

## Profil Hematologi, Kadar Besi (Fe), dan Rasio Mieloid: Eritroid Kuda Hiperimun yang digunakan dalam Produksi Plasma Antisera

### *Hematology, Iron Profiles, and Myeloid: Erythroid Ratio in Hiperimmune Plasma Antisera-producing Horses*

Dinar Arifianto<sup>1\*</sup>, Anita Esfandiari<sup>1</sup>, I Wayan Teguh Wibawan<sup>1</sup>, Amrozi<sup>1</sup>, Maharani<sup>2</sup>, Darsono<sup>2</sup>, Hirawan Setiadi<sup>2</sup>, Agus Setiyono<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis, Institut Pertanian Bogor, Jawa Barat, Indonesia

<sup>2</sup>PT. Bio Farma (Persero), Bandung, Jawa Barat, Indonesia

\*Email: [dinararifianto@apps.ipb.ac.id](mailto:dinararifianto@apps.ipb.ac.id)

Naskah diterima: 14 November 2023, direvisi: 1 Januari 2024, disetujui: 23 Februari 2024

#### Abstract

In the late 19<sup>th</sup> century horses played crucial role in the development of the first antisera against human diphtheria. Until now, horses are still being used to produce various anti-venom, anti-rabies, anti-tetanus, and even anti-SARS CoV-2 serum. Plasma antisera production process begins with injecting immunogen (hyperimmunization) to the horse. Antibody produced were collected from horse and then purified and sterilized for human used. Hyperimmunization causes various side effects, including amyloid fibrils accumulation in various tissues and organs that can disrupt their function. Twelve horses were used in this study and divided into 4 groups. Control group (n=3) consist of horses that had never received hyperimmunization treatment, while the other 9 horses were grouped based on the duration of plasma antisera production (year of hyperimmunization), 3 horses in each group. Group I consist of horses with 2-3 years of production period, group II consist of horses with 4-5 years of production period, and group III consist of horses with 6-7 years of production period. Whole blood with EDTA, serum, and bone marrow aspiration samples were analyzed for total erythrocyte count, Hb, PCV, platelets, iron profiles (serum iron, UIBC, TIBC, transferrin saturation), myeloid:erythroid ratio (M:E) and reticulocyte presentage. Result showed that there were significant differences in total erythrocytes and M:E ratio ( $P < 0.05$ ), whereas Hb, PCV, platelets, iron components, and reticulocyte presentage did not show significant differences ( $P > 0.05$ ). These data shows that hyperimmunization procedure decrease erythrocytes and increase myeloid:erythroid (M:E) ratio in plasma antisera-producing horses.

**Keywords:** antisera; hematology; horse; hiperimmune; iron

#### Abstrak

Kuda merupakan salah satu hewan yang penting dalam produksi plasma antisera sebagai bahan baku pembuatan serum. Akhir abad ke-19 kuda berperan krusial dalam pengembangan serum pertama terhadap penyakit difteri manusia. Hingga saat ini kuda masih digunakan untuk memproduksi berbagai serum anti-venom, anti-rabies, anti-tetanus, hingga anti-SARS CoV-2. Proses produksi plasma antisera diawali dengan injeksi imunogen pada kuda yang disebut dengan hiperimunisasi. Antibodi dalam jumlah besar yang terbentuk dikoleksi kemudian dipurifikasi untuk digunakan pada manusia. Hiperimunisasi menimbulkan berbagai efek samping, diantaranya adalah penimbunan fibril amiloid pada berbagai jaringan yang dapat mengganggu fisiologi dan fungsi organ tubuh. Sebanyak 12 ekor kuda digunakan dalam penelitian ini dan dibagi menjadi 4 kelompok. Kuda kontrol (n=3) terdiri atas kuda yang belum pernah mendapatkan perlakuan hiperimunisasi, sedangkan 9 kuda lainnya dikelompokkan berdasarkan lamanya waktu produksi plasma antisera dengan metode hiperimunisasi (masing-masing kelompok berjumlah 3 ekor). Kelompok I terdiri atas kuda dengan

masa produksi 2-3 tahun, kelompok II terdiri atas kuda dengan masa produksi 4-5 tahun, dan kelompok III terdiri atas kuda dengan masa produksi 6-7 tahun. Sampel darah, serum, dan aspirasi sumsum tulang dianalisis untuk menghitung nilai eritrosit, Hb, PCV, trombosit, profil besi (besi serum, UIBC, TIBC, saturasi transferin), rasio mieloid:eritroid (M:E) dan persentase retikulosit. Analisis statistik menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan pada parameter eritrosit dan rasio M:E ( $P < 0,05$ ), sedangkan nilai Hb, PCV, trombosit, persentase retikulosit, dan profil besi tidak ditemukan perbedaan yang signifikan ( $P > 0,05$ ). Data tersebut menunjukkan bahwa perlakuan hiperimunitisasi menyebabkan penurunan eritrosit dan peningkatan nilai rasio mieloid:eritroid (M:E) pada kuda penghasil plasma antisera.

**Kata kunci:** antisera; besi; hematologi; hiperimun; kuda

## Pendahuluan

Pada tahun 1890, kuda memainkan peranan penting dalam perkembangan serum untuk mengobati penyakit difteri (*Corynebacterium diphtheriae*) pada manusia (Warmuth *et al.*, 2012; Kaufmann 2017). Antisera kuda yang didapatkan dengan teknik antibodi poliklonal digunakan sebagai bahan serum imunisasi pasif manusia pada berbagai kasus infeksi bakterial, viral, maupun toksin biologis (Lonker *et al.*, 2020). Hewan produksi plasma antisera diberi perlakuan hiperimunitisasi dengan imunogen tertentu untuk mendapatkan imunoglobulin spesifik, dan setelah melalui berbagai proses pemurnian imunoglobulin tersebut digunakan untuk pasien manusia (Costa *et al.*, 2021). Hingga saat ini telah dikembangkan serum anti-venom, anti-rabies, anti-tetanus, anti-SARS CoV-2, dan berbagai jenis antisera lain dari hewan kuda (Sieda dan Soliman 2017; Soto *et al.*, 2021). Paparan terhadap imunogen hiperimunitisasi dalam waktu yang lama pada kuda produksi plasma antisera akan menyebabkan kerusakan pada organ, diantaranya hati dan limpa (Hablovarid *et al.*, 2017; Moreira *et al.*, 2019) akibat amiloidosis. Amyloidosis merupakan kelompok penyakit akibat protein *missfolding* yang membentuk timbunan fibril amyloid pada jaringan ekstraseluler (Murakami *et al.*, 2013). Amiloid terdiposisi sebagai matriks ekstraseluler yang menyebabkan kerusakan dan gangguan fungsi organ (Woldemeskel 2012). Beberapa kasus diantaranya berupa ruptur organ dan kematian (Cacelia *et al.*, 2014). Evaluasi efek samping hiperimunitisasi penting dilakukan untuk meminimalkan penurunan kondisi kesehatan kuda produksi plasma antisera, sehingga kuda dapat diistirahatkan apabila

sudah menunjukkan penurunan kesehatan secara laboratorik meskipun belum muncul secara klinis. Nilai eritrosit, Hb, PCV, trombosit merupakan parameter hematologi sederhana yang dapat digunakan sebagai bahan evaluasi patologi klinik adanya gangguan sistemik termasuk peradangan kronis yang terjadi karena proses hiperimunitisasi. Profil besi (besi serum, UIBC, TIBC, dan saturasi transferin) dapat digunakan untuk melihat sejauh mana regulasi besi di dalam tubuh, sedangkan rasio mieloid eritroid (rasio M:E) dan persentase retikulosit dapat digunakan untuk melihat adanya masalah produksi sel darah pada sumsum tulang. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui sejauh mana efek hiperimunitisasi pada kuda produksi plasma antisera memengaruhi nilai eritrosit, Hb, PCV, trombosit, profil besi (besi serum, UIBC, TIBC, saturasi transferin), rasio mieloid:eritroid (M:E) dan persentase retikulosit.

## Materi dan Metode

### Hewan Penelitian

Hewan yang digunakan dalam penelitian ini 12 ekor kuda lokal dewasa dengan dengan berat badan berkisar 250-300 kg, dan umur antara 8-15 tahun. Kuda dalam penelitian ini merupakan kuda produksi plasma antisera yang sudah tidak aktif lagi digunakan (9 ekor) dan kuda yang bukan merupakan produksi plasma antisera (3 ekor). Kuda-kuda tersebut merupakan hibah dari PT. Bio Farma (Persero). Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan etik yang tertuang dalam surat kelayakan etik SKHB IPB nomor: 028/KEH/SKE/IX/2022. Kuda dibagi menjadi 4 kelompok (masing-masing kelompok 3 ekor) berdasarkan lama durasi paparan imunogen saat digunakan sebagai kuda produsen antisera.

**Tabel 1.** Data 12 ekor kuda yang digunakan dalam penelitian. Kuda dibagi menjadi 4 kelompok berdasarkan lama paparan (waktu produksi) sebagai penghasil plasma antisera.

Data kuda	Kontrol (n=3) Produksi 0 th.	Kel. I (n=3) Produksi 2-3 th.	Kel. II (n=3) Produksi 4-5 th.	Kel. III (n=3) Produksi 6-7 th.
<b>Usia</b>				
Mean (tahun)	9	13	11	14
Median (tahun)	7	12	12	13
Rentang usia (tahun)	6-14	12-15	9-12	13-16
<b>Jenis kelamin</b>				
Jantan (ekor)	0	2	3	2
Betina (ekor)	3	1	0	1
<b>Jenis imunogen</b>				
Tetanus (ekor)	0	1	0	1
Difteri (ekor)	0	0	1	0
<i>Naja</i> (ekor)	0	0	0	1
<i>Bungarus</i> (ekor)	0	0	1	1
<i>Ankistrodon-Bungarus-Naja</i> (ekor)	0	2	1	0

Jenis kelamin, umur kuda, dan jenis imunogen diabaikan. Kelompok kontrol adalah kuda yang belum pernah digunakan untuk produksi antisera (produksi 0 tahun). Kelompok I merupakan kuda yang pernah digunakan untuk produksi plasma antisera selama 2-3 tahun, kelompok II dengan masa produksi 4-5 tahun, dan kelompok III dengan masa produksi 6-7 tahun (Tabel 1).

### Metode Hiperimunisasi

Proses hiperimunisasi (sepenuhnya dilakukan oleh PT. Bio Farma-Persero) dilakukan dengan cara menyuntikkan imunogen dalam kurun waktu tertentu selama digunakan sebagai hewan produksi antisera. Kuda yang telah diberi perlakuan hiperimunisasi diambil darahnya, kemudian dilakukan pemisahan antara plasma dan komponen sel darah. Setelah terpisah sel darah dilarutkan dalam NaCl Fisiologis 0,9% sesuai dengan volume plasma yang diambil. Larutan tersebut kemudian ditransfusikan kembali pada kuda yang sama. Protokol produksi imunogen, metode hiperimunisasi, dosis pemberian, hingga menjadi produk imunoglobulin siap edar sesuai dengan prosedur WHO *Technical Report Series* no. 1004 tahun 2017 dan dikerjakan oleh PT. Bio Farma (Persero). Imunogen yang digunakan dalam penelitian ini adalah toksoid tetanus, toksoid difteri, anavenom ular *Naja*, anavenom ular *Bungarus*, dan anavenom *Agkistrodon-Bungarus-Naja* (poli-spesifik).

### Pemeriksaan Hematologi

Sampel darah diambil dari vena jugularis, disimpan ke dalam tabung *tripotassium ethylene diamine tetraacetic acid* ( $K_3$ EDTA) sebanyak 3 mL dan sebanyak 5 mL dimasukkan ke dalam tabung *gel separation tube* untuk memisahkan serum. Pemeriksaan hematologi meliputi pemeriksaan jumlah eritrosit, kadar hemoglobin (Hb), nilai *packed cell volume* (PCV), dan jumlah trombosit. Analisis dilakukan menggunakan penghitung hematologi otomatis Abaxis HM5™ dengan metode *impedance*.

### Pemeriksaan Profil Besi (Fe)

Pemeriksaan profil besi terdiri atas besi serum, *unsaturated iron-binding capacity* (UIBC), *total iron-binding capacity* (TIBC), dan saturasi transferin. Pemeriksaan besi serum dan UIBC menggunakan metode *enzymatic colorimetric assay*. Nilai TIBC diperoleh dengan rumus  $TIBC = \text{besi serum} + \text{UIBC}$ . Nilai saturasi transferrin diperoleh dengan rumus  $\text{saturasi transferrin (\%)} = \frac{\text{besi serum}}{TIBC} \times 100\%$ .

### Pemeriksaan Sumsum Tulang

Kuda disedasi detomidine 1% sebanyak 0,5 mL secara IV dan anestesi lokal lidocaine HCl pada daerah tusukan pengambilan sampel. Sternebrae ke-5 pada daerah sternum dilubangi dengan *Jamshidi bonemarrow needle* (11G, 4-in). Cairan sumsum tulang diambil menggunakan

sput 20 mL. Cairan sumsum tulang diteteskan pada *object glass* kemudian diratakan. Sampel kemudian difiksasi dengan metanol dan diwarnai dengan Giemsa 10%. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop cahaya dengan menghitung rasio mieloid:eritroid (rasio M:E) dan persentase retikulosit. Penghitungan rasio M:E dilakukan dengan menghitung sel-sel yang masuk dalam kelompok sel mieloid (mieloblast, promielosit, mielosit, metamielosit, *band cell*, neutrofil, eosinofil, dan basofil), dan kelompok sel eritroid (proeritroblast, basofilik eritroblast, polikromatofilik eritroblast, normoblast, dan retikulosit). Perhitungan dilakukan dengan mengelompokkan 500 sel yang ditemukan berdasarkan jenisnya. Jumlah sel-sel mieloid yang terhitung dibagi dengan jumlah sel-sel eritroid yang terhitung. Persentase retikulosit dihitung melalui penghitungan persentase sel retikulosit yang ditemukan pada apus sumsum tulang.

#### Analisis Statistik

Analisis data dilakukan secara deskriptif dan analitis. Perbandingan data kelompok kontrol, I, II, dan III dianalisis dengan menggunakan Uji Kruskal Wallis. Apabila terdapat perbedaan, maka analisis dilanjutkan dengan menggunakan Uji Mann Whitney. Pengolahan data dilakukan dengan menggunakan *software* SPSS.

### Hasil dan Pembahasan

Hasil pemeriksaan jumlah eritrosit menunjukkan adanya penurunan gradual dari kelompok kontrol hingga kelompok III (Gambar 1A). Analisis statistik menunjukkan bahwa terdapat

perbedaan yang signifikan pada parameter jumlah eritrosit ( $P < 0,05$ ), namun tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada kadar Hb, nilai PCV dan jumlah trombosit ( $P > 0,05$ ). Jumlah eritrosit yang berbeda signifikan ditemukan antara kelompok kontrol dengan kelompok II dan kelompok kontrol dengan kelompok III. Hal tersebut menunjukkan bahwa penurunan jumlah eritrosit terjadi setelah masa produksi mencapai 4-5 tahun (Tabel 2). Menurut (Aros *et al.*, 2017) nilai normal jumlah eritrosit kuda adalah  $6,87 \pm 1,11$  juta/mm<sup>3</sup>. Tabel 2 menunjukkan rata-rata jumlah eritrosit pada kelompok III (produksi 6-7 tahun) di bawah batas kisaran normal. Hal tersebut menunjukkan bahwa kuda pada kelompok tersebut mengalami anemia. Individu dinyatakan mengalami kondisi anemia apabila didapati jumlah eritrosit, Hb, maupun PCV berada di bawah batas normal (Padalino *et al.*, 2016).

Paparan imunogen dalam proses hiperimunitisasi menyebabkan respon inflamasi sistemik. Komponen protein fase akut yang paling dominan muncul pada proses inflamasi kuda adalah serum amiloid A (SAA) (Oertly *et al.*, 2021). Serum amiloid A (SAA) diproduksi di hepar oleh hepatosit. Produksi SAA distimulasi oleh dua jenis sitokin proinflamasi yaitu *interleukin-1* (IL-1) dan *tumor necrosis factor alpha* (TNF $\alpha$ ) (Filho *et al.*, 2022). Selama proses inflamasi, SAA dalam serum dapat meningkat ratusan kali dari konsentrasi normal (Woldemeskel 2012). Proses inflamasi kronis yang terjadi terus menerus dalam proses hiperimunitisasi akan menyebabkan IL-1 dan TNF $\alpha$  diproduksi secara masif dan berulang sehingga menyebabkan terjadinya gangguan

**Tabel 2.** Rataan jumlah eritrosit, kadar hemoglobin, nilai PCV, dan jumlah trombosit kuda berdasarkan durasi paparan imunogen saat digunakan sebagai kuda produksi plasma antisera.

Parameter	Mean dan SD Pengukuran Hematologi					P
	Kontrol	Kelompok I	Kelompok II	Kelompok III	Nilai	
	(Prod. 0 th.)	(Prod. 2-3 th.)	(Prod. 4-5 th.)	(Prod. 6-7 th.)	Normal	
Eritrosit (juta/mm <sup>3</sup> )	8,38 ± 0,74 <sup>a</sup>	7,93 ± 0,77 <sup>ab</sup>	6,98 ± 0,38 <sup>b</sup>	6,43 ± 0,56 <sup>b</sup>	6,87 ± 1,11	0,048*
Hb (g/dL)	14,4 ± 1,27	14,43 ± 0,83	12,8 ± 2,34	10,06 ± 0,3	12 ± 16,2	0,103
PCV (%)	40,72 ± 4,85	36,74 ± 3,82	34,64 ± 5,7	29,61 ± 1,27	33,6 ± 5,1	0,134
Trombosit (ribu/mm <sup>3</sup> )	112,67 ± 18,14	92 ± 26,05	80,33 ± 14,74	115,67 ± 19,85	107 ± 22	0,248

Keterangan: Tanda (\*) menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan pada taraf uji Kruskal Wallis ( $P < 0,05$ ). Huruf *superscript* yang serupa pada baris yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan pada taraf uji Mann-Whitney, sedangkan huruf *superscript* yang berbeda menunjukkan ada perbedaan yang signifikan pada uji Mann-Whitney. Nilai normal (Aros *et al.* 2017).

pada proses eritropoiesis dalam sumsum tulang (Walton *et al.*, 2021). Konsentrasi SAA yang tinggi dalam jangka waktu lama juga menyebabkan deposisi fibril amiloid ekstraseluler di berbagai organ dan jaringan tubuh (Zheng *et al.*, 2016).

Tabel 3 menunjukkan rata-rata parameter profil besi pada semua kelompok kuda. Hasil analisis statistik menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada besi serum, UIBC, TIBC, maupun saturasi transferin ( $P>0,05$ ). Rataan masing-masing parameter profil besi pada kuda semua kelompok masih dalam batas kisaran normal. Konsentrasi besi serum pada kisaran 105-277  $\mu\text{g/dL}$  (Borges *et al.*, 2007), UIBC pada kisaran 125-178  $\mu\text{g/dL}$  (Harvey *et al.*, 2008), TIBC pada kisaran 230-455  $\mu\text{g/dL}$  (Harvey *et al.*, 2008), dan % saturasi transferin pada kisaran 21-48% (Theelen *et al.*, 2018). Parameter % saturasi transferin walaupun tidak berbeda nyata ( $P>0,05$ ), namun pada kuda kelompok III (Produksi 6-7 tahun) cenderung memiliki rata-rata persentase tertinggi. Inflamasi kronis dalam kasus infeksi alami lebih berpotensi untuk memengaruhi komponen besi dalam tubuh melalui mekanisme *hepcidin upregulation* di mana IL-6 dan IL-10 akan

menyebabkan penurunan absorpsi besi ( $\text{Fe}^{2+}$ ) intestinum dan meningkatkan penyimpanan besi ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ke dalam makrofag (Walton *et al.*, 2021).

Proses eritropoiesis juga dihambat oleh beberapa sitokin diantaranya *interferon gamma* ( $\text{IFN-}\gamma$ ), *transforming growth factor-}\beta* ( $\text{TGF-}\beta$ ), dan  $\text{TNF-}\alpha$ . Aksi  $\text{IFN-}\gamma$  dan  $\text{TGF-}\beta$  diperantarai melalui jalur protein kinase teraktivasi mitogen p38, sedangkan  $\text{IFN-}\gamma$  bekerja melalui jalur *Janus-associated* kinase (JAK/STAT). Aktivasi jalur ini menyebabkan produksi faktor intraseluler yang meningkatkan apoptosis melalui regulasi transkripsi dan pada akhirnya menyebabkan supresi mieloid (Galushko 2014). Sitokin IL-6 telah diketahui sebagai bagian terpenting dalam patogenesis anemia pada inflamasi kronis. Sitokin tersebut merupakan inhibitor  $\text{TNF-}\alpha$  yang poten dan menginduksi transkripsi feritin yang menyebabkan peningkatan retensi serta penyimpanan zat besi di dalam sel retikulo-endotel (Kumar dan Bhoi, 2016). Sitokin-sitokin tersebut menginduksi apoptosis pada *erythroid burst-forming unit* dan *colony-forming unit*. Aksi tersebut sebagian diperantarai oleh aksi ceramide serta penurunan jumlah reseptor eritropoietin di dalam prekursor sel eritroid (Yanatori *et al.*, 2023). Kehadiran

**Tabel 3.** Rataan kadar besi serum, UIBC, TIBC, dan saturasi transferin berdasarkan lama durasi paparan imunogen saat digunakan sebagai kuda produksi plasma antisera.

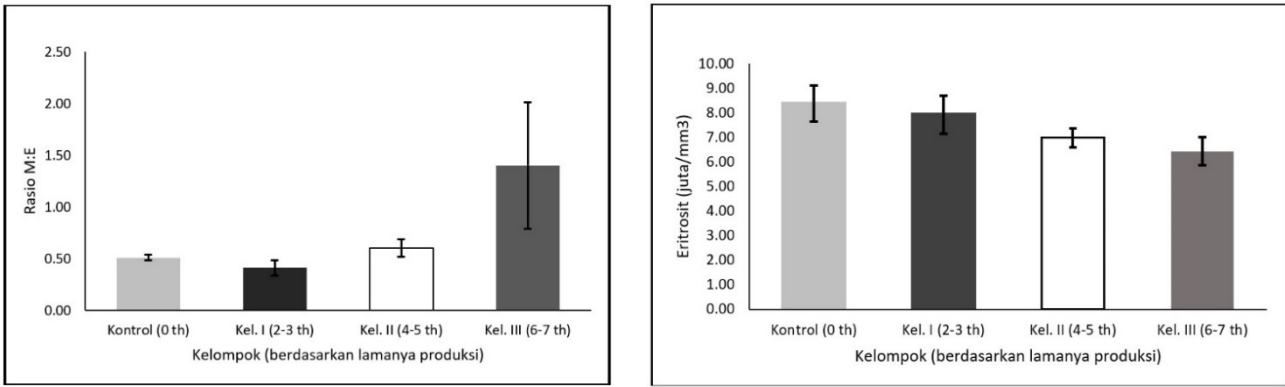
Parameter	Mean dan SD Profil Besi					Normal	P
	Kontrol (Prod. 0 th.)	Kelompok I (Prod. 2-3 th.)	Kelompok II (Prod. 4-5 th.)	Kelompok III (Prod. 6-7 th.)	Nilai		
Besi serum ( $\mu\text{g/dL}$ )	177,3 $\pm$ 47,9	138,3 $\pm$ 18,7	168,3 $\pm$ 31,1	191,3 $\pm$ 81,4	105-277	0,578	
UIBC ( $\mu\text{g/dL}$ )	138 $\pm$ 16,5	160,3 $\pm$ 32,6	135,7 $\pm$ 8,3	129 $\pm$ 55,4	125-178	0,789	
TIBC ( $\mu\text{g/dL}$ )	315,3 $\pm$ 32,1	298,7 $\pm$ 27,6	304 $\pm$ 30,8	320,3 $\pm$ 26,3	230-455	0,779	
Sat. Transferin (%)	55,3 $\pm$ 9,6	46,3 $\pm$ 7,8	55,3 $\pm$ 5,1	58,7 $\pm$ 20,1	21-48	0,507	

Keterangan: UIBC=*unsaturated iron-binding capacity*; TIBC=*total iron-binding capacity*.

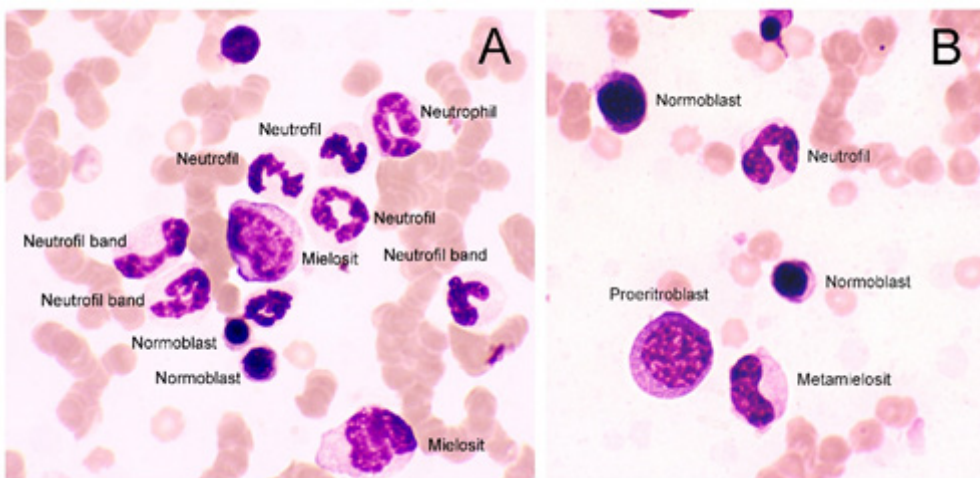
**Tabel 4.** Rataan rasio M:E dan persentase retikulosit berdasarkan lama durasi paparan imunogen saat digunakan sebagai kuda produksi plasma antisera.

Parameter	Mean dan SD					Normal	P
	Kontrol (Prod. 0 th.)	Kelompok I (Prod. 2-3 th.)	Kelompok II (Prod. 4-5 th.)	Kelompok III (Prod. 6-7 th.)	Nilai		
Rasio M:E	0,51 $\pm$ 0,03 <sup>ab</sup>	0,41 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	0,6 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>	1,4 $\pm$ 0,6 <sup>c</sup>	<0,5	0,025*	
Retikulosit (%)	3,11 $\pm$ 0,54	3,05 $\pm$ 0,29	2,99 $\pm$ 1,13	2,91 $\pm$ 0,88	>3	0,933	

Keterangan: Tanda (\*) menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan pada taraf uji Kruskal Wallis ( $P<0,05$ ). Huruf *superscript* yang serupa pada baris yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan pada taraf uji Mann-Whitney, sedangkan huruf *superscript* yang berbeda menunjukkan ada perbedaan yang signifikan pada uji Mann-Whitney. Nilai normal rasio M:E dan retikulosit (Walton *et al.* 2021).



**Gambar 1.** A) Grafik perbandingan nilai jumlah eritrosit antar kelompok berdasarkan lamanya durasi paparan imunogen saat digunakan sebagai hewan produksi plasma antisera. B) Grafik perbandingan nilai rasio M:E antar kelompok berdasarkan lamanya durasi paparan imunogen saat digunakan sebagai hewan produksi plasma antisera.



**Gambar 2.** Hasil foto sediaan apus sumsum tulang kuda hiperimunisasi memperlihatkan perkembangan hematopoiesis sel-sel mieloid dan eritroid masih tampak normal namun mengalami peningkatan rasio M:E yang signifikan secara statistik. A) Tampak tahap perkembangan sel mieloid (mielosit, neutrofil *band*, neutrofil bersegmen) dan normoblast

IFN juga menyebabkan turunnya kuantitas dan aktivitas eritropoietin serta penurunan ekspresi *growth factor* lain seperti *stem cell factor* (Madu dan Ughasosro 2016).

Gambar 1 A menunjukkan terjadi penurunan secara gradual dari jumlah eritrosit kelompok kontrol hingga kelompok III (produksi 6-7 tahun). Hal tersebut menunjukkan bahwa semakin lama waktu penggunaan sebagai hewan produksi menyebabkan penurunan jumlah eritrosit. Hiperimunisasi yang dilakukan pada kuda penghasil antisera dapat menyebabkan reaksi inflamasi yang mengaktifkan berbagai sitokin pro-inflamasi (IL-1, IL-6, dan TNF- $\alpha$ ) yang akan mengganggu proses eritropoiesis atau disebut sebagai anemia inflamasi kronis (Lavateli *et al.*, 2014). Tabel 4 memperlihatkan terdapat perbedaan yang nyata pada uji Kruskal Wallis rasio M:E ( $P < 0,05$ ), namun persentase

retikulosit tidak menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ( $P > 0,05$ ). Retikulosit pada kuda sangat jarang ditemukan pada sediaan apus darah perifer meskipun kuda mengalami anemia regeneratif, sehingga penentuan jenis anemia (regeneratif atau non-regeneratif) harus dilakukan menggunakan parameter rasio M:E dan persentase retikulosit. Dalam kondisi anemia yang ringan hingga sedang retikulosit kuda sulit ditemukan dalam sirkulasi perifer (Balan *et al.*, 2018). Anemia dikatakan regeneratif apabila rasio M:E  $< 0,5$  dan persentase retikulosit  $> 3\%$ , sedangkan rendahnya persentase retikulosit dengan rasio M:E normal atau tinggi menandakan terjadinya anemia non-regeneratif (Walton *et al.*, 2021). Kelompok II dan III memiliki rata-rata persentase retikulosit  $< 0,3$  yang menandakan kelompok-kelompok tersebut mengalami anemia non-regeneratif. Hal tersebut diperkuat

dengan rataan rasio M:E pada kelompok II dan III yang mengalami peningkatan di atas kisaran normal. Hal tersebut menunjukkan bahwa kuda dengan paparan imunogen selama 4-5 tahun dan 6-7 tahun mengalami anemia non-regeneratif.

### Kesimpulan

Metode hiperimunitisasi pada kuda untuk memproduksi antisera menyebabkan anemia yang ditandai dengan penurunan jumlah eritrosit yang signifikan ( $P < 0,05$ ), meskipun nilai Hb, PCV, trombosit dan persentase retikulosit tidak mengalami perubahan yang signifikan ( $P > 0,05$ ). Lamanya waktu paparan imunogen berpengaruh terhadap rasio mieloid:eritroid sumsum tulang ( $P < 0,05$ ), namun tidak berpengaruh terhadap indeks besi (besi serum, UIBC, TIBC, dan saturasi transferin) ( $P > 0,05$ ). Hal tersebut menunjukkan bahwa perlakuan hiperimunitisasi pada kuda menyebabkan anemia non-regeneratif dengan jalur supresi eritropoiesis sumsum tulang dan tidak memengaruhi profil besi.

### Ucapan Terima Kasih

Kuda yang digunakan dalam penelitian ini adalah hibah dari PT. Bio Farma (Persero). Penelitian ini didanai oleh Beasiswa Pendidikan Indonesia (Kemendikbud Ristek dan Lembaga Pengelola Dana Pendidikan Kementerian Keuangan Republik Indonesia).

### Daftar Pustaka

- Aros K, Carrasco J, Briones R, Tadich TA. 2017. Hematological and serum biochemical reference values for urban-working equines in Chile. *Austral J Vet Sci* (1) 27-33
- Balan M, McCullough M, O'Brien PJ. 2018. Equine blood reticulocytes: reference intervals, physiological and pathological changes. *Comp Clin Pathol*. <https://doi.org/10.1007/s00580-018-2820-4>
- Borges AS, Divers TJ, Stokol T, Mohammed H. 2007. Serum iron and plasma fibrinogen concentration as indicator of systemic inflammatory disease in horses. *J Vet Intern Med* (21) 489-494.
- Cacelia G, Clement MD, Luan D, Truong MD. 2014. An evaluation of Congo red fluorescence for the diagnosis of amyloidosis. *Human Pathology* (45) 1766-1766
- Costa CBP da, Martins FJ, Cunha LER, Ratcliffe NA, Paula RC de, Castro HC. 2021. COVID-19 and hyperimmune sera: a feasible plan to fight against coronavirus. *International immunopharmacology* (20). [doi.org/10.1016/j.intimp.2020.107220](https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.107220).
- Filho WPC, Souto PC, Orozco AMO, Jimenez AKA, Girardi FM, Bento LD, Fonseca LA. 2022. Influence of Short and Medium Distance Road Transport on the Acute Phase Proteins in Horses. *J eq vet sci*. 117. 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2022.104061>
- Galushko EA. 2014. The clinical significance of hepcidin detection in the patients with anemia and rheumatoid arthritis. *Klin Med (Mosk)*. 92: 21-27.
- Hablovarid A, Eslampanah MH, Akbari M. 2017. Prognosis of hepatic amyloidosis status and insufficiency in snake antivenom producing horses. *Razi Institute*. 72(2):113-122.
- Harvey JW. 2008. Iron metabolism and disorders. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 269-270.
- Kaufmann SHE. 2017. Remembering Emil von Behring: from tetanus treatment to antibody cooperation with phagocytes. *Mbio*. (8). [doi:ARTN e00117-1710.1128/mBio.00117-17](https://doi.org/10.1128/mBio.00117-17).
- Kumar M, Bhoi S. 2016. Cytokines, granulocyte-macrophage colony stimulating factor, interleukin-3 and erythropoietin: can they be a therapeutic option for the stimulation of hematopoietic progenitor cells in trauma-hemorrhagic shock? *Indian J Crit Care Med*. 20: 207-209.
- Lavatelli F, Albertini R, Di Fonzo A, Palladini G, Merlini G. 2014. Biochemical markers in early diagnosis and management of systemic amyloidosis. *Clin Chem Lab Med*. 52(11):1517-1531.
- Lonker NS, Fechner K, El Whed AA. 2020. Horses as crucial part of one health. *Vet Sci*. 7(28):1-15.

- Madu AJ dan Ughasoro MD. 2016. Anemia of chronic disease: an in-depth review. *Medical principles and practice* 26: 1-9. DOI: 10.1159/000452104
- Moreira AS, Dreyfus JM, Peek SF. 2019. Suspected hepatic amyloidosis in horse. *Equine veterinary education*. doi: 10.1111/eve.13087.
- Murakami T, Inoshima Y, Sakamoto E, Fukushi H, Sakai H, Yanai T, Ishiguro N. 2013. AA amyloidosis in vaccinated growing chickens. *J comp path*. 149: 291-297. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcpa.2013.02.002>.
- Oertly M, Gerber V, Anhold H, Chan DS, Pusterla N. 2021. The Accuracy of Serum Amyloid A in Determining Early Inflammation in Horses After Long-Distance Transportation by Air. *J eq vet sci*. 97: 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2020.103337>
- Padalino B, Rubino G, Lucinio R, Petazzi F. 2016. A new classification to diagnose type of anemia in standardbred horses: a retrospective study. *Journal of Equine Veterinary Science*. 44: 21-25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2016.03.004>.
- Seida AA, Soliman R. 2017. Hybridomas Producing Monoclonal Antibodies against Tetanus Toxin Replaces the Polyclonal Horse Anti-Tetanic Serum. *ARC Journal of Immunology and Vaccines* (2):1-9
- Soto AM, Arguedas M, Brenes H, Bujan W, Aguilar EC, Diaz C, Echeverri A, Diaz MF, Gomez A, Hernandez A, Marrera M, Leon G, Macaya R, Kuhne A, Mora JAM, Mora J, Sanabria A, Sanchez A, Sanchez L, Segura A, Segura E, Solano D, Soto C, Stynoski JL, Vargas M, Villalta M, Reusken CBEM, Drosten C, Gutierrez JM, Giron AA, Drexler JF. 2021. High efficacy of therapeutic equine hyperimmune antibodies against SARS-CoV-2 variants concern. *Journal Frontiers in Medicine* (8). doi:10.3389/fmed.2021.735853
- Theelen MJP, Beukers M, Grinwis GCM, Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan MM. 2018. Chronic iron overload causing haemochromatosis and hepatopathy in 21 horses and one donkey. *Equine Veterinary Journal*. doi:10.1111/evj.13029
- Walton RM, Cowell RL, Valenciano AC. 2021. Equine hematology, cytology, and clinical chemistry. John Wiley and Son. Hoboken. NJ: 10-11
- Warmuth V, Eriksson A, Bower MA, Barker G, Barrett E, Hanks BK, Li SC, Lomitashvili D, Ochir-Goryaeva M, Sizonov GV, Sayonov V, Manica A. 2012. Reconstructing the origin and spread of horse domestication in the Eurasian steppe. *Proc Natl Acad Sci USA*. 109: 8202–8206. doi:10.1073/pnas.1111122109
- WHO Expert Committee on Biological Standardization: WHO Technical Report Series 1004. 2017. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data.
- Woldemeskel M. 2012. Review of amyloidosis in animals. Hindawi Publishing Corp. *Veterinary Medicine International*. doi:10.1155/2012/427296
- Yanatori I, Kishi F, Toyokuni S. 2023. New iron export pathways acting via holo-ferritin secretion. *Ar biochem biophys*. 746. 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2023.109737>
- Zheng X, Wong G, Zhao Y, Wang H, He S, Bi Y, Chen W, Jin H, Gai W, Chu D, Cao Z, Wang C, Fan Q, Chi H, Gao Y, Wang T, Feng N, Yan F, Huang G, Zheng T, Li N, Li Y, Qian J, Zou Y, Kobinger G, Gao GF, Qiu X, Yang S, Xia X. 2016. Treatment with hyperimmune equine immunoglobulin or immunoglobulin fragments completely protects rodents from Ebola virus infection. *Scientific Report*. 6(24179):1-11. doi: 10.1038/srep24179