

Efektivitas Larutan Desinfektan dalam Mengaktivasi Virus Avian Influenza pada Bulu Unggas

Effectiveness of Disinfectants to Inactivate Avian Influenza Virus on the Feathers

Bagus Nanang Luwito^{1*}, I Wayan Teguh Wibawan², Retno Damayanti Soejoedono³

¹Balai Karantina Pertanian Kelas I Balikpapan Jl. Pelita No. 3,
Sepinggang Balikpapan Kalimantan Timur 76115;

²Departemen Ilmu Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner,
Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor
Jl. Agatis, Kampus IPB Dramaga, Bogor Jawa Barat 16680

*Email : bagus240456@gmail.com

Naskah diterima : 26 Juli 2017, direvisi : 11 Desember 2018, disetujui 11 Desember 2018

Abstract

Avian Influenza (AI) virus is pathogenic agent that can spread from one area to another area through the transportation of infected animals or their products such as feathers. This research was aimed to inactivated AI virus with 775 ppm sodium hypochlorite and 0.1% chloroxyleneol and to examine the difference of treatment by time (day) for inactivation AI virus on the feathers. AI virus isolate A/chicken/sidrap/ 07160336-2/2016 used in this research was obtained from Balai Besar Veteriner Maros. The treatment of disinfectants were performed on the first day (the day of disinfectant solutions were prepared), the third day and the seventh day by soaked the feathers in disinfectant solution for 10 minutes. The effectiveness of disinfectants were evaluated by inactivation index. The result show that the average of inactivation index of 775 ppm of sodium hypochlorit was 4.17 for the first day, 5.17 for the third day, and 4.20 for the seventh day, while the average of inactivation index of 0.1% chloroxyleneol was 5.50 for the first day, 6.43 for the third day, and 5.77 for the seventh day. Our result indicated that the sodium hypochlorit and chloroxyleneol were effective for inactivation of AI virus. The 0.1% of chloroxyleneol was more effective for inactivation AI virus than 775 ppm of sodium hypochlorit, whilst the most effective duration for the treatment is the three days.

Key words : Avian Influenza virus; chloroxyleneol; inactivation index; sodium hypochlorit

Abstrak

Virus Avian Influenza (AI) merupakan agen penyakit yang dapat menyebar dari suatu daerah ke daerah lain melalui lalu lintas hewan terinfeksi atau produknya seperti bulu. Penelitian ini bertujuan menginaktivasi virus AI menggunakan sodium hipoklorit 775 ppm dan kloroxilenol 0.1% serta mengetahui perbedaan efektivitas waktu (hari) perlakuannya dalam menginaktivasi virus AI pada bulu unggas. Isolat virus AI dengan kode A/chicken/sidrap/07160336-2/2016 yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari Balai Besar Veteriner Maros. Perlakuan desinfeksi dilakukan pada hari ke - 0 (hari pada waktu larutan desinfektan disiapkan), ke-3 dan ke -7 dengan cara bulu direndam larutan desinfektan selama 10 menit. Hasil penelitian ini menunjukkan rata - rata indek inaktivasi yang diperoleh larutan sodium hipoklorit 775 ppm pada hari ke - 0 sebesar 4.17, hari ke -3 sebesar 5.17 dan hari ke -7 sebesar 4.20, sedangkan rata - rata indek inaktivasi kloroxilenol 0,1% pada hari ke -0 sebesar 5.50, hari ke -3 sebesar 6.43 dan ke -7 sebesar 5.77. Penelitian ini dapat disimpulkan bahwa larutan sodium hipoklorit dan kloroxilenol dapat menginaktivasi virus AI. Larutan kloroxilenol 0.1% lebih efektif dibandingkan dengan larutan sodium hipoklorit 775 ppm. Kelompok hari perlakuan yang paling efektif adalah pada hari ke -3.

Kata kunci : Virus Avian Influenza; kloroxilenol; indek inaktivasi; sodium hipoklorit

Pendahuluan

Wabah Avian Influenza (AI) menyebabkan dampak kerugian ekonomi yang sangat berarti terutama di sektor peternakan. Virus AI merupakan agen patogen yang dapat menyebar dari suatu daerah ke daerah lain melalui lalu lintas hewan terinfeksi atau produknya. Virus AI masuk dalam golongan *Orthomixoviridae*, genus virus Influenza A dan merupakan virus RNA dengan untai tunggal serta memiliki selubung amplop. Subtipe dari virus influenza A ini terbagi atas kombinasi 17 hemaglutinin (H1-H17) dan 10 neuraminidase (N1-N10) setelah ditemukan H17 dan N10 yang diisolasi dari kelelawar buah (Tong *et al.* 2012).

Bulu merupakan produk sampingan dari peternakan unggas yang masih dapat dimanfaatkan sebagai bahan untuk pembuatan pakan ternak, industri garmen seperti pakaian, industri peralatan rumah tangga seperti alat pembersih debu, bantal, guling, kasur serta industri di bidang sarana olah raga. Bulu unggas banyak digunakan untuk keperluan komersil. Penggunaan bulu unggas tanpa dilakukan pemrosesan dapat menyebarkan virus AI (Van den Berg 2009). Kontaminasi virus AI pada bulu berasal dari leleran unggas sakit dengan kandungan titer virus yang tinggi dan berasal dari lingkungan (Yamamoto *et al.* 2010).

Desinfeksi merupakan upaya yang dilakukan untuk membebaskan media pembawa dari mikroorganisme penyebab penyakit secara fisik atau kimia antara lain dengan pemberian larutan desinfektan. Penggunaan larutan desinfektan yang tepat, murah serta mudah didapat harus tetap efektif berdasarkan kerentanan target dari agen penyakit yang akan dikendalikan. *Environmental Protection Agency* (EPA) telah menyusun daftar bahan desinfektan yang efektif untuk menginaktivasi virus AI. Dua jenis bahan desinfektan yang telah diregistrasi oleh EPA untuk menginaktivasi virus AI antara lain adalah sodium

hipoklorit (NaOCl) yang lebih sering dikenal dengan pemutih dan kloroxilenol (C_8H_8ClOH) yang merupakan turunan dari senyawa fenol. Pelaksanaan tindakan desinfeksi memegang peranan dalam pencegahan penyebaran virus AI di lingkungan (Birnbaum dan O'brien 2008).

Penerapan prosedur biosekuriti di lapangan oleh petugas, karyawan atau pelaku usaha di bidang peternakan terkadang kurang bijaksana dalam pelaksanaan tindakan desinfeksi sehingga masih ditemukan kejadian wabah virus AI pada suatu daerah atau peternakan, meskipun telah dilakukan program biosekuriti yang ketat. Pemilihan jenis larutan desinfektan yang tepat serta waktu perlakuan yang efektif dalam menginaktivasi virus AI pada bulu unggas selama ini belum pernah dilakukan pengkajian. Penelitian ini bertujuan menginaktivasi virus AI menggunakan sodium hipoklorit 775 ppm dan kloroxilenol 0.1% serta mengetahui perbedaan efektivitas waktu (hari) perlakuannya dalam menginaktivasi virus AI pada bulu unggas.

Materi dan Metode

Propagasi Isolat Virus AI

Isolat virus AI diperoleh dari Balai Besar Veteriner Maros (BBVET Maros) dengan kode isolat A/chicken/sidrap/07160336-2/2016. Isolat tersebut diperbanyak pada Telur Ayam Berembrio (TAB) *specific antibody negative* (SAN) umur 9 sampai 11 hari. Cairan alantois yang menunjukkan positif pada uji aglutinasi cepat selanjutnya dilakukan pengukuran titer dengan pengujian *Egg Infectious Dose 50* (EID_{50}) menggunakan rumus *A simple method of estimating fifty percent endpoints* (Reed dan Muench 1938).

Reidentifikasi Isolat Virus AI

Identifikasi ulang isolat virus AI yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan uji hemaglutinasi

(HA) dan uji penghambatan hemaglutinasi (HI) menggunakan serum antibodi virus AI sub tipe H5N1. Metode pengujian mengacu pada prosedur standar yang berlaku (OIE 2015).

Karakterisasi Isolat Virus AI

Isolat virus AI yang sudah diperbanyak dan diidentifikasi ulang selanjutnya dikarakterisasi secara molekuler melalui pengujian RT-PCR. Ekstraksi RNA dari isolat virus AI tersebut menggunakan Viral Nucleic Acid Extraction Kit II (Geneaid Biotech Ltd.). Hasil ekstraksi dari RNA selanjutnya diamplifikasi menggunakan *QIAGEN OneStep RT-PCR Kit* (QIAGEN) dengan menggunakan pasangan primer *forward* H5-kha-1: 5' CCT CCA GAR TAT GCM TAY AAA ATT GTC 3' dan primer *reverse* H5-kha-3: 5' TAC CAA CCG TCT ACC ATK CCY TG 3' untuk mendeteksi gen H5 and H5-kha-3: dan menggunakan pasangan primer *forward* N1-1: 5' TTG CTT GGT CGG CAA GTG C 3' dan primer *reverse* N1-2: 5' CCA GTC CAC CCA TTT GGA TCC 3' untuk mendeteksi gen N1. Produk hasil amplifikasi selanjutnya dikonfirmasi melalui proses elektroforesis. Marker DNA *ladder* 100 bp *plus* (Vivantis) digunakan sebagai penanda terbentuknya posisi pita. Posisi pita akan terbentuk pada posisi 300 bp untuk gen H5 dan posisi 616 bp untuk gen N1 (Slomka *et al.* 2007; WHO 2007).

Persiapan Larutan Desinfektan

Dua jenis larutan desinfektan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu sodium hipoklorit dan kloroxilenol. Dosis penggunaan larutan sodium hipoklorit sebesar 775 ppm dan kloroxilenol sebesar 0.1%. Larutan desinfektan tersebut dicampur dengan aquades dan dibiarkan pada suhu lingkungan untuk digunakan pada perlakuan hari ke-3 dan ke-7.

Persiapan dan Kontaminasi Virus AI pada Bulu

unggas

Bulu unggas yang digunakan adalah bulu ayam. Bulu tersebut dicuci dengan air kran untuk menghilangkan kotoran, kemudian direndam dengan larutan susu skim 2% selama 30 menit, selanjutnya dicuci kembali dengan aquades dan dikeringkan. Proses selanjutnya, bulu unggas disterilisasi menggunakan pemanasan basah (*autoclave*) dengan suhu 121°C selama 30 menit.

Kontaminasi bulu unggas dilakukan dengan cara 20 buah bulu unggas direndam dengan larutan virus AI yang dicampur dengan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) perbandingan 1:1 dan ditambahkan 5% *Fetal Bovine Serum* (FBS). Bulu unggas yang sudah dikontaminasi selanjutnya dibiarkan pada suhu ruang selama 10 menit. Metode ini merupakan modifikasi dari metode penelitian yang pernah dilakukan sebelumnya (Gamal *et al.* 2014).

Pembuatan Kontrol Positif

Kontrol positif digunakan untuk mengukur titer virus sebelum diberikan perlakuan desinfeksi. Bulu unggas yang sudah dikontaminasi dengan virus AI kemudian diambil lima buah bulu untuk diekstraksi dengan cara diperas dan ditampung dalam gelas beker, kemudian cairan hasil ekstraksi tersebut dilakukan pengenceran secara berseri kelipatan 10 kali mulai dari 10^{-1} sampai 10^{-9} . Tiap pengenceran dari pengenceran 10^{-4} sampai 10^{-9} diinokulasi pada tiga butir TAB dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama lima hari untuk mengetahui titer virus dari kontrol positif melalui penghitungan EID_{50}/ml . Hasil titer virus AI dari kontrol positif digunakan dalam menentukan indek inaktivasi (Lombardi *et al.* 2008).

Perlakuan Desinfeksi pada Bulu Unggas

Sisa bulu unggas yang sudah dikontaminasi dengan virus AI sebanyak 15 buah, kemudian

diberikan perlakuan dengan larutan sodium hipoklorit 775 ppm dan kloroxilenol 0.1% dengan cara bulu direndam dan digoyang perlahan secara manual selama 10 menit. Bulu yang telah selesai direndam kemudian diambil dan cairan yang terdapat pada bulu tersebut diekstraksi dengan cara diperas dan ditampung dalam gelas beker, selanjutnya cairan hasil ekstraksi tersebut dilakukan pengenceran secara berseri kelipatan 10 kali mulai dari 10^{-1} sampai 10^{-3} dan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali. *DE neutralizing broth* (Himedia) digunakan sebagai larutan pengenceran pertama untuk setiap perlakuan untuk menghentikan reaksi dan menghilangkan efek sitotoksik dari larutan desinfektan (Alphin *et al.* 2009). Setiap pengenceran kemudian diinokulasi pada tiga butir TAB, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37 °C selama lima hari. Penghitungan EID_{50}/ml dilakukan untuk mengetahui titer virus setelah perlakuan. Hasil titer setelah perlakuan digunakan dalam menentukan indeks inaktivasi dengan cara titer virus AI dari kontrol positif dikurangi dengan titer virus AI setelah perlakuan (Lombardi *et al.* 2008). Perlakuan desinfeksi pada penelitian ini menggunakan larutan desinfektan yang dibuat pada hari ke-0 selanjutnya dibiarkan pada suhu lingkungan ± 30 °C untuk digunakan kembali pada hari ke-3 dan ke-7 tanpa dilakukan penggantian larutan yang baru.

Penghitungan Indeks Inaktivasi

Indek inaktivasi virus dihitung menggunakan rumus :

$$\text{Indek Inaktivasi} = \text{Titer K(+)} - \text{Titer Perlakuan}$$

Titer virus setelah perlakuan akan berkurang antara 3 sampai 4 \log_{10} dari kontrol positif yang diberi perlakuan desinfektan (Maillard *et al.* 2013). Inaktivasi virus AI dikatakan efektif bila menghasilkan nilai indeks inaktivasi $\geq 2.8 \log_{10}$, yang diperoleh dari titer kontrol positif $\geq 4.0 \log_{10}$ dan virus tidak bereplikasi setelah

perlakuan dengan ditunjukkan titer virus $< 1.2 \log_{10}$ (Lombardi *et al.* 2008).

Analisa Data

Data indeks inaktivasi yang diperoleh diuji dengan menggunakan analisis sidik ragam pada taraf nyata 0.05. Jika perlakuan menunjukkan pengaruh nyata maka dilanjutkan dengan uji *Tukey* pada taraf nyata 0.05. Pengolahan data menggunakan program Minitab 16.

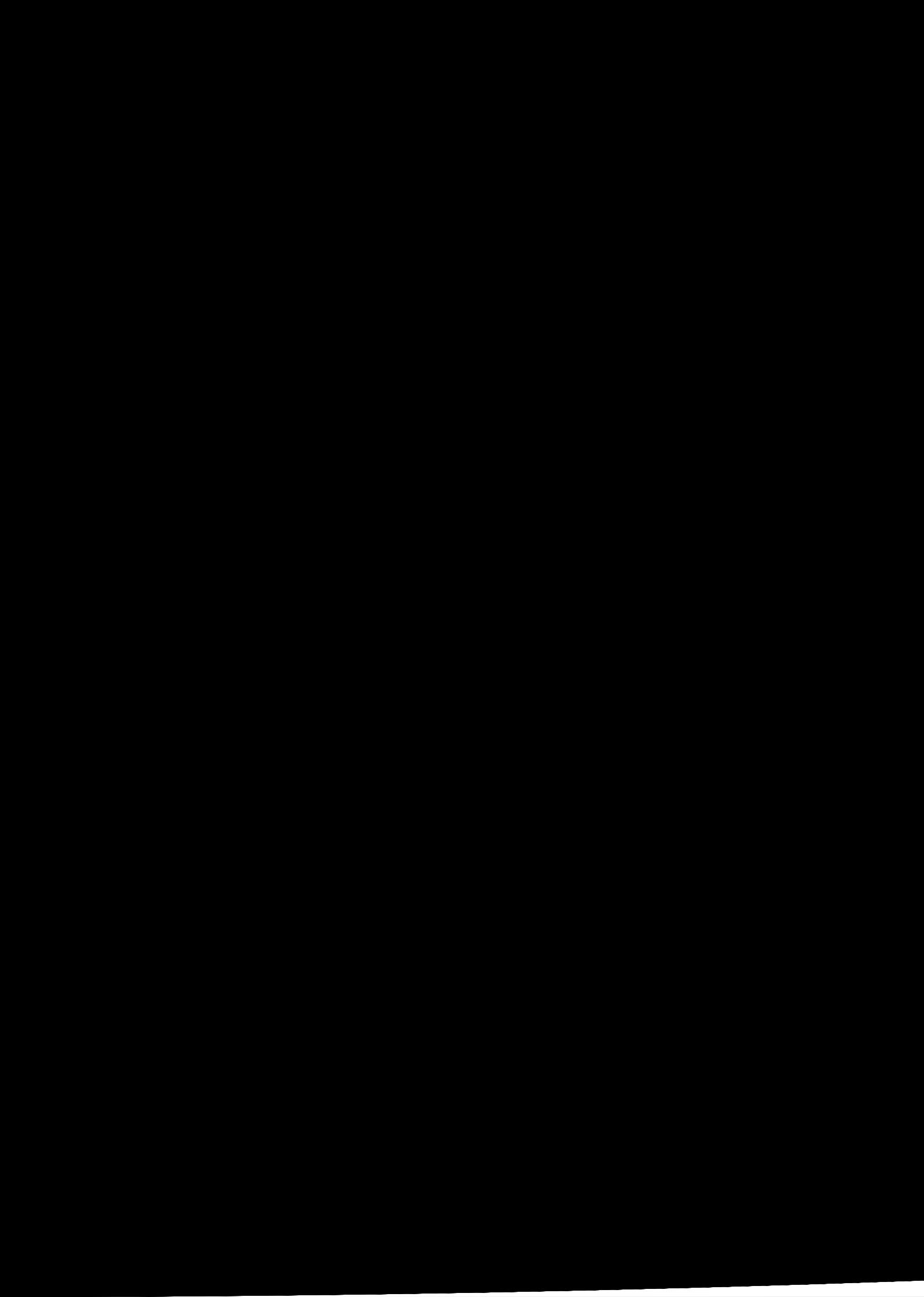
Hasil dan Pembahasan

Propagasi, Reidentifikasi dan Karakterisasi Isolat Virus

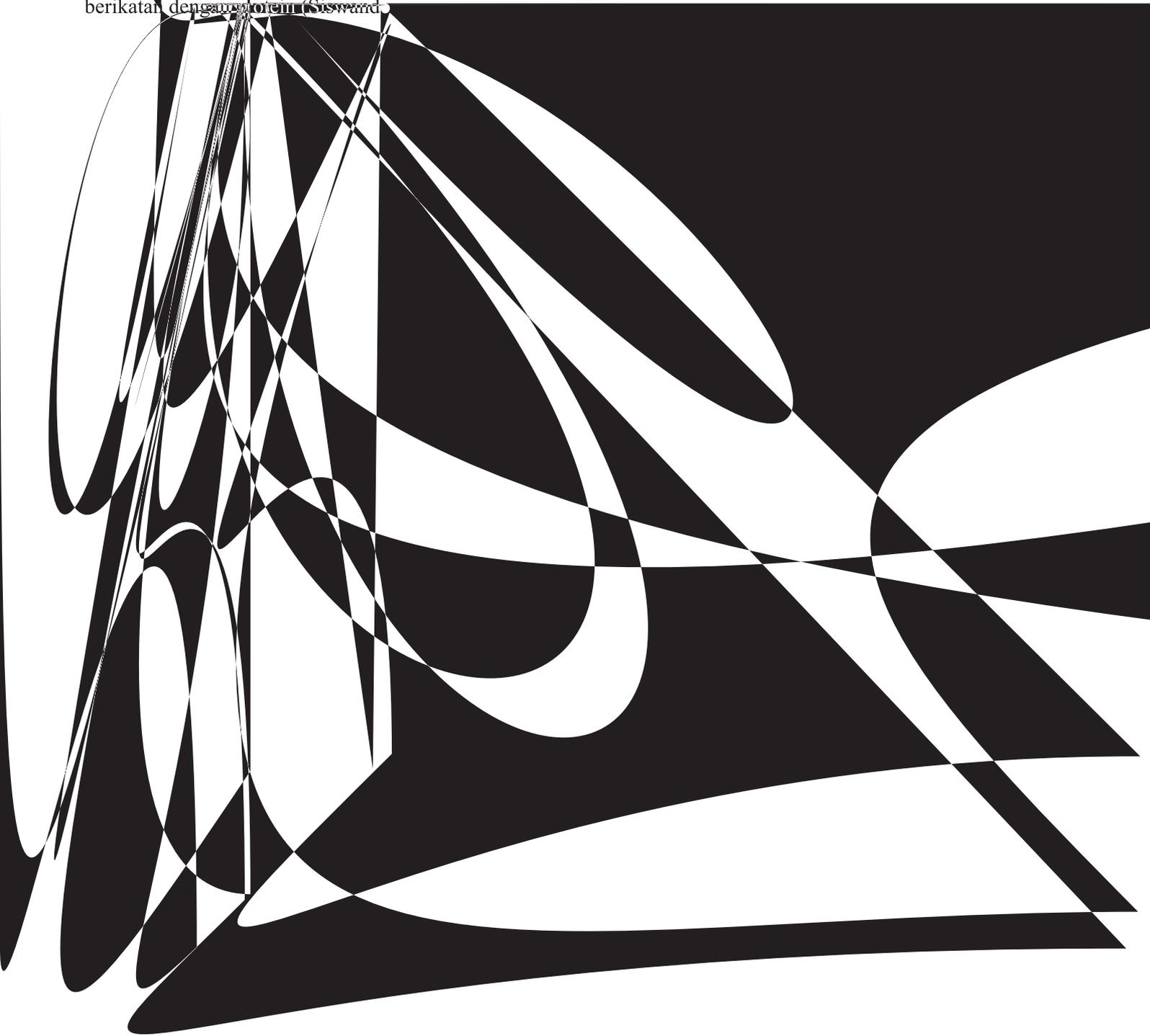
Pengujian secara molekuler menggunakan RT - PCR menunjukkan bahwa isolat virus yang diperoleh adalah virus AI subtype H5N1.

Perlakuan Desinfeksi pada Bulu Unggas dan Analisa Data

Hasil titer kontrol positif, titer setelah perlakuan dengan larutan sodium hipoklorit 775 ppm dan kloroxilenol 0.1% pada hari ke - 0, ke - 3 dan ke - 7 serta indeks inaktivasi yang dihasilkan pada tiap ulangan dapat dilihat pada Tabel 1. Hasil yang ditunjukkan pada tabel 1, perlakuan larutan sodium hipoklorit 775 ppm dan kloroxilenol 0.1% pada hari ke - 0, ke - 3 dan ke - 7, menunjukkan hasil yang efektif dalam menginaktivasi virus AI pada bulu unggas. Hal ini ditunjukkan dengan perolehan nilai indeks inaktivasi pada semua perlakuan lebih dari $2.8 \log_{10}$. Nilai indeks inaktivasi terendah yang diperoleh adalah $3.0 \log_{10}$ dan nilai tertinggi yang diperoleh adalah $7.4 \log_{10}$.



Sodium hipoklorit merupakan desinfektan yang digunakan secara luas. Perlakuan larutan sodium hipoklorit 775 ppm dan kloroxilenol 0.1 % dapat menonaktifkan virus AI pada bulu unggas. Kemampuan germisidal dari sodium hipoklorit disebabkan oleh adanya asam hipoklorit (HOCl) yang terbentuk pada saat penambahan dengan air (H₂O) (Pratiwi, 2008). Asam hipoklorit yang terbentuk akan membebaskan senyawa Cl yang akan berikatan dengan protein (Siswandu, 2010).



- Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 2.3.4. Avian Influenza. <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>. diakses pada tanggal 28 April 2016.
- Pratiwi ST. 2008. Mikrobiologi Farmasi. Erlangga. Jakarta. Indonesia: 135 - 147.
- Reed LJ, Muench H. 1938. A simple method of estimating fifty percent end points. *Am. J. Hyg.* 27: 493 - 497
- Siswandono, Soekardjo B. 2000. Kimia Medisinal. Volume ke - 2. Airlangga University Press. Surabaya. Indonesia: 7 - 82.
- Slomka MJ, Coward VJ, Banks J, Londt BZ, Brown IH, Voermans J, Koch G, Handberg KJ, Jorgensen PH, Cherbonel-Pansart M et al. 2007. Identification of Sensitive and Specific Avian Influenza Polymerase Chain Reaction Methods Through Blind Ring Trials Organized in the European Union. *Avian Dis.* 51: 227-234.
- Suarez DL, Spackman E, Senne DA, Bulaga L, Welsch AC, Froberg K. 2003. The effect of various disinfectants on the detection of avian influenza virus by real time RT-PCR. *Avian Dis.* 47: 1091-1095.
- Tong S, Li Y, Rivaller P, Conrardy C, Castillo DAA, Chen LM, Recuenco S, Ellison JA, Davis CT et al. 2012. A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109: 4269-4274.
- Van den Berg T. 2009. The role of the legal and illegal trade of live birds and avian products in the spread of avian influenza. *Rev. Sci. Tech.* 28: 93-111.
- Wanaratana S, Tantilertcharoen R, Sasipreeyajan J, Pakpinyo S. 2010. The inactivation of avian influenza virus subtype H5N1 isolated from chickens in Thailand by chemical and physical treatments. *J. Vetmic.* 140: 43-48.
- [WHO] World Health Organization. 2007. Recommendations and laboratory procedures for detection of avian influenza A(H5N1) virus in specimens from suspected human Cases. . diakses pada tanggal 6 Juni 2017.
- Yamamoto Y, Nakamura K, Yamada M, Mase M. 2010. Persistence of avian influenza virus (H5N1) in feathers detached from bodies of infected domestic ducks. *Appl Environ Microbiol.* 76: 5496-5499.