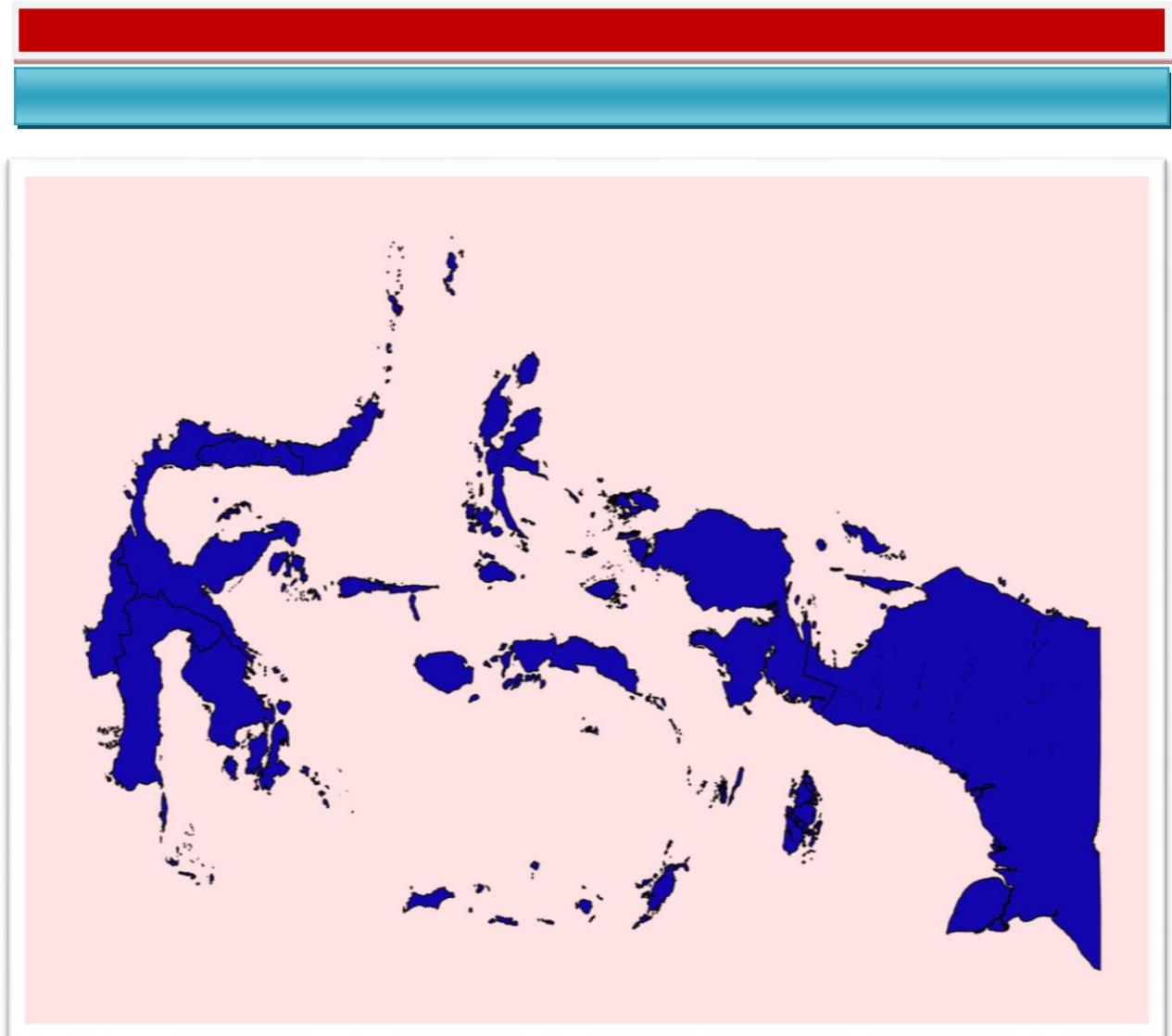


ISSN 0216-1486

DIAGNOSA VETERINER

Buletin Informasi Kesehatan Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner

Volume 14, Nomor 3, Tahun 2015



**KEMENTERIAN PERTANIAN REPUBLIK INDONESIA
DIREKTORAT JENDERAL PETERNAKAN DAN KESEHATAN HEWAN**

BALAI BESAR VETERINER MAROS

KATA PENGANTAR

Diagnosa Veteriner Vol. 14, No. 3, Tahun 2015

Alhamdulillah, segala puji bagi Tuhan Yang Maha Kuasa. Atas rahmat dan karuniaNya Buletin Diagnosa Veteriner Vol. 14 No. 3, Tahun 2015 dapat diterbitkan.

Buletin edisi ini kami menyajikan 3 artikel, yaitu: Pengembangan Metode Pewarnaan Histologi Khusus Trichome Masson's untuk Diagnosa Penyakit pada Hewan, *Encephalomyocarditis Virus (EMCV)* : Ancaman Bagi Populasi Babi, Primata dan Manusia, Deteksi Virus Pada Level *Family* Menggunakan Protokol *Predict*.

Redaksi membuka kesempatan kepada semua pihak yang berkepentingan dengan dunia veteriner dan peternakan untuk menyampaikan ide atau gagasan berupa karya ilmiah populer pengamatan lapangan, hasil penelitian atau review melalui buletin ini.

Redaksi mengharapkan kritik dan saran yang bersifat membangun dari pembaca sebagai bahan pembelajaran untuk pengembangan Buletin Diagnosa Veteriner volume selanjutnya.

Maros, 26 Desember 2015

Redaksi

DAFTAR ISI

Diagnosa Veteriner Vol. 14, No. 3, Tahun 2015

	Halaman
Kata Pengantar	i
Susunan Redaksi	ii
Daftar Isi	iii
Pengembangan Metode Pewarnaan Histologi Khusus Trichome Masson's untuk Diagnosa Penyakit pada Hewan	1
<i>Encephalomyocarditis Virus (EMCV)</i> : Ancaman Bagi Populasi Babi, Primata dan Manusia	6
Deteksi Virus Pada Level <i>Family</i> Menggunakan Protokol <i>Predict</i>	10

DIAGNOSA VETERINER

Buletin Informasi Kesehatan Hewan dan
Kesehatan Masyarakat

International Standard Serial Number (ISSN) : 0216 – 1486

Volume : 14

No : 3

Tahun : 2015

SUSUNAN REDAKSI

- Pengarah : Kepala Balai Besar Veteriner Maros
- Pemimpin Redaksi : drh. Dini Wahyu Yudianingtyas, M.Sc
- Sekretaris : Suryani Gesha Utami, A.Md
- Anggota : 1. drh. Titis Furi Djatmikowati
2. drh. Wiwik Dariani
3. Marwati

Pengembangan Metode Pewarnaan Histologi Khusus Trichome Masson's untuk Diagnosa Penyakit pada Hewan

Wahyuni¹, Enggar Kumorowati¹, Pitriani², Hasniah Achmad²

¹⁾ Medik Veteriner, Balai Besar Veteriner Maros

²⁾ Paramedik Veteriner, Balai Besar Veteriner Maros

Email : yunihadipurnama@gmail.com

Intisari

Telah dilakukan pengembangan metode pewarnaan histologi khusus di balai besar veteriner maros tahun 2015 yaitu pewarnaan khusus untuk trichome masson's . Percobaan pewarnaan ini dilakukan sebanyak lima kali untuk mendapatkan hasil pewarnaan yang sesuai dengan teori yaitu positif berwarna biru untuk kolagen. Tujuan dari pengembangan metode pewarnaan ini adalah dapat digunakan untuk membantu medik veteriner yang berkecimpung dalam dunia histologi dalam mendiagnosa penyakit hewan yang berhubungan dengan peningkatan atau kerusakan pada jaringan kolagen atau jaringan ikat seperti penyakit yang disebabkan agent seperti virus, parasit, jamur ,bakteri maupun tumor.

Kata kunci : pengembangan metode pewarnaan khusus trichome masson 's.

Pendahuluan

Masson's trichome adalah pewarnaan tiga warna yang digunakan dalam histology. Diciptakan oleh Claude L. Pierre Masson's (1880-1959) yang aplikasinya untuk membedakan secara khusus tetapi sangat cocok membedakan antara sel dari jaringan pengikatnya. Tujuan utama dari pewarnaan trichome ini adalah untuk memperlihatkan jaringan kolagen dan otot secara normal dan membedakannya dalam kondisi tumor. Juga dapat memperlihatkan perubahan jaringan ikat atau fibrosis pada kondisi cirrhosis hati atau pyelonephritis. Untuk keratin dan fiber otot akan terlihat berwarna merah, kolagen dan tulang berwarna biru, sitoplasma berwarna merah atau merah muda dan inti sel akan berwarna coklat ataupun hitam.

Serabut kolagen merupakan jenis serabut protein yang paling banyak terdapat dalam tubuh. Diameternya antara 1 μ - 12 μ rata-rata sebesar eritrosit (7,7 μ). Serabut kolagen yang terdiri dari gabungan serabut-serabut halus disebut fibril yang berdiameter 0,3-0,5 μ . Dalam keadaan segar serabut kolagen berwarna putih sehingga disebut serabut putih. Serabut kolagen tahan terhadap tekanan dan tarikan tetapi tidak bersifat lentur. Dengan pewarnaan H&E akan terlihat berwarna merah muda atau merah.

Tujuan dari pengembangan metode ini adalah untuk membantu medik veteriner yang berkecimpung dalam dunia histologi untuk mendiagnosa pasti penyakit hewan, yang berhubungan dengan peningkatan atau kerusakan pada jaringan kolagen dan jaringan ikat seperti penyakit yang disebabkan agent seperti virus, parasit, jamur ,bakteri maupun tumor setelah melakukan pemeriksaan dengan pewarnaan rutin yaitu haematoxylin dan eosin.

Materi dan Metode

Materi yang digunakan adalah kulit dari marmut yang dipotong menjadi 10 bagian kemudian difixasi dengan BNF 10% selama 2 hari. Dilakukan proses pembuatan histopat selama tiga hari. Percobaan pewarnaan dilakukan sebanyak lima kali sampai

mendapatkan warna dan waktu yang sesuai sehingga hasil yang diharapkan dapat tercapai.

Metode yang digunakan adalah :

1. Proses pembuatan histopatologi

1. Fiksasi

Sampel jaringan difiksasi dengan Buffered Neutral Formalin (BNF), volume Buffered Neutral Formalin (BNF) minimal 10 kali volume jaringan. Pada umumnya waktu yang diperlukan untuk fiksasi sempurna adalah 48 jam.

2. Pemotongan Spesimen

- a. Spesimen yang dipilih untuk pemeriksaan, dipotong setebal 0,5-1 cm.
- b. Potongan spesimen dimasukkan dalam keranjang pemrosesan dengan disertai dengan label nomor spesimen yang ditulis dengan pensil.

3. Prossesing dan Embedding

Embedding cassette yang telah diisi spesimen jaringan dimasukkan kedalam *tissue processor* dengan pengaturan waktu selama 20 jam.

4. Pemotongan

- a. Ambil blok jaringan kemudian difiksir pada microtome. Blok jaringan dipotong dengan microtome kasar sehingga didapatkan permukaan yang rata.
- b. Gunakan pisau mikrotom yang masih tajam, ketebalan potongan 5-6 mikron. Pilih potongan jaringan terbaik dari pita yang terbentuk.
- c. Potongan yang terpilih direntangkan pada floating out yang bersuhu sekitar 40°C yang terlebih. Suhu yang ideal akan mengakibatkan potongan jaringan merentang sempurna, tidak berkerut.
- d. Slide yang berisi tempelan potongan jaringan ditempatkan diatas pelat pemanas slide, minimal dua jam.

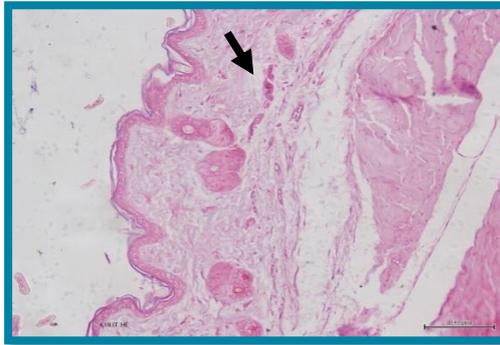
2. Pewarnaan trichome masson's

Metode :

1. Deparafine, cuci air
2. Hilangkan pigmen mercury dengan lugol's iodine 15 menit
3. Cuci dengan air
4. Masukkan dalam larutan sodium tiosulfat 5% 3 menit
5. Cuci dengan air selama 10 menit atau lebih lama
6. Haematoxylin 3 menit
7. 1% acid alkohol cepat 3x
8. Cuci di air
9. Solution acid fuchsin 5 menit (sol A)
10. Cuci aquadest
11. Solution phosmolybdic acid 5 menit (sol B)
12. Keringkan
13. Solution methyl blue 5 menit (sol C)
14. Cuci dengan aquadest
15. 1% acetic acid 2 menit
16. Dehidrasi alkohol
17. Xylol
18. Mounting

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kolagen pada pewarnaan H&E sebagai berikut :



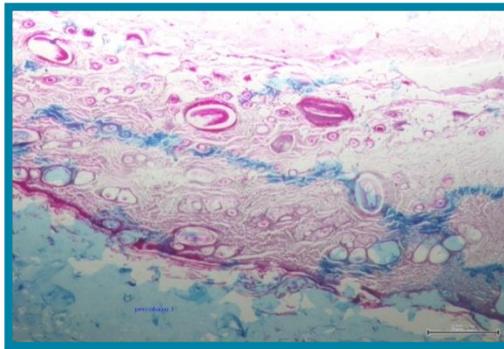
Gambar 1. Jaringan kolagen berwarna merah muda

Percobaan dilakukan sebanyak lima kali yaitu;

1. Percobaan pertama tanggal 23 september 2015

Dengan hasil : warna tidak masuk ke sel, kemungkinan ada tahap yang terlewat

Saran : ulangi sesuai tahap pewarnaan

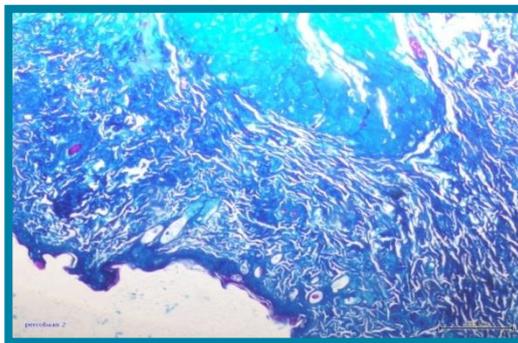


Gambar 2

2. Percobaan kedua tanggal 24 september 2015

Dengan hasil : warna terlalu biru

Saran : tahap acid alkohol kurang lama

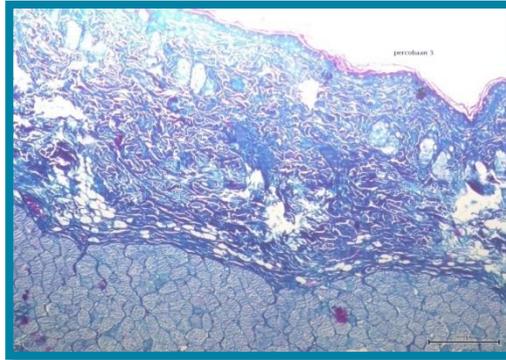


Gambar 3

3. Percobaan ketiga tanggal 25 september 2015

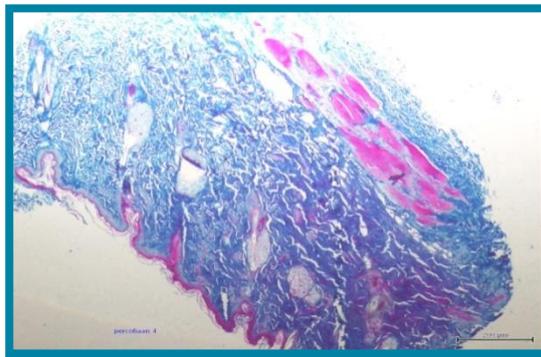
Dengan hasil : warna masih biru, tetapi ada bagian yang terwarnai merah

Saran : sol B dan C dikurangi waktunya jadi 3 menit



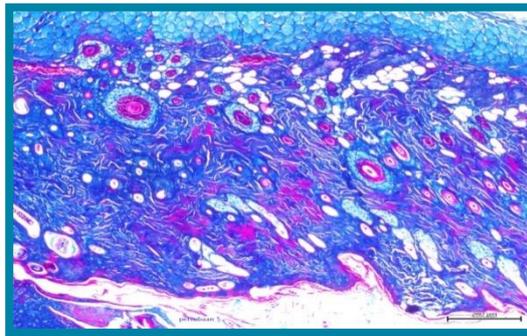
Gambar 4.

4. Percobaan keempat tanggal 2 oktober 2015
Dengan hasil : warna sudah baik, tetapi warna musculus kurang merah begitu juga bagian epidermis
Saran : sol B dan C dikurangi waktunya jadi 2 menit



Gambar 5.

5. Percobaan kelima tanggal 4 oktober 2015
Dengan hasil : warna biru dan merah seimbang, warna kolagen biru, musculus berwarna merah



Gambar 6

Menurut brancroft (2008) hasil warna yang dihasilkan dari pewarnaan masson's trichome adalah inti sel berwarna biru atau hitam, sitoplasma, otot dan eritrosit berwarna merah dan kolagen berwarna biru.

Pada percobaan pertama warna kolagen tidak berwarna biru hanya warna merah pada sitoplasma dan eritrosit. Kemungkinan hal ini disebabkan warna dari solution b dan c yang menyebabkan warna biru tidak masuk ke sel karena slide tidak melalui tahap ke 2 yaitu menghilangkan pigmen mercury dengan iodine dan sodium thiosulfat. Fungsi sodium thiosulfat sebagai pengatur dan memperbaiki warna.

Pada percobaan kedua dan ketiga hasil warna tampak biru secara keseluruhan, hal ini kemungkinan solution B dan C waktunya terlalu lama yaitu 5 menit dan pencelupan acid alkohol untuk peluntur warna biru kurang lama, sehingga menutupi warna dari solution A yang menghasilkan warna merah. Pada percobaan keempat dikurangi waktunya jadi 3 menit dan hasilnya lebih baik yaitu warna kolagen biru tetapi warna musculus (otot) masih tercampur warna merah dan biru. Pada percobaan kelima waktu solutin B dan C menjadi 2 menit dan waktu solution A tetap 5 menit dan hasilnya sangat baik antara warna biru dan merah seimbang dan sesuai dengan teori dari pewarnaan trichome masson's.

Pewarnaan trichome massons dapat digunakan sebagai diagnosa penyakit hewan seperti peningkatan jaringan ikat pada kasus distomatosis, pyelonepritis pada kasus leptospirosis, fibroblast tumor dan kasus penyakit pada kulit (dermatitis) . Dengan pewarnaan khusus ini dapat mempermudah medik veteriner untuk diagnosa pasti ke arah agent penyebab penyakit (diagnosa etiologi)

KESIMPULAN

Setelah dilakukan percobaan sebanyak lima kali barulah di dapat hasil pewarnaan pewarnaan khusus dengan metode trichome masson's. Terdapat perbedaan waktu perlakuan yaitu pada solution B (phosmolybdcic acid) dan solutin C (methylin blue) dari 5 menit (teori) menjadi 2 menit.

SARAN

Perlu dilakukan percobaan pada kasus penyakit hewan seperti distomatosis pada hati, pyelonephritis pada ginjal, tumor pada kulit dan infeksi kulit akibat infeksi parasit seperti sarcoptes sp. maupun demodex sp.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonimus (2013). Massons Trichome Stain. Wikipedia Foundation Inc.
- Bancroft,J. Gambler,M. (2008). Theory and Practice Of Histological Techniques, 6th Edition. Chusrchil-Livingston London.
- Bricegirdle, B (1997). A History of Microtechnique. 2nd. Science Heritage Ltd. Chicago.
- Jasrin,T.A(2006). Histology Jaringan Pengikat.
- Jones, M.L (2010). Special Stain and H&E chapter 10 Mastering The Trichome Stain. DAKO North Amerika. Carpinteria.California.
- Luna LG (1968). Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology 3rd Edition. American Registry of Pathology. McGraw-Hill Book Company. New York.

***Encephalomyocarditis Virus (EMCV) :* Ancaman Bagi Populasi Babi, Primata dan Manusia**

Muflihanah¹⁾, Fitrahadiyani¹⁾, Sitti Hartati Said¹⁾, Bagoes Poermadjaja¹⁾, Hendra Wibawa²⁾, Ernes Andhesfa³⁾, Nining Hartaningsih⁴⁾, Joko Pamungkas⁵⁾, Uus Saepuloh⁵⁾, Syafrison Idris⁶⁾

¹⁾Balai Besar Veteriner Maros

²⁾Balai Besar Veteriner Wates

³⁾Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan

⁴⁾FAO Indonesia

⁵⁾Pusat Studi Satwa Primata

⁶⁾Direktorat Kesehatan Hewan

Intisari

Encephalomyocarditis virus (EMCV) adalah virus yang termasuk dalam kelompok *single stranded RNA* (ssRNA) yang menyebabkan encephalomyocarditis pada babi. Termasuk genus *Cardiovirus* (EMCV-1 dan EMCV-2) dalam *family Picornaviridae*. Pada babi dikenal dua strain dari EMCV-1 yaitu strain A menyebabkan kelainan reproduksi pada babi betina dewasa dan strain B menyebabkan kelainan jantung pada babi muda. Termasuk penyakit zoonosis tetapi pada manusia umumnya terjadi *asymptomatic*. Rodensia merupakan inang alami dan reservoir dari virus ini. Munculnya *emerging dan re-emerging disease* di Indonesia maka perlu dilakukan deteksi dini pada agen termasuk virus pada level *family* dan deteksi penyakit menular pada babi selain penyakit yang termasuk dalam daftar PHMS.

Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mendeteksi genus virus *Encephalomyocarditis* pada sampel mamalia.

Tiga puluh delapan sampel mamalia berupa swab hidung dan darah EDTA koleksi Balai Besar Veteriner Maros tahun 2013 sampai tahun 2015 dideteksi terhadap *family Picornavirus* genus virus *Encephalomyocarditis* dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dilanjutkan dengan sekuensing.

Dari hasil pengujian, sampel mamalia dengan menggunakan primer spesifik untuk mendeteksi EMCV ditemukan sampel positif yaitu sampel swab dari babi di Kab. Maros (MM14), swab babi dari Kota Manado Sulawesi Utara (MM 18) dan swab sapi Bali dari Bombana Sulawesi Tenggara (MM 22) pada target gen 286 pasangan basa. Hasil sekuensing menunjukkan bahwa ketiga sampel tersebut memiliki kesamaan genetik (97%) dengan virus *Encephalomyocarditis* isolat Sing-M105-02 yang diisolasi dari orang utan di Kebun Binatang Singapura.

Terdeteksinya *partial gene* virus *Encephalomyocarditis* pada babi dan sapi di wilayah kerja Balai Besar Veteriner Maros menunjukkan bahwa transmisi penyakit dari satwa liar ke ternak tidak bisa dihindari. Untuk itu perlu dilakukan surveillans untuk deteksi dini infeksi EMCV pada ternak babi, penerapan protokol *Predict* untuk *screening* penyakit *emerging dan re-emerging* virus dan perlu dikembangkan diagnosa komprehensif penyakit hewan menular di Laboratorium Veteriner.

Kata Kunci : *Encephalomyocarditis virus, Babi, PCR*

Pendahuluan

Encephalomyocarditis pertama kali diisolasi tahun 1945 oleh Helwig dan Schmidt di Miami pada siamang jantan, yang mati mendadak karena edema paru dan miokarditis (Carocci *et al.*, 2012). Encephalomyocarditis virus (EMCV) adalah virus yang termasuk dalam kelompok *single stranded RNA* (ssRNA) dalam *Family Picornaviridae*.

Picornaviridae dibagi dalam 12 genera diantaranya *Cardiovirus*. Genus *Cardiovirus* dibagi menjadi 2 spesies *Encephalomyocarditis virus* (EMCV) dan *Theilovirus*. *Encephalomyocarditis virus* (EMCV) terbagi menjadi EMCV-1 dan EMCV-2 yang menginfeksi beragam spesies hewan termasuk babi, rodensia, sapi, gajah, rakun, marsupial, babon, kera, simpanse dan manusia. Pada babi dikenal dua strain dari EMCV-1 yaitu strain A menyebabkan kelainan reproduksi dan strain B menyebabkan kelainan pada jantung. Rodensia merupakan inang alami dan reservoir dari virus ini. Penularan pada mamalia yang lain (manusia, satwa primata, gajah, babi, kuda dan sapi) diduga akibat *virus spillover* dari populasi rodensia liar (*wild mice and rats*). Pada individu terinfeksi virus akan *shedding* pada urin, tinja dan sekresi pada saluran pernafasan (Iskandriati *et al*, 2015)

Beberapa outbreak EMCV di dunia yaitu di peternakan babi di Australia, Amerika dan Canada, kebun binatang di USA, kematian dari singa-singa yang diberi makan karkas gajah yang mati karena EMCV, pada tahun 1995 gajah Afrika di Kruger National Park, South Africa, satwa primata (lemurs, marmoset dan macaca) pada kebun binatang Parco Natura Viva di Italia tahun 2006-2007, monyet Rhesus di *Caribbean Primate Center* tahun 2012 dan orang utan di Kebun Binatang Singapura tahun 2013 ((Carocci *et al.*, 2012, (Yeo, *et al*, 2013). Implikasi Infeksi EMCV yaitu sangat ganas pada babi dan kera (usia muda) dengan gejala khas peradangan otot jantung. Pada babi selain myocarditis, EMCV menyebabkan gangguan reproduksi seperti abortus, kemajiran, mumifikasi dan *stillbirth*. Termasuk *zoonotic agent* tetapi ada manusia umumnya *asymptomatic*. Gambaran klinis yang dilaporkan meliputi demam, sakit kepala, muntah. Belum ada laporan kejadian myocarditis pada manusia (Iskandriati *et al*, 2015).

Diagnosa presumtif yaitu dari gejala klinis khususnya kematian pada tahap neonatal dan terjadinya kegagalan reproduksi. Diagnosa defenitif dengan isolasi virus dari jaringan hati pada fase akut menggunakan BHK-21 atau *Vero cell line*. *Polymerase Chain Reaction* adalah metode lain untuk mengidentifikasi virus ini.

Antisipasi terhadap ancaman penyakit eksotik *Emerging and Re-emerging diseases* U.S. Agency for International Development (USAID) membentuk *Emerging Pandemic Threats (EPT)*. Salah satu proyek EPT (*Emerging Pandemic Threat*) untuk identifikasi penyakit menular baru yang bisa menjadi ancaman bagi kesehatan manusia yaitu PREDICT. Kegiatan berfokus pada satwa liar sebagai agen zoonosis seperti kelelawar, tikus, dan primata non-manusia. Dalam dua tahun terakhir, FAO bekerja sama dengan USAID dan Kementerian Pertanian melakukan identifikasi agen khususnya family virus dan spesies virus dengan sampel dari mamalia dan unggas terhadap kemungkinan munculnya *emerging diseases* termasuk family Picornaviridae spesifik terhadap EMCV.

Tujuan

Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mendeteksi genus virus *Encephalomyocarditis* pada sampel mamalia dan *interface* penularan dari satwa liar ke ternak.

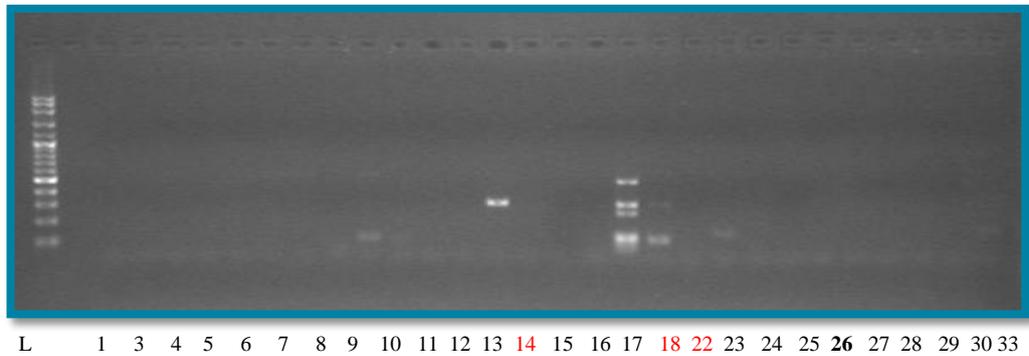
Materi dan Metode

Tiga puluh delapan sampel mamalia berupa swab hidung dan darah EDTA koleksi Balai Besar Veteriner Maros tahun 2013 sampai tahun 2015 dideteksi terhadap family *Picornavirus* genus virus *Encephalomyocarditis* dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) pada target gen 3Dpol dilanjutkan dengan sekuensing

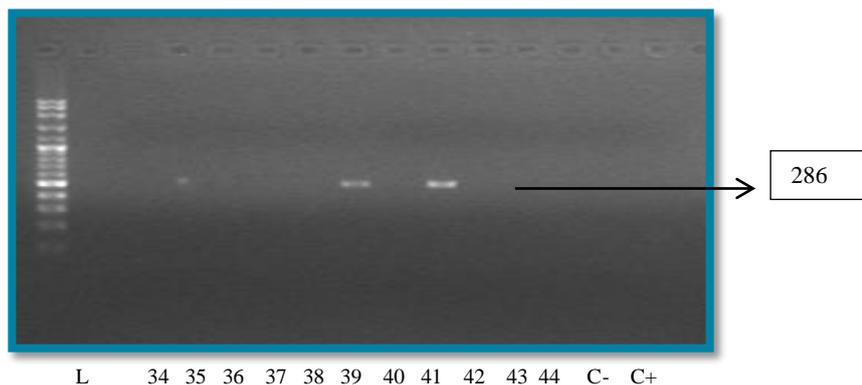
Dalam pengujian sampel menggunakan kontrol positif *Universal Control* sehingga resiko untuk kontaminasi sangat besar, sehingga alur pekerjaan mulai dari ekstraksi, pembuatan mix, template DNA, elektroforesis dan visualisasi hasil mengikuti alur kerja laboratorium molekuler khususnya PCR.

Hasil

Dari hasil pengujian sampel mamalia dengan menggunakan primer spesifik untuk mendeteksi EMCV ditemukan sampel positif pada sampel swab dari babi di Kab. Maros (MM14), swab babi dari Kota Manado Sulawesi Utara (MM 18) dan sampel swab sapi Bali dari Bombana Sulawesi Tenggara (MM 22) pada target 286 pasangan basa.



Gambar1. PCR EMCV terhadap sampel mamalia, 2015-07-31 17hr 36min



Hasil PCR selanjutnya dilakukan sequencing dan dilanjutkan analisa hasil sequencing untuk mengetahui filogenetik masing-masing virus. Hasil sequencing sebagai berikut :

Tabel 1. Hasil Sekuensing

No	Kode	Jenis Sampel	Jenis Hewan	Kab/Kota	Th Koleksi	HASIL IDENTIFIKASI VIRUS (Kesamaan Genetik)
1	MM14	Nasal Swab	Babi	Maros, Sulsel	2015	Encephalomyocarditis virus(Isolate Sing-M105-02, 97%)
2	MM18	Nasal Swab	Babi	Manado, Sulut	2015	Encephalomyocarditis virus(Isolate Sing-M105-02, 97%)
3	MM22	Nasal Swab	Sapi Bali	Bombana, Sultra	2015	Encephalomyocarditis virus(Isolate Sing-M105-02, 97%)

Dari hasil sekuensing menunjukkan swab nasal babi dari Maros Sulawesi Selatan, Manado Sulawesi Utara dan swab nasal sapi dari Bombana Sulawesi Tenggara memiliki kesamaan genetik 97% dengan *Encephalomyocarditis virus* isolate Sing-M105-02.

Pembahasan

Infeksi EMCV terjadi melalui saluran pencernaan yaitu dari makanan, air minum dan karkas yang terinfeksi virus EMC (Carocci *et al*, 2012). Ditemukannya *Encephalomyocarditis virus* pada mamalia (babi dan sapi) dari sampel koleksi Balai Besar Veteriner Maros menunjukkan bahwa perlu mendapatkan perhatian serius terhadap penyakit babi selain *Classical Swine Fever* (CSF) dan *Porcine Respiratory and Reproductive Syndrome* (PRRS). Beberapa laporan *outbreak* juga menunjukkan bahwa EMCV merupakan penyebab terjadinya miokarditis pada primata di beberapa kebun binatang di dunia.

Terdeteksinya *partial gene* virus *Encephalomyocarditis* pada babi dan sapi di wilayah kerja Balai Besar Veteriner Maros menunjukkan bahwa transmisi penyakit dari satwa liar ke ternak tidak bisa dihindari. Rodensia liar (tikus) merupakan reservoir dari penyakit ini. Hasil sekuensing menunjukkan bahwa EMCV pada babi dan sapi di wilayah kerja Balai Besar Veteriner Maros identik 97% dengan isolat isolat Sing-M105-02 pada kasus EMCV yang menyerang orang utan di Singapore Zoologicals Gardens yang merupakan kasus pertama di Singapura dan Asia Tenggara (Yeo, *et al*, 2013).

Untuk menghindari terjadinya *encephalomyocarditis* pada babi, maka perlu dilakukan kontrol populasi terhadap rodensia di peternakan agar tidak terjadi penyebaran penyakit dan kontaminasi terhadap pakan dan air minum ternak. Beberapa peternakan babi seperti di Tomohon Sulawesi Utara, *interface* antara rodensia dan babi tidak bisa dihindari karena sebagian besar lokasi kandang babi terletak di area perkebunan. Peningkatan sanitasi yang diikuti program biosekuriti termasuk penyemprotan kandang dengan desinfektan merupakan salah satu kontrol rodensia di peternakan.

Kesimpulan dan Saran

Terdeteksinya *partial gene* virus *Encephalomyocarditis* pada babi dan sapi di wilayah kerja Balai Besar Veteriner Maros menunjukkan bahwa transmisi penyakit dari satwa liar ke ternak tidak bisa dihindari. Untuk itu perlu dilakukan surveillans untuk deteksi dini infeksi EMCV pada ternak babi, penerapan protokol *Predict* untuk *screening* penyakit *emerging* dan *re-emerging* virus dan perlu dikembangkan diagnosa komprehensif penyakit hewan menular di Laboratorium Veteriner.

Keterbatasan/Limitasi

Adapun keterbatasan dari penelitian ini adalah sampel hanya diambil dari koleksi Balai Besar Veteriner Maros di beberapa wilayah tetapi tidak diketahui apakah daerah pengambilan sampel memiliki risiko *interface* penularan penyakit dari satwa liar ke ternak.

Daftar Pustaka

- Carocci, M., Bakkali-Kassimi, L., 2012. The *Encephalomyocarditis virus*. *Landes Bioscience* Vol 34, 351-367 July 2012.
- Iskandariati, D, Saepuloh, U. 2015. *Encephalomyocarditis virus (EMCV)*. Pusat Studi Satwa Primata. Bogor
- Yeo, D.S.Y, Lian, J.E, Fernandez, C.J., Lin, Y, N., Liaw, J.C.W., Soh, M.L., Lim, E. A.S., Chan, K. P., Ng, M.L., Tan, H.C., Oh, S., Ooi, E.E., Tan, B. H.. 2013. A highly divergent *Encephalomyocarditis* from nonhuman primates in Singapore. *Virology Journal* 2013 10 ; 248.

Deteksi Virus Pada Level *Family* Menggunakan Protokol *Predict*

Muflihanah¹⁾, Fitrahadiyani¹⁾, Sitti Hartati Said¹⁾, Bagoes Poermadaja¹⁾, Hendra Wibawa²⁾, Ernes Andhesfa³⁾, Nining Hartaningsih⁴⁾, Joko Pamungkas⁵⁾, Uus Saepuloh⁵⁾ Syafrison Idris⁶⁾

¹⁾Balai Besar Veteriner Maros

²⁾Balai Besar Veteriner Wates

³⁾Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan

⁴⁾FAO Indonesia

⁵⁾Pusat Studi Satwa Primata

⁶⁾Direktorat Kesehatan Hewan

Intisari

Dalam upaya respon cepat dan identifikasi penyakit menular baru yang bisa menjadi ancaman bagi kesehatan manusia maka diperlukan suatu protokol. PREDICT merupakan bagian program *Emerging Pandemic Threats (EPT)* melakukan penelitian yang berfokus pada satwa liar yang paling mungkin membawa penyakit zoonosis.

Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mendeteksi secara dini *emerging and re-emerging diseases* yang disebabkan oleh virus melalui beberapa target family dan genus pada unggas serta mamalia serta mempelajari kemungkinan adanya *interface* penularan penyakit dari satwa liar ke ternak.

Lima belas sampel unggas dan tiga puluh delapan sampel mamalia koleksi Balai Besar Veteriner Maros dideteksi terhadap family *Orthomyxovirus* (virus *Influenza A*), *Paramyxovirus*, *Coronavirus*, *Herpesvirus* dan *Picornavirus* (*Encephalomyocarditis virus*) dengan menggunakan teknik PCR dilanjutkan sekuensing berdasarkan protokol PREDICT.

Hasil menunjukkan swab itik Kab.Pinrang (MU9) positif terhadap family *orthomyxovirus* virus Influenza A. Deteksi *Paramyxovirus* menunjukkan semua sampel unggas negatif. Sampel mamalia negatif terhadap strain *Human Coronavirus* dan *Bat Coronavirus*. Swab hidung babi dari Jayapura Papua (MM5) dan Kab. Maros (MM13), darah kambing dari Takalar (MM 27) positif terhadap *Herpesvirus*. Deteksi *Picornavirus* spesifik *Encephalomyocarditis virus* ditemukan positif pada swab babi dari Kab.Maros (MM14) dan Kota Manado Sulawesi Utara (MM 18) serta swab sapi Bali dari Bombana Sulawesi Tenggara (MM 22).

Hasil sekuensing menunjukkan darah kambing dari Kab.Takalar Sulawesi Selatan memiliki kesamaan genetik 98-99% dengan virus *Caprine herpesvirus* tipe 2. Swab nasal babi dari Maros Sulawesi Selatan, Manado Sulawesi Utara serta swab nasal sapi dari Bombana Sulawesi Tenggara didapatkan kesamaan genetik 97% dengan *Encephalomyocarditis virus* isolat Sing-M105-02. Swab itik dari Pinrang Sulawesi Selatan didapatkan kesamaan genetik 94-98% Influenza A Virus isolatA/duck/Victoria/0305-2/2012 (H5N3).

Terdeteksinya *partial gene* penyakit *emerging* dan *re-emerging* virus pada sampel ternak yaitu virus *Caprine Herpesvirus 2* pada kambing akan mengakibatkan implikasi klinis penyakit *Malignant Catarrhal Fever* (MCF). Virus *Encephalomyocarditis* yang ditemukan pada babi dan sapi mengakibatkan implikasi peradangan jantung dan gangguan reproduksi pada babi.

Kata Kunci : Family Virus, Protokol Predict

Pendahuluan

Penyakit zoonosis berdampak pada manusia dan ekonomi secara global. Terdapat kurang lebih 75% penyakit yang baru muncul (*emerging diseases*) merupakan zoonosis. Dalam era globalisasi dan perdagangan, perjalanan penyakit ini sangat cepat berpengaruh pada kesehatan masyarakat dan ekonomi. Mayoritas *Emerging Infectious Diseases* (EIDs) pada manusia merupakan zoonosis, berasal dari satwa liar dan sebagian besar disebabkan oleh virus diantaranya *Avian Influenza*, *Severe Acute Respiratory Syndrome* (SARS), Nipah Virus, Ebola, MERS-CoV yang menjadi ancaman dunia (Anthony *et al.*, 2013). Zoonosis muncul di satwa liar dan mampu menginfeksi hewan domestik dan manusia. Munculnya *acquired immune deficiency syndrome* (AIDS) yang disebabkan oleh virus (HIV) karena adanya kontak manusia dan satwa primata. Wabah Ebola manusia pertama kali di dunia karena adanya kontak dengan kera besar tertular yang diburu untuk dimanfaatkan dagingnya. Munculnya wabah SARS di Cina disebabkan oleh virus corona dihubungkan dengan perdagangan internasional carnivora kecil. Burung-burung liar merupakan reservoir virus *West Nile* dimana virus ini menjadi penyebab wabah pada burung yang terus berlanjut dan berpindah ke manusia dan kuda (Naipospos, 2010). Epidemik virus Nipah yang awalnya ditemukan pada kelelawar kemudian menular ke babi dan selanjutnya ke manusia yang menyebabkan kematian lebih dari 100 orang di Malaysia dan Singapura (Lim *et al.*, 2002).

Dalam upaya untuk mengidentifikasi dan respon terhadap penyakit zoonosis baru sebelum menyebar ke manusia, *U.S. Agency for International Development (USAID)* membentuk *Emerging Pandemic Threats (EPT)*. Program EPT terdiri dari empat proyek: PREDICT, RESPOND, IDENTIFY dan PREVENT. PREDICT berusaha untuk mengidentifikasi penyakit menular baru yang bisa menjadi ancaman bagi kesehatan manusia. PREDICT melakukan penelitian yang berfokus pada satwa liar yang paling mungkin untuk membawa penyakit zoonosis seperti kelelawar, tikus, dan primata non-manusia. PREDICT telah mengembangkan dan mengoptimalkan protokol untuk mendeteksi dan menemukan virus pada target family pada hewan yang dapat menyebabkan penyakit dan epidemik pada manusia termasuk *alphavirus*, *arenavirus*, *astrovirus*, *bunyavirus*, *coronavirus*, *filovirus*, *flavivirus*, *herpesvirus*, *orthomyxovirus*, *paramyxovirus*, *poxvirus*, *reovirus*, *retrovirus* dan *rhabdovirus* (USAID PREDICT, 2009). Pendekatan diagnostik yang dilakukan adalah kombinasi antara teknik PCR dengan sekuensing. Teknik PCR merupakan metode yang utama digunakan.

Pengujian sampel pada satwa liar telah dilakukan di negara berisiko tinggi seperti Bangladesh, Brazil, China, Kolombia, Indonesia, Malaysia, dan Meksiko. Setelah para ilmuwan mengumpulkan sampel, mereka menganalisis sampel di laboratorium untuk identifikasi penyakit. Penyakit yang ditemukan dimasukkan dalam data dasar untuk pembuatan peta prediksi wabah penyakit. Pendekatan ini tidak hanya memungkinkan para peneliti untuk menemukan penyakit baru, tetapi juga membantu masyarakat mempersiapkan dan menanggapi ancaman wabah.

PREDICT telah mengidentifikasi virus baru sebanyak 812 jenis dan 147 yang telah diketahui pada satwa liar termasuk di Indonesia (USAID PREDICT, 2009). Berdasarkan hal tersebut FAO bekerjasama dengan PREDICT dan Kementerian Pertanian melakukan identifikasi virus pada beberapa level family virus dan genus dari sampel unggas dan mamalia untuk mendeteksi kemungkinan munculnya *emerging diseases*.

Tujuan

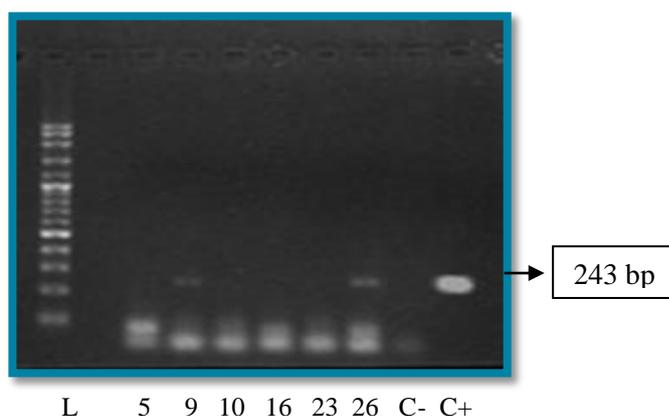
Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mendeteksi secara dini *emerging and re-emerging diseases* melalui target family virus dan genus pada unggas dan mamalia serta mempelajari kemungkinan *interface* penularan penyakit dari satwa liar ke ternak.

Materi dan Metode

Lima belas (15) sampel unggas dilakukan deteksi terhadap family *Orthomyxovirus* virus *Influenza A* dan *Paramixovirus* serta tiga puluh delapan (38) sampel mamalia berasal dari koleksi Balai Besar Veteriner Maros dilakukan deteksi terhadap family *Orthomyxovirus* virus *Influenza A*, *Coronavirus*, *Herpesvirus* pada target gen *polymerase* dan *terminase* serta *Picornavirus* genus *Encephalomyocarditis* virus. Pemilihan sampel dilakukan dengan melihat jenis sampel dan asal daerah. Deteksi family virus dilakukan dengan menggunakan teknik PCR berdasarkan protokol yang telah dikembangkan oleh PREDICT. Dalam pengujian sampel menggunakan kontrol positif universal. Hasil positif PCR dilanjutkan dengan sekuensing.

Hasil

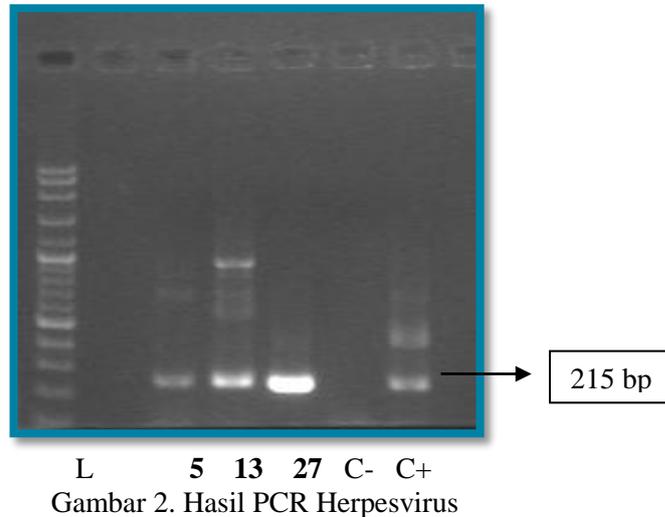
Hasil menunjukkan deteksi family *Orthomyxovirus* virus *Influenza A* menggunakan primer dengan target gen *Matriks* menunjukkan bahwa sampel itik Kab. Pinrang (MU9) positif terhadap virus *Influenza A* pada target gen 243 bp.



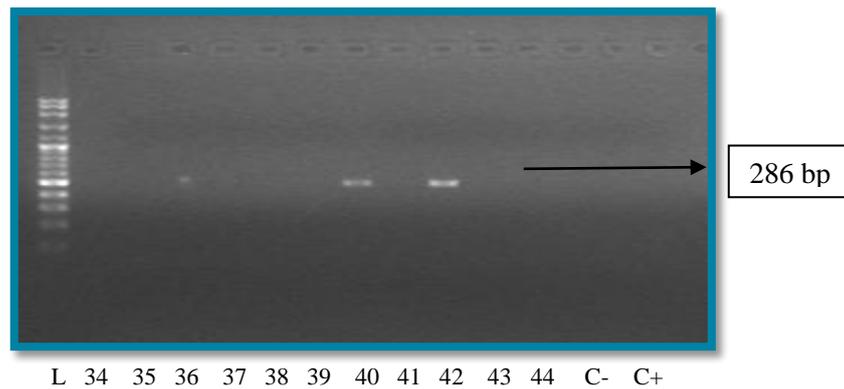
Gambar 1. Hasil PCR Virus Influenza A

Deteksi *Paramyxovirus* menggunakan teknik *hemi-Nested PCR* dengan target gen *polymerase* pada *round 1* pada 639 bp dan *round 2* pada 561 bp menunjukkan semua sampel unggas menunjukkan negatif terhadap *Paramyxovirus*. Deteksi terhadap *Coronavirus* dilakukan terhadap sampel mamalia dengan target gen *RNA Dependent RNA polymerase (RdRp)* untuk mendeteksi strain *Human Coronavirus* menggunakan teknik *Nested PCRs* menunjukkan bahwa semua sampel negatif terhadap terhadap *Human Coronavirus* dan *Bat Coronavirus*.

Deteksi terhadap *Herpesvirus* dilakukan terhadap sampel mamalia dengan target gen *polymerase* dan *terminase*. Hasil pengujian menunjukkan bahwa sampel swab hidung babi dari Jayapura Papua (MM5), sampel swab babi dari Kab. Maros (MM13), sampel darah Kambing dari Takalar (MM 27) positif terhadap *Herpesvirus*



Deteksi picornavirus pada sampel mamalia dengan menggunakan primer spesifik untuk mendeteksi EMCV ditemukan sampel positif yaitu sampel swab dari babi di Kab.Maros (MM14), swab babi dari Kota Manado Sulawesi Utara (MM 18) dan swab sapi Bali dari Bombana Sulawesi Tenggara (MM 22) pada target gen 286 pasangan basa.



Hasil positif PCR pada target family virus kemudian dilanjutkan dengan sekuensing untuk melihat virus secara spesifik.

Tabel 1. Hasil Sekuensing

No	Kode	Jenis Sampel	Jenis Hewan	Kab/Kota	Th Koleksi	HASIL IDENTIFIKASI VIRUS (Kesamaan Genetik)
1	MM27	Darah	Kambing	Takalar, Sulsel	2015	Caprine herpesvirus 2 (Pol and Term genes, 98-99%)
2	MM28	Darah	Kambing	Takalar, Sulsel	2015	Caprine herpesvirus 2 (Term genes, 99%)
3	MM14	Nasal Swab	Babi	Maros, Sulsel	2015	Encephalomyocarditis virus(Isolate Sing-M105-02, 97%)
4	MM18	Nasal Swab	Babi	Manado, Sulut	2015	Encephalomyocarditis virus(Isolate Sing-M105-02, 97%)
5	MM22	Nasal Swab	Sapi Bali	Bombana, Sultra	2015	Encephalomyocarditis virus(Isolate Sing-M105-02, 97%)
6	MU9	Oral Swab	Itik	Pinrang, Sulsel	2014	Influenza A Virus (Matrix Gene, 94-98%)

Hasil menunjukkan sampel darah Kambing dari Takalar, Sulawesi Selatan memiliki kesamaan genetik 98-99% dengan virus *Caprine herpesvirus* tipe 2 pada target gen *polymerase* dan *terminase*. Swab nasal babi dari Maros Sulawesi Selatan, Manado Sulawesi Utara dan swab nasal sapi dari Bombana Sulawesi Tenggara didapatkan kesamaan genetik 97% dengan *Encephalomyocarditis virus* isolat Sing-M105-02. Swab oral itik dari Pinrang Sulawesi Selatan didapatkan kesamaan genetik 94-98% Influenza A Virus isolatA/duck/Victoria/0305-2/2012(H5N3) pada gen matrix protein 2 (M2).

PEMBAHASAN

Deteksi terhadap family orthomyxovirus virus *Influenza A* dilakukan pada semua sampel baik sampel unggas maupun sampel mamalia berdasarkan protokol PREDICT menggunakan primer dengan target gen Matriks. Sampel unggas ditemukan positif yaitu sampel itik Kab. Pinrang (MU9). Swab oroparingeal itik dari Pinrang Sulawesi Selatan didapatkan kesamaan genetik 94-98% Influenza A Virus isolatA/duck/Victoria/0305-2/2012(H5N3) pada gen matrix protein 2 (M2). Penyakit *Avian Influenza* masih terus mewabah di beberapa daerah di Indonesia.

Deteksi terhadap family *Paramyxovirus* menunjukkan bahwa seluruh sampel unggas negatif. *Paramyxovirus* sangat patogen pada hewan seperti ayam, kalkun, hewan akuatik seperti salmon, ikan hiu, ikan paus, lumba-lumba, rodentia, kuda, sapi, kelelawar, babi dan manusia. Family *Paramyxovirus* pada hewan diantaranya virus Nipah dan Hendra yang mengakibatkan infeksi serius dan fatal pada manusia. *Paramyxovirus* merupakan target yang penting dikembangkan untuk mendeteksi virus baru. Primer yang digunakan berasal dari daerah sejati (*high conserved region*) pada genom (Tong *et al.*, 2008).

Coronavirus dibagi menjadi empat genera berdasarkan *antigenic cross-reactivity* dan sekuen nukleotida yaitu *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* dan *Deltacoronavirus*. *Alphacoronavirus* dan *Betacoronavirus* berkaitan dengan infeksi pada mamalia termasuk manusia sedangkan *Gammacoronavirus* dan *Deltacoronavirus* sangat berkaitan dengan infeksi pada unggas. Hal yang menarik adalah dampaknya terhadap ternak babi dan peternakan unggas. Kelelawar merupakan reservoir yang penting pada beberapa penyakit zoonosis disebabkan oleh virus yang berdampak pada kesehatan hewan dan kesehatan manusia. Virus dari kelelawar menular ke manusia dengan kontak langsung melalui gigitan atau saliva hewan yang terinfeksi dan udara (Quan *et al.*, 2010). Ada dua *emerging diseases* dari genera *Betacoronavirus* yaitu SARS-CoV dan MERS-CoV. Hasil pengujian menunjukkan semua sampel mamalia negatif terhadap Coronavirus baik *Human Coronavirus* maupun *Bat Coronavirus*.

Pada pengujian ini ditemukan sampel positif terhadap *Herpesvirus* dari sampel swab nasal babi dan darah kambing. Deteksi terhadap *Herpesvirus* dilakukan terhadap sampel mamalia dengan target gen *polymerase* dan *terminase*. Hasil sekuensing menunjukkan sampel darah kambing dari Takalar, Sulawesi Selatan memiliki kesamaan genetik 98-99% dengan *Caprine herpesvirus* tipe 2. Virus ini dapat mengakibatkan penyakit *Malignant catarrhal fever* (MCF) pada mamalia (Le *et al.*, 2003). Ditemukannya positif PCR dan hasil sekuensing *Caprine herpesvirus* tipe 2 pada Kambing menunjukkan bahwa perlu perhatian serius terhadap penyakit hewan di luar penyakit hewan menular strategis.

Deteksi family *Picornaviridae* genus *Cardiovirus* virus *Encephalomyocarditis* ditemukan sampel positif yaitu sampel swab dari babi dan swab sapi. Dari hasil sekuensing swab nasal babi dari Maros Sulawesi Selatan, Manado Sulawesi Utara dan swab nasal sapi dari Bombana Sulawesi Tenggara didapatkan kesamaan genetik 97% dengan *Encephalomyocarditis virus* isolat Sing-M105-02. *Encephalomyocarditis* (EMCV-1 dan EMCV-2) menginfeksi beragam mamalia. Pada babi dikenal dua strain

yaitu EMCV 1 dan EMCV-2. Dari EMCV-1 yaitu strain A menyebabkan kelainan reproduksi dan strain B menyebabkan kelainan pada jantung. Rodensia merupakan inang alami dan reservoir dari virus ini. Penularan pada mamalia yang lain (manusia, satwa primata, gajah, babi, kuda dan sapi) diduga akibat *virus spillover* dari populasi rodensia liar (*wild mice and rats*). Pada individu terinfeksi virus akan *shedding* pada urin, tinja dan sekresi pada saluran pernafasan. Implikasi Infeksi EMCV yaitu sangat ganas pada babi dan kerbau (usia muda) dengan gejala khas peradangan otot jantung. Pada babi selain myocarditis, EMCV menyebabkan gangguan reproduksi seperti abortus, kemajiran, mumifikasi dan *stillbirth*. Termasuk *zoonotic agent* tetapi pada manusia umumnya *asymptomatic*. (Carocci *et al.*, 2012).

Munculnya hasil positif EMCV maka diperlukan perhatian terhadap penyakit babi yang lain selain CSF dan PRRS. Selain itu telah terjadi *interface* dari satwa liar (rodensia liar) ke hewan domestik sapi dan babi.

KESIMPULAN DAN SARAN

Deteksi virus pada tingkat family menggunakan protokol PREDICT kombinasi PCR dan sekuensing memiliki sensitifitas tinggi dan dapat digunakan untuk mendeteksi virus baru dari unggas dan mamalia. Terdeteksinya *partial gene* beberapa *emerging* dan *re-emerging* virus pada sampel ternak, antara lain virus *Caprine Herpesvirus 2* pada kambing akan mengakibatkan implikasi klinis penyakit *Malignant Catarrhal Fever* (MCF), sedangkan virus *Encephalomyocarditis* yang ditemukan pada babi dan sapi akan mengakibatkan implikasi peradangan jantung dan gangguan reproduksi pada babi. Ditemukannya EMCV pada babi dan sapi menunjukkan bahwa telah terjadi *interface* dari satwa liar (rodensia liar) ke hewan domestik.

Protokol PREDICT dapat diterapkan untuk *screening* penyakit *emerging* dan *re-emerging* virus serta bagian dari diagnosa komprehensif di Balai Besar Veteriner dan Balai Veteriner di Indonesia. Selain itu dapat digunakan sebagai alternatif protokol diagnostik untuk *risk-assessment* di wilayah/zona bebas penyakit.

Perlu dilakukan kajian lebih lanjut untuk mengetahui *interface* penularan penyakit dari satwa liar ke hewan domestik.

KETERBATASAN/LIMITASI

Adapun keterbatasan dari penelitian ini adalah sampel hanya diambil dari koleksi Balai Besar Veteriner Maros di beberapa wilayah tetapi tidak diketahui apakah daerah pengambilan sampel memiliki risiko *interface* penularan penyakit dari satwa liar ke ternak.

DAFTAR PUSTAKA

- Anthony, S.J., Epstein, J.H., Murray, K.A., Navarette-Maclas, I., Torrelio, C.M.Z., Solovyov, A., Flores, R.O., Arrigo, N.C., Islam, A., Khan, A.A., Hosseini, P., Bogich, T.L., Olival, K.J., Leon, M.D.S., Karesh, W.B., Goldstein, Tracey., Luby, S.P, Morse, S.S, Mazet, J.A.K., Daszak, P., Lipkin, W.I. 2013. A strategy to Estimate Unknown Viral Diversity in Mammals. *mBio* 4(5) : e00598.13
- Carocci, M., Bakkali-Kassimi, L.. 2012. The encephalomyocarditis virus. *Virulence* 3:4, 351–367; July 1, 2012; G 2012 Landes Bioscience

- Lam, S. K., Chua K. B.. 2015. Nipah Virus Encephalitis Outbreak in Malaysia. *Clinical Infectious Diseases* 2002:34 (Suppl 2)
- Li, H., Wunschmann, A., Keller, J., D., Hall, G., Crawford, T. B. . 2003. Caprine herpesvirus-2-associated malignant catarrhal fever in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *J Vet Diagn Invest* 15:46–49 (2003)
- Naipospos, T. 2010. Perdagangan satwa liar dan risiko penyakit zoonosis. Blog Veterinerku
- Quan, P.L., Firth, C., Street, C., Henriquez, J. A., Petrosov, A., Tashmukhamedova A., Hutchison, S.K., Egholm, M., Osinubi, M.O.V., Ogunkoya, A.B., Briese, T., Rupprecht, C.E., Lipkin, W.I..2010. Identification of a Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-like Virus in a Leaf-Nosed Bat in Nigeria. *mBio* 1(4) e00208-10
- Tong, S., Chern, S.W.W, Li, M., Pallansch, M.A., Anderson, L.J.. 2008. Sensitive and Broadly Reactive Reverse Transcription-PCR Assays To Detect Novel Paramyxoviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, Aug 2008 p. 2652-2658.
- USAID PREDICT. Virus Detection and Discovery, Reducing Pandemic Risk, Promotion Global Health. <http://predict.global>