

**PENGGUNAAN CAIRAN EMPEDU SAPI UNTUK PRODUKSI SPOROZOIT *Eimeria tenella*
MELALUI EKSITASI *IN VITRO***

**THE USE OF CATTLE BILE FLUID FOR EXCYTATION OF *Eimeria tenella* sporozoites
THROUGH IN VITRO EXCYTATION**

Sunandjak¹, Joko Prastowo²

¹Mahasiswa Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada Yogyakarta
²Bagian Parasitologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

ABSTRAK

Sebanyak 20 ml cairan empedu sapi dan 5 ml larutan tripsin 0,4% telah digunakan untuk memproduksi sporozoit *Eimeria tenella* melalui eksitasi *in vitro*. Sporosista terkonsentrasi sebanyak 0,20 ml dicampur dengan 25 ml cairan empedu sapi dan 5 ml larutan tripsin 4% dalam suhu inkubator 41°C dalam interval waktu 60, 90, 105 dan 120 menit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa produksi sporozoit tertinggi yaitu 2×10^4 /ml tercapai pada menit ke-105 dan produksi menurun 15 menit kemudian.

Kata kunci: cairan empedu sapi, eksitasi *in vitro*, sporozoit, *Eimeria tenella*, *in vitro*

ABSTRACT

The cattle bile fluid in 20 ml and 5 ml of solution of tripsine was used to produce sporozoits *Eimeria tenella* through *in vitro* excitation. Amount 0,20 ml concentrated sporocysts mixed with 20 ml of cattle bile fluid and tripsin 4% in incubator 41°C in interval time 60, 90, 105 and 120 minutes. The result showed that the peak production of sporozoits in 2×10^4 /ml was reached in 105 minutes and decreased in next 15 minutes.

Key word: cattle bile fluid, excytation, sporozoits, *Eimeria tenella*, *in vitro*

PENDAHULUAN

Eimeria tenella (*E. tenella*) adalah koksidia yang paling patogen pada ayam (Levine, 1961). Tanda yang menciri dari koksidiosis ini adalah berat badan menurun, anoreksia dan berak berdarah. Selain itu ditemukan adanya mukosa sekum yang berdarah, nekrosis fibrinogen, dinding menebal dan lumen terisi dengan darah (Flynn, 1973). Pada infeksi berat yang ditandai dengan berak darah dapat menimbulkan anemia dan kematian. Kematian yang terjadi pada ayam tergantung pada umur dan jumlah oosista yang menginfeksi (Soulby, 1986). Pada ayam muda kematian dapat mencapai 32-90% (Flynn, 1973) bahkan dapat mencapai 100%. Pada ayam dewasa ditandai dengan penurunan produksi telur dan berat badan (Lapage, 1956). Kerugian ekonomi di Amerika Serikat akibat koksidiosis mencapai US 34.854000 per tahun (Levine, 1995) dan menurut Gordon (1977) peternakan unggas seluruh dunia mengalami kerugian ekonomi akibat koksidiosis mencapai 50-100 juta poundsterling.

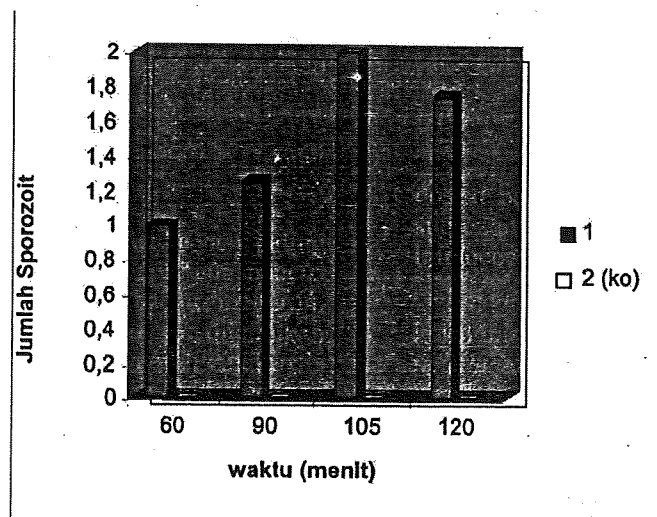
Berbagai usaha telah dilakukan untuk pengendalian dan pencegahan koksidiosis, diantaranya dengan pemberian koksidostat baik melalui makanan dan minuman (Flynn, 1973) maupun dengan cara vaksin (Shirley sitasi Prastowo, 1998).

Beberapa vaksin yang sudah pernah dilakukan dalam skala laboratorium adalah vaksin utuh (Shirley sitasi Prastowo, 1998) dan vaksin berbentuk sporosista (Saadi sitasi Prastowo, 1998). Menurut McDougald Dan Reid (1991) penggunaan vaksin langsung yang dicampur pakan atau air minum dengan pemberian oosista yang disinari dengan sinar ultraviolet dapat meningkatkan imunitas alami melalui infeksi ringan

oosista pada ayam muda. Selain itu dengan pemberian sporozoit yang dilemahkan ataupun dengan coccivac, immococc atau paracocs.

Sampai sekarang vaksinasi terhadap koksidiosis dilakukan dengan pemberian oosista *E. tenella* dengan dosis rendah dan berulang-ulang. Kendala yang dihadapi dalam pengembangan vaksin salah satunya adalah sulitnya ketersediaan sampel sporozoit (Prastowo, 1999). Ketersediaan sporozoit dapat dilakukan dengan proses eksitasi *in vitro* dengan membuat kondisi lingkungan yang mirip dengan saluran pencernaan ayam, seperti suhu tubuh, adanya sari empedu dan tripsin. Oleh karena itu perlu diupayakan usaha eksitasi sporozoit *in vitro* yang relatif mudah dan murah. Menurut Xie sitasi Cahyaningsih dan Utami (1999) eksitasi *in vitro* sporozoit *E. tenella* dapat dilakukan dengan bantuan kerja empedu ayam, empedu babi, empedu sapi dan taurodeoksikholat (TDC) yang dikomersilkan. Hasil eksitasi *in vitro* sporozoit *E. tenella* tersebut yang paling baik menggunakan taurodeoksikholat, namun harganya mahal. Sedangkan untuk eksitasi *in vitro* sporozoit *E. tenella* dengan menggunakan empedu babi dan ayam dibutuhkan jumlah empedu yang banyak. Selain itu juga karena empedu sapi yang ada di rumah potong hewan, selama ini masih dianggap sebagai limbah pada umumnya, yang tidak ada manfaatnya maka peneliti menganggap perlu untuk melakukan penelitian tentang pemanfaatan cairan empedu sapi untuk eksitasi *in vitro* sporozoit *E. tenella*.

Dengan diketahui bahwa kombinasi cairan empedu sapi dan tripsin dapat mengeksitasi *in vitro* sporozoit *E. tenella* diharapkan dapat lebih efisien,



Gambar 1. Grafik hasil eksitasi sporozoit *E. tenella* dengan menggunakan empedu sapi
 Keterangan : 1. Eksitasi sporozoit menggunakan 20 ml cairan empedu sapi dengan 5 ml larutan tripsin 4% ,
 2. Kontrol (eksitasi enggunakan 20 ml cairan empedu sapi tanpa larutan tripsin).

hemat biaya dalam usaha penyediaan sampel sporozoit dan juga dapat meningkatkan nilai dan daya guna empedu sapi itu sendiri. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui eksitasi *in vitro* sporozoit dari *E. tenella* oleh kombinasi cairan empedu sapi dan larutan tripsin.

MATERI DAN METODE

Untuk memperbanyak oosista *E. tenella* digunakan ayam strain AA dari PT Malindo Feed mill sejumlah 50 ekor. Perbanyak oosista dilakukan dengan menginfeksi secara peroral pada ayam umur 21 hari (3 minggu) dengan 50.000 oosista *E. tenella* yang sudah sporulasi. Pada hari ke 8 pasca infeksi dilakukan pemanenan oosista, baik dari tinja maupun dari sekumnya. Oosista dibersihkan dari material feses dengan cara penyaringan secara bertahap menggunakan saringan berukuran 100 mesh, 200 mesh dan 325 mesh. Hasil penyaringan dibiarkan mengendap selama 12-24 jam. Setelah supernatan dibuang, endapan oosista disporulasikan dengan kalium bikromat 2,5%. Oosista yang telah disporulasikan dibersihkan dari larutan kalium bikromat. Selanjutnya oosista yang sudah bersih dilakukan sterilisasi dengan larutan sodium hipoklorit 13%.

Pengeluaran sporosista dari oosista dilakukan dengan bantuan 30 g *glass beads* ukuran 212-300 m untuk 25 ml sporosista. Setelah dilakukan penghitungan jumlah oosista larutan dimasukan ke dalam tabung yang berisi *glass beads*, digojog secara manual dengan kecepatan dan gerakan tetap selama 0,5 menit. Sebelum dilakukan pemecahan sporosista menjadi sporozoit, terlebih dahulu sporosista dibersihkan dari kotoran dengan cara melakukan sentrifus 1000 rpm selama 5 menit. Endapan hasil sentrifus diambil dan supernatan dibuang.

Cairan empedu yang diperoleh dari Rumah potong hewan dibiarkan pada suhu kamar. 20 ml cairan empedu ditambah 5 ml larutan tripsin 4% dan 1.10^5 sporosista lalu diinkubasikan pada suhu 41°C dengan tahapan waktu yang berlainan yaitu 60 menit, 90 menit, 105 menit dan 120 menit. Setiap tahapan waktu tersebut dihitung jumlah produksi sporozoit yang diperoleh.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Proses eksitasi *in vitro* sporozoit *E. tenella* dilakukan dengan bantuan kerja 20 ml cairan empedu sapi dari rumah potong hewan dan 5 ml larutan tripsin 0,4%. Sebagai kontrol adalah eksitasi *in vitro* sporozoit *E. tenella* dengan cairan empedu tanpa larutan tripsin. Adapun hasil eksitasi *in vitro* sporozoit *E. tenella* terlihat pada gambar 1.

Gambar 1 menunjukkan bahwa ada kenaikan jumlah produksi sporozoit sesuai dengan lamanya proses pengeraman dan mencapai puncak produksi pada menit ke-105, menurun pada 15 menit kemudian.

Eksitasi sporozoit dengan empedu tanpa adanya tripsin, yang berfungsi sebagai kontrol, tidak dihasilkan sporozoit satu pun pada semua tahap eksitasi. Ketidakberhasilan eksitasi sporozoit pada kontrol disebabkan karena tidak adanya tripsin yang berfungsi mempercepat reaksi.

Faktor yang mempengaruhi keberhasilan eksitasi sporozoit tersebut adalah adanya kesesuaian suhu, pH dan keadaan lingkungan empedu dan tripsin dalam kondisi yang optimal. Menurut Poedjadi (1994) suatu reaksi kimia khususnya antara senyawa organik yang dilakukan dalam laboratorium (*in vitro*) memerlukan suatu kondisi yang ditentukan oleh beberapa faktor seperti suhu, pH, tekanan waktu dan lain-lain. Apabila salah satu kondisi tidak sesuai dengan apa yang seharusnya dibutuhkan (tidak optimal) maka reaksi tidak dapat berlangsung dengan baik. Pemecahan sporosista menjadi sporozoit oleh empedu dan enzim tripsin mungkin karena penyusun dari dinding sporosista yang sama dengan penyusun dinding oosista menurut Statish sitasi Eryl (1987) terdiri dari 67% peptida, 14% lipida dan 15% karbohidrat sehingga dapat lisis oleh empedu. Pelisisan dinding sporosista tersebut oleh empedu karena adanya hubungan dengan fungsi empedu sebagai fasilitator untuk digesti lemak dan absorpsi asam lemak, kolesterol, karotene (proses vit A) dan yang terlarut dalam lemak (vit D dan K). Menurut Cantrow A dan Max Trumper (1955) fungsi penting garam empedu adalah sebagai fasilitator untuk digesti lemak, absorpsi asam lemak, kolesterol, karotene (pro vitamin A) dan yang terlarut dalam lemak (vit D dan K). Hal ini diperkuat oleh Current sitasi Cahyaningsih dan Utami (1999) yang mengatakan bahwa enzim tripsin dan empedu diperlukan secara bersamaan agar sumbat badan stiedia mengalami degradasi dan selanjutnya sporozoit keluar melalui pintu yang terbentuk dari degradasi tersebut. Menurut Haslewood sitasi Patton (1979) sebagian herbivora (mamalia) mempunyai dihidroksi garam empedu yang terkonjugasi dengan taurin menjadi taurosenedeoksikolat yang sangat penting untuk eksitasi sporozoit *E. tenella*, Wang sitasi Patton (1979) juga mengatakan bahwa tripsin merupakan enzim yang essensial untuk eksitasi *E. tenella*. Persentase hasil sporozoit maksimal ini adalah sangat sedikit yaitu 6,25%.

Faktor yang menyebabkan adanya pencapaian jumlah tertinggi karena suhu yang optimal untuk kerja empedu dan tripsin, sejalan dengan penambahan waktu pengeraman yang diberikan, dan pada saat pengeraman selama 105 menit di inkubator tersebut dapat tercapai suhu optimalnya. Pada saat itu pula pH optimal tripsin juga tercapai yaitu sekitar 8-11 seperti yang dikatakan Poedjadi (1994) pH optimum tripsin adalah 8-11 sehingga tripsin dapat bekerja dengan kecepatan reaksi yang paling tinggi.

Sedangkan faktor yang menyebabkan terjadinya penurunan sporozoit 15 menit setelah pengeraman 105 menit disebabkan oleh adanya peningkatan suhu dan perubahan pH lingkungan pada larutan empedu dan tripsin pada waktu tersebut yang menyebabkan perubahan keadaan optimal untuk kerja empedu dan tripsin sehingga terjadi penurunan fungsi kerjanya. Sifat dari larutan tripsin itu sendiri yang bisa merusak atau bersifat toksik terhadap sporozoit.

Morfologi sporozoit hasil eksistasi *in vitro* dengan bantuan kerja empedu dan tripsin adalah sebagai berikut: bentuk sporozoit seperti buah pisang dengan satu ujungnya membulat dan ujung yang lain meruncing; ukuran sporozoit panjang 11 m dan lebar 3 m. Menurut Soulsby (1986) sporozoit *E. tenella* berukuran 10x1,5 m dan panjang sporozoit adalah 12,8 m.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat diambil kesimpulan bahwa cairan empedu sapi dapat digunakan untuk memproduksi sporozoit *E. tenella* melalui eksitasi *in vitro* dengan menggunakan larutan tripsin sebagai katalisatornya.

DAFTAR PUSTAKA

- Cahyaningsih dan Sri Utami H, 1999. Penggunaan Sari Empedu Sapi untuk Studi dan Produksi Sporozoit Melalui Eksistasi *in vitro* dari *E. tenella*. *J. Med. Vet.* 29-32
- Cantrow, A. and Max T. 1955. *Clinical Biochemistry*. WB Saunders Company Philadelphia and London
- Eryl, S. R. 1987. Hubungan antara Jumlah Oosista *E. tenella* yang Diinfeksi dengan Jumlah Oosista yang Dieliminasi Serta Gambaran Darah Ayam Pedaging. Tesis Fakultas Pasca Sarjana UGM, Yogyakarta
- Flynn, J. R. 1973. *Parasit of Laboratory Animals*. 4th ed The Iowa State University Press.
- Gordon, R. F. 1977. *Poultry Disease*. 1st edition. Baliere Tindal and Cox, London.
- Lapage, G. 1956. *Veterinary Parasitology*. 1st edition. Oliver and Boyd Edinburg, London.
- Levine, N. D. 1961. *Protozoon Parasites of Domestic Animals and of Man*. Burgess Publishing Company. Minnesota.
- Levine, N. D. 1995. *Protozoology Veteriner Terjemahan dari Veterinary Protozoology Gajah Mada University Press, Yogyakarta*.
- Mc Douggald L.R. and W.M. Reid 1991. *Coccidiosis In Diseases of Poultry* 9th Ed. Iowa State University Press, Amess, Iowa USA.
- Patton W. H. and G. P. Brigman. 1979. The Use of Sodium Taurodeoxycholate for Excystation of *Eimeria tenella* Sporozoites. *J. Parasitology* pp. 526-530
- Prastowo, J., Artama, W.T., Sumartono. 1998. *Produksi Antibodi Monoklonal Terhadap Membran Protein Koksidia Isolat Yogyakarta*. Program Pasca Sarjana, Universitas Gajah Mada, Yogyakarta.
- Prastowo, J. Mufasirin dan Sumartono 1999. Pengaruh Waktu Inkubasi terhadap Eksitasi Sporozoit *Eimeria tenella* Secara *in vitro*. *J. Sain, Vet.* Vol XVI (2). Hal 9-15
- Poedjadi, 1994. *Dasar-dasar Biokimia*. Universitas Indonesia Press, Jakarta
- Soulsby, E. J. I. 1986. *Helminths, Arthropods and Protozoa of Domestic Animals*. 7th edition. Baliere Tindall, London.