

ISSN 0216-6461

e-ISSN 2354-6832

Terakreditasi Kemenristekdikti
Keputusan Menteri Ristek/BRIN
No. 85/M/KPT/2020

WARTAZOA

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

Volume 32
Nomor 2
Juni 2022



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

WARTAZOA

Buletin Ilmu Peternakan dan Kesehatan Hewan Indonesia

Volume 32 Nomor 2 Tahun 2022

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:

Prof. (Riset) 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)

Dr. Drh. Eny Martindah, MSc. (Peneliti Ahli Utama – Balai Besar Penelitian Veteriner – Parasitologi dan Epidemiologi)

Ir. Mariyono, MSi. (Peneliti Ahli Madya – Loka Penelitian Sapi Potong – Pakan dan Nutrisi Ternak)

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 Nurgartiniingsih, 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

Wartazoa nomor 2 tahun 2022 berisi 5 makalah yang lebih menguraikan tentang penyakit dan hanya 1 makalah tentang penggunaan marker untuk mendapatkan informasi keragaman genetik.

Tuberkulosis (Ztb) disebabkan oleh anggota kelompok bakteri *Mycobacterium tuberculosis* kompleks yang dapat menyerang hewan sebagai *reservoir* dan bersifat zoonosis, sehingga tuberkulosis dapat menular dan menginfeksi manusia. Penyakit ini dapat ditularkan melalui rute inhalasi dan oral. Upaya pencegahan kejadian dan penularan Ztb dari ternak ke manusia meliputi: meningkatkan manajemen pemeliharaan yang baik, pelaksanaan program surveilans secara rutin, meningkatkan cakupan vaksinasi serta upaya lainnya dengan memperhatikan segala faktor risiko yang dapat meningkatkan kejadian dan penularan Ztb.

Toksoplasmosis merupakan salah satu penyakit yang disebabkan oleh parasit protozoa *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) yang biasanya dapat ditemukan pada feses kucing, sayuran mentah, daging mentah, rumput-rumputan, dan tanah. Penularan *T. gondii* dapat secara vertikal maupun horizontal. Kejadian toksoplasmosis yang menyerang kucing di Indonesia memiliki prevalensi yang beragam tergantung pada metode diagnosis yang digunakan, jumlah sampel, kondisi geografis, dan iklim. Oleh sebab itu, informasi mengetahui siklus hidup *T. gondii*, gejala klinis, patogenesis, diagnosis, faktor risiko, pengendalian, situasi toksoplasmosis pada kucing perlu diketahui untuk mencegah kasus negatif dari protozoa *T.gondii* terhadap kucing dan manusia.

Penyakit *African Swine Fever* (ASF) telah mewabah di Indonesia dan negara tetangga. Sampai saat ini, cara penanggulangan yang dikenal efektif adalah penerapan biosekuriti ketat dan pemusnahan semua babi yang terinfeksi atau teduga terinfeksi. Tetapi, cara ini sulit diterapkan di Indonesia dan pendekatan vaksinasi pada babi akan lebih baik untuk mencegah ASF. Pembuatan vaksin masih cukup sulit karena virus ASF sangat kompleks dengan kemampuan melumpuhkan sistem imun babi yang sangat canggih. Vaksin aktif yang dipreparasi dengan mendelesi gen yang berperan dalam virulensi adalah cara yang paling besar memberikan harapan.

Campylobacter jejuni dan *C. coli* menjadi kontaminan pada daging ayam terutama di bagian kulit dan dapat menyebabkan campylobacteriosis pada manusia dengan gejala pencernaan yang terganggu hingga mengancam kehidupan. Oleh sebab itu, upaya mengurangi kontaminasi *Campylobacter* spp pada daging ayam atau mengurangi penggunaan antibiotik saat pemeliharaan ayam ketika ditemukan penyakit merupakan hal yang harus dilakukan. Upaya ini tidak hanya mengurangi penyebaran campylobacteriosis tetapi juga mencegah terjadinya resistensi antibiotik.

Program pelestarian dan pengembangan sapi-sapi lokal ini memerlukan informasi dasar berupa keragaman genetik, hubungan genetik, dan struktur genetik antar rumpun ternak. Terdapat beberapa jenis marker DNA yang dapat digunakan untuk menganalisis keragaman genetik, salah satunya marker mikrosatelit. Setidaknya 28 marker mikrosatelit yang telah diteliti pada sapi lokal Indonesia. Berdasarkan nilai PIC, beberapa marker dikategorikan sebagai sangat informatif sehingga dapat dipertimbangkan untuk digunakan dalam analisis keragaman genetik rumpun ternak lainnya di masa mendatang.

Demikianlah uraian singkat mengenai 5 makalah yang diterbitkan dalam Wartazoa volume 32 no 2, tahun 2022. Semoga informasi yang disampaikan akan sangat bermanfaat bagi para pembaca.

Bogor, Juni 2022

Ketua Dewan Penyunting

WARTAZOA

Buletin Ilmu Peternakan dan Kesehatan Hewan Indonesia

Volume 32 Nomor 2 (Juni 2022)

ISSN 0216-6461

e-ISSN 2354-6832

DAFTAR ISI	Halaman
Potensi Transmisi Penyakit Zoonotik Tuberkulosis dari Ternak kepada Manusia (Potential Transmission of Zoonotic Tuberculosis Disease from Livestock to Humans) Hasna Aldisa Madani, AI Cahyadi dan S Windria	59-68
Pengendalian Toksoplasmosis pada Kucing di Indonesia (Cats Toxoplasmosis Control in Indonesia) Ageng Ilham Ramadhani, R Yesica dan IBGR Wisesa	69-78
Upaya yang Penuh Tantangan Menuju Penemuan Vaksin <i>African Swine Fever</i> (Challenging Efforts Towards the Discovery of the African Swine Fever Vaccine) Simson Tarigan	79-90
Antibiotic Resistance of the <i>Campylobacter</i> Isolates According to Their Species in Broiler Chicken Meats in Many Regions (Resistensi Antibiotik dari Isolat <i>Campylobacter</i> Menurut Spesiesnya Pada Daging Ayam Pedaging di Berbagai Daerah) Elma Hrustemović, F Čaklovica, J Đedićbegović, M Smajlović, K Čaklovica dan E Članjak-Kudra	91-104
Aplikasi Marker Mikrosatelit untuk Analisis Keragaman Genetik Sapi Lokal Indonesia (Application of Microsatellite Markers for Genetic Diversity Analysis of Indonesian Local Cattle) Dwi Nur Happy Hariyono	105-118

Potensi Transmisi Penyakit Zoonotik Tuberkulosis dari Ternak kepada Manusia

(Potential Transmission of Zoonotic Tuberculosis Disease from Livestock to Humans)

Hasna Aldisa Madani¹, AI Cahyadi² dan S Windria^{2,3}

¹Mahasiswa Sarjana Program Studi Kedokteran Hewan, Fakultas Kedokteran, Universitas Padjadjaran, Bandung, Indonesia

²Departemen Ilmu Kedokteran Dasar, Divisi Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Padjadjaran, Bandung, Indonesia

³Program Studi Kedokteran Hewan, Fakultas Kedokteran, Universitas Padjadjaran, Bandung, Indonesia

Kontributor utama: adi.imam@unpad.ac.id

(Diterima 12 November 2021 – Direvisi 22 Maret 2022 – Disetujui 2 Juni 2022)

ABSTRACT

Zoonotic Tuberculosis (Ztb) is caused by member of group bacteria called *Mycobacterium tuberculosis complex* which can attack animals as reservoirs and is zoonotic so that it can be transmitted and infected humans. This paper aims to review about zoonotic tuberculosis which includes: causative agents, modes of transmission, risk factors and prevention of Ztb transmission from livestock to humans. Based on reviewing 47 literatures, it shows that zoonotic tuberculosis in livestock can be caused by *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium caprae* and *Mycobacterium orygis*. The disease is transmitted by inhalation and oral routes. The most common risk factors are types of livestock rearing, age of livestock and population or herds size. There are several measures to prevent Ztb transmitted from livestock to humans, such as improving the good maintenance management, implementation of routine surveillance program, increasing vaccination coverage and other preventive measures by taking into account all risk factors that can increase the incidence and transmission of Ztb.

Key words: Zoonotic tuberculosis, transmission, livestock, *Mycobacterium tuberculosis complex*

ABSTRAK

Zoonotik Tuberkulosis (Ztb) disebabkan oleh anggota kelompok bakteri *Mycobacterium tuberculosis complex* yang dapat menyerang hewan sebagai reservoir dan bersifat zoonosis, sehingga dapat menular dan menginfeksi manusia. Makalah ini bertujuan untuk mengulas mengenai penyakit zoonotik tuberkulosis yang meliputi spesies bakteri penyebab, cara penularan, faktor risiko dan pencegahan penularan penyakit dari ternak ke manusia. Berdasarkan kajian terhadap 47 literatur dapat diketahui bahwa zoonotik tuberkulosis pada ternak dapat disebabkan oleh *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium caprae* dan *Mycobacterium orygis*. Penyakit ini dapat ditularkan melalui rute inhalasi dan oral. Faktor risiko yang paling umum meliputi pemeliharaan ternak, usia ternak dan populasi ternak. Upaya pencegahan kejadian dan penularan Ztb dari ternak ke manusia meliputi: meningkatkan manajemen pemeliharaan yang baik, pelaksanaan *surveillance program* secara rutin, meningkatkan cakupan vaksinasi serta upaya lainnya dengan memperhatikan segala faktor risiko yang dapat meningkatkan kejadian dan penularan Ztb.

Kata kunci: Zoonotik tuberkulosis, penularan, ternak, *Mycobacterium tuberculosis complex*

PENDAHULUAN

Zoonotik tuberkulosis (Ztb) merupakan tuberkulosis yang disebabkan oleh anggota kelompok bakteri *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTBC) (Kaneene et al. 2014), dapat menyerang hewan sebagai *reservoir* dan bersifat zoonosis sehingga dapat menular dan menginfeksi manusia (OIE 2017; WHO 2017; FAO 2017). Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) mengklasifikasikan zoonotik tuberkulosis sebagai salah satu diantara tujuh penyakit zoonosis terabaikan yang berpotensi menginfeksi manusia (Ereqat et al. 2013).

Data kejadian Ztb pada manusia, pada tahun 2016 secara global diperkirakan telah terjadi sebanyak 142.000 kasus (72.700 kasus di Afrika, 46.700 kasus di Asia Tenggara, 18.000 kasus di Pasifik Barat, 7.660 kasus di Mediterania Timur, 1.160 kasus di Eropa dan 822 kasus di Amerika), dengan 12.500 kasus kematian. Jumlah tersebut terhitung sebesar 1,4% dari total kasus tuberkulosis (TB) secara global yang mencapai 10 juta kasus (WHO 2017).

Dampak Ztb paling yang paling utama terhadap kesehatan manusia dan hewan, berupa terjadinya kesakitan dan kematian. Dampak ekonomi akibat Ztb

meliputi: penurunan efisiensi produksi daging dan susu, kerugian atas daging hewan terinfeksi yang tidak layak dikonsumsi, serta tingginya biaya program pemberantasan penyakit (Thoen et al. 2016). Penyakit ini juga berpotensi menghambat aktivitas perdagangan ternak beserta produknya, baik skala nasional ataupun internasional (Narro et al. 2012; Pendell et al. 2016; OIE; WHO; FAO 2017). Ternak memiliki kontribusi yang besar pada kehidupan masyarakat. Ternak dapat digunakan untuk kegiatan pertanian, dimanfaatkan produksinya (daging, susu, telur, kulit, wol, dsb.) hingga untuk kepentingan upacara budaya dan agama. Interaksi yang tinggi menyebabkan hewan memiliki potensi dalam penularan penyakit, dengan tingkat infeksi dan dampak yang berbeda-beda yang dapat menjadi ancaman bagi kesehatan masyarakat dan hewan (WHO 2020; Teppawar et al. 2018). Penelitian mengenai potensi transmisi zoonotik tuberkulosis dari ternak ke manusia penting dilakukan. Dengan mengetahui informasi mengenai spesies bakteri penyebab, cara penularan, faktor risiko serta pencegahan penularan Ztb dari ternak ke manusia, diharapkan kejadian Ztb dapat dicegah dan ditanggulangi dengan baik.

ZOONOTIK TUBERKULOSIS PADA TERNAK

Zoonotik tuberkulosis diketahui dapat terjadi pada ternak sapi (Biru et al. 2014; Shaheenur Islam et al. 2020;), kambing (Higino et al. 2011; Rahman et al. 2013), domba (Munos-mendoza et al. 2015; Infantes-lorenzo et al. 2019) dan babi (Bailey et al. 2013; Lipiec et al. 2019). Tuberkulosis pada sapi dilaporkan terjadi di negara Algeria (Naima et al. 2011), Bangladesh (Shaheenur Islam et al. 2020), Britania (Fielding et al. 2020), Egypt (Hassanain et al. 2009), Eritrea (Ghebremariam et al. 2018), Ethiopia (Biru et al. 2014; Kassa et al. 2015; Habitu et al. 2019; Dejene et al. 2016; Kemal et al. 2019), Indonesia (Mahatmi et al. 2014; Daulay 2015), Morocco (Yahyaoui-Azami et al. 2017), Niger (Boukary et al. 2012), Spain (Infantes-lorenzo et al. 2019) dan negara lainnya.

Penelitian Biru et al. 2014, melaporkan angka kejadian tuberkulosis sapi sebesar 20% berdasarkan level ternak (*animal prevalence*) dan 11,4% berdasarkan level kawanan ternak (*herd prevalence*). Penelitian yang dilakukan Kemal et al. 2019 menunjukkan hasil prevalensi berdasarkan level ternak (*animal prevalence*) sebesar 20,3% serta 51,2% berdasarkan level kawanan ternak (*herd prevalence*). Perbedaan angka prevalensi berdasarkan pada level ternak dan kawanan ternak, bergantung pada jumlah sampel ternak serta kondisi peternakan daerah yang digunakan penelitian.

Tuberkulosis pada sapi atau *Bovine Tuberculosis* (Btb), umumnya disebabkan oleh bakteri *M. bovis*

(Escarcega et al. 2020; Rahim et al. 2017; Shaheenur Islam et al. 2020; Dejene et al. 2016). Tuberkulosis sapi juga dapat disebabkan oleh bakteri MTBC lainnya yaitu *M. orygis* (Rahim et al. 2017; Shaheenur Islam et al. 2020) dan *M. caprae* (Rodriguez et al. 2011). Kejadian di negara Bangladesh, tercatat 44.800 kasus dengan kematian 2.090 kasus (Shaheenur Islam et al. 2020). Pada sapi, infeksi tuberkulosis menimbulkan lesi berupa formasi granuloma nodular yang disebut dengan tuberkel. Lesi tersebut dapat diamati pada limfonodus, umumnya daerah kepala dan thoraks, paru-paru, organ pencernaan, hati, empedu, pleura dan peritoneum (WHO 2009; Boukary et al. 2012).

Tuberkulosis diketahui menyerang domba, meskipun ternak ini dianggap kurang rentan terhadap infeksi tuberkulosis dibandingkan dengan ternak ruminansia lainnya (Munos-mendoza et al. 2015). Tuberkulosis pada domba dapat disebabkan oleh *M. bovis* dan *M. caprae* (Rodriguez et al. 2011; Rahman et al. 2013; Dejene et al. 2016; Vidal et al. 2018; Kassa et al. 2012). Tuberkulosis pada domba dilaporkan terjadi pada negara Bangladesh (Rahman et al. 2013), Ethiopia (Tschoop et al. 2011), Niger (Boukary et al. 2012) dan Spanyol (Munos-mendoza et al. 2015; Infantes-lorenzo et al. 2019). Tuberkulosis pada kambing atau *Caprine tuberculosis* (*Caprine Tb*) juga dapat disebabkan oleh bakteri *M. bovis* (Higino et al. 2011; Naima et al. 2011) dan *M. caprae* (Rodriguez et al. 2011; Vidal et al. 2018). *Caprine tb* dilaporkan terjadi di negara Algeria (Naima et al. 2011), Bangladesh (Rahman et al. 2013), Brazil (Higino et al. 2011), Ethiopia (Tschoop et al. 2011), Niger (Boukary et al. 2012) dan Spanyol (Infantes-lorenzo et al. 2019).

Infeksi tuberkulosis pada kambing dan domba menghasilkan lesi tuberkel perkejuan yang berwarna kekuningan (*yellowish caseous*) serta lesi granuloma yang dapat diamati pada limfonodus (*retropharyngeal, parotid, bronchial, mesenteric*), paru-paru hingga organ pencernaan (Kassa et al. 2012). Penelitian Vidal et al. 2018, menunjukkan bahwa dari 11 ekor sampel ternak kambing dan 3 ekor domba yang terinfeksi, teramati lesi makroskopik berupa lesi perkejuan pada organ paru-patu, lesi granuloma pada limfonodus *mesenteric*. Hasil kultur bakteri dan PCR menunjukkan semua isolat teridentifikasi diinfeksi oleh MTBC dengan *spoligotype profile* bakteri *M. caprae*. Pada pengamatan secara mikroskopik dengan pewarnaan Hematoksilin dan Eosin (H&E), teramati lesi berupa *pneumonia granulomatous lesion*, fibrosis serta adanya *multinucleated giant cell*. Berdasarkan laporan tersebut dapat diketahui bahwa kambing rentan terhadap infeksi MTBC khususnya *M. caprae*.

Tuberkulosis pada babi dapat disebabkan oleh *M. bovis* dan *M. caprae* (Dejene et al. 2016; Rodriguez et al. 2011; Bailey et al. 2013). Kejadiannya dilaporkan terjadi di negara Polandia (Lipiec et al. 2019) dan

Spanyol (Infantes-lorenzo et al. 2019). Infeksi tuberkulosis pada babi menimbulkan lesi yang serupa dengan ternak lainnya, yaitu lesi berwarna putih kekuningan yang terkalsifikasi sehingga bertekstur seperti pasir dengan ukuran 0,2 - 4 cm, lesi umumnya dapat diamati pada kepala, thorax hingga abdomen (Bailey et al. 2013). Babi termasuk ternak yang memiliki kerentanan yang tinggi terhadap infeksi tuberkulosis, khususnya yang disebabkan oleh *M. bovis* (Lipiec et al. 2018). Babi liar diketahui merupakan *maintanance host* yang penting, dapat menjadi salah satu sumber penularan dari *M. bovis* yang signifikan. Di negara New Zealand, dilaporkan bahwa babi liar juga digunakan dalam memonitor prevalensi kejadian tuberkulosis akibat *M. bovis* pada hewan kuskus ekor sikat (*Trichosurus vulpecula*) yang juga termasuk *host* dari *M. bovis* (Nugent et al. 2011; Bailey et al. 2013).

Kejadian Ztb pada ternak banyak terjadi di negara Afrika dan Asia (khususnya Asia tenggara). Tingginya kejadian Ztb pada negara-negara tersebut dapat disebabkan oleh beberapa faktor seperti: upaya penanggulangan penyakit belum efektif, rendahnya pengetahuan masyarakat tentang penyakit, banyaknya penduduk yang memiliki peternakan sendiri, kebiasaan masyarakat dalam konsumsi produk hewan (Adesokan et al. 2018). Tingginya kejadian Ztb juga berhubungan dengan kondisi kemiskinan yang tinggi, urbanisasi yang cepat, kepadatan penduduk, kondisi lingkungan dengan polusi udara tinggi, fasilitas kesehatan negara yang kurang memadai, kurangnya program survei dan pendeteksian dini penyakit serta rendahnya pelaporan kejadian Ztb pada suatu negara (Kock et al. 2021).

Ztb pada ternak diketahui paling banyak disebabkan oleh *M. bovis*. *M. bovis* merupakan agen utama penyebab zoonotik tuberkulosis. *M. bovis* termasuk kedalam genus *mycobacterium*, secara fenotip bakteri tersebut dicirikan sebagai mikroba intraseluler fakultatif, berbentuk batang, tidak memiliki kapsul, tidak membentuk spora, tidak bergerak (*non-motil*), aerobik obligat, memiliki dinding sel yang kaya akan lipid, bersifat hidrofobik. Bakteri ini diketahui mampu bertahan hidup selama beberapa bulan dalam kondisi yang dingin, gelap dan lembab. Bakteri ini juga mampu bertahan hidup dengan durasi yang bervariasi mulai 18-332 hari pada suhu 12-24°C tergantung dengan paparan sinar matahari. Sifat bakteri yang aerobik obligat menyebabkan bakteri membutuhkan oksigen untuk bertahan hidup, *M. bovis* mampu bertahan dalam kondisi rendah oksigen dengan memasuki kondisi diam tanpa bereplikasi, dimana bakteri dapat bertahan hidup selama berbulan-bulan hingga menahun sampai menemukan kondisi yang menguntungkan, seperti saat kondisi tubuh inang berkurang melalui kondisi penyakit serta stress yang menyerta (Teppawar et al. 2018).

M. bovis diketahui memiliki potensial zoonotik yang tinggi, dikarenakan memiliki kemampuan patogenesis yang kompleks, mampu menghindari atau memanipulasi respon imun tubuh inang. *M. bovis* memiliki faktor virulensi yang meliputi: dinding sel yang tebal, terdiri dari tiga jenis molekul yang terikat secara kovalen (peptidoglikan, arabinogalaktan dan asam mikolat). Pada dinding sel juga terdapat: 1) lapisan lilin D yang berfungsi untuk menggertak respon kekebalan serta menyebabkan bakteri menjadi tahan asam, 2) glikolipid yang menyebabkan daya toksik dan respons granulomatosus serta memberikan ketahanan bakteri terhadap fagositosis dan 3) mikosida yang menyebabkan bakteri menjadi resisten terhadap enzim terlarut dalam air, antibiotik dan desinfektan. Bakteri ini juga memiliki *cord factor* yang mampu menginduksi terjadinya pembengkakan pada mitokondria, sehingga menyebabkan penurunan respirasi dan aktivitas fosforilasi. Faktor ini juga diketahui dapat menginduksi disintegrasi retikulum endoplasma kasar dan pelepasan ribosom di sel hati. Pada bagian lapisan membran sitoplasmik dalam. *M. bovis* memiliki protein phosphatidylinositol mannosides dan lipoarabinomannan (LAM). LAM berfungsi dalam menghambat pematangan fagosom. Bakteri *slow grower* seperti *M. tuberculosis* dan *M. bovis* memiliki *mannosylated LAM* (ManLAM) yang memberikan kemampuan lain bagi *mycobacteria* untuk memasuki fagosit melalui reseptor manose dan sebagai ligan untuk interaksi dengan sel dendritik. Protein yang terdapat di dalam bakteri ini meliputi: Alkil-hidroperoksidas (AhpC dan AhpD), Antigen 85 (A,B dan C), Erp, ESAT-6, HbhA, Mce protein, MpcA dan MpcB, protein mel, PE dan PPE serta *Superoxides dismutases* (SODs). Semua protein tersebut memiliki fungsi dan perannya masing-masing dalam proses patogenesis yang sangat kompleks dari zoonotik tuberkulosis oleh bakteri *M. bovis* (Thoen et al. 2014). Semua faktor virulensi yang telah disebutkan tersebut dapat menjadi alasan mengapa bakteri *M. bovis* memiliki potensi zoonotik yang tinggi dalam menyebabkan zoonotik tuberkulosis pada hewan dan manusia.

CARA PENULARAN ZOONOTIK TUBERKULOSIS

Ztb dapat ditransmisikan dari hewan ke manusia melalui rute inhalasi (Shaheenur islam et al. 2020; Kemal et al. 2019; Tschopp et al. 2009; Kassa et al. 2015; Ghebremariam et al. 2018) dan oral (Shaheenur islam et al. 2020; Ghebremariam et al. 2018; Yahyaoui-Azami et al. 2018; Biru et al. 2014; Kassa et al. 2015; Escárcega et al. 2020; Boukary et al. 2012; Rodriguez et al. 2011; Vidal et al. 2018). Inhalasi merupakan cara penularan penyakit Ztb yang paling utama antara

manusia dan hewan (Kemal et al. 2019). Manusia dapat terinfeksi Ztb dari ternak melalui rute inhalasi, bakteri dapat terhirup manusia saat melakukan kontak ketika menangani hewan ataupun melalui peralatan dan lingkungan kandang yang terkontaminasi oleh sekresi hewan terinfeksi (Shaheenur Islam et al. 2020; Biru et al. 2014; Kassa et al. 2015). Individu yang bekerja pada bidang peternakan, kebun binatang, pemerahan susu, penjualan ternak, kedokteran hewan, inspeksi daging, laboratorium dan bidang lainnya yang berkaitan dengan hewan serta ternak, memiliki potensi yang lebih tinggi terpapar penyakit dari hewan seperti Ztb (Teppawar et al. 2018).

Penularan Ztb dari ternak kepada manusia juga dapat terjadi secara oral yaitu melalui konsumsi produk hewan (susu dan daging) dari hewan yang terinfeksi. (Kassa et al. 2012; Kemal et al. 2019; Ghebremariam et al. 2018). Penularan Ztb dari ternak ke manusia dapat didukung oleh kebiasaan masyarakat akan konsumsi susu segar yang tidak dipasteurisasi terlebih dahulu (*raw milk*) serta kebiasaan dalam konsumsi daging yang tidak dimasak sempurna (Ghebremariam et al. 2018). Penelitian yang dilakukan oleh Biru et al. 2014 di negara Ethiopia menunjukkan bahwa sejumlah 79% dari respondenya diketahui memiliki kebiasaan konsumsi *raw milk* dan daging yang tidak dimasak sempurna.

FAKTOR RISIKO YANG BERPOTENSI MENINGKATKAN KEJADIAN SERTA PENULARAN Ztb DARI TERNAK KE MANUSIA

Faktor risiko yang berhubungan dengan aktivitas manusia

Pertama, lama waktu telah bekerja dengan ternak. Responden yang telah bekerja menangani hewan di rumah pemotongan hewan selama lebih dari 6 tahun, diketahui berisiko 3 kali lebih tinggi untuk terpapar tuberkulosis dibandingkan dengan pekerja yang lama kerjanya dibawah 6 tahun (Agbalaya et al. 2020). Kedua, kurangnya pengawasan mengenai lesi penyakit pada saat pemotongan hewan. Kurangnya pengawasan yang dilakukan saat pemotongan hewan dapat menyebabkan daging yang berasal dari hewan terinfeksi, yang seharusnya diafkir menjadi tidak tersaring serta apabila tidak sengaja terkonsumsi oleh masyarakat, hal tersebut tentu dapat meningkatkan risiko terjadinya tuberkulosis melalui rute transmisi oral atau konsumsi (Sichewo et al. 2019; Agbalaya et al. 2020).

Ketiga, mengonsumsi susu segar tanpa dipasteurisasi (*raw milk*). Presentase kejadian pada negara Eritrea, tercatat sebesar 29% (Ghebemariam et al. 2018), pada negara Afrika Selatan tercatat sebesar 89% (Sichewo et al. 2019), pada negara Ethiopia

sebesar 53% (Kemal et al. 2019) dan di negara Nigeria tercatat 85-94% responden (penduduk) yang masih mengonsumsi susu segar tanpa dipasteurisasi (*raw milk*) (Boukary et al. 2012). Perilaku masyarakat *raw milk* umumnya terjadi karena faktor kebiasaan (rutin setiap hari atau setiap minggu), minum langsung *raw milk* dirasa lebih praktis, *raw milk* digemari masyarakat karena disebutkan memiliki rasa yang lebih enak dan segar serta cenderung memiliki harga yang lebih murah dibanding susu pasteurisasi (Kemal et al. 2019). Diketahui bahwa lesi yang terdapat pada kelenjar susu akibat infeksi tuberkulosis pada ternak, dapat mengontaminasi susu yang dihasilkan, sehingga *raw milk* yang langsung dikonsumsi oleh masyarakat berpotensi menjadi sumber penularan secara oral (Sichewo et al. 2019; Rodriguez et al. 2011). Keempat, penduduk yang mengonsumsi daging mentah (*raw meat*) atau daging yang kurang matang, ditambah dengan kondisi daging yang berasal dari peternakan sendiri, memiliki 1,4 kali risiko lebih tinggi untuk terpapar tuberkulosis melalui rute transmisi oral (Agbalaya et al. 2020). Konsumsi *raw milk* serta konsumsi daging mentah atau daging kurang matang, dapat dikatakan sebagai faktor risiko yang berhubungan secara signifikan dalam meningkatkan kejadian dan penularan Ztb dari ternak ke manusia (Sichewo et al. 2019; Kemal et al. 2019).

Kelima, kurangnya pengetahuan serta pemahaman masyarakat mengenai penyakit, diketahui memiliki hubungan terhadap angka kejadian serta penularan penyakit, khususnya Ztb dari ternak ke manusia (Ghebremariam et al. 2018; Kemal et al. 2019; Tembo et al. 2020; Belichior et al. 2016). Responden yang kurang atau tidak memahami penyakit, khususnya mengenai ciri khas lesi yang ditimbulkan, penularannya dari ternak ke manusia serta faktor risiko potensial yang dapat diperoleh saat melakukan pekerjaan mereka, berisiko 2,2 kali lebih tinggi terpapar penyakit Ztb (Agbalaya et al. 2020). Keenam, memelihara ternak dalam tempat tinggal. Penelitian Kemal et al. 2019 di negara Ethiopia, 37% dari total respondenya memelihara ternak di tempat tinggal yang sama dengan mereka, dengan tujuan agar ternak dapat terawasi secara langsung oleh pemilik. Sayangnya hanya 11% dari responden yang mengetahui bahwa kondisi tersebut dapat menjadi salah satu faktor risiko yang meningkatkan kejadian dan penularan Ztb dari ternak ke manusia.

Faktor risiko yang berhubungan dengan hewan

Pertama, usia ternak. Sapi yang berusia 3-6 tahun berisiko 2,8 kali dan sapi yang berusia lebih dari 6 tahun berisiko 3,3 kali lebih besar untuk terpapar tuberkulosis sapi (Shaheenur islam et al. 2020). Pada penelitian Dejene et al. 2016 di Ethiopia, sapi yang

berusia lebih dari 10 tahun berisiko 2,5 kali lebih tinggi terpapar tuberkulosis sapi. Begitu juga dengan penelitian Ullah et al. 2019 di Pakistan, ternak yang memiliki usia 5-8 tahun lebih, berisiko 3 kali lebih tinggi untuk terpapar tuberkulosis sapi. Usia ternak memiliki hubungan dengan lamanya waktu paparan yang terjadi, semakin bertambahnya usia ternak dapat mencerminkan waktu paparan yang lebih lama, sehingga berpotensi terjadinya paparan berulang pada ternak (Shaheenur islam et al. 2020; Kassa et al. 2012; Ullah et al. 2019) ataupun reaktivasi dari agen penyakit dalam tubuh ternak setelah waktu yang lama (Guta et al. 2014). Kedua, jenis kelamin ternak. Penelitian Ghebremariam et al. 2018 di Eritrea menyebutkan ternak jantan berisiko 3 kali lebih tinggi untuk terpapar tuberkulosis dibandingkan dengan ternak betina. Hal tersebut berkaitan dengan beberapa hal yaitu: penggunaan ternak jantan sebagai hewan penarik, baik untuk transportasi manusia atau barang, penggunaan ternak untuk membajak sawah serta kondisi ternak yang dikandangkan dalam waktu lama (Moiane et al. 2014). Ketiga, *breed* atau ras ternak. Penelitian yang dilakukan Azami et al. 2018 di Morocco, melaporkan prevalensi tuberkulosis sebesar 21,7% pada sapi keturunan silang (*Crossbred*), 16,7% pada sapi impor serta 9,6% pada sapi lokal. Penelitian yang dilakukan Nazimul Islam et al. 2021 di Bangladesh, juga menyebutkan bahwa sapi *Crossbred* berisiko 3 kali lebih besar untuk terpapar tuberkulosis dibandingkan dengan sapi ras murni. Hal tersebut dapat disebabkan oleh kondisi dari sapi *crossbred* dan sapi impor yang tidak terbiasa dengan kondisi peternakan dengan kawanan sapi lokal. Kondisi tersebut juga dipengaruhi oleh sistem pemeliharaan peternakan di wilayah negara tersebut serta jenis kawanan sapi yang mendominasi, seperti peternakan dengan sistem pemeliharaan ekstensif yang didominasi oleh kawanan sapi keturunan silang, serta peternakan dengan sistem pemeliharaan intensif yang didominasi oleh kawanan sapi impor (Yahyaoui-azami et al. 2018).

Sapi perah dinyatakan berisiko 3 kali lebih tinggi terhadap kejadian tuberkulosis dibandingkan dengan sapi potong. Hal tersebut dapat terjadi akibat beberapa faktor predisposisi sapi perah terhadap suatu penyakit. Pertama, adanya sebuah gen *Taurine Transporter (TauT)* pada sapi perah Friesian-Holstein. Kehadiran gen tersebut berpotensi menyebabkan defisiensi zat taurin yang lebih tinggi serta dapat mengakibatkan kelainan pada sistem imun (Nazimul islam et al. 2021). Kedua, siklus produktif yang panjang pada sapi perah. Ketiga, melalui kerumunan ternak yang terjadi serta teknik saat pemerahan susu berpotensi meningkatkan transmisi penyakit (Dias et al. 2016). Keempat, tingkat produksi pada pemeliharaan sapi perah yang cenderung lebih tinggi dibandingkan pemeliharaan sapi potong, berpotensi meningkatkan kejadian stress metabolik

yang dapat menyebabkan penurunan sistem kekebalan tubuh sehingga kerentanan sapi perah terhadap suatu penyakit meningkat. Ras ternak dapat menjadi salah satu faktor risiko kejadian tuberkulosis pada ternak, yang mana akan berdampak pula dalam peningkatan transmisi tuberkulosis dari ternak ke manusia.

Keempat, *Body Condition Score (BCS)*. Ternak kurus dengan kondisi BCS yang rendah, berisiko 1 kali lebih besar terhadap paparan penyakit dibandingkan dengan ternak yang gemuk dan normal (Dejene et al. 2016). Kondisi BCS ternak yang rendah dapat disebabkan oleh infeksi suatu penyakit, infestasi parasit pada gastrointestinal hingga kondisi lingkungan seperti perubahan iklim dan cuaca yang ekstrim, dapat meningkatkan kerentanan ternak terhadap paparan penyakit seperti Ztb (Moiane et al. 2014; Ghebremariam et al. 2018).

Kelima, status kebuntingan dan paritas ternak. Ternak yang sedang bunting berisiko 2 kali lebih tinggi untuk terpapar tuberkulosis. Hal tersebut dapat terjadi terkait dengan kondisi perubahan hormon pada sapi yang sedang melewati masa transisi (beberapa minggu terakhir kebuntingan hingga minggu pertama setelah melahirkan) yang dapat menyebabkan kondisi immunosupresi, sehingga kerentanan terhadap kejadian penyakit menjadi lebih tinggi (Shaheenur islam et al. 2020). Sedangkan ternak yang memiliki paritas atau jumlah persalinan yang lebih dari lima kali, berisiko 2,2 kali lebih tinggi untuk terpapar tuberkulosis. Disebutkan bahwa angka persalinan (paritas) berhubungan pula dengan usia ternak. Semakin tinggi paritas maka semakin tua pula usia ternak, semakin tua usia ternak akan semakin tinggi pula risiko terjadinya paparan tuberkulosis (Kassa et al. 2012).

Keenam, ukuran kawanan atau populasi ternak (*Herd size*). Penelitian Shaheenur Islam et al. 2020 di Bangladesh menyebutkan ukuran kawanan ternak diketahui berhubungan secara signifikan terhadap kejadian serta transmisi tuberkulosis dari ternak kepada manusia. Kawanan ternak yang terdiri dari 2-10 ekor, berisiko 1 kali lebih tinggi untuk terpapar penyakit (tuberkulosis). Kawanan ternak lebih dari 11-20 ekor berisiko 2,6 kali lebih tinggi untuk terpapar penyakit (tuberkulosis). Kawanan ternak 21-50 ekor berisiko 22,3 kali lebih tinggi untuk terpapar penyakit (tuberkulosis). Kawanan yang terdiri dari lebih dari 50 ekor memiliki risiko 43,7 kali lebih tinggi untuk terpapar penyakit (tuberkulosis). Ukuran kawanan yang besar dikaitkan juga dengan tingginya proses *restocking* atau pemasukan ternak baru kedalam kawanan, dimana hal tersebut memungkinkan terjadinya peningkatan introduksi dan persistensi dari infeksi penyakit (Dias et al. 2016), peningkatan transmisi penyakit baik antar ternak lama dengan yang baru, serta transmisi dari ternak ke manusia (Bahense et al. 2016). Kawanan yang memiliki ukuran atau jumlah

ternak yang besar, yang didukung dengan kondisi lain seperti kondisi ruang serta lantai kandang yang kurang memadai, ventilasi yang tidak baik serta sistem manajemen pemeliharaan yang buruk, berisiko meningkatkan kejadian serta transmisi tuberkulosis dari ternak ke manusia (Nazimul islam et al. 2021; Ullah et al. 2019).

Ketujuh, pergerakan ternak (*herd movement*). Pergerakan ternak berkaitan dengan proses pemindahan ternak, baik itu pembelian dan pemasukan ternak baru dari luar (Singhla et al. 2017), atau memindahkan ternak dari kawanan lama ke kawanan baru. Ternak yang dipindahkan berpotensi mentransmisikan penyakit dan terjadi sirkulasi infeksi tuberkulosis di kawanan yang baru (Guta et al. 2014). Ternak yang dibeli dari luar berisiko 2,6 kali lebih tinggi untuk terpapar tuberkulosis dibandingkan dengan ternak yang sudah dipelihara dan dibesarkan di peternakan sendiri (Ullah et al. 2019).

Kedelapan, keberadaan beberapa jenis ternak dalam satu kawanan (*Mixed farm*). Penelitian Tschoop et al. 2009 di Ethiopia, menyebutkan 70% responden memiliki peternakan dengan kondisi *mixed farm*. Ternak dengan kondisi tersebut berisiko 2 kali lebih tinggi untuk terpapar penyakit, seperti Ztb. Pemeliharaan ternak yang bercampur memungkinkan terjadinya kontak yang berpotensi menjadi rute transmisi yang dapat meningkatkan kejadian penyakit Ztb (Guta et al. 2014).

Kesembilan, kontak dengan alam dan hewan liar. Kondisi peternakan yang berdekatan dengan alam liar berpotensi terjadinya kontak antara ternak dengan hewan liar. Terjadinya kontak antara ternak dengan hewan liar, seperti babi hutan serta rusa yang merupakan *reservoir* dari tuberkulosis, berpotensi meningkatkan transmisi serta kejadian tuberkulosis pada ternak. Ternak yang mengalami kontak dengan hewan liar rusa (*Red deer*) memiliki risiko 1,6 kali terpapar tuberkulosis sapi (Guta et al. 2014). Hal tersebut juga berhubungan dengan besarnya ukuran kawanan serta lokasi penggembalaan (*pastura*) ternak yang berdekatan dengan alam liar seperti hutan, saat musim panas ternak berusaha mencari air serta merumput di area yang luas, hal tersebut berpotensi meningkatkan kejadian tuberkulosis serta transmisi dari ternak ke manusia (Dejene et al. 2016).

FAKTOR RISIKO LAIN YANG BERHUBUNGAN DENGAN MANAJEMEN PEMELIHARAAN, IKLIM DAN LINGKUNGAN

Pertama, jenis sistem pemeliharaan ternak. Pemeliharaan ternak dapat dilakukan secara ekstensif (digembalakan), intensif (dikandangan) atau semi-

intensif (gabungan dari keduanya). Ternak yang dipelihara dengan sistem intensif berisiko 7,9 kali lebih tinggi untuk terpapar tuberkulosis serta mentransmisikannya kepada sesama ternak dan kepada manusia (Shaheenur islam et al. 2020). Penelitian lain yang menyebutkan bahwa ternak yang dipelihara dengan sistem intensif (dikandangan) berisiko 3 kali lebih tinggi untuk terpapar tuberkulosis (Belchior et al. 2016). Sistem pemeliharaan intensif dengan pengandangan hewan dalam waktu lama, didukung dengan manajemen pemeliharaan yang buruk, menyebabkan hewan rentan stress serta berpotensi meningkatkan kejadian dan transmisi tuberkulosis baik antar ternak serta dari ternak kepada manusia (Dias et al. 2016; Ullah et al. 2019).

Kedua, penggunaan sumber mata air dan area merumput komunal (*communal grazing and watering*). Ternak yang dipelihara dengan kondisi *communal grazing and watering*, berisiko 5,5 kali lebih tinggi untuk terpapar tuberkulosis (Tembo et al. 2020). Ketiga, manajemen pemeliharaan yang buruk. Penelitian Nazimul islam et al. 2021 di Bangladesh menyebutkan 35% responden memelihara ternak didalam kandang, dengan 94% dari kandang tersebut memiliki kondisi ventilasi udara yang kurang baik. Manajemen pemeliharaan yang buruk, dapat dikaitkan dengan praktik sanitasi kandang yang buruk serta didukung dengan kondisi kandang *indoor* dengan ventilasi yang terbatas, hal tersebut berpotensi meningkatkan kejadian tuberkulosis dan transmisi penyakit baik antar hewan serta dari hewan ke manusia (Kemal et al. 2019). Manajemen pemeliharaan ternak yang buruk tentu dapat berdampak pada kondisi ternak yang meliputi rendahnya BCS, mempengaruhi kesehatan dan kekebalan tubuh hewan, sehingga hewan lebih rentan terhadap penyakit (Dias et al. 2016; Moiane et al. 2014).

Keempat, iklim lingkungan. Kondisi lingkungan di negara tertentu seperti di Eritrea yang memiliki suhu sedang disertai curah hujan yang tinggi, dapat menjadi sebuah kondisi lingkungan yang baik untuk agen patogen (*M. bovis*) untuk bertahan hidup (Ghebremariam et al. 2018). Kondisi lingkungan di negara Ethiopia yang memiliki suhu yang tinggi, berpotensi menyebabkan stress akibat suhu tinggi (*heat stress*) dalam lingkungan pemeliharaan, apabila dibiarkan terus-menerus dapat berdampak pula pada kesehatan ternak, sehingga dapat dikatakan bahwa iklim termasuk faktor risiko yang berhubungan dengan kejadian dan transmisi Ztb pada suatu negara (Kemal et al. 2019).

Tabel 1. Faktor risiko yang berpotensi meningkatkan kejadian serta transmisi penyakit zoonotik tuberkulosis dari ternak kepada manusia

Faktor risiko	Referensi
Faktor risiko yang berhubungan dengan aktivitas manusia	
Lama waktu telah bekerja dengan ternak	Agbalaya et al. 2020
Kurangnya pengawasan mengenai lesi penyakit pada saat pemotongan ternak	Agbalaya et al. 2020; Sichewo et al. 2019
Konsumsi susu segar yang tidak dipasteurisasi (<i>raw milk</i>)	Agbalaya et al. 2020; Boukary et al. 2012; Ghebremariam et al. 2018; Kemal et al. 2019; Sichewo et al. 2019; Vidal et al. 2018; Tembo et al. 2020; Belchior et al. 2016
Konsumsi daging yang tidak dimasak sempurna	Agbalaya et al. 2020; Belchior et al. 2016; Sichewo et al. 2019
Kurangnya pengetahuan masyarakat mengenai penyakit zoonotik tuberkulosis	Agbalaya et al. 2020; Ghebremariam et al. 2018; Kemal et al. 2019; Sichewo et al. 2019; Tembo et al. 2020; Belchior et al. 2016
Memelihara ternak dalam tempat tinggal	Ghebremariam et al. 2019; Kemal et al. 2019
Faktor risiko yang berhubungan dengan hewan	
Usia ternak	Shaheenur Islam et al. 2020; Nazimul islam et al. 2021; Dejene et al. 2016; Kemal et al. 2019 ; Kassa et al. 2012; Azami et al. 2018; Moiane et al. 2014; Bailey et al. 2013; Guta et al. 2014; Silva et al. 2016; Naima et al. 2011; Ullah et al. 2019
Jenis kelamin ternak	Shaheenur Islam et al. 2020; Ghebremariam et al. 2018; Moiane et al. 2014; Naima et al. 2011
Ras ternak	Yahyaoui-azami et al. 2018; Moiane et al. 2014; Nazimul islam et al. 2021; Bahiense et al. 2016 ; Dias et al. 2016; Veloso et al. 2016
<i>Body Condition Score</i> (BCS) dan kondisi kesehatan ternak	Dejene et al. 2016; Kemal et al. 2019; Moiane et al. 2014 Ghebremariam et al. 2018
Status kebuntingan dan paritas	Shaheenur Islam et al. 2020 Dejene et al. 2016; Kemal et al. 2019; Kassa et al. 2012
Pergerakan ternak (<i>herd movement</i>)	Dejene et al. 2016; Kemal et al. 2019; Singhla et al., 2017; Rodriguez et al. 2011; Guta et al. 2014; Nazimul islam et al. 2021; Ullah et al. 2019
Keberadaan beberapa jenis ternak dalam satu kawanan	Dias et al. 2016;Guta et al. 2014
Kontak dengan alam dan hewan liar	Dejene et al. 2016; Kemal et al. 2019; Marsot et al. 2016; Tembo et al. 2020
Faktor risiko lain (manajemen pemeliharaan, iklim dan lingkungan)	
Jenis sistem pemeliharaan (ekstensif / semi-intensif / intensif)	Shaheenur Islam et al. 2020; Nazimul islam et al. 2021; Mondal et al. 2014; Boukary et al. 2012; Ghebremariam et al. 2018; Kemal et al. 2019; Marsot et al. 2016; Belchior et al. 2016; Dias et al. 2016; Silva et al. 2016; Porphyre et al. 2008; Ullah et al. 2019
Penggunaan sumber air dan area merumput komunal	Ghebremariam et al. 2018; Marsot et al. 2016; Moiane et al. 2014; Nazimul islam et al. 2021; Tembo et al. 2020
Manajemen pemeliharaan yang buruk, kondisi perkandangan dengan minim ventilasi, sanitasi kandang yang buruk	Dejene et al. 2016; Kemal et al. 2019; Boukary et al. 2012; Moiane et al. 2014; Nazimul islam et al. 2021; Dias et al. 2016
Iklim lingkungan	Dejene et al. 2016; Kemal et al. 2019; Ghebremariam et al. 2018

PENCEGAHAN KEJADIAN DAN PENULARAN ZOONOTIK TUBERKULOSIS

Upaya yang dapat dilakukan dalam pencegahan, pengendalian kejadian serta penularan zoonotik tuberkulosis meliputi: meningkatkan manajemen pemeliharaan yang baik, pelaksanaan hygiene dan sanitasi pada situasi perkandangan atau peternakan (Kemal et al. 2019; Dias et al. 2016), pemeriksaan kondisi serta karantina terhadap setiap ternak yang akan dipindahkan kedalam kawanan baru (Moiane et al. 2014), meningkatkan *surveillance program* secara rutin pada peternakan ternak perah dan potong guna

mendeteksi penyakit sedini mungkin (Nazimul islam et al. 2021; Bahiense et al. 2016; Dias et al. 2016). Meningkatkan kegiatan *case-control studies* guna mengidentifikasi mekanisme penyebaran serta faktor risiko penyakit (Veloso et al. 2016). Meningkatkan kegiatan inspeksi dan pengawasan di tempat pemotongan hewan oleh dokter hewan, guna mendeteksi serta mengafkir organ dan karkas dari hewan yang terinfeksi tuberkulosis, meningkatkan edukasi guna meningkatkan pemahaman masyarakat terkait suatu penyakit khususnya tuberkulosis, baik itu mengenai ciri penyakit, agen penyebab hingga penularannya antar ternak dan pada manusia,

mengedukasi mengenai pentingnya konsumsi susu yang dipasteurisasi serta konsumsi daging yang dimasak matang sempurna (Sichewo et al. 2019) guna mencegah peningkatan kejadian serta transmisi tuberkulosis melalui rute oral. Meningkatkan cakupan vaksinasi, meminimalisir segala kemungkinan terjadinya kontak dengan alam dan hewan liar yang berpotensi meningkatkan penularan dan kejadian tuberkulosis (Tembo et al. 2020), menghindari pemeliharaan beberapa jenis ternak didalam satu kawanan (*mixed herds*) (Dias et al. 2016). Upaya pencegahan dapat dilakukan dengan memperhatikan serta menghindari segala kemungkinan terkait faktor risiko yang dapat meningkatkan kejadian serta penularan zoonotik tuberkulosis, baik antar ternak serta dari ternak kepada manusia.

KESIMPULAN

Zoonotik tuberkulosis (Ztb) disebabkan oleh anggota kelompok bakteri *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTBC) (*M. bovis*, *M. caprae* dan *M. orygis*). Kejadian Ztb paling banyak disebabkan oleh *M. Bovis*, yang dapat menyerang ternak sapi, domba, kambing hingga babi. Ztb dapat ditularkan antar ternak serta dari ternak ke manusia melalui rute inhalasi dan oral. Terdapat 19 variabel faktor risiko yang berpotensi dalam meningkatkan kejadian dan penularan Ztb dari ternak ke manusia, faktor risiko yang paling umum meliputi: pemeliharaan ternak, usia ternak, ukuran kawanan atau populasi ternak (*size herds*). Upaya pencegahan kejadian dan penularan Ztb dari ternak kepada manusia meliputi: meningkatkan manajemen pemeliharaan yang baik, pelaksanaan *surveillance program* secara rutin, meningkatkan cakupan vaksinasi serta upaya lainnya dengan memperhatikan segala faktor risiko yang dapat meningkatkan kejadian dan transmisi Ztb.

DAFTAR PUSTAKA

- Adesokan HK, Akinseye VO, Sulaimon MA. 2018. Knowledge and practices about zoonotic tuberculosis prevention and associated determinants amongst livestock workers in Nigeria. PLoS ONE 13: 1-12.
- Agbalaya MA, Ishola OO, Adesokan HK, Fawole OI. 2020. Prevalence of bovine tuberculosis in slaughtered cattle and factors associated with risk of disease transmission among cattle handlers at Oko-Oba Abattoir, Lagos, Nigeria. Vet World. 13:1725-1731.
- Bailey SS, Crawshaw TR, Smith NH, Palgrave CJ. 2013. *Mycobacterium bovis* infection in domestic pigs in Great Britain. Vet J. 198:391-397.
- Bahiense L, de Ávila LN, Bavia ME, Amaku M, Dias RA, Grisi-Filho JHH, Neto JSF. 2016. Prevalence and risk factors for bovine tuberculosis in the State of Bahia, Brazil. Semina: Ciências Agrárias. 37:3549-3559.
- Bapat PR, Renuka SD, Seema DS, Aliabbas AH, Amit RN, Anuja PK, Hatim FD, Lokendra KS, Rajpal SK. 2017. Prevalence of zoonotic tuberculosis and associated risk factors in Central Indian populations, J Epidem Glob Health 7:277-283.
- Belchior APC, Lopes LB, Picao Goncalves VS, Leite RC. 2016. Prevalence and risk factors for bovine tuberculosis in Minas Gerais State, Brazil. Trop Anim Health Prod. 48:373-378.
- Biru A, Ameni G, Sori T, Desissa F, Teklu A, Tafess K. 2014. Epidemiology and public health significance of bovine tuberculosis in and around Sululta District, Central Ethiopia. African J Microbiol Res. 8:2352-2358.
- Boukary AR, Thys E, Rigouts L, Matthys F, Berkvens D, Mahamadou I, Yenikoye A, Saegerman C. 2012. Risk factors associated with bovine tuberculosis and molecular characterization of mycobacterium bovis strains in urban setting in Niger. Transbound Emerg Dis. 59:490-502.
- Daulay MU. 2015. Kajian prevalensi dan faktor risiko penyakit tuberkulosis pada sapi perah di wilayah bogor serta pengembangan media kultur *Mycobacterium bovis* [Disertasi]. [Bogor (Indonesia)]: Institut Pertanian Bogor.
- Dejene SW, Heitkonig IMA, Prins HHT, Lemma FA, Mekonnen DA, Alemu ZE, Keikay TZ, de Boer WF. 2016. Risk Factors for Bovine Tuberculosis (bTB) in Cattle in Ethiopia. PLoS ONE. 11:1-16.
- Dias RA, Ulloa-Stanojlovic FM, Belchior APC, Ferreira R, Goncalves RC, Barai de Aguiar RSC, Sousa P, Santos AMA, Amaku M, Ferreira F, Telles EO, Grisi-Filho JHH, Goncalves JSV, Heinemann MB, Neto JSF. 2016. Prevalence and risk factors for bovine tuberculosis in the state of Sao Paulo, Brazil. Semina: Ciências Agrárias. 37:3673-3684.
- Erekat S, Nasereddin A, Levine H, Azmi K, Al-Jawabreh A. 2013. First-time detection of *Mycobacterium bovis* in livestock tissues and milk in the West Bank, Palestinian territories. PLoS Negl Trop Dis. 7:e2417.
- Escárcega DAV, Razo CAP, Ruiz SG, Gallegos SLS, Suazo FM, Alarcón GJC. 2020. Analysis of bovine tuberculosis transmission in Jalisco, Mexico through whole-genome sequencing. J Vet Res. 64:51-61.
- Fielding HR, McKinley TJ, Delahay RJ, Silk MJ, McDonald RA. 2020. Effects of trading networks on the risk of bovine tuberculosis incidents on cattle farms in Great Britain. R Soc Open Sci. 7:1-11.
- Ghebremariam MK, Michel AL, Vernooij JCM, Nielen M, Rutten VPMG. 2018. Prevalence of bovine tuberculosis in cattle, goats, and camels of traditional livestock raising communities in Eritrea. BMC Vet Res. 14:1-13.

- Guta S, Casal J, Garcia-Saenz A, Saez JL, Pacios A, Garcia P, Napp S, Allepuz A. 2014. Risk factors for bovine tuberculosis persistence in beef herds of Southern and Central Spain. *Prev Vet Med*. 115:173–180.
- Habitu T, Areda D, Muwonge A, Tessema GT, Skjerve E, Gebrehiwot T. 2019. Prevalence and risk factors analysis of bovine tuberculosis in cattle raised in mixed crop-livestock farming system in Tigray region, Ethiopia. *Transbound Emerg Dis*. 66:488-496.
- Higino SSS, Pinheiro SR, Oliveira de Souza G, Dib CC, do Rosário TR, Melville PA, Alves CJ, de Azevedo SS. 2011. *Mycobacterium bovis* infection in goats from the northeast region of Brazil. *Braz J Microbiol*. 42:1437-1439.
- Infantes-Lorenzo JA, Moreno I, Roy A, Rialde MA, Balseiro A, de Juan L, Romero B, Bezos J, Puentes E, Åkerstedt J, Tessema GT, Gortázar C, Domínguez L, Domínguez M. 2019. Specificity of serological test for detection of tuberculosis in cattle, goats, sheep and pigs under different epidemiological situations. *BMC Vet Res*. 15:1-8.
- Kaneene JB, Miller RA, Kaplan B, Steele JH, Thoen CO. 2014. Preventing and controlling zoonotic tuberculosis: a one health approach. *Veterinaria Italiana*. 50:7-22.
- Kassa A, Enquselassi F, Aseffa A, Beyen D. 2015. Bovine tuberculosis (btb) as a risk factor for developing tuberculosis in humans in the rural community of Ethiopia: A- case control study. *Ethiop Med J*. 53:1-8.
- Kemal J, Sibhat B, Abraham A, Terefe Y, Tulu KT, Welay K, Getahun N. 2019. Bovine tuberculosis in eastern Ethiopia: prevalence, risk factors and its public health importance. *BMC Infect Dis*. 19:1-9.
- Kock, R, Michel AL, Yeboah-Manu D, Azhar EI, Torrelles JB, Cadmus SI, Zumla A. 2021. Zoonotic tuberculosis—the changing landscape. *Int J Infect Dis*. 113:S68-S72.
- Lipiec M, Radulski L, Szulowski K. 2019. A case of bovine tuberculosis in pigs in Poland—a country free from the disease. *Ann Agric Environ Med*. 26:29-32.
- Mahatmi H, Suratma NA, Besung NK, Budiasa K, Widiarsa GP. 2014. Seroprevalensi tuberkulosis pada sapi bali sebagai langkah awal monitoring pencegahan penyakit zoonosis (*new emerging disease*) di provinsi bali. *Prosiding Seminar Nasional Biosains I*. hlm. 101-106. ISBN: 978-602-294-065-4.
- Marsot M, Béal M, Scoizec A, Mathevon Y, Durand B, Courcoul A. 2016. Herd-level risk factors for bovine tuberculosis in French cattle herds. *Prev Vet Med*. 131:31-40.
- Moiane I, Machado A, Santos N, Nhambir A, Inlamea O, Hattendorf J, Ka'llenius G, Zinsstag J, Correia-Neves M. 2014. Prevalence of bovine tuberculosis and risk factor assessment in cattle in rural livestock areas of govuro district in the southeast of mozambique. *PLoS ONE*. 9:1-9.
- Mondal MAH, Parvin MS, Sarker SC, Rahman AKMA, Islam MT. 2014. Prevalence and risk factors of bovine tuberculosis in cattle in Mymensingh Sadar. *Bangl J Vet Med*. 12:179-183.
- Munoz-Mendoza M, Romero B, del Cerro A, Gortazar C, Garcia-Marin JF, Menendez S, Mourelo J, de Juan L, Saez JL, Delahay RJ, Balseiro A. 2015. Sheep as a potential source of bovine TB: epidemiology, pathology and evaluation of diagnostic techniques. *Transbound Emerg Dis*. 63:635-646.
- Naima S, Borna M, Bakir M, Djamel Y, Fadila B, Jakob Z, Djamel G. 2011. Tuberculosis in cattle and goats in the North of Algeria. *Vet Res*. 4:100-103.
- Narrod C, Zinsstag J, Tiongco M. 2012. A one health framework for estimating the economic costs of zoonotic diseases on society. *Ecohealth*. 9:150-162.
- Nazimul Islam M, Khan MK, Khan MFR, Kostoulas P, AnisurRahman AKM, Mahbub Alam M. 2021. Risk factors and true prevalence of bovine tuberculosis in Bangladesh. *PLoS ONE*. 16:1-15.
- Nugent G. 2011. Maintenance, spillover and spillback transmission of bovine tuberculosis in multi-host wildlife complexes: a New Zealand case study. *Vet Microbiol*. 151:34-42.
- Pendell DL, Lusk JL, Marsh TL, Coble KH, Szmania SC. 2016. Economic assessment of zoonotic diseases : An illustrative study of rift valley fever in the United States. *Transbound Emerg Dis*. 63:203-214.
- Rahman MM, Khan MFR, Nazmul Hussain Nazir KHM, Bahanur Rahman M. 2013. Prevalence of bovine and avian tuberculosis in sheep and goat population of Bangladesh. *Sci J Microbiol*. 2:1-8.
- Rahim Z, Thapa J, Fukushima Y, van der Zanden AGM, Gordon SV, Suzuki Y. 2017. Tuberculosis caused by *Mycobacterium orygis* in dairy cattle and captured monkeys in Bangladesh: a new scenario of tuberculosis in South Asia. *Transbound Emerg Dis*. 64:1965–1969.
- Rodríguez S, Bezos J, Romero B, de Juan L, Álvarez J, Castellanos E, Moya N, Lozano F, Javed MT, Sáez-Llorente JL, Liébana E, Mateos A, Domínguez L, Aranaz A, and The Spanish Network on Surveillance and Monitoring of Animal Tuberculosis. 2011. *Mycobacterium caprae* infection in livestock and wildlife, Spain. *Emerg Infect Dis*. 17:532-535.
- Shaheenur Islam SK, Rumi TB, Lutful Kabir SM, van der Zanden AGM, Kapur V, Anisur Rahman AKM, Ward MP, Bakker D, Ross AG, Rahim Z. 2020. Bovine tuberculosis prevalence and risk factors in selected districts of Bangladesh. *PLoS ONE*. 15:1-18.
- Sichewo PR, Michel AL, Musoke J, Etter EMC. 2019. Risk factors for zoonotic tuberculosis at the wildlife–livestock–human interface in South Africa. *Pathogens*. 8:2-14.
- Silva MCP, Gonçalves VSP, Mota ALAA, Koloda M, Neto JSF, Grisi-Filho JHH, Dias RA, Amaku M, Telles

- EO, Ferreira F, Heinemann MB, Alfieri AA, Muller EE. 2016. Prevalence and herd-level risk factors for bovine tuberculosis in the State of Paraná, Brazil. *Semina: Ciências Agrárias Londrina*. 37:3611-3624.
- Singhla T, Boonyayatra S, Punyapornwithaya V, VanderWaal KL, Alvarez J, Sreevatsan S, Phornwisetsirikun S, Sankwan J, Srijun M, Wells SJ. 2017. Factors affecting herd status for bovine tuberculosis in dairy cattle in Northern Thailand. *Hindawi Vet Med Intern*. 2017:2964389.
- Tembo NFP, Muma JB, Hang'ombe B, Munyeme M. 2020. Clustering and spatial heterogeneity of bovine tuberculosis at the livestock/wildlife interface areas in Namwala District of Zambia. *Vet World*. 478-488.
- Teppawar RN, Chaudhari SP, Moon SL, Shinde S, Khan WA, Patil AR. 2018. Zoonotic tuberculosis: A concern and strategies to combat. In: Enany S, editor. *Basic biology and applications of actinobacteria* [Internet]. London (UK): IntechOpen.
- Thoen CO, James HS, Kaneene JB. 2014. Zoonotic tuberculosis: *Mycobacterium bovis* and other pathogenic Mycobacteria. 3rd ed. New York (USA): John Wiley & Sons, Inc. p. 51-62.
- Thoen CO, Kaplan B, Thoen TC, Gilsdorf MJ, Shere JA. 2016. Zoonotic tuberculosis. A comprehensive one health approach. *Medicina*. 76:159-165.
- Tschopp R, Bobosha K, Aseffa A, Schelling E, Habtamu M, Iwentu R, Hailu E, Firdessa R, Hussein J, Young D, Zinsstag J. 2011. Bovine tuberculosis at a cattle-small ruminant-human interface in Meskan, Gurage region, Central Ethiopia. *BMC Infect Dis*. 11:1-10.
- Ullah A, Khattak US, Ayaz S, Qureshi MS, Khan I, Jan IU, Khattak I, Taj R, Nigar S, Khan NU, Khan MA, Sohail ML. 2019. Bovine tuberculosis (bTB): prevalence and associated risk factors in large ruminants in the central zone of Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *Pak J Zool*. 51:127-133.
- Veloso FP, Baumgarten KD, Mota ALAA, Ferreira F, Neto JSF, Grisi-Filho JHH, Dias RA, Amaku M, Telles EO, Gonçalves VSP. 2016. Prevalence and herd-level risk factors of bovine tuberculosis in the State of Santa Catarina. *Semina: Ciências Agrárias*. 37:3659-3672.
- Vidal E, Grasa M, Perálvarez T, Martín M, Mercader I, Pérez de Val B. 2018. Transmission of tuberculosis caused by *Mycobacterium caprae* between dairy sheep and goats. *Small Rumin Res*. 158:22-25.
- [WHO] World Health Organization. 2017. Zoonotic tuberculosis. Geneva (Swiss): World Health Organization.
- [WHO] World Health Organization. 2020. Zoonosis. Geneva (Swiss): World Health Organization.
- [OIE, WHO, FAO] World Organization for Animal Health, World Health Organization, Food and Agricultural Organization of the United Nations. 2017. Roadmap for zoonotic tuberculosis. Geneva (Swiss): WHO Press.
- Yahyaoui-Azami H, Aboukhassib H, Bouslikhane M, Berrada J, Rami S, Reinhard M, Gagneux S, Feldmann J, Borrell S, Zinsstag J. 2017. Molecular characterization of bovine tuberculosis strains in two slaughterhouses in Morocco. *BMC Vet Res*. 13:1-7.
- Yahyaoui-Azami H, Ducrotoy MJ, Bouslikhane M, Hattendorf J, Thrusfield M, Conde-Alvarez R, Moriyon I, Zuniga-Ripa A, Munoz Alvaro PM, Mick V, Bryssinckx W, Welburn SC, Zinsstag J. 2018. The prevalence of brucellosis and bovine tuberculosis in ruminants in Sidi Kacem Province, Morocco. *PLoS ONE*. 13:1-17.

Pengendalian Toksoplasmosis pada Kucing di Indonesia (Cats Toxoplasmosis Control in Indonesia)

Ageng Ilham Ramadhani¹, R Yesica² dan IBGR Wisesa²

¹Pendidikan Profesi Dokter Hewan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia

²Laboratorium Parasitologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia
Kontributor utama: agengilham@gmail.com

(Diterima 23 Februari 2022 – Direvisi 18 Mei 2022 – Disetujui 3 Juni 2022)

ABSTRACT

Toxoplasmosis is one of the parasitic diseases caused by *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*). *Toxoplasma gondii* is usually found in cats' faeces, raw vegetables, meats, grasses, and soil. The transmission of *T. gondii* happens vertically or horizontally. The standard diagnostic techniques of *T. gondii* detection are microscopic examination of cats faeces, PCR, and antibody detection. The drug of choice in cats toxoplasmosis is clindamycin antibiotic (doses: 10-12/kgBW), another treatment is the combination of sulfadiazine 120 mg/kgBW dan pirimetamin 1 mg/kgBW also can be given to reduce the oocyst shed. The prevention of *T. gondii* infection in cats is not giving raw meats and keeping the environment disinfected. The prevalence of cats toxoplasmosis in cats in Indonesia is influenced by multiple diagnostic techniques, sample total, geographical condition, and climate. The risk factor of toxoplasmosis infection in cats are stray cats, raw foods, and a hygienic environment. The purpose of this article is knowing the life cycle of *T. gondii*, clinical sign, pathogenesis, diagnostic method, risk factors, control, and the prevalence of cats toxoplasmosis in Indonesia in the last 50 years.

Key words: Cat, *Toxoplasma gondii*, Toxoplasmosis

ABSTRAK

Toksoplasmosis merupakan salah satu penyakit yang disebabkan oleh parasit protozoa *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*). *Toxoplasma gondii* biasanya dapat ditemukan pada feses kucing, sayuran mentah, daging mentah, rumput-rumputan, dan tanah. Penularan *T. gondii* dapat secara vertikal maupun horizontal. Teknik diagnosis yang sering digunakan untuk mendeteksi keberadaan protozoa *T. gondii* yaitu pemeriksaan mikroskopis pada feses, pemeriksaan PCR, dan deteksi antibodi. Pengobatan toksoplasmosis pada kucing dapat diberikan klindamisin dengan dosis 10-12 mg/kgBB per oral maupun kombinasi sulfadiazine 120 mg/kgBB dan pirimetamin 1 mg/kgBB. Pencegahan penularan *T. gondii* dapat dilakukan dengan cara kucing tidak diberi pakan mentah dan lingkungan sekitar rutin dilakukan desinfeksi. Kejadian toksoplasmosis yang menyerang kucing di Indonesia memiliki prevalensi yang beragam tergantung pada metode diagnosis yang digunakan, jumlah sampel, kondisi geografis, dan iklim. Faktor risiko penularan toksoplasmosis pada kucing terjadi akibat kucing yang dibiarkan, diberi pakan mentah, dan pengaruh kebersihan lingkungan. Tujuan dari tulisan ini yaitu untuk mengetahui siklus hidup *T. gondii*, gejala klinis, patogenesis, diagnosis, faktor risiko, pengendalian, situasi toksoplasmosis pada kucing dalam kurun waktu 50 tahun terakhir.

Kata kunci: Kucing, *Toxoplasma gondii*, Toksoplasmosis

PENDAHULUAN

Toksoplasmosis merupakan salah satu penyakit yang disebabkan oleh parasit protozoa *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*). Kucing merupakan inang definitif dari protozoa *T. gondii* dan dapat menularkan toksoplasmosis ke manusia, sehingga toksoplasmosis termasuk dalam penyakit zoonosis. Kejadian toksoplasmosis pada manusia dianggap berbahaya (khususnya pada ibu hamil), karena seringkali tidak menunjukkan gejala klinis (asimtomatis) dengan prevalensi mencapai 70% (Rusjdi 2020).

Namun penderita yang asimtomatis masih dapat menularkan toksoplasmosis secara kongenital pada

janin dan menimbulkan gejala kecacatan pada bayi yang baru lahir, hidrocefalus, korioretinitis, pengapuran pada otak, bahkan keguguran. Sedangkan penderita toksoplasmosis yang menunjukkan gejala klinis berat dapat menunjukkan gejala gangguan imunitas, seperti pada pasien AIDS, sindrom IgM berlebih, dan pasien yang mengalami kondisi immunosupresan (Rusjdi 2020).

Febianingsih et al. (2017) melaporkan bahwa seroprevalensi toksoplasmosis pada manusia di Gianyar, Bali mencapai 56,7% dengan salah satu faktor risiko berupa keberadaan hewan kucing di lingkungan sekitar. Sedangkan prevalensi toksoplasmosis pada kucing di Amerika Serikat menunjukkan nilai 34% dan prevalensi toksoplasmosis di Thailand menunjukkan

nilai yang relatif rendah (4,8%) (Jittapalapong et al. 2010). Dubey (2020) juga menyebutkan bahwa prevalensi toksoplasmosis di negara Thailand relatif rendah antara 7-11%. Hal tersebut dapat dipengaruhi oleh gaya hidup masyarakat Thailand yang vegetarian dan melarang keberadaan kucing di lingkungan sekitar tempat tinggal maupun tempat ibadah masyarakat (Jittapalapong et al. 2010).

Toksoplasmosis menjadi salah satu Penyakit Hewan Menular Strategis (PHMS) yang diatur dalam Keputusan Menteri Pertanian nomor 4026/Kpts/OT.140/4/2013 tentang Penetapan Jenis Penyakit Hewan Menular Strategis di Indonesia. Penetapan toksoplasmosis dalam PHMS berdasarkan atas status dan situasi kasus pada tahun 2011-2014 di beberapa provinsi di Indonesia yang dipublikasikan oleh Direktorat Jenderal Pertanian dan Kesehatan Hewan, Kementerian Pertanian (Suharto & Akbar 2018).

Berdasarkan permasalahan tersebut, pada tulisan kali ini akan membahas toksoplasmosis pada kucing di Indonesia, yang meliputi siklus hidup *T. gondii*, gejala klinis, patogenesis, diagnosis, faktor risiko, pengendalian, situasi toksoplasmosis pada kucing dalam kurun waktu 50 tahun terakhir dengan pencarian literatur dari referensi nasional yang dilakukan dengan menggunakan *online database* melalui *Google scholar*, *PubMed*, dan *Science Direct*.

TOXOPLASMA GONDII

Taksonomi

Toksoplasmosis merupakan salah satu penyakit yang disebabkan oleh parasit protozoa *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*). Berikut ini merupakan klasifikasi protozoa *T. gondii*, yaitu kingdom: protista, subkingdom: protozoa, filum: apicomplexa, kelas: sporozoasida, ordo: euccidiorida, famili: sarcolytidae, genus: *Toxoplasma*, spesies: *Toxoplasma gondii* (Dubey 2020).

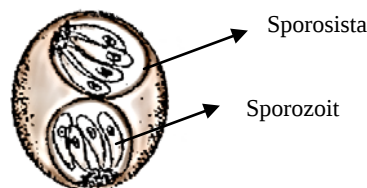
Rute penularan

Toxoplasma gondii biasanya dapat ditemukan pada feses kucing, sayuran mentah, daging mentah, rumput-rumputan, dan tanah. Kucing dapat terinfeksi *T. gondii* ketika memakan sesuatu yang terkontaminasi oosista *T. gondii*. Selain itu, kucing juga dapat terinfeksi *T. gondii* ketika memakan inang perantara (seperti rodensia) atau jaringan (seperti daging) yang mengandung sista *T. gondii* (Dubey 2020).

Siklus hidup

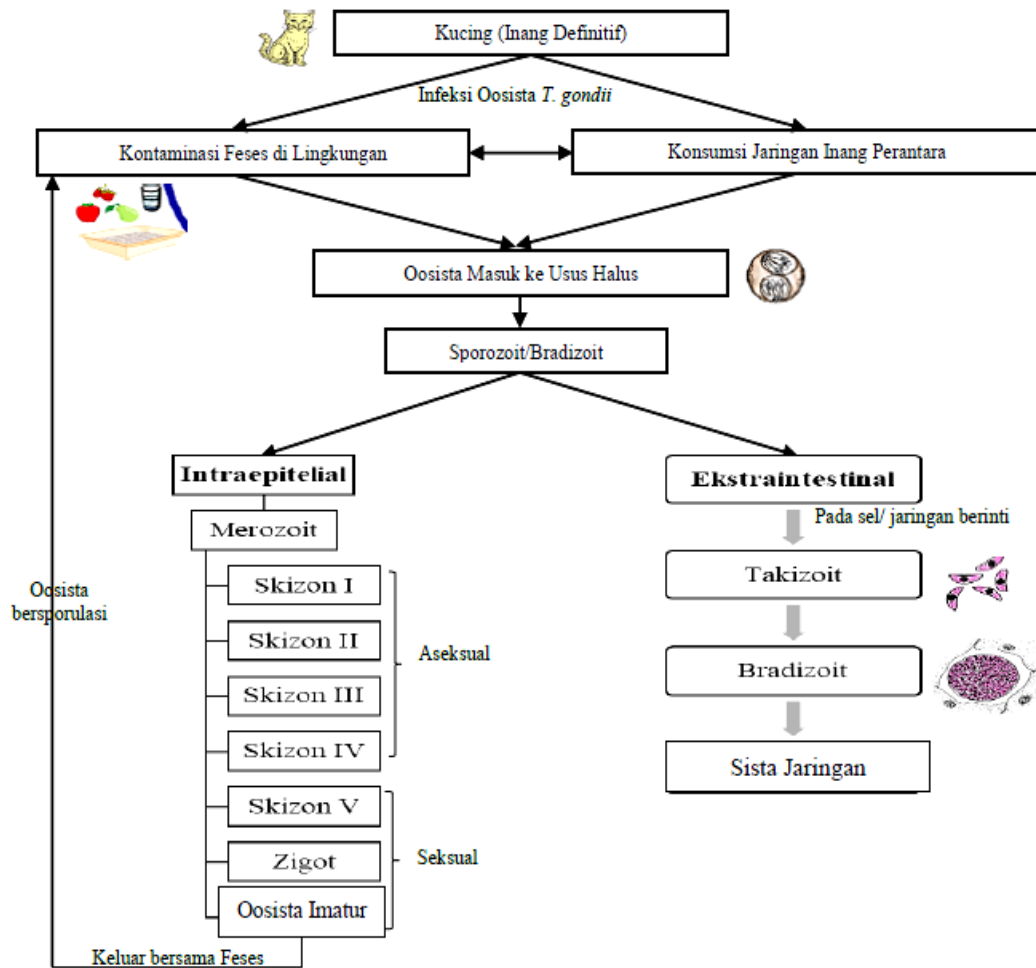
Secara umum, siklus hidup *T. gondii* terjadi secara seksual (melalui proses fertilisasi) dan aseksual (melalui pembelahan vegetatif). Pada kucing, siklus hidup *T. gondii* terjadi secara seksual (gametogoni) dan aseksual (skizogononi) di intraepitelial (di dalam sel epitel usus) maupun ekstraintestinal (di luar usus). Sedangkan siklus hidup *T. gondii* pada inang perantara (seperti rodensia, unggas, ternak, serangga, dan sebagainya) hanya terjadi secara aseksual intraepitelial maupun ekstraintestinal (Subekti & Arrasyid 2006).

Di dalam sel epitel usus (intraepitelial), *T. gondii* mengalami reproduksi secara aseksual dan seksual. Pada tahapan reproduksi aseksual, diawali dengan sporozoit atau bradizoit yang membentuk skizon I dalam kurun waktu 12 jam setelah infeksi dan berkembang menghasilkan 2-3 merozoit (Eamsobhana 2004). Selanjutnya merozoit akan keluar dari sel epitel usus lama dan menginfeksi sel epitel yang baru, serta membentuk skizon II yang terdapat 2-30 merozoit dalam kurun waktu 24-54 jam setelah infeksi. Merozoit akan terus berkembang sampai membentuk skizon III-V (Subekti & Arrasyid 2006). Kemudian skizon IV dan V memulai tahapan reproduksi secara seksual, merozoit membentuk mikrogamet dan makrogamet. Mikrogamet bergerak menggunakan flagelanya menuju makrogamet dan melakukan fertilisasi membentuk zigot yang selanjutnya akan membentuk oosista tidak infeksius ketika dikeluarkan melalui feses kucing (Hartmann et al. 2013; Subekti & Arrasyid 2006).

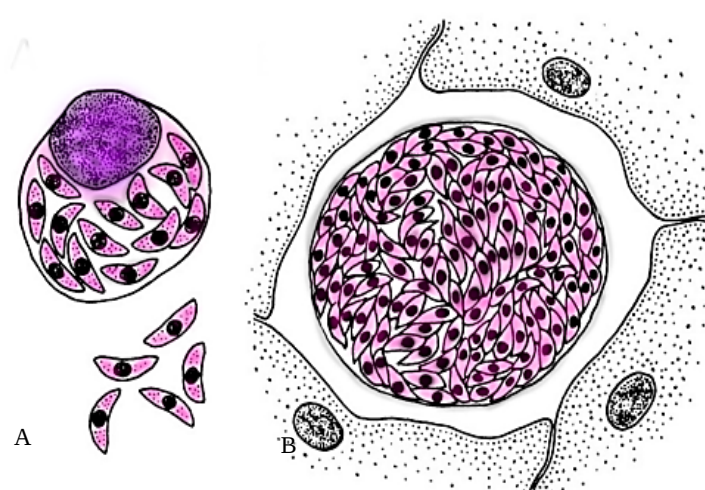


Gambar 1. Bentuk oosista yang bersporulasi (berisi 2 sporosista yang di dalamnya mengandung 4 sporozoit) (dimodifikasi dari Eamsobhana 2004).

Setelah berada di lingkungan selama 1-5 hari, oosista akan bersporulasi dan mengandung 2 sporosista yang di dalamnya masing-masing terdapat 4 sporozoit (Gambar 1) (Eamsobhana 2004; Hartmann et al. 2013). Seekor kucing yang terinfeksi *T. gondii* dapat mengeluarkan oosista sebanyak 10 juta dalam sehari selama 2 pekan. Seekor kucing juga dapat mengeluarkan 360 juta oosista dalam 1 hari. Periode masuknya oosista menuju ke dalam tubuh kucing sampai terbentuk oosista kembali yaitu sekitar 20-40 hari (Nurcahyo & Priowidodo 2019).



Gambar 2. Siklus hidup *T. gondii* (dimodifikasi dari Nurcahyo & Priyowidodo 2019).



(A): Takizoit pada sel yang berinti; (B): Bradizoit

Gambar 3. Sista jaringan *T. gondii* (dimodifikasi dari Nurcahyo & Priyowidodo 2019).

Oosista dapat bertahan hidup di lingkungan dalam waktu lebih dari setahun pada kondisi yang lembab. Menurut Nurcahyo & Priyowidodo (2019), oosista dapat bersporulasi di lingkungan pada suhu 24°C selama 2-3 hari dan dapat bertahan pada suhu 37°C selama 306 hari. Sedangkan oosista yang belum bersporulasi dapat bertahan pada suhu 37-50°C selama 24 jam. Selain itu, oosista *T. gondii* dapat bertahan selama 14-18 hari pada tingkat kelembaban sebesar 44-80% dan bersporulasi selama 28 hari pada suhu -4°C (Dubey 2020).

Siklus hidup *T. gondii* pada ekstraintestinal (di luar usus) terjadi ketika sporozoit atau bradizoit yang masuk ke dalam usus halus dan menuju ke pembuluh darah atau limfe menuju ke jaringan yang berinti (Subekti & Arrasyid 2006) seperti paru-paru, hati, otot, dan sebagainya. Selanjutnya sporozoit akan berkembang menjadi takizoit dalam kurun waktu 24 jam setelah infeksi. Periode prepaten pada kucing yang menelan takizoit pada tubuh inang perantara yaitu 13 hari atau lebih (Subekti & Arrasyid 2006). Takizoit akan membelah diri secara endodiogoni dan menghancurkan sel yang ditempati dan menginfeksi jaringan di sekitarnya (Gambar 3). Lalu takizoit akan berkembang menjadi bradizoit dalam kondisi laten dan membentuk sista jaringan. Pada kucing maupun inang perantara, sista jaringan mulai terbentuk setelah 10 hari infeksi (Hartmann et al. 2013; Subekti & Arrasyid 2006).

Patogenesis

Infeksi toksoplasmosis pada jaringan disebabkan oleh bentuk takizoit yang berada di dalam jaringan berinti, seperti paru-paru, hati, otot, dan ginjal (Subekti & Arrasyid 2006). Proses penetrasi takizoit menuju sel target pada jaringan terdapat 3 tahapan, yaitu perlekatan (*attachment*), penetrasi aktif, dan pembentukan vakuola. Perlekatan takizoit dengan sel target jaringan melibatkan ikatan antara antigen permukaan takizoit (*surface antigen/SAG*) dengan ligan permukaan pada sel target. Antigen permukaan berperan sebagai protein yang terdapat pada permukaan takizoit dan berfungsi untuk memberikan sinyal pada ligan permukaan sel yang terinfeksi (Black & Boothroyd 2000).

Tahap selanjutnya yaitu penetrasi takizoit ke dalam sel yang dilakukan dengan cara *gliding*. Gerakan *gliding* disebabkan oleh struktur takizoit yang memiliki sitoskeleton dan terdiri atas mikrotubulus, subpelikuler, dan filamen aktin-miosin (Black & Boothroyd 2000). Sehingga adanya gerakan *gliding* tersebut menyebabkan takizoit masuk ke dalam sel lebih cepat daripada proses fagositosis. Tahap terakhir yaitu pembentukan

vakuola parasitoforus yang berfungsi untuk melindungi takizoit selama di dalam sel, sehingga takizoit tidak mudah rusak dan memungkinkan untuk terus penetrasi, serta mengambil nutrisi dari sitoplasma sel inang. Selain itu, vakuola ini juga dapat berfungsi sebagai tempat perkembangan takizoit maupun bradizoit secara intraseluler (Black & Boothroyd 2000; Subekti & Arrasyid 2006).

Gejala klinis

Menurut Hartmann et al. (2013), kucing yang terinfeksi *T. gondii* tidak menunjukkan gejala klinis spesifik, seperti adanya kondisi diare jika saluran digesti kucing mengandung banyak oosista *T. gondii* pada intraepitelial usus. Selain itu, jika infeksi toksoplasmosis terjadi pada ekstraintestinal (di luar saluran usus) akan menyebabkan gangguan atau kerusakan pada jaringan. Gejala klinis toksoplasmosis pada kucing yaitu demam, ikterus, anoreksia, penurunan berat badan, gangguan neurologis (kejang dan ataksia), gangguan respirasi seperti dispnea dan pnemonia, dan gangguan okular berupa uveitis (Dubey 2020).

DIAGNOSIS

Teknik diagnosis yang sering digunakan untuk mendeteksi keberadaan protozoa *T. gondii* diantaranya:

Pemeriksaan mikroskopis

Pemeriksaan secara mikroskopis dapat dilakukan pada sampel feses yang langsung diamati di bawah mikroskop. Hartmann et al. (2013) menyebutkan bahwa sampel feses yang digunakan pada pemeriksaan mikroskopis dapat dilakukan proses sentrifugasi dahulu menggunakan larutan sakarosa, kemudian endapannya diamati di bawah mikroskop. Rata-rata diameter oosista yang nampak pada mikroskop tersebut sekitar 9,37 µm × 11,25 µm (Hanafiah et al. 2018). Namun metode ini memiliki spesifisitas yang rendah, karena oosista *T. gondii* yang keluar bersama feses biasanya dalam jumlah yang sedikit. Selain itu oosista dalam feses hanya nampak ketika *T. gondii* sudah mengeluarkan oosista dalam siklus hidupnya. Oosista dapat keluar bersama feses kucing terjadi pada hari ke-6 sampai dengan 11 setelah terinfeksi *T. gondii* dengan jumlah 200-4.350 oosista/gram jumlah feses. Morfologi oosista *T. gondii* juga mirip dengan endoparasit lain, sehingga sulit untuk membedakan morfologinya dan menimbulkan negatif palsu (Nurcahyo & Prastowo 2014).

Salah satu cara untuk memastikan endoparasit yang ditemukan merupakan jenis protozoa *T. gondii* yaitu dengan melakukan sporulasi secara manual (Nurchahyo & Prastowo 2014). Sampel feses dapat dikoleksi dan ditambahkan dengan reagen kalium bikromat 2,5% untuk menginisiasi proses sporulasi. Selanjutnya campuran sampel feses dan reagen didiamkan dalam suhu ruang serta diamati dalam kurun waktu 24-48 jam sampai oosista nampak bersporulasi. Pemberian reagen kalium bikromat berfungsi sebagai media sporulasi dan nutrisi pada oosista, serta sebagai pengawet (Tresnani et al. 2012).

Pemeriksaan serologis

Pemeriksaan lain untuk konfirmasi keberadaan *T. gondii* yaitu uji serologis menggunakan sampel serum yang mengandung antibodi untuk mendeteksi keberadaan IgG dan IgM (Liyanage et al. 2021). Keberadaan kadar IgG terhadap *T. gondii* yang tinggi pada kucing sehat dapat mengindikasikan bahwa kucing pernah terinfeksi toksoplasmosis dalam kurun waktu relatif lama. Sedangkan keberadaan kadar IgM yang tinggi dapat mengindikasikan bahwa kucing dalam masa infeksi aktif dan akut. Apabila tidak ditemukan keberadaan antibodi terhadap *T. gondii* dapat mengindikasikan kucing rentan terhadap toksoplasmosis (Nurchahyo & Priyowidodo 2019).

Berikut ini, beberapa pemeriksaan serologis yang dapat dilakukan untuk mendeteksi keberadaan antibodi *T. gondii*, seperti uji *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), *latex agglutination test* (LAT), *indirect hemagglutination* (IHA), *indirect immunofluorescent antibody test* (IFAT), dan uji warna *Sabin-Feldman* yang memiliki sensitivitas dan spesifisitas tinggi (Liyanage et al. 2021). Namun beberapa uji serologis tersebut memiliki beberapa kelemahan, seperti pada uji *Sabin-Feldman* hanya menunjukkan hasil positif jika sampel yang diuji mengandung parasit hidup yang virulen (Udonsom et al. 2010). Pada uji LAT sering menunjukkan hasil positif palsu karena hanya dapat mendeteksi total antibodi dan tidak mampu membedakan jenis IgG atau IgM. Uji ELISA juga memiliki beberapa keunggulan, seperti sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi, jumlah antigen yang digunakan sedikit dengan jumlah sampel banyak, namun kelemahannya yaitu membutuhkan keterampilan yang memadai, waktu yang dibutuhkan lama, proses uji yang panjang (Subekti & Kusumaningtyas 2011).

Pemeriksaan virologis dengan teknik molekuler

Pemeriksaan *T. gondii* secara molekuler dapat dilakukan dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) *Nested* maupun *Real Time* (RT). Target gen pada PCR *Nested* berada pada ribosom DNA 18S, meliputi primer B1, SAG 1, dan SAG 2 pada target 529 *base pair* (bp). Pemeriksaan PCR-RT menggunakan primer Tox-B5 dan B6 pada ribosom DNA 18S memiliki target pada 529 bp. Sensitivitas PCR untuk deteksi gen B1 sebesar 83,3% dan spesifisitas sebesar 95,7% (Alfonso et al. 2009). Keberhasilan pemeriksaan PCR untuk mendeteksi keberadaan *T. gondii* dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya keberhasilan metode ekstraksi DNA dan jumlah oosista yang terdapat pada sampel feses (Hanafiah et al. 2018).

FAKTOR RISIKO TOKSOPLASMOSIS PADA KUCING

Dubey (2020) menyatakan bahwa kucing yang diliaran dan beraktivitas di luar rumah lebih berisiko terhadap terjadinya penularan toksoplasmosis dengan prevalensi lebih besar 68% dibandingkan kucing yang dipelihara di dalam rumah. Kucing yang diliaran di luar rumah dapat terinfeksi toksoplasmosis ketika memakan sesuatu yang terkontaminasi oosista *T. gondii* di lingkungan. Kucing liar juga dapat terinfeksi toksoplasmosis jika berburu atau memakan rodensia yang mengandung oosista *T. gondii*.

Jittapalapong et al. (2010) juga menyebutkan bahwa kucing yang diliaran di luar rumah memiliki prevalensi lebih rendah (11%) dibandingkan kucing yang dipelihara di dalam rumah (23,1%). Hasil berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Hanafiah et al. (2015) menyatakan bahwa kucing yang dipelihara di dalam rumah justru memiliki risiko penularan toksoplasmosis 5 kali lebih besar dibandingkan dengan kucing yang diliaran.

Jokelainen et al. (2012) menyatakan bahwa faktor risiko penularan toksoplasmosis pada kucing yang lain yaitu pemberian pakan yang masih mentah. Kucing yang sering diberi pakan mentah (seperti daging) memiliki risiko penularan toksoplasmosis lebih besar dibandingkan kucing yang diberi pakan matang atau pakan komersial. Pakan daging mentah berpotensi untuk terinfeksi oosista *T. gondii*, karena oosista *T. gondii* dapat bersporulasi di dalam otot atau daging hewan (khususnya inang perantara) membentuk sista jaringan. Sista jaringan *T. gondii* dapat mati pada suhu 66°C, sehingga diperlukan pemasakan yang sempurna supaya oosista *T. gondii* mati dan pakan dapat dikonsumsi dengan aman (Sonar & Brahmabhatt 2010).

PENGENDALIAN TOKSOPLASMOSIS

Pengobatan

Pengobatan yang dapat diberikan pada kasus toksoplasmosis untuk kucing yaitu dengan pemberian antibiotik klindamisin dengan dosis 10-12 mg/kgBB secara per oral 2 kali sehari selama 4 minggu (Güven & Ceylan 2020). Knold et al. (2019) menyebutkan bahwa pemberian klindamisin dapat bekerja efektif dalam menghambat pelepasan oosista *T. gondii* pada dosis 11 mg/kgBB secara per oral sekali sehari atau 12,5 mg/kgBB secara per oral 2 hari sekali. Nurcahyo & Priowidodo (2019) menyebutkan bahwa pemberian kombinasi sulfadiazine 120 mg/kgBB dan pirimetamin 1 mg/kgBB dapat menurunkan produksi oosista pada kucing. Kombinasi kedua obat dianjurkan sebagai salah satu terapi toksoplasmosis pada kucing karena efektif untuk mematikan pseudosista *T. gondii* dan stadium proliferasi.

Pencegahan

Pencegahan yang dapat dilakukan pada kucing yang terinfeksi toksoplasmosis yaitu dengan mengurangi kejadian infeksi dan penyebaran oosista *T. gondii* di lingkungan. Kucing harus diberikan pakan yang matang sempurna (minimal dimasak pada suhu 65°C) karena oosista *T. gondii* dapat mati pada suhu 66°C dalam 15 menit (Nurcahyo & Priowidodo 2019). Selain itu, kucing sebaiknya tidak dibiarkan di luar rumah, karena berpotensi terkontaminasi pakan yang mengandung oosista *T. gondii* yang ada di lingkungan atau dapat memakan inang perantara yang mengandung sista jaringan *T. gondii*, salah satunya pada tikus (Dubey 2020).

Tikus sebagai inang perantara dapat terinfeksi *T. gondii* ketika mengonsumsi makanan yang terkontaminasi oosista *T. gondii*, lalu parasit ini akan menetap di otak tikus. Ketika tikus yang terinfeksi *T. gondii* termakan oleh kucing, maka *T. gondii* akan bersiklus kembali di dalam tubuh kucing. Secara alamiah tikus takut terhadap kucing, namun ketika tikus terinfeksi *T. gondii* pada otak, maka tikus akan mengalami perubahan perilaku menjadi lebih berani pada kucing dan fenomena tersebut dikenal sebagai *zombie/monster rat*. Keberadaan *T. gondii* pada otak tikus dapat merusak komunikasi antar sel dan membentuk *amygdala*, yaitu bentukan sel menyerupai kacang almond yang terdapat pada *medial lobe temporal* pada otak. Bagian otak tersebut berperan dalam memproses memori dan respon emosional (seperti rasa takut, kecemasan, dan agresifitas). Sehingga kucing disarankan untuk tidak

diliarkan untuk meminimalisasi kontak dengan tikus dan tidak terinfeksi *T. gondii* kembali (Mendonça-Natividade & Ricci-Azevedo 2020).

Selain itu lingkungan sekitar harus dipastikan bersih, rutin dilakukan desinfeksi, serta mencegah masuknya inang perantara, seperti tikus, maupun serangga (Hartmann et al. 2013). Nurcahyo & Priowidodo (2019) menyebutkan bahwa infeksi *T. gondii* dapat disebarkan melalui gigitan serangga dan menelan cacing yang membawa oosista *T. gondii*. Lalat dan moluska juga diduga dapat berperan sebagai vektor oosista *T. gondii* yang berasal dari feses kucing. Oosista *T. gondii* resisten terhadap beberapa desinfektan, namun oosista tersebut dapat inaktif jika diberikan iodine 1%, formalin 0,3%, dan ammonia 1% (Dubey 2020). Sedangkan takizoit dan sista peka terhadap beberapa desinfektan, seperti sodium hipoklorit 1% dan ethanol 70% (Balcha et al. 2020). Takizoit juga dapat inaktif pada pH <4 dan suhu -15°C selama lebih dari 3 hari atau suhu -20°C selama 2 hari (Sonar & Brahmabhatt 2010).

PENULARAN PADA MANUSIA

Manusia dapat terinfeksi toksoplasmosis ketika memakan sesuatu yang terkontaminasi oosista atau sista jaringan *T. gondii*. Infeksi toksoplasmosis di dalam tubuh manusia berlangsung di ekstraintestinal secara aseksual (Subekti & Arrasyid 2006). Di dalam saluran cerna, oosista atau sista jaringan *T. gondii* akan pecah dan mengeluarkan sporozoit. Sporozoit akan masuk dan berproliferasi di dalam enterosit (sel usus) (Cesbron-Delauw et al. 2008). Selanjutnya sporozoit akan berkembang menjadi takizoit yang memiliki kemampuan replikasi dengan cepat. Jika takizoit sudah berada di dalam enterosit dalam jumlah banyak, membran sel usus akan pecah dan menyebabkan takizoit keluar serta menginfeksi jaringan berinti lainnya. Lalu takizoit akan menyebar ke seluruh jaringan berinti di dalam tubuh, khususnya pada jaringan otak dan otot (Pittman & Knoll 2015).

KEJADIAN TOKSOPLASMOSIS PADA KUCING DI INDONESIA

Prevalensi toksoplasmosis pada kucing di Indonesia bergantung pada kondisi geografis, iklim, dan tingkat penularan antar kucing. Pada Tabel 1 merupakan beberapa laporan kasus toksoplasmosis pada kucing di Indonesia pada tahun 1970-2020 dengan menggunakan metode pemeriksaan mikroskopis feses yang mengandung oosista *T. gondii*.

Berdasarkan data pada Tabel 1, kejadian toksoplasmosis pada kucing di beberapa daerah di Indonesia pada tahun 1970-2020 dengan pemeriksaan mikroskopis pada feses memiliki prevalensi yang bervariasi yaitu sebesar 1-30%. Adanya variasi pada prevalensi dapat dipengaruhi oleh tingkat pengeluaran oosista yang berbeda pada masing-masing laporan kasus. Selain itu, morfologi oosista *T. gondii* yang mirip dengan endoparasit lain seringkali sulit untuk dibedakan dan menimbulkan negatif palsu. Sehingga sensitivitas deteksi dari metode yang digunakan pada beberapa data tersebut juga berbeda, khususnya pada mikroskop yang digunakan (Nurcahyo & Prastowo 2014).

Pada Tabel 2 merupakan data laporan kasus toksoplasmosis pada kucing dengan pemeriksaan lain, meliputi pemeriksaan PCR dan uji serologis berupa uji IHA, CATT, *rapid test*, dan FELISA. Uji PCR yang dilakukan oleh Subrata et al. (2015), Hanafiah et al. (2018) dan Prayekti (2020) pada Tabel 2 menunjukkan prevalensi sebesar 4-50%. Sedangkan uji IHA yang dilakukan oleh Durfee & Cross (1976) sebesar 40%, uji CATT yang dilakukan oleh Hanafiah et al. (2010) dan (Nurcahyo & Prastowo 2014) sebesar 6,8-16%, serta *rapid test* Mudji & Marek (2017) dan Mursalim et al. (2018) sebesar 5-16%. Variasi nilai prevalensi ini dapat disebabkan oleh tingkat sensitivitas dan spesifisitas masing-masing uji.

Tabel 1. Laporan kasus toksoplasmosis pada kucing di Indonesia berdasarkan pemeriksaan mikroskopis feses tahun 1970-2020

Penulis	Tahun	Lokasi	Jumlah sampel	Prevalensi
Dianny	1998	Kotamadya Padang	48	8,3%
Iskandar	1998	Bogor	30	3,33%
Iskandar & Husein	2001	Bogor	138	1%
Renggadita	2009	Pasar tradisional kota Surabaya	30	3,33%
Nurcahyo & Prastowo	2014	Yogyakarta	116	9,4%
Simamora et al.	2015	Denpasar Selatan	35	2,85%
Subrata et al.	2015	Denpasar	80	17,5%
Tahlilli	2017	Kota Mataram, Nusa Tenggara Barat.	60	25%
Prayekti	2020	Surabaya	50	14%
Zakaria & Ardiansyah	2020	Pasar tradisional Sidoarjo	24	29,2%

Tabel 2. Laporan kasus toksoplasmosis pada kucing di Indonesia dengan beberapa metode pemeriksaan lain tahun 1970-2020

Penulis	Tahun	Lokasi	Jumlah sampel	Metode uji	Prevalensi
Durfee & Cross	1976	Kalimantan Selatan	69	<i>Indirect Hemagglutination Antibodies (IHA) T. gondii</i>	40%
Hanafiah et al.	2010	Provinsi Aceh	50	Uji serologis <i>Card Agglutination Test (CATT)</i>	16%
Nurcahyo & Prastowo	2014	Yogyakarta	132	Uji <i>Card Agglutination Test (CATT)</i>	6,8%
Wijayanti & Marbawati	2014	Banjarnegara	22	<i>Field ELISA (FELISA)</i>	40,9%
Subrata et al.	2015	Denpasar	8	<i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	50%
Mudji & Marek	2017	Pasar Keputran Surabaya	30	<i>Rapid Diagnostic Test</i>	20%
Hanafiah et al.	2018	Yogyakarta	9	<i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	33,3%
Mursalim et al.	2018	Kecamatan Tamalanrea Makassar	20	<i>Rapid Diagnostic Test</i>	5%
Prayekti	2020	Surabaya	7	<i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	4%

Data prevalensi pada Tabel 1 dan 2 dapat digunakan untuk mengetahui faktor yang mempengaruhi persebaran penyakit, seperti pengetahuan mengenai faktor risiko penularan, kondisi lingkungan, maupun pemilihan metode untuk diagnosis yang akurat, serta dapat digunakan sebagai salah satu upaya dalam pengendalian toksoplasmosis (Liyanage et al. 2021). Program pengendalian penyakit seperti rencana pemberian terapi perlu segera dilakukan untuk memastikan dana yang digunakan dan mencegah penyakit tidak menular secara luas (Fihiruddin et al. 2020).

KESIMPULAN

Toksoplasmosis merupakan salah satu penyakit yang disebabkan oleh parasit protozoa *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*). Penyakit ini dapat menular ke manusia, sehingga bersifat zoonosis. Kejadian toksoplasmosis yang menyerang kucing di Indonesia memiliki prevalensi yang beragam dan dapat disebabkan oleh pengaruh metode diagnosis yang digunakan, jumlah sampel, pengaruh kondisi geografis, dan iklim. Upaya pengendalian toksoplasmosis pada kucing dapat dilakukan dengan pemberian pengobatan dan pencegahan guna mengurangi kejadian toksoplasmosis. Faktor risiko penularan toksoplasmosis pada kucing diantaranya kucing yang diliarkan, diberi pakan mentah, dan pengaruh kebersihan lingkungan.

DAFTAR PUSTAKA

- Alfonso Y, Fraga J, Fonseca C, Jiménez N, Pinillos T, Dorta-Contreras AJ, Cox R, Capó V, Pomier O, Bandera F. 2009. Molecular diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in cerebrospinal fluid from AIDS patients. *Cerebrospinal Fluid Res.* 6:1–6.
- Balcha, Tessema M, Aga BI, Disasa DD, Berhanu G. 2020. Public health and economic significance of toxoplasmosis. *Am-Euras J Sci Res.* 15:112–121.
- Black MW, Boothroyd JC. 2000. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64:607–623.
- Cesbron-Delauw, Marie-France, Gendrin C, Travier L, Ruffiot P, Mercier C. 2008. Apicomplexa in mammalian cells: Trafficking to the parasitophorous vacuole. *Traffic.* 9:657–664.
- Dianny D. 1998. *Toxoplasma gondii* pada kucing di empat kecamatan Kotamadya Padang [Skripsi]. [Padang (Indonesia)]: Universitas Andalas.
- Dubey JP, Cerqueira-Cézar CK, Murata FHA, Kwok OCH, Yang YR, Su C. 2020. All about toxoplasmosis in cats: the last decade. *Vet Parasitol.* 283:109145.
- Dubey JP. 2020. The history and life cycle of *Toxoplasma gondii*. Dalam: *Toxoplasma gondii*. 3rd ed. Amsterdam (Belanda): Elsevier.
- Dubey JP. 2016. *Toxoplasmosis of animals and humans*. Boca Raton (USA): CRC Press.
- Durfee PT, Cross JH. 1976. Toxoplasmosis in man and animals in South Kalimantan (Borneo), Indonesia. *Am J Trop Med Hyg.* 25:42–47.
- Eamsobhana P. 2004. Aquatic stages of parasitic protozoa. *Freshwater Invertebrates of the Malaysian Region*.
- Febianingsih, Eka NP, Indriani C, Artama WT. 2017. Seroprevalensi toksoplasmosis di Kabupaten Gianyar, Bali. *BKM.* 33:61–66.
- Fihiruddin, Artama WT, Widartono BS. 2020. Spatial analysis of toxoplasmosis through EcoHealth approaches using GRA-1 recombinant: Case in Sleman, Yogyakarta. *Indones J Biotechnol.* 25:109–119.
- Güven M, Ceylan E. 2020. Clinical toxoplasmosis in two cats and its treatment with Clindamycin. *Turk J Vet Res.* 4:95–98.
- Hanafiah M, Kamaruddin M, Nurcahyo W, Winaruddin. 2010. Study of toxoplasmosis infection in human and related to animal in Banda Aceh. *Indones J Vet Sci.* 4:87–92.
- Hanafiah M, Nurcahyo W, Prastowo J, Hartati S. 2015. Faktor risiko infeksi *Toxoplasma gondii* pada kucing domestik yang dipelihara di Yogyakarta. *Indones J Vet Sci.* 9:55–58.
- Hanafiah M, Prastowo J, Hartati S, Aliza D, Nurcahyo RW. 2018. Detection of *Toxoplasma gondii* copro-prevalence by polymerase chain reaction using repetitive 529 bp gene in feces of pet cats (*Felis catus*) in Yogyakarta, Indonesia. *Vet World.* 11:1338.
- Hartmann K, Addie D, Belák S, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T, Gruffydd-Jones T, Hosie MJ, Lloret A, Lutz H. 2013. *Toxoplasma gondii* infection in cats: ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg.* 15:631–637.
- Iskandar T. 1998. Pengisolasian *Toxoplasma gondii* dari otot diafragma seekor domba yang mengandung titer antibodi tinggi dan tanah tinja dari seekor kucing. *Iimu Ternak Vet.* 3:111–116.
- Iskandar T, Husein A. 2001. Isolasi penyebab *Toxoplasma gondii* dan parasit lain dari feses kucing. Dalam: Haryanto B, Setiadi B, Sinurat AP, Mathius IW, Situmorang P, Nurhayati, Ashan, Abubakar, Murdiati TB, Hastiono S, Hardjoutomo S, Adjid

- RMA, Priadi A. (penyunting). Teknologi Peternakan dan Veteriner Dalam Pengembangan Sistem Agribisnis Peternakan yang Berdaya Saing. Pros Sem Nas Teknol Vet. Bogor, 17-18 September 2001. Bogor (Indonesia): Puslitbangnak. hlm. 767-772.
- Jittapalapong S, Inpankaew T, Pinyopanuwat N, Chimnoi W, Kengradomkij C, Wongnarkpet S, Maruyama S, Lekkla A, Sukthana Y. 2010. Epidemiology of *Toxoplasma gondii* infection of stray cats in Bangkok, Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 41:13-18.
- Jokelainen P, Simola O, Rantanen E, Näreaho A, Lohi H, Sukura A. 2012. Feline toxoplasmosis in Finland: Cross-sectional epidemiological study and case series study. *J Vet Diagn Investig*. 24:1115-1124.
- Knold M, Faisst DN, Johansen MV. 2019. Assessment of efficacy and safety of treatment of cats with toxoplasmosis. *DVT*. 102:32-36.
- Liyanage KLDTD, Wiethoelter A, Hufschmid J, Jabbar A. 2021. Descriptive comparison of ELISAs for the detection of *Toxoplasma gondii* antibodies in animals: A systematic review. *Pathogens*. 10:605.
- Mendonça-Natividade, Costa F, Ricci-Azevedo R. 2020. *Toxoplasma gondii*: A microbe that turns mice into zombies. *Frontiers for Young Minds*. 08:36.
- Mudji EH, Marek YK. 2017. Diagnosis toxoplasmosis pada kucing liar (*Felis silvestris* catus) menggunakan antigen rapid test kit di Pasar Keputran Surabaya. *Agroveteriner*. 5:138-142.
- Mursalim MF, Abwah RN, Ris A. 2018. Deteksi *Toxoplasma gondii* pada kucing domestik (*Felis domestica*) dengan metode *Rapid Diagnostic Test* dan metode Apung. *Jl Agrisistem*. 14:18-26.
- Nurcahyo W, Prastowo J. 2014. Identifikasi toxoplasmosis pada feses kucing secara mikroskopis dan serologis. *Indones J Vet Sci*. 8:147-150.
- Nurcahyo W, Priyowidodo D. 2019. Toxoplasmosis pada hewan. Vol VIII. Yogyakarta (Indonesia): Samudra Biru.
- Pittman KJ, Knoll LJ. 2015. Long-term relationships: the complicated interplay between the host and the developmental stages of *Toxoplasma gondii* during acute and chronic infections. *Microbiol Mol Biol Rev*. 79:387-401.
- Prayekti KI. 2020. Deteksi infeksi *Toxoplasma gondii* pada kucing diare di rumah sakit hewan dan beberapa klinik hewan di Surabaya dengan metode mikroskopik dan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) [Skripsi]. [Surabaya (Indonesia)]: Universitas Airlangga.
- Renggadita A. 2009. Prevalensi *Toxoplasma gondii* pada sampel tanah dan tinja kucing di Pasar Tradisional Kota Surabaya [Skripsi]. [Surabaya (Indonesia)]: Universitas Airlangga.
- Rusjdi, Selfi Renita. 2020. Respon imun terhadap infeksi *Toxoplasma gondii*. *J Kesehatan Andalas* 9:100-107.
- Simamora ATAJ, Suratma NA, Apsari IAP. 2015. Isolasi dan identifikasi oosista *Toxoplasma gondii* pada feses kucing dengan metode pengapungan gula sheater. *Indones Medic Vet*. 4:88-96.
- Sonar SS, Brahmbhatt MN. 2010. Toxoplasmosis: An important protozoan zoonosis. *Vet World*. 3:436.
- Subekti DT, Arrasyid NK. 2006. Immunopathogenicity of different types of *Toxoplasma gondii*. *Indones Bul Anim Vet Sci*. 16:128-145.
- Subekti DT, Kusumaningtyas E. 2011. Perbandingan uji serologi toksoplasmosis dengan uji cepat imunostik, ELISA dan Aglutinasi Lateks. *JITV*. 16:163-241.
- Subrata IM, Suryadhi NT, Mantik-Astawa N, Damriyasa IM. 2015. Epidemiological and molecular analysis of *Toxoplasma gondii* in faecal samples of cats obtained from house of maternal in Bali. *Bali Medic J*. 4:68-75.
- Suharto RH, Akbar IMW. 2018. The study of the determination of toxoplasmosis as one of quarantine pests and diseases for animals (HPHK). Dalam: Indrawati A, Priosoeryanto BP, Murtini S, Tiuria R, Idris S, Sailasuta A (penyunting). To Serve Mankind Through Animal Kingdom. Proceeding The 20th Federation of Asian Veterinary Associations (FAVA) Congress and The 15th National Veterinary Scientific Conference of Indonesian Veterinary Medical Association (KIVNAS PDHI). Bali, 1-3 November 2018. Jakarta (Indonesia); Indonesian Veterinary Medical Association.
- Tahlilli S. 2017. Prevalensi *Toxoplasma gondii* pada inang definitif kucing (*Felis domestica*) di Kota Mataram Nusa Tenggara Barat. *J Sangkareang Mataram*. 3:52-55.
- Tresnani G, Prastowo J, Nurcahyo W, Daryono BS. 2012. Profil protein stadium sporozoit *Eimeria tenella* isolat Yogyakarta melalui analisis protein SDS-PAGE. *JVeteriner*. 13:163-166.
- Udonsom R, Buddhirongawatr R, Sukthana Y. 2010. Is Sabin-Feldman Dye test using *T. gondii* tachyzoites from animal inoculation still the best method for detecting *Toxoplasma gondii* antibodies?. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 41:1059.

- Wijayanti T, Marbawati D. 2014. Seropositif toksoplasmosis kucing liar pada tempat-tempat umum di Kabupaten Banjarnegara. *Balaba*. 10:59–64.
- Zakaria R, Ardiansyah S. 2020. Potential analysis of toxoplasmosis distribution in wild cats (*Felis silvestris*) in some markets of Sidoarjo District through microscopic identification of *Toxoplasma gondii*. *Medicra J Medic Lab Sci/Technol*. 3:59–64.

Upaya yang Penuh Tantangan Menuju Penemuan Vaksin *African Swine Fever*

(Challenging Efforts Towards the Discovery of the African Swine Fever Vaccine)

Simson Tarigan

Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl. RE. Martadinata 30, Bogor, Indonesia
Kontributor utama: sitariganta@gmail.com

(Diterima 30 Desember 2021 – Direvisi 1 April 2022 – Disetujui 16 Mei 2022)

ABSTRACT

African swine fever (ASF) has been endemic in Indonesia and neighbouring countries. So far, the only reliable measure to eradicate the disease has been the application of strict biosecurity and culling of all infected pigs. This method is not feasible in Indonesia because most pig farms are small with a deficient level of biosecurity. Vaccination would be the most practical control measure, but no vaccine has been available for ASF. The difficulties encountered in developing the ASF vaccine lie in the fact that the ASF virus is very complex, with a sophisticated ability to paralyze the host immune system. ASF virus infects monocytes and macrophages, causing the cells to lose their functions to mount immune responses, further complicating vaccine development. Killed vaccines, even those containing complete structural and non-structural proteins of the virus and fortified with potent adjuvants for both humoral and cellular immune responses, were practically incapable of inducing protective immunity. Subunit vaccines containing recombinant viral proteins have also been developed, but none have provided satisfactory protection even though the vaccine indicates neutralizing antibodies. Live vaccines prepared from naturally low virulent viral strains or by repeated attenuation in cell cultures provided more satisfactory protective immunities than the inactive or subunit vaccines. However, their use in the field had caused severe side effects because the mutant still had residual virulence. Live vaccines prepared by deleting genes that play a role in virulence have been the most promising approach. Several mutants that were no longer virulent but capable of inducing protective immunity have been identified; however, lengthy safety testing is still needed before this vaccine is commercially available.

Key words: Killed vaccine, subunit vaccine, live vaccine, gene deletion, immune evasion, African swine fever

ABSTRAK

Penyakit *African swine fever* (ASF) telah mewabah di Indonesia dan negara tetangga. Sampai saat ini cara penanggulangan yang dikenal efektif adalah penerapan biosekuriti ketat dan pemusnahan semua babi yang terinfeksi. Akan tetapi, cara ini tidak fisibel diterapkan di Indonesia karena sebagian besar peternakan babi merupakan peternakan kecil dengan tingkat biosekuriti yang sangat rendah. Oleh karena itu, vaksinasi merupakan cara penanggulangan yang paling praktis. Sayangnya, sampai saat ini vaksin untuk ASF belum tersedia, sekalipun usaha pengembangannya telah dimulai sejak penyakit ditemukan. Kesulitan pembuatan vaksin disebabkan karena virus ASF sangat kompleks dengan kemampuan melumpuhkan sistem imun babi yang sangat canggih. Virus ASF menginfeksi sel monosit dan makrofag, menyebabkan sel tersebut kehilangan fungsinya dalam pembentukan respons imun, dan hal ini menambah kesulitan dalam pengembangan vaksin. Vaksin in-aktif sekalipun mengandung protein virus yang utuh baik struktural maupun non-struktural, dilengkapi dengan adjuvan yang kuat tidak mampu menginduksi kekebalan yang protektif. Vaksin rekombinan sekalipun mampu menginduksi *neutralizing antibodies* yang kuat, hanya mampu mengurangi keparahan penyakit ketika babi yang telah divaksin ditantang dengan virus ASF. Vaksin aktif yang dipreparasi dari *strain virus low virulent* secara alami atau atenuasi berulang pada kultur sel memberikan kekebalan protektif yang lebih utuh, namun penggunaannya di lapangan menimbulkan efek samping yang serius karena virus mutan masih memiliki sisa virulensi. Vaksin aktif yang dipreparasi dengan mendelesi gen yang berperan dalam virulensi adalah cara yang paling besar memberikan harapan. Beberapa mutan yang stabil tidak lagi virulen tetapi mampu menginduksi kekebalan protektif telah ditemukan; namun pengujian keamanan yang panjang masih diperlukan sebelum vaksin ini dapat digunakan secara komersial.

Kata kunci: Vaksin inaktif, vaksin subunit, vaksin hidup, delesi gen, *immune evasion*, *African swine fever*

PENDAHULUAN

Wabah penyakit menular pada babi dengan morbiditas dan mortalitas yang sangat tinggi terjadi di provinsi Sumatra utara sejak bulan September 2019.

Penyakit tersebut terkonfirmasi sebagai *African swine fever* (ASF) pada 27 November 2019 dan dilaporkan ke OIE pada tanggal 17 Desember 2019 (FAO 2020). Sampai awal bulan Februari 2020 penyakit telah menyebar di seluruh provinsi Sumatera Utara dengan

kematian yang tercatat sebanyak 46.600 ekor (Okenews 11 Feb 2020). Selain di Sumatera Utara, penyakit juga dengan cepat mewabah di Kabupaten Pasaman dan Mentawai, Provinsi Sumatera Barat (Covesia News Rabu, 11 Mar 2020, Kominfo Mentawai 17 Mar 2020), Provinsi Sumatera Selatan (Jawa Pos 12 Juli 2020), Provinsi Bali (CNN Indonesia 5 Feb 2020), Provinsi Nusa Tenggara Timur (Antara 3 Juli 2020) dan Provinsi Jawa Barat (Dharmayanti et al. 2021). Kematian babi di Provinsi Nusa Tenggara Timur dalam beberapa bulan saja mencapai sekitar 22000 ekor (Antara 3 Juli 2020). Hasil analisis sekuens gene protein p72, p54 dan CD2v diketahui bahwa virus ASF yang mewabah di Sumatera Utara dan Jawa Barat termasuk genotipe II serogrup 8, satu klaster dengan virus ASF genotipe II penyebab wabah di Eropa dan Asia (Dharmayanti et al. 2021).

Penyakit ASF sudah menjadi masalah besar bagi Indonesia, terutama di daerah yang memiliki populasi babi yang tinggi. Mengingat sampai saat ini vaksin ASF belum ada, serta virus ASF sangat resisten dan dapat bertahan tahunan pada caplak babi maka penanggulangan penyakit tersebut akan sangat sulit atau bahkan tidak tertanggulangi. Walaupun penanggulangan ASF sulit, beberapa negara dapat menanggulanginya bahkan berhasil memberantasnya dengan penerapan *stamping-out policy*, yakni mengeliminasi semua ternak terjangkit atau sumber penularan penyakit. Kondisi peternakan babi di Indonesia yang sebagian besar ekstensif dengan kebiasaan memberi makan babi dengan sisa dapur rumah tangga dan restoran tidak memungkinkan menerapkan kebijakan biosekuriti ketat dan *stamping out* seperti yang pernah diterapkan di Eropa dan Amerika Selatan. Oleh karena itu, vaksinasi menjadi salah satu cara yang paling dapat diandalkan.

Usaha pengembangan vaksin telah dimulai sejak tahun 1920an sejak ASF pertama kali ditemukan, namun terlepas dari besarnya usaha yang dilakukan sampai saat ini vaksin tersebut belum juga terwujud. Tulisan ini mengulas tentang kesulitan-kesulitan yang dihadapi dan tahapan yang dicapai saat ini dalam usaha pengembangan vaksin tersebut. Tulisan ini melengkapi tulisan sebelumnya tentang penyakit *African Swine fever* yang telah diterbitkan di jurnal ini (Sendow et al. 2020).

INDIKASI ASF DAPAT DIKENDALIKAN DENGAN VAKSINASI

Penelitian awal ASF mengungkapkan bahwa babi yang sembuh dari ASF memiliki kekebalan terhadap reinfeksi. Akan tetapi, ketika serum dari babi yang sembuh ditransfer kepada babi sehat tidak memberikan perlindungan yang lengkap ketika ditantang dengan

virus ASF; penyakit masih tetap terjadi sekalipun masa inkubasinya pada sebagian babi lebih panjang menjadi 11-18 hari (de Kock et al. 1940). Transfer pasif spesifik antibodi memperlihatkan bahwa antibodi tidak mampu memberikan proteksi yang utuh tetapi dapat memperlambat timbulnya dan menurunkan keparahan gejala klinis, mengurangi level viremia dan menurunkan mortalitas (Schlafer et al. 1984). Peran antibodi harus dilengkapi oleh *cell mediated immunity* untuk membentuk kekebalan yang utuh. Salah satu sel yang jelas berperan adalah *natural killer (NK) cells*. Sel NK yang berasal dari babi yang diimunisasi dengan virus ASF tidak virulen memproduksi interferon- γ (IFN γ) dan IFN α , ketika babi tersebut terpapar dengan virus ASF *interferon* mampu menghambat replikasi virus dalam makrofag (Martins & Leita 1994). Fakta diatas menunjukkan bahwa vaksin yang dapat menginduksi antibodi dan *cell mediated immunity* yang tepat dapat memberikan kekebalan protektif terhadap infeksi ASF. Berbagai usaha telah dilakukan untuk menemukan vaksin yang dapat menginduksi respons imun yang protektif tersebut.

VAKSIN IN-AKTIF

Vaksin in-aktif adalah salah satu bentuk vaksin yang sederhana dalam pembuatannya namun sangat efektif untuk banyak penyakit viral. Hal yang sama tidak terjadi pada ASF karena babi yang diimunisasi dengan virus yang diinaktivasi tidak dapat bertahan dari kematian ketika ditantang dengan virus ASF (Stone & Hess 1967). Vaksin in-aktif yang dibuat dari sel alveolar makrofag diambil dari babi yang terinfeksi dengan virus ASF lalu diinaktivasi dengan glutaraldehid mampu menginduksi bukan saja respons humoral tetapi juga respons selular ketika diinokulasikan pada babi. Immunogen pada vaksin tersebut jauh lebih lengkap karena mengandung bukan saja struktur protein tetapi juga nonstruktur protein virus ASF. Akan tetapi, ketika babi yang telah divaksin ditantang dengan virus ASF virulen homolog, babi tidak dapat bertahan dari kematian sekalipun vaksin ini menginduksi respons selular dan antibodi yang lebih lengkap (Forman et al. 1982).

Vaksin inaktif yang menggunakan adjuvan kopolimer modern seperti PolygenTM (MVP Technologies, Omaha, USA) atau adjuvan modern emulsi minyak dalam air, Emulsigen® (MVP Technologies, Omaha, USA) yang dikombinasikan dengan *dimethyldioctadecyl ammonium bromide* (DDA) untuk menginduksi respons sel T juga telah dicoba namun tetap saja tidak memberikan perlindungan pada babi terhadap virus ASF (Blome et al. 2014).

WAKSIN SUBUNIT PROTEIN

Vaksin subunit berbasis protein adalah vaksin dengan rekombinan protein sebagai komponen utamanya. Protein p30, p54, p72, pp62, dan CD2v yang masing-masing disandi oleh gen CP204L, E183L, B646L, CP530R, and EP402R merupakan protein virus ASF yang paling banyak mendapat perhatian (Gaudreault & Richt 2019; Monteagudo et al. 2017). Protein capsid p72 adalah protein yang paling dominan, sebanyak 31-33% dari protein virus ASF merupakan protein p72, dan bersifat imunogenik (Liu et al. 2019). Antibodi terhadap p72 diyakini memainkan peran penting dalam imun proteksi, karena monoklonal antibodi yang diproduksi terhadap p72 dapat menetralkan infeksi virus ASF. Akan tetapi, kemampuan netralisasi tersebut tidak stabil karena hilang pada isolat virus yang sama setelah dipasase berulang pada kultur sel (Zsak et al. 1993). Tidak diketahui mekanisme netralisasi dan penyebab hilangnya kemampuan netralisasi. Pasase virus ASF pada sel kultur kemungkinan menyebabkan perubahan konformasi protein p72 sehingga tidak lagi mampu menetralkan infeksi virus ASF sekalipun antibodi monoklonal tersebut masih mampu berikatan dengan protein p72 (Borca et al. 1994).

Selain protein p72, protein p30 dan p54 merupakan protein struktural virus ASF yang sangat imunogenik dan antibodi yang diinduksinya juga memiliki aktivitas netralisasi. Protein p30 dan p54 yang diisolasi dari virion akan terikat pada permukaan alveolar makrofag ketika ditambahkan pada suspensi sel tersebut. Kemudian, kedua protein terlepas dari permukaan sel ketika serum konvalesens ditambahkan. Lebih lanjut, serum dari babi yang diimunisasi dengan rekombinan protein p54 dan/atau rekombinan protein p30 memiliki kemampuan menetralkan infeksi virus ASF pada makrofag. Antibodi monospesifik protein p54 menghambat perlekatan virus pada makrofag sedangkan antibodi monospesifik p30 menghambat internalisasi virus. Aktivitas netralisasi antibodi p54 dan p30 secara *in vitro* tidak sebanding dengan yang terjadi secara *in vivo*. Kekebalan protektif yang diperoleh setelah imunisasi dengan protein tersebut pada babi tidak kelihatan atau hanya parsial. Sebuah penelitian melaporkan bahwa babi yang diimunisasi dengan rekombinan protein p54 atau p30 memperlihatkan terbentuknya kekebalan protektif parsial yang ditandai dengan kelambatan timbulnya gejala klinis, penurunan titer viremia, dan penurunan tingkat kematian (Gomez-Puertas et al. 1998). Imunisasi babi dengan kedua protein tetapi dalam bentuk fusi p54/p30 yang diekspresikan oleh *Baculovirus* bahkan memberikan kekebalan protektif lebih tinggi tetapi belum memuaskan. Ketika ditantang dengan virus ASF, babi bertahan dari kematian, gejala

klinis yang lebih ringan dan kemunculannya beberapa hari lebih lambat dan titer viremia yang jauh lebih rendah sekitar 2 log dibandingkan dengan babi kontrol yang tidak divaksin (Barderas et al. 2001).

Protein virus ASF yang juga banyak mendapat perhatian adalah CD2v, yang merupakan glikoprotein transmembran tipe 2 yang disandi oleh gen EP402R. Protein ini merupakan salah satu protein ASF yang paling variabel, tidak vital untuk replikasi virus tetapi sangat penting dalam patogenesis dan imunogenesis virus (Jia et al. 2017). Protein ini terdiri beberapa bagian: bagian *signal peptide*, bagian ekstraseluler, bagian transmembran dan bagian sitoplasmik. Bagian ekstraseluler terdiri dari dua domain dan memiliki kesamaan dengan protein *surface adhesion receptor* CD2 sel T limfosit sehingga dinamai CD2v. Protein CD2v diekspresikan pada stadium akhir infeksi, sebagian dideposit pada membran sel yang terinfeksi, sehingga menyebabkan sel tersebut mampu membentuk *rosette* dengan eritrosit, fenomena yang dikenal sebagai *haemadsorption*. Bagian sitoplasmik CD2v yang memiliki panjang 150 asam amino tidak memiliki kesamaan struktur dengan bagian sitoplasmik protein CD2. Bagian sitoplasmik CD2v dapat berikatan dengan protein SH37P yang berperan dalam *trafficking* dan *signal transduction* pada makrofag sebagai akibatnya signal dari makrofag ke limfosit terganggu sehingga terjadi gangguan respons imun (Dixon et al. 2004).

Selain dideposit pada membran sel yang terinfeksi, protein juga di paking pada selaput terluar (*outer envelope*) virion. Oleh karena protein CD2v inilah, virion dapat melekat pada permukaan eritrosit sehingga virus disebarkan darah ke seluruh tubuh. Oleh karena berperan dalam penyebaran virus, protein CD2v berperan sebagai *virulent enhancement* atau meningkatkan virulen. Klasifikasi serologis virus ASF berdasarkan *haemadsorption inhibition* (HAI) sangat bermanfaat karena proteksi imun pada virus ASF bersifat *HAI- serotype specific* artinya babi yang sembuh dari infeksi atau diimunisasi dengan virus ASF hanya kebal terhadap tantangan virus dengan HAI yang sama (Burmakina et al. 2016; Malogolovkin et al. 2015). Fakta ini menyebabkan perhatian pada CD2v dalam hubungannya dengan pengembangan vaksin sangat besar. Ruiz-Gonzalvo et al. (1996) membuktikan bahwa babi yang diimunisasi dengan protein CD2v berupa rekombinan *baculovirus* memiliki kekebalan yang cukup tangguh. Ketika ditantang dengan virus ASF dosis letal, babi hanya menunjukkan gejala klinis yang ringan (Ruiz-Gonzalvo et al. 1996). Penelitian sebelumnya menggunakan *semipurified* CD2e, diisolasi dari partikel virus menunjukkan kekebalan protektif yang lebih rendah, kendati sebagian bertahan dari kematian ketika ditantang dengan virus ASF (Ruiz-Gonzalvo & Coll 1993). Selain CD2v, protein virus ASF yang juga terlibat dalam proses

haemadsorption adalah protein *C-type lectin* atau pEP153R. Seperti CD2v, lectin ini juga tidak esensial untuk replikasi virus tetapi diperlukan virus untuk *immune evasion* dengan cara menghambat apoptosis (Malogolovkin et al. 2015). Pemanfaatan protein ini untuk vaksin kelihatannya belum dilakukan.

Protein virus ASF yang dianggap berperan mengenali reseptornya pada sel hospes adalah protein P12 yang terletak pada lapisan partikel virus paling luar (Carrascosa et al. 1993). Protein p12, baik dalam bentuk rekombinan dengan sistem *Baculovirus* atau diisolasi langsung dari virion mampu menghambat perlekatan virus dengan sel makrofag (Carrascosa et al. 1991&1995). Akan tetapi, babi yang diimunisasi dengan protein tersebut sama sekali tidak terlindungi ketika ditantang dengan virus ASF (Carrascosa et al. 1995). Bahkan spesifik antibodi monoklonal terhadap p12 juga tidak memiliki kemampuan netralisasi (Carrascosa et al. 1991).

Protein p22 merupakan protein membran, disandi oleh gen KP177R dan terletak pada *outer envelope*. Mengingat protein p22 terdapat pada permukaan virion dan diekspresikan pada stadium awal infeksi maka protein ini diduga dapat dijadikan sebagai komponen vaksin (Camacho & Vinuela 1991). Akan tetapi ketika babi diimunisasi dengan protein p22, bahkan dalam bentuk koktail dengan protein p30, p54 dan p72, tidak menginduksi kekebalan protektif (Neilan et al. 2004).

Receptor binding dan Immune Evasion Proteins- ASFV menginfeksi dan bereplikasi pada sel myeloid (monosit, macrofage dan antigen presenting cell). Sel-sel ini memainkan peran yang sangat vital dalam respons imun baik humoral ataupun seluler. Infeksi ASFV menghambat fungsi makrofag seperti fagositosis, kemotaksis dan sintesa *reactive oxygen species*, tetapi tidak menghambat ekspresi reseptor Fc dan aktivitas ADCC (*antibody dependant cellular cytotoxicity*) (Martins et al. 1987). Makrofag merupakan kelompok sel yang sangat beragam lokasi, aktivitas, dan responsnya terhadap infeksi virus ASF. Perbedaan ini terlihat dengan jelas dengan alveolar makrofag (AM) yang terdapat pada permukaan alveolus paru-paru dan *pulmonary intravascular macrophage* (PIM). Infeksi pada PIM menimbulkan sekresi IL-1 dan TNF- α yang selanjutnya menimbulkan akumulasi sel netrofil, mikrothrombi, kebocoran pembuluh darah yang berakibat edema dan perdarahan (Carrasco et al. 2002). Respons yang sama tidak terjadi pada alveolar makrofag. Respons yang serupa dengan PIM juga terjadi pada makrofag limpa dan limfoglandula babi yang diinfeksi dengan ASFV virulen, bahkan peningkatan IL-1 α , IL-1 β , IL-6 dan TNF α bukan saja terdeteksi pada makrofag pada organ tersebut tetapi juga pada darah atau serum. Kerusakan patologis dan gejala klinis diawali oleh peningkatan sitokin tersebut (Salguero et al. 2002).

Mengingat replikasi ASFV pada sel monosit dan makrofag merupakan langkah awal terjadinya penyakit, penyakit tentunya tidak terjadi apabila replikasi ASFV pada sel ini dapat dicegah, misalnya dengan vaksinasi. Beberapa protein ASFV yang memainkan peran vital dalam infeksi atau replikasi ASFV telah diidentifikasi. Virus ASF memasuki sel makrofag dengan cara endositosis yang dimediasi oleh reseptor (*receptor-mediated endocytosis*) (Sanchez et al. 2017). Reseptor virus pada makrofag belum banyak diketahui tetapi protein virus ASF yang mengenali reseptor telah diketahui, diantaranya protein p12. Rekombinan p12 yang fungsional dan antibodi monoklonal terhadap p12 telah dihasilkan untuk meyakinkan kemungkinan penggunaan p12 sebagai vaksin yang efektif. Rekombinan p12 yang dihasilkan dapat berikatan dengan reseptor sehingga menghambat infeksi sel oleh ASFV. Akan tetapi, antibodi spesifik terhadap p12 baik yang terbentuk pada infeksi alami maupun dihasilkan dengan imunisasi dengan rekombinan p12 tidak mampu menghambat infeksi (Angulo et al. 1993; Carrascosa et al. 1995). Fenomena seperti ini tidak lazim pada kebanyakan penyakit viral. Vaksin yang mengandung protein pengikat reseptor (*receptor binding protein*) seperti hemagglutinin pada virus influenza, spike protein pada virus penyebab SARS, MERS, SARS CoV-2 menginduksi netralisasi antibodi, dan netralisasi antibodi tersebut dapat memberi perlindungan terhadap infeksi (Huang et al. 2020; Jeong et al. 2021).

Immune evasion atau kemampuan menghindari sistem imun hospes pada virus ASF juga sangat canggih. Banyak protein virus berperan dalam *immune evasion* yang telah diidentifikasi. Teknik ekspresi diferensial gen pada sel makrofag babi yang diinfeksi virus ASF berhasil mengidentifikasi 5 kelompok gen/protein ASFV yang berperan dalam *immune evasion* tersebut (Zhu et al. 2019). Kelompok pertama adalah protein yang berperan menghambat pemrosesan dan penyajian antigen MHC II, kelompok kedua berfungsi menghindarkan sel efektor CD8⁺ T dan neutrofil melalui penurunan ekspresi *chemokine*. kelompok ketiga berfungsi menekan aktivasi makrofag M1, Protein kelompok ke 4 berfungsi menginduksi sitokin yang dapat menghambat sistem imun (*suppressive cytokines*) dan kelompok kelima adalah protein yang menghambat proses autofagi dan apoptosis makrofag. Pemanfaatan keseluruhan protein *immune evasion* sebagai komponen vaksin subunit belum dilakukan. Salah satu kendala dalam pemanfaatannya sebagai vaksin adalah karena jumlahnya sangat banyak. Tidaklah fisibel semua protein dijadikan vaksin, dan kalau hanya sebagian yang digunakan sebagai vaksin, dikhawatirkan tidak akan efektif karena fungsinya akan digantikan oleh protein yang lain.

Sitokin (TNF- α) yang dihasilkan oleh sel yang terinfeksi virus ASF menyebabkan apoptosis bukan saja pada sel makrofag yang terinfeksi tetapi juga *non-infected* limfosit yang memainkan peran utama dalam pembentukan *adaptive immunity* (Gomez del Moral et al., 1999; Ramiro-Ibanez et al. 1996; Salguero et al. 2005). Pada stadium awal infeksi, apoptosis dihambat; dan penghambatan ini merupakan mekanisme untuk memberi kesempatan ASFV bereplikasi, virus progeni menonjol pada permukaan sel (*progeny budding*) dan tersebar (*release*). Sejumlah protein ASFV yang diekspresikan pada stadium awal infeksi yang berperan menghambat apoptosis telah diidentifikasi, antara lain: Bcl2 homolog (produk gen A179L), *apoptosis Inhibitor protein* (IAP) (produk gen A224L) dan protein *hemadsorption* (produk gen EP153R) (Afonso et al. 1996; Chacon et al. 1995; Hurtado et al. 2004). Selain itu, *multigene family* (MGF) 360 dan 530 sepanjang 11 kbp (kilobase pairs) pada ujung kiri genom juga berfungsi menghambat apoptosis sel yang terinfeksi. *Multigene family* 360 dan 530 dapat hilang karena pasase virus ASF berulang pada kultur sel tetapi kehilangan tidak mengganggu replikasi virus. Hal ini berarti bahwa MGF 360 dan 530 tidak vital bagi virus ASF. Akan tetapi isolat yang kehilangan MGF tersebut membunuh makrofag sangat cepat, bahkan saking cepatnya sebagian makrofag mati sebelum proses replikasi selesai (Zsak et al. 2001).

WAKSIN SUBUNIT DNA

Peran antibodi dalam proteksi pada ASF tidak diragukan, namun seperti diuraikan diatas, antibodi saja tidak memberikan proteksi yang utuh. proteksi yang utuh membutuhkan sel sitotoksik. Babi yang diimunisasi dengan virus ASF avirulen memiliki kekebalan yang utuh sehingga resisten ketika ditantang dengan virus ASF. Resistensi tersebut hilang ketika sebelum ditantang sel limfosit CD8⁺ T dihilangkan (Oura et al. 2005). Kelemahan utama vaksin in-aktif atau vaksin subunit protein adalah ketidak-mampuannya menginduksi respons imun seluler.

Vaksin sub unit DNA yang mengandung gen yang menyandi protein virus ASF mampu menginduksi *antibody-* dan *cell-mediated immunities*. Setelah masuk ke dalam sel, vaksin DNA ditranslasi menjadi protein, sebagian dari protein mengalami proses fragmentasi lalu diekspresikan pada permukaan sel bersama molekul MHC-I untuk menginduksi *cell-mediated immune response* yakni *cytolytic T lymphocytes* dan *T-helper cells*. Sebagian dari protein yang disandi vaksin DNA disekresi keluar sel lalu diambil oleh *antigen presenting cells* kemudian didegradasi menjadi peptida dan disajikan pada permukaan sel oleh molekul MHC-II yang selanjutnya menstimulasi sel B untuk mensintesis antibodi (Liu 2003).

Pengembangan vaksin DNA untuk ASF sudah dilakukan namun sampai saat ini belum memberikan hasil seperti yang diharapkan. Babi yang diimunisasi dengan plasmid yang mengandung gen untuk protein p30 dan p54 tidak mampu menginduksi antibodi. Antibodi spesifik baru terbentuk bila ke dalam plasmid tersebut ditambahkan gen untuk protein ekstraseluler CD2v. Sekalipun demikian, babi yang memiliki antibodi tersebut semuanya mati ketika ditantang dengan virus ASF (Argilaguuet et al. 2011). Penambahan gen ubiquitin ke dalam *construct*, sehingga terekspresikan sebagai fusi protein ubiquitin-CD2v-p30 -p54 mampu meningkatkan imun seluler terutama sel limfosit T CD8⁺ tetapi antibodi spesifik tidak terbentuk. Ketika babi yang telah diimunisasi tersebut ditantang dengan virus ASF, hanya sebagian (2 dari 6 ekor) bertahan dari kematian (Argilaguuet et al. 2012). Tingkat proteksi yang lebih tinggi kemungkinan dapat diperoleh seandainya vaksinasi mampu menginduksi *neutralizing specific* antibodi beserta kekebalan seluler, terutama limfosit T CD8⁺ spesifik.

Vaksin DNA yang mampu menginduksi respons antibodi dan seluler yang sesuai belum ditemukan. Sunwoo et al. (2019) memformulasi suatu vaksin koktail yang mengandung plasmid DNA yang mengandung gen fusi protein CD2v-p72-p32-17 dan rekombinan protein p15, p35, p54 dan p13. Ketika babi diimunisasi 3 kali dengan vaksin koktail tersebut, antibodi spesifik terhadap rekombinan protein dan spesifik sel imun memang terbentuk tetapi tidak protektif. Ketika babi ditantang dengan virus ASF, penyakit parah timbul bahkan lebih parah dibandingkan dengan babi kontrol yang tidak divaksin. Penyebab infeksi lebih parah pada babi yang divaksin adalah karena antibodi yang terbentuk tidak seperti yang diharapkan tetapi sebaliknya meningkatkan infeksi atau *antibody dependant enhancemet* (ADE) (Sunwoo et al. 2019).

WAKSIN AKTIF ATENUASI ALAMI

Ciri penyakit ketika virus ASF mewabah di suatu daerah atau negara yang baru adalah perakut atau akut dengan mortalitas yang sangat tinggi, dan virus penyebabnya mempunyai virulensi yang tinggi. Setelah beberapa tahun mewabah, virus mengalami mutasi sehingga timbul populasi virus ASF yang virulensinya rendah. Virus dengan virulensi yang menurun tersebut menimbulkan penyakit yang ringan, kronis atau bahkan subklinis. Virus *strain* NH/P68 (NHV) diisolasi dari babi yang menderita ASF kronis di Portugal tahun 1968, yakni 8 tahun setelah penyakit pertama muncul (Leitao et al. 2001). Virus *strain* NHV memiliki virulensi yang sangat rendah dan hanya menimbulkan penyakit yang sangat ringan ketika diinokulasi kepada babi yang sehat. Babi yang diinfeksi dengan *strain*

NHS menginduksi respons antibodi dan seluler yang spesifik yang mampu memberikan perlindungan yang relatif utuh ketika babi ditantang dengan virus ASF virulen dosis letal (Portugal et al. 2015).

Selain dari babi penderita ASF kronis, virus ASF avirulen juga bisa diisolasi dari caplak babi. Boinas et al. (2004) mengisolasi sejumlah isolat virus ASF dari caplak babi, *Ornithodoros erraticus*, yang dikelompokkan menjadi kelompok yang memiliki aktivitas haemadsorpsi (HAD) dan yang tidak (*non* HAD). Virus yang non HAD tersebut ternyata memiliki virulensi yang sangat rendah. Babi yang diinokulasi dengan virus non HAD tersebut, *strain* OUR83/3, tidak menimbulkan penyakit tetapi membentuk kekebalan yang relatif lengkap (Boinas et al. 2004). Analisis genom virus *strain* OUR83/3 mengungkapkan adanya delesi sepanjang 8-10 kb pada MGF 360 dan mutasi pada gen yang menyandi CD2v dan C-type lectin protein (Chapman et al. 2008).

Low atau *avirulent* virus ASF genotype II juga telah diisolasi dari babi hutan buruan di Latvia tahun 2017, yakni sekitar 10 tahun sejak introduksi ASF genotype II di daratan Eropa. Isolat virus avirulen yang diberi nama Lv17/WB/Rie1 juga tidak memiliki aktivitas *hemadsorption*. Hasil sekuens genom menunjukkan delesi *single nucleotide* pada gen *EP402R* yang menyandi protein CD2v. Delesi tersebut menyebabkan *frame shift* sehingga sel yang terinfeksi virus Lv17/WB/Rie1 hanya mengekspresikan *non-functional, truncated* CD2v protein. Babi yang diinokulasi dengan *strain* Lv17/WB/Rie1 tersebut menimbulkan gejala klinis yang ringan atau bahkan tidak terlihat gejala pada sebagian yang lain. Setelah terinfeksi oleh *strain* Lv17/WB/Rie1, babi memiliki kekebalan atau resistensi penuh terhadap virus yang virulen, terbukti dari hasil uji tantang dengan isolat virulen (HAD Latvian) (Gallardo et al. 2019).

WAKSIN ATENUASI PASASE BERULANG

Sel tropisme virus ASF secara alami sangat sempit yakni sel monosit dan sel makrofag babi tetapi virus tersebut dapat diadaptasikan untuk bereplikasi pada sel lain dan berakibat perubahan genotip dan fenotip seperti penurunan virulensi. Virus ASF *strain* E75 berkurang virulensinya setelah 40 kali pasase pada sel CV1 (*green monkey kidney fibroblast*). *Strain* mutan yang diperoleh, E75CV1, hanya menimbulkan penyakit ringan ketika diinokulasikan pada babi, dan babi yang sembuh dari infeksi mutan ini memiliki resistensi terhadap virus virulen homolog *strain* E75, tetapi tidak resisten terhadap *strain* heterolog BA71 (Lacasta et al. 2015). Pasase berulang pada sel tersebut dapat menghilangkan tropisme virus pada sel makrofag babi, dan bila tropisme tersebut hilang maka virulensi virus juga hilang. Teknik pasase berulang ini sederhana dan

telah digunakan untuk tujuan menemukan biang vaksin aktif ASF. Rodriguez et al. (2015) mem pasase berulang virus ASF virulen *strain* BA71 pada sel CV1 dan memperoleh *strain* baru BA71V yang tidak lagi virulen setelah pasase ke 36. Akan tetapi *strain* virus yang baru tersebut sama sekali tidak memiliki kemampuan menginduksi kekebalan protektif pada babi sekalipun terhadap virus tua yakni *strain* BA71. Hasil seperti ini tidak diduga karena perubahan genom yang menyebabkan kehilangan virulensi virus tersebut sangat sedikit (Rodriguez et al. 2015). Atenuasi berulang virus virulen *strain* Georgia pada sel Vero menyebabkan kehilangan virulensinya pada pasase yang lebih tinggi yakni pasase ke-110. Virus yang sudah di atenuasi ini juga tidak mampu menginduksi kekebalan protektif pada babi (Krug et al. 2015). Analisis keseluruhan genom virus yang atenuasi ini berbeda dengan sebelumnya (Rodriguez et al. 2015). Atenuasi pada virus *strain* Georgia menyebabkan delesi yang signifikan secara bertahap dan terakumulasi di tempat tertentu pada ujung variabel kanan dan kiri genom. Atenuasi berulang juga menyebabkan mutasi berupa substitusi asam amino dan *frameshift* pada beberapa gen (Krug et al. 2015).

Vaksin ASF asal atenuasi pasase berulang telah diaplikasikan pada peternakan babi di Portugal dan Spanyol tahun 1960 an. Hasil vaksinasi tidak seperti diharapkan karena vaksin aktif sekalipun dalam percobaan di laboratorium tidak virulen masih menimbulkan penyakit ketika diaplikasikan di peternakan. Sebanyak 7% dari babi yang divaksin menderita sakit dengan gejala pneumonia, gangguan gerak dan ulserasi kulit (Munoz-Perez et al. 2021). Kejadian ini menyebabkan penghentian penggunaan vaksin atenuasi pasase berulang.

WAKSIN ATENUASI DELESI GEN

Persoalan utama yang dihadapi dalam penggunaan vaksin aktif atenuasi alami atau pasase berulang adalah masih sering menjadi virulen ketika diaplikasikan di lapangan atau kehilangan kemampuannya menginduksi kekebalan protektif bila dipasase berlebihan. Harapan untuk dapat mengatasi persoalan diatas timbul dengan berkembangnya teknik molekuler yang mampu mendelesi gen secara presisi.

Pengetahuan tentang segmen genom yang harus didelesi untuk menghilangkan virulensi virus ASF telah banyak diketahui. Hasil komparasi genom virus virulen dengan yang avirulen, baik yang natural maupun yang diperoleh melalui pasase berulang, mengungkapkan bahwa terjadi delesi segmen genom pada virus yang avirulen. Segmen genom yang terdelesi beragam tetapi pada umumnya terjadi pada bagian genom variabel terutama pada kelompok MGF. Segmen tersebut mempunyai peran dalam patogenitas atau *immune*

evasion (Rodriguez et al. 2015). Atenuasi virus dengan cara mendelesi gen yang bertanggung jawab terhadap patogenitas menggunakan teknologi molekuler memberikan harapan, terlebih dengan tersedianya teknik molekuler yang lebih efisien untuk gen delesi. Berbeda dengan teknik pasase berulang, teknik molekuler mendelesi gen secara terarah dan spesifik.

Teknik rekombinasi homolog atau teknik CRISPR/cas 9 adalah teknik molekuler yang telah dipakai untuk delesi gen pada virus ASF. Neilan et al berhasil mendelesi gen atau ORF 4CL dengan teknik rekombinasi homolog (Neilan et al. 1997). Awalnya produk ORF 4CL diduga berperan sebagai *inhibitor* apoptosis sehingga bila gen ini didelesi virus kehilangan virulensinya dan dapat dijadikan sebagai vaksin aktif. Akan tetapi, dugaan tersebut meleset karena virus yang telah kehilangan ORF 4CL tidak berubah kemampuannya dibandingkan dengan virus asalnya dalam menginduksi apoptosis pada sel makrofag dan virulensinya pada babi. Dugaan ini didasarkan pada fakta bahwa ORF 4CL mengandung motif BIR (*baculovirus inhibitor of apoptosis motif*).

Gen 8DR yang menyandi protein CD2v juga telah berhasil di delesi menggunakan teknik rekombinasi homolog pada virus ASF ganas *strain* Malawi Lil-20/1 (Borca et al. 1998). Teknik ini menghasilkan delesi hanya pada gen 8DR dan tidak menimbulkan mutasi pada genom bagian lain. Ketika mutan ASF- Δ 8DR diinokulasi pada babi replikasinya menurun secara signifikan yang ditandai dengan penurunan titer virus sampai 10.000 kali pada darah dan 1000 kali pada limfoglandula. Akan tetapi virus mutan ASF - Δ 8DR ini masih ganas, patogenitasnya masih sama dengan *strain* induk Malawi Lil-20/1, sehingga tidak memungkinkan digunakan sebagai vaksin.

Gen NL-S yang diduga berperan sebagai *host range gen* juga telah didelesi pada virus ASF *strain* E-70 (Zsak et al. 1996). Sesuai dengan dugaan, delesi gen NL-S tidak menimbulkan gangguan replikasi virus pada sel makrofag. Virulensi virus mutan jauh menurun sehingga inokulasi pada babi tidak menimbulkan kematian, gejala klinis yang nampak hanya demam ringan, dan viremia muncul lebih lambat dengan titer berkurang sampai 1000 kali. Babi yang sebelumnya diinokulasi dengan mutan virus ASF Δ NL-S bertahan terhadap infeksi tantang dengan virus induk (E-70) dosis letal. Tepat disebelah atas gen NL-S terdapat gen UK yang berperan dalam virulensi virus dan tidak esensial untuk replikasi virus. Delesi gen UK pada virus ASF *strain* E70, mutan E70 Δ UK, tidak menyebabkan gangguan replikasi pada biakan sel makrofag tetapi ketika diinokulasikan pada babi terjadi penurunan titer viremia 300 – 1000 kali dibandingkan dengan virus induknya *strain* E70. Inokulasi virus mutan pada babi tidak menimbulkan kematian tetapi demam dan gejala klinis, sekalipun jauh lebih ringan,

masih muncul. Setelah sembuh, reinfeksi dengan virus induk *strain* E70 tidak menimbulkan penyakit (Zsak et al. 1998).

Teknik rekombinasi homolog juga telah digunakan untuk mendelesi gen *thymidine kinase* virus ASF *strain* Malawi Lil-20/1 dan *strain* Haiti (Moore et al. 1998). Oleh karena produk gen ini berperan dalam sintesis DNA virus, maka delesi gen, seperti diduga, mengganggu replikasi virus pada sel makrofag. Virulensi virus mutan jauh menurun dibandingkan dengan virus induk tetapi masih mampu menimbulkan demam dan viremia bahkan kematian pada beberapa babi.

Gen 9GL (B119L) virus ASF juga berhasil didelesi dengan cara rekombinasi homolog antara gen 9GL virus ASF *strain* Malawi Lil-20/1 dengan sebuah vektor transfer rekombinasi yang mengandung insert gen reporter β -glucuronidase pada sel makrofag babi (Lewis et al. 2000). Gen 9GL yang menyandi protein nonstruktural p14 yang berperan dalam fosforilasi oksidatif sangat *conserved* pada isolat virus ASF. Delesi gen ini menyebabkan gangguan yang sangat besar pada maturasi virus pada sel makrofag sehingga kehilangan virulensinya. Inokulasi virus mutan ASF Δ 9GL pada babi hanya menyebabkan demam ringan pada beberapa babi. Babi yang pernah terinfeksi dengan virus mutan ASF Δ 9G tidak menunjukkan gejala sakit ketika ditantang dengan virus induk Malawi Lil-20/1 dosis letal. Sekalipun gen Gen 9GL (B119L) sangat *conserved*, dampak dari delesi gen tersebut tidak. O'Donnell et al. (2015b) mendelesi gen 9GL pada virus ASF *strain* Georgia dengan cara yang sama seperti diuraikan diatas pada *strain* Malawi Lil-20/1 menghasilkan mutan yang masih virulen sekalipun mengalami gangguan pertumbuhan pada sel makrofag dan patogenitasnya berkurang pada dosis rendah (O'Donnell et al. 2015b).

Delesi gen untuk mendapatkan mutan virus ASF yang nonvirulen tapi menginduksi kekebalan protektif pada virus ASF genotipe 2 kelihatannya jauh lebih sulit dibandingkan dengan genotipe 1 (Tabel 1 dan 2). Pada genotipe II *strain* Georgia, atenuasi mutan ASF Δ 9GL mejadi komplis hanya setelah gen UK juga turut dilesi. Delesi kedua gen dilakukan dengan teknik rekombinasi homolog secara sekuensial. Sepanjang 173 nucleotida gen 9GL didelesi dan digantikan dengan gen *β -glucuronidase* plus promoter p72, dan 255 nucleotida gen UK didelesi dan disubstitusi dengan gen protein *mCherry plus* promoter p72 (O'Donnell et al. 2016). Mutan yang diperoleh, ASFVG Δ 9GL- Δ UK, tidak menimbulkan penyakit ketika diinokulasi pada babi sekalipun dengan dosis yang tinggi, yakni 10^6 HAD₅₀. Imunisasi babi dengan dosis 10^4 HAD₅₀ memberikan perlindungan yang utuh setelah 14 hari pasca imunisasi.

Tabel 1. Dampak delesi gen pada genom virus *African swine fever* genotipe I terhadap virulensi dan kemampuan menginduksi kekebalan protektif pada babi

Gen yang didelesi	Strain/ Isolat virus ASF	Virulensi atau patogenitas mutan	Proteksi	Referensi
8DR	Malawi Lil-20/1	masih virulen	tidak ada data	Borca et al. 1998
NL	E-70	ringan berupa demam ringan dan viremia	hampir komplrit	Zsak et al. 1996
NL	Malawi Lil-20/1	masih virulen	tidak ada data	Afonso et al. 1998
NL	Pretoriuskop/96/4	masih virulen	tidak ada data	Afonso et al. 1998
UK	E-70	ringan berupa demam ringan dan viremia	hampir komplrit	Zsak et al. 1998
TK (A240L)	Malawi Lil-20/1 dan strain Haiti	ringan berupa demam ringan, viremia, mortalitas rendah	hampir komplrit	Moore et al. 1998
9GL (B119L)	Malawi Lil-20/1	atenuasi hampir komplrit	hampir komplrit	Lewis et al. 2000
MGF360 dan 505	Benin 97/1	ringan berupa demam ringan, viremia, mortalitas rendah	hampir komplrit	Sanchez-Cordon et al. 2018
DP148R	Benin 97/1	<i>attenuated</i>	hampir komplrit	Reis et al. 2017
CD2v (EP402R)	BA71	<i>attenuated</i>	hampir komplrit	Monteagudo et al. 2017
DP71L (NL) & DP96GR (UK)	virulensi rendah OUR T88/3	tidak virulen	proteksi hilang	Abrams et al. 2013

Tabel 2. Dampak delesi gen pada genom virus *African swine fever* genotipe II terhadap virulensi dan kemampuan menginduksi kekebalan protektif pada babi

Gen yang didelesi	Strain/isolat virus ASF	Virulensi atau patogenitas mutan	Proteksi	Referensi
TK (A240L)	Georgia	patogenik ringan	tidak protektif	Sanford et al. 2016
9GL (B119L)	Georgia	patogenik ringan	protektif	O'Donnell et al. 2015b
9GL & UK	Georgia	patogenik ringan	komplrit	O'Donnell et al. 2016
DP96GR (UK)	Georgia	Virulen	tidak ada data	Ramirez-Medina et al. 2019
DP71L (NL)	Georgia	bervariasi (tidak virulen -virulen)	tidak ada data	Ramirez-Medina et al. 2019
C962R	Georgia	virulen	tidak ada data	Ramirez-Medina et al. 2020
MGF530 (1R, 2R, 3R); MGF360 (12L, 13L, 14L)	Georgia	tidak virulen	komplrit	O'Donnell et al. 2015a
DP148R	Pig/Heilongjiang/2018	virulen	tidak ada data	Chen et al. 2020
CD2v	Pig/Heilongjiang/2018	virulensinya sedikit berkurang	tidak ada data	Chen et al. 2020
CD2v + UK	Pig/Heilongjiang/2018	virulensinya sedikit berkurang	tidak ada data	Chen et al. 2020
9GL& UK,	Pig/Heilongjiang/2018	<i>attenuated</i>	tidak terproteksi	Chen et al. 2020
MGF530 (1R, 2R, 3R); MGF360 (12L, 13L, 14L)	Pig/Heilongjiang/2018	<i>attenuated</i>	terproteksi tetapi mutan bisa berbalik menjadi virulen	Chen et al. 2020
MGF530 (1R, 2R, 3R); MGF360 (12L, 13L, 14L) CD2v	Pig/Heilongjiang/2018	tidak virulen	terproteksi dan mutan stabil tidak virulen	Chen et al. 2020

Babi yang diinokulasi dengan ASFVGΔ9GL-ΔUK membentuk antibodi spesifik yang titernya berkorelasi dengan derajat kekebalan. Tambahan delesi gen NL (DP71L) pada mutan ASFVGΔ9GL-ΔUK ini menyebabkan kemampuan bereplikasi mutan ini (ASFVGΔ9GL-ΔUK-ΔNL) 100 kali lebih rendah dibandingkan virus induknya ASFVGΔ9GL-ΔUK atau 1000 kali lebih rendah dibanding virus neneknya, *strain* Georgia (Ramirez-Medina et al. 2019). Inokulasi mutan delesi *triple* gen pada babi tidak menimbulkan penyakit dan hanya dengan titer viremia yang sangat rendah, dan sebagai konsekuensinya antibodi yang terbentuk juga rendah. Akibatnya, babi yang diimunisasi dengan ASFVGΔ9GL-ΔUK-ΔNL tidak memiliki kekebalan terhadap infeksi tantang dengan virus ASF *strain* Georgia (ASFV-G).

Hasil yang sama tidak diperoleh ketika dilakukan pada virus ASF isolat China Pig/Heilongjiang/2018 sekalipun isolat ini masih satu klaster dengan *strain* Georgia. Mutan yang tidak virulen dan mampu menginduksi kekebalan protektif pada pada genom isoolat Pig/Heilongjiang/2018 baru terjadi setelah dilakukan delesi pada 7 gen, MGF530 (1R, 2R, 3R); MGF360 (12L, 13L, 14L) CD2v. Ketujuh gen tersebut harus didelesi karena bila delesi hanya pada 6 gen, yakni tanpa delesi gen CD2v, mutan yang terbentuk tidak stabil karena dapat berbalik menjadi virulen (Chen et al. 2020). Hasil uji lapangan menunjukkan bahwa vaksin mutan delesi 7 gen tersebut stabil dan tidak ada kecenderungan untuk berbalik menjadi virulen. Oleh karena itu, mutan delesi 7 gen tersebut diharapkan dapat dijadikan vaksin dan digunakan secara meluas. Uji lapang yang lebih luas, melibatkan berbagai negara masih perlu dilakukan sebelum vaksin diproduksi secara komersial.

KESIMPULAN

Penyakit *African swine fever* (AFS) telah menyebar di Indonesia dan negara tetangga. Penerapan biosekuriti dan *stamping out* yang ketat merupakan keharusan karena virus dapat bertahan lama sekalipun dalam lingkungan yang ekstrim. Cara ini tidak mungkin diterapkan di Indonesia. Oleh karena itu ketersediaan vaksin untuk menanggulangi penyakit sangat dibutuhkan. Virus ASF sangat kompleks dan mempunyai cara yang ampuh melumpuhkan sistem imunitas. Berbagai format vaksin in-aktif, vaksin subunit protein, vaksin subunit DNA, vaksin aktif atenuasi alami atau pasase berulang telah dikembangkan sejak penyakit ASF ditemukan namun tidak ada satupun yang efektif. Vaksin aktif berupa virus ASF yang diatenuasi dengan delesi tujuh gen pengendali virulensi dan *immune evasion* memberi harapan namun ketersediaannya masih menunggu pengujian keamanan yang cukup panjang.

DAFTAR PUSTAKA

- Abrams CC, Goatley L, Fishbourne E, Chapman D, Cooke L, Oura CA, Netherton CL, Takamatsu HH, Dixon LK. 2013. Deletion of virulence associated genes from attenuated African swine fever virus isolate OUR T88/3 decreases its ability to protect against challenge with virulent virus. *Virology*. 443:99-105.
- Afonso CL, Neilan JG, Kutish GF, Rock DL. 1996. An African swine fever virus Bc1-2 homolog, 5-HL, suppresses apoptotic cell death. *J Virol*. 70:4858-4863.
- Afonso CL, Zsak L, Carrillo C, Borca MV, Rock DL. 1998. African swine fever virus NL gene is not required for virus virulence. *J Gen Virol*. 79:2543-2547.
- Angulo A, Vinuela E, Alcamí A. 1993. Inhibition of African swine fever virus binding and infectivity by purified recombinant virus attachment protein p12. *J Virol*. 67:5463-5471.
- Argilaguuet JM, Perez-Martin E, Gallardo C, Salguero FJ, Borrego B, Lacasta A, Accensi F, Diaz I, Nofrarias M, Pujols J, Blanco E, Perez-Filgueira M, Escibano JM, Rodriguez F. 2011. Enhancing DNA immunization by targeting ASFV antigens to SLA-II bearing cells. *Vaccine*. 29:5379-5385.
- Argilaguuet JM, Perez-Martin E, Nofrarias M, Gallardo C, Accensi F, Lacasta A, Mora M, Ballester M, Galindo-Cardiel I, Lopez-Soria S, Escibano JM, Reche PA, Rodriguez F. 2012. DNA vaccination partially protects against African swine fever virus lethal challenge in the absence of antibodies. *PLoS One*. 7:e40942.
- Blome S, Gabriel C, Beer M. 2014. Modern adjuvants do not enhance the efficacy of an inactivated African swine fever virus vaccine preparation. *Vaccine*. 32: 3879-3882.
- Boinas FS, Hutchings GH, Dixon LK, Wilkinson PJ. 2004. Characterization of pathogenic and non-pathogenic African swine fever virus isolates from *Ornithodoros erraticus* inhabiting pig premises in Portugal. *J Gen Virol*. 85:2177-2187.
- Borca MV, Carrillo C, Zsak L, Laegreid WW, Kutish GF, Neilan JG, Burrage TG, Rock DL. 1998. Deletion of a CD2-like gene, 8-DR, from African swine fever virus affects viral infection in domestic swine. *J Virol*. 72:2881-2889.
- Borca MV, Irusta P, Carrillo C, Afonso CL, Burrage T, Rock DL. 1994. African swine fever virus structural protein p72 contains a conformational neutralizing epitope. *Virology*. 201:413-418.
- Burmakina G, Malogolovkin A, Tulman ER, Zsak L, Delhon G, Diel DG, Shobogorov NM, Morgunov YP, Morgunov SY, Kutish GF, Kolbasov D, Rock DL. 2016. African swine fever virus serotype-specific proteins are significant protective antigens for African swine fever. *J Gen Virol*. 97:1670-1675.

- Camacho A, Vinuela E. 1991. Protein p22 of African swine fever virus: an early structural protein that is incorporated into the membrane of infected cells. *Virology*. 181:251-257.
- Carrasco L, Nunez A, Salguero FJ, Diaz San Segundo F, Sanchez-Cordon P, Gomez-Villamandos JC, Sierra MA. 2002. African swine fever: Expression of interleukin-1 alpha and tumour necrosis factor-alpha by pulmonary intravascular macrophages. *J Comp Pathol*. 126:194-201.
- Carrascosa AL, Saastre I, Gonzalez P, Vinuela E. 1993. Localization of the African swine fever virus attachment protein P12 in the virus particle by immunoelectron microscopy. *Virology*. 193:460-465.
- Carrascosa AL, Sastre I, Vinuela E. 1991. African swine fever virus attachment protein. *J Virol*. 65:2283-2289.
- Carrascosa AL, Sastre I, Vinuela E. 1995. Production and purification of recombinant African swine fever virus attachment protein p12. *J Biotechnol*. 40:73-86.
- Chacon MR, Almazan F, Nogal, ML, Vinuela E, Rodriguez, JF. 1995. The African swine fever virus IAP homolog is a late structural polypeptide. *Virology*. 214:670-674.
- Chapman DAG, Tcherepanov V, Upton C, Dixon LK. 2008. Comparison of the genome sequences of non-pathogenic and pathogenic African swine fever virus isolates. *J Gen Virol*. 89:397-408.
- Chen W, Zhao D, He X, Liu R, Wang Z, Zhang X, Li F, Shan D, Chen H, Zhang J, Wang L, Wen Z, Wang X, Guan Y, Liu J, Bu Z. 2020. A seven-gene-deleted African swine fever virus is safe and effective as a live attenuated vaccine in pigs. *Sci China Life Sci*. 63: 623-634.
- de Kock G, Robinson EM, Keppel JGG. 1940. Swine fever in South Africa. *Onderstepoort J Vet Sci Anim Industry*. 14:31-93.
- Dharmayanti NLPI, Sendow I, Ratnawati A, Settypalli TBK, Saepullo M, Dundon WG, Nuradji H, Naletoski I, Cattoli G, Lamien CE. 2021. African swine fever in North Sumatra and West Java provinces in 2019 and 2020, Indonesia. *Transbound Emerg Dis*. 68:2890-2896.
- Dixon LK, Abrams CC, Bowick G, Goatley LC, Kay-Jackson PC, Chapman D, Liverani E, Nix R, Silk R, Zhang F. 2004. African swine fever virus proteins involved in evading host defence systems. *Vet Immunol Immunopathol*. 100:117-134.
- Forman AJ, Wardley RC, Wilkinson PJ. 1982. The immunological response of pigs and guinea pigs to antigens of African swine fever virus. *Arch Virol*. 74:91-100.
- Gallardo C, Soler A, Rodze I, Nieto R, Cano-Gomez C, Fernandez-Pinero J, Arias M. 2019. Attenuated and non-haemadsorbing (non-HAD) genotype II African swine fever virus (ASFV) isolated in Europe, Latvia 2017. *Transbound Emerg Dis*. 66:1399-1404.
- Gaudreault NN, Richt JA. 2019. Subunit vaccine approaches for African Swine Fever virus. *Vaccines (Basel)* 7:56.
- Gomez del Moral M, Ortuno E, Fernandez-Zapatero P, Alonso F, Alonso C, Ezquerro A, Dominguez J. 1999. African swine fever virus infection induces tumor necrosis factor alpha production: implications in pathogenesis. *J Virol*. 73:2173-2180.
- Gomez-Puertas P, Rodriguez F, Oviedo JM, Brun A, Alonso C, Escribano JM. 1998. The African swine fever virus proteins p54 and p30 are involved in two distinct steps of virus attachment and both contribute to the antibody-mediated protective immune response. *Virology*. 243:461-471.
- Huang J, Huang H, Wang D, Wang C, Wang Y. 2020. Immunological strategies against spike protein: Neutralizing antibodies and vaccine development for COVID-19. *Clin Transl Med*. 10:e184.
- Hurtado C, Granja AG, Bustos MJ, Nogal ML, Gonzalez de Buitrago G, de Yebenes VG, Salas ML, Revilla Y, Carrascosa, AL. 2004. The C-type lectin homologue gene (EP153R) of African swine fever virus inhibits apoptosis both in virus infection and in heterologous expression. *Virol*. 326:160-170.
- Jeong H, Lee CS, Lee J, Lee J, Hwang HS, Lee M, Na K. 2021. Hemagglutinin nanoparticulate vaccine with controlled photochemical immunomodulation for pathogenic influenza-specific immunity. *Adv Sci*. 8:e2100118.
- Jia N, Ou Y, Pejsak Z, Zhang Y, Zhang J. 2017. Roles of African swine fever virus structural proteins in viral infection. *J Vet Res*. 61: 135-143.
- Krug PW, Holinka LG, O'Donnell V, Reese B, Sanford B, Fernandez-Sainz I, Gladue DP, Arzt J, Rodriguez L, Risatti GR, Borca MV. 2015. The progressive adaptation of a georgian isolate of African swine fever virus to vero cells leads to a gradual attenuation of virulence in swine corresponding to major modifications of the viral genome. *J Virol*. 89:2324-2332.
- Lacasta A, Monteagudo PL, Jimenez-Marin A, Accensi F, Ballester M, Argilague J, Galindo-Cardiel I, Segales J, Salas ML, Dominguez J, Moreno A, Garrido JJ, Rodriguez F. 2015. Live attenuated African swine fever viruses as ideal tools to dissect the mechanisms involved in viral pathogenesis and immune protection. *Vet Res*. 46:135.
- Leitao A, Cartaxeiro C, Coelho R, Cruz B, Parkhouse RM, Portugal F, Vigario JD, Martins CL. 2001. The non-haemadsorbing African swine fever virus isolate ASFV/NH/P68 provides a model for defining the protective anti-virus immune response. *J Gen Virol*. 82:513-523.
- Lewis T, Zsak L, Burrage TG, Lu Z, Kutish GF, Neilan JG, Rock DL. 2000. An African swine fever virus ERV1-ALR homologue, 9GL, affects virion maturation and viral growth in macrophages and viral virulence in swine. *J Virol*. 74:1275-1285.

- Liu MA. 2003. DNA vaccines: a review. *J Intern Med.* 253:402-410.
- Liu Q, Ma B, Qian N, Zhang F, Tan X, Lei J, Xiang Y. 2019. Structure of the African swine fever virus major capsid protein. *Cell Res.* 29:953-955.
- Malogolovkin A, Burmakina G, Tulman ER, Delhon G, Diel DG, Salnikov N, Kutish GF, Kolbasov D, Rock DL. 2015. African swine fever virus CD2v and C-type lectin gene loci mediate serological specificity. *J Gen Virol.* 96:866-873.
- Martins CL, Leitao AC. 1994. Porcine immune responses to African swine fever virus (ASFV) infection. *Vet Immunol Immunopathol.* 43: 99-106.
- Martins CL, Scholl T, Mebus CA, Fisch H, Lawman MJ. 1987. Modulation of porcine peripheral blood-derived macrophage functions by in vitro infection with African swine fever virus (ASFV) isolates of different virulence. *Viral Immunol.* 1:177-190.
- Monteagudo PL, Lacasta A, Lopez E, Bosch L, Collado J, Pina-Pedrero S, Correa-Fiz F, Accensi F, Navas MJ, Vidal E, Bustos MJ, Rodriguez JM, Gallei A, Nikolin V, Salas ML, Rodriguez F. 2017. BA71DeltaCD2: a New recombinant live attenuated African swine fever virus with cross-protective capabilities. *J Virol.* 91:e01058-17.
- Moore DM, Zsak L, Neilan JG, Lu Z, Rock DL. 1998. The African swine fever virus thymidine kinase gene is required for efficient replication in swine macrophages and for virulence in swine. *J Virol.* 72:10310-10315.
- Munoz-Perez C, Jurado C, Sanchez-Vizcaino JM. 2021. African swine fever vaccine: Turning a dream into reality. *Transbound Emerg Dis.* 68:2756-2668.
- Neilan JG, Lu Z, Kutish GF, Zsak L, Burrage TG, Borca MV, Carrillo C, Rock DL. 1997. A BIR motif containing gene of African swine fever virus, 4CL, is nonessential for growth in vitro and viral virulence. *Virol.* 230:252-264.
- Neilan JG, Zsak L, Lu Z, Burrage TG, Kutish GF, Rock DL. 2004. Neutralizing antibodies to African swine fever virus proteins p30, p54, and p72 are not sufficient for antibody-mediated protection. *Virol.* 319:337-342.
- O'Donnell V, Holinka LG, Gladue DP, Sanford B, Krug PW, Lu X, Arzt J, Reese B, Carrillo C, Risatti GR, Borca MV. 2015a. African swine fever virus Georgia isolate harboring deletions of MGF360 and MGF505 genes is attenuated in swine and confers protection against challenge with virulent parental virus. *J Virol.* 89:6048-6056.
- O'Donnell V, Holinka LG, Krug PW, Gladue DP, Carlson J, Sanford B, Alfano M, Kramer E, Lu Z, Arzt J, Reese B, Carrillo C, Risatti GR, Borca MV. 2015b. African Swine fever virus Georgia 2007 with a deletion of virulence-associated gene 9GL (B119L), when administered at low doses, leads to virus attenuation in swine and induces an effective protection against homologous challenge. *J Virol.* 89:8556-8566.
- O'Donnell V, Holinka LG, Sanford B, Krug PW, Carlson J, Pacheco JM, Reese B, Risatti GR, Gladue DP, Borca MV. 2016. African swine fever virus Georgia isolate harboring deletions of 9GL and MGF360/505 genes is highly attenuated in swine but does not confer protection against parental virus challenge. *Virus Res.* 221:8-14.
- Oura CAL, Denyer MS, Takamatsu H, Parkhouse RME. 2005. In vivo depletion of CD8⁺ T lymphocytes abrogates protective immunity to African swine fever virus. *J Gen Virol.* 86:2445-2450.
- Portugal R, Coelho J, Hoper D, Little NS, Smithson C, Upton C, Martins C, Leitao A, Keil GM. 2015. Related strains of African swine fever virus with different virulence: genome comparison and analysis. *J Gen Virol.* 96:408-419.
- Ramirez-Medina E, Vuono E, O'Donnell V, Holinka LG, Silva E, Rai A, Pruitt S, Carrillo C, Gladue DP, Borca MV. 2019. Differential effect of the deletion of African swine fever virus virulence-associated genes in the induction of attenuation of the highly virulent Georgia strain. *Viruses.* 11:599
- Ramirez-Medina E, Vuono EA, Rai A, Pruitt S, Silva E, Velazquez-Salinas L, Zhu J, Borca MV, Gladue DP. 2020. The C962R ORF of African swine fever strain Georgia is non-essential and not required for virulence in swine. *Viruses.* 12:60.
- Ramiro-Ibanez F, Ortega A, Brun A, Escribano JM, Alonso C. 1996. Apoptosis: a mechanism of cell killing and lymphoid organ impairment during acute African swine fever virus infection. *J Gen Virol.* 77:2209-2219.
- Reis AL, Goatley LC, Jabbar T, Sanchez-Cordon PJ, Netherton CL, Chapman DAG, Dixon LK. 2017. Deletion of the African swine fever virus gene DP148R does not reduce virus replication in culture but reduces levels of protection against challenge. *J Virol.* 91(24): e01428-17.
- Rodriguez JM, Moreno LT, Alejo A, Lacasta A, Rodriguez F, Salas ML. 2015. Genome Sequence of African Swine Fever Virus BA71, the virulent parental strain of the nonpathogenic and tissue-culture adapted BA71V. *PLoS One.* 10:e0142889.
- Ruiz-Gonzalvo F, Coll JM. 1993. Characterization of a soluble hemagglutinin induced in African swine fever virus-infected cells. *Virol.* 196:769-777.
- Ruiz-Gonzalvo F, Rodriguez F, Escribano JM. 1996. Functional and immunological properties of the baculovirus-expressed hemagglutinin of African swine fever virus. *Virol.* 218:285-289.
- Salguero FJ, Ruiz-Villamor E, Bautista MJ, Sanchez-Cordon PJ, Carrasco L, Gomez-Villamandos JC. 2002. Changes in macrophages in spleen and lymph nodes during acute African swine fever: expression of cytokines. *Vet Immunol Immunopathol.* 90:11-22.

- Salguero FJ, Sanchez-Cordon PJ, Nunez A, Fernandez de Marco M, Gomez-Villamandos JC. 2005. Proinflammatory cytokines induce lymphocyte apoptosis in acute African swine fever infection. *J Comp Pathol.* 132:289-302.
- Sanchez EG, Perez-Nunez D, Revilla Y. 2017. Mechanisms of entry and endosomal pathway of African swine fever virus. *Vaccines.* 5:42.
- Sanchez-Cordon PJ, Jabbar T, Berrezaie M, Chapman D, Reis A, Sastre P, Rueda P, Goatley L, Dixon LK. 2018. Evaluation of protection induced by immunisation of domestic pigs with deletion mutant African swine fever virus BeninDeltaMGF by different doses and routes. *Vaccine.* 36:707-715.
- Sanford B, Holinka LG, O'Donnell V, Krug PW, Carlson J, Alfano M, Carrillo C, Wu P, Lowe A, Risatti GR, Gladue DP, Borca MV. 2016. Deletion of the thymidine kinase gene induces complete attenuation of the Georgia isolate of African swine fever virus. *Virus Res.* 213:165-171.
- Schlafer DH, McVicar JW, Mebus CA. 1984. African swine fever convalescent sows: subsequent pregnancy and the effect of colostral antibody on challenge inoculation of their pigs. *Am J Vet Res.* 45:1361-1366.
- Sendow I, Ratnawati A, Dharmayanti NLPI, Saepullo M. 2020. African Swine Fever: penyakit emerging yang mengancam peternakan babi di dunia. *Wartazoa.* 30:14-24.
- Stone SS, Hess WR. 1967. Antibody response to inactivated preparations of African swine fever virus in pigs. *Am J Vet Res.* 28:475-481.
- Sunwoo SY, Perez-Nunez D, Morozov I, Sanchez EG, Gaudreault NN, Trujillo JD, Mur L, Nogal M, Madden D, Urbaniak K, Kim IJ, Ma W, Revilla Y, Richt JA. 2019. DNA-protein vaccination strategy does not protect from challenge with African swine fever virus armenia 2007 strain. *Vaccines.* 7:12.
- Zhu JJ, Ramanathan P, Bishop EA, O'Donnell V, Gladue DP, Borca MV. 2019. Mechanisms of African swine fever virus pathogenesis and immune evasion inferred from gene expression changes in infected swine macrophages. *PLoS One.* 14:e0223955.
- Zsak L, Caler E, Lu Z, Kutish GF, Neilan JG, Rock DL. 1998. A nonessential African swine fever virus gene UK is a significant virulence determinant in domestic swine. *J Virol.* 72:1028-1035.
- Zsak L, Lu Z, Burrage TG, Neilan JG, Kutish GF, Moore DM, Rock DL. 2001. African swine fever virus multigene family 360 and 530 genes are novel macrophage host range determinants. *J Virol.* 75:3066-3076.
- Zsak L, Lu Z, Kutish GF, Neilan JG, Rock DL. 1996. An African swine fever virus virulence-associated gene NL-S with similarity to the herpes simplex virus ICP34.5 gene. *J Virol.* 70:8865-8871.
- Zsak L, Onisk DV, Afonso CL, Rock DL. 1993. Virulent African swine fever virus isolates are neutralized by swine immune serum and by monoclonal antibodies recognizing a 72-kDa viral protein. *Virol.* 196:596-602.

Antibiotic Resistance of the *Campylobacter* Isolates According to Their Species in Different Samples of Broiler Chicken in Many Regions

(Resistensi Antibiotik dari Isolat *Campylobacter* Menurut Spesiesnya Pada Berbagai Sampel Ayam Pedaging di Berbagai Daerah)

Elma Hrustemović¹, F Čaklović¹, J Đedićbegović² and M Smajlović¹, K Čaklović¹ and E Članjak-Kudra¹

¹Faculty of Veterinary Medicine, University of Sarajevo, Zmaja od Bosne No. 90, Sarajevo 71 000, Bosnia and Herzegovina

²Faculty of Pharmacy, University of Sarajevo, Zmaja od Bosne No. 8, Sarajevo 71000, Bosnia and Herzegovina

Main contributor: elma_hrustemovic@hotmail.com

(Received 14th April 2022 – Revised 19th May 2022 – Accepted 6th June 2022)

ABSTRACT

Campylobacter jejuni and *C. coli* are contaminants of broiler skin, and in unauthorized numbers cause campylobacteriosis in consumers where symptoms range from gastrointestinal to life-threatening. The number of chicken bacteria and their genetic diversity depend on the growing conditions, and the presence of antibiotic resistance genes is the result of irrational use of antibiotics. The purpose of this paper is to point out the importance of reducing the contamination of *Campylobacter* spp. in broiler production as well as the importance of the rational use of antibiotics in the production of broilers with a contribution to the prevention of the spread of campylobacteriosis and antibiotic resistance. The incidence of campylobacteriosis can be prevented by the concept of *Hazard Analysis Critical Control Point* (HACCP) in broiler production and the use of probiotics as biological preservatives in broiler meat. The spread of antibiotic resistance genes can be reduced by prohibition of antibiotic use for prophylaxis and only permitted for medication.

Key words: Antibiotic resistance, chicken meat, *Campylobacter* spp., prevention

ABSTRAK

Campylobacter jejuni dan *C. coli* adalah kontaminan pada kulit ayam pedaging, dan dalam jumlah banyak yang tidak semestinya menyebabkan campylobacteriosis pada konsumen di mana gejala berkisar dari gangguan pencernaan hingga mengancam jiwa. Jumlah bakteri ayam dan keragaman genetiknya tergantung pada kondisi pertumbuhan, dan adanya gen resistensi antibiotik merupakan akibat dari penggunaan antibiotik yang tidak rasional. Tujuan dari makalah ini adalah untuk menunjukkan pentingnya mengurangi kontaminasi *Campylobacter* spp dalam produksi ayam pedaging serta pentingnya penggunaan antibiotik yang rasional dalam produksi ayam pedaging dengan kontribusi terhadap pencegahan penyebaran campylobacteriosis dan resistensi antibiotik. Kejadian campylobacteriosis dapat dicegah dengan konsep *Hazard Analysis Critical Control Point* (HACCP) dalam produksi ayam pedaging dan penggunaan probiotik sebagai pengawet biologis pada daging ayam pedaging. Penyebaran gen resistensi antibiotik dapat dikurangi dengan pelarangan antibiotik dalam ransum ayam untuk pencegahan dan hanya diijinkan untuk pengobatan.

Kata kunci: Resistensi antibiotik, daging ayam, *Campylobacter* spp., pencegahan

INTRODUCTION

Thermophilic *Campylobacter* spp. (*C. jejuni*, *C. coli*) are microaerophilic, gram-negative bacteria, and zoonotic potential that cause campylobacteriosis. The most common causes of the disease are: *C. jejuni* (95%) and *C. coli* (2-5%) (Wieczorek & Osek 2013). Campylobacteriosis is a seasonal zoonosis, and bacteria most often exert their harmful effects on the epithelium of the intestinal and reproductive tract (Chukwu et al. 2019). Campylobacteriosis is a leading public health problem in Europe, the United States, Australia, New Zealand, but it is also present in Africa and Asia, but

research is scarce (Hanson et al. 2018). The first measure to control the spread of *C. jejuni* and *C. coli* in the skin of broiler carcasses is laboratory detection and compliance with biosecurity measures in production to maintain microbiological/health safety of food, provide safe and quality food for consumers (Furmeg et al. 2020). Prevention includes *Good Hygienic Practice* (GHP) and *Good Manufacturing Practice* (GMP) in broiler production (Hrustemović et al. 2021b).

There is no relevant scientific evidence that humans can be carriers, while warm-blooded animals are considered reservoirs of infection, especially poultry (Sheppard & Maiden 2015). *Campylobacter*

jejuni and *Campylobacter coli* are found in the digestive tract of seemingly healthy poultry, often in a percentage of 100%, and are also found on feathers and are a source of infection for humans (Laconi et al. 2021).

Cross-contamination, mixing roasted meat with raw chicken meat is a high risk factor for getting campylobacteriosis in consumers. Food should be handled with care to prevent possible food poisoning. Contamination of raw chicken meat largely depends on the processing of the slaughter (Silva et al. 2018; Alarjani et al. 2021). The dangers are different phases of primary production (fattening, slaughter and primary processing of chicken meat), so it is important to respect sanitary standards in different phases of primary production, "from farm to table" (Crim et al. 2014).

Each country should have a strategic plan and strict biosecurity measures to prevent contamination of production facilities with thermophilic *Campylobacter* spp. which is the obligation of EU member states (Bilska & Kowalski 2014; Facciola et al. 2017; Ben Romdhane & Merle 2021).

A review of the literature indicates that *C. jejuni* and *C. coli* are significant contaminants of broiler carcass skin, and that antibiotic resistance is a global public health problem (Hrustemović et al. 2021b). When we talk about *C. jejuni* and *C. coli* as contaminants of chicken meat, it is most often a bacterium of poultry origin (Vizzini et al. 2021). Food contaminants, in addition to the danger of causing alimentary intoxications in humans, can also mediate the spread of antibiotic resistance (ABR) genes to bacteria of human origin. Antibiotic resistance in isolates of *C. jejuni* and *C. coli* is present in the highest percentages in fluoroquinolones, macrolides and tetracyclines used in human and veterinary medicine, which indicates the importance of monitoring and rational use of antibiotics (Collignon & McEwen 2019; Premaratne et al. 2017).

In order to reduce the growth of ABR, international protocols have been developed with recommendations for the choice of AB in the treatment of bacterial infections in human and veterinary medicine, and EU member states have banned the use of AB in poultry (Wernicki et al. 2017). The problem of the validity of international protocols is reflected in the possibility of changing the genetic material of bacteria that carry with them and the change of resistance. Bacteria are short-lived, grow, multiply and transmit genetic material to their offspring (Sheppard & Maiden 2015). The genetic material of bacteria is variable and can be changed depending on external influences, including the use of antibiotics. In this regard, the effectiveness of certain AB in the treatment

of bacterial infections is changing (Hrustemović et al. 2021b; Hrustemović et al. 2022).

Antibiotic resistance can be innate (natural, intrinsic) and acquired. Bacterial genetic material can mutate as a result of bacterial defense, adaptation, survival in the case of certain AB, and genes can move through the genomes of the bacterial cell and transmit resistance genes. In addition to genetically determined bacterial resistance, there are biochemical mechanisms of bacterial resistance to certain AB, namely: enzymatic inactivation and modification, changes in DNA gyrase and topoisomerase IV, target modification (change in target enzyme), changes in ribosome structure, active efflux, changes in metabolic pathway, altering the permeability of the bacterial cell membrane (Hrustemović et al. 2022).

With the uncontrolled use of AB, bacteria can change their hereditary material in order to survive and pass it on to their offspring, who become resistant to the once effective AB. A special danger is posed by microorganisms that are constantly present in the body, such as *C. jejuni* and *C. coli* in chickens, and the uncontrolled use of AB in chickens changes their hereditary material and becomes resistant to the AB used. The high risk of spreading ABR should be reduced by rational consumption of AB, with special emphasis on the limited use of AB in poultry (Premaratne et al. 2017).

This article describes the presence of antibiotic resistance in isolates of *Campylobacter* spp. from broiler chicken meat in different regions in order to indicate the importance of reducing the contamination of broilers with *Campylobacter* spp. in production as well as the importance of rational use of antibiotics in broiler production with contribution to the prevention of the spread of campylobacteriosis and antibiotic resistance.

GENERAL CHARACTERISTICS OF *CAMPYLOBACTER* SPP.

Campylobacter spp. belong to the genus *Campylobacter*. Thermophilic species are important for public health: *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*), *Campylobacter coli* (*C. coli*), *Campylobacter fetus* (*C. fetus*), *Campylobacter lari* (*C. lari*), *Campylobacter hyointestinalis* (*C. hyointestinalis*) and *Campylobacter sputorum* (*C. sputorum*) (Costa & Iraola 2019). Thermophilic species are found in the intestines of various animals. The most important reservoirs of infection are: poultry, domestic and wild animals, pets, birds, mollusks (Hansson et al. 2018; Hrustemović et al. 2021; Laconi et al. 2021). They show high sensitivity to disinfectants, acids and salts. Inactivation is achieved at -12°C, some species survive at -70°C. In general, storing chicken meat at a refrigerator

temperature of 4°C and a temperature of -20°C reduces the amount of *C. jejuni* and *C. coli* in chicken meat (Awadallah et al. 2014). They show sensitivity to high temperatures and gradual drying. The optimum temperature is 30-45.5°C (Chukwu et al. 2019). These are microaerophilic, gram-negative bacilli, seagull wing shapes or the letter S (Bronowski et al. 2014; Markey et al. 2013). They are asporogenic and motile. Most oxidases and catalases are positive, reduce nitrate to nitrite and do not break down glucose. In the differentiation of thermophilic species *C. jejuni* and *C. coli*, hydrolysis of hippurate, which is negative in *C. coli*, is performed and tested. To differentiate *C. lari*, a test is performed on nalidixic acid to which isolated *C. lari* is naturally resistant (Markey et al. 2013).

Colonies are not subject to hemolysis. They have a variable appearance depending on the *Campylobacter* species and the nutrient media used for cultivation. On Karmala agar they are flat, gray in color, moist and spill, while on Skirrow agar they are gray and brown. On modified agar with carbon-cefoperazone-deoxycholate (mCCDA) they are small and flat, gray-white in color, with a tendency to spill and are watery. *Campylobacter jejuni* form flat, gray, and water colonies, and *C. coli*, round, glossy, and white (Quinn et al. 2011; Hrustemović et al. 2021).

Bacteria possess the ability to adhere to the substrate. *Campylobacter* species characterized by mobility that has a directed movement (chemotaxis) towards various organs through the epithelium (translocation) (Lacini et al. 2021). They can invade the epithelium (invasion), form a biofilm, release endotoxins and resist immunity (Quinn et al. 2011; Bolton 2015; Kaakoush et al. 2015; Costa & Iraola 2019). Virulence is related to the strength of the released endotoxin (Markey et al. 2013).

CAMPYLOBACTERIOSIS IN ANIMALS AND HUMANS

Campylobacteriosis is a very rare animal disease. Animals are considered reservoirs of infection (Markey et al. 2013). Human-to-human transmission is also possible in immunocompromised humans (Bronowski et al. 2014). The sources of infection for humans are quite wide, because they are ubiquitous bacteria. Transmission is direct through animals and indirect through water and food (Wieczorek & Osek 2013).

Campylobacteriosis is caused pathogenic bacterial species of the genus *Campylobacter*, which in humans most often cause symptoms of acute food poisoning (Ruddell et al. 2020). Campylobacteriosis of humans belongs to the seasonal zoonoses, food poisoning diseases that most often occur in the warm season when the most favorable climatic conditions for the growth

and development of these pathogens in food (Kaakoush et al. 2015; Hrustemović et al. 2022b).

In humans, they most often cause diseases of the digestive tract, but various complications are possible in the form of hemorrhagic diarrhea, bacteremia, septicemia, reactive arthritis, Guillan-Barré syndrome with neurological consequences, autoimmune disorder of the peripheral nervous system where antibodies attack the myeloid envelope of other peripheral nerves. Septicemia is a rare complication with a possible fatal outcome (Chukwu et al. 2019). Campylobacteriosis in humans: a form of gastroenterocolitis, a septic form, subclinical, prolonged or chronic (Markey et al. 2013). The form of gastroenterocolitis most often occurs in children, as well as a septic form that can have a lethal outcome.

Complications occur if bacteria enter the bloodstream through the intestinal wall (Bintsis 2017; Chukwu et al. 2019). Young children and people with HIV, autoimmune and neoplastic diseases are very susceptible to campylobacteriosis (Kalenic et al. 2013; Bronowski et al. 2014). Subclinical is asymptomatic and can be proven only by laboratory examination. In the case of a prolonged form, complications may occur including Guillain Barre syndrome or Miller Fisher syndrome, with symptoms of partial or complete paralysis (Chukwu et al. 2019).

EPIDEMIOLOGY OF CAMPYLOBACTERIOSIS IN DIFFERENT REGIONS

Campylobacteriosis is a seasonal zoonosis that occurs in the spring-summer season (Chukwu et al. 2019). Epidemiological data indicate high prevalences of campylobacteriosis in many regions, and it is considered that the prevalences are even higher, because many countries do not have a legal obligation to monitor (Kaakoush et al. 2015; Ben Romdhane & Merle 2021).

Monitoring data suggest that the prevalence of campylobacteriosis is highest in Sweden, Denmark and the United States. Monitoring data are scarcer in Africa, Asia, and the Middle East and are not considered leading enteritis. In countries in Africa and Asia, one billion people get various intestinal infections each year (Sahin et al. 2012; Kaakoush et al. 2015; Silva et al. 2018).

In Southeast Asia, Thailand, campylobacteriosis is the leading cause of diarrhea as in European countries and the United States (Mason et al. 2017). The European Food Safety Authority (EFSA) and the European Center for Disease Prevention and Control (ECDC) report that a trend of campylobacteriosis growth has been recorded in Europe since 2005, which has not been recorded in any other alimentary epidemic

and that campylobacteriosis is the leading alimentary intoxication (Table 1) (EFSA & ECDC 2009-2021).

Many authors believe that data on the annual rate of campylobacteriosis are much higher than currently available and that control monitoring of preventive measures should be done in all regions /countries (Kaakoush et al. 2015; Ben Romdhane & Merle 2021).

Some authors believe that lower rates of campylobacteriosis in third-world countries are due to less infection reservoirs, and less exposure while others believe it is humoral immunity resulting from childhood exposure to *Campylobacter* bacteria (Ben Romdhane & Merle 2021; Hrustemović et al. 2021b). As bacteria in the genus *Campylobacter* are microaerophilic and extremely sensitive to the presence of oxygen, the methodology used for sampling, isolation, and identification may yield incorrect results (Bronowski et al. 2014; Kaakoush et al. 2015).

HUMAN IMMUNITY TO CAMPYLOBACTERIOSIS

Host immunity is based on cellular and humoral immunity, as well as non-immune defense mechanisms. Cellular immunity in the form of T lymphocyte production is important in immunocompromised patients, patients with autoimmune diseases, HIV infection, and neoplastic diseases (Costa & Iraola 2019). In campylobacteriosis, the humoral immune response is significant where IgA immunoglobulins (acute phase), IgG, IgM play an important role. Overcoming the infection leaves an insecure immunity (Markey et al. 2013; Costa & Iraola 2019; Ben Romdhane & Merle 2021). Immunity resistance is related to the lack of cytokine release. The clinical picture of the disease is related to cellular and humoral immunity. Cellular immunity refers to the release of T-lymphocytes, the so-called "Killer cell",

and humoral immunity to the production of antibodies, immunoglobulin IgA, IgG and IgM. The non-immune response depends on the composition of the intestinal flora. Bacteria of the genus *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* play a significant role in alleviating the clinical picture, because they release bactericidal, fungicidal and viricidal substances (Zhang et al. 2017). Probiotics reduce the complications of campylobacteriosis in the form of celiac disease, Crohn's disease, ulcerative colitis, etc. (Lebwohl et al. 2015).

BENEFITS OF PROBIOTICS AND THEIR INHIBITORY EFFECT ON PATHOGENS

Food enriched with probiotic cultures of the genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* contribute to health: As an example, *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*) is a well-known species for the fermentation of dairy products (Fijan 2014). *Lactobacillus* convert sugars into lactic acid and serve in the preparation of fermented products (Hrustemović et al. 2021b). *Lactobacillus* has the ability to synthesize bacteriocins that damage pathogens (da Silva Sabo et al. 2014). The effect is still being investigated, and nisin is used (Cotter et al. 2013). *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*) can inhibit the growth of *Campylobacter* spp. from food (Messaoudi et al. 2012; Wang et al. 2014). *Lactobacillus plantarum* is considered one of the most important species of the genus *Lactobacillus* (da Silva Sabo et al. 2014).

Bacteriocin enzymes, which are produced by probiotic bacteria, can also be used in food preservation as biological preservatives in the so-called "New food", which excludes the use of harmful, chemical compounds nitrite and nitrate, which are required for food to be pathogens free (da Silva Sabo et al. 2014).

Table 1. Campylobacteriosis in Europe

Europe / year	Frequency of campylobacteriosis from 2005 to 2019 in Europe		
	Growth (%)	No of cases	Source
Europe / 2005	6-7	195 426	EFSA & ECDC (2009)
Europe / 2007	2-3	200 507	EFSA & ECDC (2009)
Europe / 2010	5-6	212 064	EFSA & ECDC (2012)
Europe / 2011	3-4	220 209	EFSA & ECDC (2013)
Europe / 2014	7-8	236 851	EFSA & ECDC (2015)
Europe / 2016	3-4	246 307	EFSA & ECDC (2017)
Europe / 2018	0-1	246 571	EFSA & ECDC (2019)
The number of reported campylobacteriosis decreases, probably due to the COVID-19 pandemic, Europe / 2021	recorded a decline since 2019	120 946	EFSA & ECDC (2021)

Bacteriocins are used today as biological food preservatives, and canning of dairy products is also recommended (Perez et al. 2014). Probiotics are increasingly being used in addition to antibiotics as part of therapy to reduce the side effects in the form of diarrhea and stomach cramps. Recently, they are also used as biological preservatives. Such food preservatives are not harmful, are good for the microflora of the consumer and help strengthen the immune system (da Silva Sabo et al. 2014).

It is known that meat is susceptible to spoilage and meat quality is related to microbiological and biochemical quality. There is a trend of "New food" on the market and consumers want the meat to be with as few chemical additives as possible (Ibrahim et al. 2021). Reduced salt content, reduction of chemical preservatives, use of vacuum, is known as a "Mild technology" whose disadvantages are the increase of bacteria in various meat products (Verma et al. 2022). For this reason, the use of probiotics and metabolites in meat as competitive antagonists of pathogenic bacteria and natural preservatives is being studied. Probiotics are in use, which has been tested for many years, as well as their products such as nisin (Juturu & Wu 2018; Verma et al. 2022).

The use of probiotics should not change the taste of meat (da Silva Sabo et al. 2014). Probiotics reduce the growth of food pathogens with their metabolites, but this inhibition must last for some time for the probiotic to be a good biological preservative, to have good metabolic activity, and to survive at low temperatures (Ghanbari et al. 2013). Bacteria of the genus *Lactobacillus* spp. have those abilities. Their metabolic products with which they competitively inhibit the growth of pathogenic bacteria are bacteriocins, organic acids (lactic acid), diacetyl, hydrogen peroxide, and carbon dioxide (Hwanhlem & Aran 2015). Bacteriocins are synthesized peptides and act by signaling cells (Chikindas et al. 2018). They have an inhibitory effect on bacteria in the immediate vicinity. Organic acids lower the pH value and thus reduce the population of pathogens. Fat-soluble, have the ability to enter the cell of pathogenic bacteria and reduce pH, and also affect bacterial metabolism. Hydrogen peroxide causes permeability of the pathogen membrane. Carbon dioxide creates an anaerobic environment and causes the permeability of lipid membranes. Diacetyl acts on the protein responsible for binding arginine and bacteria (Neal-McKinney et al. 2012).

SANITATION AS A HYGIENIC MEASURE IN CHICKEN MEAT PRODUCTION

One of the measures to reduce *C. jejuni* and *C. coli* in the primary production of broiler chicken meat

is the application of hygienic and sanitary standards in primary production (Hrustemović et al. 2021). The effect of probiotics in chicken meat as a natural preservative on reducing contamination with *C. jejuni* and *C. coli* is also being investigated (Wang et al. 2014).

In order to reduce the occurrence of campylobacteriosis, the following are important: hygienic food handling, avoidance of contamination, storage of food in refrigerators, chlorination of water, *Hazard Analysis Critical Control Point* system (HACCP), *Good Hygienic Practice* (GHP), *Good Manufacturing Practice* (GMP) (Bilska & Kowalski 2014; Facciola et al. 2017; Hrustemović et al. 2021b).

Subsequent contamination of meat most often occurs in primary production, so it is important to respect hygienic and sanitary standards at different stages of primary production (fattening, slaughter, primary processing) (Crim et al. 2014). The application of *Hazard Analysis Critical Control Point* (HACCP), *Longitudinal Integrated Safety Assurance* (LISA), *Quality, Safety, Acceptability* (QSA) and *Specific Pathogen Free* (SPF) systems for the purpose of "Safe food" production is very important. The most commonly used disinfectants in primary production are halogens, phenols, cationic surfactants, cresols, and aldehydes (Hrustemović et al. 2021b).

Chlorine is the best bactericide, and it is also a fungicide and viricide. It is used for sanitation in the form of chlorinated lime, calcium hypochlorite, and as a gas for water disinfection. Stabilized liquid chloride has no negative characteristics, toxicity, and corrosivity (Hadžiabdić et al. 2013).

Phenols are bactericides, fungicides, and viricides, but they are not sporocides. They are toxic, corrosive, strong-smelling, and environmentally unacceptable. Cationic surfactants work best on gram-positive bacteria. They also act on fungi and viruses. They are non-toxic, corrosive, and odorless (Hrustemović et al. 2021b).

Cresols are bactericides, fungicides and viricides. The disadvantage is corrosivity and reduced action in organic matter. Formaldehyde is a bactericides, fungicides and kills viruses, but it is toxic, corrosive, and strongly odorous (Quinn et al. 2011; Hrustemović et al. 2021b).

PROBLEMS OF ANTIBIOTIC RESISTANCE *CAMPYLOBACTER JEJUNI* AND *CAMPYLOBACTER COLI*

In Bosnia and Herzegovina, various types of antibiotics (AB) are still used in the production of broiler chicken meat in prophylaxis, therapy, and for the purpose of increasing production. Prophylactically, it is usually sought to reduce the number of pathogenic

bacteria in chicken intestines in order to reduce meat contamination with intestinal bacteria, including *C. jejuni* and *C. coli*, which are potential causes of campylobacteriosis in humans, during slaughter, spreading, and processing of chicken carcasses (Hrustemović et al. 2021b; Vizzini et al. 2021). This method of reducing contaminants in chicken meat is not recommended because it increases the risk of antibiotic resistance (ABR), and there is another problem of residues in meat that can harm consumers (Hrustemović et al. 2022).

The use of large quantities of AB in the production of broiler chicken meat in European Union (EU) member states has long been recognized as bad therefore, this prophylactic method was rejected and the ban on the use of AB in chicken production is regulated by law. Given that Bosnia & Herzegovina (B&H) desires to join the EU, we should expect harmonization of legal preconditions in B&H with the laws of EU member states, which would greatly contribute to reducing the spread of antibiotic resistance. Monitoring the spread of ABR of food contaminating bacteria is very important in order to identify the problem and act in a timely manner to rationalize the use of antibiotics (Ben Romdhane & Merle 2021; Hrustemović et al. 2022).

The trend of spreading antibiotic resistance to bacteria requires all countries of the world to rationalize the consumption of AB in order to maintain their effectiveness. Continuous monitoring is recommended as a control measure of measures taken to spread ABR (Ma et al. 2021).

In all countries of the world, there is a growing trend of multidrug resistance (MDR), especially those bacteria that are pluripotent, ie. antibiotic resistance to one antibiotic entails antibiotic resistance to other antibiotics of the same class. The probable reason for this phenomenon is the same mechanism of action of antibiotics from the same class because the acquired mechanism of ABR is precisely related to the mechanism of action of antibiotics (Hrustemović et al. 2021a).

Problems with antibiotic resistance of thermophilic *C. jejuni* and *C. coli* is that these bacteria if they have an ABR biochemical mechanism (containing antibiotic resistance genes), are often active efflux. Active efflux is defense mechanism used by bacteria to protect themselves against various antibiotics and disinfectants (Tang et al. 2017). This is the only mechanism of bacterial resistance that is not related to the mechanism of action of antibiotics, and bacteria can expel the antibiotic with energy, regardless of the antibiotic class or type, or mechanism of action. Antibiotic resistance genes in the bacterial world can be transmitted from parents to offspring (vertically) and via plasmids between all nearby bacteria that are

competent (horizontally) (Sheppard & Maiden 2015; Ma et al. 2021; Hrustemović et al. 2021a).

A review of the literature in many countries revealed antibiotic resistance of isolates of *C. jejuni* and *C. coli*. *Campylobacter* species are constant contaminants of chicken skin, so it is important to wash your hands after manipulation, because in addition to possible campylobacteriosis, these bacterial species can transmit antibiotic resistance genes to bacteria from humans (Hansson et al. 2018; Hrustemović et al. 2022).

Based on monitoring data on antibiotic resistance of *C. jejuni* and *C. coli*, it is noticeable that ABR has been reported in many antibiotic classes, with a significant increase in ABR to fluoroquinolones (ciprofloxacin, marbofloxacin, enrofloxacin) and quinolones (nalidixic acid) (Mason et al. 2017; Silva et al. 2018). In veterinary medicine, fluoroquinolones are very often used in the treatment of various bacterial infections. They are important antibiotics for veterinary medicine *Veterinary Critically Important Antimicrobial Agents* - VCIA (Tang et al. 2017; OIE 2019). The increase in resistance to these antibiotics is not surprising, because they are empirically widely prescribed in human and veterinary medicine. They are most often prescribed empirically in the treatment of urinary tract infections due to their good effect on enterobacteria, which are common causes of infections in this region (Markey et al. 2013).

Cephalothin has also been linked to high rates of antibiotic resistance in *C. jejuni* and *C. coli* isolates (Giacomelli et al. 2014). It is a type of antibiotic that belongs to the class of β lactam antibiotics. It is an antibiotic of the first generation of cephalosporins (β lactams) that was discovered a long time ago and has been used for a long time in both human and veterinary medicine, so it is no wonder that many bacteria that were naturally sensitive to this type of antibiotic are now resistant. Resistance genes are spread to offspring and other bacteria, including those of different phylogenetic affiliations. Otherwise, irrational, frequent use of β -lactam antibiotics leads to acquired antibiotic resistance and bacteria defend themselves against antibiotics through a biochemical mechanism known as enzymatic modification and bacteria have the ability to secrete β -lactamase enzymes and less frequently amidase (Poirel et al. 2018; Hrustemović et al. 2021a).

Antibiotic resistance to cephalothin is not surprising, but the great danger to public health is the spread of antibiotic resistance to more recent β -lactam antibiotics such as cephalosporins III (cefotaxime) or the spread of antibiotic resistance to newer β -lactam antibiotics, reserve carbapenems. Generation III cephalosporins are more recent antibiotics with a broad spectrum of action and have been left to be used in the treatment of severe bacterial infections such as sepsis, various respiratory bacterial diseases, complicated

urinary tract infections, mastitis, etc. (Markey et al. 2013; OIE 2019). Otherwise, these antibiotics should be used only in emergencies, because in addition to spreading bacterial resistance to antibiotics, they also strengthen very dangerous anaerobic bacteria such as *Clostridium difficile* (Frieri et al. 2017).

The spread of antibiotic resistance of *C. jejuni* and *C. coli* isolates to tetracyclines is on the lesser rise, therefore, tetracyclines should never be the first drug of choice in the treatment of less dangerous bacterial infections due to their very broad spectrum of action (Pérez-Boto et al. 2014; Nemeth, Oesch & Kuster 2015; Shobo et al. 2016).

An increase in antibiotic resistance of *C. jejuni* and *C. coli* isolates to macrolides (erythromycin, azithromycin) has been reported worldwide (Shobo et al. 2016). There is also an increase in *C. jejuni* and *C. coli* multidrug resistance to fluoroquinolones, macrolides and tetracyclines used to treat campylobacteriosis (Mason et al. 2017; Premaratne et al. 2017).

Since 2013, antibiotic resistance has been presented as a global public health problem. Monitoring is an important control measure, but the spread can be reduced by rational use of antibiotics. When a bacterium acquires antibiotic resistance genes, it takes ten years for susceptibility to return (Schrijver et al. 2018).

RISKS AND PREVENTION OF CAMPYLOBACTERIOSIS AND ANTIBIOTIC RESISTANCE

Risk and prevention of campylobacteriosis

The food that is most often associated with reported epidemics of campylobacteriosis is chicken meat, unpasteurized eggs, unpasteurized dairy products, etc. (Silva et al. 2011; Tang et al. 2017; Silva et al. 2018). Poultry and domestic cattle are considered to be the most important reservoirs of infection (Sheppard & Maiden 2015; Ruddell et al. 2020).

It is primarily transmitted through contaminated water and food or by direct contact with animals that transmit the infection (Bronowski et al. 2014; Tang et al. 2017). Secondary transmission refers to subsequently contaminated food with animal feces (Markey et al. 2013). Subsequent contamination of meat most often occurs in primary production, so it is important to respect hygienic and sanitary standards at different stages of primary production (fattening, slaughter, primary processing) (Crim et al. 2014; Hansson et al. 2018).

Culture, microscopic, and biochemical assays are used to identify *C. jejuni* and *C. coli* (Markey et al. 2013). The *Enzyme-linked immunosorbent assay*

(ELISA), *Randomly amplified polymorphic DNA* (RAPD) and repetitive sequence-based PCR (rep-PCR) are used for epidemiological purposes (Azizian et al. 2018).

In order to reduce the outbreak of campylobacteriosis epidemics, hand hygiene, hygienic food handling, heat treatment of food, pasteurization of milk, dairy products, and fruit juices, avoidance of cross-contamination, refrigeration, fruit and vegetable peeling, water chlorination, water chlorination, various sanitary standards are important. stages of primary production, HACCP system (GHP & GMP) (Bilska & Kowalski 2014; Facciola et al. 2017).

The sanitation procedure reduces the number of pathogenic microorganisms. Sanitation is a process that involves mechanical cleaning and disinfection of the space (Hrustemović et al. 2021b). Proper sanitation contributes to the evaluation of the veterinary health system, which represents protection against financial risk, health protection, and safety (Hrustemović et al. 2021a). A study in Germany, Bechstein et al. (2019) state that the use of disinfectant, without the application of hydrostatic pressure, has no significant effect on reducing contamination with *C. jejuni*, while a study in Mississippi, Nair et al. (2014) state that the use of lauric arginate reduces contamination without application of hydrostatic pressure. In a study in Arkansas (USA), Wagle et al. (2017), report a positive effect of the application of the disinfectant phytophenolic compound β -resorcil acid on the decrease in contamination of raw skins, chicken meat with *C. jejuni*, after cultivation.

A review of the current resistance study of *Campylobacter* spp. on antibiotics and disinfectants, in some cases variations were observed and in some not. It is evident that resistance to antibiotics and disinfectants is present in *Campylobacter* spp. (Hrustemović et al. 2021b). Microorganisms are the slowest to acquire resistance to disinfectants (Cantas et al. 2013; Pidot et al. 2018). If resistance occurs, it is usually acquired by biochemical mechanisms of resistance, such as: efflux pump or alteration of cell membrane permeability. If biochemical mechanisms of resistance to disinfectants are developed, cross-resistance to antibiotics is most common (Quinn et al. 2011). Since microorganisms are also able to acquire resistance to disinfectants, it is necessary to find a new means of providing an aseptic environment in the future (Högberg & Heddini & Cars). Recently, the effectiveness of natural, biocidal agents such as pine oil has been tested. Microorganisms have not yet shown resistance to natural, biocidal agents (Quinn et al. 2011).

Campylobacteriosis therapy can be suppurative, immunomodulatory, and antibiotic. The most commonly used antibiotics are macrolides and

fluoroquinolones, aminoglycosides, tetracyclines, and reserve carbapenems can also be used (Quinn et al. 2011; Premarathne et al. 2017).

Wrong choice of antibiotics, wrong dose, irrational use of antibiotics, prescribing for viral diseases, prophylaxis in delaying surgical work, etc., can contribute to the creation of antibiotic resistance. Good clinical practice, and correct use of antibiotics, achieve a therapeutic effect while reducing side effects (Hrustemović et al. 2021a).

Risk and prevention of antibiotic resistance

Antibiotic resistance is widespread in the world, and reducing the use of antibiotics is the only solution to this public health problem. Scientists are looking for solutions and finding adequate substitutes for antibiotics. Alternative therapies include the use of probiotic bacteria of the genus *Lactobacillus* (Saint-Cyr et al. 2016). Probiotics are increasingly being researched as a good solution in reducing pathogens in various types of food, ie their products bacteriocins that can be used as biological preservatives in food (Soltani et al. 2021). *Lactobacillus* probiotics that reduce *C. jejuni* and *C. coli* in chicken intestines can be used in the primary production of broiler chicken meat, which contributes to the prevention of campylobacteriosis in consumers (Neal-McKinney et al. 2012; Hrustemović et al. 2022b).

Antibiotic resistance of bacteria is a global public health problem that can arise spontaneously by mutation, be transmitted vertically from parents to offspring or by horizontal transfer to all bacteria in the immediate vicinity (Giedraitiene 2011). Bacteria can also acquire different biochemical mechanisms of resistance, which are related to the mechanisms of action of the used biocidal agent to which certain bacteria have acquired resistance (Markey et al. 2013).

In *Campylobacter jejuni* and *C. coli* the most common mechanism of antibiotic resistance is active efflux (Ma et al. 2021; Moradi & Baserisalehi 2022). In order to prove the antibiotic resistance of the tested bacteria, various detection methods are used, of which the disk diffusion method is routinely used the most, and molecular methods, and gene sequencing methods are also used (Markey et al. 2013).

ANTIBIOTIC RESISTANCE OF CAMPYLOBACTER ISOLATES ACCORDING TO THEIR SPECIES IN DIFFERENT SAMPLES IN MANY REGION

By monitoring the prevalence of antibiotic resistance of *C. jejuni* and *C. coli*, certain variations in the study results were observed. The high percentage of antibiotic resistance is evident in fluoroquinolones,

macrolides, and tetracyclines (Table 2) (Mason et al. 2017; Yamada et al. 2019). Monitoring has also confirmed that poultry is the most common carrier of campylobacteriosis in humans. Campylobacteriosis is the leading toxin infection in Europe, the United States, Australia, and New Zealand (Hanson et al. 2018).

In a study in Bosnia and Herzegovina related to the percentage of *C. jejuni* and *C. coli* in chicken meat, Alagić et al. (2016) state that most isolates were identified as *C. jejuni* (91.9%) and a smaller number as *C. coli* (8.1%). Samples were taken from the bodies of chickens on slaughter lines, with the assumption of intestinal contamination during slaughter, and the presence of contaminants in unauthorized numbers suggests poor production processes. Contamination with *C. jejuni* and *C. coli* was recorded on chicken carcasses in the percentage of 27.4% (23/84), on chicken breasts (19.0%), in the visceral cavity (15.5%) and in chicken liver (9.5%).

In a study of the presence of *Campylobacter* spp. on the skin of broiler carcasses in northern Croatia, Furmeg et al. (2021) report more dramatic results, stating that out of a total of 60 tested samples, as many as 28 (46.67%) had a result above the limit value (>1000 CFU/g) according to Regulation (EU) 2017/1495, emphasizing the importance of implementing biosecurity measures in slaughterhouses as and monitoring the prevalence of *C. jejuni* and *C. coli* to ensure food safety.

In a study of the percentage of *Campylobacter* spp. in chicken meat in Indonesia (Lampung, Jakarta and Central Java), Syarifah et al. (2020) report that out of a total of 105 examined samples, as many as 65 (61.9%) had positive results. Most of the positive results are from Lampung and Jakarta with a prevalence of 80%, and from Central Java 30%.

Based on alarming data on the incidence of campylobacteriosis in humans in Barbados, isolation of *Campylobacter* spp. from faecal samples in 596 animals and 311 food samples of animal origin. The highest percentages of isolated *Campylobacter* spp. were recorded in chickens (94.2%), pigs (90.5%), dogs (46.9%), cats (37.3%) and wild birds (39.3%). In chickens, the most common species is *C. jejuni* (79.8%), in pigs *C. coli* (98.4%), and in cats *C. upsaliensis* and *C. helveticus*. Researchers state that people are most often infected by consuming contaminated chicken meat, but also that pets are significant reservoirs of infection (Mughini et al. 2013).

Table 2. Antibiotic resistance of *Campylobacter* isolates from different samples in many regions

Regions/country/year	Prevalence of antibiotic resistance of <i>Campylobacter</i> spp. isolates from broiler chicken samples			
	Sample	Antibiotic classes	ABR (%)	Source
Southwest Asia/Iran/2018	Broiler	Tetracyclines	<i>Campylobacter</i> spp: 70.6 %	Azizian et al. (2018)
Southwest Asia/Iran/2018	Broiler	Fluoroquinolones	<i>Campylobacter</i> spp: 63.7 %	Azizian et al. (2018)
Southwest Asia/Iran/2018	Broiler	Penicillins	<i>Campylobacter</i> spp: 27.5 %	Azizian et al. (2018)
Europe/Central Italy/2017	Broiler cloaca	Fluoroquinolones	<i>C. jejuni</i> : 39 %; <i>C. coli</i> : 70 %	Pergola et al. (2017)
Europe/Central Italy/2017	Broiler cloaca	Tetracyclines	<i>C. jejuni</i> : 10 %; <i>C. coli</i> : 70 %	Pergola et al. (2017)
Europe/Central Italy/2017	Broiler cloaca	Macrolides	<i>C. jejuni</i> : 100 %; <i>C. coli</i> : 30 %	Pergola et al. (2017)
South Africa /2016	Health center	Fluoroquinolones	<i>C. jejuni</i> : 20.4 %; <i>C. coli</i> : 33.3 %	Shobo et al. (2016)
South Africa /2016	Health center	Macrolides: erythromycin	<i>C. jejuni</i> : 31.5 %; <i>C. coli</i> : 38.9 %	Shobo et al. (2016)
South Africa /2016	Health center	Macrolides: azithromycin	<i>C. jejuni</i> : 50 %; <i>C. coli</i> : 77.8 %	Shobo et al. (2016)
Southeast Asia/Thailand/2017	Production chains	Fluoroquinolones: enrofloxacin	<i>C. jejuni</i> : 100 %; <i>C. coli</i> : 98.9 %	Thomrongsuwannakij et al. (2017)
Southeast Asia/Thailand/2017	Production chains	Tetracyclines: tetracycline	<i>C. jejuni</i> : 55.6 %; <i>C. coli</i> : 97.9 %	Thomrongsuwannakij et al. (2017)
Southeast Asia/Thailand/2017	Production chains	Tetracyclines: doxycycline	<i>C. jejuni</i> : 50 %; <i>C. coli</i> : 79 %	Thomrongsuwannakij et al. (2017)
Southeast Asia/Thailand/2017	Production chains	Sulfonamides: trimethoprim-s.	<i>C. jejuni</i> : 36.1 %; <i>C. coli</i> : 81.9 %	Thomrongsuwannakij et al. (2017)
South Asia/India/2018	Skin of broiler	Cephalosporins: cephalothin	<i>C. jejuni</i> : 81.1 %	Khan et al. (2018)
South Asia/India/2018	carcasses,	Tetracyclines	<i>C. jejuni</i> : 59.4 %	Khan et al. (2018)
South Asia/India/2018	intestines,			
South Asia/India/2018	cutting boards.			
Europe/Turkey/2009	Slaughterhouses	Tetracyclines	<i>C. jejuni</i> : 76.3 %	Cokal et al. (2009)
Europe/Turkey/2009	Slaughterhouses	Fluoroquinolones: ciproflox.	<i>C. jejuni</i> : 74.2%; <i>C. coli</i> : 65.5%	Cokal et al. (2009)
Southeastern region of the	Chicken liver	Fluoroquinolones: ciproflox.	<i>C. jejuni</i> : 33%	Yeh et al. (2022)
United States of	Chicken liver	Tetracyclines	<i>C. jejuni</i> : 14%	Yeh et al. (2022)
America/Georgia/2022				

Bartkowiak-Higgo et al. (2006) in a pilot study in South Africa, reported the percentage of *C. jejuni* and *C. coli* in broilers, citing positive skin and liver results of broilers contaminated with *C. jejuni* and *C. coli* (24%) as well as intestinal contamination (28 %), which indicates an increased risk of consumer disease in Africa, where trials are rare and scarce epidemiological data do not classify campylobacteriosis as the leading enteritis.

In a study of the percentage and distribution of antibiotic resistance of *Campylobacter* spp. from chickens in Iran, Azizian et al. (2018) report that 55% of chickens were contaminated with *Campylobacter* spp., of which 67 isolates were typified by the molecular polymerase chain reaction (rep-PCR) method of which 57 (85.1%) were identified as *C. jejuni* and 10 (14.9%) as *C. coli*. Significant genetic differences were observed in *C. jejuni* isolates. Antibiotic resistance of *C. jejuni* and *C. coli* isolates was performed using the disk diffusion method and the highest percentages were recorded for tetracyclines (70.6%), fluoroquinolones (63.7%), penicillins (27.5%). By monitoring the prevalence of antibiotic resistance of *C. jejuni* and *C. coli* isolates, the highest percentages of fluoroquinolone resistance were observed (Mason et al. 2017; Yamada et al. 2019).

In a study of the percentage of antibiotic resistance in isolates of *C. jejuni* and *C. coli* obtained from broiler cloaca from a farm in central Italy, Pergola et al. (2017) report an increasing prevalence of antibiotic resistance to fluoroquinolones, macrolides, and tetracyclines. In the corresponding number of samples (n = 116) the highest percentage of isolates was identified as *C. jejuni* (n = 99) and a slightly smaller number as *C. coli* (n = 41) which are common statistical differences. *Campylobacter jejuni* isolates showed the highest percentages of resistance to fluoroquinolones (39%), slightly less to tetracyclines (10%), and all other isolates of *C. jejuni* were resistant to macrolides. *Campylobacter coli* isolates showed the highest percentages of resistance to fluoroquinolones (70%), tetracyclines (70%) and slightly less to macrolides (30%).

Shobo et al. (2016) in the study of the prevalence and distribution of antibiotic resistance of *Campylobacter* spp. from a private health center in South Africa, using a molecular PCR method, identified 72 isolates of *Campylobacter* spp. of which 54 (75%) were identified as *C. jejuni* and *C. coli* 18 (25%). Isolates of *C. jejuni* and *C. coli* in the highest percentages showed resistance to fluoroquinolones: ciprofloxacin, in *C. jejuni* 11 (20.4%) and *C. coli* 6 (33.3%). Isolates of *C. jejuni* also showed resistance to macrolides: erythromycin 17 (31.5%) and azithromycin 36 (50%), and isolates of *C. coli* to erythromycin 7 (38.9%) and azithromycin 14 (77.8%). High

percentages of resistance are also evident for tetracyclines in isolates of *C. jejuni* 14 (25.9%) and isolates of *C. coli* 10 (55.6%). Recent research on the presence of South African isolates of *C. jejuni* and *C. coli* resistant to fluoroquinolones, macrolides and tetracyclines, raises concerns among scientists who call for the importance of the rational use of antibiotics.

Thomrongsuwannakij et al. (2017) in a study in Thailand, report the percentage of antibiotic resistance in isolates of *C. jejuni* and *C. coli* from broiler production, following two production chains, where the presence of most multidrug-resistant isolates (*C. jejuni*: 100%; *C. coli*: 98.9%). The highest antibiotic resistance was again recorded on fluoroquinolones: enrofloxacin which is exclusively a veterinary antibiotic, then on tetracyclines: tetracycline, sulfo preparations: trimethoprim-sulfamethoxazole and tetracyclines: doxycycline (*C. jejuni*: 100%, 55.6%, 36.1%, 50%; *C. coli*: 98.9%, 97.9%, 81.9%, 79%).

Research in India, Khan et al. (2018) report that the highest percentages of *C. jejuni* contamination were recorded on broiler carcass skin (38.6%) and intestines (24%), and the lowest on cutting boards and knives (14.0%). Antibiotic resistance was found in (97%) isolates of *C. jejuni*, and the highest percentages were recorded for cephalosporins: cephalothin (81.1%) and tetracyclines (59.4%). Lower percentages of antibiotic resistance are evident in first generation quinolones: nalidixic acid, cephalosporins: ciprofloxacin, macrolides: erythromycin, azithromycin and aminoglycosides: gentamicin (6.9-8.9%), which differs to a lesser extent from previous studies.

A review of the literature concludes that *C. jejuni* and *C. coli* are significant contaminants of broiler carcass skin, and that antibiotic resistance is a global public health problem (Hrustemović et al. 2021b). Antibiotic resistance in isolates of *C. jejuni* and *C. coli* is present in the highest percentages in fluoroquinolones, macrolides and tetracyclines used in human and veterinary medicine, which indicates the importance of monitoring and rational use of antibiotics (Collignon & McEwen 2019; Premaratne et al. 2017). Campylobacteriosis is a leading public health problem in Europe, the United States, Australia, New Zealand, but it is also present in Africa and Asia, but research is scarce (Baker et al. 2020; Collignon & McEwen 2019; Hanson et al. 2018). The first measure to control the spread of campylobacteriosis from broiler chicken meat to humans is laboratory detection of *C. jejuni* and *C. coli* and compliance with biosecurity measures in production to maintain microbiological/health safety of food, provide safe and quality food for consumers (Furmeg et al. 2020). Prevention includes GHP and GMP in the production of broiler chicken meat (Hrustemović et al. 2021b). The spread of antibiotic resistance of *C. jejuni* and *C.*

coli isolates through chicken meat can be mitigated by cessation of antibiotic use in prophylaxis as prescribed by European Union legislation, which is not the case in Bosnia and Herzegovina (Hrustemović et al. 2021b). Other options should be considered in improving the health safety of broiler chicken meat, which exclude the prophylactic use of antibiotics in broiler chickens. As a new prophylactic measure in maintaining the microbiological/health safety of broiler chicken meat, the use of *Lactobacillus* probiotics as biological preservatives is offered (Soltani et al. 2021).

CONCLUSIONS

Campylobacteriosis is the leading alimentary intoxication in Europe and the United States, and antibiotic resistance is a global public health problem. Prevention of campylobacteriosis includes sanitation in primary production, avoidance of cross-contamination, and use of probiotic bacteria as biological preservatives in food. The spread of antibiotic resistance to *C. jejuni* and *C. coli* from chicken meat is possible with the cessation of antibiotic use in prophylaxis in broilers.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was made possible and thanks to the grant of the Ministry of Science, Higher Education and Youth of the Canton Sarajevo in 2022 and a grant for doctoral students from the Federal Ministry of Education and Science in 2021.

REFERENCES

- Awadallah MAI, Ahmed HA, El-Gedawy AA, Saad AM. 2014. Molecular identification of *C. jejuni* and *C. coli* in chicken and humans, at Zagazig, Egypt, with reference to the survival of *C. jejuni* in chicken meat at refrigeration and freezing temperatures. *Int Food Res J*. 21:1801.
- Alagić D, Smajlović A, Smajlović M, Maksimović Z, Članjak E, Čaklović K, Tanković S, Veljović E, Ljevaković-Musladin I, Rifatbegović M. 2016. Učestalost onečišćenja mesa brojlera s bakterijama roda *Campylobacter*. *MESO*. 18:335-341.
- Azizian K, Hasani A, Shahsavandi S, Ahangarzadeh Rezaee M, Hasani A, Hosseinpour R, Alizadeh H. 2018. *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in cecum contents of chickens of slaughter age: A microbiological surveillance. *Trop Biomed*. 35:423-433.
- Alarjani KM, Elkhadragey MF, Al-Masoud AH, Yehia HM. 2021. Detection of *Campylobacter jejuni* and *Salmonella typhimurium* in chicken using PCR for virulence factor *hipO* and *invA* genes (Saudi Arabia). *Biosci Rep*. 41:BSR20211790.
- Bartkowiak-Higgo AJ, Veary CM, Venter EH, Bosman AM. 2006. A pilot study on post-evisceration contamination of broiler carcasses and ready-to-sell livers and intestines (mala) with *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in a high-throughput South African poultry abattoir. *J S Afr Vet Assoc*. 77:114-119.
- Bilska A, Kowalski R. 2014. Food quality and safety management. *LogForum*. 10:351-361.
- Bronowski C, James CE, Winstanley C. 2014. Role of environmental survival in transmission of *Campylobacter jejuni*. *FEMS Microbiol Lett*. 356:8-19.
- Bolton DJ. 2015. *Campylobacter* virulence and survival factors. *Food Microbiol*. 48:99-108.
- Bintsis T. 2017. Foodborne pathogens. *AIMS Microbiol*. 3:529-563.
- Bechstein DV, Popp J, Sudhaus-Joern N, Krischek C. 2019. Effect of ethyl-lauroyl-arginate hypochloride in combination with high hydrostatic pressure processing on the microbial load and physico-chemical characteristics of minced and portioned chicken breast meat. *Poult Sci*. 98:966-976.
- Baker MG, Grout L, Wilson N. 2020. Update on the *campylobacter* epidemic from chicken meat in New Zealand: The urgent need for an upgraded regulatory response. *Epidemiol Infect*. 149:e30.
- Ben Romdhane R, Merle R. 2021. The Data Behind Risk Analysis of *Campylobacter Jejuni* and *Campylobacter Coli* Infections. *Curr Top Microbiol Immunol*. 431:25-58.
- Cokal Y, Caner V, Sen A, Cetin C, Karagenc N. 2009. *Campylobacter* spp. and their antimicrobial resistance patterns in poultry: an epidemiological survey study in Turkey. *Zoonoses Public Health*. 56:105-110.
- Cotter PD, Ross RP, Hill C. 2013. Bacteriocins-a viable alternative to antibiotics? *Nat Rev Microbiol*. 11:95-105.
- Cantas L, Shah SQ, Cavaco LM, Manaia CM, Walsh F, Popowska M, Garelick H, Bürgmann H, Sørum H. 2013. A brief multi-disciplinary review on antimicrobial resistance in medicine and its linkage to the global environmental microbiota. *Front Microbiol*. 4:96.
- Crim SM, Iwamoto M, Huang JY, Griffin PM, Gilliss D, Cronquist AB, Cartter M, Tobin-D'Angelo M, Blythe D, Smith K, Lathrop S, Zansky S, Cieslak PR, Dunn J, Holt KG, Lance S, Tauxe R, Henao OL. 2014. Incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food--Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. sites, 2006-2013. *Morb Mortal Wkly Rep*. 63:328-32.
- Chikindas ML, Weeks R, Drider D, Chistyakov VA, Dicks LM. 2018. Functions and emerging applications of bacteriocins. *Curr Opin Biotechnol*. 49:23-28.
- Chukwu MO, Luther King Abia A, Ubomba-Jaswa E, Obi L, Dewar JB. 2019. Characterization and Phylogenetic Analysis of *Campylobacter* Species Isolated from Paediatric Stool and Water Samples in the Northwest

- Province, South Africa. *Int J Environ Res Public Health*. 16:2205.
- Costa D, Iraola G. 2019. Pathogenomics of Emerging *Campylobacter* Species. *Clin Microbiol Rev*. 32:e00072-18.
- Collignon PJ, McEwen SA. 2019. One Health-Its Importance in Helping to Better Control Antimicrobial Resistance. *Trop Med Infect Dis*. 4:22.
- da Silva Sabo S, Vitolo M, González JMD, Oliveira RPS. 2014. Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. *Food Res Int*. 64:527-536.
- [EFSA and ECDC] European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. 2009. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2006. *EFSA J*. 223.
- [EFSA and ECDC] European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. 2012. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *EFSA J*. 10:2597.
- [EFSA and ECDC] European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. 2013. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. *EFSA J*. 18:20449.
- [EFSA and ECDC] European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA J*. 13:4329.
- European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC). 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA J*. 13(1):3991.
- [EFSA and ECDC] European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. 2017. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA J*. 15:e05077.
- [EFSA and ECDC] European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. 2019. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2018. *EFSA J*. 17:e05926.
- [EFSA and ECDC] European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. 2021. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2019. *EFSA J*. 19.
- Fijan S. 2014. Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature. *Int J Environ Res Public Health*. 11:4745-67.
- Facciola A, Riso R, Avventuroso E, Visalli G, Delia SA, Laganà P. 2017. *Campylobacter*: from microbiology to prevention. *J Prev Med Hyg*. 58:E79-E92.
- Frieri M, Kumar K, Boutin A. 2017. Antibiotic resistance. *J Infect Public Health*. 10:369-378.
- Furmeg S, Cvetnić Ž, Bukvić M, Sokolović J, Mikulić M, Cvetnić M, Jaki Tkalec V. 2021. *Campylobacter* spp. u koži vrata pilića brojlera. *Vet stanica*. 52:265-273.
- Giedraitienė A, Vitkauskienė A, Naginienė R, Pavilonis A. 2011. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina (Kaunas)*. 47:137-146.
- Ghanbari M, Jami M, Domig KJ, Kneifel W. 2013. Seafood biopreservation by lactic acid bacteria-a review. *LWT Food Sci Technol*. 54:315-324.
- Giacomelli M, Salata C, Martini M, Montesissa C, Piccirillo A. 2014. Antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from poultry in Italy. *Microb Drug Resist*. 20:181-188.
- Högberg LD, Heddini A, Cars O. 2010. The global need for effective antibiotics: challenges and recent advances. *Trends Pharmacol Sci*. 31:509-515.
- Hadžiabdić S, Majerle M, Vrabelj D, Ratiznojnik M, Goletić T, Kustura A, Rešidbegović E, Gagić A. 2013. Djelovanje 1% -otnog rastvora stabiliziranog tečnog hlora dioksida (CIO₂) na uzročnike food-born oboljenja u *in vitro* uvjetima. *Veterinaria*. 62:157-163.
- Hwanhlem N, Aran H. 2015. Biopreservation of seafood by using bacteriocins and bacteriocinogenic lactic acid Bacteria as potential bio-control agents. In: Liong, MT, editor. *Beneficial microorganisms in agriculture, aquaculture and other areas*. Cham: New York (USA): Springer Publishing Company. p. 183-213.
- Hansson I, Sandberg M, Habib I, Lowman R, Engvall EO. 2018. Knowledge gaps in control of *Campylobacter* for prevention of campylobacteriosis. *Transbound Emerg Dis*. 65:30-48.
- Hrustemović E, Čaklović F, Đedićbegović J. 2021a. Review of *Escherichia coli* pathogens and food-borne antibiotic resistance to prevention. In: *Proceedings of III. International Agricultural, Biological & Life Science Conference Agbiol 2021*. Edirne (Turkey): Trakya University. p. 12-37. Available from: https://agbiol.org/files/46/editor/files/AGBIOL_2021_FULL_PROCEEDING_BOOK.pdf
- Hrustemović E, Čaklović F, Đedićbegović J. 2021b. Food pathogen of broiler chicken meat *Campylobacter* spp. and antibiotic resistance. In: *Proceedings of III. International Agricultural, Biological & Life Science Conference Agbiol 2021*. Edirne (Turkey): Trakya University. p. 38-77. Available from: https://agbiol.org/files/46/editor/files/AGBIOL_2021_FULL_PROCEEDING_BOOK.pdf
- Hrustemović E, Čaklović F, Đedićbegović J, Čaklović K. 2022a. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* from Animals, Food and Humans. *Wartazoa*. 32:1-14.
- Hrustemović E, Čaklović F, Đedićbegović J. 2022b. Food pathogen of chicken meat *Campylobacter* spp.: a review. *AgroLife Sci J*. 11:80-85.
- Ibrahim SA, Ayivi RD, Zimmerman T, Siddiqui SA, Altemimi AB, Fidan H, Esatbeyoglu T, Bakhshayesh RV. 2021. Lactic acid bacteria as antimicrobial agents: food safety

- and microbial food spoilage prevention. *Foods*. 10:3131.
- Jore S, Viljugrein H, Brun E, Heier BT, Borck B, Ethelberg S, Hakkinen M, Kuusi M, Reiersen J, Hansson I, Engvall EO, Løfdahl M, Wagenaar JA, van Pelt W, Hofshagen M. 2010. Trends in *Campylobacter* incidence in broilers and humans in six European countries, 1997-2007. *Prev Vet Med*. 93:33-41.
- Juturu V, Wu JC. 2018. Microbial production of bacteriocins: Latest research development and applications. *Biotechnol Adv*. 36:2187-2200.
- Kalenić S, Abram M, Batinić D, Beader N, Bedenić B, Bošnjak Z, Budimir A, Drenjančević D. 2013. Medicinska mikrobiologija. Zagreb (Croatia): Medicinska naklada. p. 97-100.
- Kaakoush NO, Castaño-Rodríguez N, Mitchell HM, Man SM. 2015. Global epidemiology of *Campylobacter* infection. *Clin Microbiol Rev*. 28:687-720.
- Khan JA, Rathore RS, Abulreesh HH, Qais FA, Ahmad I. 2018. Prevalence and antibiotic resistance profiles of *Campylobacter jejuni* isolated from poultry meat and related samples at retail shops in Northern India. *Foodborne Pathog Dis*. 15:218-225.
- Lebwohl B, Blaser MJ, Ludvigsson JF, Green PH, Rundle A, Sonnenberg A, Genta RM. 2013. Decreased risk of celiac disease in patients with *Helicobacter pylori* colonization. *Am J Epidemiol*. 178:1721-1730.
- Laconi A, Drigo I, Palmieri N, Carraro L, Tonon E, Franch R, Bano L, Piccirillo A. 2021. Genomic analysis of extra-intestinal *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from commercial chickens. *Vet Microbiol*. 259:109161.
- Marks SL, Rankin SC, Byrne BA, Weese JS. 2011. Enteropathogenic bacteria in dogs and cats: diagnosis, epidemiology, treatment, and control. *J Vet Intern Med*. 25:1195-1208.
- Messaoudi S, Kergourlay G, Dalgalarondo M, Choiset Y, Ferchichi M, Prévost H, Pilet MF, Chobert JM, Manai M, Dousset X. 2012. Purification and characterization of a new bacteriocin active against *Campylobacter* produced by *Lactobacillus salivarius* SMXD51. *Food Microbiol*. 32:129-134.
- Markey B, Leonard F, Archambault M, Cullinane A, Maguire D. 2013. Clinical veterinary microbiology. 2nd ed. Edinburgh, Mosby.
- Mughini Gras L, Smid JH, Wagenaar JA, Koene MG, Havelaar AH, Friesema IH, French NP, Flemming C, Galson JD, Graziani C, Busani L, VAN Pelt W. 2013. Increased risk for *Campylobacter jejuni* and *C. coli* infection of pet origin in dog owners and evidence for genetic association between strains causing infection in humans and their pets. *Epidemiol Infect*. 141:2526-2535.
- Mason CJ, Sornsakrin S, Seidman JC, Srijan A, Serichantalergs O, Thongsen N, Ellis MW, Ngauy V, Swierczewski BE, Bodhidatta L. 2017. Antibiotic resistance in *Campylobacter* and other diarrheal pathogens isolated from US military personnel deployed to Thailand in 2002-2004: a case-control study. *Trop Dis Travel Med Vaccines*. 3:13.
- Ma L, Konkel ME, Lu X. 2021. Antimicrobial Resistance Gene Transfer from *Campylobacter jejuni* in Mono- and Dual-Species Biofilms. *Appl Environ Microbiol*. 87:e0065921.
- Moradi P, Baserisalehi M. 2022. The Role of Efflux Pumps in the Antibiotic Resistance of *Campylobacter* spp. Isolated From Domestic Animals and Poultry. *Avicenna J Clin Microbiol Infect*. 9:21-25.
- Neal-McKinney JM, Lu X, Duong T, Larson CL, Call DR, Shah DH, Konkel ME. 2012. Production of organic acids by probiotic lactobacilli can be used to reduce pathogen load in poultry. *PLoS One*. 7:e43928.
- Nair DV, Nannapaneni R, Kiess A, Mahmoud B, Sharma CS. 2014. Antimicrobial efficacy of lauric arginate against *Campylobacter jejuni* and spoilage organisms on chicken breast fillets. *Poult Sci*. 93:2636-2640.
- Nemeth J, Oesch G, Kuster SP. 2015. Bacteriostatic versus bactericidal antibiotics for patients with serious bacterial infections: systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother*. 70:382-395.
- [OIE] World Organisation for Animal Health. 2019. OIE List Of Antimicrobial Agents Of Veterinary Importance. Paris (France): World Organisation for Animal Health.
- Pérez-Boto D, Herrera-León S, García-Peña FJ, Abad-Moreno JC, Echeita MA. 2014. Molecular mechanisms of quinolone, macrolide, and tetracycline resistance among *Campylobacter* isolates from initial stages of broiler production. *Avian Pathol*. 43:176-182.
- Perez RH, Zendo T, Sonomoto K. 2014. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microb Cell Fact*. 13:S3.
- Premarathne JMKJK, Anuar AS, Thung TY, Satharasinghe DA, Jambari NN, Abdul-Mutalib NA, Huat JTY, Basri DF, Rukayadi Y, Nakaguchi Y, Nishibuchi M, Radu S. 2017. Prevalence and antibiotic resistance against tetracycline in *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in cattle and beef meat from Selangor, Malaysia. *Front Microbiol*. 8:2254.
- Pergola S, Franciosini MP, Comitini F, Ciani M, De Luca S, Bellucci S, Menchetti L, Casagrande Proietti P. 2017. Genetic diversity and antimicrobial resistance profiles of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* isolated from broiler chicken in farms and at time of slaughter in central Italy. *J Appl Microbiol*. 122:1348-1356.
- Pidot SJ, Gao W, Buultjens AH, Monk IR, Guerillot R, Carter GP, Lee JYH, Lam MMC, Grayson ML, Ballard SA, Mahony AA, Grabsch EA, Kotsanas D, Korman TM, Coombs GW, Robinson JO, Gonçalves da Silva A, Seemann T, Howden BP, Johnson PDR, Stinear TP. 2018. Increasing tolerance of hospital *Enterococcus faecium* to handwash alcohols. *Sci Transl Med*. 10:eaar6115.
- Poirel L, Madec JY, Lupo A, Schink AK, Kieffer N, Nordmann P, Schwarz S. 2018. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr*. 6.

- Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, Hartigan P, Fanning S, Fitzpatrick ES. 2011. Veterinary microbiology and microbial disease. 2nd ed. Hohenboken (UK): Wiley-Blackwell.
- Ruddell B, Hassall A, Sahin O, Zhang Q, Plummer PJ, Kreuder AJ. 2020. Role of metAB in methionine metabolism and optimal chicken colonization in *Campylobacter jejuni*. Infect Immun. 89:e00542-20.
- Sahin O, Fitzgerald C, Stroika S, Zhao S, Sippy RJ, Kwan P, Plummer PJ, Han J, Yaeger MJ, Zhang Q. 2012. Molecular evidence for zoonotic transmission of an emergent, highly pathogenic *Campylobacter jejuni* clone in the United States. J Clin Microbiol. 50:680-687.
- Silva J, Leite D, Fernandes M, Mena C, Gibbs PA, Teixeira P. 2011. *Campylobacter* spp. as a foodborne pathogen: A review. Front Microbiol. 2:200.
- Sheppard SK, Maiden MC. 2015. The evolution of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Cold Spring Harb Perspect Biol. 7:a018119.
- Shobo CO, Bester LA, Baijnath S, Somboro AM, Peer AK, Essack SY. 2016. Antibiotic resistance profiles of *Campylobacter* species in the South Africa private health care sector. J Infect Dev Ctries. 10:1214-1221.
- Saint-Cyr MJ, Guyard-Nicodème M, Messaoudi S, Chemaly M, Cappelier JM, Dousset X, Haddad N. 2016. Recent advances in screening of anti-*campylobacter* activity in probiotics for use in poultry. Front Microbiol. 7:553.
- Silva WC, Targino BN, Mendonça RS, Sant'Ana A S, Hungaro HM. 2018. *Campylobacter*: An overview of cases, occurrence in food, contamination sources, and antimicrobial resistance in Brazil. Food Rev Int. 34:364-389.
- Schrijver R, Stijntjes M, Rodríguez-Baño J, Tacconelli E, Babu Rajendran N, Voss A. 2018. Review of antimicrobial resistance surveillance programmes in livestock and meat in EU with focus on humans. Clin Microbiol Infect. 24:577-590.
- Syarifah IK, Latif H, Basri C, Rahayu P. 2020. Identification and differentiation of *Campylobacter* isolated from chicken meat using real-time polymerase chain reaction and high resolution melting analysis of *hipO* and *glyA* genes. Vet World. 13:1875-1883.
- Soltani S, Hammami R, Cotter PD, Rebuffat S, Said LB, Gaudreau H, Bédard F, Biron E, Drider D, Fliss I. 2021. Bacteriocins as a new generation of antimicrobials: toxicity aspects and regulations. FEMS Microbiol Rev. 45:fuaa039.
- Tang Y, Fang L, Xu C, Zhang Q. 2017. Antibiotic resistance trends and mechanisms in the foodborne pathogen, *Campylobacter*. Anim Health Res Rev. 18:87-98.
- Thomrongsuwannakij T, Blackall PJ, Chansiripornchai N. 2017. A study on *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* through commercial broiler production chains in Thailand: Antimicrobial resistance, the characterization of DNA gyrase subunit a mutation, and genetic diversity by flagellin a gene restriction fragment length polymorphism. Avian Dis. 61:186-197.
- Vizzini P, Vidic J, Manzano M. 2021. Enrichment free qPCR for rapid identification and quantification of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, and *C. upsaliensis* in chicken meat samples by a new couple of primers. Foods. 10:2341.
- Verma DK, Thakur M, Singh S, Tripathy S, Gupta AK, Baranwal D, Srivastav PP. 2022. Bacteriocins as antimicrobial and preservative agents in food: Biosynthesis, separation and application. Food Biosci. 46:101594.
- Wagner J, Jabbusch M, Eisenblätter M, Hahn H, Wendt C, Ignatius R. 2003. Susceptibilities of *Campylobacter jejuni* isolates from Germany to ciprofloxacin, moxifloxacin, erythromycin, clindamycin, and tetracycline. Antimicrob Agents Chemother. 47:2358-2361.
- Wang G, Zhao Y, Tian F, Jin X, Chen H, Liu X, Zhang Q, Zhao J, Chen Y, Zhang H, Chen W. 2014. Screening of adhesive *lactobacilli* with antagonistic activity against *Campylobacter jejuni*. Elsevier B V. 44:49-57.
- Wieczorek K, Osek J. 2013. Antimicrobial resistance mechanisms among *Campylobacter*. Biomed Res Int. 57:24-100.
- Wernicki A, Nowaczek A, Urban-Chmiel R. 2017. Bacteriophage therapy to combat bacterial infections in poultry. Virol J. 14:179.
- Wagle BR, Arsi K, Upadhyay A, Shrestha S, Venkitanarayanan K, Donoghue AM, Donoghue DJ. 2017. β -Resorcylic Acid, a Phytophenolic Compound, Reduces *Campylobacter jejuni* in Postharvest Poultry. J Food Prot. 80:1243-1251.
- Yamada K, Saito R, Muto S, Sasaki M, Murakami H, Aoki K, Ishii Y, Tateda K. 2019. Long-term observation of antimicrobial susceptibility and molecular characterisation of *Campylobacter jejuni* isolated in a Japanese general hospital 2000-2017. J Glob Antimicrob Resist. 18:59-63.
- Yeh HY, Cox NA, Hinton A, Berrang ME, Plumlee Lawrence JR, Thompson TM. 2022. Prevalence and characterization of quinolone resistance in *Campylobacter* spp. isolates in chicken livers from retail stores in Georgia, USA. J Food Prot. 85:406-413.
- Zhang M, Sun K, Wu Y, Yang Y, Tso P, Wu Z. 2017. Interactions between Intestinal microbiota and host immune response in inflammatory bowel disease. Front Immunol. 8:942.

Aplikasi Marker Mikrosatelit untuk Analisis Keragaman Genetik Sapi Lokal Indonesia

(Application of Microsatellite Markers for Genetic Diversity Analysis of Indonesian Local Cattle)

Dwi Nur Happy Hariyono

Program Studi Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Khairun, Ternate 97719, Indonesia
Kontributor utama: d.nur.happy@unkhair.ac.id

(Diterima 20 April 2022 – Direvisi 19 Mei 2022 – Disetujui 8 Juni 2022)

ABSTRACT

Animal genetic resources (AnGR), including cattle, have been valuable national assets that need to be preserved and developed. There are at least 16 recognized breeds of cattle that have been registered as local and new breeds by the Ministry of Agriculture of the Republic of Indonesia. Conservation and development programs of these local cattle breeds require basic information regarding their genetic diversity, relationships, and structures. There are several types of DNA markers that can be used for genetic diversity analysis, such as microsatellite markers. Microsatellites or short tandem repeats (STRs) are a group of DNA sequences consisting of tandemly repeated units (1–6 bp), which are abundant throughout the genome and can be found in both coding and non-coding regions. The primary advantages of microsatellites are that they are inherited in a Mendelian pattern (codominant markers), high polymorphism rates, and high abundances throughout the genome. The aim of this review is to discuss the application of microsatellite markers for genetic diversity analysis in Indonesian local cattle based on 3 indices: number alleles per locus, expected heterozygosity (He), and polymorphisms information content (PIC). There are at least 28 microsatellite markers that have been studied in Indonesian local cattle, with the number of alleles per locus ranging from 2 to 32, He values ranging from 0.100 to 0.985, and PIC values from 0.095 to 0.935. Based on the PIC values, several microsatellites was classified as highly informative, e.g. BM1824, ILST6, TGLA126, TGLA53, TGLA227, TGLA122, ETH225, INRA23, SPS113, SPS115, BM1818, CSSM66, ETH10, INRA005, INRA037, ETH185, HEL017, and ILSTS029. Therefore, these microsatellite markers can be potentially used for future genetic diversity analysis of other breeds of cattle.

Key words: Genetic analysis, DNA marker, microsatellite, local cattle, conservation

ABSTRAK

Sumber daya genetik ternak (SDGT) sapi lokal merupakan aset nasional yang sangat berharga, sehingga perlu dilestarikan dan dikembangkan. Terdapat setidaknya enam belas rumpun/galur sapi lokal yang telah ditetapkan sebagai rumpun lokal dan dilepas sebagai rumpun/galur baru oleh Kementerian Pertanian Republik Indonesia. Program pelestarian dan pengembangan sapi-sapi lokal ini memerlukan informasi dasar berupa keragaman genetik, hubungan genetik, dan struktur genetik antar rumpun ternak. Terdapat beberapa jenis marker DNA yang dapat digunakan untuk menganalisis keragaman genetik, salah satunya marker mikrosatelit. Mikrosatelit atau *short tandem repeats* (STRs) merupakan sekuen DNA yang terdiri dari pengulangan satu sampai enam pasang basa (*base pairs*) nukleotida, keberadaannya melimpah sepanjang genom, dan dapat ditemukan di *coding* dan *non-coding regions*. Keunggulan mikrosatelit yaitu memiliki pola pewarisan Mendel (marker kodominan), tingkat polimorfisme tinggi, dan tersebar melimpah dalam genom. Tujuan dari review ini membahas aplikasi marker mikrosatelit untuk analisis keragaman genetik sapi lokal Indonesia berdasarkan 3 indikator: jumlah alel per lokus, *expected heterozygosity* (He), dan *polymorphisms information content* (PIC). Terdapat setidaknya 28 marker mikrosatelit yang telah diteliti pada sapi lokal Indonesia, dengan kisaran jumlah alel per lokus sebanyak 2 sampai 32, nilai He bervariasi dari 0,100 sampai 0,985, dan nilai PIC dari 0,095 sampai 0,935. Berdasarkan nilai PIC, beberapa marker dikategorikan sebagai sangat informatif, antara lain BM1824, ILST6, TGLA126, TGLA53, TGLA227, TGLA122, ETH225, INRA23, SPS113, SPS115, BM1818, CSSM66, ETH10, INRA005, INRA037, ETH185, HEL013, ILSTS017, dan ILSTS029. Marker-marker tersebut dapat dipertimbangkan untuk digunakan dalam analisis keragaman genetik rumpun ternak lainnya di masa mendatang.

Kata kunci: Analisis genetik, marker DNA, mikrosatelit, sapi lokal, konservasi

PENDAHULUAN

Kementerian Pertanian hingga saat ini telah menetapkan beberapa rumpun/galur sapi lokal di

Indonesia: sapi Bali, sapi Madura, sapi Galekan, sapi Pogasi Agrinak, sapi Aceh, sapi Pesisir, sapi Sumbawa, sapi Jabres, sapi Krui, sapi Kuantan, sapi Pasundan, sapi Donggala, sapi Peranakan Ongole (PO), sapi PO

Kebumen, sapi Sumba Ongole, dan sapi Rote (Ditjen PKH 2022). Penetapan rumpun/galur tersebut dilakukan sebagai upaya untuk melindungi, melestarikan, dan mengembangkan sumber daya genetik ternak (SDGT) lokal. Berdasarkan Peraturan Menteri Pertanian Republik Indonesia Nomor 117/Permentan/SR.120/10/2014, penetapan rumpun atau galur adalah pengakuan pemerintah terhadap rumpun atau galur yang telah ada di suatu wilayah sumber bibit yang secara turun-temurun dibudidayakan peternak dan menjadi milik masyarakat, sedangkan pelepasan rumpun atau galur adalah penghargaan negara yang dilaksanakan oleh pemerintah terhadap suatu rumpun atau galur baru hasil pemuliaan di dalam negeri atau hasil introduksi yang dapat disebarluaskan.

Semua rumpun/galur sapi lokal yang ada di Indonesia memiliki peran strategis sebagai sumber pangan asal hewan (daging), sumber perekonomian keluarga (mata pencaharian), dan berperan dalam kegiatan sosial, budaya, dan kearifan lokal. Program pengembangan sapi lokal di Indonesia telah dilakukan melalui kegiatan pemuliaan, baik dengan seleksi maupun persilangan sesuai tujuan yang hendak dicapai oleh para pemulia. Namun demikian, program pelestarian dan pengembangan sapi lokal dapat dilakukan apabila tersedia informasi-informasi dasar tentang keragaman fenotipik dan genetik. Informasi tentang keragaman genetik dapat memberikan gambaran tentang ancaman-ancaman yang terjadi pada suatu rumpun atau populasi ternak, seperti level silang dalam, sehingga manajemen pengembangan ternak lokal yang lebih efisien dapat dilaksanakan. Dengan demikian, telah jelas bahwa informasi dasar berupa keragaman genetik ternak merupakan informasi penting dan kunci keberhasilan dalam pemanfaatan dan pengembangan SDGT yang efisien.

Keragaman genetik pada ternak telah dipelajari oleh peneliti-peneliti di dunia menggunakan metode genetika kuantitatif dengan memanfaatkan aplikasi ilmu statistika. Metode ini telah memberikan manfaat yang signifikan terhadap peningkatan produktivitas ternak melalui program seleksi dan persilangan, terutama untuk sifat pertumbuhan, produksi daging, dan produksi telur. Aplikasi genetika kuantitatif saat ini seringkali dikombinasikan dengan genetika molekuler dalam praktik pemuliaan ternak. Genetika kuantitatif biasanya digunakan untuk program seleksi sifat-sifat ekonomis berdasarkan estimasi parameter genetik dan nilai *breeding value*, sedangkan genetika molekuler digunakan untuk menganalisis variasi alel atau sekuen DNA dalam genom dan pengaruhnya terhadap fenotip menggunakan suatu marker DNA. Marker DNA merupakan DNA atau gen yang diketahui lokasinya di dalam kromosom dan dapat digunakan sebagai penciri genetik individu (genotipe). Marker DNA di bidang peternakan banyak digunakan untuk mempelajari

keragaman dan hubungan filogenetik antar bangsa, deteksi penyakit, dan mengkaji variasi sekuen DNA dan asosiasinya dengan sifat-sifat ekonomis (Agung et al. 2019; Teneva et al. 2013).

Salah satu marker DNA yang dapat digunakan untuk mempelajari keragaman genetik adalah marker mikrosatelit. Marker mikrosatelit merupakan pengulangan sekuen DNA pendek yang terdiri dari satu sampai enam basa nukleotida (1-6 *base pairs*) (Leffak et al. 2017; Ho et al. 2019). Keunggulan marker mikrosatelit antara lain: tersebar melimpah sepanjang genom, tingkat polimorfisme yang tinggi, dan bersifat kodominan. Berdasarkan keunggulan ini, banyak peneliti menggunakan marker mikrosatelit untuk mempelajari keragaman genetik sapi lokal di Indonesia (Utomo et al. 2011; Merliana et al. 2014; Septian et al. 2015; Sutarno et al. 2015; Mansur et al. 2016; Agung et al. 2019; Margawati et al. 2019; Jakaria et al. 2020). Hasil-hasil penelitian tersebut dapat memberikan informasi yang komprehensif tentang keragaman genetik pada populasi sapi lokal, yang nantinya dapat digunakan sebagai dasar dalam menyusun program pelestarian, pemanfaatan, dan pengembangan SDGT. Tulisan ini dimaksudkan untuk membahas pemanfaatan marker mikrosatelit dan aplikasinya untuk mempelajari keragaman genetik sapi lokal, khususnya di Indonesia.

JENIS RUMPUN/GALUR SAPI LOKAL INDONESIA

Saat ini terdapat beberapa spesies sapi hasil domestikasi yang tersebar di seluruh dunia. Secara umum, kebanyakan sapi hasil domestikasi tersebut termasuk kedalam spesies *Bos taurus* atau *Bos indicus* (*zebu*), yang mana keduanya merupakan keturunan dari *Bos primigenius*. Selain itu, ada juga sapi hasil domestikasi yang tergolong ke dalam spesies *Bos grunniens* (tersebar di daerah sekitar Tibet) dan gayal (*Bos frontalis*) dari India Timur yang berasal dari gaur (*Bos gaurus*) (Ahrestani 2018; Mohamad et al. 2009). Sapi Bali di Indonesia merupakan hasil domestikasi dari banteng (*Bos javanicus*) (Mohamad et al. 2009).

Di Indonesia, terdapat beberapa rumpun atau galur sapi lokal yang sudah ditetapkan atau dilepas oleh Kementerian Pertanian. Masing-masing rumpun/galur sapi lokal ini memiliki karakteristik fenotipik dan atau genetik yang khas, sehingga dapat dibedakan rumpun yang satu dengan rumpun yang lainnya. Selain itu, rumpun/galur sapi lokal memiliki beberapa keunggulan, seperti ketahanan terhadap penyakit atau parasit dan kemampuan untuk tumbuh dibawah kondisi pakan ternak yang berkualitas rendah. Jenis rumpun/galur sapi lokal di Indonesia beserta penyebaran dan karakteristik fenotipik (kualitatif dan kuantitatif) dapat dilihat di Tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik rumpun atau galur sapi lokal di Indonesia

Nama sapi (rumpun/galur)	No. SK Kepmentan	Penyebaran	Karakteristik		Pustaka
			Sifat kualitatif	Sifat kuantitatif	
Krui (rumpun)	693/Kpts/PK.040/M/11/2021	Kabupaten Pesisir Barat, Provinsi Lampung	Bentuk muka segitiga ramping Bentuk tanduk melengkung ke luar (silak congklong) Warna kepala dan tubuh cokelat Memiliki gelambir Berpunuk kecil Memiliki bulu kipas hitam di ujung ekor	Sapi Krui dewasa memiliki: Bobot badan: 234,50 kg (jantan); 208,30 kg (betina) Lingkar dada: 137,00 cm (jantan); 130,30 cm (betina) Panjang badan: 133,60 cm (jantan); 127,40 cm (betina)	Hamdani et al. (2017); Ningsih et al. (2017)
Galekan (rumpun)	617/KPTS/PK.20/M/09/2020	Sepanjang pesisir selatan dan pegunungan wilayah Kabupaten Trenggalek	Memiliki warna bulu tubuh cokelat dan cokelat terang Warna moncong hitam Warna ujung ekor hitam Warna pantat smear	Sapi Galekan dewasa memiliki: Bobot badan: 310,00 kg (jantan); 224,00 kg (betina) Tinggi gumba: 115,00 cm (jantan); 110,25 cm (betina) Panjang badan: 131,50 cm (jantan); 119,75 cm (betina)	Kepmentan (2020); Kuswati et al. (2022)
Pogasi Agrinak (galur)	05/Kpts/PK.040/M/1/2020	-	Tanduk tumbuh pendek dan besar Moncong di sekitar lubang hidung berwarna hitam Punuk tumbuh sedang ke arah atas Bergelambir kecil, namun banyak Bentuk pantat tidak terlalu runcing	Sapi Pogasi Agrinak umur 2 tahun memiliki: Bobot badan: 321,00 kg (jantan); 324,90 kg (betina) Tinggi gumba: 134,30 cm (jantan); 129,20 cm (betina) Panjang badan: 128,40 cm (jantan); 128,10 cm (betina) Lingkar dada: 160,00 cm (jantan); 156,70 cm (betina)	Aryogi et al. (2020)
Rote (rumpun)	41/Kpts/PK.020/1/2017	Kabupaten Rote Ndao, Provinsi Nusa Tenggara Timur	-	-	-
PO Kebumen (galur)	358/Kpts/PK.040/6/2015	Kabupaten Kebumen, Provinsi Jawa Tengah	Memiliki warna bulu tubuh putih Moncong berwarna hitam Warna vulva merah, ada juga yang hitam	Sapi PO Kebumen betina dewasa memiliki: Tinggi gumba 133,67 cm Panjang badan 124,09 cm Lingkar dada 173,11 cm	Sudrajat & Subiharta (2014); Adinata et al. (2016)

Lanjutan Tabel 1. Karakteristik rumpun atau galur sapi lokal di Indonesia

Nama sapi (rumpun/galur)	No. SK Kepmentan	Penyebaran	Karakteristik		Pustaka
			Sifat kualitatif	Sifat kuantitatif	
Donggala (rumpun)	666/Kpts/SR.120/6/2 014	Provinsi Sulawesi Tengah	-	-	-
Kuantan (rumpun)	1052/Kpts/SR.120/10 /2014	Kabupaten Indragiri Hulu dan Kabupaten Kuantan Singingi, Provinsi Riau	Sapi Kuantan betina memiliki warna bulu dominan putih kecoklatan, bentuk tanduk melengkung ke atas, pendek, dan kecil, serta memiliki warna kaki putih Sapi Kuantan jantan memiliki warna bulu tubuh dominan putih kecoklatan, ada yang bertanduk dan tidak bertanduk, serta warna kaki putih	Sapi Kuantan jantan dewasa memiliki: Tinggi pundak : 98,84 cm Panjang badan: 88,45 cm Lingkar dada: 119,77 cm	Misrianti et al. (2018); Yendraliza et al. (2019)
Pasundan (rumpun)	1051/Kpts/SR.120/10 /2014	Provinsi Jawa Barat meliputi; Kabupaten Pangandaran, Tasikmalaya, Garut, Cianjur, Sukabumi, Ciamis, Kuningan, Majalengka, Sumedang, Indramayu dan Purwakarta	Warna bulu tubuh coklat kemerahan (merah bata) Ujung ekor hitam Tanduk hitam (ada juga yang tidak bertanduk) Moncong hitam	Sapi Pasundan umur poel 1 memiliki: Tinggi gumba :113,13 cm (jantan); 106,93 cm (betina) Panjang badan: 113,39 (jantan); 109,63 (betina) Lingkar dada: 132,33 (jantan); 130,28 (betina)	Said et al. (2017)
Sumba Ongole rumpun)	427/Kpts/SR.120/3/ 2014	Provinsi Nusa Tenggara Timur	Sapi Sumba Ongole jantan dan betina memiliki warna bulu tubuh dominan putih	Sapi Sumba Ongole grade II umur 18-24 bulan memiliki: Panjang badan: 134±2,15 cm (jantan); 118±0,88 cm (betina) Tinggi Pundak: 136±2,27 cm (jantan); 123±0,93 cm (betina) Lingkar dada: 168±2,09 cm (jantan);154±1,30 cm (betina)	Kambanau et al. (2022)

Lanjutan Tabel 1. Karakteristik rumpun atau galur sapi lokal di Indonesia

Nama sapi (rumpun/galur)	No. SK Kepmentan	Penyebaran	Karakteristik		Pustaka
			Sifat kualitatif	Sifat kuantitatif	
Jabres (rumpun)	2842/Kpts/LB.430/8/ 2012	Kabupaten Brebes, Provinsi Jawa Tengah	Sapi Jabres betina memiliki: warna tubuh melahonais, kaki depan dan belakang berwarna merah, tidak berpuncuk, tanduk besar, terdapat garis punggung dan warna putih pada pantat, dan ada spot putih pada dahi (100%)	Sapi Jabres betina dewasa memiliki rata-rata: Tinggi pundak: 111,4±4,65 cm Panjang badan : 121±7,00 cm Lingkar dada: 146,2±5,94 cm	Ramadhan et al. (2014)
Peranakan Ongole (rumpun)	2841/Kpts/LB.430/8/ 2012	Seluruh wilayah Indonesia	Sapi PO betina memiliki: Gelambir lebar Warna bulu dominan putih Profil muka segitiga lurus Bertanduk (warna hitam) Terdapat punuk Telinga agak menggantung Moncong hitam Tracak hitam	Sapi PO dewasa memiliki rata-rata: Bobot badan: 331,3 kg (jantan); 302,6 kg (betina) Panjang badan: 132,1 cm (jantan) ; 134,3 cm (betina) Tinggi gumba: 132,9 cm (jantan) ; 125,7 cm (betina) Lingkar dada: 163,3 cm (jantan) ; 157,1 cm (betina)	Hartati et al. (2009); Trifena et al. (2011)
Aceh (rumpun)	2907/Kpts/OT.140/6/ 2011	Provinsi Aceh	Warna bulu merah bata Bentuk muka cekung Tanduk tumbuh beragam, namun mayoritas tumbuh menyamping ke atas menyerupai huruf V dan ada yang tumbuh kesamping melengkung ke atas ke depan	Sapi Aceh dewasa memiliki: Bobot badan: 191,13 kg (jantan); 169,02 kg (betina) Panjang badan: 117,35 cm (jantan); 112,89 cm (betina) Lingkar dada: 141,00 cm (jantan); 132,63 cm (betina) Tinggi gumba: 105,90 cm (jantan); 100,28 cm (betina)	Mukhtar et al. (2015); Widi et al. (2016); Masduqi et al. (2021)
Pesisir (rumpun)	2908/Kpts/OT.140/6/ 2011	Provinsi Sumatera Barat	Secara umum, sapi Pesisir memiliki: -Warna tubuh didominasi merah dengan variasi warna mulai dari kekuning-kuningan sampai kehitaman - Bulu mata berwarna pirang - Warna coklat kehitaman pada bagian punggungnya - Warna keputihan pada bagian kakinya - Bulu ekor berwarna hitam - Telinga mengarah ke samping	-	Putri et al. (2019)

Lanjutan Tabel 1. Karakteristik rumpun atau galur sapi lokal di Indonesia

Nama sapi (rumpun/galur)	No. SK Kepmentan	Penyebaran	Karakteristik		Pustaka
			Sifat kualitatif	Sifat kuantitatif	
Sumbawa (rumpun)	2909/Kpts/OT.140/6/ 2011	Pulau Sumbawa, Provinsi Nusa Tenggara Barat	-	-	-
Bali (rumpun)	325/Kpts/OT.140/1/ 2010	Hampir ke seluruh wilayah Indonesia	- Bertanduk/tidak bertanduk - Memiliki warna kelopak mata hitam - Warna bulu merah bata (betina) dan berubah menjadi kehitaman seiring bertambahnya umur (jantan) - Warna moncong putih - Warna putih di kaki bagian bawah (seperti kaos kaki) - Warna pantat putih	Ciri sapi Bali umur 3 tahun : Bobot badan: 210,10 kg (jantan) ; 207,89 kg (betina) Tinggi pundak: 113,79 (jantan); 117,82 (betina) Lingkar dada: 155,22 (jantan); 160,16 (betina) Panjang badan: 115,56 (jantan); 119,75 (betina)	Hikmawaty et al. (2014); Zulkharnaim et al. (2020)
Madura (rumpun)	3735/Kpts/HK040/11 /2010	Provinsi Jawa Timur, khususnya Pulau Madura	- Bulu tubuh berwarna merah bata (jantan) dan kuning kecoklatan (betina) - Kaki berwarna putih dengan batas yang tidak jelas - Ujung ekor berwarna hitam - Pantat berwarna putih dengan batas yang tidak jelas - Jantan berpunuk - Memiliki tanduk kecil mengarah ke arah luar	Ciri sapi Madura betina umur 2 tahun : - Bobot badan 191,70 kg - Lingkar dada 133,60 cm - Panjang badan 124,00 cm - Tinggi gumba 115,70 cm	Nurgiartiningsih et al. (2016); Maylinda et al. (2021)

Sumber : 1) Ditjen PKH (2022)

Keterangan :

1. Kepmentan: Keputusan Menteri Pertanian;
2. Rumpun adalah segolongan hewan dari suatu spesies yang mempunyai ciri fenotipe yang khas dan dapat diwariskan pada keturunannya (Permentan Nomor 117/Permentan/SR.120/10/2014);
3. Galur adalah sekelompok individu hewan dalam satu rumpun yang mempunyai karakteristik tertentu yang dimanfaatkan untuk tujuan pemuliaan atau perkembangbiakkan (Permentan Nomor 117/Permentan/SR.120 /10/2014) Secara umum, sapi-sapi lokal di Indonesia merupakan hasil persilangan antara Bos zebu dan sapi Bali (*Bos sondaicus*) (Mohamad et al. 2009; Nijman et al. 2003). Rumpun/galur sapi lokal hasil persilangan tersebut termasuk sapi Madura di Pulau Madura dan sekitarnya, sapi Jabres di Kabupaten Brebes, sapi Rancah di Kabupaten Ciamis, sapi Rambon di Kabupaten Bondowoso, dan sapi Galekan di Kabupaten Trenggalek (Sutarno et al. 2015). Berdasarkan analisis amplified fragment length polymorphism (AFLP) dan satellite fragment length polymorphisms (SFLP), sapi Madura memiliki DNA mitokondria dari zebu dan banteng, dan analisis mikrosatelit menunjukkan bahwa sapi Bali memiliki alel spesifik yang juga terdeteksi pada banteng (Nijman et al. 2003).

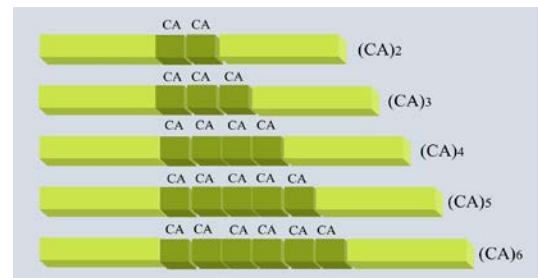
Hasil analisis filogenetik menggunakan marker gen mitokondria sitokrom *b* menunjukkan bahwa sapi Pasundan memiliki hubungan genetik yang dekat dengan sapi Pacitan. Keduanya merupakan keturunan dari *Bos javanicus* dan *Bos indicus* (Hartatik et al. 2019). Berdasarkan analisis DNA mitokondria, *Y-chromosomal*, dan mikrosatelit menunjukkan bahwa sapi Aceh, sapi Pesisir, dan sapi PO memiliki hubungan genetik yang dekat dengan bangsa sapi Zebu dan sapi Bali. Hal ini menunjukkan bahwa *Bos zebu* dan sapi Bali merupakan tetua dari ketiga rumpun sapi lokal tersebut. Hasil analisis DNA mitokondria menunjukkan bahwa sapi Madura dan sapi Galekan memiliki DNA mitokondria dari banteng dan lebih dekat hubungan genetiknya dengan sapi Bali, serta lebih jauh dari Zebu India (Mohamad et al. 2009). Beberapa populasi sapi lokal Indonesia, seperti sapi Donggala, sapi Madura, sapi Sragen, sapi Galekan, dan sapi Rambon memiliki *maternal lineage* dari *Bos javanicus* berdasarkan analisis mtDNA *cyt b* (Prihandini et al. 2020). Berdasarkan analisis mikrosatelit, sapi-sapi lokal di Indonesia diklasifikasikan menjadi tiga klaster, yaitu klaster *Bos taurus* (sapi Simmental Indonesia), *Bos indicus* (sapi Sumba Ongole, sapi Peranakan Ongole, sapi Madura, sapi Pasundan, dan sapi Pesisir), dan *Bos javanicus* (Banteng dan sapi Bali) (Agung et al. 2019).

MARKER MIKROSATELIT

Definisi dan keunggulan

Mikrosatelit atau *short tandem repeats* (STRs) merupakan sekuen DNA yang terdiri dari pengulangan satu sampai enam pasang basa (*base pairs*) nukleotida, keberadaannya melimpah sepanjang genom, dan dapat ditemukan di *coding* dan *non-coding regions* (Leffak et al. 2017; Ho et al. 2019). Sebagai contoh, sekuen basa nukleotida CA (*dinucleotide repeated sequences*) diulang sebanyak dua, tiga, empat, lima, dan enam kali (Gambar 1). Pengulangan sekuen di-, tri- dan tetra nukleotida merupakan motif sekuen basa yang paling sering digunakan dalam studi genetika molekuler (Wang et al. 2021). Motif sekuen basa tersebut biasanya memiliki pengulangan 5 sampai 20 kali dalam genom dengan panjang minimal 12 bp, namun jumlah pengulangan juga dapat bervariasi dalam DNA genom populasi (Al-Samarai & Al-Kazaz 2015; Prajapati et al. 2017). Laju mutasi dari marker mikrosatelit berkisar antara 10^{-2} dan 10^{-4} per generasi (Miah et al. 2013). Laju mutasi mikrosatelit dipengaruhi oleh pola stabilisasi mikrosatelit dan relatif lebih tinggi lajunya di daerah yang mendekati *heterozygous sites*. Stabilitas mikrosatelit dipengaruhi oleh panjang bentangan *tandem repeats*. Semakin panjang bentangan *tandem*

repeats, semakin besar pula kemungkinan adanya penyejajaran kembali konfirmasi yang tidak selaras selama replikasi, sehingga menghasilkan tingkat mutasi yang lebih tinggi (Anmarkrud et al. 2008).



Gambar 1. Contoh motif pengulangan basa nukleotida CA (*dinucleotide repeated sequences*) pada marker mikrosatelit (Al-Samarai and Al-Kazaz 2015).

Mikrosatelit memiliki beberapa keunggulan, antara lain memiliki pola pewarisan Mendel (marker kodominan), tidak mengkode protein, dan tersebar melimpah dalam genom (tingkat polimorfisme yang tinggi) (Miah et al. 2013; Al-Samarai & Al-Kazaz 2015). Berdasarkan keunggulan-keunggulan ini, marker mikrosatelit menjadi salah satu marker genetik paling populer untuk deteksi keragaman genetik, terutama untuk program pemuliaan ternak (Singh et al. 2014). Namun demikian, ada beberapa faktor yang harus dipertimbangkan dalam penggunaan marker mikrosatelit, termasuk biaya analisis yang mahal, kerumitan analisis sampel dan data di laboratorium, pengembangan primer spesifik, munculnya *stutter bands*, adanya *null alleles*, dan homoplasi (Abdul-Muneer 2014; Miah et al. 2013). Penggunaan mikrosatelit untuk populasi yang besar juga membutuhkan tenaga dan waktu yang lebih, karena mikrosatelit-mikrosatelit yang akan digunakan untuk analisis genetik perlu dilakukan *screening* dan pengelompokan berdasarkan pewarna/*fluorescent* (Miah et al. 2013).

Marker mikrosatelit sering diaplikasikan untuk studi keragaman genetik, hubungan filogenetik, struktur genetik populasi, dan analisis *quantitative trait loci* (QTLs) (Abebe et al. 2015; Azimu et al. 2018; De Carvalho et al. 2020; Habimana et al. 2020; Hariyono et al. 2019; Zhang et al. 2021). Marker mikrosatelit juga telah diaplikasikan untuk studi keragaman genetik sapi lokal di Indonesia (Utomo et al. 2011; Merliana et al. 2014; Septian et al. 2015; Sutarno et al. 2015; Mansur et al. 2016; Agung et al. 2019; Margawati et al. 2019; Jakaria et al. 2020). Hasil-hasil penelitian tersebut dapat memberikan informasi berupa estimasi variasi genetik yang ada dalam dan antar rumpun atau populasi ternak, yang mana informasi tersebut dapat digunakan sebagai dasar penyusunan program

pelestarian dan pengembangan ternak oleh para pemulia, peneliti, dan pengambil kebijakan.

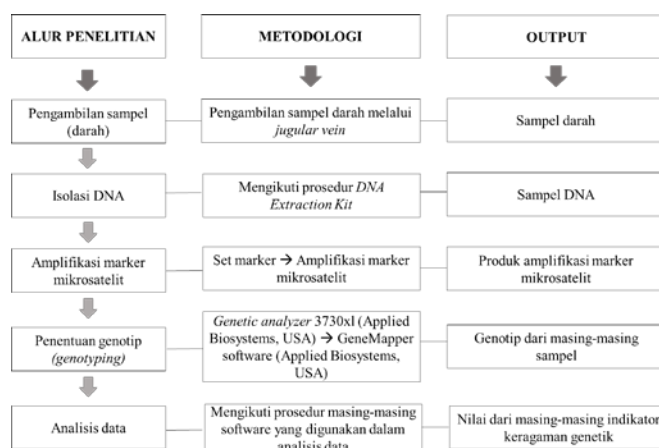
Tahapan analisis mikrosatelit untuk keragaman genetik

Secara umum, alur penelitian marker mikrosatelit untuk mempelajari keragaman genetik ternak terdiri dari pengambilan sampel (darah) dengan output berupa sampel darah, isolasi DNA dengan output berupa sampel DNA, amplifikasi marker mikrosatelit dengan output berupa produk amplifikasi marker mikrosatelit, penentuan genotipe (*genotyping*) dengan output berupa genotipe dari masing-masing sampel, dan analisis data dengan output berupa nilai dari masing-masing indikator keragaman genetik (Gambar 2). Prosedur ini juga dapat digunakan untuk analisis mikrosatelit pada spesies ternak yang lain, seperti kambing, domba, ayam, kuda, dan lainnya, dengan modifikasi sesuai masing-masing jenis spesies dan kebutuhan analisis di laboratorium.

1. Pengambilan sampel (darah): Pengambilan sampel darah dapat dilakukan oleh teknisi menggunakan *venoject* melalui *jugular vein* dan ditampung ke dalam tabung *vacutainer* yang mengandung antikoagulan. Sampel darah sebaiknya disimpan ke dalam *ice box* selama pengambilan sampel di lapangan, dan disimpan pada suhu -20°C hingga sampel tersebut digunakan untuk ekstraksi DNA. Sampel untuk ekstraksi DNA dapat juga diperoleh dari sumber lainnya: semen, kulit, tulang, dan jaringan.
2. Isolasi DNA: Isolasi DNA merupakan tahapan yang penting, karena kualitas DNA menentukan kualitas output pada tahapan analisis selanjutnya. Isolasi DNA dapat dilakukan menggunakan teknik konvensional dan *kit*. Saat ini banyak *DNA extraction kit* untuk isolasi DNA, seperti *DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen, Hilden, Germany), *gSYNCTM DNA Extraction Kit* (Geneaid Biotech Ltd., Sijhih, Taiwan), dan lain-lain. Sampel DNA

lalu disimpan pada suhu -20°C sebelum digunakan dalam tahapan PCR, dicek kualitas dan kuantitasnya menggunakan elektroforesis pada 1% gel agarose dan spektrofotometer pada NanoDrop 2000C (thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

3. Amplifikasi marker mikrosatelit: Pemilihan marker mikrosatelit untuk analisis genetik merupakan faktor penting yang harus diperhatikan dalam tahapan amplifikasi. *Food and Agriculture Organization* (FAO) telah merekomendasikan 30 marker mikrosatelit yang tersebar di beberapa kromosom untuk karakterisasi genetik ternak sapi. Tiga puluh marker mikrosatelit tersebut dikelompokkan menjadi 8 *multiplex group* berdasarkan pewarnaan *fluorescent* (*fluorescent-labeled primers*). Pewarnaan tersebut terdiri dari HEX, FAM, dan TET (FAO 2011). Namun demikian, penggunaan jumlah marker mikrosatelit perlu diperhatikan karena berkaitan dengan dana penelitian, kerumitan analisis di laboratorium, waktu analisis, dan jumlah sampel. Amplifikasi marker mikrosatelit meliputi tahap pre-denaturasi, denaturasi, *annealing*, *extension*, dan *final extension*. Output dari tahap 3 ini adalah produk amplifikasi marker mikrosatelit.
4. Penentuan genotipe (*genotyping*): Penentuan genotipe dapat dilakukan menggunakan mesin Genetic Analyzer 3730xl (Applied Biosystems, USA). Data hasil *genotyping* dari mesin tersebut, lalu dibaca pada software GeneMapper ver. 4.1. (Applied Biosystems, USA). Output yang dihasilkan dari tahapan ini adalah data genotipe.
5. Analisis data: Data genotipe dari tahap 4 dapat disimpan dalam bentuk format text document. Data genotipe juga dapat dicopy ke dalam jenis file dokumen yang lain dan diformat sesuai dengan ketentuan format input data pada masing-masing software yang akan digunakan untuk analisis genetik.



Gambar 2. Skema alur penelitian keragaman genetik sapi menggunakan mikrosatelit.

Aplikasi mikrosatelit untuk keragaman genetik sapi lokal Indonesia

Beberapa peneliti telah menggunakan marker mikrosatelit untuk menganalisis keragaman dan hubungan genetik sapi-sapi lokal di Indonesia. Terdapat setidaknya 28 marker mikrosatelit yang telah diuji tingkat keragamannya di sapi lokal Indonesia (Tabel 2). Indikator-indikator yang umum digunakan untuk menggambarkan keragaman genetik berdasarkan marker mikrosatelit adalah jumlah alel per lokus,

expected heterozygosity (He), dan *polymorphism information content* (PIC). Jumlah alel per lokus adalah jumlah alel yang terdeteksi pada suatu lokus mikrosatelit, He adalah proporsi genotipe heterosigot di suatu populasi dalam kondisi *Hardy-Weinberg equilibrium* (HWE), dan PIC adalah kemampuan suatu marker untuk mendeteksi polimorfisme, atau dengan kata lain tingkat *informativeness* suatu marker dalam membedakan individu-individu di dalam dan antar populasi.

Tabel 2. Hasil penelitian keragaman genetik sapi lokal menggunakan mikrosatelit

Rumpun sapi	Jumlah marker	Nama marker	Jumlah alel per lokus	He	PIC	Pustaka
Bali, Madura, PO Kebumen	4	INRA035	8	-	0,586	Jakaria et al. (2020)
		ILSTS006	12	-	0,793	
		ETH225	12	-	0,804	
		HEL9	14	-	0,767	
Peranakan Ongole, Bali, Pesisir, Sumba Ongole, Madura, Banteng, dan Pasundan	12	BM1824	23	0,862	0,847	Agung et al. (2019)
		ILST6	25	0,881	0,869	
		TGLA126	23	0,934	0,928	
		TGLA53	32	0,893	0,885	
		TGLA227	32	0,917	0,909	
		TGLA122	30	0,927	0,920	
		ETH225	31	0,940	0,935	
		INRA23	24	0,911	0,903	
		SPS113	27	0,921	0,914	
		SPS115	19	0,825	0,810	
		BM1818	14	0,793	0,768	
		CSSM66	26	0,727	0,715	
Bali	1	ETH10	5	0,600	0,533	Margawati et al. (2019)
Bali	2	HEL9	2	-	-	Mansur et al. (2016)
		INRA035	3	-	-	
Madura, Bali, PO, dan Aceh	5	TGLA227	4	0,480	0,480	Sutarno et al. (2015)
		ETH225	5	0,550	0,550	
		BM1824	4	0,410	0,410	
		INRA005	3	0,600	0,600	
Bali	4	MM12	5	0,720	0,710	Septian et al. (2015)
		SPS115	10	0,779	0,744	
		MM12	2	0,100	0,095	
		INRA037	14	0,884	0,867	
Bali	1	ETH185	6	0,653	0,613	Merliana et al. (2014)
		BM1329	4	0,478	0,435	
Katingan	10	ILSTS045	18	0,478	-	Utomo et al. (2011)
		HEL013	12	0,985	-	
		ILSTS017	10	0,985	-	
		ILSTS089	14	0,393	-	
		ILSTS029	16	0,677	-	
		ILSTS061	14	0,235	-	
		CSSM066	9	0,154	-	
		BM1818	13	0,232	-	
		ILSTS036	16	0,297	-	
		ILSTS026	14	0,485	-	

Keterangan: He: *expected heterozygosity*; PIC: *polymorphism information content*

Jumlah alel per lokus yang sama dengan nol (0) menunjukkan bahwa tidak ada polimorfisme pada lokus mikrosatelit yang diteliti, sedangkan semakin tinggi jumlah alel per lokus menunjukkan semakin tinggi jumlah varian alel yang dapat dideteksi dalam suatu lokus mikrosatelit. Agung et al. (2019) menguji 12 lokus mikrosatelit pada sembilan populasi sapi dan satu populasi banteng di Indonesia. Semua lokus mikrosatelit yang diuji memiliki jumlah alel per lokus yang tinggi, berkisar antara 14 (BM1818) sampai 32 (TGLA53 dan TGLA227) alel per lokus. Utomo et al. (2011) mendeteksi 9 (CSSM066) sampai 18 (ILST045) alel per lokus pada populasi sapi Katingan, sedangkan Sutarno et al. (2015) hanya mendeteksi 3 (INRA005) sampai 5 (ETH225 dan MM12) alel per lokus pada populasi sapi Madura, sapi Bali, sapi PO, dan sapi Aceh. Terdapat beberapa lokus mikrosatelit yang memiliki jumlah alel per lokus tidak lebih dari 3, yaitu lokus INRA005 (Sutarno et al. 2015), MM12 (Septian et al. 2015), HEL9 dan INRA035 (Mansur et al. 2016). Suatu marker mikrosatelit dapat dikategorikan informatif jika setidaknya memiliki empat alel per lokus (Wimmers et al. 2000). Oleh karena itu, marker-marker yang memiliki jumlah alel per lokus lebih dari empat (Tabel 1) sangat direkomendasikan untuk digunakan dalam analisis keragaman, hubungan, dan struktur genetik populasi. Secara umum, jumlah alel per lokus dari berbagai marker mikrosatelit yang digunakan pada sapi lokal Indonesia berkisar dari 2 (HEL9 dan MM12) sampai 32 (TGLA53 dan TGLA227); 33,33% marker mempunyai jumlah alel per lokus <10 ; dan 66,67% marker dengan jumlah alel per lokus >10 , sehingga membuka peluang untuk eksplorasi marker mikrosatelit lain diuji cobakan pada sapi lokal Indonesia.

He merupakan salah satu indikator keragaman genetik yang umum diteliti. Nilai He merupakan probabilitas (*expected*; yang diharapkan) pada suatu individu untuk bergenotipe heterozigot pada lokus tertentu. Tidak ada klasifikasi nilai He, namun He memiliki kisaran nilai antara 0 (rendah) sampai 1 (tinggi). Klasifikasi keragaman genetik: rendah, sedang, dan tinggi berdasarkan nilai He hanya bersifat relatif, tergantung apakah mendekati nol (0) atau mendekati satu (1). Nilai He sama dengan 1 artinya semua individu dalam suatu populasi berpeluang 100% untuk memiliki genotipe heterozigot pada lokus tertentu dengan asumsi bahwa individu-individu tersebut berada dalam populasi yang memenuhi keseimbangan *Hardy-Weinberg* (*Hardy-Weinberg equilibrium*).

Secara umum, nilai He dari lokus mikrosatelit yang pernah diteliti pada populasi sapi lokal Indonesia berkisar antara 0,100 (MM12) sampai 0,935 (ETH225). Hanya terdapat beberapa lokus yang memiliki nilai He $\leq 0,250$, yaitu lokus ILST061, CSSM066, dan

BM1818 di populasi sapi Katingan (Utomo et al. 2011) dan MM12 di populasi sapi Bali (Septian et al. 2015). Lokus dengan nilai He yang mendekati nol (0) menunjukkan bahwa keragaman genetik sapi lokal Indonesia pada lokus-lokus tersebut rendah. Keragaman genetik yang rendah salah satunya dapat dipengaruhi oleh silang dalam. Nilai He dapat berkurang sebesar 50% dalam 15 generasi akibat adanya silang dalam (*inbreeding*) (Norris et al. 2001). Populasi dengan jumlah individu yang terbatas dapat meningkatkan kejadian silang dalam, sehingga dapat menurunkan kemampuan suatu populasi untuk bertahan hidup dan menurunkan keberhasilan reproduksi sebagai akibat dari depresi silang dalam.

Terdapat temuan menarik dari marker mikrosatelit pada sapi lokal Indonesia. Misalnya: lokus CSSM066 pada sapi Katingan memiliki jumlah alel sebanyak 9 buah, namun nilai He pada lokus tersebut relatif rendah ($He = 0,154$). Hasil ini diduga bahwa 9 alel yang terdeteksi di lokus CSSM066 pada sapi Katingan sebagian besar muncul dalam bentuk homosigot dan sebagian kecil dalam bentuk heterosigot, sehingga nilai He relatif rendah walaupun jumlah alel yang terdeteksi relatif banyak. Nilai He yang relatif rendah menunjukkan bahwa lokus CSSM066 pada sapi Katingan memiliki keragaman genetik yang relatif rendah. Beberapa faktor penyebab rendahnya keragaman genetik yaitu: jumlah populasi yang terbatas, silang dalam, dan *positive assortive mating*. Salah satu cara untuk meningkatkan keragaman genetik yaitu penerapan *negative assortive mating*. *Negative assortive mating* dapat meningkatkan jumlah individu yang bergenotipe heterosigot dalam suatu populasi karena pasangan perkawinan (individu yang terlibat dalam perkawinan) dipilih berdasarkan fenotipe/genotipe yang berbeda. Selain itu, introduksi ternak dari populasi lain dari jenis rumpun sapi yang sama ke dalam populasi yang diteliti dapat dilakukan guna meningkatkan keragaman genetik.

Indikator lain yang umum diteliti dalam analisis mikrosatelit adalah PIC. PIC merupakan kemampuan suatu marker untuk mendeteksi polimorfisme, dan merupakan faktor penting dalam memilih marker DNA. Jika suatu marker DNA tidak mampu mendeteksi polimorfisme atau perbedaan genetik antar individu, maka kegunaan marker tersebut tidak efektif. Oleh karena itu, pemilihan marker mikrosatelit yang informatif berdasarkan indikator nilai PIC sangat penting guna mengurangi biaya analisis dan meningkatkan akurasi hasil (Serrote et al. 2020). Terdapat klasifikasi nilai PIC, yaitu sangat informatif ($PIC > 0,50$), cukup informatif ($0,50 > PIC > 0,25$), dan kurang informatif ($PIC < 0,25$) (Botstein et al. 1980). Berdasarkan klasifikasi tersebut, marker mikrosatelit yang pernah dideteksi pada populasi lokal di Indonesia memiliki nilai PIC yang beragam. Lokus MM12

memiliki nilai PIC sebesar 0,710 (sangat informatif) di populasi sapi Madura, sapi Bali, sapi PO, dan sapi Aceh (Sutarno et al. 2015), namun nilai PIC pada lokus tersebut hanya 0,095 (kurang informatif) di populasi sapi Bali (Septian et al. 2015). Hal ini menunjukkan bahwa tingkat *informativeness* dari suatu marker mikrosatelit tergantung pada populasi yang diteliti. Lokus MM12 di populasi sapi Bali yang diteliti oleh Septian et al. (2015) tidak direkomendasikan untuk digunakan dalam menyimpulkan hubungan dan struktur genetik populasi yang diteliti, namun demikian lokus ini sangat direkomendasikan untuk digunakan dalam menyimpulkan hubungan genetik dan struktur genetik antar populasi sapi Madura, sapi Bali, sapi PO, dan sapi Aceh yang diteliti oleh Sutarno et al. (2015). Oleh karena itu, marker-marker dengan nilai PIC > 0,50 sangat direkomendasikan untuk digunakan dalam analisis keragaman, hubungan, dan struktur genetik antar populasi sapi lokal di Indonesia di masa mendatang.

Marker mikrosatelit juga banyak digunakan untuk studi keragaman genetik populasi sapi di luar negeri, termasuk populasi sapi di Mesir (sapi Baladi dan sapi Menufi; lokus ETH10, ETH225, BM1818, BM1824, BM2113, SPS115, TGLA53 dan TGLA126), sapi di Eropa (sapi Tagil, sapi Red Gorbato, dan sapi Ukrainian Grey; lokus ILST006, SPS115, BM1824, TGLA122, ETH3, ETH225, BM2113, TGLA126, CSSM66, TGLA53, INRA023, CSRM60, ETH10, dan TGLA227), sapi di Rusia (sapi Black Pied; lokus BM1818, BM1824, BM2113, ETH3, ETH10, ETH225, TGLA122, TGLA126, TGLA227, INRA023, dan SPS115), dan sapi di Spanyol (sapi Pirenaica; 30 lokus sesuai rekomendasi FAO) (Aitnazarov et al. 2022; Faid-Allah et al. 2018; Gamarra et al. 2020; Svishcheva et al. 2020). Hasil-hasil penelitian menunjukkan bahwa penggunaan marker mikrosatelit bermanfaat dalam memberikan informasi tentang level silang dalam, status keragaman genetik, level *heterozygote deficiency/excess*, serta struktur dan perbedaan genetik antar populasi.

Keragaman genetik merupakan faktor penting dalam keberlangsungan hidup suatu rumpun ternak. Semakin tinggi keragaman genetik, semakin besar pula peluang suatu rumpun untuk dapat bertahan hidup, terutama saat perubahan iklim yang tidak menentu di masa mendatang. Selain perubahan iklim, tuntutan produk peternakan yang tidak menentu di masa mendatang menuntut suatu rumpun ternak untuk memiliki keragaman genetik (variasi alel). Keragaman genetik inilah yang menjadi dasar bagi pemulia untuk menciptakan galur baru dengan karakteristik ekonomis sesuai dengan tujuan yang hendak dicapai (*breeding goal*). Identifikasi alel-alel unik yang hanya terdeteksi pada rumpun sapi tertentu juga penting, karena dapat

menjadi penciri genetik suatu rumpun dibandingkan rumpun lainnya.

KESIMPULAN

Marker mikrosatelit terbukti dapat diaplikasikan untuk analisis keragaman genetik sapi lokal di Indonesia. Kisaran dari masing-masing indikator keragaman genetik adalah sebagai berikut: terdapat 2 sampai 32 alel per lokus, nilai *He* rendah sampai tinggi (0,100–0,985), dan nilai PIC beragam (0,095–0,935). Berdasarkan nilai PIC, terdapat beberapa marker yang dikategorikan sangat informatif, antara lain BM1824, ILST6, TGLA126, TGLA53, TGLA227, TGLA122, ETH225, INRA23, SPS113, SPS115, BM1818, CSSM66, ETH10, INRA005, INRA037, ETH185, HEL013, ILSTS017, dan ILSTS029. Kedepan, marker tersebut dapat dipertimbangkan untuk digunakan dalam analisis keragaman genetik rumpun ternak lainnya. Namun demikian, pengelompokan marker berdasarkan tingkat *informativeness* tersebut sangat tergantung pada sub populasi sapi yang diteliti.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdul-Muneer PM. 2014. Application of microsatellite markers in conservation genetics and fisheries management: recent advances in population structure analysis and conservation strategies. *Genet Res Int*. 2014:691759.
- Abebe AS, Mikko S, Johansson AM. 2015. Genetic diversity of five local Swedish chicken breeds detected by microsatellite markers. *PLoS One*. 10:1–13.
- Adinata Y, Aryogi, Pamungkas D. 2016. Morfostruktural bangsa Sapi PO, PO Kebumen dan Bali, dasar informasi genetik mendukung ketahanan pangan, in: *Prosiding Seminar Nasional Inovasi Teknologi Pertanian*. Banjarbaru (Indonesia): IAARD Press. p. 1227–1233.
- Agung PP, Saputra F, Zein MSA, Wulandari AS, Putra WPB, Said S, Jakaria J. 2019. Genetic diversity of Indonesian cattle breeds based on microsatellite markers. *Asian-Australas J Anim. Sci*. 32:467–476.
- Ahrestani F. 2018. *Bos frontalis* and *Bos gaurus* (Artiodactyla: Bovidae). *Mamm Species*. 50:34–50.
- Aitnazarov R, Mishakova T, Yudin N. 2022. Assessment of genetic diversity and phylogenetic relationships in Black Pied cattle in the Novosibirsk Region using microsatellite markers. *Vavilov J Genet Breed*. 25:831–838.
- Al-Samarai FR, Al-Kazaz AA. 2015. Molecular markers: an introduction and applications. *Eur J Mol Biotechnol*. 9:118–130.
- Anmarkrud JA, Kleven O, Bachmann L, Lifjeld JT. 2008. Microsatellite evolution: Mutations, sequence

- variation, and homoplasy in the hypervariable avian microsatellite locus HrU10. *BMC Evol Biol.* 8:138.
- Aryogi, Pamungkas D, Efendy J. 2020. Formation and phenotypic performance of the new breed POGASI Agrinak cattle. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci.* 492:12106.
- Azimu W, Manatbay B, Li Y, Kaimaerdan D, Wang HE, Reheman A, Muhatai G. 2018. Genetic diversity and population structure analysis of eight local chicken breeds of Southern Xinjiang. *Br Poult Sci.* 59:629–635.
- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Gen.* 32:314–331.
- De Carvalho DA, Martínez AM, Carolino I, Barros MC, Vallejo MEC, Santos-Silva F, Almeida MJDO, Carolino N, Bermejo JVD, Sarmiento JLR. 2020. Diversity and genetic relationship of free-range chickens from the northeast region of Brazil. *Animals.* 10:1–14.
- [Ditjen PKH] Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan. 2022. Jenis rumpun sapi [Internet]. [Diakses pada 25 Maret 2022]. Tersedia di: <http://bibit.ditjenpkh.pertanian.go.id/jenis-rumpun/sapi>.
- Faid-Allah E, Ghoneim E, Elbetagy AR, El-Dabour M. 2018. Genetic diversity and structure of native Egyptian cattle populations and French-Egyptian Cross via DNA-microsatellite. *JITV.* 23:1-10.
- [FAO] Food and Agricultural Organization. 2011. Molecular genetic characterization of animal genetic resources, in: *FAO Animal Production and Health Guidelines*. Cambridge (UK): Cambridge University Press.
- Gamarra D, Taniguchi M, Aldai N, Arakawa A, Lopez-Oceja A, de Pancorbo MM. 2020. Genetic characterization of the local pirenaica cattle for parentage and traceability purposes. *Animals.* 10:1–13.
- Habimana R, Okeno TO, Ngeno K, Mboumba S, Assami P, Gbotto AA, Keambou CT, Nishimwe K, Mahoro J, Yao N. 2020. Genetic diversity and population structure of indigenous chicken in Rwanda using microsatellite markers. *PLoS One.* 15:1–17.
- Hamdani MDI, Adhianto K, Sulastri, Husni A, Renitasari. 2017. Ukuran-ukuran tubuh sapi Krui jantan dan betina di Kabupaten Pesisir Barat Lampung. *Jurnal Ilmu Ternak.* 17:97–102.
- Hariyono DNH, Maharani D, Cho S, Manjula P, Seo D, Choi N, Sidadolog JHP, Lee JH. 2019. Genetic diversity and phylogenetic relationship analyzed by microsatellite markers in eight Indonesian local duck populations. *Asian-Australas J Anim Sci.* 32:31–37.
- Hartati, Sumadi, Hartatik T. 2009. The identification of genetic characteristic of Ongole Grade cattle in smallholder farmers. *Buletin Peternakan.* 33:64–73.
- Hartatik T, Hariyono DNH, Adinata Y. 2019. Short communication: Genetic diversity and phylogenetic analysis of two Indonesian local cattle breeds based on cytochrome b gene sequences. *Biodiversitas.* 20:17–22.
- Hikmawaty, Gunawan A, Noor R, Jakaria. 2014. Identification of body size and body shape of Bali cattle in breeding centers on principal component analysis. *Jurnal Ilmu Produksi dan Teknologi Hasil Peternakan.* 2:231–237.
- Ho EKH, MacRae F, Latta LC, Benner MJ, Sun C, Ebert D, Schaack S, Rogers R. 2019. Intraspecific variation in microsatellite mutation profiles in *Daphnia magna*. *Mol Biol Evol.* 36:1942–1954.
- Jakaria J, Alwiyah A, Saputra F, Baihaqi M, Noor RR. 2020. Genetic diversity between Bali cattle (*Bos javanicus*) and its hybrids using microsatellite markers. *Iran J Appl Anim Sci.* 10:453–460.
- Kambanau DH, Kaka A, Hambakodu M. 2022. Sifat kualitatif dan kuantitatif bibit sapi Sumba Ongole Kecamatan Pandawai Kabupaten Sumba Timur. *Jurnal Peternakan.* 6:1–6.
- [Kepmentan] Keputusan Menteri Pertanian. 2020. Keputusan Menteri Pertanian Republik Indonesia Nomor 617/KPTS/PK.020/M/09/2020 tentang Penetapan Rumpun Sapi Galekan. Jakarta (Indonesia): Kementerian Pertanian.
- Kuswati, Ali MI, Wahyuni RD. 2022. Morphometric characteristics of Galekan cattle breed base on principle component analysis (PCA). *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan.* 32:1–12.
- Leffak M, Gadgil R, Barthelemy JLT. 2017. Replication stalling and DNA microsatellite instability. *Biophys Chem.* 225:38–48.
- Mansur M, Mahmudi ATB, Dagong MIA, Rahmi L, Bugiwati RSRA, Baco S. 2016. Keragaman genetik sapi Bali di kabupaten Barru berdasarkan karakteristik fenotipe dan DNA penciri mikrosatelit. *JITP.* 4:104–111.
- Margawati ET, Volkandari SD, Indriawati I, Ridwan M. 2019. Genetic diversity and relationship among Bali cattle from several locations in Indonesia based on ETH10 microsatellite marker. *JITV.* 23:168.
- Masduqi, Sari EM, Abdullah MAN. 2021. Identifikasi sifat kuantitatif dan sifat kualitatif pada sapi Aceh dalam rangka pelestarian sumber daya genetik ternak lokal. *Jurnal Agripet.* 21:141–148.
- Maylinda S, Nugroho H, Busono W. 2021. Phenotypic characteristics of local cattle in Madura island. *AIP Conf Proc.* 060002.
- Merliana MR, Wandia IN, Puja IK. 2014. Polimorfisme lokus mikrosatelit BM1329 dan hubungannya dengan calving interval pada sapi Bali. *Jurnal Ilmu dan Kesehatan Hewan.* 2:117–125.
- Miah G, Rafii MY, Ismail MR, Puteh AB, Rahim HA, Islam NK, Latif MA. 2013. A review of microsatellite

- markers and their applications in rice breeding programs to improve blast disease resistance. *Int J Mol Sci.* 14:22499–22528.
- Misrianti R, Mustika RP, Ali A. 2018. Keragaman sifat kualitatif dan kuantitatif sapi Kuantan pada berbagai tingkatan umur di Kecamatan Benai Kabupaten Kuantan Singingi Provinsi Riau. *Jurnal Peternakan.* 15:55–61.
- Mohamad K, Olsson M, van Tol HTA, Mikko S, Vlamings BH, Andersson G, Rodríguez-Martínez H, Purwantara B, Paling RW, Colenbrander B, Lenstra JA. 2009. On the origin of Indonesian cattle. *PLoS One.* 4:e5490.
- Mukhtar, Jamaliah, Hendra S. 2015. Keragaman fenotipe sapi Aceh betina pada BPTU-HPT Indrapuri. *Jurnal Ilmu Peternakan.* 3:34–38.
- Nijman IJ, Otsen M, Verkaar ELC, de Ruijter C, Hanekamp E, Ochieng JW, Shamsad S, Rege JEO, Hanotte O, Barwegen M, Sulawati T, Lenstra JA. 2003. Hybridization of banteng (*Bos javanicus*) and zebu (*Bos indicus*) revealed by mitochondrial DNA, satellite DNA, AFLP and microsatellites. *Heredity (Edinb).* 90:10–16.
- Ningsih SF, Sulastri, Hamdani MDI. 2017. Karakteristik kualitatif sapi Krui di Kabupaten Pesisir Barat Lampung. *Jurnal Riset dan Inovasi Peternakan.* 1:5–9.
- Norris DE, Shurtleff AC, Toure YT, Lanzaro GC. 2001. Microsatellite DNA polymorphism and heterozygosity among field and laboratory populations of *Anopheles gambiae* s.s. (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 38:336–340.
- Nurgiartiningih V, Budiarto A, Kusmartono K, Suyadi S. 2016. Evaluation of performance in female Madura cattle in Madura island, Indonesia. *Anim Prod.* 18:125.
- Prajapati BM, Gupta JP, Pandey DP, Parmar GA, Chaudhari JD. 2017. Molecular markers for resistance against infectious diseases of economic importance. *Vet World.* 10:112–120.
- Prihandini PW, Primasari A, Luthfi M, Efendy J, Pamungkas D. 2020. Genetic diversity of mitochondrial DNA cytochrome b in Indonesian native and local cattle populations. *JITV.* 25:39.
- Putri AE, Farajallah A, Perwitasari D. 2019. The origin of pesisir cattle based on D-loop mitochondrial DNA. *Biodiversitas.* 20:2569–2575.
- Ramadhan TM, Mulliadi D, Arifin J. 2014. Perbedaan kualitatif dan kuantitatif sapi betina lokal di Majalengka dengan sapi betina Jabres. *Students e-J.* 3:1–11.
- Said S, Pintaka W, Putra W, Anwar S, Agung PP, Yuhani H. 2017. Phenotypic, morphometric characterization and population structure of Pasundan cattle at West Java, Indonesia. *Biodiversitas.* 18:1638–1645.
- Septian WA, Jakaria, Sumantri C. 2015. Genetic diversity of Bali cattle based on microsatellite marker in Indonesian breeding centre. *Media Peternakan.* 38:12–17.
- Serrote CML, Reiniger LRS, Silva KB, Rabaiolli SM dos S, Stefanel CM. 2020. Determining the polymorphism information content of a molecular marker. *Gene.* 726:144175.
- Singh U, Deb R, Alyethodi RR, Alex R, Kumar S, Chakraborty S, Dhama K, Sharma A. 2014. Molecular markers and their applications in cattle genetic research: A review. *Biomark Genom Med.* 6:49–58.
- Sudrajat P, Subiharta. 2014. Karakter fenotipik sapi betina Peranakan Ongole (PO) Kebumen. *Widyariset.* 17:283–290.
- Sutarno, Setyawan AD, Lymbery AJ. 2015. Genetic diversity of five Indonesian native cattle breeds at microsatellite loci. *Asian J Anim Sci.* 9:57–64.
- Svishcheva G, Babayan O, Lkhasaranov B, Tsendsuren A, Abdurasulov A, Stolpovsky Y. 2020. Microsatellite diversity and phylogenetic relationships among East Eurasian *Bos taurus* breeds with an emphasis on rare and ancient local cattle. *Animals.* 10:1493.
- Teneva A, Dimitrov K, Petrović CV, Petrović MP, Dimitrova I, Tyufekchiev N, Petrov N. 2013. Molecular genetics and SSR markers as a new practice in farm animal genomic analysis for breeding and control of disease disorders. *Biotechnol Anim Husb.* 29:405–431.
- Trifena, Budisatria IGS, Hartatik T. 2011. The phenotypic changes of first filial and backcross of Ongole Grade, Simpo, and Limpo cows. *Buletin Peternakan.* 35:11–16.
- Utomo BN, Noor RR, Sumantri C, Supriatna I, Gurnadi ED. 2011. Keragaman genetik sapi Katingan dan hubungan kekerabatannya dengan beberapa sapi lokal lain menggunakan analisis DNA mikrosatelit. *JITV.* 16:112–125.
- Wang H, Yang B, Wang H, Xiao H. 2021. Impact of different numbers of microsatellite markers on population genetic results using SLAF-seq data for *Rhododendron* species. *Sci Rep.* 11:8591.
- Widi TS, Baliarti E, Ibrahim A, Koesmara H, Budisatria IGS. 2016. Phenotypic characteristics of Aceh cattle on different sex and age in smallholder farmers. Proceeding at the 3rd Animal Production International Seminar and The 3rd ASEAN Regional Conference on Animal Production. Malang (Indonesia): UB Press.
- Wimmers K, Ponsuksili S, Hardge T, Valle-Zarate A, Mathur PK, Horst P. 2022. Genetic distinctness of African, Asian and South American local chickens. *Anim Genet.* 31:159–165.
- Yendraliza, Abadi H, Misrianti R, Ali A, Effendi A. 2019. Body size identification and semen quality of Kuantan cattle. *Jurnal Ilmu Peternakan Terpadu* 7:186–191.

- Zhang X, He Y, Zhang W, Wang Y, Liu Xinmeng, Cui A, Gong Y, Lu J, Liu Xin, Huo X, Lv J, Guo M, Du X, Han L, Chen H, Chen J, Li C, Chen Z. 2021. Development of microsatellite marker system to determine the genetic diversity of experimental chicken, duck, goose, and pigeon populations. *Biomed Res Int.* 2021:8851888.
- Zulkharnaim, Baco S, Rahim L, Yusuf M. 2020. Identification of qualitative characteristic Bali polled cattle. *Hasanuddin J Anim Sci.* 2:70–75.



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.

....., 2022

Submitted by:

Name	Main or Member Contributor	Signature
	Main	
	Main	
	Member	
		



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.

....., 2022

Approved by:

Name	Main or Member Contributor	Signature

PEDOMAN BAGI PENULIS

KETENTUAN UMUM

Naskah yang dikirim belum pernah diterbitkan dan dalam waktu yang bersamaan tidak disampaikan kepada media publikasi lain. Perlu menandatangani surat pernyataan tentang keaslian naskah (*ethical statement*) dan hak publikasi (*copyright transfer*) sebagaimana terlampir atau dapat diunduh di <http://medpub.litbang.pertanian.go.id/index.php/wartazoa/index>.

RUANG LINGKUP

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

PENGIRIMAN NASKAH

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

TATA CARA PENULISAN NASKAH

1. **Judul** ditulis singkat, jelas, spesifik dan informatif yang mencerminkan isi naskah serta tidak lebih dari 15 kata.
 2. **Nama** penulis tanpa gelar dan lembaga/institusi ditulis lengkap di bawah judul, disertai dengan alamat lengkap dan alamat e-mail penulis korespondensi.
 3. **Abstrak** ditulis dalam bahasa Indonesia dan bahasa Inggris dan merupakan intisari naskah, masing-masing tidak lebih dari 125-250 kata yang dituangkan dalam satu paragraf dengan jarak satu spasi.
 4. **Kata kunci** (*key words*) dalam bahasa Indonesia dan Inggris, boleh kata tunggal dan majemuk, serta terdiri atas tiga sampai dengan lima kata.
 5. **Pendahuluan** terdiri dari latar belakang, permasalahan atau rumusan masalah, serta tujuan dan manfaat ulasan (*review*).
 6. **Isi pokok bahasan** menyajikan dan membahas secara jelas pokok bahasan dengan mengacu kepada tujuan penulisan.
 7. **Kesimpulan** merupakan substansi pokok bahasan yang menjawab permasalahan serta tujuan penulisan dan bukan merupakan tulisan ulang atau ringkasan dari pembahasan.
 8. **Saran** (apabila ada) dapat berisi rekomendasi, tindak lanjut atau implikasi kebijakan atas kesimpulan yang diperoleh.
 9. **Ucapan terima kasih** (apabila ada).
 10. **Daftar pustaka:**
 - a. Penulisan menggunakan Program Mendeley
 - b. Minimal 25 acuan, diutamakan menggunakan pustaka 10 tahun terakhir dan minimal 80% pustaka primer. Sitasi hasil penulisan sendiri paling banyak 30% dari total acuan.
 - c. Pustaka dari internet hanya diperbolehkan dari sumber yang dapat dipertanggungjawabkan seperti jurnal, instansi pemerintah atau swasta.
 - d. Nama pengarang disusun secara alfabetis dan tahun penerbitan.
 11. **Tabel:**
 - a. Huruf standar yang digunakan adalah *Times New Roman* dengan jarak satu spasi dan *font* 11.
 - b. Judul adalah kalimat singkat, jelas, dapat dimengerti tanpa harus membaca naskah.
 - c. Setiap kolom dari tabel harus memiliki tajuk (*heading*). Unit harus dipisahkan dari judul dengan koma dalam kurung atau di bawahnya.
 - d. Keterangan tabel ditulis di bawah tabel dengan jarak 1 spasi dan *font* 11. Sumber data dituliskan di bawah tabel atau di dalam tabel pada tajuk sendiri.
 - e. Garis pemisah dibuat dalam bentuk horisontal.
- Contoh tabel:

Tabel 1. Komposisi kimia susu kambing, sapi dan kerbau organik

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

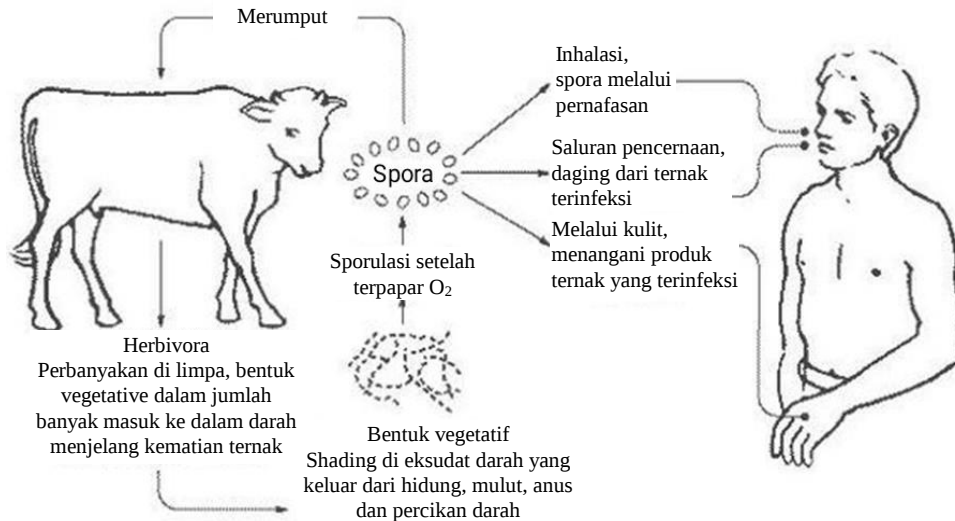
td: Data tidak tersedia; BKLT: Berat kering tanpa lemak

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

12. **Gambar/grafik:**

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

Contoh gambar:



Gambar 1. Penularan penyakit antraks pada ternak dan manusia

Sumber: Qureshi (2012) yang dimodifikasi

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

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

15. **Penulisan pustaka dalam teks:**

- Penulisan pustaka menggunakan Program Mendeley (<http://www.mendeley.com>) dengan gaya sitasi mengikuti Council of Science Editor (CSE) edisi ke-7 tahun 2006.
- Pustaka harus ditulis nama penulis terlebih dahulu, diikuti tahun, contoh: Martindah (2017) atau (Martindah 2017).
- Bila ada dua nama penulis dalam satu makalah, maka nama penulis harus ditulis semua, contoh: Putra & Indriastuti (2011) atau (Putra & Indriastuti 2011).
- Bila ada lebih dari dua nama penulis dalam satu makalah, maka harus ditambah et al. (huruf tegak dan diberi titik di belakang huruf), contoh: Wina et al. (2017) atau (Wina et al. 2017) dan di dalam daftar pustaka ditulis lengkap hingga penulis kesepuluh, serta diakhiri dengan et al.
- Bila ada lebih dari satu pustaka untuk satu pernyataan, maka harus ditulis urutan dari tahun yang tertua dan urutan alfabet nama penulis bila tahunnya sama, contohnya: (Sumanto 2012; Gunawan & Talib 2016; Wina et al. 2017).
- Pustaka dalam pustaka seperti contoh: Teleni dalam Widiawati (2012) tidak diperkenalkan.
- Bila suatu pernyataan diperoleh dari komunikasi pribadi, perlu dicantumkan "nama orang yang dihubungi" dan diikuti dengan (komunikasi pribadi) di belakangnya.
- Memuat nama penulis yang dirujuk dalam naskah.
- Jika penulis yang sama menulis lebih dari satu artikel dalam tahun yang sama dapat dibubuhi huruf kecil.
- Disusun secara alfabetis dan tahun penerbitan menurut nama penulis.

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

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

Buku:

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

Jurnal:

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

Artikel dalam Buku:

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

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

Internet:

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

Prosiding:

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

Skripsi/Tesis/Disertasi:

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

Jurnal elektronik:

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

Registered in:

