014. Genotyping of *Burkholderia mallei* from an outbreak of glanders in Bahrain suggests multiple introduction events. PLoS Negl Trop Dis. 8:e3195. doi: 10.1371/journal.pntd.0003195.
- Silva EB, Dow SW. 2013. Development of *Burkholderia mallei* and *pseudomallei* vaccines. Front Cell Infect Microbiol. 3:3389. doi: 10.3389/fcimb.2013.00010
- Slater J. 2013. From glanders to Hendra virus: 125 years of equine infectious diseases. Vet Record. 173:186-189.
- Sprague LD, Neubauer H. 2004. Melioidosis in Animals: a review on epizootiology, diagnosis and clinical presentation. J Vet Med B. 51:305-320.
- Sprague LD, Zachariah R, Neubauer H, Wernery R, Joseph M, Scholz HC, Wernery U. 2009. Prevalence-dependent use of serological tests for diagnosing glanders in horses. BMC Vet Res. 5:32. doi: 10.1186/1746-6148-5-32.
- Timoney J. 2013. Overview of glanders (Farcy): Merck Veterinary Manual [Internet]. [diakses pada 19 September 2018]. Tersedia dari: http://www.merckvetmanual.com/mvm/generalized_conditions/glanders/overview_of_glanders.html.

- Van Zandt KE, Greer MT, Gelhaus HC. 2013. Glanders: An overview of infection in humans. *Orphanet J Rare Dis.* 8:131. doi: 10.1186/1750-1172-8-131.
- Verma AK, Saminathan M, Neha, Tiwari R, Dhama K, Singh SV. 2014. Glanders - a re-emerging zoonotic disease: a review. *J Biol Sci.* 14:38-51.
- Wernery U. 2009. Glanders. In: Mair TS, Hutchinson RE, editors. *Infectious diseases of the horse*. Cambridgeshire (UK): Equine Vet J Ltd. p. 253-260.
- Wilkinson L. 1981. Glanders: Medicine and veterinary medicine in common pursuit of a contagious disease. *Med Hist.* 25:363-384.
- Wittig MB, Wohlsein P, Hagen RM, Al Dahouk S, Tomaso H, Scholz HC, Nikolaou K, Wernery R, Wernery U, Kinne J, Elschner M, Neubauer H. 2006. Glanders-a comprehensive review. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 113:323-330.
- Yabuuchi E, Kosako Y, Oyaizu H, Yano I, Hotta H, Hashimoto Y, Ezaki T, Arakawa M. 1992. Proposal of *Burkholderia* genus and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus. *J Microbiol Immunol.* 36:1251-1275.

Karakteristik Biologis Virus West Nile dan Keterkaitannya dengan Perkembangan Obat Antiviral dan Vaksin

(Biological Characteristics of West Nile Virus and Its Correlation with the Development of Antiviral Drugs and Vaccines)

Diana Nurjanah dan NLPI Dharmayanti

Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl. RE Martadinata No. 30, Bogor 16114
Kontributor utama: diananurjanah@gmail.com

(Diterima 7 Juli 2019 – Direvisi 30 Juli 2019 – Disetujui 22 Agustus 2019)

ABSTRACT

West Nile virus (WNV) is a zoonotic RNA virus. Its genome encodes 3 structural and 7 non-structural proteins. Mutations can occur in both structural and non-structural proteins of the virus. Mutations can enhance the pathogenicity and virulence, but some mutations are beneficial for the development of vaccines. Licensed vaccines are only available for horses, while vaccines for humans are still under development. In Indonesia, WNV infection was detected in 2014 in West and East Java, but vaccines and antiviral drugs in both animals and humans are not yet available. This paper describes the characteristic of structural and non-structural proteins of WNV and its correlation with mutations and the development of vaccines and antiviral drugs. Molecular identification and further research are needed to predict, prevent and control WNV infections in vectors, susceptible animals and humans.

Key words: West Nile virus, zoonotic, mutation, vaccines, antiviral drugs

ABSTRAK

Virus West Nile (WNV) merupakan virus RNA yang bersifat zoonosis. Genom WNV mengkode 3 protein struktural dan 7 protein non struktural. Kejadian mutasi dapat terjadi baik pada protein struktural maupun protein non-struktural virus. Mutasi pada WNV mampu mempengaruhi patogenitas dan virulensi virus, namun beberapa mutasi bersifat menguntungkan sehingga dimanfaatkan untuk pengembangan vaksin. Vaksin terlisensi hanya tersedia untuk kuda, sedangkan vaksin pada manusia masih dalam tahap pengembangan. Di Indonesia, infeksi virus ini berhasil dideteksi pada tahun 2014 di Jawa Barat dan Jawa Timur, namun vaksin dan obat antiviral baik pada hewan dan manusia belum tersedia. Tulisan ini menguraikan tentang karakter protein struktural dan non-struktural WNV serta keterkaitannya dalam kejadian mutasi dan pengembangan vaksin serta obat antiviral. Identifikasi molekuler perlu dilakukan untuk dapat memprediksi, mencegah dan mengendalikan kejadian infeksi virus West Nile baik pada vektor, hewan peka maupun manusia.

Kata kunci: Virus West Nile, zoonosis, mutasi, vaksin, obat antiviral

PENDAHULUAN

Virus West Nile (WNV) merupakan virus zoonosis yang bersirkulasi di antara nyamuk, burung, kuda, manusia dan vertebrata lain (Murray et al. 2010). Burung berperan sebagai reservoir alami dan nyamuk dari genus *Culex* bertindak sebagai vektor transmisi dari virus ini (Eastwood et al. 2011; Gamino & Höfle 2013). Manusia dan kuda sebagai inang insidental (*dead-end host*) tidak terlibat dalam siklus transmisi (Venter et al. 2010; CDC 2019). Virus West Nile termasuk ke dalam kompleks *Japanese Encephalitis* (JE) dalam famili *Flaviviridae*, genus *Flavivirus* (Fall et al. 2017). Kasus infeksi pada manusia pertama kali ditemukan di Uganda pada tahun 1937 (Hughes et al. 1940), sedangkan infeksi pada kuda pertama kali ditemukan di USA pada Oktober 1999 (Ostlund et al.

2001). Gejala klinis WNV pada manusia bervariasi, mulai dari asimtomatis/ demam akut ringan hingga gejala neurologis akibat ensefalitis (Murgue et al. 2002).

Wabah yang bersifat masif pertama kali dilaporkan pada tahun 2002-2003 dengan kasus infeksi mencapai 2.946 dan 284 di antaranya bersifat fatal. Wabah masif lainnya terjadi pada tahun 2012 dan pada tahun 2018. Wabah pada tahun 2018 terjadi di Eropa dengan kejadian infeksi lebih dari 2.000 kasus dan 181 kasus bersifat fatal (Rosenberg et al. 2018; Barrett 2018; CDC 2019). Hingga Januari 2019, kejadian WNV pada manusia di USA dilaporkan menginfeksi sebanyak 2.647 orang, 1.658 di antaranya bersifat *neuroinvasive* dan sisanya sebanyak 989 kasus diklasifikasikan sebagai penyakit *non-neuroinvasive* (CDC 2019). Pasien dengan gangguan sistem

kekebalan, orang lanjut usia dan anak-anak memiliki risiko terinfeksi virus ini dengan tingkat keparahan yang lebih tinggi sehingga dapat berakibat fatal (Evans & Seeger 2007).

Tindakan pencegahan dengan vaksin terlisensi hanya tersedia untuk hewan, khususnya kuda (Iyer & Kousoulas 2013), sedangkan vaksin untuk manusia masih dalam tahap pengembangan (Monath 2006). Virus West Nile merupakan virus RNA beruntai tunggal dengan angka mutasi yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan virus DNA (Armstrong et al. 2011). Mutasi dianggap berperan dalam peningkatan virulensi dan penurunan efikasi vaksin yang sudah tersedia. Namun, beberapa kejadian mutasi bersifat menguntungkan sehingga dimanfaatkan untuk pengembangan vaksin yang poten. Keterbatasan vaksin dalam menimbulkan antibodi protektif pada pasien dengan gangguan kekebalan serta lamanya waktu yang dibutuhkan untuk menghasilkan vaksin yang sesuai melatarbelakangi pengembangan terapi antiviral untuk WNV. Kejadian infeksi WNV di Indonesia terdeteksi pada tahun 2014. Infeksi tersebut ditemukan dari isolat Bandung tahun 2004 dan wabah yang menjangkit 12 orang pasien rumah sakit di Surabaya (Myint et al. 2014; Nurcahyani 2014). Penelitian WNV di Indonesia masih sangat terbatas. Kesenjangan pengetahuan mengenai aspek penting dari virus dan belum tersedianya vaksin serta antiviral untuk manusia membatasi kemampuan dalam memprediksi, mencegah dan mengendalikan infeksi WNV di Indonesia.

KARAKTERISTIK BIOLOGIS

Struktur virus

Famili *flaviviridae* terdiri dari 4 genus di antaranya *Flavivirus*, *Pestivirus*, *Hepacivirus* dan *Pegivirus*. *Flaviviridae* memiliki bentuk sferis dengan diameter 40-60 nm, beramplop dan nukleokapsidnya berbentuk ikosahedral (MacLachlan et al. 2017). Genus *Flavivirus* dari famili *Flaviviridae* memiliki rentang inang yang cukup luas karena dapat bereplikasi baik pada sel vertebrata maupun invertebrata (Cook & Holmes 2006). Berdasarkan rentang inang dan spesies vektor, genus ini dapat dibagi ke dalam 4 kelompok berbeda yaitu *mosquito-borne*, *tick-borne*, *no known vector* dan *insect specific*. Virus yang ditransmisikan melalui nyamuk (*mosquito-borne*) dapat diklasifikasikan menjadi *clade encephalitis* atau JE serocomplex yang terdiri dari WNV dan virus *Japanese Encephalitis* sedangkan *clade non encephalitic* atau demam berdarah terdiri dari virus *Dengue* dan virus *Yellow Fever* (Colpitts et al. 2012).

Genom

Virus *West Nile* (WNV) memiliki diameter 40-50 nm dengan genom ssRNA berpolaritas positif sekitar 11 kb yang mengkode tiga protein struktural yaitu kapsid (protein C), *envelope* (protein E) dan premembran (protein PrM) serta 7 protein non-struktural (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, dan NS5) (Hayes & Gubler 2006).

Protein E

Protein E merupakan protein struktural *envelope* yang penting secara imunologis dan menjadi target utama respon imun inang. Protein E bertanggungjawab dalam *viral attachment*, fusi membran dan pembentukan virion (Wang et al. 2001; Zhang et al. 2017). Protein ini memiliki berat molekul 53 kD dan merupakan glikoprotein membran tipe I dengan 12 residu sistein yang *conserved*. Protein E memiliki 3 domain yaitu domain 1 (DI), domain 2 (DII) dan domain 3 (DIII) serta domain transmembran helix (TMD) (Zhang et al. 2017).

DI merupakan pusat domain struktur dengan 120 residu pada 3 segmen yang terletak di antara DII dan DIII. Sebagai pusat domain, DI memiliki fungsi sebagai stabilisator orientasi protein E secara keseluruhan dan berpartisipasi dalam perubahan konformasinya. Situs *glycosylation* domain ini dihubungkan dengan produksi virus, sensitivitas pH dan sifat *neuroinvasive* (Zhang et al. 2017). DII merupakan domain dimerisasi yang disusun oleh 12 asam amino yang berperan dalam fusi dan pengikatan membran sel-virus. DIII yang menjangkau asam amino 296-415 berfungsi dalam pengenalan dan pengikatan reseptor. Domain ini menjadi fokus dalam pengembangan vaksin karena memiliki *multiple* epitop yang dikenali oleh antibodi ternetralisasi (Beasley & Barrett 2002; Pokidysheva et al. 2006; Iyer & Kousoulas 2013). Berdasarkan fungsi dari DIII, protein E dapat digunakan untuk mengkarakterisasi WNV *neuroinvasive* dan *non-neuroinvasive* dengan sekuensing nukleotidanya (Rice et al. 1998). Domain transmembran helix terdiri dari TM1 dan TM2. Keduanya memiliki fungsi yang penting dalam biosintesis dan proses dari poliprotein virus, TM1 bertindak sebagai sekuen *stop-transfer* sedangkan TM2 berperan sebagai sekuen sinyal internal untuk translokasi protein NS1 pertama ke dalam lumen retikulum endoplasmik (Fritz et al. 2011).

Protein C

Protein C merupakan protein struktural kecil dengan berat molekul 12-14 kD, bermuatan positif dan

disebut sebagai protein inti. Protein ini membentuk komponen struktural nukleokapsid dan terlibat dalam RNA *folding* selama replikasi (Ferlenghi et al. 2001; Zhang et al. 2007). Protein kapsid juga terlibat dalam berbagai peran non-struktural selama siklus replikasi, termasuk replikasi RNA, translasi, infektivitas dan viabilitas virus. Fungsi non-struktural tersebut diperoleh dengan memodulasi *signaling pathways* sel inang karena protein C adalah protein virus yang pertama kali berinteraksi dengan protein sel inang di sitoplasma. Protein ini juga ikut berperan dalam aktivitas anti-apoptosis sehingga mampu meningkatkan *signaling prosurvival* selama terjadinya infeksi virus (Hunt et al. 2007; Bhuvanakantham et al. 2009; Urbanowski & Hobman 2013). Penelitian yang dilakukan oleh van Marle et al. (2007) menunjukkan bahwa protein kapsid memiliki peran dalam neuropatogenesis karena mampu menginduksi neuroinflamasi melalui peningkatan CXCL10 dan CCL2 baik secara *in vivo* maupun *ex vivo*.

Protein PrM

Protein premembran merupakan protein struktural glikosilasi transmembran pendek yang memiliki fungsi melindungi protein E dari fusi awal dengan membran sel inang di dalam vesikel golgi kompleks (Chambers 1990; Tan et al. 2009; Setoh et al. 2012). Protein ini merupakan prekursor protein membran yang diekspresikan pada permukaan virion di sepanjang protein E. Pada virus *immature*, protein ini melapisi *fusion loop* protein E (Elshuber 2003; Zybert et al. 2008; Luo et al. 2015). Pada proses perakitan virus, protein E dan PrM membentuk heterodimer sebelum berinteraksi dengan kompleks nukleokapsid untuk menghasilkan virus *immature*. Protein PrM kemudian mengalami pembelahan oleh *furin like protease* inang yang terjadi di dalam transgolgi untuk menghasilkan virus *mature* melalui *exocytosis* (Zhang 2003; Li et al. 2008; Zhang et al. 2013). Modulasi proporsi pembelahan tersebut dapat merangsang sensitivitas antibodi ternetralisasi (Nelson et al. 2008). Protein PrM WNV memiliki situs *N-Linked glycosylation* tunggal yang berada pada asam amino 15-17 dan ablasi dari motif *glycosylation* ini dapat merubah pelepasan dan infektivitas partikel virus (Hanna et al. 2005). Protein PrM WNV dianggap penting dalam pembentukan dan sekresi virus serta berperan dalam peningkatan virulensi virus (Chambers 1990; Tan et al. 2009; Setoh et al. 2012).

Protein NS

Protein non-struktural bersifat multifungsi dan memiliki peran penting dalam sintesis dan/atau

perakitan virus (Colpitts et al. 2012). Protein NS1 merupakan glikoprotein yang memiliki 3 situs *N-Linked glycoprotein* yang sangat *conserved*. Protein NS1 disekresi oleh sel terinfeksi dengan *multiple* sistein yang membentuk ikatan disulfida (Londono-Renteria & Colpitts 2016). Protein NS1 mengalami proteolisis di retikulum endoplasmik dan terdimerisasi. Bentuk dimer protein NS1 diangkut ke sel lain melalui beberapa mekanisme di antaranya melalui membran retikulum endoplasmik (mNS1), membran plasma bagian luar (pNS1) dan medium ekstraseluler dalam bentuk terlarut (sNS1). Dalam bentuk terlarutnya, 3 buah dimer NS1 akan bersatu membentuk heksamer NS1 (Alcalá et al. 2017; Alcalá et al. 2018). Protein ini bersifat sangat imunogenik sehingga menjadi target utama dari antibodi inang. Protein NS1 intraseluler berperan sebagai kofaktor esensial untuk replikasi virus, bersifat antagonis terhadap aktivitas komplemen dan menghambat *signaling* TLR3 (Martín-Acebes 2012; Chancey et al. 2015). Protein NS1 yang berhubungan dengan plasma membran (pNS1) dan dalam bentuk terlarut (sNS1) berperan dalam patogenitas virus (Alcalá et al. 2017; Alcalá et al. 2018).

Protein NS2A merupakan protein transmembran hidrofobik yang berukuran kecil (25 kD) dengan peran sebagai kofaktor untuk replikasi virus, pembentukan struktur membran, perakitan virus, regulasi respon imun inang dan diseminasi virus meskipun tidak memiliki fungsi enzimatis (Chancey et al. 2015; Londono-Renteria & Colpitts 2016). Colpitts et al. (2012) menyatakan bahwa protein NS2A bersama dengan protein NS2B, NS4A dan NS4B mampu menghambat respon imun bawaan inang ketika terjadi infeksi virus dengan mekanisme hambatan produksi interferon α/β . Mutasi pada protein ini mampu menyebabkan atenuasi virus secara *in vivo* (Martín-Acebes 2012).

Protein NS2B merupakan protein hidrofobik kecil yang berperan sebagai kofaktor protease NS3 dan berfungsi sebagai *membrane anchor* protease virus (Martín-Acebes 2012). Tiga membran domain pada terminal C dan N protein NS2B berperan penting dalam penyatuan kompleks protease ke dalam membran yang terinduksi virus (Londono-Renteria & Colpitts 2016).

Protein NS3 merupakan protein terbesar kedua setelah NS5 yang sangat *conserved* dan memiliki banyak fungsi enzimatis. N-terminal protein ini mengkode viral *trypsin-like* serine protease yang mampu membelah poliprotein virus untuk melepaskan protein struktural dan non-struktural. Aktivitas enzimatis lainnya yang esensial untuk replikasi WNV yaitu NS3 helicase, nucleoside triphosphatase dan RNA triphosphatase. Berdasarkan fungsi enzimatisnya, protein NS3 menjadi komponen kunci dalam proses

replikasi virus, sehingga perubahan pada protein ini dapat menyebabkan terganggunya proses replikasi virus. Protein NS3 hanya dapat aktif dengan keberadaan kofaktornya yaitu NS2B. Bentuk aktifnya NS2B/NS3 merupakan komponen yang esensial untuk replikasi dan perakitan virus serta menjadi target antivirus yang menjanjikan (Ebel et al. 2011; Martín-Acebes 2012; Londono-Renteria & Colpitts 2016).

Protein NS4A dan NS4B merupakan protein hidrofobik berukuran kecil dengan beberapa domain yang terikat pada *viral replication complex* di membran yang terinduksi virus. Protein NS4A berperan sebagai kofaktor yang meregulasi aktivitas ATP-ase NS3 helicase dan berperan dalam pengurutan sinyal untuk translokasi protein NS4B melalui membran retikulum endoplasmik. Protein NS4A bersama dengan protein NS4B dan NS2A berperan dalam penghambatan *signaling interferon* pada sel terinfeksi virus. Protein NS4B yang memiliki fungsi penting dalam kompleks replikasi *flavivirus* dapat ditemukan pada membran perinuklear dan nukleus dari sel terinfeksi virus. Mutasi pada protein ini menghasilkan sifat atenuasi WNV secara *in vivo* (Martín-Acebes 2012; Wicker et al. 2012; Londono-Renteria & Colpitts 2016).

Protein NS5 merupakan protein terbesar dengan ukuran 100 kDa dengan 2 aktivitas enzimatis yaitu N-terminal domain dan C-terminal domain. N-terminal domain mengkode metiltransferase sedangkan C-terminal domain mengkode *RNA-dependent RNA polymerase* (RdRP) yang bertanggungjawab terhadap replikasi virus. Metiltransferase dan polimerase protein NS5 merupakan target antiviral yang menjanjikan (Londono-Renteria & Colpitts 2016). Protein NS5 memiliki fungsi sebagai antagonis interferon (IFN) utama dengan mekanisme hambatan pY-STAT 1 (*IFN-Dependent STAT 1 phosphorylation*) atau dengan degradasi STAT 2 dan penekanan ekspresi gen *IFN-dependent*. Berkaitan dengan fungsinya sebagai antagonis IFN, mutasi alami protein NS5 WNV mungkin memiliki pengaruh terhadap virulensi WNV asal lapang sehingga dapat digunakan dalam pengembangan vaksin *live attenuated* atau terapi antiviral di masa mendatang (Laurent-Rolle et al. 2010).

Lineage virus West Nile

Berdasarkan filogenetika molekuler, WNV dibagi menjadi 5 *lineage* dan 3 *putative lineage* (Pachler et al. 2014). Kejadian encephalitis pada manusia dikaitkan dengan *lineage* 1, 2 dan 5 (Petersen et al. 2013; Zohaib et al. 2019). Strain pada *lineage* 1 terbagi ke dalam *clade* 1a, 1b dan 1c. *Clade* 1a ditemukan pada isolat Afrika, Eropa dan Amerika. *Clade* ini memiliki kedekatan hubungan genetik di antara daerah yang jaraknya berjauhan secara geografis sehingga dianggap

sebagai akibat penyebaran virus melalui burung migrasi (Martín-Acebes 2012). *Lineage* 1 berasal dari sub-sahara atau Afrika Utara yang mewabah pada awal abad 20 dan menyebar ke utara pada tahun 1970-1980-an.

Pada tahun 1990, strain WNV *clade* 1a menyebabkan wabah sporadis ringan di Maroko dan Eropa Barat. Virus West Nile menyebar ke Amerika dan menjadi masalah kesehatan yang bersifat global. Isolat asal Amerika Utara pada awal kejadian berhasil diidentifikasi di New York tahun 1999, isolat tersebut memiliki kedekatan dengan virus *lineage* 1a yang diisolasi di Israel tahun 1998 (Petersen et al. 2013; Chancey et al. 2015). Hal tersebut menimbulkan persepsi bahwa virus WN NY99 mungkin disebarkan melalui burung migrasi atau vektor yang tidak sengaja terbawa turis yang sebelumnya mengunjungi negara Israel. *Clade* 1a kemudian dibagi menjadi *subclade* A dan B. Sebagian besar isolat dari Eropa Barat dan beberapa isolat dari Eropa Timur masuk ke dalam *subclade* A sedangkan sisa isolat lain dari Eropa Timur masuk kedalam *subclade* B (Zehender et al. 2017). *Clade* 1b terdiri dari virus Kunjin asal Australia yang merupakan salah satu subtype dari WNV. *Clade* 1c terbatas pada isolat dari India dan kemudian membentuk kluster baru menjadi *lineage* 5 (Martín-Acebes 2012; Pachler et al. 2014; Chancey et al. 2015).

Isolat virus WN *lineage* 2 secara historis ditemukan endemis di Sub Sahara Afrika dan Madagaskar. Isolat ini telah menyebabkan wabah zoonosis yang bersifat sporadik di Afrika Selatan meskipun dianggap kurang virulen jika dibandingkan dengan *lineage* 1. Selanjutnya, wabah oleh *lineage* 2 pada manusia dan burung terjadi di Eropa, khususnya Eropa Selatan dan Eropa Timur. Virus West Nile *lineage* 2 juga ditemukan di Indonesia pada spesimen kasus klinis pada tahun 2004 melalui sekuensing (Martín-Acebes 2012; Myint et al. 2014; Chancey et al. 2015).

Lineage 3 berhasil diisolasi dari isolat nyamuk *Culex* asal Republik Ceko yang berdekatan dengan Austria, pada tahun 1997 dan 1999. *Lineage* 3 secara eksperimental hanya mampu menginfeksi nyamuk dan sel-nya lebih lanjut WNV *lineage* 4 diisolasi dari kutu *Dermacentor marginatus* di Rusia pada tahun 1988, termasuk isolat kutu dari Caucasus dan beberapa isolat nyamuk dan reptil di sungai Volga. *Lineage putative* 6 yang memiliki kedekatan dengan *lineage* 4 pernah dilaporkan di Spanyol. Beberapa isolat lain yang pernah ditemukan yaitu virus Koutanyo dari Afrika (KOUNV) yang merupakan *lineage putative* 7 dan *lineage putative* 8 yang merupakan varian virus Kunjin (KUNV) pada isolat asal Serawak dan Senegal (Martín-Acebes 2012; Pachler et al. 2014; Chancey et al. 2015).

MUTASI

Virus RNA dapat beradaptasi secara cepat terhadap perubahan lingkungan dan dikenal memiliki angka mutasi yang tinggi dengan kemampuan evolusi yang cepat. Perubahan kecil dari nukleotida/asam amino dapat mempengaruhi replikasi dan virulensi virus serta spesifisitas inang (Ebel et al. 2004). Terjadinya mutasi selektif dapat menghasilkan profil epidemiologi dan gambaran penyakit yang tidak terduga. Mutasi pada WNV dapat terjadi baik pada protein struktural maupun protein non-struktural dan menghasilkan atenuasi fenotip (Brault et al. 2007; Pachler et al. 2014). Perubahan pada 5' dan 3' Untranslated Region (UTR) juga dianggap berpengaruh dalam patogenitas WNV (Pachler et al. 2014). Meskipun genom WNV relatif fleksibel terhadap beberapa perubahan sekuen yang dapat mempengaruhi patogenitas virus, namun hal tersebut tergantung dari strain virus dan kepekaan inang terinfeksi (Rizzoli et al. 2015).

Protein struktural dan non-struktural WNV berperan dalam berbagai fungsi seperti replikasi, virulensi dan patogenitas (Tan et al. 2009; Chancey et al. 2015). Perubahan atau mutasi yang terjadi baik pada protein struktural dan non-struktural dapat dimanfaatkan untuk penemuan vaksin karena beberapa mutasi bersifat menguntungkan. Beberapa penelitian modifikasi genetik protein struktural dan non-struktural WNV pun dilakukan untuk mendapatkan antiviral atau vaksin yang berpotensi.

Pada protein struktural PrM, substitusi asam amino T20 menjadi asam aspartat dapat mempengaruhi glycosylation, pembentukan heterodimer dan sekresi partikel virus (Lustig et al. 2018). Mutasi pada protein PrM (K31A, K31T, K31V, T20D) menyebabkan penurunan sekresi antigen VLP secara signifikan dari sel yang ditransfeksikan (Calvert et al. 2012). Tan et al. (2009) menyatakan bahwa triple mutasi pada ektodomain protein PrM menyebabkan hilangnya infeksiivitas WNV pada sel mamalia dan nyamuk secara nyata. Selain itu, mutasi protein PrM N15Q menyebabkan terjadinya penurunan jumlah virus jika dibandingkan dengan *wild-type* WNV melalui uji real-time PCR (Hanna et al. 2005).

Mutasi protein struktural lainnya terjadi pada glikoprotein E. Substitusi tunggal asam amino T70I bertanggungjawab dalam peningkatan resistensi asam yang menjadikan mutan membutuhkan pH lebih asam di dalam endosome untuk melakukan fusi. Sedangkan perubahan tunggal asam amino pada glikoprotein E posisi 159 menyebabkan replikasi dan transmisibilitas virus terjadi secara efisien pada suhu yang lebih tinggi oleh vektor (Martin-Acebes & Saiz 2011), sehingga mutasi glikoprotein E yang terjadi pada Val 159 Ala dianggap dapat mempengaruhi adaptasi virus terhadap

vektor nyamuk *Culex* sp (Di Giallonardo et al. 2016). Adaptasi tersebut dapat menghasilkan vektor yang kompeten dalam peningkatan distribusi dan intensitas penularan WNV pada inang. Perubahan genetik pada motif N-glycosylation protein E menyebabkan hilangnya situs N-glycosylation, tidak stabilnya fusi E-peptide dan penurunan replikasi virus (Rizzoli et al. 2015). Mutasi pada protein E L107E yang terletak pada daerah *conserved fusion loop flavivirus* menyebabkan atenuasi *neuroinvasive* pada mencit meskipun tidak menyebabkan atenuasi *neurovirulen* secara signifikan. Sedangkan mutasi N154S menyebabkan atenuasi moderate *neuroinvasive* dan atenuasi ringan *neurovirulen* (Beasley et al. 2005; Zhang et al. 2006; Whiteman et al. 2010).

Mutasi pada asam amino P250L protein NS1 bertanggungjawab terhadap atenuasi WNV *lineage* 2 secara signifikan pada hewan coba mamalia baik secara *in vivo* dan *in vitro*. Mutasi pada NS1 dianggap menjadi ciri khas yang penting dari virulensi WNV *lineage* 2 (Szentpáli-Gavallér et al. 2016). Virus yang memiliki mutasi NS1 NNT130-132QQA/N175A/N207A mampu menghapus 3 situs *glycosylation* pada protein NS1 WNV dan menghasilkan atenuasi virus pada tikus secara *neuroinvasive* dan *neurovirulen*. Infeksi dengan virus mutan tersebut dapat menginduksi terbentuknya antibodi protektif yang mampu melindungi 50% mencit dari infeksi letal dengan WNV 99NY. Secara *in vitro*, mutasi yang terjadi akibat rendahnya *glycosylation* NS1 tersebut menyebabkan replikasi, maturasi dan sekresi NS1 dari retikulum endoplasmik tidak terjadi secara efektif pada sel Vero (Liu et al. 2006; Whiteman et al. 2015). Mutasi pada residu T260A-G270S protein NS2A menyebabkan pembentukan vesikel yang abnormal, oleh karena itu protein NS2A dianggap berperan langsung dalam pembentukan vesikel. Perubahan genetik protein NS2A pada A30P menyebabkan hilangnya NS1' (NS1 *extension*) dan terganggunya mekanisme penghindaran respon imun inang. Mutasi A30P pada NS2A menghasilkan sifat atenuasi berkaitan dengan hilangnya kemampuan virus untuk menghambat aktivitas INF- β *transcription*, sehingga terjadi penurunan penyebaran virus secara signifikan akibat induksi respon INF- β yang kuat. Pada hewan coba, mutasi ini membatasi kemampuan replikasi virus ekstra neural sehingga dapat menurunkan kemungkinan virus menyerang sistem saraf pusat yang menyebabkan *encephalitis* (Liu et al. 2006; Rizzoli et al. 2015). Mutasi pada protein NS2A beserta NS4A menghasilkan kegagalan replikasi virus RNA dan menyebabkan pembentukan vesikel yang *immature* (Yu et al. 2017). Mutasi yang terjadi pada protein NS3 posisi H249P dan protein NS4B posisi E249B menghasilkan penurunan virulensi pada mencit secara parsial (Szentpáli-Gavallér et al. 2016).

Substitusi asam amino T249P pada protein NS3 berkontribusi terhadap peningkatan virulensi pada unggas secara signifikan (Braut et al. 2007). Pada burung gagak Amerika (*Corvus brachyrhynchos*) mutasi ini menyebabkan peningkatan virogenesis dan efisiensi replikasi pada suhu tinggi (Rizzoli et al. 2015). Mutasi pada NS3del483 dianggap dapat menyebabkan atenuasi virus berkaitan dengan penurunan efisiensi replikasi secara *in vivo* pada hewan coba tikus dan secara *in vitro* pada sel tikus L929. Delesi residu Asp483 terdapat di dalam domain RNA helicase dan sangat *conserved* pada WNV, sehingga dianggap sebagai determinan penting sifat *neuroinvasive* dan *neurovirulen* WNV. Virus West Nile dengan mutasi NS3del483 lebih mudah dieliminasi dari sirkulasi dan kurang bersifat *neuroinvasive* jika dibandingkan dengan virus *wild type*. Delesi residu Asp483 menyebabkan virus lebih peka terhadap obat antiviral sehingga produksi virus dapat ditekan. Penurunan produksi virus menyebabkan infeksi virus pada hewan dapat lebih mudah dikontrol dan menghasilkan atenuasi dari *quasispecies* secara parsial (Ebel et al. 2011).

Mutasi pada NS4A E46K, E47K dan D50K menyebabkan peningkatan degradasi ATP oleh NS3. Berkaitan dengan fungsi ATP *in vitro* yang dibutuhkan untuk aktivitas NS3 helicase, mutasi pada NS4A dapat menjadi target mutagenesis untuk mendapatkan profil atenuasi WNV melalui perubahan efisiensi replikasi virus (Shiryaev et al. 2009). Mutasi titik pada protein NS4A (V67I) dan NS4B (I240M) memberikan kemampuan WNV untuk menginduksi jalur autofagi (Blazquez et al. 2015). Mutasi protein NS4B pada C102S, P38G dan E249G mampu mengurangi hambatan signaling IFN, menurunkan aktivitas helicase dan replikasi virus. Mutasi NS4B E249G mampu menurunkan mortalitas hingga 50%, menurunkan patogenitas dan meningkatkan imunogenisitas pada mencit. Mutasi P38G berlokasi di *regio conserved* dari NS4B dekat dengan *N-Terminal domain*, sedangkan mutasi pada C102S berlokasi di sentral domain transmembran hidrofobik. Mutasi P38G dan C102S adalah mutasi yang menghasilkan sifat atenuasi yang kuat. Mutasi C102S menyebabkan atenuasi pada *neuroinvasive* dan *neurovirulen*, sedangkan mutasi P38G menyebabkan atenuasi pada *neuroinvasive* namun tidak pada *neurovirulen* (Wicker et al. 2006; Evans & Seeger 2007; Wicker et al. 2012; Rizzoli et al. 2015). Substitusi Val-Met pada asam amino posisi 9 peptida 2K (yang mencakup membran retikulum di antara protein NS4A dan NS4B) memberikan sifat resistensi WNV terhadap obat antiviral lycorine melalui peningkatan replikasi RNA virus (Evans & Seeger 2007; Zou et al. 2009). Berkaitan dengan sifat protein NS4B yang penting untuk replikasi dan penentuan patogenitas virus pada inang melalui

hambatan STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) ketika *signalling* interferon, maka mutasi pada NS4B dapat dimanfaatkan sebagai target antiviral yang poten di masa mendatang (Wicker et al. 2006; Wicker et al. 2012). Mutasi pada protein NS5 (VI631/632AA, W651A, W382A) menyebabkan hambatan signaling IFN dan mempengaruhi virulensi WNV asal lapangan (Laurent-Rolle et al. 2010). Mutasi pada NS5 K61A, K182A dan E218A menyebabkan hilangnya aktivitas 2'O metilasi yang menghasilkan atenuasi pada WNV. Mutasi NS5 E218A memungkinkan WNV mengalami atenuasi pada fenotip *neuroinvasive* dan *neurovirulen* serta dapat menginduksi respon imun yang protektif (Zhou et al. 2007). Kombinasi mutasi secara alami protein NS5 (A804V) bersama dengan protein NS4B (E249G) dan 3'UTR (A10596G, C10774U, A10799G) menghasilkan varian virus dengan *small plaque* (sp), *temperature sensitive* (ts) dan atenuasi pada tikus (Davis et al. 2007).

Beberapa mutasi dimanfaatkan untuk penelitian vaksin di masa mendatang karena bersifat menguntungkan dengan menurunkan infektivitas, replikasi, patogenitas dan virulensi virus. Sehingga diharapkan ke depan dapat dikembangkan vaksin untuk manusia dengan efikasi yang baik dan aman melalui modifikasi genetik WNV.

PERKEMBANGAN OBAT ANTIVIRAL

Obat antiviral adalah salah satu strategi yang digunakan untuk mengendalikan infeksi virus ketika vaksin yang sesuai belum ditemukan. Terapi antiviral yang efektif memiliki target pada protein inang atau virus yang berperan penting dalam infeksi dan replikasi seperti protein NS3, NS4B dan NS5. Namun usaha penemuan obat antiviral untuk infeksi WNV masih cukup rendah jika dibandingkan dengan virus Hepatitis C dan Dengue. Hal tersebut berkaitan dengan persepsi rendahnya urgensi infeksi WNV pada manusia yang cenderung asimtomatis. Selain menggunakan alternative terapi dengan antibodi, terapi WNV akan dijelaskan lebih dalam menurut mekanisme penghambatan replikasi dan penurunan infektivitas virus.

Berkaitan dengan reaksi silang di antara flavivirus, pengembangan obat Dengue mungkin berpotensi digunakan sebagai terapi WNV. Alternatif terapi lain dapat dilakukan dengan pemberian antibodi. Antibodi melindungi inang dari infeksi WNV melalui beberapa mekanisme seperti blokade reseptor binding, hambatan fusi, pembersihan virus, lisis virus/sel terinfeksi dan sitotoksitas sel terinfeksi (Lim & Shi 2013). Molekul seperti interferon- α dianggap memiliki aktivitas proteksi terhadap infeksi WNV secara *in vitro* dan *in vivo* dengan menghambat tropisme virus dan

mencegah kematian sel neuron terinfeksi. Meskipun molekul tersebut tidak dapat melintasi *blood brain barrier* namun interferon- α bisa menjadi terapi yang berpotensi untuk flaviviral encephalitis (Gea-Banacloche et al. 2004; Samuel & Diamond 2005). Penggunaan interferon- α pada 2 orang pasien dengan infeksi WNV encephalitis dilaporkan pertama kali pada tahun 2005 dengan hasil pemulihan kondisi pasien setelah periode recovery selama 9 bulan (Kalil et al. 2005). Dibandingkan dengan ribavirin, interferon- α memiliki aktivitas terapeutik yang lebih baik (Anderson & Rahal 2002).

Ribavirin dianggap mampu menghambat replikasi dan sitopatisitas WNV pada sel saraf manusia secara *in vitro*. Pada sel vero, penggunaan ribavirin hanya menghasilkan sifat protektif tanpa diikuti dengan sifat terapeutik (Anderson & Rahal 2002). Ribavirin dengan dosis tinggi dapat meningkatkan prognosis pada individu dengan kondisi *encephalitis* (Jordan et al. 2000; Gould & Fikrig 2004). Beberapa laporan menyatakan bahwa penggunaan ribavirin pada hewan coba dan pasien wabah di Israel menunjukkan hasil yang kurang baik (Chowers et al. 2001; Morrey et al. 2004). Favipiravir merupakan analog nukleosida berspektrum luas dengan aktivitas antiviral yang poten terhadap beberapa virus RNA. Secara eksperimental, favipiravir mampu melindungi mencit dari ujiantang WNV dosis letal. Aktivitas poten tersebut didapatkan dari kemampuan obat ini dalam menurunkan infektivitas virus dan mengurangi jumlah virus (Escribano-Romero et al. 2017).

Pengobatan infeksi WNV dengan SiRNA dianggap efektif untuk menghentikan replikasi virus. Salah satu contohnya adalah penggunaan bifungsional SiRNA yang terbukti mampu menurunkan titer WNV. Efektivitas efikasi SiRNA sebagai terapi antiviral dicapai setelah 48 jam infeksi secara *in vitro*. SiRNA yang memiliki target pada protein NS5 dan NS2A dapat menjadi kandidat terapi antiviral WNV di masa mendatang (Karothea et al. 2018). Secara *in vivo*, penggunaan SiRNA dapat menurunkan titer virus di otak, menurunkan neuropatologi dan mortalitas serta menghasilkan angka *recovery* setelah 5-6 hari infeksi. SiRNA menghasilkan respon imunitas alami yang memberikan perlindungan dan *recovery* terhadap infeksi *flavivirus encephalitis* (Beloor et al. 2018).

Beberapa obat Parkinson seperti L-Dopa, Selegiline, Isatin dan Amantadine pernah diuji sebagai obat WNV. Pengobatan dengan L-Dopa, Isatin dan Amantadine mampu menurunkan jumlah virus secara signifikan secara *in vitro*. Di antara obat antiparkinson tersebut, hanya amantadine yang memiliki efek penghambatan infeksi WNV tertinggi dengan mekanisme hambatan multiplikasi pada tahap maturasi (Blázquez et al. 2016). Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, pengembangan lebih lanjut obat

Parkinson sebagai terapi infeksi WNV yang poten perlu dilakukan untuk melihat efikasi obat secara klinis baik pada hewan maupun manusia.

Inhibitor Protein Kinase C (PKC) seperti Chelerythrine dan Calphostin C dapat menjadi kandidat antivirus yang potensial untuk pengobatan infeksi WNV. Chelerythrine dan Calphostin C mampu menginduksi penurunan multiplikasi WNV secara signifikan pada percobaan *in vitro*. Chelerythrine bekerja pada regio katalitik C-terminal yang conserved sehingga chelerythrine mampu menghambat semua bentuk isoform PKC. Calphostin C berinteraksi dengan *N-Terminal regulatory* dari PKC dan berkompetisi untuk terikat pada *binding site* DAG (diacylglycerol) dan phorbol esters sehingga calphostin C menjadi inhibitor yang lebih spesifik untuk PKC klasik dan novel namun tidak untuk PKC dalam bentuk atipikal (Blázquez et al. 2016; Blázquez et al. 2018). Thiopurine dianggap mampu menghambat replikasi sebagian besar virus dari famili *flaviviridae* termasuk menghambat produksi WNV (Lim et al. 2011).

Minocyclin merupakan antibiotik tetrasiklin yang mampu menghambat replikasi WNV dan apoptosis sel saraf manusia melalui hambatan *signaling c-Jun N terminal kinase* (JNK) secara *in vitro*. Minocyclin yang memiliki sifat neuroprotektif menjadi senyawa antiviral dan antiinflamasi untuk terapi *encephalitis* yang disebabkan oleh virus. Berkaitan dengan sifatnya yang aman dan murah, minocycline dapat menjadi kandidat terapi antiviral WNV untuk dikembangkan lebih lanjut di masa mendatang (Michaelis et al. 2007). Lycorine merupakan senyawa alkaloid dengan efek biologis menghambat sintesis protein dan DNA serta menghambat pertumbuhan dan pembelahan sel. Lycorine dilaporkan memiliki aktivitas antiviral melalui penekanan replikasi RNA virus (Zou et al. 2009).

Kombinasi *alcohol monoterpene* (CMA) yang didapatkan dari *Melaleuca alternifolia* menghasilkan aktivitas virusidal, penurunan titer virus dan presentasi sel terinfeksi secara *in vitro*. Aktivitas tersebut didapatkan dari mekanisme induksi siklus sel pada fase G0/G1. Sedangkan secara *in vivo*, CMA menyebabkan penurunan morbiditas, hambatan penurunan berat badan dan penurunan titer virus di otak (Pliego Zamora et al. 2016). Molekul oligomer *antisense* mampu menghambat virus dengan mekanisme pengikatan RNA pada sekuens spesifik. Molekul seperti *phosphorodiamidate morpholino oligomer* (PMO) memiliki aktivitas inhibitor pada beberapa *flavivirus* termasuk WNV secara *in vitro* dan *in vivo*. Efikasi PMO secara *in vivo* terhadap infeksi WNV membutuhkan konjugasi dengan *peptide Arg-rich* (PPMO). Penggunaan PPMO sebagai terapi antiviral WNV dicapai dengan dosis 100-200 ug/hari yang menghasilkan perlindungan pada hewan coba

tikus secara parsial dari infeksi WNV, sedangkan dosis 300 ug/hari PPMO dapat menimbulkan toksisitas pada hewan coba (Diamond 2005; Deas et al. 2007).

Derivat imino sugar seperti deoxynorjirimycin (DNJ) atau castanospermine memiliki aktivitas antiviral dengan mekanisme hambatan pada retikulum endoplasmik α -glukosidase 1 dan 2 pada inang yang esensial untuk sekresi virus (Diamond 2009). Derivate DNJ dengan rantai samping *hydroxylated cyclohexyl* yaitu OSL-95II juga memiliki aktivitas antiviral terhadap WNV dengan mekanisme hambatan yang sama, kemudian *novel derivate imino sugar* CM-9-78 yang memiliki atom oksigen dalam rantai samping memiliki efikasi antiviral yang lebih baik jika dibandingkan dengan OSL-95II (Chang et al. 2009).

Metabolisme *lipid* berkaitan erat dengan infeksi *flavivirus* karena kolesterol terlibat dalam infektivitas WNV. Terapi dengan lovastatin dapat menghentikan infeksi secara *in vitro*. Penambahan lovastatin dan kolestrol eksogen pada media kultur mampu menurunkan replikasi replikon WNV hingga 89%. Efek lain yang dihasilkan adalah penurunan replikasi virus, produksi virus yang infeksius dan pembentukan struktur membran yang diinduksi virus pada sel yang diinfeksi WNV. Terapi dengan lovastatin dan kolestrol pada pasien yang terinfeksi WNV dapat menjadi pilihan yang aman dan murah untuk uji klinis di masa mendatang (Mackenzie et al. 2007).

Tahap replikasi RNA WNV sangat bergantung dari proses sintesis asam lemak dengan bantuan enzim kunci asam lemak sintase. Pemberian *inhibitor* enzim asam lemak sintase yaitu cerulenin dan C75 dianggap mampu menurunkan infeksi seluler WNV secara *in vitro*. Cerulenin dan C75 mampu menurunkan produksi WNV ketika ditambahkan ke media kultur pada 0 atau 3 jam setelah infeksi, hal tersebut menunjukkan bahwa cerulenin dan C75 memiliki pengaruh pada stadium replikasi virus dibandingkan dengan tahap *viral entry*. Hambatan produksi virus pada 3 jam setelah infeksi dicapai dengan penurunan sintesis RNA virus (Martín-Acebes et al. 2011).

Asam mikofenolik merupakan *inhibitor* yang poten untuk WNV dengan mekanisme hambatan enzim inosine monophosphate dehydrogenase. Brequinar yang merupakan *inhibitor* enzim dihydroorotate dehydrogenase, enzim kunci dalam biosintesis pirimidin *de novo*, dapat menghambat sintesis RNA virus, perakitan dan pelepasan virion secara *in vitro* (Qing et al. 2010). Senyawa 6-azauridin merupakan *inhibitor* enzim orotidine monophosphate decarboxylase, enzim yang berperan dalam biosintesis pirimidin, mampu mengontrol infeksi WNV dengan mekanisme hambatan replikasi virus secara *in vitro*. Cyclosporine yang merupakan isomerase peptidyl-prolyl bekerja dengan mengganggu interaksi antara NS5 dan cyclophilin A yang dibutuhkan virus untuk

menginfeksi inang (Qing et al. 2009; Krishnan & Garcia-Blanco 2014). Pengembangan terapi antiviral yang memiliki target pada komponen utama metabolisme nukleotida dapat menjadi terapi antiviral untuk WNV yang menjanjikan di masa mendatang. Pengembangan obat antiviral terus dilakukan khususnya untuk terapi pasien dengan gangguan sistem kekebalan tubuh dan jika vaksin yang sesuai belum dihasilkan.

PERKEMBANGAN VAKSIN

Salah satu tindakan pencegahan terhadap infeksi virus adalah dengan melakukan vaksinasi. Vaksinasi dapat menjadi program eradikasi yang baik jika dikombinasikan dengan metode pengendalian lain. Beberapa sifat vaksin yang ideal memiliki sifat poten dan stabil, dosis tunggal, tidak menyebabkan efek samping yang berlebihan serta antibodi yang terbentuk dapat dibedakan dengan antibodi dari infeksi alam (Peyre et al. 2009).

Berbagai kandidat vaksin WNV masih dalam tahap pengujian. Vaksin terlisensi saat ini hanya tersedia untuk kuda, sedangkan vaksin untuk manusia seperti vaksin VLA (*live attenuated*), DNA dan platform lainnya masih dalam tahap pengembangan (Gould & Fikrig 2004). Terdapat 4 jenis vaksin untuk kuda yang tersedia di pasaran yaitu tiga vaksin inaktif utuh dan satu vaksin *live chimera* Canarypox yang mengekspresikan protein PrM dan E dari WNV (Barrett 2018). Keseluruhan vaksin tersebut membutuhkan dosis ganda pada awal pemberian dengan *booster* yang berulang setiap tahun (Kaiser & Barrett 2019).

Perkembangan vaksin WNV pada manusia masih terus berlanjut, hingga saat ini terdapat 6 buah kandidat vaksin WNV yang masih dalam tahap uji klinis. Kandidat vaksin tersebut diantaranya Hydrovax-001, *Inactivated* WNV, Chimerivax-WN02, rWN/DEN4del30, HBV-002 atau WN-80E dan VRC WNV (Ulbert 2019).

Kandidat vaksin Hydrovax-001 merupakan vaksin inaktif dengan virus utuh yang berbasis hidrogen peroksida. Kandidat vaksin ini masih dalam tahap I uji klinis pada manusia dan membutuhkan uji klinis lanjutan untuk mengetahui kemampuan imunogenitasnya. Berbeda dengan kandidat vaksin lain yang menggunakan *strain* WNV NY99, Hydrovax-001 menggunakan *strain* virus Kunjin yang telah teratenuasi secara alami. Respon antibodi dihasilkan dengan pemberian dosis berganda dari kandidat vaksin ini (Woods et al. 2019). Kandidat vaksin inaktif WNV NY99 merupakan kandidat vaksin yang telah melalui tahap uji I/II secara klinis. Kandidat vaksin ini menggunakan *strain* WNV NY99 yang berbasis

formaldehid dan berhasil menimbulkan respon imun tertinggi setelah pemberian 3 dosis (Barrett et al. 2017).

Kandidat vaksin *chimera* WNV ChimeriVax-WN02 merupakan virus *Yellow Fever* 17-D yang mengekspresikan protein PrM dan E dari WNV NY99. Kandidat vaksin ini merupakan generasi kedua dari ChimeriVax-WN dengan 3 mutasi protein E pada residu 107, 316 dan 440 yang menghasilkan peningkatan atenuasi (Arroyo et al. 2004). Vaksin ChimeriVax-WN02 mampu meningkatkan respon imun humoral pada hamster. Pada kera, vaksin ini menyebabkan viremia sementara, menginduksi antibodi netralisasi dan melindungi dari virus tantang West Nile *wild type* yang diinfeksi secara intraserebral. Vaksin chimera dapat menginduksi sel CD4⁺ dan CD8⁺ terhadap infeksi WNV pada manusia. Puncak respon antibodi diperoleh dengan dosis tunggal. Berdasarkan uji klinis fase II, kandidat vaksin ini dianggap aman dan efektif pada manusia dengan kelompok umur yang bervariasi (Monath et al. 2015; Kaiser & Barrett 2019).

Kandidat vaksin *chimera live attenuated* WNV/Dengue serotype 4 (WN/DEN4) menghasilkan respon antibodi netralisasi yang kuat dan melindungi kera dari viremia ketika dilakukan uji tantang. Vaksin ini merupakan virus *chimera* yang mendapat gen protein struktural PrM dan E dari WNV strain NY99 (Gould & Fikrig 2004). Sedangkan kandidat vaksin *chimera* rWN/DEN4delta30 merupakan vaksin *chimera* WN/DEN4 yang didapat dari 2 mekanisme yaitu chimerisasi antigenik WNV dengan non-neuroinvasive virus dengue serotipe 4 dan delesi 30 nukleotida pada 3'UTR (Pierce et al. 2017). Baik vaksin *chimera* WN/DEN4 dan rWN/DEN4delta30 dengan dosis tunggal 103 FFU menghasilkan perlindungan sebesar 90-100% ketika ditantang dengan WNV. Sedangkan dosis yang lebih tinggi (104 FFU) dari kedua vaksin chimera tersebut menghasilkan perlindungan yang lengkap terhadap uji tantang WNV (Pletnev et al. 2002). Berdasarkan uji klinis fase I, kandidat vaksin ini dianggap menjanjikan dari segi keamanan dan imunogenisitasnya (Kaiser & Barrett 2019).

Kandidat vaksin lain adalah WN-80E atau HBV-002 yang dibuat berdasarkan protein E terlarut yang tidak memiliki domain transmembran pada sistem ekspresi dalam sel *Drosophila melanogaster* dengan atau tanpa pemberian protein NS1 WNV. Vaksin ini terbukti dapat menginduksi antibodi pada beberapa hewan coba seperti hamster dan *non-human primates*. Pada uji klinis tahap I, netralisasi antibodi dicapai setelah minggu ke-2 post vaksinasi. Kandidat vaksin ini memiliki efektivitas dan imunogenisitas yang rendah pada pasien diatas umur 45 tahun (Watts et al. 2007; Siirin et al. 2008; Brandler & Tangy 2013; Kaiser & Barrett 2019).

Kandidat vaksin VRC-WNV merupakan kandidat vaksin dengan plasmid DNA yang mengekspresikan fragmen protein PrM/E WNV. Kandidat vaksin ini terdiri dari CMV-302 dan CMV 303. Kandidat CMV 302 menggunakan promotor Cytomegalovirus untuk meningkatkan ekspresi gen, sedangkan kandidat CMV 303 menggunakan promotor Human T-cell Leukemiavirus Tipe 1 untuk ekspresi gen lebih lanjut. Berdasarkan uji klinis fase I, kandidat vaksin ini menghasilkan netralisasi antibodi (> 90%) yang dicapai setelah tiga kali pemberian dosis pada kelompok usia pasien yang berbeda (Kaiser & Barrett 2019).

Kandidat vaksin lainnya yang masih dalam tahap pengembangan adalah vaksin rekombinan subunit. WNV-like *particle* dikembangkan pada sel insekta dengan menggunakan rekombinan Baculovirus yang mengekspresikan protein struktural PrM/E atau C/PrM/E WNV. Vaksin tersebut terbukti dapat menurunkan morbiditas dan mortalitas pada mencit setelah dilakukan uji tantang dengan WNV. Imunitas terhadap WNV dihasilkan tanpa disertai dengan viremia (Qiao et al. 2004). Kandidat vaksin rekombinan yang mengandung domain III protein E WNV pada vektor ekspresi *E. coli* mampu meningkatkan produksi antibodi dan menghasilkan imunitas yang protektif terhadap infeksi WNV dan encephalitis pada mencit (Chu et al. 2007). Kandidat vaksin rekombinan yang menggunakan virus Measles (MV) strain Schwars (MVSchw-sEWNV) mampu mengekspresikan protein E WNV strain virulen IS-98-ST1. Vaksin ini menghasilkan perlindungan pada mencit dari uji tantang dosis letal WNV dan mampu menghasilkan antibodi spesifik terhadap WNV (Desprès et al. 2005). Kandidat vaksin rekombinan lain (TRIP/sEWNVe) menggunakan vektor Lentivirus yang mengekspresikan protein E/PrM dari WNV strain virulen IS-98-ST1. Kandidat vaksin ini berhasil memberikan perlindungan mencit terhadap uji tantang WNV dengan dosis letal dan berhasil meningkatkan imunitas yang protektif dan tahan lama dengan dosis tunggal (Iglesias et al. 2006).

Pengembangan vaksin *chimera live attenuated* lainnya menggunakan virus JE strain SA14-14-2 sebagai *genetic backbone* yang mengekspresikan gen PrM dan E dari WNV (ChinWNV). ChinWNV menghasilkan replikasi yang efisien pada sel vero, stabilitas genetik secara *in vitro* dan profil atenuasi secara *in vivo* pada mencit. Dosis tinggi ChinWNV menghasilkan respon imun humoral yang kuat dan segera pada mencit sehingga menghasilkan perlindungan yang baik dari virus tantang West Nile yang bersifat letal (Li et al. 2013). Sedangkan pengembangan vaksin dengan virus subtype WNV-Kunjin berbasis virus DNA mampu memberikan perlindungan pada mencit terhadap uji tantang dengan

dosis letal WNV (Hall et al. 2003; Brandler & Tangy 2013).

PROSPEKTIF PENELITIAN WEST NILE VIRUS

Kasus infeksi WNV telah dideteksi di Indonesia pada tahun 2014, namun data penunjang penelitian masih sangat terbatas. Beberapa penelitian yang dilakukan di Indonesia masih difokuskan pada kejadian wabah asal manusia. Surveilans dan monitoring virus ini baik pada vektor (nyamuk), *reservoir* (burung), manusia dan hewan lain seperti kuda sangat diperlukan untuk melihat perkembangan virus ini di lapangan mengingat WNV memiliki diversifitas yang tinggi, variasi fenotip yang luar biasa, sirkulasi endemis di beberapa negara di dunia dan kemampuan mutasi yang mungkin dapat menyebabkan wabah suatu saat nanti (Rizzoli et al. 2015).

Kondisi negara Indonesia yang memiliki iklim tropis sangat mendukung perkembangbiakan vektor WNV (nyamuk) (Bartlow et al. 2019). Kedekatan antara *reservoir*-vektor-inang insidental menjadi tantangan dalam pengendalian penyakit ini di Indonesia. Selain itu, peningkatan populasi vektor dihubungkan dengan peningkatan resistensi produk insektisida yang digunakan untuk mengendalikan populasi nyamuk. Kesenjangan pengetahuan mengenai aspek penting dari virus, disertai dengan belum tersedianya vaksin dan pengobatan khusus untuk manusia membatasi kemampuan dalam memprediksi, mencegah dan mengendalikan infeksi WNV di Indonesia. Penelitian lanjutan sangat diperlukan untuk memonitoring perkembangan virus ini di lapangan serta sebagai upaya untuk penemuan vaksin dan antiviral untuk infeksi WNV di masa mendatang.

KESIMPULAN

Karakterisasi biologi protein struktural dan non-struktural virus West Nile perlu dilakukan secara berkesinambungan untuk dapat memprediksi, mencegah dan mengendalikan infeksi virus West Nile baik pada vektor, hewan peka dan manusia. Kejadian mutasi pada protein struktural dan non-struktural dapat menyebabkan peningkatan efisiensi penularan virus West Nile, namun beberapa mutasi bersifat menguntungkan dan menghasilkan atenuasi virus yang dimanfaatkan dalam pengembangan vaksin west Nile virus di masa mendatang. Pengembangan obat antiviral terus dilakukan khususnya untuk terapi pasien dengan gangguan sistem kekebalan tubuh dan jika vaksin yang sesuai belum dihasilkan.

DAFTAR PUSTAKA

- Alcalá AC, Hernández-Bravo R, Medina F, Coll DS, Zambrano JL, del Angel RM, Ludert JE. 2017. The dengue virus non-structural protein 1 (NS1) is secreted from infected mosquito cells via a non-classical caveolin-1-dependent pathway. *J Gen Virol.* 98:2088-2099.
- Alcalá AC, Palomares LA, Ludert JE. 2018. Secretion of nonstructural protein 1 of dengue virus from infected mosquito cells: facts and speculations. *J Virol.* 92:e00275-18.
- Anderson JF, Rahal JJ. 2002. Efficacy of interferon alpha-2b and ribavirin against West Nile virus in vitro. *Emerg Infect Dis.* 8:107-108.
- Armstrong PM, Vossbrinck CR, Andreadis TG, Anderson JF, Pesko KN, Newman RM, Lennon NJ, Birren BW, Ebel GD, Henn MR. 2011. Molecular evolution of West Nile virus in a northern temperate region: Connecticut, USA 1999–2008. *Virol.* 417:203-210.
- Arroyo J, Miller C, Catalan J, Myers GA, Ratterree MS, Trent DW, Monath TP. 2004. ChimeriVax-West Nile Virus live-attenuated vaccine: preclinical evaluation of safety, immunogenicity and efficacy. *J Virol.* 78:12497-12507.
- Barrett ADT. 2018. West Nile in Europe: an increasing public health problem. *J Travel Med.* 25:1-2.
- Barrett PN, Terpening SJ, Snow D, Cobb RR, Kistner O. 2017. Vero cell technology for rapid development of inactivated whole virus vaccines for emerging viral diseases. *Expert Rev Vacc.* 16:883-894.
- Bartlow AW, Manore C, Xu C, Kaufeld KA, Del Valle S, Ziemann A, Fairchild G, Fair JM. 2019. Forecasting zoonotic infectious disease response to climate change: mosquito vectors and a changing environment. *Vet Sci.* 6:40.
- Beasley DWC, Barrett ADT. 2002. Identification of neutralizing epitopes within structural domain iii of the west nile virus envelope protein. *J Virol.* 76:13097–13100.
- Beasley DWC, Whiteman MC, Zhang S, Huang CY-H, Schneider BS, Smith DR, Gromowski GD, Higgs S, Kinney RM, Barrett ADT. 2005. Envelope protein glycosylation status influences mouse neuroinvasion phenotype of genetic lineage 1 west nile virus strains. *J Virol.* 79:8339-8347.
- Beloor J, Maes N, Ullah I, Uchil P, Jackson A, Fikrig E, Lee SK, Kumar P. 2018. Small interfering rna-mediated control of virus replication in the cns is therapeutic and enables natural immunity to west nile virus. *Cell Host Microbe.* 23:549-556.
- Bhuvanathan R, Chong MK, Ng ML. 2009. Specific interaction of capsid protein and importin- α/β influences West Nile virus production. *Biochem Biophys Res Commun.* 389:63-69.
- Blázquez AB, Martín-Acebes MA, Saiz J-C. 2016. Inhibition of west nile virus multiplication in cell culture by anti-parkinsonian drugs. *Front Microbiol.* 7:296.

- Blázquez AB, Martín-Acebes MA, Saiz JC. 2015. Amino acid substitutions in the non-structural proteins 4A or 4B modulate the induction of autophagy in West Nile virus infected cells independently of the activation of the unfolded protein response. *Front Microbiol.* 5:1-9.
- Blázquez AB, Vázquez-Calvo Á, Martín-Acebes MA, Saiz JC. 2018. Pharmacological inhibition of protein kinase c reduces West Nile virus replication. *Viruses.* 10:91. doi: 10.3390/v10020091.
- Brandler S, Tangy F. 2013. Vaccines in development against West Nile virus. *Viruses.* 5:2384-2409.
- Brault AC, Huang CY-H, Langevin SA, Kinney RM, Bowen RA, Ramey WN, Panella NA, Holmes EC, Powers AM, Miller BR. 2007. A single positively selected West Nile viral mutation confers increased virogenesis in American crows. *Nat Genet.* 39:1162-1166.
- Calvert AE, Huang CY-H, Blair CD, Roehrig JT. 2012. Mutations in the West Nile prM protein affect VLP and virion secretion *in vitro*. *Virol.* 433:35-44.
- [CDC] Centers for Disease Control and Prevention. 2019. Preliminary maps & data for 2018 [Internet]. [disitasi 5 September 2019]. Tersedia dari: <https://www.cdc.gov/westnile/statsmaps/preliminarymapsdata2018/index.html>.
- Chambers T. 1990. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Ann Rev Microbiol.* 44:649-688.
- Chancey C, Grinev A, Volkova E, Rios M. 2015. The global ecology and epidemiology of West Nile virus. *Biomed Res Int.* 2015:376230. doi: 10.1155/2015/376230.
- Chang J, Wang L, Ma D, Qu X, Guo H, Xu X, Mason PM, Bourne N, Moriarty R, Gu B, Guo JT, Block TM. 2009. Novel imino sugar derivatives demonstrate potent antiviral activity against flaviviruses. *Antimicrob Agents Chemother.* 53:1501-1508.
- Chowers MY, Lang R, Nassar F, Ben-David D, Giladi M, Rubinshtein E, Itzhaki A, Mishal J, Siegmán-Igra Y, Kitzes R, Pick N, Landau Z, Wolf D, Bin H, Mendelson E, Pitlik SD, Weinberger M. 2001. Clinical characteristics of the West Nile fever outbreak, Israel, 2000. *Emerg Infect Dis.* 7:675-678.
- Chu J-HJ, Chiang C-CS, Ng M-L. 2007. Immunization of flavivirus West Nile recombinant envelope domain III protein induced specific immune response and protection against West Nile virus infection. *J Immunol.* 178:2699-2705.
- Colpitts TM, Conway MJ, Montgomery RR, Fikrig E. 2012. West Nile Virus: Biology, Transmission, and Human Infection. *Clin Microbiol Rev.* 25:635-648.
- Cook S, Holmes EC. 2006. A multigene analysis of the phylogenetic relationships among the flaviviruses (Family: Flaviviridae) and the evolution of vector transmission. *Arch Virol.* 151:309-325.
- Davis CT, Galbraith SE, Zhang S, Whiteman MC, Li L, Kinney RM, Barrett ADT. 2007. A combination of naturally occurring mutations in North American West Nile Virus nonstructural protein genes and in the 3' untranslated region alters virus phenotype. *J Virol.* 81:6111-6116.
- Deas TS, Bennett CJ, Jones SA, Tilgner M, Ren P, Behr MJ, Stein DA, Iversen PL, Kramer LD, Bernard KA, Shi PY. 2007. *In vitro* resistance selection and *in vivo* efficacy of morpholino oligomers against west nile virus. *Antimicrob Agents Chemother.* 51:2470-2482.
- Desprès P, Combredet C, Frenkiel M, Lorin C, Brahic M, Tangy F. 2005. Live Measles Vaccine Expressing the Secreted Form of the West Nile Virus Envelope Glycoprotein Protects against West Nile Virus Encephalitis. *J Infect Dis.* 191:207-214.
- Diamond MS. 2005. Development of effective therapies against West Nile virus infection. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 3:931-944.
- Diamond MS. 2009. Progress on the development of therapeutics against West Nile virus. *Antiviral Res.* 83:214-227.
- Eastwood G, Kramer LD, Goodman SJ, Cunningham AA. 2011. West Nile virus vector competency of *Culex quinquefasciatus* mosquitoes in the Galápagos Islands. *Am J Trop Med Hyg.* 85:426-433.
- Ebel GD, Carricaburu J, Young D, Bernard KA, Kramer LD. 2004. Genetic and phenotypic variation of West Nile virus in New York, 2000-2003. *Am J Trop Med Hyg.* 71:493-500.
- Ebel GD, Fitzpatrick KA, Lim PY, Bennett CJ, Deardorff ER, Jerzak GVS, Kramer LD, Zhou Y, Shi PY, Bernard KA. 2011. Nonconsensus west nile virus genomes arising during mosquito infection suppress pathogenesis and modulate virus fitness *in vivo*. *J Virol.* 85:12605-12613.
- Elshuber S. 2003. Cleavage of protein prM is necessary for infection of BHK-21 cells by tick-borne encephalitis virus. *J Gen Virol.* 84:183-191.
- Escribano-Romero E, Jiménez de Oya N, Domingo E, Saiz JC. 2017. Extinction of West Nile Virus by Favipiravir through Lethal Mutagenesis. *Antimicrob Agents Chemother.* 61:e01400-17.
- Evans JD, Seeger C. 2007. Differential Effects of Mutations in NS4B on West Nile Virus Replication and Inhibition of Interferon Signaling. *J Virol.* 81:11809-11816.
- Fall G, Di Paola N, Faye M, Dia M, Freire CC de M, Loucoubar C, Zanotto PM de A, Faye O, Sall AA. 2017. Biological and phylogenetic characteristics of West African lineages of West Nile virus. Beasley DWC, editor. *PLoS Negl Trop Dis.* 11:e0006078.
- Ferlenghi I, Clarke M, Ruttan T, Allison SL, Schlich J, Heinz FX, Harrison SC, Rey FA, Fuller SD. 2001. Molecular Organization of a Recombinant Subviral Particle from Tick-Borne Encephalitis Virus. *Mol Cell.* 7:593-602.
- Fritz R, Blazevec J, Taucher C, Pangerl K, Heinz FX, Stiasny K. 2011. The Unique Transmembrane Hairpin of Flavivirus Fusion Protein E Is Essential for Membrane Fusion. *J Virol.* 85:4377-4385.
- Gamino V, Höfle U. 2013. Pathology and tissue tropism of natural West Nile virus infection in birds: a review. *Vet Res.* 44:39. doi: 10.1186/1297-9716-44-39.
- Gea-Banacloche J, Johnson RT, Bagic A, Butman JA, Murray PR, Agrawal AG. 2004. West Nile virus:

- pathogenesis and therapeutic options. *Ann Intern Med.* 140:545-553.
- Di Giallonardo F, Geoghegan JL, Docherty DE, McLean RG, Zody MC, Qu J, Yang X, Birren BW, Malboeuf CM, Newman RM, Ip HS, Holmes EC. 2016. Fluid Spatial Dynamics of West Nile Virus in the United States: Rapid Spread in a Permissive Host Environment. *J Virol.* 90:862-872.
- Gould LH, Fikrig E. 2004. West Nile virus: a growing concern?. *J Clin Invest.* 113:1102-1107.
- Hall RA, Nisbet DJ, Pham KB, Pyke AT, Smith GA, Khromykh AA. 2003. DNA vaccine coding for the full-length infectious Kunjin virus RNA protects mice against the New York strain of West Nile virus. *Proc Natl Acad Sci.* 100:10460-10464.
- Hanna SL, Pierson TC, Sanchez MD, Ahmed AA, Murtadha MM, Doms RW. 2005. N-Linked glycosylation of West Nile virus envelope proteins influences particle assembly and infectivity. *J Virol.* 79:13262-13274.
- Hayes EB, Gubler DJ. 2006. West Nile Virus: Epidemiology and Clinical Features of an Emerging Epidemic in the United States. *Ann Rev Med.* 57:181-194.
- Hughes TP, Paul JH, Smithburn KC, Burke AW. 1940. A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *Am J Trop Med Hyg.* s1-20:471-492.
- Hunt TA, Urbanowski MD, Kakani K, Law L-MJ, Brinton MA, Hobman TC. 2007. Interactions between the West Nile virus capsid protein and the host cell-encoded phosphatase inhibitor, I 2 PP2A. *Cell Microbiol.* 9:2756-2766.
- Iglesias MC, Frenkiel MP, Mollier K, Souque P, Despres P, Charneau P. 2006. A single immunization with a minute dose of a lentiviral vector-based vaccine is highly effective at eliciting protective humoral immunity against West Nile virus. *J Gene Med.* 8:265-274.
- Iyer A, Kousoulas K. 2013. A Review of Vaccine Approaches for West Nile Virus. *Int J Environ Res Public Health.* 10:4200-4223.
- Jordan I, Briesse T, Fischer N, Lau JY, Lipkin WI. 2000. Ribavirin Inhibits West Nile Virus Replication and Cytopathic Effect in Neural Cells. *J Infect Dis.* 182:1214-1217.
- Kaiser JA, Barrett ADT. 2019. Twenty years of progress toward West Nile virus vaccine development. *Viruses.* 11:823. doi: 10.3390/v11090823.
- Kalil AC, Devetten MP, Singh S, Lesiak B, Poage DP, Bargenquast K, Fayad P, Freifeld AG. 2005. Use of Interferon- in Patients with West Nile Encephalitis: Report of 2 Cases. *Clin Infect Dis.* 40:764-766.
- Karothia D, Dash PK, Parida M, Bhagyawant S, Kumar JS. 2018. Inhibition of West Nile virus Replication by Bifunctional siRNA Targeting the NS2A and NS5 Conserved Region. *Curr Gene Ther.* 18:180-190.
- Krishnan M, Garcia-Blanco M. 2014. Targeting host factors to treat West Nile and dengue viral infections. *Viruses.* 6:683-708.
- Laurent-Rolle M, Boer EF, Lubick KJ, Wolfenbarger JB, Carmody AB, Rockx B, Liu W, Ashour J, Shupert WL, Holbrook MR, Barrett AD, Mason PW, Bloom ME, García-Sastre A, Khromykh AA, Best SM. 2010. The NS5 protein of the virulent West Nile virus NY99 strain is a potent antagonist of type I interferon-mediated JAK-STAT signaling. *J Virol.* 84:3503-3515.
- Li L, Lok S-M, Yu I-M, Zhang Y, Kuhn RJ, Chen J, Rossmann MG. 2008. The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: Structure and maturation. *Science.* 319:1830-1834.
- Li XF, Deng YQ, Yang HQ, Zhao H, Jiang T, Yu XD, Li SH, Ye Q, Zhu SY, Wang HJ, Zhang Y, Ma J, Yu YX, Liu ZY, Li YH, Qin ED, Shi PY, Qin CF. 2013. A chimeric dengue virus vaccine using Japanese encephalitis virus vaccine strain SA14-14-2 as backbone is immunogenic and protective against either parental virus in mice and nonhuman primates. *J Virol.* 87:13694-13705.
- Lim PY, Keating JA, Hoover S, Striker R, Bernard KA. 2011. A thiopurine drug inhibits west nile virus production in cell culture, but not in mice. *PLoS One.* 6:e26697. doi: 10.1371/journal.pone.0026697.
- Lim S, Shi P-Y. 2013. West Nile virus drug discovery. *Viruses.* 5:2977-3006.
- Liu WJ, Wang XJ, Clark DC, Lobigs M, Hall RA, Khromykh AA. 2006. A single amino acid substitution in the West Nile virus nonstructural protein NS2A disables its ability to inhibit alpha/beta interferon induction and attenuates virus virulence in mice. *J Virol.* 80:2396-2404.
- Londono-Renteria B, Colpitts TM. 2016. A brief review of West Nile virus biology. *Methods Mol Biol.* 1435:1-13.
- Lorenz IC, Allison SL, Heinz FX, Helenius A. 2002. Folding and Dimerization of Tick-Borne Encephalitis Virus Envelope Proteins prM and E in the Endoplasmic Reticulum. *J Virol.* 76:5480-5491.
- Luo Y, Guo X, Yan H, Fang D, Zeng G, Zhou J, Jiang L. 2015. Comprehensive mapping infection-enhancing epitopes of dengue pr protein using polyclonal antibody against prM. *Appl Microbiol Biotechnol.* 99:5917-5927.
- Lustig Y, Sofer D, Burris ED, Mendelson E. 2018. Surveillance and diagnosis of West Nile virus in the face of flavivirus cross-reactivity. *Front Microbiol.* 9:2421. doi: 10.3389/fmicb.2018.02421.
- Mackenzie JM, Khromykh AA, Parton RG. 2007. Cholesterol manipulation by West Nile virus perturbs the cellular immune response. *Cell Host Microbe.* 2:229-239.
- MacLachlan NJ, Dubovi EJ, Barthold SW, Swayne DE, Winton JR. 2017. *Flaviviridae. Dalam: Fenner's Veterinary Virology.* Amsterdam (Belanda): Elsevier. p. 525-545.
- van Marle G, Antony J, Ostermann H, Dunham C, Hunt T, Halliday W, Maingot F, Urbanowski MD, Hobman T, Peeling J, Power C. 2007. West nile virus-induced neuroinflammation: Glial infection and capsid protein-mediated neurovirulence. *J Virol.* 81:10933-10949.
- Martin-Acebes MA. 2012. West Nile virus: A re-emerging pathogen revisited. *World J Virol.* 1:51-70.

- Martín-Acebes MA, Blázquez AB, Jiménez de Oya N, Escribano-Romero E, Saiz JC. 2011. West Nile virus replication requires fatty acid synthesis but is independent on phosphatidylinositol-4-phosphate lipids. *PLoS One*. 6:e24970. doi: 10.1371/journal.pone.0024970.
- Martin-Acebes MA, Saiz J-C. 2011. A West Nile virus mutant with increased resistance to acid-induced inactivation. *J Gen Virol*. 92:831-840.
- Michaelis M, Kleinschmidt MC, Doerr HW, Cinatl J. 2007. Minocycline inhibits West Nile virus replication and apoptosis in human neuronal cells. *J Antimicrob Chemother*. 60:981-986.
- Monath TP. 2006. Prospects for development of a vaccine against the West Nile virus. *Ann N Y Acad Sci*. 951:1-12.
- Monath TP, Seligman SJ, Robertson JS, Guy B, Hayes EB, Condit RC, Excler JL, Mac LM, Carbery B, Chen RT. 2015. Live virus vaccines based on a yellow fever vaccine backbone: Standardized template with key considerations for a risk/benefit assessment. *Vaccine*. 33:62-72.
- Morrey JD, Day CW, Julander JG, Blatt LM, Smeeth DF, Sidwell RW. 2004. Effect of interferon-alpha and interferon-inducers on West Nile virus in mouse and hamster animal models. *Antivir Chem Chemother*. 15:67-75.
- Murgue B, Zeller H, Deubel V. 2002. The ecology and epidemiology of West Nile virus in Africa, Europe and Asia. *Curr Top Microbiol Immunol*. 267:195-221.
- Murray KO, Mertens E, Desprès P. 2010. West Nile virus and its emergence in the United States of America. *Vet Res*. 41:67. doi: 10.1051/vetres/2010039.
- Myint KSA, Kosasih H, Artika IM, Perkasa A, Puspita M, Ma'roef CN, Antonjaya U, Ledermann JP, Powers AM, Alisjahbana B. 2014. Short report: West Nile virus documented in Indonesia from acute febrile illness specimens. *Am J Trop Med Hyg*. 90:260-262.
- Nelson S, Jost CA, Xu Q, Ess J, Martin JE, Oliphant T, Whitehead SS, Durbin AP, Graham BS, Diamond MS, Pierson TC. 2008. Maturation of West Nile Virus Modulates Sensitivity to Antibody-Mediated Neutralization. Buchmeier MJ, editor. *PLoS Pathog*. 4:e1000060. doi: 10.1051/vetres/2010039.
- Nurcahyani D. 2014. 12 Warga Surabaya terinfeksi virus West Nile [Internet]. [diakses pada 6 Januari 2019]. Tersedia dari: <https://lifestyle.okezone.com/read/2014/01/09/82/924113/12-warga-surabaya-terinfeksi-virus-west-nile>.
- Ostlund EN, Crom RL, Pedersen DD, Johnson DJ, Williams WO, Schmitt BJ. 2001. Equine West Nile Encephalitis, United States. *Emerg Infect Dis*. 7:665-669.
- Pachler K, Lebl K, Berer D, Rudolf I, Hubalek Z, Nowotny N. 2014. Putative new West Nile virus lineage in *Uranotaenia unguiculata* Mosquitoes, Austria, 2013. *Emerg Infect Dis*. 20:2119-2122.
- Petersen LR, Brault AC, Nasci RS. 2013. West Nile virus: Review of the literature. *JAMA*. 310:308-315.
- Peyre M, Fusheng G, Desvaux S, Roger F. 2009. Avian influenza vaccines: A practical review in relation to their application in the field with a focus on the Asian experience. *Epidemiol Infect*. 137:1-21.
- Pierce KK, Whitehead SS, Kirkpatrick BD, Grier PL, Jarvis A, Kenney H, Carmolli MP, Reynolds C, Tibery CM, Lovchik J, et al. 2017. A live attenuated chimeric West Nile Virus vaccine, rWN/DEN4Δ30, is well tolerated and immunogenic in Flavivirus-Naïve older adult volunteers. *J Infect Dis*. 215:52-55.
- Pletnev AG, Putnak R, Speicher J, Wagar EJ, Vaughn DW. 2002. West Nile virus/dengue type 4 virus chimeras that are reduced in neurovirulence and peripheral virulence without loss of immunogenicity or protective efficacy. *Proc Natl Acad Sci*. 99:3036-3041.
- Pliego Zamora A, Edmonds JH, Reynolds MJ, Khromykh AA, Ralph SJ. 2016. The in vitro and in vivo antiviral properties of combined monoterpene alcohols against West Nile virus infection. *Virology*. 495:18-32.
- Pokidysheva E, Zhang Y, Battisti AJ, Bator-Kelly CM, Chipman PR, Xiao C, Gregorio GG, Hendrickson WA, Kuhn RJ, Rossmann MG. 2006. Cryo-EM reconstruction of dengue virus in complex with the carbohydrate recognition domain of DC-SIGN. *Cell*. 124:485-493.
- Qiao M, Ashok M, Bernard KA, Palacios G, Zhou ZH, Lipkin WI, Liang TJ. 2004. Induction of sterilizing immunity against West Nile virus (WNV), by immunization with WNV-Like particles produced in insect cells. *J Infect Dis*. 190:2104-2108.
- Qing M, Yang F, Zhang B, Zou G, Robida JM, Yuan Z, Tang H, Shi PY. 2009. Cyclosporine inhibits flavivirus replication through blocking the interaction between host cyclophilins and viral NS5 protein. *Antimicrob Agents Chemother*. 53:3226-3235.
- Qing M, Zou G, Wang Q-Y, Xu HY, Dong H, Yuan Z, Shi P-Y. 2010. Characterization of dengue virus resistance to brequinar in cell culture. *Antimicrob Agents Chemother*. 54:3686-3695.
- Rice CM, Halevy M, Lustig S, Chambers TJ, Nestorowicz A. 1998. West Nile virus envelope proteins: Nucleotide sequence analysis of strains differing in mouse neuroinvasiveness. *J Gen Virol*. 79:2375-2380.
- Rizzoli A, Jiménez-Clavero M, Barzon L, Cordioli P, Figuerola J, Koraka P, Martina B, Moreno A, Nowotny N, Pardigon N, Sanders N, Ulbert S, Tenorio A. 2015. The challenge of West Nile virus in Europe: Knowledge gaps and research priorities. *Eurosurveillance*. 20:21135.
- Rosenberg R, Lindsey NP, Fischer M, Gregory CJ, Hinckley AF, Mead PS, Paz-Bailey G, Waterman SH, Drexler NA, Kersh GJ, et al. 2018. Vital signs: Trends in reported vectorborne disease cases — United States and territories, 2004-2016. *Morb Mortal Wkly Rep*. 67:496-501.
- Samuel MA, Diamond MS. 2005. Alpha/beta interferon protects against lethal West Nile virus infection by restricting cellular tropism and enhancing neuronal survival. *J Virol*. 79:13350-13361.

- Setoh YX, Prow NA, Hobson-Peters J, Lobigs M, Young PR, Khromykh AA, Hall RA. 2012. Identification of residues in West Nile virus pre-membrane protein that influence viral particle secretion and virulence. *J Gen Virol.* 93:1965-1975.
- Shiryaev SA, Chernov AV, Aleshin AE, Shiryaeva TN, Strongin AY. 2009. NS4A regulates the ATPase activity of the NS3 helicase: A novel cofactor role of the non-structural protein NS4A from West Nile virus. *J Gen Virol.* 90:2081-2085.
- Siirin MT, Travassos Da Rosa APA, Newman P, Weeks-Levy C, Collier BA, Xiao SY, Lieberman MM, Watts DM. 2008. Evaluation of the efficacy of a recombinant subunit West Nile vaccine in Syrian golden hamsters. *Am J Trop Med Hyg.* 79:955-962.
- Szentpáli-Gavallér K, Lim S, Dencső L, Bányai K, Koraka P, Osterhaus A, Martina B, Bakonyi T, Bálint Á. 2016. In vitro and in vivo evaluation of mutations in the NS region of lineage 2 West Nile virus associated with neuroinvasiveness in a mammalian model. *Viruses.* 8:49.
- Tan TTT, Bhuvanankantham R, Li J, Howe J, Ng M-L. 2009. Tyrosine 78 of pre-membrane protein is essential for assembly of West Nile virus. *J Gen Virol.* 90:1081-1092.
- Ulbert S. 2019. West Nile virus vaccines – current situation and future directions. *Hum Vaccin Immunother.* 15:2337-2342.
- Urbanowski MD, Hobman TC. 2013. The West Nile virus capsid protein blocks apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. *J Virol.* 87:872-881.
- Venter M, Steyl J, Human S, Weyer J, Zaayman D, Blumberg L, Leman PA, Paweska J, Swanepoel R. 2010. Transmission of West Nile virus during horse autopsy. *Emerg Infect Dis.* 16:573-575.
- Wang T, Anderson JF, Magnarelli LA, Bushmich S, Wong S, Koski RA, Fikrig E. 2001. West Nile virus envelope protein: Role in diagnosis and immunity. *Ann N Y Acad Sci.* 951:325-327.
- Watts R, Lane S, Hanslik T, Hauser T, Hellmich B, Koldingsnes W, Mahr A, Segelmark M, Cohen-Tervaert JW, Scott D. 2007. Development and validation of a consensus methodology for the classification of the ANCA-associated vasculitides and polyarteritis nodosa for epidemiological studies. *Ann Rheum Dis.* 66:222-227.
- Whiteman MC, Li L, Wicker JA, Kinney RM, Huang C, Beasley DWC, Chung KM, Diamond MS, Solomon T, Barrett ADT. 2010. Development and characterization of non-glycosylated E and NS1 mutant viruses as a potential candidate vaccine for West Nile virus. *Vaccine.* 28:1075-1083.
- Whiteman MC, Popov V, Sherman MB, Wen J, Barrett ADT. 2015. Attenuated West Nile virus mutant NS1 130-132QQA/175A/207A exhibits virus-induced ultrastructural changes and accumulation of protein in the endoplasmic reticulum. *J Virol.* 89:1474-1478.
- Wicker JA, Whiteman MC, Beasley DWC, Davis CT, McGee CE, Lee JC, Higgs S, Kinney RM, Huang CYH, Barrett ADT. 2012. Mutational analysis of the West Nile virus NS4B protein. *Virology.* 426:22-33.
- Wicker JA, Whiteman MC, Beasley DWC, Davis CT, Zhang S, Schneider BS, Higgs S, Kinney RM, Barrett ADT. 2006. A single amino acid substitution in the central portion of the West Nile virus NS4B protein confers a highly attenuated phenotype in mice. *Virology.* 349:245-253.
- Woods CW, Sanchez AM, Swamy GK, McClain MT, Harrington L, Freeman D, Poore EA, Slifka DK, Poer DeRaad DE, Amanna IJ, Slifka MK, Cai S, Shahamatdar V, Wierzbicki MR, Amegashie C, Walter EB. 2019. An observer blinded, randomized, placebo-controlled, phase I dose escalation trial to evaluate the safety and immunogenicity of an inactivated West Nile virus vaccine, HydroVax-001, in healthy adults. *Vaccine.* 37:4222-4230.
- Yu L, Takeda K, Gao Y. 2017. Characterization of virus-specific vesicles assembled by West Nile virus non-structural proteins. *Virology.* 506:130-140.
- Zehender G, Veo C, Ebranati E, Carta V, Rovida F, Percivalle E, Moreno A, Lelli D, Calzolari M, Lavazza A, Chiapponi C, Baioni L, Capelli G, Ravagnan S, Da Rold G, Lavezzo E, Palù G, Baldanti F, Barzon L, Galli M. 2017. Reconstructing the recent West Nile virus lineage 2 epidemic in Europe and Italy using discrete and continuous phylogeography. *PLoS One.* 12:e0179679.
- Zhang L, Zhang Z, Weng Z. 2013. Rapid reassortment of internal genes in avian influenza A (H7N9) virus. *Clin Infect Dis.* 57:1059-1061.
- Zhang S, Li L, Woodson SE, Huang CYH, Kinney RM, Barrett ADT, Beasley DWC. 2006. A mutation in the envelope protein fusion loop attenuates mouse neuroinvasiveness of the NY99 strain of West Nile virus. *Virol.* 353:35-40.
- Zhang X, Jia R, Shen H, Wang M, Yin Z, Cheng A. 2017. Structures and functions of the envelope glycoprotein in flavivirus infections. *Viruses.* 9:338.
- Zhang Y. 2003. Structures of immature flavivirus particles. *EMBO J.* 22:2604-2613.
- Zhang Y, Kaufmann B, Chipman PR, Kuhn RJ, Rossmann MG. 2007. Structure of Immature West Nile Virus. *J Virol.* 81:6141-6145.
- Zhou Y, Ray D, Zhao Y, Dong H, Ren S, Li Z, Guo Y, Bernard KA, Shi P-Y, Li H. 2007. Structure and Function of Flavivirus NS5 Methyltransferase. *J Virol.* 81:3891-3903.
- Zohaib A, Niazi SK, Saqib M, Sajid MS, Khan I, Sial A-R, Athar MA, Taj Z, Abbas G, Rathore MA, et al. 2019. Detection of West Nile virus lineage 1 sequences in blood donors, Punjab Province, Pakistan. *Int J Infect Dis.* 81:137-139.
- Zou G, Zhang B, Lim P-Y, Yuan Z, Bernard KA, Shi P-Y. 2009. Exclusion of West Nile Virus Superinfection through RNA Replication. *J Virol.* 83:11765-11776.
- Zybert IA, van der Ende-Metselaar H, Wilschut J, Smit JM. 2008. Functional importance of dengue virus maturation: Infectious properties of immature virions. *J Gen Virol.* 89:3047-3051.

Penyakit Koksidiosis pada Sapi di Indonesia dan Perkembangan Teknik Diagnosisnya

(Coccidiosis Disease in Cattle in Indonesia and Development of Diagnostic Techniques)

Fitrine Ekawasti dan AH Wardhana

Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl. RE Martadinata No. 30, Bogor 16114

Kontributor utama: fitineekawasti@gmail.com

(Diterima 31 Juli 2019 – Direvisi 20 Agustus 2019 – Disetujui 4 September 2019)

ABSTRACT

Coccidiosis is a parasitic disease caused by the protozoan of the order Coccidia, the family Eimeriidae of the genus *Eimeria* which breeds rapidly in the digestive tract and is the most difficult disease to be controlled on cattle farms. *Eimeria* spp. in cattle can cause high economic losses and increase susceptibility against infectious diseases. Therefore, coccidiosis in cattle needs attention from the government. This paper describes a number of diagnostic methods that can be used in the detection of *Eimeria* spp. in cattle based on the goals and objectives of the examination. The coccidiosis cases often do not show any clinical symptoms but can cause sudden death in livestock. The diagnostic method that still used at present is based on its morphology that should not be used in identifying *Eimeria* species because the morphological characteristics *Eimeria* spp. have similar shape and size structures between species (resembling morphology). An appropriate diagnostic method for *Eimeria* is needed in the context of controlling coccidiosis strategically.

Key words: Diagnose, coccidiosis, *Eimeria* spp., cattle, Indonesia

ABSTRAK

Koksidiosis merupakan penyakit parasitik yang disebabkan oleh protozoa ordo *Koksidia*, famili *Eimeriidae* genus *Eimeria* yang cepat berkembang biak di saluran pencernaan dan paling sulit dikendalikan di peternakan sapi dibandingkan dengan protozoa gastrointestinal lainnya. Infestasi *Eimeria* spp. pada sapi dapat menimbulkan kerugian ekonomi yang tinggi dan dapat meningkatkan kerentanan terhadap adanya infeksi penyakit menular lainnya sehingga penyakit koksidiosis pada sapi perlu mendapat perhatian dari pemerintah. Tulisan ini mengulas tentang koksidiosis pada sapi dan beberapa metode diagnosis yang dapat digunakan dalam deteksi *Eimeria* spp. pada sapi sesuai dengan sasaran dan tujuan pemeriksaan. Kasus koksidiosis sering tidak menunjukkan gejala klinis dan tiba-tiba dapat langsung menyebabkan kematian ternak. Metode diagnosis yang masih sering digunakan sampai saat ini adalah identifikasi morfologi yang sebenarnya tidak dapat dijadikan acuan dalam identifikasi spesies *Eimeria*, karena karakteristik morfologi *Eimeria* spp. memiliki struktur bentuk dan ukuran yang mirip antar spesies (*resembling morphology*). Diperlukan metode diagnosis spesies *Eimeria* yang tepat dalam rangka strategi pengendalian penyakit koksidiosis.

Kata kunci: Diagnosis, koksidiosis, *Eimeria* spp. sapi, Indonesia

PENDAHULUAN

Ternak sapi potong di Indonesia merupakan salah satu komoditas peternakan yang menjadi tumpuan pemerintah dalam rangka memenuhi kebutuhan protein hewani per kapita di Indonesia. Direktorat Jendral Peternakan dan Kesehatan Hewan menyebutkan bahwa populasi sapi potong di Indonesia mengalami peningkatan dari tahun ke tahun. Data statistika menunjukkan populasi sapi pada tahun 2018 mencapai 17.050.000 ekor (Kementan RI 2018). Kendati demikian, pemerintah Indonesia masih terus berusaha untuk meningkatkan populasi sapi potong dengan

mengimplementasikan Upaya Khusus Sapi Indukan Wajib Bunting (UPSUS SIWAB).

Manajemen pemeliharaan sapi potong tidak lepas dari kendala yang berpotensi menghambat produksi daging ataupun menurunkan daya reproduksi ternak, seperti gangguan kesehatan akibat penyakit tertentu. Jonsson et al. (2011) dan Lassen et al. (2014) melaporkan bahwa salah satu penyakit yang sering dijumpai pada industri sapi potong adalah koksidiosis, yaitu penyakit parasitik pada saluran pencernaan yang disebabkan oleh *Eimeria* spp. Parasit ini mampu menyebabkan diare akut dan sekitar 75% kasus koksidiosis pada pedet berakhir dengan kematian (Dauguschies & Najdrowski 2005; Bruhn et al. 2011).

Ekawasti et al. (2019) melaporkan prevalensi koksidiosis di Banten mencapai 63,9% pada pedet, 75% pada sapi berumur 1 – 2 tahun dan 42,3% pada sapi berumur lebih 2 tahun. Sebagian besar kasus koksidiosis disebabkan oleh jenis *Eimeria* patogen, yaitu *Eimeria bovis* dan *E. zuerni*.

Eimeria spp. adalah salah satu protozoa saluran pencernaan yang susah untuk dikendalikan di industri peternakan. Penyakit ini dilaporkan mampu mempengaruhi pertumbuhan, produktivitas serta tingkat morbiditas dan mortalitas ternak (Astuti et al. 2011; Marquez 2014). Sejauh ini, lebih dari 20 spesies *Eimeria* yang telah diidentifikasi pada ternak dan 13 diantaranya menyerang sapi, yaitu *E. alabamensis*, *E. auburnensis*, *E. bovis*, *E. brasiliensis*, *E. bukidnonensis*, *E. canadensis*, *E. cylindrica*, *E. ellipsoidalis*, *E. illinoisensis*, *E. pellita*, *E. subspherica*, *E. wyomingensis* dan *E. zuernii* (Sanchez et al. 2008; Bruhn et al. 2011). Adapun spesies *Eimeria* spp. pada sapi yang memiliki tingkat patogenitas tinggi adalah *E. bovis* dan *E. zuernii* karena kedua spesies tersebut dapat menyebabkan kematian, terutama pada ternak muda (Rehman et al. 2011; Koutny et al. 2012).

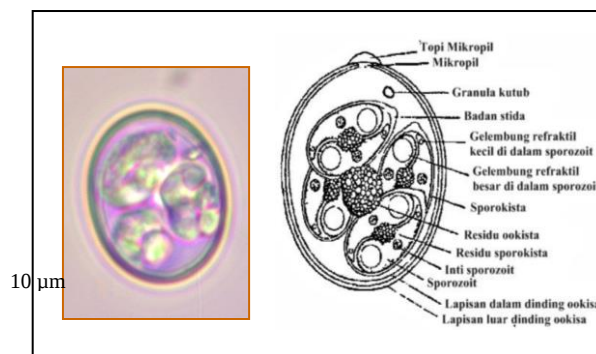
Walaupun *Eimeria* spp. yang non patogen tidak menimbulkan kematian, namun spesies-spesies tersebut menyebabkan kerusakan pada jaringan sehingga meningkatkan kepekaan terhadap infeksi penyakit menular lainnya. Ekawasti et al. (2019) menyatakan bahwa koksidiosis berpotensi sebagai pembuka pintu terhadap agen-agen penyakit lainnya, seperti virus, bakteri, jamur atau parasit lainnya. Oleh karena itu, manajemen strategi pengendalian koksidiosis pada industri peternakan harus diperhatikan, terutama melakukan deteksi untuk mengetahui spesies *Eimeria* yang berdistribusi di peternakan tersebut. Strategi pengendalian yang kurang tepat akan meningkatkan kasus koksidiosis karena oosista akan terus mencemari lingkungan dan berpotensi menjadi sumber penularan bagi ternak, khususnya ternak muda.

Teknik diagnosis yang akurat juga memegang peranan penting dalam strategi pencegahan dan

pengendalian koksidiosis pada sapi (Heidari & Gharekhani 2014). Selama ini, diagnosis koksidiosis di lapang banyak berdasarkan teknik parasitologis, yaitu menggunakan uji apung (*whitlock*) dengan melakukan pengamatan morfologi dibawah mikroskop. (Ananta et al. 2014; Hamid et al. 2016). Namun demikian, teknik ini memiliki beberapa kelemahan karena karakteristik morfologi antar spesies *Eimeria* mempunyai ciri bentuk dan ukuran yang hamper sama (Sánchez et al. 2008). Oleh karena itu, para peneliti mengembangkan beberapa modifikasi teknik pemeriksaan spesies *Eimeria* baik secara parasitologis maupun molekuler untuk meningkatkan sensitivitas dan spesifisitas teknik diagnosis yang digunakan di laboratorium. Tulisan ini mengulas tentang penyakit koksidiosis pada sapi di Indonesia dan beberapa pengembangan teknik deteksi *Eimeria* spesies yang mulai banyak digunakan dinegara-negara maju dan sedang berkembang.

EIMERIA SPP. PADA SAPI

Eimeria spp. merupakan protozoa *obligate intracellular* yang menyerang sel-sel epitel dan kelenjar-kelenjar pada saluran pencernaan sehingga menyebabkan koksidiosis pada hewan (Makau 2014). Oosista *Eimeria* spp. berbentuk bulat, ovoid dan elips dengan permukaan dinding oosista halus, homogen, dan transparan. Umumnya oosista tidak berwarna, namun beberapa diantaranya mempunyai warna kuning muda (Gambar 1). Ukuran panjang oosista *Eimeria* spp. berkisar antara 10 sampai 50 μ m dan memiliki *shell refractil*. Beberapa spesies memiliki granula kutub, oosista dan mikrofil atau pori kecil di salah satu ujung yang tertutup oleh topi mikrofil. Setiap oosista dari spesies *Eimeria* mempunyai 4 sporosista dan masing-masing sporosista terdiri atas 2 sporozoit. Sporozoit berisi inti sporozoit, gelembung *refractil* yang jernih dari bahan protein, residu sporosista dan badan stida terdapat pada ujung sporozoit (Gambar 1; Dauschies & Najdrowski 2005).



Gambar 1. Struktur oosista *Eimeria* spp. bersporulasi

Sumber: Florião et al. 2016 (Modifikasi)

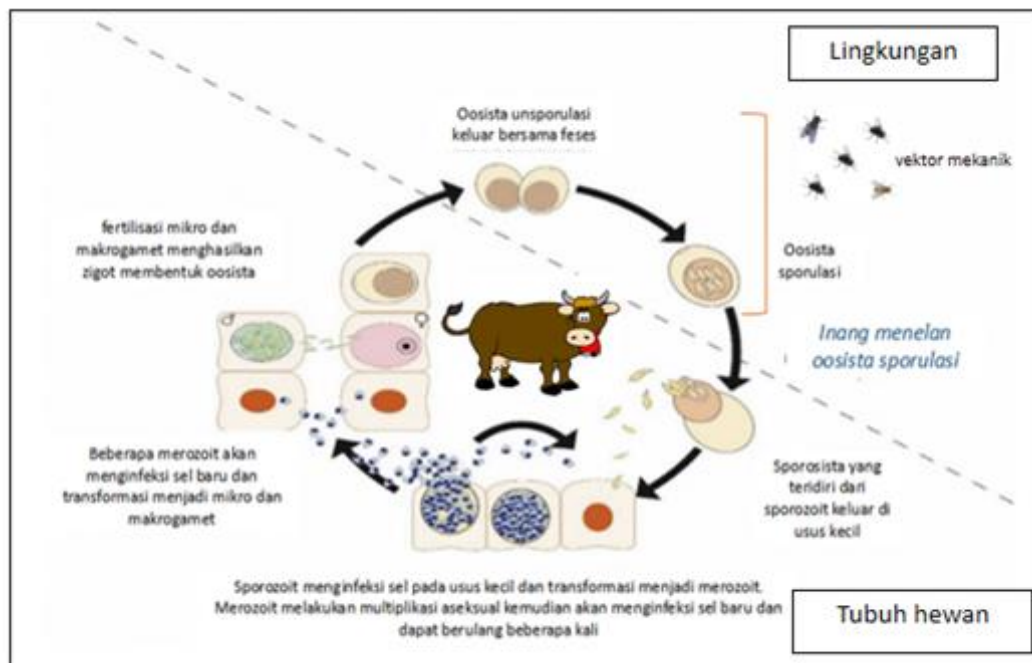
Perbedaan beberapa spesies *Eimeria* ditentukan menurut bentuk, ukuran, warna oosista, waktu dan tempat sporulasi, keberadaan mikrofil dan ketebalan dinding oosista serta karakter fisiologisnya. Struktur oosista *Eimeria* spp. yang telah bersporulasi dapat dilihat pada Gambar 1. Bentuk dan ukuran *Eimeria* spp. mirip satu sama lain sehingga sulit diidentifikasi secara mikroskopis. Struktur internal dari oosista yang telah sporulasi merupakan ciri yang dapat digunakan untuk membedakan *Eimeria* dengan protozoa dari famili *Eimeriidae* yang lainnya seperti isospora (Oluwadare 2004).

Siklus hidup *Eimeria* spp. terjadi di dalam tubuh inang (endogenus) dan di lingkungan (eksogenus) (Gambar 2). *Eimeria* spp. hanya membutuhkan inang tunggal untuk melengkapi seluruh proses siklus hidupnya yang bersifat langsung. Parasit ini tidak memerlukan vektor biologis untuk perkembangbiakannya, tetapi vektor mekanik seperti lalat atau insekta lainnya dilaporkan membantu dalam menyebarkan oosista infeksi dari tinja ke lingkungan yang baru (Indraswari et al. 2017).

Siklus hidup *Eimeria* spp terdiri atas skizogoni, gametogoni dan sporogoni. Fase siklus hidup ini *Eimeria* spp. dimulai dari tertelannya oosista infeksi oleh ternak melalui air minum atau pakan yang terkontaminasi (Indraswari et al. 2017). Selanjutnya, dinding oosista *Eimeria* spp. pecah dan melepaskan sporosista, kemudian sporozoit yang ada di dalam

sporosista diaktifkan oleh tripsin agar keluar dari sporosista untuk mengalami fase perbanyakan/multiplikasi secara aseksual (skizogoni) di usus halus. Sporozoit menginfeksi sel epitel usus dan membulat menjadi meront dan memulai fase seksual (gametogoni) menjadi gametosit jantan (mikrogamet) dan betina (makrogamet). Mikrogamet dan makrogamet mengalami proses fertilisasi untuk menghasilkan zigot. Zigot akan terlapisi dinding sista membentuk oosista yang akan keluar melalui tinja ke lingkungan dan mengalami sporulasi pada kondisi optimal membentuk oosista infeksi di lingkungan (Makau 2014; Keeton & Navarre 2018).

Tahap sporulasi (sporogoni) terjadi di luar tubuh inang dengan waktu sporulasi selama beberapa hari hingga beberapa minggu tergantung pada spesies, ketersediaan oksigen, kelembaban dan suhu. Selama proses sporulasi, sitoplasma sel akan rusak dan terjadi perkembangan sporozoit di dalam sporosista (Lassen & Jarvis 2009; Makau 2014; Keeton & Navarre 2018). Oosista infeksi memiliki protoplasma yang mengandung massa nukleus dengan dinding pelindung yang tahan terhadap pengaruh fisik, kimia ataupun terhadap aktivitas bakteri di lingkungan (Lassen & Jarvis 2009). Oosista *Eimeria* spp. infeksi (berspora) dapat bertahan dalam waktu yang lama di bawah kondisi lingkungan baik ataupun ekstrim (Lassen et al. 2014; Indraswari et al. 2017).



Gambar 2. Siklus hidup *Eimeria* spp

Sumber: Keeton & Navarre 2018 (modifikasi)

Faktor predisposisi

Faktor pendukung yang dapat mempengaruhi kejadian koksidirosis dengan variasi gejala klinis, yaitu jumlah oosista yang tertelan, keadaan hewan dan lingkungan (Maas 2007; Makau 2014). Jika jumlah oosista per gram (OPG) tinja diatas 5.000 oosista yang tertelan, maka dapat menimbulkan gejala klinis koksidirosis pada sapi (Bangoura et al. 2012).

Faktor hewan

Tingkat kejadian koksidirosis dipengaruhi oleh kondisi atau karakter hewan seperti ras, umur dan jenis kelamin (Malek & Kuraa 2018). *Bovine Eimeria* umumnya dapat menginfeksi semua ras sapi (Makau 2014), namun pada kejadian koksidirosis di Nigeria, sapi potong memiliki nilai prevalensi lebih tinggi dibanding sapi perah (Oluwadare 2004). Laporan lain menyebutkan bahwa koksidirosis lebih tinggi dibandingkan dengan jenis ras sapi lainnya di Brazil (Bruhn et al. 2011). Ditinjau dari status biologisnya, umur anak sapi kurang dari satu tahun, mulai dari usia 3 minggu sampai 6 bulan lebih rentan terinfeksi *Eimeria* spp. karena tingkat imunitasnya yang masih rendah sehingga mudah tertular dari sapi yang lebih dewasa apabila dicampurkan dalam satu kandang (Bruhn et al. 2011; Davoudi et al. 2011; Heidari & Gharekhani 2014). Oosista mulai dapat ditemukan pada tinja pedet umur 5 minggu dengan prevalensi infeksi mencapai 20-35% dan meningkat hingga 60-70% pada pedet berumur 7 minggu (Matsubayashi et al. 2009). Sapi dewasa umumnya relatif lebih tahan dari koksidirosis karena telah memiliki tingkat kekebalan (imunitas) yang cukup dari paparan infeksi *Eimeria* spp. sebelumnya sehingga sistem imunitas meningkat secara sempurna (Heidari & Gharekhani 2014). Sapi betina dilaporkan lebih rentan terhadap infeksi *Eimeria* spp. dibanding sapi jantan (Khan et al. 2013; Fitriastuti et al. 2011). Kondisi ini terkait dengan keadaan fisiologis, stress dan berhubungan dengan masa kebuntingan atau kelahiran (Manya et al. 2008). Namun pada daerah tertentu, kejadian koksidirosis lebih tinggi pada sapi jantan dibanding sapi betina (Dawid et al. 2012; Doviansyah 2015; Sufi et al. 2016), karena kandang sapi jantan relatif jarang dibersihkan dibandingkan dengan kandang sapi betina yang selalu dibersihkan pada saat pemerahan (Doviansyah 2015).

Faktor lingkungan

Faktor lingkungan yang terdiri dari kondisi musim atau iklim (suhu dan kelembaban) dan manajemen peternakan dapat mempengaruhi tingkat prevalensi kejadian koksidirosis (Matsubayashi et al. 2009).

Koksidirosis sering terjadi pada musim dingin atau hujan dibandingkan dengan musim kering (Makau 2014), karena memiliki suhu dan kelembaban yang cocok terhadap perkembangan oosista infeksi (Lassen & Jarvis 2009; Keeton & Navarre 2018).

Pola manajemen pemeliharaan dan perkandangan juga sangat mempengaruhi angka prevalensi kejadian koksidirosis, seperti kepadatan kandang, kepadatan populasi di area penggembalaan, kadar oksigen dan pencahayaan dalam kandang, sanitasi, drainase, sistem pemberian pakan dan sumber air minum (Bangoura et al. 2012). Prevalensi infeksi dan intensitas infestasi *Eimeria* spp. lebih tinggi pada sapi yang digembalakan dibandingkan sapi yang dikandangkan, karena resiko kontaminasi *Eimeria* spp. lebih kecil terjadi di kandang. Sapi yang dikandangkan dapat memiliki peluang kontaminasi lebih besar jika menggunakan alas kandang tanpa semen dibandingkan menggunakan alas semen karena tipe alas kandang tanpa semen sulit dibersihkan (Rehman et al. 2011; Bangoura et al. 2012).

Selain faktor hewan dan lingkungan, tingkat kejadian koksidirosis juga dipengaruhi oleh tipe patogenitas spesies *Eimeria*. Disamping itu, variasi tingkat patogenitas spesies *Eimeria* pada sapi dapat mempengaruhi tingkat keparahan dan variasi gejala klinis. Tipe patogenitas *Eimeria* spp. didasarkan oleh beberapa faktor, antara lain jumlah sel atau jaringan inang yang rusak, jumlah merozoit dan lokasi parasit di dalam jaringan sel inang (Mundt et al. 2005). Satu oosista *Eimeria* spp. patogen dapat menyebabkan kerusakan 50 juta sel usus halus yang disebabkan oleh akumulasi dari proses peradangan dan gangguan pada lapisan sel sehingga menyebabkan kebocoran sel dan pendarahan (*haemorrhagi*). Akibatnya, sapi mengalami kehilangan banyak darah, air dan protein yang menyebabkan proses penyerapan nutrisi tidak efisien bahkan dalam kondisi yang parah dapat menyebabkan kematian (Pedersen 2013).

Gejala klinis

Perjalanan klinis penyakit ini bervariasi antara 4 - 14 hari (Oluwadare 2004; Dauschies & Najdrowski 2005). *Eimeria* spp. dapat menginduksi terjadinya enteritis serta mengakibatkan terjadinya diare pada ternak. Umumnya infeksi ringan ditandai dengan terjadinya diare ringan yang berlangsung sekitar 5 - 7 hari (Dauschies & Najdrowski 2005). Pada infeksi berat dapat menyebabkan pertumbuhan rambut pada kulit hewan menjadi kasar, anoreksia dan diare yang hebat dengan tinja cair bercampur mukus dan darah yang berwarna merah sampai kehitaman. Reruntuhan sel-sel epitel yang bercampur tinja cair sering mengotori daerah sekitar perianal, kaki belakang dan pangkal ekor. Kematian dapat terjadi akibat diare parah

yang disebabkan oleh depresi, dehidrasi, bobot badan menurun, kehilangan elektrolit, pendarahan usus atau adanya infeksi sekunder dari mikroorganisme lain dan pada saat kondisi diare, hewan terus merejan sehingga mengakibatkan prolapsus rektum pada sapi (Fraser 2006).

Mundt et al. (2005) menyatakan bahwa gejala klinis tergantung pada keseimbangan antara imunitas dengan dosis infeksi. Diagnosis koksidiosis yang didasarkan pada gejala klinis saja dapat dikelirukan dengan gejala klinis dari penyakit intestinal lainnya. Sebagai contoh, diare berair pada ternak tidak hanya disebabkan oleh *Eimeria* spp. tetapi dapat disebabkan oleh agen penyakit yang lain, seperti giardiasis dan cryptosporidiosis. Dalam beberapa kasus, sapi tidak menunjukkan gejala klinis meskipun terdapat oosista *Eimeria* pada tinjanya. Walaupun sapi menunjukkan gejala subklinis, namun tetap menyebabkan lesi-lesi pada saluran pencernaan sapi yang merusak mukosa usus. Kerusakan mukosa usus disebabkan oleh fase seksual *Eimeria* spp. yang dapat mengakibatkan gangguan penyerapan nutrisi sehingga memengaruhi kesehatan, produksi dan performa sapi (Lassen & Jarvis 2009).

KOKSIDIOSIS PADA SAPI DI INDONESIA

Kejadian koksidiosis di Indonesia telah dilaporkan di beberapa daerah di Indonesia. Pengujian koksidiosis berdasarkan pengamatan morfologi oosista *Eimeria* spp. pada sampel tinja. Fitriastuti et al. (2011) melakukan pemeriksaan pada sapi potong yang diambil dari Provinsi Gorontalo, Sulawesi Utara, Sulawesi Selatan, Sulawesi Tenggara, Sulawesi Tengah, Kalimantan Barat, Kalimantan Timur, Kalimantan Tengah dan Maluku dengan hasil 10% negatif, 2% infeksi berat dan 88% infeksi ringan. Kejadian koksidiosis juga dilaporkan di Cibungbulang, Bogor, Jawa Barat sebesar 20% (Dewi et al. 2016).

Survei yang dilakukan oleh Balai Veteriner Subang pada tahun 2013 menunjukkan tingkat kejadian koksidiosis di Jawa Barat sebesar 47,8% (B-Vet 2013) dan survei yang dilakukan oleh Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor menunjukkan bahwa tingkat prevalensi koksidiosis pada sapi potong di peternakan rakyat di Jawa Barat dilaporkan sangat bervariasi, yaitu Sumedang 59,2%, Tasikmalaya 4,1%, dan Cianjur, Ciamis, Sukabumi dan Subang, yaitu berkisar antara 19,1% sampai 23,7% (IPB 2012), serta di Sekolah Peternakan Rakyat (SPR) Kecamatan Kasiman Kabupaten Bojonegoro sebesar 41,7% (Taryu 2015). Sufi et al. (2016) melaporkan kejadian koksidiosis yang dapat terjadi juga pada sapi perah di Koperasi Peternak Sapi Bandung Selatan (KPBS) mencapai 44,75%.

Kejadian koksidiosis juga telah dilaporkan di beberapa wilayah di Jawa Tengah, meliputi lokasi Wonogiri 43,2% (Nugroho 2013), Boyolali 48,3% (Sumiarto 2013), Klaten 41,4% (Budiharta 2013), dan Sleman 78% (Raharjo 2013) serta di beberapa kabupaten, yaitu Kabupaten Karanganyar 38,7% (Istiyani 2013), Kabupaten Wonogiri 43,24% (Ardianto 2013), Kabupaten Sragen 38,78% (Nanditya 2014), dan Kabupaten Boyolali 48,2% (Wicaksana 2013).

Menurut Taryu (2015) berdasarkan identifikasi morfologi oosista secara konvensional infeksi *Eimeria* yang terjadi di SPR Bojonegoro disebabkan oleh 10 spesies yaitu *E. subspherica*, *E. zuernii*, *E. ellipsoidalis*, *E. bovis*, *E. brasiliensis*, *E. pellita*, *E. wyomingensis*, *E. auburnensis*, *E. canadensis* dan *E. bukidnonensis*. Infeksi tertinggi disebabkan oleh *E. bovis* 77,5% sedangkan infeksi terendah disebabkan oleh *E. subspherica* 4,5%. Sebanyak 64,9% terjadi infeksi campuran 2 sampai 6 spesies *Eimeria* di setiap sampel. Prevalensi *Eimeria zuernii* dan *Eimeria bovis* yang juga dideteksi melalui pengamatan morfologi oosista dari tinja sapi di Bandung berkisar 3,7% sampai 8,7% (Iskandar 2007).

Laporan prevalensi koksidiosis pada sapi secara molekuler dengan menggunakan PCR di Pulau Jawa pertama kali di publikasi oleh Ekawasti et al. (2019). Berdasarkan penanda molekuler yang spesies spesifik mampu dideteksi prevalensi koksidiosis menurut spesiesnya, antara lain 10,4% *E. bovis*, 2,8% *E. ellipsoidalis*, 2,1% *E. alabamensis*, 1,4% *E. zuernii*, 1,1% *E. auburnensis*, dan 0,4% *E. cylindrica*, serta infeksi campuran 2 sampai 4 spesies *Eimeria* sebanyak 26,3%. Data yang dilaporkan menunjukkan bahwa *E. bovis* (*Eimeria* patogen) memiliki prevalensi yang paling tinggi dibandingkan dengan spesies yang lainnya.

Perkembangan teknik diagnosis koksidiosis

Diagnosis suatu penyakit secara umum dapat diawali dengan pengamatan gejala klinis dan tingkat kematian yang terjadi pada sapi (Suardana & Budiharta 2007). Namun demikian, menurut Maas (2007) bahwa penegakan diagnosis koksidiosis tidak disarankan hanya berdasarkan gejala klinis saja. Perlu dilakukan uji lanjutan di laboratorium dengan metode yang tepat. Beberapa metode pemeriksaan koksidiosis di laboratorium dapat dilakukan secara konvensional maupun molekuler, yang meliputi pemeriksaan secara kuantitatif dan kualitatif. Pemilihan metode yang tepat perlu dipertimbangkan sesuai sasaran dan tujuan pemeriksaan karena masing-masing teknik diagnosis memiliki kelemahan dan keunggulan yang berbeda.

Metode konvensional

Deteksi oosista *Eimeria* spp dalam sampel tinja adalah kunci utama untuk menegakan diagnosis koksidiosis. Sejauh ini, metode konvensional merupakan metode yang paling populer dan banyak digunakan di laboratorium melalui pemeriksaan mikroskopis dengan pengamatan morfologi bentuk, ukuran dan warna oosista *Eimeria*. Selain sederhana dan murah, metode ini juga mudah dilakukan (Hamid et al. 2006; Ekawasti et al. 2019). Beberapa teknik konvensional memerlukan waktu yang lebih lama dalam proses identifikasi dan tingkat akurasi yang rendah. Umumnya, infeksi *Eimeria* spp. pada ternak terjadi dalam bentuk infeksi campuran (infeksi lebih dari satu spesies). Namun demikian, karakteristik morfologi dan perubahan patologisnya masing-masing spesies *Eimeria* spp relatif serupa sehingga sulit untuk dideteksi spesies *Eimeria* secara akurat melalui metode konvensional (Mirani et al. 2012).

Selain berdasarkan pengamatan morfologi oosista, deteksi spesies secara patologi anatomi juga dapat dilakukan berdasarkan lokasi lesi-lesi yang ditimbulkan oleh *Eimeria* spp. Beberapa spesies tertentu dilaporkan memiliki daerah predileksi yang khas. Spesies *Eimeria* spp. pada sapi berdasarkan karakteristik morfologi dan lokasi lesi pada usus dapat dilihat pada Tabel 1.

Oosista *Eimeria* merupakan oosista yang memiliki berat jenis lebih ringan daripada berat jenis air, sehingga pada metode konvensional ini digunakan garam atau gula jenuh untuk mengapungkan oosista *Eimeria* spp. (flotasi tinja) sehingga mudah untuk dikoleksi dan diperiksa. Pemeriksaan secara konvensional (*coprological examination*) terbagi

menjadi dua metode, yaitu secara kuantitatif dan kualitatif.

Metode kuantitatif

Teknik *Mc. Master* dan *whitlock* merupakan metode kuantitatif dengan menghitung jumlah oosista pada sampel tinja untuk mendapatkan jumlah ookista per gram tinja (OPG) yang dapat membantu dalam mengetahui tingkat keparahan koksidiosis sebagai penyebab penyakit klinis (Mundt et al. 2005). Metode kuantitatif yang memiliki keunggulan dapat mengetahui derajat keparahan koksidiosis, namun juga memiliki kelemahan, yaitu kurang sensitif dan hanya terbatas pada identifikasi arah genus. Oleh karena itu, teknik ini hanya dapat digunakan sebagai uji skrining terhadap koksidiosis (Ekawasti et al. 2019).

Metode kualitatif

Pemeriksaan sampel secara kualitatif dengan menentukan positif dan negatif keberadaan oosista *Eimeria* spp. dapat dilakukan dengan metode apung sentrifus atau dengan apusan langsung (natif) (Zajac & Conboy 2006). Metode apung modifikasi merupakan metode konsentrasi yang lebih sensitif terhadap diagnosis oosista koksidia dan memerlukan jumlah sampel yang lebih sedikit dibandingkan dengan metode kuantitatif (Ekawasti et al. 2019). Namun, teknik diagnosis ini juga hanya terbatas pada identifikasi oosista *Eimeria* tingkat genus, sehingga diperlukan uji lanjutan untuk menentukan spesies *Eimeria*.

Tabel 1. Karakteristik oosista *Eimeria* spp. pada sapi

Spesies	Ukuran (µm)		Bentuk	Lokasi Predileksi
	P	L		
<i>Eimeria alabamensis</i>	12-24	11-16	<i>Ovoid/piriform/asimetri</i>	Usus kecil (usus halus, sekum, kolon)
<i>Eimeria auburnensis</i>	32-46	20-25	<i>Ovoid/ellipsoid</i>	Usus kecil (Lokasi sepertiga bagian tengah dan bawah dari usus).
<i>Eimeria bovis</i>	23-34	17-23	<i>Ovoid/subellipsoidal</i>	Merogoni terjadi di usus kecil. Gametogoni di bagian terminal dari ileum dan sekum.
<i>Eimeria ellipsoidal</i>	20-26	13-17	<i>Ellipsoid/silindris</i>	Tahap merogoni dan gametogoni ada di usus kecil dari hospes.
<i>Eimeria cylindrica</i>	16-27	12-15	<i>Ellipsoid/subsilindris</i>	Tahap merogoni dan gametogoni berada di usus kecil.
<i>Eimeria zuernii</i>	13-22	13-18	<i>Subspherical/ellipsoid</i>	Usus besar, sekum, dan rektum sapi muda (ditemukan di lamina propis ileum bawah).

Sumber: Dauschies & Najdrowski (2005) dan Slobodian et al. (2017) (Modifikasi)

P = panjang; L = lebar

Adapun metode kualitatif lain melalui metode pengukuran panjang dan lebar oosista secara morfologi yang telah dikembangkan adalah metode komputerisasi *Coccimorph*. Metode ini dilakukan dengan cara pengambilan fotomikrograf (foto digital) oosista *Eimeria* spp yang bersporulasi dengan perbesaran 400 X. Identifikasi *Eimeria* spp. dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak *Coccimorph* (<http://www.coccidia.icb.usp.br/coccimorph/>). Perangkat lunak dapat diunduh secara *online* dari internet yang selanjutnya dicocokkan dengan gambar-gambar oosista berdasarkan spesies pada *software* tersebut. *Eimeria* spp. diidentifikasi oleh perangkat lunak dalam setiap sampel dicatat (Gussem 2007).

Aplikasi komputerisasi *Coccimorph* dapat digunakan untuk mengganti metode konvensional manual di laboratorium klinis dan fotomikrograf yang diunggah melalui internet sudah cukup untuk mendapatkan diagnosis spesies (Gussem 2007; Eassa et al. 2019). Secara ekonomis, metode ini terbilang murah dan lebih hemat jika diaplikasikan di laboratorium, terutama laboratorium yang tidak memiliki fasilitas biologi molekuler. Namun apabila ditinjau dari segi identifikasi ke arah spesies, keakuratan deteksinya tergantung dari kualitas fotomikrograf yang dihasilkan. Metode ini lebih sesuai digunakan untuk skrining kasus koksidiosis pada suatu peternakan.

Metode molekuler

Berbeda dengan metode konvensional, identifikasi secara molekuler bertujuan menentukan mendeteksi spesies *Eimeria* spp. dan keragaman genetik baik intraspesies atau interspesies (Kokuzawa et al. 2013). Metode molekuler yang sering digunakan untuk mendiagnosis *Bovine Coccidiosis* antara lain *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), Western Blot, Polymerase Chain Reaction (PCR) dan *Loop-mediated Isothermal Amplification* (LAMP)

ELISA

Jenis *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) yang sering digunakan adalah *Antibody Immunosorbent Enzyme-linked*, yaitu teknik yang menggabungkan antara antibodi spesifik dengan enzim spesifik secara sederhana. ELISA memberikan pengukuran antigen atau antibodi yang relatif efektif dan memberikan hasil data kuantitatif. Metode ini dilaporkan mampu mendeteksi keberadaan antigen *Eimeria* spp yang dikenali oleh antibodi atau digunakan untuk menguji antibodi yang mengenali antigen. Ahmed & Hasan (2007) menyatakan bahwa serodiagnosis ELISA dapat membuktikan terjadinya potensi infeksi *Eimeria* spp. pada sapi yang lebih

sensitif dibandingkan dengan pemeriksaan secara konvensional. Beberapa kasus koksidiosis yang dinyatakan negatif pada pemeriksaan secara konvensional dikoreksi menjadi positif terinfeksi *Eimeria* spp berdasarkan pemeriksaan ELISA (*Partially Purified Antigen*). Laporan ini membuktikan bahwa tingkat sensitivitas ELISA lebih tinggi dibandingkan dengan metode konvensional. Namun demikian, kit ELISA *Eimeria* spp belum banyak di pasar dan secara ekonomis harganya relatif mahal dan memerlukan operator dengan keahlian khusus (Toaleb et al. 2011).

Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Elektroforesis (SDS-PAGE) dan *Western Blot* (*Immunoblotting*)

Metode ini ditujukan untuk mendeteksi ekspresi protein (antigen) suatu organisme, termasuk *Eimeria* spp. Elusi fraksi antigen *Eimeria* spp. dilakukan menggunakan SDS-PAGE. Berat molekul standar diaplikasikan dalam gel yang sama untuk menghitung molekul bobot komponen yang diperiksa. Fraksi protein yang dipisahkan secara elektroforesis diwarnai dengan pewarna *Commassie blue* yang terang (Toaleb et al. 2011). Umumnya teknik SDS PAGE ini dilanjutkan dengan metode Western Blot.

Western blot adalah teknik analisis yang banyak digunakan dalam biologi molekuler dan imunogenetika untuk mendeteksi protein spesifik dalam sampel menggunakan elektroforesis gel sehingga terjadi fraksinasi protein berdasarkan bobot molekulnya oleh jarak polipeptida atau oleh struktur 3-D protein. Selanjutnya, protein yang telah terfraksinasi tersebut ditransfer ke membran sesuai dengan antibodi terhadap target protein. Uji immunoblot digunakan untuk mendeteksi pita imunoreaktif dari fraksi terisolasi menggunakan serum sapi yang terinfeksi *Eimeria* secara alami. Fraksi yang paling imunogenik (F1) memiliki satu pita imunogenik yang dapat digunakan untuk diagnosis koksidiosis (Toaleb et al. 2011).

Setelah elektroforesis, antigen *Eimeria* spp. diblotting ke nitroselulosa dalam sistem blotting. Membran nitroselulosa diinkubasi dengan sera positif *Eimeria* sapi yang telah dimurnikan dengan filtrasi gel kromatografi. Fraksi imunogenik (F1) adalah yang paling kuat seperti nilai ELISA yang menggunakan dari tiga pita bobot molekul 225, 198, 114,5 KDa sebagai antigen *Eimeria* spp (Ahmed & Hassan 2007).

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Teknik PCR primer spesifik merupakan metode diagnosis yang efektif dan terpadu untuk mendeteksi spesies *Eimeria* baik secara individu atau simultan

dalam suatu reaksi (Ekawasti et al, 2019; Kawahara et al. 2010). Penanda molekuler (primer DNA) gen *Internal Transcribed Spacer 1* (ITS-1) dikenal lebih unggul dan sensitif untuk mendeteksi spesies *Eimeria* pada sapi dibanding pemeriksaan konvensional (Ekawasti et al. 2019; Kawahara et al. 2010). Malek & Kurra (2018) membandingkan metode konvensional dan PCR (ITS-1) untuk mendeteksi kasus diare pada pedet yang terjadi di Aussit – Mesir. Data yang diperoleh menunjukkan bahwa PCR (ITS-1) mampu meningkatkan sensitivitas deteksi koksidiosis hingga 42 %, yaitu prevalensi 46, 7% berdasarkan metode konvensional meningkat menjadi 88,00 % berdasarkan metode molekuler. Sementara Al-Saadoon & Al-Rubaei (2018) menyatakan bahwa teknik PCR mampu mendeteksi 70%, sedangkan metode konvensional hanya sekitar 50% pada sampel tinja sapi yang dikoleksi di Iraq.

Teknik PCR dikembangkan untuk mengatasi keterbatasan pemeriksaan secara morfologis. Penanda molekuler dapat dirancang secara khusus sehingga mampu mendeteksi parasit hingga ke aras spesies. Sebanyak delapan spesies *Eimeria* berhasil dideteksi dengan teknik ini pada pedet yang mengalami diare secara alami. Berdasarkan spesiesnya, infeksi *E. zuerni* (51,4%) dan *E. bovis* (31,4%) dilaporkan sebagai dua spesies *Eimeria* patogen yang mendominasi kejadian diare pada pedet tersebut (Malek & Kurra 2018). Hasil yang serupa juga disimpulkan oleh Lee et al. (2018) yang berhasil mendeteksi *E. bovis* dan *E. zuerni* sebagai penyebab utama diare pada sapi di Korea berdasarkan penanda molekuler ITS-1.

Umumnya, kasus koksidiosis pada ternak yang terinfeksi secara alami disebabkan oleh lebih dari satu spesies *Eimeria*. Keadaan ini memicu pengembangan teknik *duplex* atau *multiplex* PCR untuk memotong alur identifikasi menggunakan PCR konvensional sehingga teknik deteksi *Eimeria* spp. menjadi lebih cepat dan murah (You 2014). Malek & Kurra (2018) menyimpulkan bahwa 48,6% kasus diare koksidiosis pada pedet disebabkan oleh infeksi tunggal, namun sekitar 51,4% merupakan infeksi campuran.

Dari segi ekonomis dan waktu yang dibutuhkan, pemeriksaan koksidiosis berdasarkan teknik *duplex* atau *multiplex* PCR akan menjadi lebih murah dan cepat dibandingkan dengan PCR tunggal (Ekawasti et al. 2019). Penggunaan beberapa reagen kimia yang dibutuhkan juga relatif lebih hemat dibandingkan dengan teknik PCR konvensional untuk pemeriksaan sampel ke arah spesies dalam waktu yang bersamaan. Kelemahan metode PCR adalah biaya yang dibutuhkan relatif mahal, memerlukan mesin Thermocycler (mesin PCR) dan membutuhkan operator yang terlatih.

Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP)

Pengembangan teknik LAMP ditujukan untuk memberi kemudahan bagi laboratorium yang tidak memiliki mesin PCR. Metode ini dikembangkan berdasarkan kebutuhan teknologi deteksi yang mampu mengamplifikasi basa nukleotida lebih cepat, sensitif dan spesifik untuk mendiagnosis suatu penyakit infeksius. Disamping itu, metode LAMP dilaporkan lebih murah dibandingkan dengan PCR (Barkway et al. 2011). Prinsip metode LAMP didasarkan pada suhu isothermal yang dapat dilakukan dengan *water bath* sehingga tidak mesin *thermocycler* yang harganya mahal. Keunggulan metode LAMP adalah tidak memerlukan tahap isolasi dan purifikasi DNA seperti pada PCR, sehingga metode ini dapat lebih praktis dan efisien waktu. Metode sangat menjanjikan untuk diaplikasikan sebagai metode diagnosis penyakit infeksius, khususnya di negara-negara berkembang (Pooja et al. 2014; Feranisa 2016).

Ekstraksi DNA dilakukan dengan cara sederhana menggunakan metode merebus. Deteksi dapat dilakukan dengan pengamatan mata telanjang menggunakan pewarna interkalasi (*cyber green*). Secara keseluruhan, metode ini dapat dikatakan sebagai molekuler konvensional yang efektif dan hemat biaya sebagai alternatif pengganti PCR untuk diagnosis infeksi *Eimeria* pada ternak (Barkway et al. 2011). Namun, teknik LAMP juga memiliki keterbatasan, yaitu kurang sensitif dibandingkan dengan PCR untuk sampel yang kompleks, karena perbedaan enzim polimerase yang digunakan, yaitu enzim Bst DNA polymerase untuk LAMP dan enzim Taq polymerase untuk PCR. Disamping itu, metode LAMP menggunakan 4 sampai 6 pasang primer untuk mendeteksi 6 atau 8 target sekuen gen yang menyebabkan penyusunan primer menjadi cukup rumit (Torres et al. 2011; Nurwidayati 2015).

Potensi pengembangan teknik Biosensor

Perkembangan teknologi yang berbasis digital di era revolusi industri 4.0 sangat pesat, termasuk piranti diagnosis penyakit berbasis biosensor untuk mendeteksi organisme-organisme yang patogen (Yoo & Lee 2016). Metode biosensor telah dikembangkan sekitar 32 tahun yang lalu dan banyak diaplikasikan di berbagai negara karena metodenya sederhana, dapat dibuat dalam piranti yang mudah dibawa, umumnya bentuknya mini, sedikit menggunakan bahan dan hasil yang diperoleh dengan metode ini sangat cepat (*real time analysis*) serta dapat dihubungkan dengan perangkat android (Fournier-Wirth et al. 2010; Bahadir & Sezginurk 2015).

Secara prinsip, biosensor akan mengenali biomarka (penanda biologis) yang spesifik melalui elemen yang tidak bergerak (*immobilized sensing element*) (Vashist et al. 2014). Elemen ini disebut dengan bioreseptor (pengenal dari bahan biologis) yang dapat berupa antibodi monoklonal, RNA, DNA, glikan, lektin, enzim, jaringan atau sel utuh. Bioreseptor yang memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi merupakan titik krusial yang penting dalam mengenali biomarka. Komponen bioreseptor juga harus mampu mencegah adanya hambatan (*inhibitor*) dan interfensi yang berasal dari organisme bukan target yang mungkin terkandung pada sampel yang diuji. Interaksi kimia antara bioreseptor dan biomarka akan dikirim dalam bentuk signal elektronik pada piranti elektronik khusus sehingga hasil analisis dapat diketahui pada waktu itu juga (*real time*) (Zhu et al. 2014).

Menurut Vidic et al. (2017) bahwa deteksi *Eimeria* spesies berpotensi untuk dikembangkan ke arah biosensor karena penelitian-penelitian molekuler telah banyak dikembangkan. Hasil-hasil teknologi molekuler dengan marka DNA tertentu, atau hasil teknologi ELISA, SDS PAGE maupun LAMP dapat diadopsi untuk selanjutnya dikembangkan menjadi piranti biosensor. Marka-marka biologis spesifik yang telah diidentifikasi berpotensi dijadikan sebagai kandidat bioreseptor yang efektif untuk mengenali biomarka dari spesies *Eimeria* dari kasus-kasus diare pada industri peternakan sapi. Pemikiran ini dapat juga diterapkan untuk mengembangkan teknik-teknik diagnosis penyakit ternak lainnya ke arah biosensor, seperti penyakit-penyakit yang disebabkan oleh bakteri, jamur maupun virus.

Berdasarkan uraian diatas diketahui bahwa masing-masing teknik diagnosis memiliki keunggulan dan kelemahan sehingga penggunaannya harus disesuaikan dengan target dan tujuan pemeriksaan. Apabila ditujukan untuk skrining koksidiosis pada industri peternakan maka metode konvensional baik secara kualitatif maupun kuantitatif dapat diaplikasikan. Namun penegakan diagnosis didasarkan pada identifikasi spesies *Eimeria* yang patogen, metode molekuler harus dilakukan sehingga strategi pengendalian penyakit ini dapat ditentukan yang berimplikasi positif terhadap peningkatan produktivitas ternak.

KESIMPULAN

Kejadian koksidiosis pada peternakan sapi yang di beberapa daerah di Indonesia sebagian besar hanya berdasarkan karakteristik morfologi, yaitu bentuk dan ukuran. Penegakan diagnosis dengan teknik tersebut tidak mampu membedakan spesies *Eimeria* yang patogen dan non patogen karena parasit ini memiliki bentuk dan ukuran yang mirip. Kondisi ini dapat

diantisipasi dengan mengimplementasikan metode molekuler yang mampu mendeteksi hingga ke aras spesies. Oleh karena itu, kombinasi antara metode konvensional dan molekuler menjadi teknik diagnosis koksidiosis yang ideal pada industri peternakan. Metode biosensor perlu juga dikembangkan sebagai teknik diagnosis alternatif yang cepat dan akurat dalam mendeteksi koksidiosis sehingga strategi pengendalian penyakit ini dapat segera ditentukan untuk meningkatkan produksi ternak.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed WM, Hassan SE. 2007. Applied studies on coccidiosis in growing buffalo-calves with special reference to oxidant/antioxidant status. *W J Zool.* 2:40-48.
- Al-Saadoon ZM, Al-Rubaie HMA. 2018. Traditional and molecular study for prevalence of coccidiosis in sheep in wasit-iraq. *Indian J Nat Sci.* 8:14394-14401.
- Alemayehu A, Belina T, Nuru M. 2013. Prevalance of bovine coccidia in kombolcha district of south wollo, Ethiopia. *J Vet Med.* 5:41-45.
- Ananta SM, Suharno, Hidayat, Matsubayashi M. 2014. Survey on gastrointestinal parasites and detection of cryptosporidium spp. on cattle in West Java, Indonesia. *Asian Pac J Trop Med.* 7:197-201.
- Ardianto A. 2013. Prevalensi koksidiosis pada pedet di kabupaten wonogiri [Skripsi]. [Yogyakarta (Indonesia)]: Universitas Gadjah Mada.
- Astiti LGS, Panjaitan T, Prisdimminggo. 2011. Identifikasi Parasit Internal pada Sapi Bali di Wilayah Dampungan Sarjana Membangun Desa di Lokasi Bima. Dalam: Prasetyo LH, Damayanti R, Iskandar S, Herawati T, Priyanto D, Puastuti W, Anggraeni A, Tarigan S, Wardhana AH, Darmayanti NLPI, penyunting. *Teknologi Peternakan dan Veteriner untuk Peningkatan Produksi dan Antisipatif terhadap Perubahan Iklim. Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner.* Bogor, 7-8 Juni 2011. Bogor (Indonesia): Puslitbangnak. hlm. 384-387.
- Bahadir EB, Sezginturk MK. 2015. Applications of commercial biosensors in clinical, food, environmental, and biothreat/ biowarfare analyses. *Anal Biochem.* 478:107-120.
- Bangoura B, Mundt HC, Schmäsche R, Westphal B, Dauschies A. 2012. Prevalence of *Eimeria bovis* and *Eimeria zuernii* in German cattle herds and factors influencing oocyst excretion. *J Parasitol Res.* 110:875-881.
- Bruhn FRP, Lopes MA, Demeu FA, Perazza CA, Pedrosa MF, Guimarães AM. 2011. Frequency of species of *Eimeria* in females of the Holstein-Friesian breed at the post-weaning stage during autumn and winter. *Rev Bras Parasitol Vet.* 20:303-307.

- Budiharta S. 2013. Prevalensi koksidiosis pada pedet di lokasi Klaten Jawa Tengah. Yogyakarta (Indonesia): Universitas Gadjah Mada.
- [B-Vet] Balai Veteriner Subang. 2013. Laporan tahunan penyidikan dan pengujian penyakit parasiter tahun 2013. Subang (Indonesia): Balai Veteriner Subang.
- Dauguschies A, Najdrowski M. 2005. Eimeriosis in cattle: Current understanding. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 52:417-427.
- Davoudi Y, Garedaghi Y, Nourmohammadzadeh F, Eftekhari Z, Safarmashaei S. 2011. Study on prevalence rate of coccidiosis in diarrheic calves in East - Azerbaijan province. *Adv Environ Biol*. 5:1563-1565.
- Dawid F, Amede Y, Bekele M. 2012. Calf coccidiosis in selected dairy farms of Dire Dawa, Eastern Ethiopia. *Global Veterinaria*. 9:460-464.
- Dewi DA, Wardhana AH, Sawitri DH, Ekawasti F, Akbari RA. 2016. Parasitic Diseases in Dairy Cattle in Cibungbulang District of West Java. In: Yulistiani D, Wardhana AH, Inounu I, Bahri S, Iskandar S, Wina E, Ginting SP, Tarigan S, Tiesnamurti B, Romjali E, Herawati T, Anggraeny YN, Shanmugavelu S, Aquino DL, editors. *Promoting Livestock and Veterinary Technology for Sustainable Rural Livestock Development. Proceeding of International Seminar on Livestock Production and Veterinary Technology*. Bali, August 10th-12th 2016. Bali (Indonesia): ICARD. p. 170-177.
- Doviansyah Z. 2015. Prevalensi koksidiosis dan identifikasi ookista *Eimeria* spp. pada sapi perah di kawasan usaha peternakan (Kunak) Kabupaten Bogor [Skripsi]. [Bogor (Indonesia)]: Institut Pertanian Bogor.
- Eassa A, El Ayis A, Abubaker, Muna A, Khaier M. 2019. Isolation and characterization of *Eimeria* species in poultry using conventional methods and coccimorph program in Khartoum state, Sudan. *World J Pharm Sci*. 8:54-67.
- Ekawasti F, Nurcahyo W, Wardhana AH, Shibahara T, Tokoro M, Sasai K, Matsubayashi M. 2019. Molecular characterization of highly pathogenic *Eimeria* species among beef cattle on Java Island, Indonesia. *J Par Inter*. 72:101927.
- Feranisa A. 2016. Komparasi antara Polymerase Chain Reaction (PCR) dan Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) dalam diagnosis molekuler. *Dental*. 3:145-151.
- Fitriastuti ER, Atikah N, Ria NM. 2011. Studi penyakit koksidiosis pada sapi betina di 9 Provinsi di Indonesia Tahun 2011. Bogor (Indonesia): Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obar Hewan.
- Florião MM, Lopes Bdo B, Berto BP, Lopes CW. 2016. New approaches for morphological diagnosis of bovine *Eimeria* species: a study on a subtropical organic dairy farm in Brazil. *Trop Anim Health Prod*. 48:577-584.
- Fournier-Wirth C, Jaffrezic-Renault N, Coste J. 2010. Detection of blood-transmissible agents: can screening be miniaturized. *Transfusion* 50:2032-2045.
- Fraser CM. 2006. *The Merck Veterinary Manual, a hand book of diagnosis therapy and disease prevention and control for veterinarians*. 7th ed. California (USA): National Institute of Technology.
- Gussem MDE. 2007. Coccidiosis in poultry: review on diagnosis, control, prevention and interaction with overall gut health. *Proceeding of 16th European Symposium on Poultry Nutrition*. Strasbourg, France, 26-30 August 2007. Beekbergen (The Netherlands): WPSA. p. 253-261.
- Hamid PH, Yuli PK, Joko P, Liliana MRDS. 2016. Gastrointestinal parasites of cattle in Central Java. *Am J Anim Vet Sci*. 11:119-124.
- Heidari H, Gharekhani J. 2014. Detection of *Eimeria* species in Iranian native cattle. *Int J Adv Res*. 2:731-734.
- Indraswari AAS, Suwiti NK, Apsari IAP. 2017. Protozoa gastrointestinal: *Eimeria auburnensis* dan *Eimeria bovis* menginfeksi sapi Bali betina di Nusa Penida. *Buletin Veteriner Udayana*. 9:112-116.
- [IPB] Institut Pertanian Bogor. 2012. Kajian penyakit parasiter dan kematian pedet [Laporan Survei]. Bogor (Indonesia): Bagian Parasitologi dan Entomologi Kesehatan, Departemen Ilmu Penyakit Hewan dan Kesmavet, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor.
- Iskandar T. 2007. Parasit penyebab diare pada sapi perah Friesian Holstein (FH) di lokasi Bandung dan Sukabumi Jawa Barat. *Prosiding Semiloka Nasional Prospek Industri Sapi Perah Menuju Perdagangan Bebas 2020*. Bogor (Indonesia): Balai Besar Penelitian Veteriner. hlm. 384-388.
- Istiyani ZD. 2013. Prevalensi koksidiosis pada pedet di Kabupaten Karanganyar [Skripsi]. [Yogyakarta (Indonesia)]: Universitas Gadjah Mada.
- Jonsson NN, Piper EK, Gray CP, Deniz A, Constantinoiu CC. 2011. Efficacy of toltrazuril 5% suspension against *Eimeria bovis* and *Eimeria zuernii* in calves and observations on the associated immunopathology. *Parasitol Res*. 109:S113-S128.
- Kaewthamasorn M, Wongsamee S. 2006. A preliminary survey of gastrointestinal and haemoparasites of beef cattle in the tropical livestock farming system in Nan Province, northern Thailand. *Parasitol Res*. 99:306-308.
- Kawahara F, Zhang G, Mingala CN, Tamura Y, Koiwa M, Onuma M, Nunoya T. 2010. Genetic analysis and development of species-specific PCR assays based on ITS-1 region of rRNA in bovine *Eimeria* parasites. *Vet Parasitol*. 174:49-57.
- Keeton ST, Navarre CB. 2018. Coccidiosis in large and small ruminants. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 34:201-208.

- [Kementan RI] Kementerian Pertanian Republik Indonesia. 2018. Livestock and animal health statistic. Jakarta (Indonesia): Kementerian Pertanian.
- Koutny H, Joachim A, Tichy A, Baumgartner W. 2012. Bovine *Eimeria* species in Austria. *Parasitol Res.* 110:1893-1901.
- Lassen B, Jarvis T. 2009. *Eimeria* and cryptosporidium in Lithuanian cattle farms. *Vet Med Zoot.* 48:24-28.
- Lassen B, Lepik T, Jarvis T. 2014. Seasonal recovery of *Eimeria* oocysts from soil on naturally contaminated pastures. *Parasitol Res.* 113:993-999.
- Lee SH, Kim HY, Lee H, Ki JW, Lee YR, Chae MJ, Oh SI, Kim JH, Rhee MH, Kwon OD, Goo YK, Kim TH, Geraldino PJJ, Kwak D. 2018. *Eimeria* species in cattle with diarrhoea in the Republic of Korea regarding age, season and nature of diarrhoea. *Vet Rec.* 183:504.
- Maas J. 2007. Coccidiosis in cattle, UCD Vet Views California Cattlemen's Magazine. California (USA): School of Veterinary Medicine University of California.
- Makau DN. 2014. A study of factors associated with the prevalence of coccidia infection in cattle and its spatial epidemiology in Busia, Bungoma and Siaya Counties, Kenya [Tesis]. [Nairobi (Kenya)]: University of Nairobi.
- Malek SS, Kuraa HM. 2018. Detection and identification of *Eimeria* species in naturally infected calves at Assiut Governorate. *Zagazig Vet J.* 46:60-69.
- Manya P, Sinha SRP, Sucheta S, Verma SB, Sharma SK, Mandal KG. 2008. Prevalence of bovine coccidiosis at Patna. *J Vet Parasitol.* 22:73-76.
- Marquez JC. 2014. Calf intestinal health: assessment and dietary interventions [Disertation]. [Illinois (USA)]: University of Illinois at Urbana-Champaign.
- Matsubayashi M, Kita T, Narushima T, Kimata I, Tani H, Sasai K, Baba E. 2009. Coprological survey of parasitic in pigs and cattle in slaughterhouse in Osaka, Japan. *J Vet Med Sci.* 71:1079-1083.
- Mirani AH, Shah MGU, Mirbahar KB, Khan MS, Lochi GM, Khan IU, Alam F, Hasan SM, Tariq M. 2012. Prevalence of coccidiosis and other gastrointestinal nematode species in buffalo calves at Hyderabad, Sindh, Pakistan. *Afr J Microbiol Res.* 6:6291-6294.
- Mundt HC, Bangoura B, Rinke M, Rosenbruch M, Daugschies A. 2005: Pathology and treatment of *Eimeria zuernii* coccidiosis in calves: investigations in an infection model. *Parasitol Int.* 54:223-230.
- Nanditya WK. 2014. Prevalensi koksidiosis pada sapi dan prevalensi kematian pedet di Sragen, Jawa Tengah, Indonesia: Studi kasus [Skripsi]. [Yogyakarta (Indonesia)]: Universitas Gadjah Mada.
- Nugroho WS. 2013. Prevalensi koksidiosis pada pedet di lokasi Wonogiri. [Skripsi]. [Yogyakarta (Indonesia)]: Universitas Gadjah Mada.
- Nurwidayati A. 2015. Aplikasi teknik diagnosis schistosomiasis berbasis molekuler. *J Vektor Penyakit.* 9:29-35.
- Oluwadare AT. 2004. Studies on bovine coccidia [Apicomplexa: Eimeriidae] in parts of Plateau state, Nigeria [Thesis]. [Jos (Nigeria)]: University of Jos.
- Pedersen S. 2013. Coccidiosis in cattle and sheep control and management methods. *Sptlight Pars Diss.* 1:18-19.
- Pooja S, Sudesh D, Poonam K, Joginder SD, Suresh KG. 2014. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) based detection of bacteria: A Review. *Afr J Biotechnol.* 13:1920-1928.
- Raharjo S. 2013. Tingkat kejadian koksidiosis pada pedet sapi perah di Kelompok Temak Sebrang Wetan Wukirsari Cangkringan Sleman [Skripsi]. [Yogyakarta (Indonesia)]: Universitas Gadjah Mada.
- Rehman TU, Khan MN, Sajid MS, Abbas RZ, Arshad M, Iqbal Z, Iqbal A. 2011. Epidemiology of *Eimeria* and associated risk factor in cattle of district Toba Tek Singh, Pakistan. *Parasitol Res.* 108:1171-1177.
- Sánchez RO, Romero JR, Founroge RD. 2008. Dynamics of *Eimeria* oocyst excretion in dairy calves in the Province of Buenos Aires (Argentina), during their first 2 months of age. *Vet Parasitol.* 151:133-138.
- Suardana IW, Budiharta S. 2007. Buku ajar epidemiologi dan ekonomi veteriner. Bali (Indonesia): Universitas Udayana.
- Sufi IM, Cahyaningsih U, Sudarnika E. 2016. Prevalensi dan faktor risiko koksidiosis pada sapi perah di Kabupaten Bandung. *J Kedokteran Hewan.* 10:195-199.
- Sumiarto B. 2013. Prevalensi dan faktor risiko koksidiosis (*Eimeria* spp.) pada pedet di lokasi Boyolali [Skripsi]. [Yogyakarta (Indonesia)]: Universitas Gadjah Mada.
- Taryu. 2015. Koksidiosis pada sapi potong di sekolah peternakan rakyat (SPR) Kecamatan Kasiman Kabupaten Bojonegoro [Tesis]. [Bogor (Indonesia)]: Institut Pertanian Bogor.
- Toaleb MI, Faragaila M, El-Moghazy, Soad EH. 2011. Diagnosis of Eimeriosis in cattle by ELISA using partially purified antigen. *World Appl Sci J.* 12:33-38.
- Torres C, Vitalis EA, Baker BR, Gardner SN. 2011. LAVA: an open-source approach to designing LAMP (loop-mediated isothermal amplification) DNA signatures. 2011. *BMC Bioinformatics.* 12:240.
- Vashist SK, Lam E, Hrapovic S, Male KB, Luong JH. 2014. Immobilization of antibodies and enzymes on 3-aminopropyltriethoxysilane-functionalized bioanalytical platforms for biosensors and diagnostics. *Chem Rev.* 114:11083-11130.
- Vidic J, Manzano M, Ming Chang C, Renault NJ. 2017. Advanced biosensors for detection of pathogens related to livestock and poultry. *Vet Res.* 48:1-22.

- Wicaksana TR. 2013. Prevalensi dan faktor risiko koksidiosis (*Eimeria* sp.) pada pedet di Kabupaten Boyolali [Skripsi]. [Yogyakarta (Indonesia)]: Universitas Gadjah Mada.
- Yoo SM, Lee SY. 2016. Optical biosensors for the detection of pathogenic microorganisms. *Trends Biotechnol.* 34:7-25.
- You MJ. 2014. Detection of four important *Eimeria* species by multiplex PCR in a single assay. *Parasitol Internat.* 63:527-533.
- Zajac AM, Conboy GA. 2012. *Veterinary clinical parasitology*. 8th ed. Oxford (UK): Wiley-Blackwell Publishing.
- Zhu C, Yang G, Li H, Du D, Lin Y. 2014. Electrochemical sensors and biosensors based on nanomaterials and nanostructures. *Anal Chem.* 87:230-249.

Faktor-faktor yang Mempengaruhi Analisis Motilitas Spermatozoa dengan Menggunakan CASA

(Factors Affecting Spermatozoa Motility Analysis Using CASA)

Dian Ratnawati¹, N Isnaini² dan T Susilawati²

¹Loka Penelitian Sapi Potong, Jalan Pahlawan no. 2, Grati, Pasuruan

²Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya, Jl. Veteran, Ketawanggede, Lowokwaru, Malang 6514
Kontributor utama: dian_sapo@yahoo.co.id

(Diterima 1 Agustus 2019 – Direvisi 3 September 2019 – Disetujui 4 September 2019)

ABSTRACT

Motility is a very important parameter to determine the quality of semen. Spermatozoa motility assessment can be done manually (subjectively) or with CASA. The superiority of motility assessment using CASA compared to manually is more objective, accurate, fast, efficient and able to provide detailed motility of spermatozoa. However, in implementation, assessments with CASA produce varied data. So far, there has not been a spermatozoa motility standard with CASA, except by minimizing variations in the factors that influence the results of analysis with CASA. The purpose of this paper is to describe factors that affecting spermatozoa motility analysis using CASA to reach optimal motility analysis. Some influencing factors include: CASA settings, semen diluent, spermatozoa concentration, chamber, analyst, sample preparation and analysis time. Recommendation standard motility assessments using CASA include: experienced and consistent analysts, sample preparation properly (mixing, pipeting and sampling), spermatozoa concentration of 20 million/ml, consistent in chamber type (conditioned 37°C), semen diluents and CASA settings (frame rate of 60 Hz and frame per field 30) and fast implementation of analysis (<2 minutes).

Key words: Spermatozoa, motility, CASA, optimum

ABSTRAK

Motilitas merupakan parameter yang sangat penting untuk menentukan kualitas semen. Penilaian motilitas spermatozoa dapat dilakukan dengan manual (subyektif) atau dengan CASA. Keunggulan penilaian motilitas menggunakan CASA dibandingkan secara manual adalah lebih obyektif, akurat, cepat, efisien dan mampu memberikan gambaran motilitas spermatozoa secara detail. Namun dalam pelaksanaannya, penilaian dengan CASA menghasilkan data yang bervariasi. Sejauh ini, belum terdapat standar penilaian motilitas spermatozoa dengan CASA, kecuali dengan meminimalkan variasi pada faktor-faktor yang mempengaruhi hasil analisis dengan CASA. Tujuan penulisan ini adalah menguraikan faktor-faktor yang mempengaruhi analisis motilitas spermatozoa dan rekomendasi analisis motilitas spermatozoa dengan menggunakan CASA untuk menghasilkan penilaian motilitas yang optimal. Beberapa faktor yang mempengaruhi hasil analisis motilitas spermatozoa dengan CASA diantaranya: Pengaturan CASA, semen, pengencer semen, konsentrasi spermatozoa, *chamber*, analis, preparasi sampel dan waktu pelaksanaan analisis. Rekomendasi standar penilaian motilitas dengan menggunakan CASA adalah: Analis yang berpengalaman dan konsisten, preparasi sampel (*mixing, pipeting* dan *sampling*) yang tepat, konsentrasi spermatozoa 20 juta/ml, tipe *chamber* konsisten (dikondisikan 37°C), pengencer yang konsisten dan setingan CASA yang konsisten (*frame rate* 60 Hz dan *frame per field* 30) dan pelaksanaan analisis yang cepat (<2 menit).

Kata kunci: Spermatozoa, motilitas, CASA, optimal

PENDAHULUAN

Indonesia sangat kaya dengan sumber daya genetic dan salah satu diantaranya adalah sapi potong. Penetapan rumpun sapi potong lokal telah ditetapkan dalam Kepmentan No 325/Kpts/OT.140/1/2010 untuk sapi Bali, Kepmentan No 3735/Kpts/HK.040/11/2010 untuk sapi Madura dan Kepmentan No 2841/Kpts/LB.430/8/ 2012 untuk sapi PO. Sapi potong lokal Indonesia mempunyai banyak keunggulan, diantaranya: kemampuan kerja baik, daya adaptasi

terhadap lingkungan, pakan terbatas, cekaman panas dan penyakit ternak yang baik, fertilitas tinggi dan persentasi karkas yang tinggi (pada sapi Bali).

Produktivitas ternak secara garis besar ditentukan oleh faktor sapi jantan dan sapi betina. Produktivitas sapi pejantan menentukan produktivitas sapi betina. Sapi pejantan fertil dibutuhkan untuk dapat membuntingi sapi betina sehingga dihasilkan keturunan. Standar fertilitas sapi pejantan dengan BSE (*Breeding Soundness Evaluation*) diantaranya kualitas semen dan lingkaran skrotum (Bruner et al. 1995; Parker et al. 1999). Jumlah produksi dan kualitas semen yang

dihasilkan pada sapi potong dipengaruhi oleh banyak faktor, diantaranya: genetik, bangsa ternak, umur dan berat badan pejantan, pakan, suhu, musim, frekuensi dan ejakulasi (Sarastina et al. 2006). Bangsa ternak juga menentukan sifat semen yang dihasilkan, diantaranya: motilitas spermatozoa, spermatozoa normal dan jumlah abnormalitas primer spermatozoa (Chenoweth et al. 1996).

Motilitas spermatozoa merupakan salah satu parameter penting dalam penilaian kualitas semen. Motilitas spermatozoa memegang peranan penting dalam pencapaian spermatozoa ke oosit dan menembus zona pellucida. Nilai motilitas menunjukkan status daya hidup dan metabolisme spermatozoa serta status dari membran sel spermatozoa. Spermatozoa motil apabila mempunyai membran sel yang utuh, sedangkan spermatozoa tidak motil mempunyai membran sel yang tidak utuh atau rusak (Sarastina et al. 2006). Terdapat 2 faktor utama yang menentukan kemampuan fertilisasi spermatozoa (Ducha et al. 2014). Keutuhan membran mempunyai peran utama dalam membentuk ikatan dengan zona pellucida, sedangkan peran motilitas spermatozoa dalam upaya menembus cumulus dan zona pellucida.

Penilaian motilitas spermatozoa dapat dilakukan secara subyektif (*biased*) dan bersifat sangat peka terhadap perubahan lingkungan. Penilaian motilitas secara subyektif atau manual biasanya dilakukan oleh lebih dari 1 analis yang sudah berpengalaman dalam melakukan analisis motilitas spermatozoa. Parameter motilitas spermatozoa meliputi beberapa kriteria, diantaranya: persentasi spermatozoa motil progresif, dan jumlah total spermatozoa motil. Terdapat prosedur penilaian motilitas spermatozoa yang lebih obyektif (*unbiased*) diantaranya dengan spektrofotometri, *time-lapse-photomicrography*, *videomicrography* dan *computerized analysis* (CASA). Prinsip kerja CASA adalah menangkap gerakan obyek (spermatozoa) pada lintasannya. Keunggulan penilaian motilitas menggunakan CASA dibandingkan secara manual adalah lebih obyektif, akurat, cepat, efisien dan mampu memberikan gambaran motilitas spermatozoa secara detail. Namun dalam pelaksanaannya, penilaian dengan CASA menghasilkan data yang bervariasi. Banyak faktor yang mempengaruhi diantaranya: setingan CASA, semen, pengencer semen, konsentrasi spermatozoa, *chamber*, analis, preparasi sampel dan waktu pelaksanaan analisis. Sejauh ini, belum terdapat standar motilitas spermatozoa dengan CASA, kecuali dengan meminimalkan variasi pada faktor-faktor yang mempengaruhi hasil analisis dengan CASA.

Tujuan penulisan ini adalah menguraikan faktor-faktor faktor-faktor yang mempengaruhi analisis motilitas spermatozoa dan rekomendasi analisis motilitas spermatozoa dengan menggunakan CASA untuk menghasilkan penilaian motilitas yang optimal.

PARAMETER MOTILITAS SPERMATOZOA DENGAN CASA

Salah satu parameter penilaian fertilitas pada sapi pejantan (*breeding soundness evaluation*) adalah kualitas semen sapi pejantan dan lingkaran skrotum. Kualitas semen pada sapi pejantan diantaranya: volume 5-8 ml, motilitas 40-75%, konsentrasi 800-2000 juta/ml, spermatozoa normal mencapai 65-95% dan rentang pH 6,4-7,8 (Garner & Hafez 2008). Syarat seekor pejantan dapat digunakan sebagai sumber semen adalah konsentrasi spermatozoa minimal 500 juta/ml, motilitas progresif 50%, persentasi morfologi normal spermatozoa minimal 80% dan abnormalitas spermatozoa dibawah 20%. Balai Besar Inseminasi Buatan (BBIB) menggunakan standar motilitas progresif 70% untuk semen segar yang layak diproses menjadi semen cair maupun semen segar, dengan standar nilai motilitas setelah *thawing* mencapai 40%.

Dalam *breeding soundness evaluation*, parameter kualitas semen yang paling utama pada adalah morfologi spermatozoa dan motilitas spermatozoa. Definisi motilitas spermatozoa adalah jumlah spermatozoa motil yang hidup dan bergerak progresif dengan kisaran nilai 0-100%. *Computerized Assisted Sperm Analyzer* merupakan suatu metode analisis spermatozoa dengan mengoptimalkan perangkat komputer. Mekanisme kerja CASA adalah melalui identifikasi pola gerakan kepala spermatozoa dan pola lintasan yang dilalui spermatozoa. Manfaat dan keunggulan CASA diantaranya: obyektif, akurat, cepat, efisien dan mampu memberikan gambaran motilitas spermatozoa secara detail (Didion 2008). Dalam penilaian motilitas dengan menggunakan CASA, penilaian motilitas spermatozoa dapat dilakukan secara lebih detail dengan parameter motilitas yang terukur lebih banyak.

Beberapa parameter motilitas yang dapat terukur dengan CASA dan batasan definisinya:

Motilitas

Definisi motilitas spermatozoa sangat bervariasi dan mempunyai batasan kriteria tersendiri. Motilitas spermatozoa merupakan spermatozoa yang bergerak dengan kecepatan $>5 \mu\text{m/s}$ (Massanyi et al. 2008). *World Health Organization* (WHO) mendefinisikan motilitas spermatozoa sebagai persentasi spermatozoa yang bergerak dengan VAP $>0 \mu\text{m/s}$, merupakan penjumlahan dari 3 kategori gerakan spermatozoa menurut WHO (*fast progressive*, *slow progressive* dan *motile non progressive*). Standar motilitas WHO tersebut dijadikan acuan untuk standar motilitas pada hewan karena memang belum tersedia.

Motilitas progresif

Sebagaimana dengan motilitas, definisi motilitas progresif juga mempunyai banyak versi. Motilitas progresif merupakan spermatozoa yang bergerak dengan kecepatan $>20 \mu\text{m}/\text{detik}$ (Massanyi et al. 2008). *World Health Organization* (WHO) mendefinisikan motilitas spermatozoa progresif merupakan persentasi spermatozoa yang bergerak dengan VAP $>25 \mu\text{m}/\text{s}$, merupakan penjumlahan dari 2 kategori gerakan spermatozoa menurut WHO (*fast progressive* dan *slow progressive*).

Hiperaktif spermatozoa

Hiperaktif spermatozoa merupakan suatu kondisi yang menggambarkan spermatozoa bergerak dengan sangat cepat namun kurang linear dan cenderung memutar atau membentuk pola lintasan seperti bintang (*star shaped pattern*). Parameter yang digunakan untuk menggambarkan suatu kondisi spermatozoa hiperaktif adalah VCL, LIN dan ALH. Terdapat banyak standar kriteria spermatozoa hiperaktif. Spermatozoa dikategorikan hiperaktif apabila mempunyai batas nilai VCL $>150 \mu\text{m}/\text{s}$, LIN $<50\%$ dan ALH $>5 \mu\text{m}$; LIN $<60\%$, ALH $>7,5 \mu\text{m}$ dan VCL $>100 \mu\text{m}/\text{s}$ (Ripp et al. 2003); LIN $<60\%$, ALH $\geq 5 \mu\text{m}$ dan VCL $>100 \mu\text{m}/\text{s}$ (Shibahara et al. 2003); VCL $>200 \mu\text{m}/\text{s}$ dan LIN $<20\%$ (Van der Horst 2014).

Distance Curve-Line (DCL), Distance Straight-Line (DSL) dan Distance Average Path (DAP)

Komponen parameter jarak tempuh spermatozoa menggunakan CASA diantaranya: DCL, DSL dan DAP. *Distance Curve-Line* (DCL) merupakan jarak yang dapat ditempuh oleh spermatozoa dalam satu menit pada lintasan *curve*. *Distance Straight-Line* (DSL) merupakan jarak yang dapat ditempuh oleh spermatozoa dalam satu menit pada lintasan *straight*. *Distance Average Path* (DAP) merupakan jarak yang dapat ditempuh oleh spermatozoa dalam satu menit pada lintasan rata-rata alur.

Velocity Curve Linear (VCL), Velocity Straight Linear (VSL) dan Velocity Average Pathway (VAP)

Komponen parameter kecepatan spermatozoa menggunakan CASA diantaranya VCL, VSL dan VAP. *Velocity Curve Linear* berarti *Curve Linear Velocity* (VCL) merupakan *velocity* spermatozoa dalam satu menit pada lintasan *curve* (Sarastina et al. 2006). *Velocity Straight Linear* (VSL) merupakan *velocity* spermatozoa dalam satu menit pada lintasan *straight* (Sarastina et al. 2006). *Velocity Average Pathway*

(VAP) merupakan *velocity* spermatozoa dalam satu menit pada lintasan rata-rata alur.

Linearity (LIN), Straightness (STR) dan Wobble (WOB)

Komponen parameter pola renang spermatozoa dengan menggunakan CASA diantaranya LIN, STR dan WOB. *Linearity* merupakan indikator kelurusan lintasan *curve linear*. *Straightness* merupakan indikator kelurusan lintasan rata-ratanya. *Wobble* merupakan pengukuran osilasi lintasan sebenarnya, mengindikasikan kuatnya goyangan spermatozoa selama satu detik.

Amplitude Lateral Head (ALH), Beat Cross Frequency (BCF), Average Orientation dan Change of Head (AOH)

Komponen parameter pola pergerakan kepala spermatozoa menggunakan CASA diantaranya: ALH, BCF dan AOH. *Amplitude Lateral Head* menunjukkan lebar rata-rata dari osilasi (getaran atau vibrasi) kepala spermatozoa saat berenang (Kathiravan et al. 2011). *Beat Cross Frequency* merupakan frekuensi (banyaknya) lintasan spermatozoa melalui rata-rata alur per detik. *Average Orientation Change of Head* (AOH) merupakan rata-rata derajat perubahan gerakan kepala spermatozoa (Sarastina et al. 2006).

FAKTOR-FAKTOR YANG MEMPENGARUHI ANALISIS MOTILITAS SPERMATOZOA DENGAN CASA

Computerized Assisted Sperms Analyzer (CASA) merupakan instrumen yang sangat bermanfaat untuk mengkarakterisasi gerakan spermatozoa karena bersifat obyektif, independen (dari interpretasi teknis) dan mampu mengidentifikasi gerakan spesifik spermatozoa. Setiap sampel spermatozoa dianalisis secara langsung pada citra digital (*digital image*), diantaranya gerakan kepala maupun kecepatan pergerakan spermatozoa (Lange-Consiglio et al. 2013). Jenis atau tipe CASA berpengaruh terhadap hasil penilaian motilitas spermatozoa. Hal ini disebabkan oleh setiap jenis/tipe CASA mempunyai standar lintasan spermatozoa (*sperm trajectory*) tersendiri dengan algoritma (cara perhitungan) yang berbeda. Karakteristik *hardware* yang digunakan setiap CASA juga berbeda. Beberapa CASA yang biasanya digunakan untuk analisis motilitas spermatozoa, diantaranya:

- *Sperm Class Analyzer*, Microptic, Spain.
- Hamilton-Thorne Bioscience, Beverly, MA, USA.
- Sperm Vision, Minitube, Tiefenbach, Germany.

- IVOS II and CEROS II, IMV Technology, France.

Upaya pemeliharaan CASA harus menjadi perhatian khusus untuk menjamin data yang dihasilkan akurat. *Software* dan *hardware* CASA harus divalidasi secara rutin untuk menghindari data yang kurang akurat atau presisi (Amann & Waberski 2014).

Hasil analisis motilitas spermatozoa menggunakan CASA sangat bervariasi dan sejauh ini belum tersedia standar protokol penilaian kualitas semen berbasis CASA. Beberapa faktor yang berdampak pada penilaian motilitas spermatozoa dengan CASA, diantaranya: setingan CASA, pengencer semen, konsentrasi spermatozoa, *chamber*, analisis, preparasi sampel dan waktu pelaksanaan analisis.

Setingan CASA (frame rate dan frame per field)

Frame rate merupakan jumlah *frame*/gambar pergerakan spermatozoa yang diambil dalam waktu 1 detik. *Frame rate* berpengaruh terhadap VCL spermatozoa. *Frame rate* 50-60 menghasilkan VCL spermatozoa yang proporsional (Perreault 2002). *Frame rate* 50-60 fps (Hz) artinya bahwa setiap gambar diambil dalam waktu 1/50-1/60 detik sehingga semakin tinggi *frame rate* menunjukkan semakin banyak pergerakan spermatozoa yang dapat ditangkap. Banyak setingan *frame rate* CASA yang lainnya, misal 25, 30, 40 atau 60. Hasil analisis motilitas spermatozoa dengan *frame rate* yang berbeda, menghasilkan data yang berbeda dan tidak dapat dibandingkan satu dengan lainnya. Data hasil analisis dapat dibandingkan apabila menggunakan setingan *frame rate* yang sama. Beberapa CASA biasanya sudah diseting dengan setingan perusahaan yang memproduksinya. Namun demikian, tidak menutup kemungkinan bahwa setingan yang ada dapat berubah untuk mengoptimalkan penilaian. *Frame rate* 60 memberikan hasil penilaian motilitas spermatozoa yang optimal. Kondisi ini menghasilkan motilitas spermatozoa yang lebih riil (sebenarnya). *Frame rate* yang semakin tinggi berpengaruh terhadap peningkatan kecepatan pergerakan dan vigor spermatozoa, demikian berlaku sebaliknya (Contri et al. 2010). Tardif et al. (1997) dan Amann & Waberski (2014) menyarankan bahwa setingan CASA harus divalidasi secara periodik untuk menjamin data yang dihasilkan.

Frame per field juga mempunyai peran dalam menghasilkan data motilitas spermatozoa dengan CASA. *Frame per field* merupakan jumlah *frame* atau gambar yang diambil dalam setiap bidang pandang. *Frame per field* berkorelasi positif dengan waktu yang dibutuhkan untuk melakukan analisis. Semakin tinggi *frame per field* membutuhkan waktu yang lebih lama untuk analisis. Hal ini berpengaruh terhadap spermatozoa yang diamati dan dapat menghasilkan data yang

bias. Beberapa studi menerapkan *frame per field* 30, 45 (Contri et al. 2010). Untuk menghasilkan data yang lebih akurat, setingan *frame per field* yang lebih rendah lebih direkomendasikan.

Pengencer semen

Semen yang mengandung spermatozoa harus melalui proses pengenceran terlebih dahulu supaya dapat dianalisis dengan optimal menggunakan CASA. Pengencer yang dicampur dengan spermatozoa berperan dalam menentukan nilai motilitas spermatozoa (Lange-Consiglio et al. 2013; Contri et al. 2010). Pada dasarnya, semua pengencer dapat digunakan sebagai pengencer spermatozoa. Syarat kriteria pengencer yang layak harus dipenuhi terlebih dahulu sebelum digunakan sebagai pengencer, diantaranya berfungsi sebagai sumber energi, buffer, mencegah *cold shock*, menambah masa dll. Perbedaan jenis dan kuantitas komponen pengencer berpengaruh terhadap motilitas spermatozoa yang dihasilkan. Banyak pengencer semen yang dapat digunakan untuk analisis motilitas dengan CASA, diantaranya: sodium-sitrat (Islam et al. 2017); tris aminomethane, dan CEP-2 (Ratnawati 2017); PBS dan NaCl 0,9% (Contri et al. 2010); CUE dan EYGT (Tardif et al. 1997).

Hasil observasi sebelumnya (*unpublished*), pengencer dengan bahan dasar susu tidak disarankan digunakan dalam pemeriksaan motilitas menggunakan CASA. Penggunaan pengencer berbahan dasar susu mengganggu tampilan spermatozoa pada layar. Dalam tampilan layar CASA, akan terlihat partikel lain berbentuk bulatan/debris yang berukuran lebih kecil, sama atau mungkin lebih besar dari spermatozoa. Hal ini akan membiaskan penilaian oleh CASA karena ukuran yang sama dengan ukuran spermatozoa sehingga teridentifikasi sebagai *static sperms*. Dampaknya adalah nilai motilitas yang bias atau tidak mewakili motilitas yang sebenarnya. Selain itu, keberadaan partikel tersebut mengganggu keleluasaan spermatozoa untuk bergerak (motilitas rendah).

Faktor lain yang mempengaruhi tampilan spermatozoa pada layar CASA dalam pengencer adalah keberadaan bahan biologis. Dalam mengoptimalkan fungsi pengencer, biasanya pengencer ditambahkan bahan biologis tertentu. Kuning telur atau putih telur biasanya menjadi komponen pengencer yang berfungsi sebagai anti *cold shock*, *cryoprotectant* maupun antioksidan. Se jauh pengamatan (*unpublished*) keberadaan bahan biologis dalam layar CASA tidak mengganggu tampilan spermatozoa dalam layar. Namun demikian, dibutuhkan teknik tersendiri dalam menentukan titik pengambilan sampel. Pada semen cair yang sudah melalui masa simpan, materi komponen biologis dan spermatozoa mengendap di bagian bawah sehingga dibutuhkan homogenisasi terlebih dahulu.

Setelah campuran homogen, sebaiknya dibiarkan beberapa saat dan dilakukan pipeting pada posisi campuran yang tidak terlalu pekat (bagian atas). Hal ini untuk menghindari terikutnya komponen biologi yang berpotensi mengganggu pengamatan motilitas dengan CASA.

Disarankan penggunaan pengencer spermatozoa yang sama (konsisten) dapat mengurangi faktor kesalahan penilaian motilitas spermatozoa dengan CASA. Pengencer sederhana yang dapat digunakan dalam penilaian dan mudah didapatkan diantaranya PBS dan larutan *isotonic* (larutan 0,9% NaCl) (Contri et al. 2010).

Konsentrasi spermatozoa

Konsentrasi spermatozoa merupakan jumlah spermatozoa dalam setiap ml, berpengaruh dalam penilaian motilitas dengan CASA. Konsistensi sampel berpengaruh terhadap data analisis yang dihasilkan CASA. Hal ini terkait langsung dengan konsentrasi spermatozoa dalam sampel (Perreault 2002). Konsentrasi spermatozoa yang terlalu tinggi menyebabkan *collision* kepala spermatozoa saling menempel (*collision*) dalam lintasannya (Lange-consiglio et al. 2013; Contri et al. 2010; Pagl et al. 2006). Populasi yang padat menyebabkan pergerakan spermatozoa juga terbatas atau tidak leluasa sehingga cenderung menurunkan potensi motilitas yang sebenarnya. Kondisi ini menyebabkan CASA tidak dapat menangkap semua pergerakan spermatozoa (*sperm trajectory*) atau hanya sebagian saja, sehingga hasil analisis motilitas yang dihasilkan tidak mewakili kondisi yang sebenarnya dari pergerakan spermatozoa.

Konsentrasi spermatozoa sebelum dianalisis menggunakan CASA adalah 20 juta/ml dan tidak disarankan konsentrasi spermatozoa 50 juta/ml dan 100 juta/ml (Contri et al. 2010; Lange-consiglio et al. 2013). Analisis motilitas juga dapat dilakukan pada konsentrasi spermatozoa yang lebih rendah, diantaranya 2-50 juta/ml (Peng et al. 2017); 5 juta/ml, 10 juta/ml (Contri et al. 2010). Konsentrasi yang lebih rendah menghasilkan hasil yang lebih baik dalam penilaian motilitas menggunakan CASA karena setiap lintasan spermatozoa dapat tertangkap oleh CASA dan dianalisis dengan sempurna. Namun demikian, konsentrasi spermatozoa 20 juta/ml lebih banyak direkomendasikan untuk hasil analisis motilitas spermatozoa yang lebih optimal.

Chamber/counting chamber

Terdapat berbagai macam tipe *chamber* yang dapat digunakan dalam pemeriksaan motilitas menggunakan CASA. Secara garis besar terdapat 2

jenis *chamber*, yaitu yang diisi dengan meneteskan sampel (*dropping*) atau melalui kapiler (*capillary forces*). *Chamber* dengan *dropping* diantaranya *Makler chamber* dan *Goldcyto chamber*. Sedangkan *chamber* dengan *capillary forces* diantaranya: *ledja*, *microscope slide*, *cover* (Peng et al. 2017), *zander spermometer*, *leica* (Massanyi et al. 2008). Semua *chamber* harus dikondisikan pada suhu 37°C sebelum sampel dimasukkan, hal ini untuk menghindari data hasil analisis yang bias (Contri et al. 2010).

Setiap *chamber* mempunyai bentuk, kedalaman dan kapasitas volume *chamber* tersendiri. Perbedaan ini berpengaruh terhadap konsentrasi spermatozoa dalam *chamber* (Peng et al. 2017) dan pergerakan spermatozoa (Lange-consiglio et al. 2013; Contri et al. 2010), baik nilai motilitas progresif atau parameter kinetiknya. Penggunaan *Makler chamber* menghasilkan hasil konsentrasi spermatozoa yang lebih tinggi (*over estimated*) daripada *chamber* yang lain sehingga lebih disarankan untuk digunakan dalam analisis motilitas yang tidak menuntut akurasi yang tinggi. Salah satu penyebab *over-estimated* perhitungan konsentrasi adalah keterbatasan CASA dalam membedakan spermatozoa dengan garis terang (*bright grids*) yang berada dalam *Makler chamber*. *Chamber* dengan penekanan kapiler (*capillary forces*) menghasilkan nilai konsentrasi dan motilitas yang lebih rendah dari kondisi yang sebenarnya. (Peng et al. 2017). Penyebab konsentrasi yang lebih rendah ini adalah adanya efek Segre-Silberberg yang menyebabkan perhitungan yang lebih rendah pada bagian tengah dan atas *chamber* daripada pada bagian bawah *chamber*. Motilitas yang rendah disebabkan adanya efek toksik dari cat maupun perekat terhadap spermatozoa yang menyebabkan kerusakan pada membran sel spermatozoa dan aksi kapiler yang menyebabkan kerusakan spermatozoa sehingga motilitas yang dihasilkan rendah (Hoogewijs et al. 2012; Gloria et al. 2013).

Penggunaan *ledja* menghasilkan jumlah spermatozoa non motil lebih tinggi spermatozoa yang bergerak cepat lebih rendah (Contri et al. 2010). Hasil pengamatan sebelumnya (unpublished) bahwa penggunaan *ledja* dan mikroskop slide tidak menghasilkan motilitas spermatozoa yang berbeda, kecuali nilai hiperaktif spermatozoa. Perbedaan kedalaman *chamber* dan sifat adhesif permukaan *chamber* yang menyebabkan perbedaan hasil analisis motilitas spermatozoa. Setiap *chamber* mempunyai kelebihan dan kekurangan tersendiri, namun untuk meminimalisasi faktor kesalahan, penggunaan *chamber* harus sama atau konsisten.

Analisis laboratorium

Faktor analisis dapat mempengaruhi hasil analisis motilitas spermatozoa dengan menggunakan CASA.

Penilaian motilitas secara subyektif dengan mikroskop cahaya, biasanya dilakukan oleh lebih dari 2 analis yang berpengalaman untuk meminimalkan tingkat kesalahan. Namun demikian, dalam melakukan penilaian motilitas dengan CASA, seharusnya dilakukan secara konsisten oleh seorang analis (andrologis) yang berpengalaman. Hal ini juga bertujuan untuk meminimalkan faktor kesalahan atau variasi hasil analisis. Penggunaan jenis CASA yang sama dengan setingan CASA, tipe *chamber*, pengencer, konsentrasi yang sama dapat menghasilkan data yang berbeda. Hal ini terkait dengan keahlian analisis dalam preparasi sampel dan pemilihan *field*/ bidang pandang pada layar CASA.

Preparasi sampel

Preparasi sampel berpengaruh terhadap hasil penilaian dengan CASA (Contri et al. 2010), diantaranya: *pipeting* dan *mixing* dan *sampling* sampel. *Mixing* dan *pipeting* sampel semen mempunyai peranan penting dalam menentukan hasil penilaian motilitas menggunakan CASA. *Mixing* biasanya dilakukan pada spermatozoa yang disimpan dalam suhu dingin atau beku. Faktor penyimpanan menyebabkan spermatozoa menumpuk di bagian bawah sehingga sebaiknya sampel di *mixing* sebelum analisis dilakukan. *Mixing* dilakukan dengan perlahan dan hati-hati, sampai dengan homogen. Resiko *mixing* yang tidak homogen berpengaruh terhadap sampel yaitu kepadatan spermatozoa yang terlalu tinggi maupun terlalu rendah. Spermatozoa yang terlalu padat menyebabkan lintasan spermatozoa tidak dapat ditangkap oleh CASA secara optimal.

Pipeting (cara pengambilan sampel dengan pipet) dan *sampling* (cara pengambilan sampel) juga mempunyai peran dalam menghasilkan data motilitas menggunakan CASA. *Pipeting* merupakan kelanjutan dari *mixing*, namun hasil akan lebih optimal apabila diberikan jarak beberapa menit sebelum dilakukan *pipeting*. Sampel yang telah homogen, kemudian disampling dengan cara *pipeting* pada titik tertentu. Cara pengambilan sampel dilakukan pada titik pengambilan (collection site) dengan tingkat kepadatan sedang, hal ini untuk menghindari konsentrasi spermatozoa yang terlalu padat sehingga lintasan spermatozoa dapat tertangkap oleh CASA secara optimal (Perez-Sanchez et al. 1996). Preparasi sampel harus divalidasi secara periodik untuk menjamin data yang dihasilkan (Tardif et al. 1997; Amann & Waberski 2014).

Waktu pelaksanaan analisis

Waktu pelaksanaan analisis harus dilakukan secepat mungkin, karena hal ini berpengaruh terhadap hasil analisis motilitas spermatozoa yang dihasilkan. Semakin lama pelaksanaan analisis maka kualitas spermatozoa semakin menurun. Pelaksanaan analisis motilitas dengan CASA harus mempertimbangkan kesiapan setingan CASA, kesiapan sampel (pengencer dan konsentrasi sampel), pemasukkan sampel ke *chamber*. Disarankan waktu pelaksanaan analisis tidak lebih dari 2 menit untuk menjamin data yang dihasilkan *valid* (Contri et al 2010).

REKOMENDASI PENGGUNAAN CASA

Penggunaan CASA untuk analisis motilitas memang mempunyai banyak keunggulan dibandingkan penilaian secara manual. Namun demikian sejauh ini banyak sekali faktor yang mempengaruhi hasil penilaian motilitas dengan CASA. *European Society of Human Reproduction and Embryology* (ESHRE) *Andrology Special Interest Group* (1998) menyatakan bahwa tidak ada sistem CASA maupun tipe *chamber* yang sempurna dalam penilaian motilitas. Upaya pendekatan yang dapat dilakukan adalah meminimalkan faktor-faktor yang mempengaruhi hasil penilaian motilitas spermatozoa sehingga meminimalkan faktor kesalahan.

Dari ulasan diatas dihasilkan suatu rekomendasi standar penilaian motilitas dengan menggunakan CASA diantaranya: dilakukan oleh analis yang berpengalaman dan konsisten, preparasi sampel (*mixing*, *pipeting* dan *sampling*) yang tepat, konsentrasi spermatozoa 20 juta/ml, konsisten dalam tipe *chamber* (dikondisikan 37°C), pengencer semen dan setingan CASA (*frame rate* 60 Hz dan *frame per field* 30) dan pelaksanaan analisis yang cepat (<2 menit).

PEMANFAATAN CASA DALAM BIDANG REPRODUKSI SAPI POTONG

Dalam bidang reproduksi sapi potong, khususnya dalam pelaksanaan analisis kualitas semen, CASA semakin memberikan peranan yang besar saat ini. Pemanfaatan CASA dalam analisis kualitas semen diantaranya sebagai alat (*tool*) untuk menganalisis motilitas (kinematik), konsentrasi morfologi, dan morfometri. Versi baru CASA dapat digunakan untuk analisis *vitality*, DNA fragmentasi, integritas dan reaksi

akrosom (Van der Horst et al. 2018). Setiap fungsi analisis CASA memberikan parameter yang lebih banyak dan gambaran yang lebih detail terkait spermatozoa sapi, sehingga hasil analisis dengan CASA lebih baik daripada evaluasi secara visual (subyektif). Pengulangan dalam pengukuran parameter kualitas semen pada babi menggunakan CASA menghasilkan koefisien variasi yang lebih rendah dari 10% dibandingkan dengan penilaian secara visual (subyektif) sehingga hasilnya lebih akurat (Vyt et al. 2004; Broekhuijse et al. 2011).

Pemanfaatan CASA di Indonesia mulai banyak digunakan dalam bidang penelitian maupun balai inseminasi. Ratnawati (2017) menggunakan CASA (SCA v.5.2) untuk mengobservasi kualitas semen cair pada tiga bangsa sapi potong menggunakan tiga jenis pengencer. Syarifuddin et al. (2018) menggunakan CASA (Sperm Vision v.3.7.5) untuk menganalisis kualitas semen sapi Bali dengan perlakuan pakan berbeda. Sarastina et al. (2006) menggunakan CASA (*sperm vision*) untuk menganalisis parameter motilitas pada beberapa bangsa sapi potong.

Dalam perkembangannya, metode analisis spermatozoa dengan sistem CASA mengalami banyak kemajuan. Pada manusia sudah ditemukan aplikasi berupa sistem CASA berbasis *smartphone* (SEEM) untuk menganalisis spermatozoa pada pria. Teknologi ini dalam upaya menjawab tantangan bahwa analisis spermatozoa dengan sistem CASA ternyata mempunyai beberapa keterbatasan, diantaranya: terbatasnya ruang dan waktu, mahal, tidak nyaman dan tidak efisien karena membutuhkan tenaga analis. Dengan teknologi CASA berbasis *smartphone* ini, analisis fertilitas pria dapat dilakukan sendiri di rumah (Cheon et al. 2019).

KESIMPULAN

Beberapa faktor yang mempengaruhi hasil analisis motilitas spermatozoa dengan CASA diantaranya: setingan CASA, semen, pengencer semen, konsentrasi spermatozoa, chamber, analisis, preparasi sampel dan waktu pelaksanaan analisis. Rekomendasi standar penilaian motilitas dengan menggunakan CASA diantaranya: analisis yang berpengalaman dan konsisten, preparasi sampel (*mixing*, *pipeting* dan *sampling*) yang tepat, konsentrasai spermatozoa 20 juta/ml, tipe chamber konsisten (dikondisikan 37°C), pengencer yang konsisten dan setingan CASA yang konsisten (frame rate 60 Hz dan *frame per field* 30) dan pelaksanaan analisis yang cepat (<2 menit). Disimpulkan selain beberapa faktor baik manusia maupun jenis alat yang berbeda yang mempengaruhi hasil analisis motilitas spermatozoa, penggunaan CASA juga memerlukan preparasi sampel termasuk

pengencer yang baik dan konsentrasi spermatozoa yang tepat.

DAFTAR PUSTAKA

- Amann RP, Waberski D. 2014. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenol.* 81:5-17.
- Bruner KA, McGraw RL, Whitacre MD, Van Camp SD. 1995. Breeding soundness examination of 1.952 yearling beef bulls in North Carolina. *Theriogenol.* 44:129-145.
- Broekhuijse MLWJ, Šoštarić E, Feitsma H, Gadella BM. 2011. Additional value of computer assisted semen analysis (CASA) compared to conventional motility assessments in pig artificial insemination. *Theriogenol.* 76:1473-1486.
- Chenoweth PJ, Chase Jr CC, Larsen RE, Thatcher MJD, Bivens JF, Wilcox CJ. 1996. The assessment of sexual performance in young *Bos taurus* and *Bos indicus* beef bulls. *Appl Anim Behav Sci.* 48:225-235.
- Cheon WH, Park HJ, Park MJ, Lim MY, Park JH, Kang BJ, Park NC. 2019. Validation of a smartphone-based, computer-assisted sperm analysis system compared with laboratory-based manual microscopic semen analysis and computer-assisted semen analysis. *Investig Clin Urol.* 60:380-387.
- Contri A, Valorz C, Faustini M, Wegher L and Carluccio A. 2010. Effect of semen preparation on casa motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Theriogenol.* 74:424-435.
- Didion BA. 2008. Computer-assisted semen analysis and its utility for profiling boar semen samples. *Theriogenol.* 70:1374-1376.
- Ducha N, Susilawati T, Wahyuningsih S. 2012. Ultrastructure and fertilizing ability of Limousin bull sperm after storage in CEP-2 extender with and without egg yolk. *Pakistan J Biol Sci.* 15:979-985.
- Garner DL, Hafez ESE. 2008. Spermatozoa and seminal plasma. In: Hafez B, Hafez ESE, editors. *Reproductive in farm animals.* 8th ed. Philadelphia (USA): Lea & Febiger. p. 96-109.
- Gloria A, Carluccio A, Contri A, Wegher L, Valorz C. and Robbe D. 2013. The effect of the chamber on kinetic results in cryopreserved bull spermatozoa. *Androl.* 1:879-885.
- Hoogewijs MK, de Vlieghe SP, Govaere JL, de Schauwer C, de Kruif A, Van Soom A. 2012. Influence of counting chamber type on CASA outcomes of equine semen analysis. *Equine Vet J.* 44:542-549.
- Holt WV, O'Brien J, Abaigar T. 2007. Applications and interpretation of computer-assisted sperm analyses and sperm sorting methods in assisted breeding and

- comparative research. *Reprod Fertil Develop.* 19:709-718.
- Islam MR, Husain SS, Hoque MA, Talukder MK, Rahman MS, Ali MY. 2017. Computer assisted sperm analysis of Brahman crossbred breeding bull semen. *Bang J Anim Sci.* 46:1-9.
- Kathiravan P, Kalatharan J, Karthikeya G, Rengarajan K and Kadirvel G. 2011. Objective sperm motion analysis to assess dairy bull fertility using computer-aided system – a review. *Reprod Dom Anim.* 46:165-172.
- Lange-Consiglio A, Meucci A, Cremonesi F. 2013. Fluorescent multiple staining and CASA system to assess boar sperm viability and membranes integrity in short and long-term extenders. *Open Vet J.* 3:21-35.
- Martinez-Pastor F, Tizado EJ, Garde J, Anel L, de Paz P. 2011. Statistical series: opportunities and challenges of sperm motility subpopulation analysis. *Theriogenol.* 75:783-795.
- Massanyi P, Chrenek P, Lukac N, Makarevich AV, Ostro A, Zivcak J, Bulla J. 2008. Comparison of different evaluation chambers for analysis of rabbit spermatozoa motility parameters using CASA system. *Slovak J Anim Sci.* 41:60-66.
- Nyuwita A, Susilawati T, Isnaini N. 2015. Kualitas semen segar dan produksi semen beku sapi Simmental pada umur yang berbeda. *J Ternak Tropika.* 16:61-68.
- Parker R, Mathis C, Hawkins D. 1999. Evaluating the breeding soundness in beef bulls. Las Cruces (USA): Department of Animal and Range Sciences, New Mexico State University.
- Pagl R, Aurich JE, Muller-Schlosser F, Kankofer M dan Aurich C. 2006. Comparison of an extender containing defined milk protein fraction with a skim milk-based extender for storage of equine semen at 5°C. *Theriogenol.* 66:1115-1122.
- Peng J, Wang H, Lu J, Hui W, Wang Y, Shang X. 2017. Identifying term relations cross different gene ontology categories. *BMC Bioinformatics.* 18:573.
- Perez-Shancez F, Tablado L, Yeung CH, Cooper TG, Soler C. 1996. Changes in motility patterns of spermatozoa from the rabbit epididymis as assessed by computer-aided sperm motion analysis. *Mol Reprod Develop.* 45:364-371.
- Perreault SD. 2002. Smart use of computer-aided sperm analysis (CASA) to characterize sperm motion. In: Robaire B, Hinton BT, editors. *The Epididymis from Molecule to Clinical Practise, A Comprehensive Survey of the Efferents Ducts, The Epididymis and The Vas Defference.* New York (USA): Kluwer Academy/Plenum Publishers. p. 459-472.
- Ratnawati D. 2017. Beberapa parameter motilitas spermatozoa semen cair pada tiga bangsa sapi lokal dengan tiga pengencer berbeda selama simpan dingin [Tesis]. [Malang (Indonesia)]: Universitas Brawijaya.
- Ripp S, Daumer KA, McKnight T, Levine LH, Garland JL, Simpson ML, Sayler GS. 2003. Bioluminescent bioreporter integrated-circuit sensing of microbial volatile organic compounds. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 30:636-642.
- Sarastina, Susilawati T, Ciptadi G. 2006. Analisis beberapa parameter motilitas spermatozoa pada berbagai bangsa sapi menggunakan *Computer Assisted Semen Analysis (CASA)*. *J Ternak Tropika.* 6:1-12.
- Shibahara H, Obara H, Kikuchi K, Yamanaka S, Hirano Y, Suzuki Y, Takamizawa S, Suzuki M. 2003. Prediction of human sperm fertilizing ability by hyperactivated pattern. *J Mamm Ova Res.* 20:29-33.
- Syarifuddin NA, Toleng AB, Rahardja DP, Ismartoyo. 2018. Analisis semen berbasis komputerisasi (CASA) untuk memprediksi fertilitas sperma sapi Bali. Dalam: Soendjoto MA, Dharmono, Riefani MK, Ansari ML, Septiyan RA, Syahdi RN, penyunting. *Prosiding Seminar Nasional Lingkungan Lahan Basah.* Banjarmasin (Indonesia): LPPM, Universitas Lambung Mangkurat. hlm. 80-85.
- Tardiff AL, Farrel PB, Trouern-trend, Foote RH. 1996. Computer-Assisted Sperm Analysis for assessing initial semen quality and changes during storage at 5°C. *J Dairy Sci.* 80:1606-1612.
- Van der Horst G. 2014. Sperm motility subpopulation and fertility. *Proceeding of 25th Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction.* p. 73-77.
- Van der Horst G, Maree L and du Plessis SS. 2018. Current perspectives of CASA applications in diverse mammalian spermatozoa. *Reprod Fertility Develop.* 30:875-888.
- Vyt P, Maes, Rijsselaere T, Dejonckheere D, Castryck F, Van Soom A. 2004. Motility assessment of porcine spermatozoa: a Comparison of methods. *Reprod Dom Anim.* 39:447-453.

Pengembangan Tanaman Pakan Ternak di Lahan Bekas Tambang Batubara dalam Mendukung Usaha Peternakan

(Forage Development on Ex-Coal Mining Land to Support of Livestock Business)

Harmini

Balai Penelitian Ternak, Ciawi
Kontributor utama: Hmini2011@gmail.com

(Diterima 1 Agustus 2019 – Direvisi 22 Agustus 2019 – Disetujui 2 September 2019)

ABSTRACT

The availability of land for forage development is important to support cattle and buffalo production in Indonesia. The government is paying great attention to accelerate cattle and buffalo populations in Indonesia. One of the Ministry of Agriculture programs, UPSUS SIWAB to increase cattle and buffalo population has been established. To support this program, sufficient forage and concentrate are crucial. Usually, the development of forage is allocated on the sub-optimal land and one alternative to sub-optimal lands is ex-coal mining land. The aim of this paper is to describe the utilization of ex-coal mining land for forage development to support the livestock productivity, some problems in ex-coal mining area and strategies to encounter these problems. There are several challenges in forage production including pH, the composition of organic matter, low soil microorganisms and heavy metals. These problems can be minimized by adding organic matter, organic fertilizer, microorganism such fungi mycorrhizae and phytoremediation. In conclusion, after the problems have been minimized, the ex-coal mining land can be used for developing forages for livestock.

Key words: Forage, ex-coal mining, phytoremediation

ABSTRAK

Ketersediaan lahan untuk pengembangan pakan hijauan merupakan hal yang penting untuk menunjang produksi sapi dan kerbau di Indonesia. Pemerintah menaruh perhatian besar untuk melakukan percepatan peningkatan populasi sapi dan kerbau melalui UPSUS SIWAB. Untuk mendukung program tersebut, kecukupan hijauan dan konsentrat sangat krusial. Pada umumnya pengembangan hijauan dialokasikan di lahan sub optimal dan salah satu alternatif lahan sub optimal adalah lahan bekas tambang batubara. Tujuan makalah ini adalah mengulas pemanfaatan lahan bekas tambang batubara untuk budidaya tanaman pakan ternak dalam mendukung produktivitas ternak dan beberapa kendala di lahan bekas tambang serta penanganannya. Beberapa masalah dalam memproduksi hijauan di lahan bekas tambang batubara adalah pH, komposisi bahan organik, populasi mikroorganisme yang rendah dan adanya residu logam berat. Permasalahan tersebut dapat diatasi dengan pemberian kapur, bahan organik, pupuk organik, mikroorganisme seperti fungi mikoriza dan fitoremediasi. Dapat disimpulkan bahwa sesudah masalah-masalah tersebut diatasi, lahan bekas tambang batubara dapat digunakan untuk mengembangkan hijauan pakan ternak.

Kata kunci: Tanaman pakan ternak, lahan bekas tambang, fitoremediasi

PENDAHULUAN

Kebutuhan daging sapi 604.966 ton dalam satu tahun, tetapi produksi saat ini hanya 354.770 ton sehingga perlu impor 41% dari kebutuhan nasional (BPS 2018). Berdasarkan Permentan no. 48 tahun 2016, pemerintah menetapkan Upaya Khusus Percepatan Peningkatan Populasi Sapi dan Kerbau Bunting (UPSUS SIWAB) sebagai percepatan populasi sapi dan kerbau secara berkelanjutan. Pasal 26 Permentan no 48 tahun 2016 menyatakan untuk mendukung UPSUS SIWAB diperlukan pakan yang aman, berkualitas, cukup, dan berkelanjutan melalui penguatan hijauan pakan ternak dan pakan konsentrat. Penguatan hijauan pakan yang dimaksud meliputi

penyediaan bibit atau benih hijauan pakan ternak, penyediaan lahan, jenis hijauan pakan ternak sesuai spesifik lokasi, dan ketersediaan air. Lahan optimal yang tersedia diperuntukkan untuk budidaya tanaman pangan, sedangkan untuk tanaman pakan ternak (TPT) diarahkan di lahan sub optimal, salah satunya lahan bekas tambang batubara.

Beberapa daerah penghasil batubara antara lain Tanjung Enim di Sumatera Selatan, Sorong di Papua, Kalimantan Selatan serta Kalimantan Timur. Pertambangan batubara meningkatkan perekonomian tetapi di lain pihak berdampak negatif bagi lingkungan seperti kerusakan besar pada flora, fauna, hidrologi dan biologi tanah (Fatmawati et al. 2018; Kumar & Pandey 2013). Selain itu, lahan bekas tambang batubara

mempunyai pH, bahan organik, unsur hara, dan populasi mikroorganisme yang rendah. Oleh karena itu, diperlukan upaya khusus bila akan digunakan untuk pengembangan tanaman pakan ternak di lahan bekas tambang batubara. Makalah ini akan mengulas pemanfaatan lahan bekas tambang batubara untuk budidaya tanaman pakan ternak dalam mendukung peningkatan populasi ternak.

KONDISI LAHAN BEKAS PERTAMBANGAN BATUBARA

Penambangan batubara dilakukan dengan dua metode: 1) *open cut mining* (penambangan permukaan atau ‘terbuka’, 2) *underground mining* (tambang bawah tanah atau ‘dalam’). Pemilihan metode penambangan ditentukan oleh letak unsur geologi endapan batubara. Tambang terbuka dilakukan jika lapisan batubara berada dekat dengan permukaan tanah. Sebaliknya tambang bawah tanah jika lapisan batubara berada cukup dalam. Di Indonesia, penambangan batubara pada umumnya dengan metode terbuka. Metode ini dilakukan dengan memotong bagian lapisan *top soil* tanah, yang berakibat berubahnya bentang alam, sifat fisik, kimia dan biologis dari tanah. Kondisi ini menyebabkan menurunnya tingkat kesuburan tanah.

Lahan bekas tambang dicirikan dengan pH masam, bahan organik dan kesuburan tanah rendah, tanah tidak stabil dan kondisi keseimbangan ekosistem permukaan tanah yang terganggu (Harmini et al. 2019; Kurniawan et al. 2014). Hal ini dapat dilihat pada Tabel 1 yang menampilkan kandungan kimia tanah di lahan bekas tambang batubara. Pemanfaatan rumput dan legum sebagai tanaman pionir dan bahan organik dapat memperbaiki lahan bekas tambang (Ahirwal & Maiti 2016). Keberadaan logam berat pada lahan bekas tambang (LBT) batubara perlu dikelola dengan tepat sehingga tidak berdampak negatif terhadap lingkungan maupun makhluk hidup. Logam berat yang terdeteksi pada LBT batubara antara lain Cr (VI), Cu, Zn, Ni, Hg, Pb (Saidy & Badruzsaufari 2009; Daru 2009). Ternak

yang mengkonsumsi hijauan (Siratro dan *Brachiaria decumbens*) di LBT batubara, ditemukan logam berat Cu, Zn dan Hg di daging dan jeroan diatas ambang batas yang diijinkan, tetapi logam berat Cr, Hg Pb dalam ambang batas normal (Daru 2009). Logam berat Cu dan Zn ditemukan juga di daging dan jeroan diatas ambang batas yang diijinkan dari ternak yang mengkonsumsi hijauan di LBT nikel, sementara Cd dan Pb dalam ambang batas normal. (Purnama 2014). Logam berat As, Hg dan Pb ditemukan dalam ambang batas pada susu sapi perah yang mengkonsumsi hijauan dari LBT batubara (Harmini, *in press*). Tabel 2 memperlihatkan ambang batas logam berat pada produk hasil ternak (mg/kg) berdasarkan Badan Standarisasi Nasional.

UPAYA REKLAMASI LAHAN BEKAS PERTAMBANGAN

Salah satu penyebab rendahnya tingkat kesuburan lahan bekas tambang adalah rendahnya mikro-organisme di dalam tanah. Untuk mengatasi hal ini, dapat digunakan *Fungi Mikoriza Arbuskula* (FMA) yang merupakan agen hayati untuk membantu rehabilitasi lahan bekas tambang, dengan simbiosis mutualisme antara cendawan dengan tanaman. Ukuran hifa yang lebih halus dari bulu-bulu akar memungkinkan hifa untuk menyusup ke pori-pori tanah yang paling kecil sehingga jaringan hifa eksternal dari FMA akan memperluas bidang serapan air dan hara, sehingga hifa bisa menyerap air pada kondisi kadar air yang rendah. Oleh karena itu, tanaman yang berasosiasi dengan mikoriza lebih mudah untuk menyerap hara tanah (Setiadi & Setiawan 2011; Rillig & Mummey 2006). FMA dapat melindungi tanaman dari unsur tertentu yang bersifat racun seperti logam berat, meningkatkan toleransi tanaman terhadap logam berat Pb, serta meningkatkan akumulasi Pb di akar dan menghambat akumulasi Pb pada batang dan daun (Arisusanti & Purwani 2013; Killham 1994).

Tabel 1. Kandungan kimia tanah di lahan bekas tambang batubara

pH	C org (%)	N total (%)	P (ppm)	KTK (cmol (+/kg)t	Kadar air (%)	K tersedia	Pb (ppm)	Fe (ppm)	Lokasi	Sumber bacaan
4,41 (sangat masam)	2,35 (rendah)	0,33 (sangat rendah)	2,53 (sangat rendah)	18,71 (rendah)	3,39	tad	2,24	430,87	KPC, Sangatta	Harmini et al. (2019)
4,10-6,46	0,48-4,82	0,08-0,21	3,52-7,72	tad	tad	11,47-92,80	4,87-13,40	tad	KPC, Sangatta	Mashud & Manaroinson (2014)
4,02 (sangat masam)	0,61 (sangat rendah)	0,08 (sangat rendah)	0,04 (sangat rendah)	tad	tad	tad	tad	tad	Berau	Ardhiansyah et al. (2014)

Keterangan: tad = tidak ada

Tabel 2. Ambang batas logam berat pada produk hasil ternak (mg/kg)

Produk hasil ternak	Jenis logam berat				
	Arsen (As)	Cadmium (Cd)	Merkuri (Hg)	Timah (Sn)	Timbal (Pb)
Susu dan hasil olahannya	0,10	-	0,03	-	0,02
Daging dan hasil olahannya	0,50	0,30	0,03	200,00	1,00
Jeroan	1,00	0,50	-	-	-

Sumber: BSN (2009)

Untuk menekan polutan dari lokasi bekas tambang batubara atau tanah di sekitar penambangan batubara yang kaya akan mineral sulfida biasanya dilakukan dengan sistem mekanis/teknis, agronomis dan kimia, untuk menghindari kontak langsung antara mineral sulfida dengan udara dan air serta pengikatan besi dengan asam sulfat yang terbentuk karena oksidasi (Marganingrum & Noviarda 2010). Salah satu sistem agronomis yang dapat dilakukan adalah revegetasi yang memainkan peranan penting dalam meningkatkan sifat fisik, kimia dan biologi tanah serta meningkatkan biomassa dan bahan organik tanah. Proses revegetasi lahan bekas tambang menjadi lahan pertanian membutuhkan tiga tahapan yaitu: 1) Pemulihan fungsi lahan yang kritis dan rusak melalui penanaman vegetasi, 2) Peningkatan fungsi lahan yang sudah direvegetasi menjadi lahan yang produktif untuk pertanian.

Langkah awal revegetasi pada umumnya dengan penanaman *legume cover crops* (LCC) untuk melindungi dari erosi tanah dan aliran permukaan (*run off*) serta meningkatkan bahan organik tanah. Leguminosa merupakan tanaman yang menyuburkan tanah karena mempunyai kemampuan mengikat N₂ (dalam bentuk N yang tidak tersedia bagi tanaman) dan mengubah menjadi N yang tersedia ketika berasosiasi dengan rhizobium (Armiadi 2009). Budidaya leguminosa di lahan bekas tambang batubara dilakukan dengan pengolahan tanah dengan pengapuran 4 t/ha dan pupuk kandang 10 t/ha (Purnamayani et al. 2017). *Calopogonium mucinoides* dan *Pueraria javanica* dikombinasi dengan mikoriza dan rhizobium mampu beradaptasi dengan baik pada overburden lahan bekas tambang timah dengan kemampuan hidup mencapai 83,3% (Narendra & Pratiwi 2014). Keberhasilan revegetasi lahan bekas tambang bisa dilihat dari komposisi dan struktur vegetasi. Komposisi vegetasi lahan bekas tambang emas PT. Newmont Minahasa Raya (PT. NMR) masih didominasi oleh tanaman introduksi seperti gamal (*Gliricidia sepium*), mahoni (*Swietenia macrophylla*), lamtoro (*Leucaena leucocephala*) (Purnomo et al. 2018). Setelah direklamasi selama 12 tahun, serta ditanami tanaman sengon, akasia, kayu putih dan vegetasi alami maka

lahan bekas tambang tersebut baru layak digunakan untuk tanaman pangan (Hermawan 2011).

Faktor pembatas lain dalam pemanfaatan lahan bekas tambang adalah adanya logam berat yang melebihi ambang batas. Fitoremediasi dikembangkan untuk menghilangkan logam berat dengan menggunakan tanaman. Fitoremediasi adalah teknik mengurangi polutan dari area yang terkontaminasi oleh polutan (Jeevanantham et al. 2019). *Bana grass* (*Pennisetum americanum* x *Pennisetum purpureum*) dan *Papalum atratum* dapat digunakan sebagai fitoekstraksi untuk Cd dan Zn (Zhang et al. 2010). *Bana grass* dan vetiver dapat digunakan untuk fitoekstraksi pada kondisi polusi Cd yang rendah dan moderat (Zhang et al. 2014). Daun dengan bulu daun (trikoma), permukaan daun tidak rata, stomata lebih banyak mampu menyerap Pb lebih tinggi dari udara (Fathia et al. 2015). Penambahan logam berat pada media tanam hidroponik pada sorgum dan alfalfa terbukti menyerap logam berat Cr, Ni, Cd dan asam etilena diamina tetraasetat (EDTA) pada bagian aerial diatas ambang batas normal (Bonfranceschi et al. 2009).

Tanaman yang masih toleran terhadap logam berat dalam level toksik dan mampu untuk berproduksi dengan baik disebut hiperakumulator. Tanaman hiperakumulator yang dapat digunakan untuk fitoremediasi dilihat di Tabel 3. Beberapa tumbuhan berpembuluh (*vascular plants*) hiperakumulator Cd, Co, Cu, Pb, Mg, Ni, Zn masing-masing >0,01%, serta konsentrasi logam berat di tajuk lebih besar dibanding akar (Gratao et al. 2005; Baker & Brooks 1989). *Portulaca oleracea* L. dapat digunakan untuk menghilangkan kontaminasi logam berat pada tanah karena jangkauan dan karakteristik fitoremediasi (Elshamy et al. 2019). *Pennisetum sinense* tidak dapat digunakan untuk fitoekstraksi berbagai macam logam berat meskipun dengan penambahan pupuk NH₄Cl, tanaman ini mampu melepaskan Cd dan Zn dari tanah tetapi kurang efektif untuk Pb (Chen et al. 2017).

Derajat kemasaman tanah yang rendah akan berdampak pada tingginya logam berat dan rendahnya mineral makro. Logam berat Cu, Zn, Se dibutuhkan tanaman untuk pertumbuhan, tetapi jika berlebihan

Tabel 3. Jenis mineral di akar, batang, daun tanaman hiperakumulator

Tanaman	Akar	Batang	Daun	Sumber pustaka
<i>Trifolium alexandrinum</i>	Cd, Co, Fe, Pb, Fe	Fe	Cr, Cu, Mn, Zn, Fe	Bhatti et al. 2018
<i>Brassica juncea</i>	Zn, Pb, Cd, Cu	Zn, Pb, Cd, Cu	Zn, Pb, Cd, Cu	Ali et al. 2017
<i>Helianthus annuus</i>	Pb	Pb	Pb	Ali et al. 2017
<i>Nicotiana tabaccum</i>	Hg	Hg	Hg	Gratao et al. 2005
<i>Pteris creatica</i>	As	As	As	Gratao et al. 2005
<i>Pteris longifolia</i>	As	As	As	Gratao et al. 2005
<i>Pteris umbrosa</i>	As	As	As	Gratao et al. 2005

menjadi toksik untuk sel tanaman. Rendahnya pH di lahan bekas tambang dapat diatasi dengan pemberian kapur karena dapat meningkatkan pH tanah, menurunkan kelarutan Al, meningkatkan Ca dan Mg, memperbaiki dan memantapkan agregat tanah, serta menurunkan tingkat erosi karena agregat tanah yang mantap (Rosmarkam & Yuwono 2002). Pemberian kapur (CaCl_2) pada lahan di dekat *shelter* tembaga yang diberi kompos dan telah terkontaminasi oleh limbah irigasi selama lebih dari 30 tahun mampu meningkatkan pH tanah dan menurunkan Cu dan Cd ditanah (Cui et al. 2016).

Pemanfaatan tanaman lokal spesifik lokasi untuk fitoremediasi perlu dipertimbangkan, karena tanaman lokal lebih mudah untuk beradaptasi dengan kondisi agroekosistem setempat. Pemilihan tanaman fitoremediasi mempertimbangkan kecepatan pertumbuhan, biomassa, siklus produksi dan keberlanjutan lingkungan. Berdasarkan familia Poaceae> Fabaceae> Asteraceae> Apiceae sebagai tanaman fitoremediasi (Guarino et al. 2017). *Sorghum bicolor* potensial untuk fitoremediasi dan produksi biomassa (Al Chami et al. 2014). *Pennisetum sinense* Roxb tidak mampu untuk memindahkan semua logam dari tanah meskipun dengan pemupukan NH_4Cl kecuali Cd dan Zn dan sedikit Pb yang diikat (Chen et al. 2017). Tanaman pakan yang digunakan untuk fitoremediasi diantaranya turi (*Sesbania grandiflora*) dengan mekanisme *rhizofiltration*, gamal (*Gliricidia sepium*) menekan logam berat di akar dan penggunaan biochar (arang bio) mampu menekan Ni dan Mn, rumput bahia (*Paspalum* spp) sebagai tanaman hiperakumulator Pb termasuk Cu dan Zn namun dalam jumlah sedang, vetiver (*Vetiveria zizanioides*) menyerap logam berat di akar, dan rumput bermuda (*Cynodon dactylon* sebagai translokasi logam berat dari akar ke batang selanjutnya ke daun (Suelee et al. 2017; Kumarathilaka & Vithanage 2017; Malar et al. 2014; Purwantari 2007; Padmavathiamma & Li 2007; Shanab et al. 2007).

Pemberian kompos pada lahan bekas tambang batubara merupakan salah satu cara untuk meningkatkan bahan organik tanah. Ternak menghasilkan kotoran ternak untuk kompos atau pupuk

organik. Keberadaan ternak di lahan bekas tambang akan saling menguntungkan antara ternak dan tanaman di lahan bekas tambang karena ternak menghasilkan kotoran sebagai pupuk organik untuk perbaikan tanah, lahan dan tanaman dibudidayakan lahan bekas tambang yang kandungan logam beratnya masih tinggi. Penggunaan bahan organik (*top soil*, bokashi, kompos Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS)) mampu memperbaiki kesuburan tanah (Amelia & Suprayogo 2018). Pemberian pupuk (kompos) diyakini merupakan langkah yang potensial untuk meningkatkan ketersediaan hara tanah. Aplikasi kompos pada *C. pubescens* mampu memasok hara pada *tailing* sebesar 19,62 kg N ha⁻¹ dan 7,89 kg P ha⁻¹ sementara pada *P. javanica* sebesar 9,7 kg N ha⁻¹ dan 7,04 kg P ha⁻¹ (Budianta et al. 2013).

PENGEMBANGAN TANAMAN PAKAN TERNAK PADA LAHAN BEKAS TAMBANG BATUBARA

Lahan bekas tambang batubara dapat dimanfaatkan untuk pertanian termasuk peternakan, serta pariwisata. Lahan harus direklamasi sebelum dimanfaatkan untuk budidaya tanaman pakan maupun pangan (Licina et al. 2016). Pemilihan tanaman pakan ternak (TPT) untuk dikembangkan di lahan bekas tambang harus diperhatikan beberapa hal diantaranya: 1) toleran kekeringan, hara rendah, dapat membentuk bahan organik sehingga mempercepat remediasi tanah pH masam; 2) Produksi biomassa tinggi; 3) palatable untuk ternak; 4) sumber bahan organik; 5) sistem perakaran kuat; 6) kualitas nutrisi cukup baik (Gizikoff 2003). Errington (2002) menambahkan tanaman pakan ternak di lahan bekas tambang batubara harus beradaptasi dengan baik dan kandungan logam berat dalam ambang batas aman. Vetiver (*Vetiveria zizanioides*) merupakan TPT yang dapat digunakan untuk fitoremediasi karena mampu memanfaatkan limbah organik sebagai sumber nutrisi (Komarawidjaja & Garno 2016). Rumput gajah dapat digunakan untuk tanah yang terkontaminasi Cu, lebih baik ditambahkan

fosfat (Liu et al. 2009). Penggunaan *Brachiaria brizantha* cv. Mulato meningkatkan fungsi mikroba tanah dalam menggunakan karbon sehingga memperbaiki kesuburan tanah (Brandan et al. 2017). Akumulasi logam berat pada bagian tanaman rumput bervariasi dari rendah sampai tinggi (Tabel 4). Produksi hijauan di lahan bekas tambang batubara tergolong rendah, tetapi kandungan bahan kering cukup tinggi (Harmini et al. 2019; Garsetiasih & Heriyanto 2017; Ardiansyah et al. 2014; Riyanto et al. 2001).

Pada lahan bekas tambang sistem penanaman rumput bersama leguminosa penting untuk dilakukan. Rumput berfungsi sebagai tanaman fitoremediasi dan penutup tanah yang mampu beradaptasi dengan baik pada lahan marginal, sedangkan leguminosa mampu mempertahankan stabilitas tanah. Sistem penanaman rumput dapat dilakukan dengan *alley cropping* (pertanaman lorong), *intercropping*, atau *monoculture*. *Intercropping* dilakukan dengan menanam dua atau jenis tanaman pada tempat dan waktu yang sama. Sistem penanaman ini mampu meningkatkan kesuburan dan bahan organik tanah, memperbaiki struktur tanah, mengurangi pemupukan, memperbaiki kualitas rumput dengan meningkatkan kadar protein pada rumput yang dihasilkan, serta kandungan bahan kering pada hijauan (Kremer et al. 2011; Lithourgidis et al. 2011; Koten et al. 2007). *Intercropping legume* dengan sereal dapat digunakan sebagai alternatif sistem pertanaman yang dikombinasi pada tanah lempung berpasir karena meningkatkan fiksasi N, kandungan bahan kering, serta protein kasar tanaman (Lithourgidis et al. 2007). *Alley cropping* alfalfa dengan *black walnut* meningkatkan mortalitas hama alfalfa (*alfalfa weevil*) sehingga meningkatkan produksi biomassa alfalfa yang pada

akhirnya meningkatkan keuntungan ekonomi (Stamps et al. 2009).

Salah satu lokasi lahan bekas tambang batubara yang telah dimanfaatkan untuk tanaman pakan ternak (TPT) adalah di Kaltim Prima Coal (KPC). Sistem tanam TPT di lahan bekas tambang batubara di KPC dengan sistem monokultur. Di Peternakan sapi perah terpadu (PESAT) di KPC tanaman pakan ternak yang dibudidayakan adalah rumput gajah dan indigofera (Gambar 1 dan 2).

Budidaya rumput di lahan bekas tambang batubara pada prinsipnya sama dengan di lahan non bekas tambang batubara. Perbanyak rumput secara menggunakan biji (generatif) dan stek atau sobekan (pols) (vegetatif). Pemberian bokashi 30 t/ha memberikan pertumbuhan dan produksi tertinggi dibandingkan dosis 10 t/ha dan 20 t/ha (Kusuma 2013). Umur potong berpengaruh terhadap kandungan nutrisi rumput gajah. Indigofera, jenis leguminosa pohon yang adaptif untuk lahan bekas tambang batubara. Indigofera dapat tumbuh dengan baik pada ketinggian 0-2200 m dpl, total produksi segar 52 ton/ha/tahun, PK 27,60% secara agronomis mudah untuk dikembangkan, tahan terhadap pemangkasan sehingga mampu mengeliminir stress kekeringan dengan jalan mengurangi proses transpirasi pada daun (Abdullah 2014; Herdiawan & Krisnan 2014; Herdiawan et al. 2012). *Pueraria javanica* mempunyai kemampuan adaptasi pada lahan bekas tambang batubara yang lebih baik dibanding *C. pubescens*, *C. muconoides*, *C. juncea*, sedangkan *C. juncea* merupakan leguminosa yang paling responsif terhadap penambahan bahan organik (Ardiansyah et al. 2014).

Tabel 4. Kandungan logam berat pada akar dan jaringan tanaman di lahan bekas tambang batubara

Jenis rumput	Logam berat	Akar (ppm)	Batang (ppm)	Daun (ppm)	Menjelang berbunga (ppm)	Rumput potong (ppm)	Sumber bacaan
<i>P.americanum x P.purpureum</i>	Cd	5,9±4	28±3	56±1	14±1	47±2	Zhang et al. 2010
	Zn	2670±219	1819±36	1383±57	335±44	1590±140	Zhang et al. 2010
<i>P. atratum</i>	Cd	349±16	Tad	Tad	Tad	46±1	Zhang et al. 2010
	Zn	9439±104	Tad	Tad	Tad	1056±141	Zhang et al. 2010
Rumput raja (<i>P. sinense</i> Roxb)	Cd	95,0±1,1	6,6 ± 0,2	12,1±0,7	Tad	13,5±0,1	Chen et al. 2017
	Pb	163,1±5	3,1±0,4	5,2±0,9	Tad	4,2±0,3	Chen et al. 2017
	Zn	1513,9±14	611,6±42,1	107,4±7,1	Tad	343,8±26,2	Chen et al. 2017
Rumput gajah	Hg	0,143	0,341	0,071	Tad	Tad	Harmini et al. 2019
	As	<0,002	<0,002	<0,002	Tad	Tad	Harmini et al. 2019
	Pb	4,252	4,477	11,811	Tad	Tad	Harmini et al. 2019
	Fe	2342,710	45,941	40,790	Tad	Tad	Harmini et al. 2019
	Mn	206,388	22,926	36,612	Tad	Tad	Harmini et al. 2019

Keterangan: Tad= tidak ada data



Gambar 1. Kebun rumput gajah di lahan bekas tambang batubara di Peternakan sapi perah terpadu (Pesat), Sangatta, Kaltim



Gambar 2. Kebun rumput Indigofera di lahan bekas tambang batubara di Peternakan sapi perah terpadu (Pesat), Sangatta, Kaltim.

KESIMPULAN

Lahan bekas tambang batubara dapat digunakan sebagai lahan untuk pengembangan tanaman pakan ternak setelah dilakukan reklamasi dan rehabilitasi. Tanaman pakan ternak relatif dapat beradaptasi dengan baik di lahan bekas tambang terutama lahan bekas tambang batubara. Hijauan pakan yang dapat dikonsumsi oleh ternak adalah tanaman pakan yang mempunyai mekanisme fitostabilisasi dan fitodegradasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah L. 2014. Prospektif agronomi dan ekofisiologi *Indigofera zollingeriana* sebagai tanaman penghasil hijauan pakan berkualitas tinggi. *Pastura*. 3:79-83.
- Ahirwal J, Maiti SK. 2016. Assesment of soil properties of different land uses generated due to surface coal mining activities in tropical Sal (*Shorea robusta*) forest, India. *Catena*. 140:155-163.
- Al Chami Z, Amer N, Smets K, Yperman J, Carleer R, Dumontet S, Vangronsveld J. 2014. Evaluation of

flash and slow pyrolysis applied on heavy metal contaminated sorghum bicolor shoots resulting from phytoremediation. *Biomass Bioenergy*. 63:1-12.

- Ali A, Guo D, Mahar A, Wang Z, Muhammad D, Li R, Wang P, Shen F, Xue Q, Zhang Z. 2017. Role of *Streptomyces pactum* in phytoremediation of trace element by *Brassica juncea* in mine polluted soils. *Ecotoxicol Environment Safety*. 144:387-395.
- Amelia L, Suprayogo D. 2018. Manajemen bahan organik untuk reklamasi lahan: analisis hubungan antara sifat kimia tanah dan pertumbuhan pohon di lahan timbunan bekas tambang batubara PT Bukit Asam (Persero), Tb. *J Tanah Sumberdaya Lahan*. 5:701-712.
- Ardhiansyah N, Sumarsono, Purbajanti ED. 2014. Pertumbuhan dan produksi beberapa leguminosa pakan yang ditanam pada media tanam tanah bekas penambangan batubara dengan perbaikan bahan organik. *J Litbang Provinsi Jawa Tengah*. 12:43-54.
- Arisusanti R, Purwani K. 2013. Pengaruh mikoriza *Glomus fasciculatum* terhadap akumulasi logam timbal (Pb) pada tanaman *Dahlia pinnata*. *J Sains Seni Pomits*. 292:2337-3520.
- Armiadi. 2009. Penambatan nitrogen secara biologi pada tanaman leguminosa. *Wartazoa*. 19:23-30.
- [BPS] Badan Pusat Statistik. 2018. Statistik Indonesia. Jakarta (Indonesia): Badan Pusat Statistik.
- Baker AJM, Brooks RR. 1989. Terrestrial higher plant which hyperaccumulate metal elements-a review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery*. 1:81-126
- Bhatti SS, Kumar V, Sambyal V, Singh J, Nagpal AK. 2018. Comparative analysis of tissue compartmentalized heavy metal uptake by common forage crop: a field experiment. *Catena*. 160:185-193.
- Bonfranceschi BA, Flocco CG, Donati ER. 2009. Study of the heavy metal phytoextraction capacity of two forage species growing in an hydroponic environment. *J Hazardous Materials*. 165:366-371.
- Brandan CP, Chavarria D, Huidobro J, Meriles JM, Gil SV. 2017. Influence of a tropical grass (*Brachiaria brizantha* cv. Mulato) as cover crop on soil biochemical properties in a degraded agricultural soil. *Eur J Soil Biol*. 83:87-90.
- [BSN] Badan Standardisasi Nasional. 2009. Batas maksimum cemaran logam berat dalam pangan. Jakarta (Indonesia): Badan Standardisasi Nasional.
- Budianta D, Gofar N, Andika GA. 2013. Improvement of sand tailing fertility derived from post tin mining using leguminous crop applied by compost and mineral soil. *J Trop Soils*. 18:217-223.
- Chen Y, Hu L, Liu X, Deng Y, Liu M, Xu B, Wang M, Wang G. 2017. Influences of king grass (*Pennisetum sinense* Roxb) - enhances approaches for phytoextraction and

- microbial communities in multi-metal contaminated soil. *Geoderma*. 307:253-266
- Cui H, Fan Y, Yang J, Xu L, Zhou J, Zhu Z. 2016. In situ phytoextraction of copper and cadmium and its biological impacts in acidic soil. *Chemosphere*. 161:233-241
- Daru TP. 2009. Teknik pengembangan tanaman penutup tanah pada lahan reklamasi tambang batubara sebagai pastura [Disertasi]. [Bogor (Indonesia)]. Institut Pertanian Bogor.
- Elshamy M, Heikal Y, Bonanomi G. 2019. Phytoremediation efficiency of *Portulaca oleracea* L. naturally growing in some industrial sites, Dakahlia District, Egypt. *Chemosphere*. 222:678-687.
- Errington JC. 2002. Toward result – based standards for mine reclamation in British Columbia. In: BC Technical and Research Committee, editors. High Elevation Mine Reclamation Symposium. British Columbia: Canadian Land Reclamation Association.
- Fathia LAN, Baskara M, Sitawati. 2015. Analisis kemampuan tanaman semak di median jalan dalam menyerap logam berat Pb. *J Produksi Tanaman*. 3:528-534.
- Fatmawati, Budiman, Dyastari L. 2018. Dampak lingkungan galian tambang batubara PT. Kaltim Prima Coal bagi kesehatan masyarakat di Kecamatan Sangatta Utara Kabupaten Kutai Timur. *J Ilmu Pemerintahan*. 6:553-566.
- Garsetiasih R, Heriyanto NM. 2017. Potensi hutan reklamasi bekas tambang batubara, Sangatta, Kalimantan Timur untuk penangkaran rusa sambar (*Rusa unicolor*). *Bul Plasma Nutrafah*. 23:127-136.
- Gizikoff KG. 2003. Re-establishing livestock use on mined landscapes in the southern interior of BC. – In: UBC: Proceedings In: Annual British Columbia Mine Reclamation in Campbell River, BC, June 20-31, 2009. Vancouver (Canada): The University of British Columbia. p. 1-11.
- Gratao PL, Majeti P, Cardoso PF, Lea PJ. 2005. Phytoremediation: Green technology for the clean up of toxic metals in the environment. *Braz J Plant Physiol*. 17:53-64.
- Guarino C, Zuzolo D, Marziano M, Baiamonte G, Morra L, Benotti D, Gresia D, Stacul ER, Cicchella D, Sciarrillo R. 2017. Identification of native-metal tolerant plant species in situ: Environmental implications and functional traits. *Sci Total Environment*. 650:3156-3167.
- Harmini, Evvyernie D, Karti PDMH, Widiawati. 2019. Evaluation of quality of forage and mineral content on elephant grass (*Pennisetum purpureum*) at ex-coal mining. *AIP Conference Proceedings*. 2120:1-6.
- Herdiawan I, Krisnan R. 2014. Produktivitas dan pemanfaatan tanaman leguminosa pohon *Indigofera zollingeriana* pada lahan kering. *Wartazoa*. 24:75-82.
- Herdiawan I, Abdullah L, Sopandie, Karti PDMH, Hidayati N. 2012. Karakteristik morfologi tanaman pakan *Indigofera zollingeriana* pada berbagai taraf stress kekeringan dan interval pemangkasan. *JITV*. 17:276-283.
- Hermawan B. 2011. Peningkatan Kualitas Lahan Bekas Tambang melalui Revegetasi dan Kesesuaiannya sebagai Lahan Pertanian Tanaman Pangan. Prosiding Seminar Nasional Budidaya Pertanian. Urgensi dan Strategi Pengendalian Alih Fungsi Lahan Pertanian. Bengkulu, 7 Juli 2011. Bengkulu (Indonesia): Universitas Bengkulu. hlm. 60-70.
- Jeevanantham S, Saravanan A, Hemavathy RV, Kumar PS, Yaashikaa PR, Yuvaraj D. 2019. Removal of toxic pollutants from water environments by phytoremediation: A survey on application and future prospects. *Environment Technol Innovation*. 13:264-276.
- Kumarathilaka P, Vithanage M. 2017. Influence of *Gliricidia sepium* biochar on attenuate perchlorate-induced heavy metal release in serpentine soil. *J Chemistry*. 2017:1-8.
- Killham K. 1994. Soil ecology. Cambridge (UK): Cambridge University Press.
- Komarawidjaja W, Garno YS. 2016. Peran rumput vetiver (*Chrysopogon zizanioides*) dalam fitoremediasi pencemaran sungai. *J Teknologi Lingkungan*. 17:7-14.
- Koten BB, Wea R, Paga A. 2007. Respon kacang tunggak dan rumput sudan sebagai sumber pakan melalui pola tanam tumpangsari dengan berbagai proporsi tanaman di lahan kering. *Buletin Peternakan*. 31:121-126.
- Kremer RJ, Kussman RD. 2011. Soil quality in a pecan-kura clover alley cropping system in the Midwestern USA. *Agroforestry Systems*. 83:213-223.
- Kumar A, Pandey AC. 2013. Evaluating impact of coal mining activity landuse/ landcover using temporal satellite images in South Karanpura Coalfields and Environs, Jharkhand State, India. *IJARSG*. 2:183-197.
- Kumiawan AR, Suroso W, Alimano M. 2014. Potensi pemanfaatan limbah pembakaran batubara PLTU sebagai media tanam dalam kegiatan revegetasi lahan bekas tambang batubara. *J Teknologi Mineral Batubara*. 10:142-154.
- Kusuma ME. 2013. Pengaruh pemberian bokashi terhadap pertumbuhan vegetative dan produksi rumput gajah (*Pennisetum purpureum*). *J Ilmu Hewani Tropika*. 2:40-45.
- Licina V, Aksic MF, Tomic Z, Trajkovic I. 2016. Bioassessment of heavy metals in the surface soil layer of an opencast mine aimed for its rehabilitation. *J Environ Manage*. 186:240-252.
- Lithourgidis AS, Dordas CA, Damalas CA, Vlachostergios DN. 2011. Annual intercrops: An alternative pathway

- for sustainable agriculture. *Australian J Crop Sci.* 5:396-410.
- Lithourgidis AS, Dhima KV, Vasilakoglou IB, Dordas CA, Yiakoulaki MD. 2007. Sustainable production of barley and wheat by intercropping common vetch. *Agron Sustain Develop.* 27:95-99.
- Liu X, Shen Y, Lou L, Ding C, Cai Q. 2009. Copper tolerance of the biomass crops Elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schumach), Vetiver grass (*Vetiveria zizanioides*) and the upland reed (*Phragmites australis*) in soil culture. *Biotechnol Adv.* 27:633-640.
- Padmavathiamma PK, Li LY. 2007. Phytoremediation technology: Hyper-accumulation metals in plants. *Water Air Soil Pollut.* 184:105-126.
- Purnama A. 2014. Risiko kontaminasi logam berat pada daging sapi yang merumput dan hidup di areal revegetasi tambang [Tesis]. [Bogor (Indonesia)]: Institut Pertanian Bogor.
- Purnamayani R, Salvia E, Purnama H. 2017. Revegetasi lahan bekas tambang batubara melalui aplikasi pupuk kandang dan mikoriza. Dalam: Herlinda S, Nirmala K, Novra A, Sahari B, Suwandi, Tanbiyaskur, Puspitahati, Syafutri MI, Sasanti AD, penyunting. *Prosiding Seminar Nasional Lahan Suboptimal 2017. Pengembangan Ilmu dan Teknologi Pertanian Bersama Petani Lokal untuk Optimalisasi Lahan Suboptimal.* Palembang, 19-20 Oktober 2017. Palembang (Indonesia): Unsri Press. hlm. 624-631.
- Purnomo DW, Fijridiyanto IA, Witono JR. 2018. Penilaian variable vegetasi pada lahan reklamasi bekas tambang emas di Ratatotok, Minahasa Tenggara. *JPK Wallacea.* 7:93-108.
- Purwantari ND. 2007. Reklamasi area tailing di pertambangan dengan tanaman pakan ternak: Mungkinkah?. *Wartazoa.* 17:101-108
- Rillig MC, Mummey DL. 2006. Mycorrhizas and soil structure. *New Phytol.* 171:41-53.
- Saidy AR, Badruzsaufari. 2009. Hubungan antara konsentrasi Cr(VI) dan sifat kimia tanah: informasi awal untuk remediasi lahan bekas tambang di Kalimantan Selatan. *J Tanah Trop.* 14:97-103.
- Shanab RA, Ghanem N, Ghanem K, Al-Kolaibe A. 2007. Phytoremediation potential of crop and wild plants for multi-metal contaminated soils. *Res J Agric Biol Sci.* 3:370-376.
- Riyanto, Daru TP, Idris S. 2001. Percobaan penutup tanah (*cover crop trial*) PT Kaltim Prima Coal (KPC) di Sangatta. Samarinda (Indonesia): Fakultas Pertanian, Universitas Mulawarman.
- Rosmarkam A, Yuwono NW. 2002. Ilmu Kesuburan Tanah. Yogyakarta (Indonesia): Kanisius.
- Marganingrum D, Noviardi R. 2010. Pencemaran air dan tanah di kawasan pertambangan batubara di PT Berau Coal Kalimantan Timur. *Riset Geologi dan Pertambangan.* 20:11-20.
- Mashud N, Manaroinsong E. 2014. Pemanfaatan lahan bekas tambang batubara untuk pengembangan sagu. *B Palma.* 15:56-63.
- Malar S, Manikandan R, Favas PJC, Sahi SV, Venkatachalam P. 2014. Effect of lead on phytotoxicity, growth, biochemical alterations and its role on genomic template stability in *Sesbania grandiflora*; Apotential plant for phytoremediation. *Ecotoxicol Environ Safety.* 108:249-257.
- Narendra BH, Pratiwi. 2014. Pertumbuhan *cover crops* pada lahan overburden bekas tambang timah di Pulau Bangka. *Forest Rehabilitation J.* 2:15-24.
- Setiadi Y, Setiawan A. 2011. Studi status fungi *mikoriza arbuskula* di areal rehabilitasi pasca penambangan (studi kasus PT INCO Tbk. Sorowako, Sulawesi Selatan). *J Silvikultur Trop.* 3:88-95.
- Stamps WT, McGraw RL, Godsey L, Woods TL. 2009. The ecology and economics of insect pest management in nut tree alley cropping in the Midwestern United States. *Agric Ecosys Environ.* 131:4-8.
- Suelee AL, Hasan SNMS, Kusin FM, Yusuff FM, Ibrahim ZZ. 2017. Phytoremediation potensial of vetiver grass (*Vetiveria zizanioides*) for treatment of metal-contaminated water. *Water Air Soil Pollut.* 228:158. doi: 10.1007/s11270-017-3349-x.
- Zhang X, Xia H, Li Z, Zhuang P, Gao B. 2010. Potential of four grasses in remediation of Cd and Zn contaminated soils. *Bioresour Technol.* 101:2063-2066.
- Zhang X, Gao B, Xia H. 2014. Effect of cadmium on growth, photosynthesis, mineral nutrition and metal accumulation of bana grass dan vetiver grass. *Ecotoxicol Environ Safety.* 106:102-108.

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

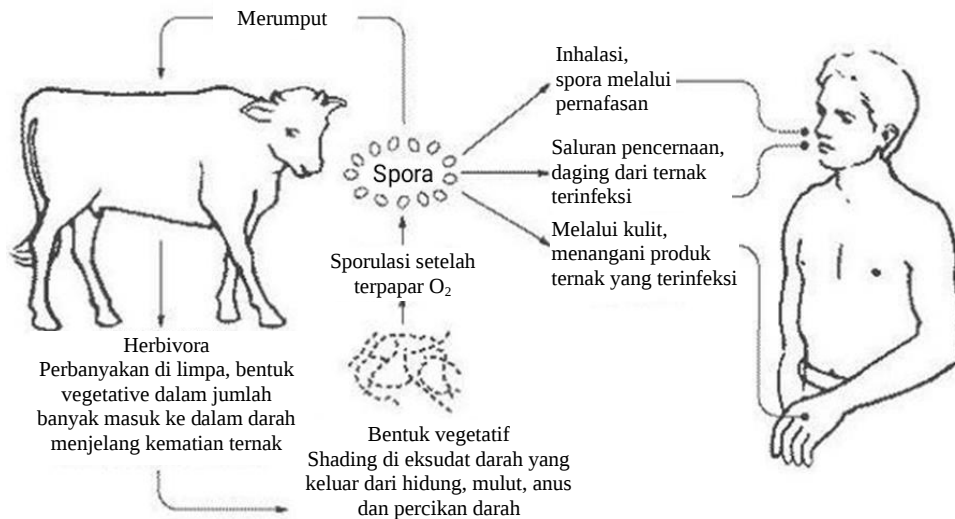
td: Data tidak tersedia; BKLT: Berat kering tanpa lemak

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

- Satuan pengukuran:** dipergunakan sistem internasional (SI).
- Penulisan angka desimal:** untuk bahasa Indonesia dipisahkan dengan koma (,), untuk bahasa Inggris dengan titik (.).
- 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 diperkenankan.
 - Bila suatu pernyataan diperoleh dari komunikasi pribadi, perlu dicantumkan "nama orang yang dihubungi" dan diikuti dengan (komunikasi pribadi) di belakangnya.
 - Memuat nama penulis yang dirujuk dalam naskah.
 - Jika penulis yang sama menulis lebih dari satu artikel dalam tahun yang sama dapat dibubuhi huruf kecil.
 - Disusun secara alfabetis dan tahun penerbitan menurut nama penulis.
- 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

Registered in:

