

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Penyakit pada burung

Menurut Aguirre (2009), ancaman utama kepunahan pada spesies endemik suatu pulau dihubungkan dengan predasi, kompetisi atau kerusakan habitat serta introduksi penyakit dan vektor penyakit. Penyakit pada burung dapat diakibatkan karena infeksi parasit, bakteri, dan virus. Contoh parasit yang menginfeksi burung adalah *Haemoproteus*, *Leucocytozoon*, *Plasmodium* (Malaria unggas), *Cheilosporira gymnorhina*, *Syngamus trachea*, *Toxoplasma gondii*, *Ectoparasites*, *Atoxoplasma*, dan *Babesia*. Penyakit pada burung yang diakibatkan oleh bakteri adalah *Yersiniosis*, *Necrotic Enteritis*, *Chlamydiosis*, sedangkan penyakit pada burung yang disebabkan oleh virus adalah *Psittacine Beak and Feather Disease* (PBFD), Poxvirus, dan Adenovirus (Rose, 2005).

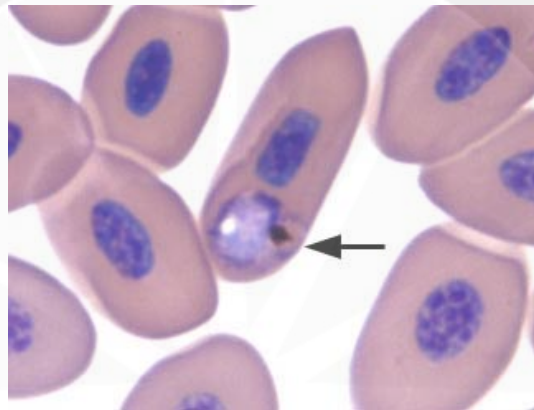
Malaria dapat menyerang mulai dari hewan melata, pengerat (rodensia), primata, burung, dan manusia (Jennings *et al.*, 2006). Malaria umumnya ditemukan dalam darah burung yang hampir dijumpai pada setiap benua kecuali Antartica (Bennett *et al.*, 1993). Pada daerah beriklim empat musim malaria unggas terutama ditemukan pada musim semi, panas, dan gugur. Pada daerah tropik, penyakit malaria unggas dapat ditemukan sepanjang tahun karena vektor serangga dapat berkembang biak dengan baik. Di Australia dan Papua New Guinea kasus malaria unggas ditemukan pada burung keluarga Acanthizidae, Alcedinidae, Columbidae, Meliphagidae, Monarchidae, Pachycephalidae, Petroicidae, dan Ptilonorhynchidae (Beadell *et al.*, 2004).

Malaria burung disebabkan oleh infeksi parasit *Hematozoa* (*Plasmodium* spp. dan *Haemoproteus* spp.). Burung dapat terinfeksi *Plasmodium* dan *Haemoproteus* secara bersamaan tanpa tanda klinis (Jennings *et al.*, 2006). Dampak fisiologis malaria burung meliputi anemia berat, hancurnya eritrosit matang, penurunan konsumsi makanan, dan tingkat aktivitas serta kehilangan berat badan hingga 30 % (Atkinson *et al.*, 2000)

1. *Plasmodium* spp.

Plasmodium pada burung umumnya ditularkan oleh nyamuk *Culex* (Atkinson dan van Riper 1991; Telford *et al.*, 1997). Nyamuk dapat menginokulasi sporozoit masuk ke dalam darah burung melalui sistem retikuloendothelial burung. Setiap sporozoit kemudian berkembang menjadi ribuan merozoit (daur *pra-erythrocytic*). Merozoit pecah dan menyerang sel inang dan sel endotel atau sel lain dari sistem retikuloendothelial. Merozoit yang pecah pada sel inang dan kemudian masuk ke dalam eritrosit dalam aliran darah, ini mengawali daur *intraerythrocytic*. Merozoit menggandakan diri dalam sel darah merah, membentuk *schizont* (*shizogony*). *Schizont* akan pecah, membunuh dan melepaskan merozoit untuk menginfeksi lebih banyak sel darah merah. Selama *schizogony*, parasit hidup pada sitoplasma sel darah merah, mencerna hemoglobin yang menghasilkan butiran pigmen coklat. Daur *intraerythrocytic* berlanjut sampai inang mati atau parasit ditekan oleh kekebalan inang. Setelah daur *intraerythrocytic* dalam eritrosit, beberapa merozoit berkembang menjadi sel-sel seksual (*mikrogametes* dan

makrogametes) dengan masing-masing daur baru. Sel seksual dipelihara dalam sel darah merah sampai mereka dikonsumsi oleh nyamuk yang menghisap darah (Jennings *et al.*, 2006). Replikasi *Plasmodium* berlangsung di dalam eritrosit yang bersirkulasi, sedangkan *Haemoproteus* di dalam sel endotel (Atkinson dan van Riper, 1991; Valkiunas, 1997). Bentuk gametosit *Plasmodium* spp. dalam sel darah merah dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Bentuk gametosit *Plasmodium* spp. dalam sel darah merah (↑)
(Sumber: Jennings *et al.*, 2006)

Penelitian pada parasit malaria unggas genus *Plasmodium* telah berkembang pesat dari akhir abad ke-19, ketika organisme ini ditemukan (Palinauskas *et al.*, 2008). Banyak studi diadakan pada pertengahan abad ke-20, tidak hanya bertujuan untuk mengevaluasi daur hidup, vektor dan mekanisme dari efek malaria pada spesies burung yang berbeda, tetapi juga untuk pencarian obat anti malaria untuk manusia (Garnham, 1966). Mayoritas studi dilakukan pada *Plasmodium gallinaceum*, *Plasmodium juxtanucleare*, *Plasmodium durnae*, *Plasmodium lophurae*, dan *Plasmodium hermani* yang berkembang dalam peternakan unggas (Permin dan Juhl, 2002). Beberapa studi

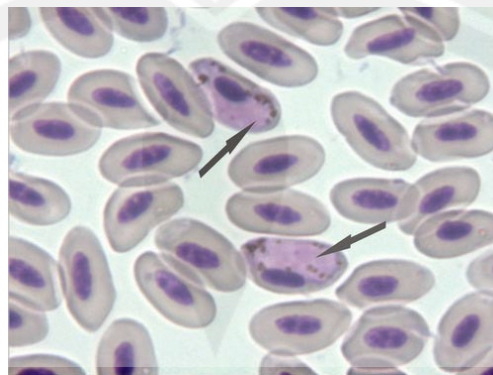
juga dilakukan pada *P. cathemerium*, *P. rouxi* pada burung kenari dan *P. relictum* pada burung-burung kepulauan Hawaii (Atkinson *et al.*, 1995). Pada akhir abad ke-20, mayoritas studi terhadap parasit malaria unggas dan haemosporidian lainnya telah dikembangkan berdasarkan pada koleksi materi burung yang terinfeksi secara alami (Palinauskas *et al.*, 2008).

2. *Haemoproteus* spp.

Haemoproteus spp. adalah protozoa intraseluler, parasit hemotropik yang menginfeksi sel darah merah burung, kura-kura, dan reptil (Bowman, 2003; Friend dan Franson, 1999). *Haemoproteus* spp. *Plasmodium* spp., dan *Leucocytozoon* spp. termasuk marga Haemosporidia (Weisman *et al.*, 2007). Lebih dari 120 spesies *Haemoproteus* diketahui dan paling sering ditemukan pada burung (Swayne dan Fadly, 2003). Parasit darah ini ditemukan di seluruh dunia dan mampu menginfeksi berbagai burung termasuk *gamebirds* (*Galliformes*), burung air (*Anseriformes*), *raptors* (*Accipitriformes*, *Falconiformes*, *Strigiformes*), burung dara dan merpati (*Columbiformes*), dan burung bertengger atau burung berkicau (*Passeriformes*). Infeksi *Haemoproteus* spp. tidak menghasilkan tanda-tanda klinis yang signifikan (Weisman *et al.*, 2007).

Haemoproteus ditularkan oleh serangga penghisap darah termasuk nyamuk genus *Culicoides* (Friend dan Franson, 1999). Penularan tergantung pada kehadiran vektor dan infeksi terjadi lebih sering pada bulan yang lebih hangat sepanjang tahun (Weisman *et al.*, 2007). Tahap infeksi *Haemoproteus*

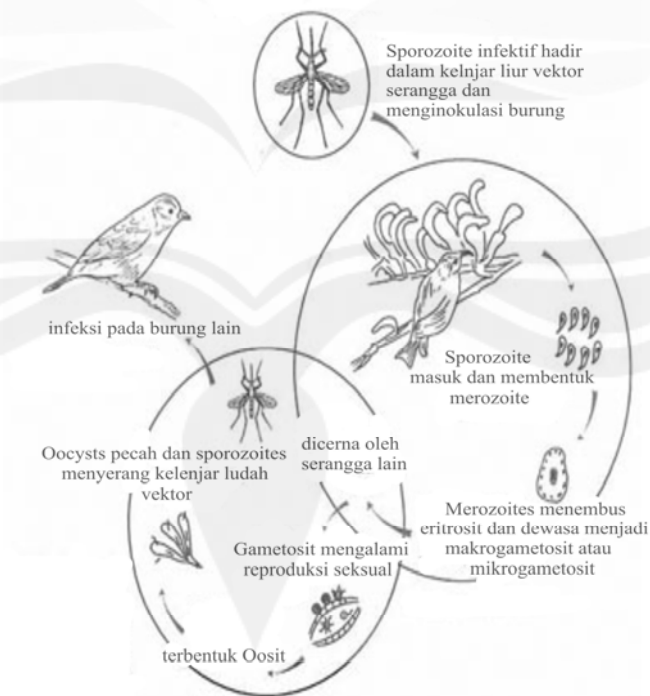
adalah sporozoit yang ada dalam kelenjar liur vektor serangga (Friend dan Franson, 1999). Setelah vektor serangga menggigit inang baru, sporozoit memasuki aliran darah inang dan menyerang sel-sel endotel pembuluh darah dalam berbagai jaringan termasuk paru-paru, hati, dan limpa (Friend dan Franson, 1999; Campbell, 1998). Dalam sel endotel, sporozoit melewati reproduksi aseksual untuk menjadi *schizont* yang kemudian menghasilkan banyak merozoit. Merozoit menembus eritrosit dan dewasa menjadi makrogametosit atau mikrogametosit (Eldridge dan Edman, 2000). Gametosit kemudian dapat dicerna oleh serangga lain pengisap darah di mana mereka menjalani reproduksi seksual di *midgut* dari serangga untuk menghasilkan *oocysts*. *Oocysts* pecah dan melepaskan banyak sporozoit yang menyerang kelenjar ludah dan berfungsi sebagai agen infeksi berikutnya untuk inang yang lain setelah serangga mengambil makanan berupa darah berikutnya (Friend dan Franson, 1999). Bentuk gametosit *Haemoproteus* spp. dalam sel darah merah dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Bentuk gametosit *Haemoproteus* spp. dalam sel darah merah (↑)
(Sumber: Tarello, 2007)

B. Vektor Malaria Unggas

Vektor malaria adalah nyamuk yang dapat menimbulkan dan menularkan suatu *infectious agent* dari sumber infeksi kepada inang (Nurmaini, 2003). Keberadaan vektor ini sangat penting karena kalau tidak ada vektor maka penyakit tersebut tidak akan menyebar. Infeksi *Plasmodium* yang terjadi pada burung-burung yang diteliti di kepulauan Hawaii diketahui ditularkan oleh nyamuk *Culex quiquefasciatus* (Warner, 1968). Daur hidup parasit malaria unggas melibatkan 2 macam inang, yaitu inang perantara (vertebrata, unggas) dan inang serangga (Gambar 3). Perkembangan aseksual dan bentuk seksual muda terjadi di dalam inang perantara, sedangkan fertilisasi dan bentuk seksual dewasa terjadi di dalam tubuh vektor (Friend dan Franson, 1999).



Gambar 3. Daur kompleks parasit *Hemosporidian* (Sumber: Friend dan Franson, 1999).

C. Burung Madu Sriganti

Burung berperan dalam membantu pemulihan vegetasi yang rusak dengan cara membantu tanaman dalam penyerbukan, contohnya burung madu yang dapat membantu penyerbukan bunga tanaman (Abrahamson, 1989). Keberadaan burung madu di Indonesia sebagai negara tropis tidak lepas dari adanya tumbuhan. Contohnya di lereng gunung Tangkubanparahu-Jawa Barat, ada 4 jenis tumbuhan yang dijadikan sumber makanan oleh burung madu, yaitu: *Calliandra calothyrsus*, *Brugmansia suaveolens*, *Melastoma malabathricum* dan *Dischaeta leprosa* (Oktaviani, 2002), sedangkan di lereng gunung Merapi beberapa spesies tanaman berbunga menjadi sumber makanan bagi burung madu sriganti, yakni: *Erythrina variegata*, *Calliandra calothyrsus*, *Schima wallichii* dan *Spathodea campanulata* (Sitepu, 2009).

Burung madu sriganti (*Cinnyris jugularis*) dalam bahasa Inggris sering disebut *Olive-backed Sunbird* atau *Yellow-bellied Sunbird*. Secara umum burung madu diartikan sebagai sekelompok burung bertengger yang biasanya memakan nektar dari tanaman berbunga. Mereka datang berpasangan atau kelompok kecil dan terbang dengan cepat (Wells, 2007).

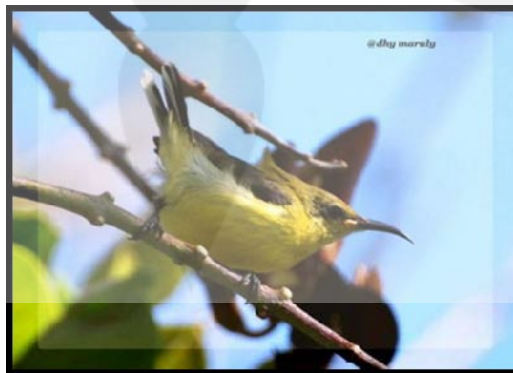
Burung madu sriganti dapat ditemukan pada dataran rendah hingga ketinggian 1700m. Habitatnya adalah daerah semak belukar, hutan mangrove, hutan hujan, di tepi hutan, lahan pertanian, perkebunan kelapa, dan kebun. Selain madu, burung madu sriganti juga memakan buah-buahan kecil, serangga kecil termasuk keluarga locustidae, ngengat dan laba-laba (Cheke *et al.*, 2001). Burung madu sriganti dapat menghisap serbuk sari dari dalam bunga dan menangkap

serangga yang lebih kecil dengan menggunakan lidah yang panjang yang dapat dijulurkan jauh melebihi paruh (Cheke *et al.*, 2001).

Tubuh burung madu sriganti berukuran kecil (10 cm). Pada burung jantan, warna tubuh bagian bawah kuning terang, dagu dan dada hitam-ungu metalik, punggung hijau zaitun. Pada burung betina, warna tubuh bagian bawah kuning, tanpa warna hitam pada dagu dan dada. Alis biasanya kuning muda (MacKinnon *et al.*, 1992). Perbedaan jantan dan betina pada burung madu sriganti dapat dilihat pada Gambar 4 dan 5.



Gambar 4. Burung madu sriganti jantan (Sumber: Taufiqurahman, 2009).
Keterangan: dagu dan dada hitam-ungu metalik.



Gambar 5. Burung madu sriganti betina (Sumber: Maruly, 2009).
Keterangan: tanpa warna hitam pada dagu dan dada.

Menurut Chasen (1938) dalam RedList IUCN (2010), burung madu sriganti secara sistematika adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Chordata
Subphylum	: Vertebrata
Class	: Aves
Order	: Passeriformes
Family	: Nectariniidae
Genus	: <i>Cinnyris</i>
Species	: <i>Cinnyris jugularis</i>

Burung madu sriganti tersebar di kepulauan Andaman dan Nikobar, Nusa Tenggara, Sumatera, New Guinea, seluruh Sulawesi dari permukaan laut hingga ketinggian 800 m, selatan Laos dan di pulau-pulau Salomo, Cina, Asia tenggara, Semenanjung Malaysia, Filipina, Australia, Kalimantan, Jawa, Bali, Maluku, dan Papua. Peta penyebaran burung madu sriganti dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Peta penyebaran burung madu sriganti (Sumber: Cheke *et al.*, 2001).
Keterangan: Warna hitam sebagai daerah sebaran burung madu sriganti.

D. Metode Diagnosis Malaria

Spesies *Haemoproteus*, *Plasmodium*, dan *Leucocytozoon* memiliki hubungan genetik yang dekat. Deteksi infeksi *Leucocytozoon* dalam darah menggunakan metode okuler tradisional sangat sulit dilakukan karena parasit ini memiliki periode hidup yang singkat yakni 3-4 hari (Fallis dan Desser, 1977; Valkiunas 1997). Walaupun sulit dideteksi, secara umum parasit *Leucocytozoon* dapat ditemukan pada populasi burung di wilayah yang beriklim sedang di belahan bumi utara (Rintamaki *et al.*, 1998; Deviche *et al.*, 2001).

Metode diagnosis parasit malaria unggas dapat dilakukan secara langsung dan tidak langsung. Metode secara langsung untuk menunjukkan parasit malaria yakni berdasarkan metode PCR dan mikroskopik. Metode mikroskopik masih dipertimbangkan dalam diagnosis malaria karena parasit malaria unggas benar-benar terlihat dalam sel darah merah tetapi sangat sulit untuk mendeteksi infeksi dengan parasitemia yang rendah karena jumlah parasit yang sangat sedikit (5 parasit/ μ l). Metode PCR yang mengamplifikasi bagian spesifik dari DNA parasit menyebabkan metode ini lebih sensitif dibandingkan metode mikroskopik, tetapi membutuhkan biaya yang sangat mahal, konsumsi waktu, dan membutuhkan tambahan langkah *sequencing* untuk memastikan produk berasal dari DNA parasit (Atkinson *et al.*, 2001).

Metode secara tidak langsung digunakan untuk menunjukkan infeksi malaria termasuk teknik serologi yang menghadirkan antibodi pada parasit. Teknik serologi yang digunakan pada diagnosis malaria unggas di kepulauan Hawaii yakni *Enzyme Linked Immunosorbant Assay* (ELISA) (Kilpatrick *et al.*,

2006) dan *Western Blotting* (Atkinson *et al.*, 2001). *Western Blotting* adalah teknik serologi yang paling spesifik untuk malaria unggas dan dapat digunakan untuk memastikan metode ELISA dan PCR (Atkinson *et al.*, 2001).

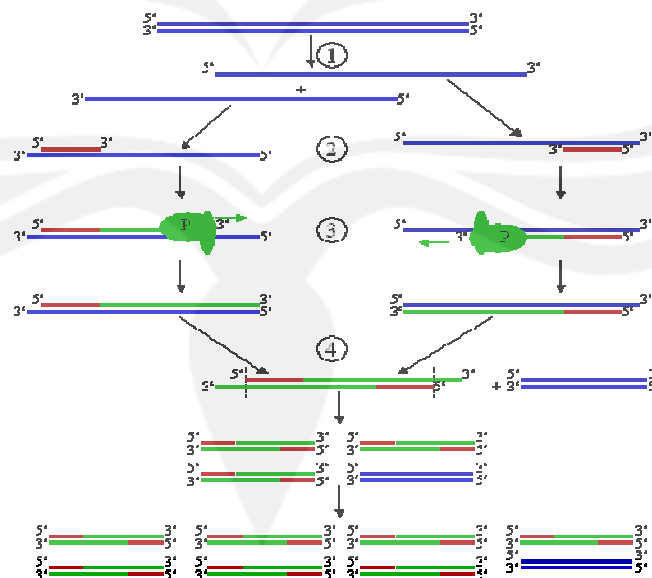
Teknologi DNA memberikan pengaruh besar pada beberapa bidang parasitologi termasuk identifikasi dan sistematika parasit, diagnosis infeksi, studi epidemiologi, dan studi resistensi (Gasser dan Zhu, 1999). Masalah penentuan jenis parasit dalam darah saat ini dapat di atasi dengan metode molekuler, yang biasanya jauh lebih sensitif daripada prosedur mikroskopis (Richard *et al.*, 2002). Metode tersebut, khususnya, menyebabkan terjadinya revolusi penelitian bidang parasitologi dan diketahui mempunyai kegunaan yang luas karena sensitifitasnya dalam mengamplifikasi gen atau fragmen gen dari sejumlah kecil material parasit (Mullis *et al.*, 1986). Deteksi infeksi malaria dengan pendekatan molekuler menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dapat mempermudah identifikasi keberadaan parasit *Plasmodium* dan *Haemoproteus* walaupun jumlah parasit yang terdapat dalam sampel darah sedikit (5 parasit/ μ l).

E. PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Teknik PCR didasarkan pada amplifikasi fragmen DNA spesifik saat terjadi penggandaan jumlah molekul DNA pada setiap siklusnya secara eksponensial dalam waktu yang relatif singkat (Watson *et al.*, 1992; Retnoningrum, 1997). Teknik ini sangat ideal untuk mengidentifikasi patogen dengan cepat dan akurat. Prinsip dasar PCR terdiri dari 4 komponen utama (Erllich, 1989) yaitu: (1) DNA *template* yaitu fragmen DNA yang akan

dilipatgandakan, (2) primer yaitu suatu sekuen oligonukleotida pendek (15-25 basa nukleotida) yang digunakan sebagai pemula sintesis rantai DNA, (3) deoksiribonukleotida Trifosfat (dNTP) terdiri atas dATP, dCTP, dGTP, dTTP dan (4) enzim DNA *polymerase* yaitu enzim yang melakukan katalis reaksi sintesis rantai DNA.

Secara garis besar PCR terdiri dari tiga langkah yang dilakukan secara bersamaan (Anonim, 1995) yaitu: (1) denaturasi awal, yaitu pemanasan awal pada suhu 95°C untuk mendenaturasi kompleks DNA secara komplit, (2) penempelan primer (*primer annealing*) pada suhu 55-72°C, (3) polimerisasi untai baru DNA oleh DNA *polimerase*, yaitu secara normal dilakukan pada suhu 72°C (merupakan suhu optimal Taq DNA *polimerase*). Jumlah siklus yang diperlukan oleh sebagian besar PCR adalah 25-40 siklus. Secara skematis proses PCR sebagai berikut (Gambar 7):



Gambar 7. Skema proses PCR (Sumber: Rice, 2005).

Keterangan: 1= tahap denaturasi awal, 2= tahap penempelan primer, 3= tahap pemanjangan DNA, 4= daur ke-1 proses PCR.

Untuk dapat menganalisis hasil dari amplifikasi PCR dilakukan proses elektroforesis. Elektroforesis adalah suatu teknik pemisahan fragmen DNA, RNA, atau protein. Prinsip dasar dari elektroforesis adalah memisahkan molekul berdasarkan muatan listrik. Elektroforesis DNA biasanya digunakan untuk memisahkan DNA berdasarkan perbedaan ukurannya (Clark, 2005). Sebelum dielektroforesis, sampel DNA yang diambil terlebih dahulu dicampur dengan *loading dye*. *Loading dye* merupakan pewarna pelacak yang ikut bermigrasi di sepanjang gel, bermuatan negatif seperti DNA dan berfungsi sebagai petunjuk seberapa jauh proses elektroforesis berlangsung, selain itu *loading dye* juga berfungsi sebagai pemberat supaya DNA dapat masuk ke dalam sumuran.

Deteksi dan identifikasi parasit malaria unggas diketahui dari konstruksi primer dengan target gen cytochrome b (*cyt-b*) yang ditemukan pada genome mitokondrial parasit dan dengan menggunakan PCR memungkinkan penyaringan spesies *Leucocytozoon* dengan spesies *Haemoproteus* dan *Plasmodium* pada sampel darah unggas (Hellgren *et al.*, 2004).

Teknik molekuler ini juga telah digunakan untuk membedakan antara parasit alami dan introduksi dalam populasi myna (*Acridotheres tritis*) (Ishtiaq *et al.*, 2006) dan untuk mendeteksi penularan silang spesies antara burung migran dan penetap (Waldenstrom *et al.*, 2002). Aplikasi metode molekuler berdasarkan PCR memberikan informasi sekuen yang memungkinkan untuk identifikasi parasit spesifik di bawah level spesies yang tidak mungkin dilakukan menggunakan morfologi parasit itu sendiri (Bensch dan Akesson, 2003). Untuk studi haematozoa unggas telah diungkapkan hingga level keanekaragaman

genetik. Keanekaragaman genetik ini telah dimanfaatkan untuk mengungkapkan hubungan filogenetik (Perkins dan Schall, 2002).

F. Nested PCR

Nested PCR merupakan variasi dari reaksi *polymerase chain reaction* biasa (PCR). *Nested* PCR menggunakan dua pasang primer, sedangkan pada PCR biasa hanya menggunakan sepasang primer. Hasil fragmen DNA dari *nested* PCR lebih spesifik dan waktu yang diperlukan dalam reaksi *nested* PCR lebih lama dibandingkan dengan PCR biasa (Anonim, 2009a). Keuntungan penggunaan *nested* PCR dapat meminimalkan kesalahan amplifikasi fragmen DNA dengan menggunakan dua pasang primer. Mekanisme kerja *nested* PCR adalah bekerja menggunakan dua pasang primer untuk mengamplifikasi fragmen DNA spesifik melalui dua proses PCR secara terpisah. *Nested* PCR memiliki aplikasi dalam bidang kesehatan dan identifikasi parasit. Beberapa contoh aplikasi yang menggunakan pendekatan *nested* PCR antara lain adalah penelitian tentang tingginya tingkat prevalensi malaria burung pada populasi liar gelatik Jawa (Yuda, 2009), penentuan karakteristik genetik protozoa pada *Falco naumanni* (Ortego *et al.*, 2007), diagnosis penyakit *Extrapulmonary tuberculosis* yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis* (Therese *et al.*, 2005), deteksi *Taenia solium* pada penyakit taeniasis (Mayta *et al.*, 2008), dan diagnosis leptospirosis (Nassi, 2003).