

JURNAL SAIN VETERINER

Ketua Dewan Penyunting

Aris Haryanto

Wakil Ketua Dewan Penyunting

Agustina Dwi Wijayanti

Penyunting Pelaksana

Devita Anggraeni

M.Th. Khrisdiana Putri

Hevi Wihadmadyatami

Penny Humaidah Hamid

Konsultan Penyunting

Sentot Santoso (Justus-Liebig-University, Giessen, Jerman)

Tutut Herawan (University of Malaya, Malaysia)

Pelaksana Teknik

Endah Choiriyah

Surohmiatun

Mitra Bebestari

Agung Janika Sitasiwi (Universitas Diponegoro)

Anwar Rosyidi (Universitas Mataram)

Deni Noviana (Institut Pertanian Bogor)

Djoko Winarso (Universitas Brawijaya)

E. Djoko Poetranto (Universitas Airlangga)

Ida Ayu Pasti Apsari (Universitas Udayana)

Iis Arifantini (Institut Pertanian Bogor)

M. Hanafiah (Universitas Syiah Kuala)

Mufasirin (Universitas Airlangga)

Ni Wayan Kurniani Karja (Institut Pertanian Bogor)

Sri Murwani (Universitas Brawijaya)

Tongku N. Siregar (Universitas Syiah Kuala)

JSV terindeks oleh:

Garuda  Scholar



Dicetak oleh:

UPP STIM YKPN

Jl. Palagan Tentara Pelajar Km. 7 Yogyakarta 55581

PENGANTAR REDAKSI

Para pembaca JSV yang budiman dimanapun berada,

Pada JSV Volume 35, Nomor 1 Juni 2017 ini, kami atas nama pribadi dan seluruh anggota dewan penyunting JSV mengucapkan Selamat Hari Raya Idul Fitri 1 Syawal 1438 Hijriah yang tahun ini jatuh pada tanggal 25-26 Juni 2017. Mohon maaf lahir dan batin untuk semua kesalahan dan kekhilafan baik sengaja maupun tidak disengaja. Semoga ke depan kita masih dapat bersilaturahmi melalui publikasi ilmiah di bidang veteriner yang lebih baik dan lebih berkualitas lagi.

Seperti pada terbitan sebelumnya, pada JSV terbitan ini, memuat sebanyak 16 artikel ilmiah dari berbagai bidang veteriner, yaitu bidang histologi, ilmu penyakit dalam, patologi, kesehatan masyarakat veteriner, reproduksi, virologi, bedah veteriner, parasitologi, anatomi dan pengolahan limbah ternak.

Kami selaku dewan penyunting JSV mengundang Bapak/Ibu/Saudara penulis dan kontributor artikel ilmiah untuk mengirimkan manuskrip artikel ilmiah untuk dapat dipublikasikan di JSV pada terbitan mendatang. Kami juga menampung semua kritik, saran dan masukan yang bersifat membangun untuk perbaikan JSV di masa yang akan datang. Kami selalu berharap bahwa kedepan JSV akan selalu berkembang semakin baik dalam mempublikasi artikel artikel ilmiah yang baik, berbobot dan berkualitas tinggi di bidang veteriner.

Terima kasih atas perhatian dan kerjasamanya.

Ketua Dewan Penyunting

DAFTAR ISI

Mozart KV 448 Menurunkan Densitas dan Aktivitas Neuroglia Hipokampus Mencit (<i>Mus Musculus</i>) Selama Stres Prenatal No. 416-KE <i>Shelly Kusumarini R, Lita Rakhma Yustinasari, Tutik Juniasuti</i>	1-8
Studi Gambaran Histopatologis Hepar, Pulmo, Lien dan Otak Serta Uji Serologis pada Tikus (<i>Rattus Norvegicus</i>) yang Diinfeksi <i>Toxoplasma Gondii</i> <i>Sri Hartati, Slamet Raharjo, Irkham Widiyono</i>	9-15
Penyakit Ginjal Kronis pada Anjing dan Kucing: Manajemen Terapi dan Diet <i>Yanuartono, Alfarisa Nururrozi And Soedarmanto Indarjulianto</i>	16-34
Gambaran Histopatologi Rumen dan Retikulum Sapi Bali Akibat Adanya Benda Asing <i>Eldarya Envisari Depari, Annas Farhani, I Wayan Batan, I Made Kardena</i>	35-41
Kemampuan Reagen Curcumax Mendeteksi Boraks dalam Bakso yang Direbus <i>Erna Dwi Astuti, Widagdo Sri Nugroho</i>	42-48
Korelasi Berat Badan dan Umur Sapi Terhadap Berat, Volume Cairan dan Konsentrasi Prostaglandin F ₂ A pada Vesikula Seminalis <i>Naela Wanda Yusria Dalimunthe, Agung Budiyanto, Erna Prawita Setyowati, Agustina Dwi Wijayanti</i>	49-56
Kerusakan Usus pada Mencit (<i>Mus Musculus</i>) yang Diinokulasi Larva 3 (L3) Anisakis SPP. <i>Febrina Dian Permatasari, Poedji Hastutiek, Lucia Tri Suwanti</i>	57-62
Perlakuan Celup Puting Setelah Pemerahan Terhadap Keberadaan Bakteri Patogen, <i>Staphylococcus Aureus</i> , <i>Streptococcus Agalactiae</i> , dan <i>E. Coli</i> pada Sapi Perah Penderita Mastitis Subklinis di Peternakan Kunak Bogor <i>Herwin Pisestyani, Etih Sudarnika, Rachmi Ramadhanita, Abdul Zahid Ilyas, Ardilasunu Wicaksono, Chaerul Basri, Arifin Budiman Nugraha, Mirnawati B. Sudarwanto</i>	63-70
Pengendalian Folikulogenesis Ovarium dengan Pemberian Ekstrak Biji Kapas <i>Siska Adelya Ramadhani, Iman Supriatna, Ni Wayan Kurniani Karja, Adi Winarto, Gusti Ayu Yuniati Kencana, I Nyoman Suartha, Daniel Raja Bonar Nainggolan, Agatha Serena Lumban Tobing</i>	71-90
Ekspresi Il – 1B pada Proses Kesembuhan Fraktur Os Femur Tikus Putih (<i>Rattus Norvegicus</i>) Ovariektomi yang Diterapi dengan Ekstrak Cikal Tulang (<i>Cissus Quadrangularis</i>) <i>Ira Sari Yudaniyanti, Bambang Sektiari Lukiswanto, M. Zainal Arifin</i>	91-101
Ekstrak Air Rumput Kebar (<i>Biophytum Petersianum Klotzch</i>) sebagai Penghambat Perkembangan Telur Cacing Gastrointestinal Ruminansia Secara In Vitro <i>Alnita Baaka, Isti Widayati, Noviyanti</i>	102-110
Morfologi Hemipenis Biawak Air (<i>Varanus Salvator Bivittatus</i>) <i>Mahfud, Adi Winarto, Chairun Nisa</i>	111-117
Pendekatan Diagnosis Avian Influenza Virus dan Newcastle Disease Virus pada Kasus Lapangan Ayam Petelur: Imunopatologis Streptavidin Biotin <i>Maya Ekaningtias, Hastari Wuryastuty, R. Wasito</i>	118-126
Newcastle Disease Virus Detection From Chicken Organ Samples Using Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction <i>Lehgarubini Shanmuganathan, Dito Anggoro, Michael Haryadi Wibowo</i>	127-135
Optimalisasi Waktu Pengomposan dan Kualitas Pupuk Kandang dari Kotoran Kambing dan Debu Sabut Kelapa dengan Bioaktivator Promi dan Orgadec <i>Linda Trivana, Adhitya Yudha Pradhana</i>	136-144

Gambar Depan: Gambaran histopatologi usus mencit dengan pewarnaan HE. hal. 60

Mozart KV 448 Menurunkan Densitas dan Aktivitas Neuroglia Hipokampus Mencit (*Mus musculus*) Selama Stres Prenatal No. 416-KE

Mozart KV 448 decreased densities and activities of hippocampus neuroglia of mice (*Mus musculus*) during prenatal stress No. 416-KE

**Shelly Kusumarini R¹, Lita Rakhma Yustinasari², Eka Pramystha Hestianah²,
Suryo Kuncorojati², Tutik Juniastuti³**

¹ Program Pendidikan Dokter Hewan (PPDH),

²Departemen Anatomi Veteriner,

³Departemen Kedokteran Dasar Veteriner

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

Kampus C UNAIR, Jl. Mulyorejo, 60115,

Telepon 031-5992785, E-mail: lita.yustinasari@gmail.com

Abstract

The aim of this research was to explore the influence of Mozart KV 448 classical music therapy to the neuroglia cells of mice's hippocampus that were exposed to stress during prenatal. This research were employing twenty female mice and twenty male mice. Female mice were estrus synchronized with PMSG and hCG then monomating to the males. Pregnant females were then divided into four groups (P0, P1, P2, P3). P0 was as control, P1 was treated by one minute forced swim test, P2 was treated by one minute forced swim test followed by thirty minutes classical music Mozart KV 448 and P3 was treated by one minute forced swim test followed by sixty minutes classical music Mozart KV 448. This research was carried out for twenty-one days during gestation period. The neuroglia density result was analyzed using ANOVA and *Duncan* test. The neuroglia activity result was analyzed using Kruskal wallis test and Z test. The histology reading showed degradation of density and activity of hippocampus neuroglia.

Keywords: prenatal stress, classical music, Mozart KV 448, neuroglia, hippocampus

Abstrak

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh terapi musik klasik Mozart KV 448 pada densitas dan aktivitas dari sel neuroglia hipokampus anak mencit yang terpapar stres selama prenatal. Penelitian ini menggunakan 20 mencit betina dan 20 mencit jantan. Mencit betina kemudian di sinkronisasi estrus dengan PMSG dan hCG setelah itu dilakukan mono mating. Mencit betina yang positif bunting di bagi menjadi empat kelompok (P0, P1, P2, P3). P0 sebagai kontrol tidak diberikan perlakuan apapun, P1 diberikan terapi *forced swim test* selama satu menit, P2 diberikan terapi *forced swim test* selama satu menit diikuti musik klasik Mozart KV 448 selama 30 menit dan P3 diberikan terapi *forced swim test* selama satu menit diikuti musik klasik Mozart KV 448 selama 60 menit. Penelitian ini dilakukan selama 21 hari periode kebuntingan. Analisis data pada densitas neuroglia menggunakan ANOVA dan uji *Duncan* selanjutnya untuk aktivitas neuroglia data yang diperoleh berupa skor nilai tingkat perubahan aktivitas antar neuroglia sehingga menggunakan uji *Kruskal wallis* dan uji Z. Hasil gambaran histologi dari penelitian ini menunjukkan penurunan terhadap densitas dan aktivitas neuroglia hipokampus.

Kata kunci : stres prenatal, musik klasik, Mozart KV 448, neuroglia, hipokampus

Pendahuluan

Stres prenatal merupakan penyakit yang dialami oleh 15-20 % wanita selama periode kehamilan atau di awal kehamilan (Bennett *et al.*, 2004a,b; Oberlander *et al.*, 2006). Akibat yang ditimbulkan oleh stres prenatal seperti berat badan lahir rendah (BBLR), resiko prematur meningkat dan *neonatal abnormality* dapat membahayakan kesehatan fetus. Selain itu, stres yang parah juga berhubungan dengan obesitas dan disfungsi metabolik pada keturunan. Peristiwa menegangkan yang dialami ibu juga menambah intensitas stres (Kim *et al.*, 2006). Kondisi stres dapat menghambat perkembangan otak janin hingga menyebabkan perkembangan otak yang lambat (*sluggish cognitive tempo*) dan *Attention Deficit Hyperactive Disorder* (ADHD) (Rodriguez and Bohlin, 2005).

Study Neuropsychology mengenai paparan musik pada *Mus musculus* mampu memodulasi perkembangan otak dan neuroplastisitas. Neuroplastisitas dapat terjadi karena rangsangan sensorik dan motorik yang memasuki sistem saraf pusat sehingga terjadi perubahan neuron di otak (Srivastava, 2013; Matthies, 2013). Penelitian yang dilakukan Amagdei *et al.* (2010) menunjukkan musik dapat mengubah cerebral hemodinamik yang mengaktivasi belahan otak kiri dan kanan. Musik klasik dapat memperbaiki fungsi neuron yang rusak pada bagian basolateral amygdala dan hipotalamus tetapi tidak pada morfologi neuron yang telah rusak (Vina, 2012). Alunan musik klasik Mozart Sonata *for two piano D major* KV 448 terbukti meningkatkan kapasitas otak dengan mengaktifkan beberapa jalur sinyal pada *spasio-temporal* (Jaušovec *et al.*, 2006).

Hubungan stres pada periode prenatal dengan sistem maternal dapat dijelaskan melalui mekanisme *Hipotalamus Pituitary Adrenal Axis* (HPA-Axis) (Atkinson and Waddell, 1995). Hipotalamus sebagai

pusat kendali mekanisme hormon di dalam tubuh akan memproduksi hormon *corticotropin releasing factor* (CRF); kemudian hipofise anterior akan menghasilkan *adrenocorticotropic hormon* (ACTH) yang diangkut ke kelenjar adrenal untuk mensekresikan hormon adrenalin. Kelenjar adrenal selain mensekresikan hormon adrenalin juga meningkatkan sekresi glukokortikoid (kortisol), kemudian kortisol tersebut akan memulai serangkaian efek metabolik melalui umpan balik negatif (Tollenaar *et al.*, 2011).

Hipokampus memiliki kepekaan yang tinggi terhadap reseptor glukokortikoid, hal ini menyebabkan hipokampus lebih rentan terhadap kondisi stres dari pada bagian otak lainnya (Rodriguez *et al.*, 2002). Pengaruh yang ditimbulkan oleh glukokortikoid menyebabkan kondisi patologis pada CNS. Neuroglia yang bertugas sebagai *modulator neurosekretory neuron* akan membantu mempertahankan fungsi neuron melalui proses neurogenesis (Huerta *et al.*, 2010). Stres yang dialami hingga akhir kebuntingan mampu menurunkan ekspresi astrosit reaktif dan mengurangi *synaptic density* pada *frontal cortex*, stratum dan hipokampus (Barros *et al.*, 2006).

Penelitian ini bertujuan untuk mengamati pengaruh terapi musik klasik Mozart Sonata KV 448 yang diberikan pada *Mus musculus* bunting yang mengalami stres prenatal terhadap densitas dan aktivitas neuroglia dari hipokampus anak *Mus musculus* yang dilahirkan.

Materi dan Metode

Penelitian ini menggunakan hewan coba mencit (*Mus musculus*) betina sebanyak 20 ekor umur 3 bulan, sedangkan mencit (*Mus musculus*) jantan sebanyak 20 ekor umur 4 bulan, untuk dilakukan mono mating. Mencit di adaptasikan dengan kandang dan

lingkungan dalam laboratorium kandang hewan coba selama empat hari setelah adaptasi kandang selesai pada hari ke lima mencit betina di suntikan hormon PMSG 5 IU 0,1 cc melalui intraperitoneal, kemudian dibiarkan selama 48 jam untuk merangsang proses folikulogenesis. Empat puluh delapan jam setelah penyuntikan PMSG, mencit betina disuntik dengan hCG 5 IU 0,1 cc melalui intraperitoneal, selanjutnya mencit dikawinkan lalu di tunggu hingga muncul *vaginal plug* yang digunakan sebagai parameter terjadinya *mating*, pemeriksaan *vaginal plug* dilakukan lima belas jam setelah penyuntikan hCG.

Perlakuan diawali dengan membagi 20 ekor mencit betina bunting menjadi empat kelompok, yaitu P0 : anak mencit yang lahir dari betina bunting yang tidak mengalami stres prenatal dan tanpa diperdengarkan musik klasik, P1 : Induk bunting yang dibuat stres fisik pada masa kebuntingan dengan berenang satu menit per hari selama kebuntingan 1-20 hari, P2 : Induk bunting yang dibuat stres fisik pada masa kebuntingan dengan berenang satu menit per hari, selanjutnya diterapi musik klasik 30 menit/hari pada hari ke 1-20, P3 : Induk bunting yang dibuat stres fisik pada masa kebuntingan dengan berenang satu menit per hari, selanjutnya diterapi musik klasik 60 menit/hari. Perlakuan tersebut dilakukan pada hari ke 1-20 kemudian pada hari ke 21 mencit akan melahirkan.

Mencit direnangkan dengan batas waktu satu menit. Setelah itu mencit diberi terapi musik klasik Mozart KV 448 D major yang diperdengarkan pada frekuensi datar 20-60 db antara 25-140 kHz dengan jarak efektif 40 cm (Mustofa, 2013). Hasil *Forced Swim test* adalah interpretasi dari imobilitas mencit bunting (Airan *et al.*, 2007). Anak mencit yang terlahir dari induk yang diberi perlakuan diambil satu ekor yang memiliki berat badan tertinggi guna memperoleh bagian kepala anak mencit melalui metode *cervical*

dislocation selanjutnya dibuat sediaan histologi. Berat badan tertinggi merupakan parameter terpenuhinya nutrisi fetus di dalam kandungan.

Tahapan pembuatan preparat histologi yang pertama adalah fiksasi. Tahap selanjutnya adalah dehidrasi dan *clearing* untuk mengeluarkan seluruh cairan yang terdapat dalam jaringan yang telah difiksasi supaya jaringan dapat diisi menggunakan parafin cair kemudian di infiltrasi dan dilakukan pembuatan blok parafin. Proses pengirisan menggunakan mikrotom. Tahapan terakhir adalah pewarnaan menggunakan Haematoxylin Eosin (HE).

Perubahan yang diamati adalah densitas dan aktivitas neuroglia. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop Olympus® CX-41 dengan perbesaran 400x yang dilengkapi dengan optilab mikroskop *digital camera*. Pengamatan dilakukan sebanyak lima lapangan pandang berbeda yang masing-masing memiliki luas area 10.000 μm^2 (100 μm kali 100 μm). Penghitungan pada densitas neuroglia menggunakan *software image raster*. Aktivitas neuroglia merupakan gambaran aktivitas neuroglia disekitar neuron, apabila neuroglia yang mengelilingi neuron menunjukkan peningkatan (neuroglia sebagai sel penyokong dari neuron) berarti aktivitasnya tinggi (Huerta *et al.*, 2010). Tingkat aktivitas neuroglia dihitung berdasarkan skoring (0-2). Aktivitas neuroglia dalam susunan normal (0), Aktivitas neuroglia kurang dari 50% dalam susunan normal (1) dan Aktivitas neuroglia lebih dari 50% dalam susunan normal (2) (Tiina-Riikka *et al.*, 2001).

Hasil dan Pembahasan

Rata-rata densitas neuroglia pada P0 adalah 160.3600 ± 31.54819 ; P1 adalah 137.6800 ± 36.53946 ; P2 adalah 108.7600 ± 34.38878 , sedangkan

P3 adalah 82.0000 ± 29.55030 . Berdasarkan hasil analisis ANOVA menunjukkan adanya perbedaan yang tidak signifikan diantara perlakuan ($p < 0,01$), pada P0 (160.3600 ± 31.54819) memberikan hasil tertinggi terhadap densitas neuroglia yang diikuti dengan P1 (137.6800 ± 36.53946) dan P2 (108.7600 ± 34.38878), sedangkan P3 (82.0000 ± 29.55030) memberikan hasil terendah terhadap densitas neuroglia (Tabel. 1).

Berdasarkan uji lanjut menggunakan *Duncan test*, P0 (160.3600 ± 31.54819) menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan dibandingkan dengan P1 (137.6800 ± 36.53946), P1 (137.6800 ± 36.53946) menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan dengan P2 (108.7600 ± 34.38878), sedangkan P2 (108.7600 ± 34.38878) menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan dengan P3 (82.0000 ± 29.55030).

Tabel 1. Rerata dan simpangan baku perlakuan terhadap densitas neuroglia

Perlakuan	\pm SD
P0	$160.3600^c \pm 31.54819$
P1	$137.6800^{bc} \pm 36.53946$
P2	$108.7600^{ab} \pm 34.38878$
P3	$82.0000^a \pm 29.55030$

^{a dan b} Superskrip dalam satu kolom menunjukkan perbedaan nyata ($p < 0,01$)

Berdasarkan hasil uji analisis dengan *Kruskall-Wallis test* rata-rata aktivitas neuroglia tertinggi pada P1 adalah 17.50; P2 adalah 13.10; P3 adalah 8.20, sedangkan aktivitas terendah P0; 3.20. *Kruskall-Wallis test* menunjukkan adanya perbedaan aktivitas neuroglia dari setiap perlakuan, hal ini ditunjukkan dengan nilai p -value sebesar $0,001 < 0,05$, karena itu hipotesis null ditolak. Berdasarkan uji lanjut menggunakan uji Z, P1^a dan P2^{ab} hasilnya menunjukkan tidak signifikan, sedangkan pada P3^{bc}

menunjukkan hasil yang signifikan dengan P1^a, P2^{ab} dan P0^c (Tabel. 2).

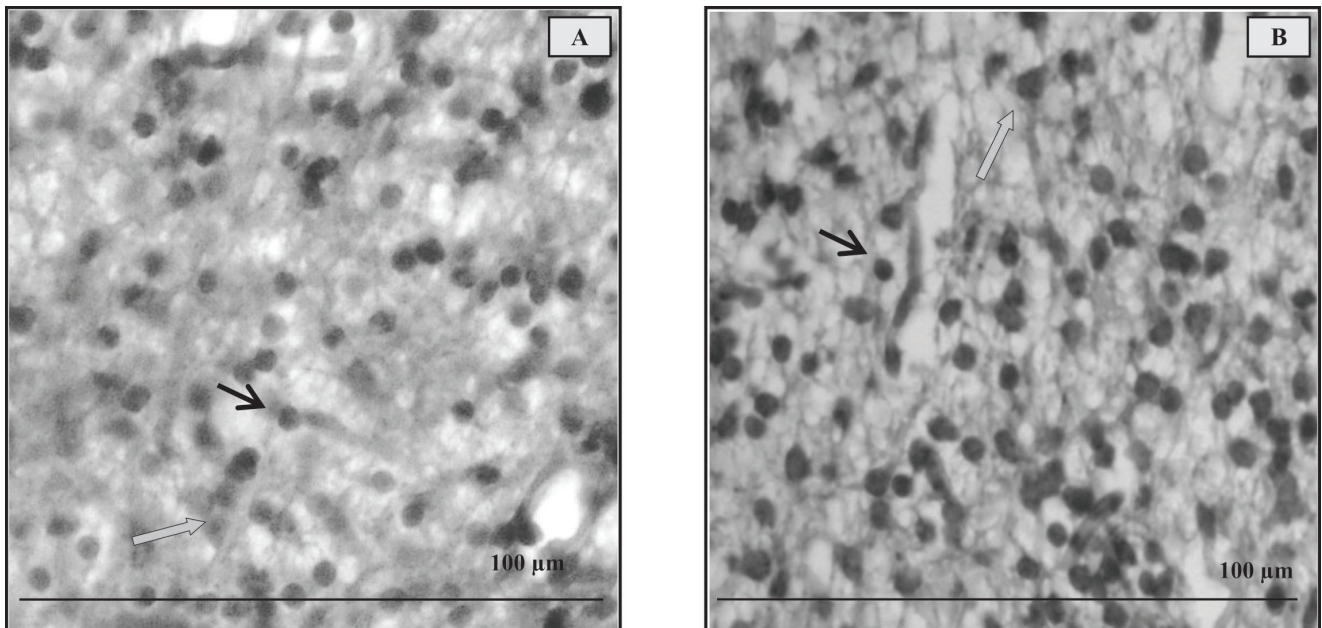
Tabel 2. Hasil analisis aktivitas neuroglia dengan uji Z

Perlakuan	Uji Z
P0	P0 ^c
P1	P1 ^a
P2	P2 ^{ab}
P3	P3 ^{bc}

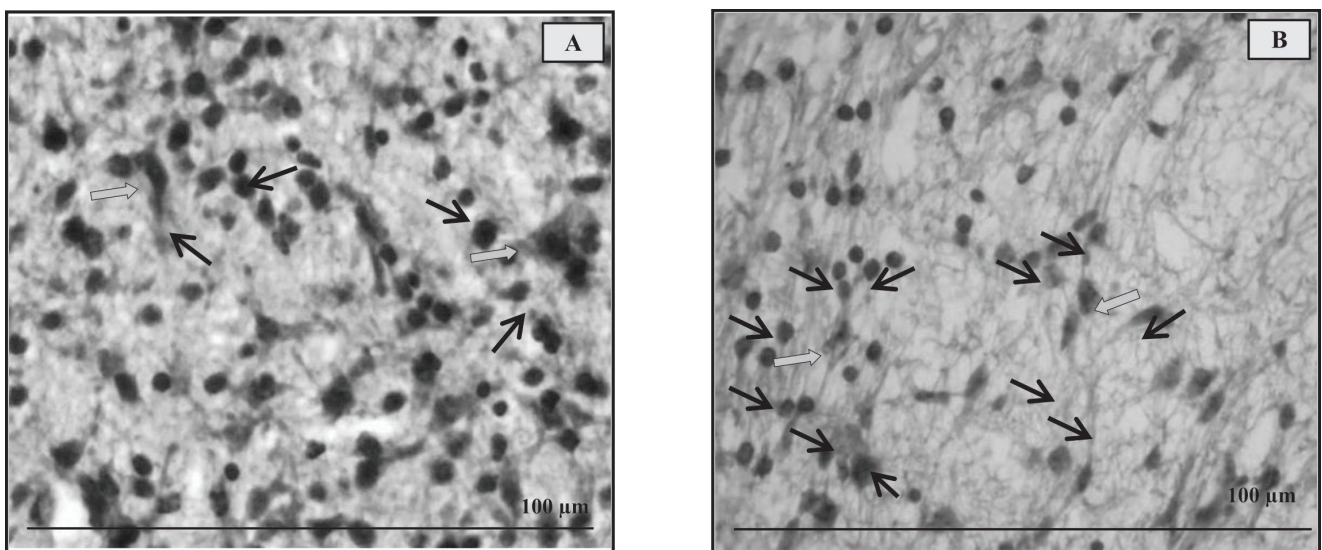
^{c dan bc} Superskrip dalam satu kolom menunjukkan perbedaan nyata ($p \leq 0,01$)

Neuroglia terlihat bertumpuk-tumpuk dengan persebaran yang rata pada seluruh area hitung (Gambar. 1B), sedangkan gambar 1A tampak berbentuk bulat padat tetapi jarak antar sel cukup renggang sehingga tingkat densitasnya menjadi rendah. Hal ini erat kaitannya dengan konsentrasi kortisol yaitu hormon yang bertanggung jawab untuk merespon kondisi stres yang tinggi dalam SSP, sehingga neurotransmitter akan mensekresikan glutamat, apabila glutamat dalam jumlah berlebih dapat menjadi *glutamate excitotoxicity*. Aktivasi glutamate-reseptor NMDA akan memobilisasi *calcium cytosolic* menuju neuron, karena kondisi stres maka konsentrasi *calcium cytosolic* juga meningkat. Aktivitas dari reseptor-glutamat akan menstimulasi ion Ca^{2+} ke sitoplasma, sehingga jumlah ion Ca^{2+} berlebihan. Ketidakseimbangan jumlah *glutamate excitotoxicity* pada kondisi stres dapat memicu kematian sel, hal tersebut dapat menyebabkan penurunan jumlah sel (Lipton, 1999).

Hasil pengamatan terhadap aktivitas antar neuroglia berdasarkan sistem skoring menunjukkan perbedaan nyata. Hal ini tampak neuroglia yang mengelilingi neuron menunjukkan tingkat aktivitas neuroglia tampak tinggi (Gambar 2B). Peningkatan kortisosteron saat stress pada mencit



Gambar 1. Irisan *axial* otak mencit bagian *cerebral cortex* hipokampus yang menunjukkan densitas neuroglia per $10.000 \mu\text{m}^2$. P0 merupakan kontrol sedangkan penurunan densitas neuroglia terjadi pada P3. Pewarnaan Haematoxylin Eosin menggunakan perbesaran 400X dengan Mikroskop Olympus® CX-4. Neuroglia (→) tampak berwarna lebih gelap dan lebih bulat sedangkan neuron (⇨) ukurannya lebih besar menyerupai piramid



Gambar 2. Irisan *axial* otak mencit bagian *cerebral cortex* hipokampus yang menunjukkan aktivitas antara neuroglia. Pewarnaan Haematoxylin Eosin menggunakan perbesaran 400X dengan Mikroskop Olympus® CX-4. Gambar A adalah kontrol dan gambar B adalah kelompok perlakuan. Keterangan : tanda panah (⇨) menunjukkan neuron sedangkan tanda panah (→) menunjukkan neuroglia yang mengelilingi neuron.

akan mempengaruhi aktivitas neuroglia terutama astrosit dan mikroglia. Stres yang berjalan dalam waktu lama dapat menyebabkan kerusakan neuron

yang mengaktifkan astrosit yang berperan penting dalam fungsi pengaturan *synaptogenesis* melalui *glial transporter uptake* dan kemudian mengubahnya

menjadi glutamin melalui aktivitas enzim glutamin sintetase. Proses ini diharapkan mampu mencegah kerusakan pada neuron (Huerta *et al.*, 2010). Mikroglia akan diaktifkan ketika otak mengalami cedera. Mikroglia akan bermigrasi ke sel target dan menghasilkan *proinflammatory molecules*, *neurotropic factor*, dan neurotransmitter untuk membentuk aktivitas sinaptik dengan neuron lain, sehingga dapat diketahui aktivitas antar neuroglia disebabkan oleh aktivitas astosit dan mikroglia yang mempertahankan kondisi normal neuron (Huerta *et al.*, 2010).

Pemberian terapi musik klasik Mozart KV 448 selama periode gestasi terhadap mencit yang mengalami stres prenatal menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan ($p \leq 0,01$) terhadap densitas neuroglia terutama pada kelompok P0 dan P1. Kelompok P2 juga terjadi penurunan densitas neuroglia tetapi penurunan paling signifikan terlihat pada P3. Kelompok P0 sebagai kontrol memiliki tingkat densitas yang tinggi karena proses kebuntingan pada mencit betina akan menyebabkan stres prenatal disamping itu faktor stres dari lingkungan dapat berpengaruh sebab kelompok P0 diletakkan dalam kandang kaca kedap suara dan tertutup sehingga suhu udara meningkat, kondisi ini dipertahankan selama 21 hari. Kondisi lingkungan dapat menjadi faktor pemicu timbulnya stres yang dinilai potensial membahayakan, tidak terkendali atau melebihi kemampuan individu untuk melakukan adaptasi (Lazarus *et al.*, 1985).

Penelitian pendahuluan yang dilakukan untuk mengamati abnormalitas neuroglia pada hipokampus anak yang dilahirkan dari mencit betina bunting yang diterapi dengan *forced swim test* menunjukkan bahwa abnormalitas neuroglia pada bentuk dan ukuran cukup tinggi, tidak terdapat penjurulan dendrit dan inti sel tidak tampak, sedangkan ukuran neuroglia tidak seragam (Kusumarini dkk., 2016). Kondisi stres akan

menyebabkan akumulasi kortikosteron yang dapat mengganggu aktivitas sinaps. Ketika stres terjadi densitas dari neuroglia akan meningkat seiring dengan peningkatan aktivitas neuron mensintesis *bioactive molecules* dan *neurotransmitters* yang melewati *Gap Junction Communication* lalu mengaktifkan astrosit untuk memberikan respon seluler. Jadi apabila neuron mengalami gangguan maka astrosit akan membentuk *synaptic plasticity* untuk membantu pertahanan neuron (Allen and Barres, 2005).

Paparan musik dengan intensitas yang teratur dapat mencegah efek hipermetabolik yang dicirikan oleh pelepasan beberapa neuroendokrin seperti katekolamin, kortisol, sitokin dan hormon lainnya yang dimodulasi oleh *Hipotalamus Pituitary Adrenal Axis* (HPA-Axis). Musik merupakan jenis terapi konvensional yang apabila didengarkan secara konsisten akan memberikan efek rileks dan menurunkan hipermetabolisme dalam SSP, hal tersebut menunjukkan musik klasik mampu menurunkan densitas dari neuroglia (Weissman, 1990).

Berdasarkan uji lanjut menggunakan uji Z, Aktivitas neuroglia pada P1a dan P2ab hasilnya menunjukkan tidak signifikan, sedangkan pada P3bc menunjukkan sangat signifikan dengan P1a, P2ab dan P0c. Musik klasik diyakini oleh banyak orang mampu menurunkan stres khususnya pada kondisi stres prenatal. Efek menyenangkan dan rileksasi diawali dari ditangkapnya gelombang suara oleh telinga kemudian gelombang suara akan ditangkap oleh membran timpani kemudian gelombang suara akan dikonversikan menjadi gerakan mekanis untuk disalurkan menuju koklea. Organ corti yang berada di dalam koklea akan menjalankan fungsinya dengan mengubah getaran mekanik gelombang bunyi menjadi impuls listrik yang akan dihantarkan ke pusat pendengaran (Bilmes, 2005).

Alunan suara yang dihasilkan oleh musik klasik akan diteruskan pada *mesocorticolimbic* sehingga berkaitan dengan aktivasi Nucleus Accumbens (NAc) dan Ventral Tegmental Area (VTA). Aktifnya NAc akan mengatur regulasi otonom, emosional, dan fungsi kognitif dalam SSP. Reseptor dopaminergik berasal dari VTA yang diproyeksikan pada daerah NAc dan otak depan. Kondisi rileks tercipta akibat interaksi antara korteks orbito frontal dengan neurotransmitter dopaminergik (NAc dan VTA). Hipokampus bertanggung jawab terhadap defensif perilaku dalam menanggapi stres dan modulasi hormon kortisol akan memberikan respon terhadap neurotransmitter dopaminergik, jadi dengan terapi musik klasik terjadi modulasi terhadap hormon kortisol yang menyebabkan kadar stres dalam SSP mengalami penurunan sehingga neurotransmitter dopaminergik akan ditangkap oleh synaptogenesis astrosit dan mikroglia untuk menurunkan aktivitasnya (Brown *et al.*, 2004; Wise, 2004). Jadi dapat disimpulkan bahwa terapi musik klasik Mozart KV 448 terhadap induk mencit (*Mus musculus*) bunting yang mengalami stres prenatal dapat menurunkan densitas dan aktivitas neuroglia hipokampus anak mencit yang dilahirkan.

Kesimpulan

Secara umum hasil pemeriksaan gambaran histologi dari penelitian ini menunjukkan bahwa telah terjadi penurunan terhadap densitas dan aktivitas neuroglia hipokampus.

Daftar Pustaka

Airan, R. D., Meltzer, L. A., Roy, M., Gong, Y., Chen, H., Deisseroth, K. (2007). High-speed imaging reveals neurophysiological links to behavior in an animal model of depression. *Science*

Magazine. 3 (17): 819-823.

- Allen, N. J., and Barres, B. A. (2005). Signaling between glia and neurons: focus on synaptic plasticity. *Curr Opin. Neurobiol.* 15 (5): 542-548.
- Amagdei, A., Baltés, F.R., Avram, J., Miu A.C. (2010). Perinatal exposure to music protects spatial memory against callosal lesions. *Int J Dev Neurosci.* 28(1): 105-109.
- Atkinson, H.C., Waddell, B.J. (1995). The hypothalamic-pituitary-adrenal-axis in rat pregnancy and lactation: circadian variation and interrelationship of plasma adrenocorticotropin and corticosterone. *Endocrinology* 136: 512-520.
- Barros, V.G., Duhalde-Vega, M., Caltana, L., Brusco, A., Antonelli, M.C. (2006). Astrocyte-neuron vulnerability to prenatal stress in adult rat brain. *J Neurosci* 83: 787-800.
- Bennett, H. A., Taddio, A., Koren, G., Einarson, T.R. (2004a). Depression during pregnancy: overview of clinical factors. *Clin Drug Investig.* 24: 157-179.
- Bennett, H.A., Einarson, A., Taddio, A., Koren, G., Einarson, T.R. (2004b). Prevalence of depression during pregnancy: systematic review. *Obstet Gynecol.* 103:698-709.
- Bilmes, J. (2005). Anatomy and physiology of the ear. Department of electrical engineering. University of Washington.
- Brown, S. (2004). Passive music listening spontaneously engages limbic and paralimbic systems. *NeuroReport.* 15: 2033-2037.
- Huerta, F Jauregui., Delgadillo, Y Ruvalcaba., Gonzalez-Castañeda., Garcia-Estrada J., Perez, O. Gonzalez, and Luquin, S. (2010). Responses of glial cells to stress and glucocorticoids. *Curr Immunol.* 6(3): 195-204.
- Jaušovec, N., Jaušovec, K., & Gerlic, I. (2006). The influence of Mozart's music on brain activity in the process of learning. *Clinical Neurophysiology.* 117: 2703-2714.
- Kim, H., Lee M.H, Chang H.K, Lee T.H, Lee H.H, Shin M.C, *et al.*, (2006). Influence of prenatal

noise and music on the spatial memory and neurogenesis in the hippocampus of developing rats. *Brain Dev.* 28 (2): 109-114.

Kusumarini, Shelly. R., Tutik Juniastuti, Lita Yustinasari. (2016). Musik klasik mozart KV 448 menyebabkan penurunan abnormalitas neuroglia hipokampus mencit (*Mus musculus*) yang mengalami stres prenatal. *Vet Med.* 9 (1): 49-54.

Lazarus, R. S., DeLongis, A., Folkmann, S., Gruen, R. (1985). Stress and adaption outcomes (The problem of confound measures). *American Psychologist.* 40(7): 770-790.

Lipton, S. A., Rosenberg, P.A. (1994). Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders, *N. Engl. J. Med.* 3 (30): 613–622.

Matthies, U., Balog J, Lehmann K. (2013). Temporally coherent visual stimuli boost ocular dominance plasticity. *J Neurosci*; 33 (29): 11774-11778.

Mustofa, Tika Rhmatillah. (2013). Skripsi. Pengaruh musik terhadap proliferasi neuron hipokampus mencit (*Mus musculus*) yang mengalami stres. Universitas Airlangga.

Oberlander, T.F., Warburton, W., Misri, S., Aghajanian, J. Hertzman, C. (2006). Neonatal outcomes after prenatal exposure to selective serotonin reuptake inhibitor antidepressants and maternal depression using population-based linked health data. *Arch Gen Psychiatry.* 63:898–906.

Rodriguez, A. Bohlin, G. (2005). Are maternal smoking and stress during pregnancy related to ADHD symptoms in children?. *J Child Psychol Psychiatry.* 46: 246–254.

Rodriguez, F., Lopeza JC., Vargasa JP., Broglia C., Gomeza Y., Salas C. (2002). Spatial memory and hippocampal pallium through vertebrate evolution: insights from reptiles and teleost fish. *Brain Res. Bull.* 57 (3-4): 499–503. PMID 11923018.

Srivastava, D.P., Woolfrey KM, Penzes P. (2013). Insights into rapid modulation of neuroplasticity by brain estrogens. *Pharmacol Rev.* 65 (4): 1318-1350.

Tiina-Riikka M. Pirttila, Asla Pitkanen, Jarkko Tuunanen, and Risto A. Kauppinen. (2001). Ex vivo mr microimaging of neuronal damage after kainate-induced status epilepticus in rat: correlation with quantitative histology. *Magnetic Resonance in Medicine.* 46: 946–954.

Tollenaar, M.S., Beijers R, Jansen J, Riksen-Walraven JM, de Weerth C. (2011). Maternal prenatal stress and cortisol reactivity to stressors in human infants stress. *Stress.* 14 (1): 53–65.

Vina, Y. (2012). Skripsi. Pengaruh terapi musik terhadap stres pada *Mus musculus* dengan induksi *food shock*. Under graduate Airlangga University. KKB KK-2 FF 357/ 11 Yuw p.

Weissman, C. (1990). The metabolic response to stress: an overview and update. *Anaesthesiology.* 73: 308–27.

Wise, R.A. (2004). Dopamine, learning and motivation. *Nat. Rev. Neurosci.* 5: 483–494.

Studi Gambaran Histopatologis Hepar, Pulmo, Lien dan Otak serta Uji Serologis pada Tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinfeksi *Toxoplasma gondii*

Sri Hartati, Slamet Raharjo, Irkham Widiyono

Bagian Ilmu Penyakit Dalam, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta
 Email: raharjo_vet19@yahoo.com

Abstract

Toxoplasmosis is a parasitic disease caused by the intracellular obligate parasite of *Toxoplasma gondii*. *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) causes severe infections in infants or children who are congenitally infected and immunocompromised individuals. Rats are one source of natural transmission of toxoplasmosis in cats and cats will release oocysts with feces that will contaminate the environment that can be a source of transmission for other animals and humans. This study aims to determine the histopathological features of hepatic, pulmo, lien and cerebellum organ and serological tests in mice infected with *T. gondii*. Twenty rats of Wistar strains infected *T. gondii* strain RH stadium takizoit (10^7). On days 1, 3, 5, 7 and 15 post infection, mice were drawn blood for serological tests using commercial kit Pastorex™ Toxo (Biorad, France). After the blood is taken, the rats are dietanized for liver organ samples, pulmo, lien and brain for histopathologic examination. The results showed that serologic test was positive after the 5th postoperative day. The histopathologic results of day 1 postinfection appear to be takizoit *T. gondii* in the liver and brain. The formation of takizoit in the pulmo appears on the 7th day post infection.

Keywords: *T. gondii*, rat, serological test, histopatology

Abstrak

Toksoplasmosis adalah penyakit parasiter yang disebabkan oleh parasit obligat intraseluler *Toxoplasma gondii*. *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) menyebabkan infeksi yang berat pada bayi atau anak-anak yang tertular secara kongenital dan individu imunokompromise. Tikus merupakan salah satu sumber penularan alami toksoplasmosis pada kucing dan kucing akan mengeluarkan oosista bersama feses yang akan mencemari lingkungan yang dapat menjadi sumber penularan bagi hewan lain dan manusia. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui gambaran histopatologis organ hepar, pulmo, lien dan otak serta uji serologis pada tikus yang diinfeksi *T. gondii*. Duapuluh ekor tikus strain Wistar diinfeksi *T. gondii* strain RH stadium takizoit (10^7). Pada hari ke 1, 3, 5, 7 dan 15 pasca infeksi, tikus diambil darahnya untuk uji serologis menggunakan kit komersial Pastorex™ Toxo (Biorad, France). Setelah diambil darahnya, tikus dietanasi untuk diambil sampel organ hepar, pulmo, lien dan otak untuk pemeriksaan histopatologi. Hasil pemeriksaan menunjukkan bahwa uji serologis dinyatakan positif setelah hari ke 5 pasca infeksi. Gambaran hasil histopatologi hari ke 1 pasca infeksi tampak takizoit *T. gondii* pada hepar dan otak. Bentuk takizoit pada pulmo tampak pada hari ke 7 pasca infeksi.

Kata kunci: *T. gondii*, tikus, uji serologis, histopatologis

Pendahuluan

Toksoplasmosis merupakan penyakit parasit menular yang disebabkan oleh protozoa *Toxoplasma gondii* (Howard, 1987; Hökelek, 2009). Parasit ini bersifat *ubiquitous* dan diperkirakan menginfeksi 30 - 50% penduduk dunia (Noble and Noble dalam

Martins *et al.*, 2000; Weiss and Dubey, 2009), *T. gondii* dapat menginfeksi semua hewan berdarah panas dan merupakan parasit intraseluler yang dapat menginfeksi berbagai jaringan (Soulsby, 1982). *Toxoplasma gondii* bersifat heteroksenosa dan memerlukan kucing atau familinya (*Felidae*) sebagai

inang definitif, sedangkan sebagai inang intermedier adalah hewan berdarah panas lainnya, termasuk rodensia (Montoya dan Remington, 2000); Montoya dan Liesenfeld, 2004). Tikus merupakan salah satu inang intermedier yang dapat menjadi sumber infeksi *T. gondii* pada kucing.

Toksoplasmosis pada manusia dan hewan menimbulkan kerugian yang cukup besar karena dapat mengakibatkan abortus, gangguan mental, buta, penurunan produksi maupun kematian (Montoya dan Remington, 2000; Krauss *et al.*, 2003). Infeksi *T. gondii* bersifat klinis dan subklinis telah dilaporkan hampir di seluruh dunia (Alfonso *et al.*, 2009). Toksoplasmosis kongenital dapat menimbulkan berbagai macam cacat bawaan terutama cacat mental dan kebutaan (Gandahusada, 1995; Montoya dan Liesenfeld, 2004). Penularan *T. gondii* dapat terjadi melalui ingesti oosista yang berasal dari tinja kucing, ingesti sista dari jaringan yang terinfeksi kronis dan secara vertikal dari induk ke janin (Okolo, 1985, Montoya dan Liesenfeld, 2004). Infeksi primer dapat menyebabkan transmisi *T. gondii* ke janin melalui plasenta dan terjadi penularan fetomaternal, reinfeksi maupun reaktivasi sista *T. gondii* pada ibu hamil (Haumont *et al.*, 2000; Rajagopalan *et al.*, 2009). Di Indonesia faktor-faktor tersebut diperparah dengan keadaan sanitasi lingkungan yang jelek dan banyaknya sumber penularan (Sasmita dkk., 1988).

Infeksi toksoplasmosis sering tanpa gejala klinis (Lappin, 1994; Nelson and Couto, 2003). Pemeriksaan histopatologi akan ditemukan nekrosis dengan infiltrasi makrofag pada paru-paru, hati, jantung, otot, sistem syaraf pusat. Perubahan patologik akibat toksoplasmosis dapat terjadi pada berbagai macam organ dalam tubuh, misalnya otak, neuron, mikroglia, parenkim hati, jantung, otot rangka, selaput fetus, dan leukosit (Levine, 1990),

saluran pencernaan, miokardium, paru-paru, hati, otak, retina mata (Urquhart *et al.*, 1987), otak, hati, paru-paru, limpa, ginjal, usus, susunan saraf pusat, plasenta (kotiledon), bursa fabrisius (Soulsby, 1982; Sukthana, 2006).

Tingkat prevalensi toksoplasmosis bervariasi dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti kepekaan spesies, perbedaan jumlah sampel, distribusi geografis, metode diagnostik dan faktor resiko yang memungkinkan terjadi infeksi (Okolo, 1985; Nissapatorn *et al.*, 2003). Menurut Okolo (1985), prevalensi toksoplasmosis di daerah panas lebih tinggi dibanding daerah dingin. Kejadian toksoplasmosis secara serologis pada manusia di Indonesia bervariasi antara 2-63% (Gandahusada, 1995). Menurut Umayah (1996) pemeriksaan antibodi terhadap toksoplasmosis pada wanita hamil di RS Dr. Sardjito adalah 51,7%. Susbandoro *et al.*, (1996) melaporkan pemeriksaan toksoplasmosis pada wanita hamil di RSUD Mataram 38,35% positif IgG dan 2% positif Ig M.

Blood *et al.*, (1983) melaporkan prevalensi toksoplasmosis pada sapi, babi dan kambing di Amerika Serikat masing-masing adalah 47%, 30% dan 48%; di Kanada pada sapi 17%, domba 65% dan babi 45%. Survey serologis di Australia menunjukkan 41% domba di peternakan terinfeksi *T. gondii* (Olant *cit* Blood *et al.*, 1983). Prevalensi toksoplasmosis pada domba di Amerika Utara 46%, di Oregon fetus domba yang mati 12,6% positif toksoplasma (Dubey, 2009). Menurut Sri Hartati (1991), prevalensi toksoplasmosis di Yogyakarta pada domba 50%, kambing 18%, sapi 2% dan babi 44% Sri Hartati dan Wieklati (1992) melaporkan prevalensi toksoplasmosis di Rumah Pemotongan Hewan (RPH) Surakarta pada domba 23%, kambing 21%, sapi 1%, babi 25% dan pada pekerja RPH yang menangani domba/kambing

64%, sapi 55% dan babi 32%. Menurut Soulsby (1982), 64% kucing di Amerika Serikat seropositif *T. gondii*. Prevalensi toksoplasmosis secara serologis pada kucing di Jakarta 72,7% (Gandahusada, 1995), di Costarica 47,5% (Frenkel and Ruiz, 1981), di Kansas pada kucing piara dewasa 37,5%, kucing umur 11-26 minggu 16,2% dan kucing liar 57,9% (Dubey, 1973).

Hasil penelitian Sri Hartati (1993) menunjukkan prevalensi toksoplasmosis pada kucing di Yogyakarta adalah 40%. Prevalensi toksoplasmosis pada hewan maupun manusia sangat bervariasi. Menurut Hermawan (1988) prevalensi toksoplasmosis pada ayam kampung di Lamongan 23%. Prevalensi toksoplasmosis secara serologis pada ayam di Jakarta 52,5% (Priyana, 2000), di Banda Aceh pada ayam buras 25% dan itik 20% (Hanafiah dkk., 2010). Menurut Ajioka *et al.*, (2001) proporsi populasi yang terinfeksi *T. gondii* pada manusia tergantung letak geografis dan gaya hidup, misalnya prevalensi di Inggris lebih rendah (30 - 40%) dibanding Perancis (60 - 90%).

Infeksi *T. gondii* secara eksperimental pada hewan coba merupakan suatu metode yang digunakan untuk memehami perkembangan penyakit dalam tubuh inang (Dubey, 2010). Mencit, tikus, kelinci dan kucing merupakan hewan coba yang sering digunakan untuk penelitian toksoplasmosis dengan cara injeksi stadium takizoit secara intraperitoneal, subkutan dan intra vena atau stadium bradizoit dari mencit secara per oral. Secara alami, tikus lebih resisten dibanding mencit yang sangat rentan terhadap *T. gondii* walaupun infeksi juga bergantung pada strain hewan, kekebalan individu, metode infeksi dan stadium serta strain *T. gondii* yang diinfeksi (Weiss dan Dubey, 2009)

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui gambaran histopatologis organ hepar, pulmo, lien

dan otak serta uji serologis pada tikus yang diinfeksi *T. gondii*. Tikus yang merupakan salah satu pakan alami favorit kucing, kemungkinan menjadi sumber penularan infeksi *T. gondii* pada kucing lebih besar.

Materi dan Metode

Duapuluh ekor tikus strain Wistar umur 8 minggu digunakan dalam penelitian ini. Tikus dipelihara dengan pakan standar. Delapan belas ekor tikus diinfeksi dengan *T. gondii* strain RH stadium takizoit (10^7) dan 2 ekor tikus lainnya tidak diinfeksi digunakan sebagai kontrol. Pada hari ke 1, 3, 5, 7 dan 15 pasca infeksi, tikus diambil darahnya untuk uji serologis menggunakan kit komersial Pastorex™ Toxo (Biorad, France). Uji serologis dilakukan menggunakan 15 µl sampel serum dicampurkan dengan setetes suspensi lateks dan setetes larutan pengencer diatas kertas campur lalu dirotasikan selama 5 menit. Hasil yang diperoleh dibandingkan dengan kontrol positif dan kontrol negatif. Hasil uji positif ditandai terbentuknya agregat berwarna kemerahan pada tepi suspensi.

Setelah diambil darahnya, tikus dietanasi untuk diambil sampel organ hepar, pulmo, lien dan otak untuk pemeriksaan histopatologi dengan metode baku.

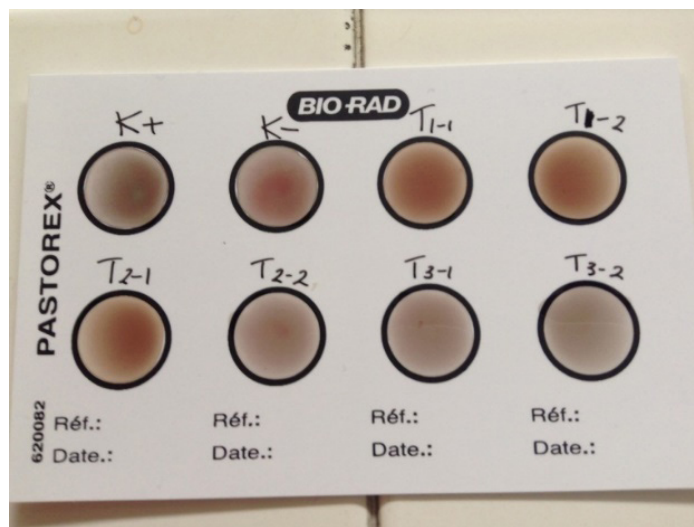
Hasil dan Pembahasan

Hasil uji serologis sampel serum darah tikus penelitian menggunakan kit komersial Pastorex™ Toxo (Biorad, France) untuk semua perlakuan dan kontrol menunjukkan hasil positif pada hari ke 5 pasca infeksi dan hari-hari setelahnya (Tabel 1). Contoh hasil uji serologis sampel serum darah tikus penelitian menggunakan Pastorex™ Toxo tersaji pada Gambar 2.

Tabel 1. Hasil Uji serologis pada sampel serum darah tikus penelitian

No tikus	Hari ke 1	3	5	7	15	
Kontrol 1		-				
Kontrol 2		-				
Tikus perlakuan 1		-	-	+	+	+
Tikus perlakuan 2		-	-	+	+	+
Tikus Perlakuan 3			-	+	-	+
Tikus Perlakuan 4			-	+	+	+

Keterangan: - = negatif, tidak ada presipitat, tidak terbentuk Ig
 + = positif, ada presipitat, terbentuk Ig



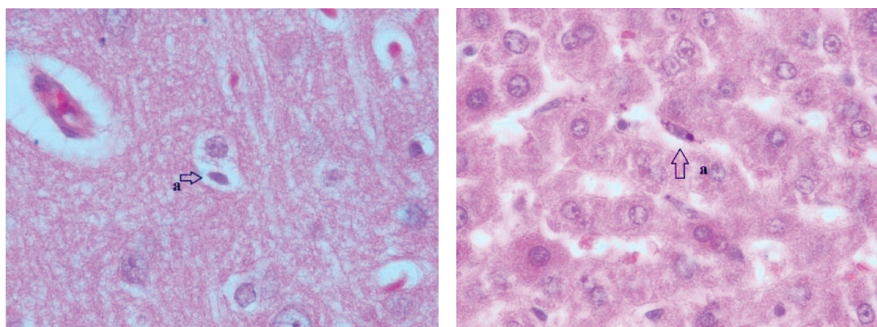
Gambar 1. Contoh hasil uji serologis sampel serum darah tikus penelitian menggunakan Pastorex™ Toxo

Hasil pada Tabel 1 menunjukkan bahwa tikus yang diinfeksi dengan stadium takizoit *T. gondii* mulai menghasilkan antibodi pada hari ke 5 pasca infeksi. Hasil positif konsisten sampai hari ke 9 pasca infeksi kecuali untuk satu tikus pada hari ke 7 menunjukkan hasil negatif. Perbedaan ini dapat disebabkan oleh respon kekebalan tubuh yang berbeda antara satu individu dengan individu lainnya atau mungkin karena respon individu tersebut terhadap infeksi toksoplasma terlambat.

Pastorex™ Toxo (Biorad, France) adalah metode uji cepat untuk mendeteksi antibody dalam darah. Alat ini memberikan interpretasi hasil positif dan negative, namun hasil positif tidak bisa

digunakan untuk mengetahui jenis antibodi yang dihasilkan. Immunoglobulin M (IgM) adalah antibody yang terbentuk pada fase awal infeksi mulai dapat dideteksi pada minggu pertama pasca infeksi dan mencapai puncaknya pada minggu ke 3 dan kemudian menurun hingga minggu ke 4. Immunoglobulin G (Ig G) sebagai antibody jangka panjang baru terbentuk dan dapat terdeteksi dalam darah mulai minggu ke 3 pasca infeksi dan akan bertahan tinggi selama berbulan-bulan atau bertahun-tahun (Faulkner, 2009; Dubey, 2010).

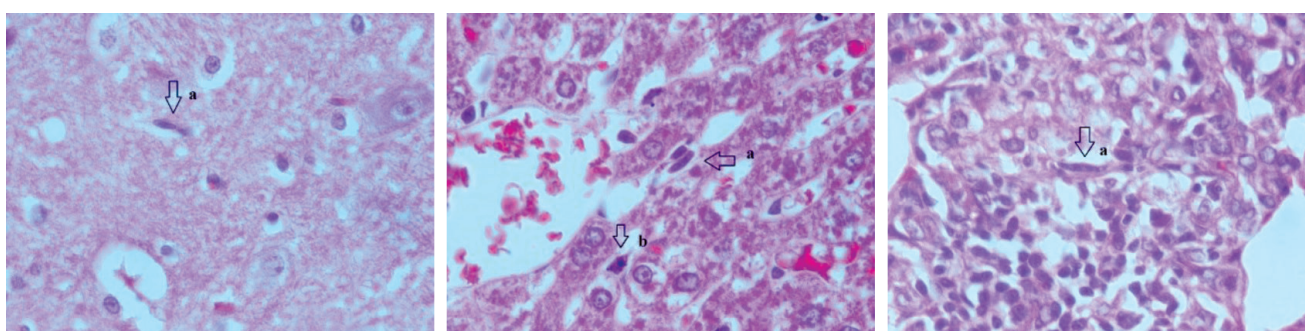
Contoh gambaran histopatologi organ otak, hepar, paru dan lien dengan penemuan potongan takizoit *T. gondii* tersaji pada Gambar 2 dan Gambar 3.



A. Otak

B. Hepar

Gambar 2. Gambaran histopatologis organ otak dan hepar tikus penelitian
A. Otak, B. Hepar. Tanda panah = potongan takizoit



A. Otak

B. Hepar

C. Paru

Gambar 3. Gambaran histopatologis organ otak, hepar dan paru tikus penelitian
A. Otak, B. Hepar, C. Paru. Tanda panah = potongan takizoit

Evaluasi secara histopatologis pada hari ke 1, 3, 5, 7 dan 15 pasca infeksi pada jaringan otak, hepar, paru dan lien dilakukan dengan tujuan untuk melihat ada tidaknya bentukan yang diduga takizoit *T. gondii* pada preparat histopatologi dan melihat ada tidaknya perubahan patologis yang terjadi pada jaringan organ-organ tersebut. Hasil analisis terhadap preparat histopatologi pada hari ke 1, 3 dan 5 pasca infeksi ditemukan potongan takizoit pada organ otak dan hepar (Gambar 2) tetapi tidak ditemukan pada organ paru dan lien. Organ paru dan lien tidak menunjukkan perubahan patologis (normal). Pada hari ke 7 dan 15 pasca infeksi potongan takizoit ditemukan pada organ otak, hepar dan paru. Organ lien tidak ditemukan perubahan patologis (Gambar 3).

Kesimpulan

Berdasar hasil dan pembahasan dapat disimpulkan bahwa uji serologis dinyatakan positif pada hari ke 5 pasca infeksi. Gambaran histopatologi hari ke 1 pasca infeksi tampak takizoit *T. gondii* pada hepar dan otak. Takizoit ditemukan pada pulmo pada hari ke 7 dan 15 pasca infeksi. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui kinetika infeksi *T. gondii* pada hewan coba.

Ucapan Terima Kasih

Terimakasih disampaikan kepada Fakultas Kedokteran Hewan UGM atas kesempatan dan dana penelitian ini melalui Program Penelitian Hibah Pengembangan Bagian FKH UGM tahun 2015.

Daftar Pustaka

- Ajioka, J. W., Jennifer M. Fitzpatrick and Christopher P. Reitter. 2001. *Ultrastructure of a Toxoplasma gondii tachyzoite*. Available from: <http://journal.gambridge.org/>
- Alfonso, Y., J. Fraga, C. Fonseca, N. Jiménez, T. Pinillos, A.J. Dorta-Contreras, R. Cox, V. Capó, O.Pomier, F. Bandera and D. Ginorio. 2009. Molecular diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in cerebrospinal fluid from AIDS patients. *Cerebrospinal Fluid Research* 6:2
- Blood, D.C., Radostits, O. M. and Henderson, J. A. 1983. *Veterinary Medicine. A Textbook of The Disease of Cattle, Sheep, Pigs, Goat and Horses*. 6 th. Ed. E.L.B.S. and Balliere Tyndal: 889-892.
- Dubey, J. P. 1973. Feline toxoplasmosis and coccidiosis: A survey of domiciled and stray cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 162 (10): 873-876.
- Dubey, J.P. 2009. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 39: 877-882.
- Frenkel, J.K and A. Ruitz. 1981. Endemicity of Toxoplasmosis in Costa Rica. Transmission between Cats, Soil, Intermediate hosts and humans. *Am.J.Epidemiol.* 113 (3) : 254-269.
- Gandahusada. S. 1995. *Penanggulangan Toksoplasmosis dalam Meningkatkan Kualitas Sumber Daya Manusia*. Pidato Pengukuhan Guru Besar Tetap Parasitologi. FK-UI, Jakarta.
- Hanafiah, M., Kamaruddin, M., Nurcahyo, W., Winaruddin. 2010. Studi Infeksi Toksoplasmosis pada Manusia dan Hubungannya dengan Hewan di Banda Aceh. *J. Kedokteran Hewan.* 4 (2): 87-92.
- Hartati, S. dan Wieklati, 1992. Prevalensi Toksoplasmosis pada Sapi, Kambing dan Pekerja Rumah Potong Hewan (RPH) Surakarta. Laporan Penelitian FKH UGM Yogyakarta.
- Hartati, S., Wuryastuty, H, Yanuartono, Purnamaningsih, H dan Raharjo, S. 2011. Studi Toksoplasmosis secara Serologis pada Kucing Lokal dan Persia. Laporan Penelitian PPDH FKH UGM Yogyakarta.
- Haumont, M., Delhaye, L., Garcia, L., Jurado, M., Mazzu, P., Daminet, V., Verlant, V., Bollen, A., Biemans, R. and Jacquet, A. 2000. Prospective immunity against congenital toxoplasmosis with recombinant SAG1 protein in a guinea pig model. *Infect. Immun.* 68: 4948 – 4953.
- Hermawan, P. 1988. Survey serologis terhadap Toksoplasmosis pada Ayam Buras di Kabupaten Lamongan dengan Uji Haemaglutinasi tak Langsung. Skripsi. FKH UNAIR. Surabaya.
- Hökelek, M. 2009. *Toxoplasmosis: Overview-eMedicine Infectious Diseases*. Available from: http://emedicine.medscape.com/infectious_disease. cited: March 2009.
- Howard, B.J. 1987. *Clinical and Patology Microbiology*. The CV Mosby Company St. Louis, Whashington DC. Toronto.
- Krauss H, A. Weber, M. Appel, B. Enders, H.D. Isenberg, H.G. Schieder, W. Slenczka, A. von Graevenitz, H. Zahner. 2003. *Zoonoses. Infectious Diseases Transmissible from Animals to Humans*. 3rd ed, Washington, ASM Press, pp 307–30
- Lappin, M. R. 1994. Feline toxoplasmosis. *Waltham Focus.* 4(4): 2-8.
- Levine, N.D. 1990. *Buku Pelajaran Parasitologi veteriner*. Universitas Gajah Mada Press, Yogyakarta.
- Martins, Thomas B., David R. Hillyard, Christine M. Litwin, Edward W. Taggart, Troy D. Jaskowski, and Harry R. Hill. 2000. Evaluation of a PCR Probe Capture assay for Detection of *Toxoplasma gondii*. *Am J.Clin Pathol* 113:714-721.
- Montoya, J. G. and O. Liesenfeld, 2004. Toxoplasmosis. *Lancet.* 263: 1965-1975.
- Montoya, J.G and J.S. Remington. 2000. *Toxoplasma gondii*. In Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2858-88.

- Nelson, R.W. and C.G. Couto. 2003. Small animal medicine. 3rd ed. Mosby Inc. St Louis, Missouri: 1296-1229.
- Nissapatorn, V., C.K.C Lee, A.A. Khairul. 2003. Seroprevalence of Toxoplasmosis among AIDS Patients in Hospital Kuala Lumpur. *Singapore Med J.* 44(4) : 194-196
- Okolo, M.I.O., 1985. Toxoplasmosis in Animlas and The Public Health Aspect. *Int. J. Zoon.* 12: 247-256.
- Priyana, A. 2000. Antibodi Anti Toxoplasma pada Ayam Kampung (*Gallus Domesticus*) di Jakarta. *Majalah Kedokteran Indonesia.* 50 (11): 504-507.
- Rajagopalan, N., J.B. Suchitra, A. Shet, and Z.K. Khan. 2009. Mortality among HIV Infected Patients in Resource Limited Setting: A Case Controlled Analysis of Inpatients at a Community Care Centre. *AM. J. Inf. Dis.* 5(3): 226-231
- Sasmita. R, R. Ernawati, dan S. Witjaksono. 1988. Perbandingan titer antibodi terhadap *Toxoplasma gondii* pada Kucing di beberapa Rumah Sakit dan Pasar di Surabaya. Kumpulan Makalah Pertemuan Ilmiah Regional Parasitologi Kedokteran II. FK Univ. Udayana, Denpasar.
- Soulsby, E. J. L. 1982. Helminths, Arthropods and Protozoa of Domestic Animals, 7th ed., The English Language Book Society and Bailliere Tynndall, London: 670-680.
- Sri-Hartati. 1991. Prevalensi toksoplasmosis secara serologis pada domba, kambing, sapi dan babi di Yogyakarta. Laporan Penelitian. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Sri-Hartati. 1993. Studi Toksoplasmosis secara serologis pada kucing diare. Laporan Penelitian. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Sukthana, Y. 2006. Toxoplasmosis: beyond animals to humans. *Trends in Parasitol* 22,3
- Susbandoro, S. D. A., Soewignyo, S., Erika, G. S., Gunawan, H., Damanik, Doddy, A. dan Zainul, M. 1996. Infeksi toksoplasma pada ibu-ibu hamil di RSUD Mataram. *Maj. Obstet. Ginekol. Ind.* 20 (4): 254-257.
- Umayah, 1996. Deteksi toksoplasmosis pada wanita hamil menggunakan antibodi monoklonal terhadap antigen membran *Toxoplasma gondii*. Tesis S-2. Program Pasca Sarjana Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Urquhart, G. M., Armaour, J., Duncan, J. L., Dunn, A. M. and Jennings, F. W. 1987. Veterinary Parasitology. ELBS ed. Longman. England.
- Weiss, L.M and Dubey, J.P., 2009. Toxoplasmosis: A history of Clinical Observation. *Int. J. For Parasitology*.doi:10.10616/j.jpara.

Penyakit Ginjal Kronis pada Anjing dan Kucing: Manajemen Terapi dan Diet

Chronic Kidney Disease in Dog and Cat: Treatment and Diet Management

Yanuartono, Alfarisa Nururrozi, Soedarmanto Indarjulianto

Departemen Ilmu Penyakit Dalam, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada
Jl. Fauna No.2, Karangmalang, Depok, Sleman. 55281 Yogyakarta
Email : yanuartono20@yahoo.com

Abstract

Chronic kidney disease is a progressive impairment of renal function and irreversible. The kidneys fail to maintain metabolism and fluid and electrolyte balance, causing uremia. This disease is a common problem in old cats and dogs that not detected by the owners up to 75 % of kidney function is damaged. Clinical signs vary as polyuria, polydipsia, anorexia, vomiting, weight loss, pale mucous membranes, mouth ulceration, halitosis and acute blindness. Chronic renal failure is not curable so that the necessary medication management and proper diet in order to improve the quality of life and prolong the life of the animal.

Keywords : chronic renal failure, clinical signs, treatment, diet

Abstrak

Penyakit ginjal kronis adalah gangguan fungsi ginjal yang progresif dan *irreversible*. Pada kondisi ini ginjal gagal mempertahankan fungsi metabolisme serta keseimbangan cairan dan elektrolit, sehingga menyebabkan uremia. Penyakit ini merupakan masalah umum pada anjing dan kucing yang sudah tua, serta seringkali tidak terdeteksi oleh pemilik hingga 75% dari fungsi ginjal mengalami kerusakan. Gejala klinis yang muncul bervariasi seperti poliuri, polidipsi, anoreksi, muntah, turunnya berat badan, membrana mukosa pucat, ulserasi mulut, halitosis dan kebutaan akut. Penyakit ginjal kronis tidak dapat disembuhkan sehingga diperlukan manajemen pengobatan dan diet yang tepat untuk dapat memperbaiki kualitas hidup dan memperpanjang hidup hewan.

Kata kunci : penyakit ginjal kronis, gejala klinis, pengobatan, diet

Pendahuluan

Fungsi utama ginjal adalah sebagai organ ekskresi dan non ekskresi (Price dan Wilson, 2005). Fungsi ekskresi ginjal meliputi pengaturan pH, konsentrasi ion mineral, komposisi cairan darah, ekskresi produk akhir nitrogen dari metabolisme protein dan sebagai jalur ekskretori untuk sebagian besar obat (Price dan Wilson, 2005). Fungsi non ekskresi adalah pengaturan tekanan darah, produksi eritrosit (Car, 2001) dan konversi vitamin D menjadi bentuk aktif (D3 atau 1-25-dihydroxycholecalciferol) (Polzin dkk., 2009).

Penyakit ginjal kronis adalah penurunan atau hilangnya kemampuan ginjal dalam mengeliminasi produk produk tidak terpakai, mengkonsentrasikan urin dan konservasi elektrolit (Neel dan Grindem, 2000). Biasanya kejadian penyakit ginjal kronis telah berlangsung dalam jangka waktu lebih dari 3 bulan (Polzin, 2011). Produk produk tidak terpakai tersebut bersifat toksik dan terakumulasi dalam aliran darah sehingga terjadi uremia dan azotemia. Akumulasi tersebut akan termanifestasi pada gejala klinis yang muncul setelah 75% ginjal mengalami kerusakan (Ettinger dan Feldman, 2005; Grauer, 2005). Gejala

klinis tersebut antara lain adalah poliuri, polidipsi, anoreksi, muntah, turunnya berat badan, membrana mukosa pucat, ulserasi mulut (Dokuzeylul dan Kayar, 2016), halitosis dan kebutaan akut (Polzin dkk., 2005; Kralova dkk., 2009; Nelson dan Couto, 2009). Prognosis penyakit ini infausta karena biasanya melanjut menuju stadium akhir ginjal (Polzin dan Osborne, 1995). Penyakit ginjal kronis sering terjadi pada anjing maupun kucing yang sudah tua (Burkholder 2000; Kralova dkk., 2009), biasanya disebabkan oleh diabetes mellitus (Arzi dkk., 2008) hipertensi (Morar dkk., 2011) atau glomerulonephritis (Vaden, 2005).

Pengobatan penyakit ginjal kronis didasarkan atas gejala-gejala klinis yang muncul dan ditujukan untuk mengurangi penderitaan pasien. Pengobatan meliputi pemberian cairan pengganti (Wellman dkk., 2012), kalsitriol (Polzin dkk., 2005), antihipertensi/ ACE inhibitor (King dkk., 2006), hormon eritropoietik (Bloomberg dkk., 1992), suplementasi potassium (Sharon dkk., 1997), suplementasi antioxidant (Yu dkk., 2006), terapi alkalin (Allen, 2000), pembatasan diet P (Roudebush dkk., 2009), pemberian agen pengikat P (Bernachon dkk., 2014), dialisis (Crisp dkk., 1989) dan transplantasi ginjal (Bernsteen dkk., 1999). Tujuan utama pemberian diet adalah untuk memenuhi kebutuhan energi, menghilangkan gejala klinis akibat uremia, meminimalisir gangguan keseimbangan cairan, elektrolit, vitamin, mineral dan asam basa (McLeland dkk., 2014). Penyakit ginjal kronis bersifat ireversibel dan tidak dapat disembuhkan sehingga diperlukan diet yang tepat untuk dapat memperbaiki kualitas serta kenyamanan hidup dan memperpanjang hidup hewan (Bartges, 2012).

Penyakit ginjal kronis

Penyakit ginjal kronis adalah kelainan struktural atau fungsional dari satu atau kedua

ginjal yang muncul dalam jangka waktu yang lama, bersifat ireversibel dan kemungkinan merupakan manifestasi akhir dari berbagai macam penyakit seperti penyakit infeksius, iatrogenik, metabolisme, kongenital, bahan toksik, traumatik, neoplasia, dan proses obstruksi yang menyerang ginjal (Lawson dkk., 2015). Sedangkan menurut Bargman dan Skorecki (2013), penyakit ginjal kronis atau penyakit renal tahap akhir merupakan gangguan fungsi renal yang progresif dan ireversibel dimana tubuh gagal untuk mempertahankan proses metabolisme dan keseimbangan cairan dan elektrolit, sehingga menyebabkan uremia.

Penyebab penyakit ginjal kronis sulit untuk ditentukan dalam kaitannya dengan stadium penyakit. Kerusakan dapat terjadi pada setiap bagian dari nefron, termasuk glomerulus, tubulus, jaringan interstitial atau pembuluh darah, yang dapat mengakibatkan kerusakan ireversibel dan hilangnya fungsi nefron (O'Neill dkk., 2013). Berdasarkan proses perjalanan penyakit dari berbagai penyebab pada akhirnya akan terjadi kerusakan nefron. Apabila nefron rusak, maka akan terjadi penurunan laju filtrasi glomerulus dan terjadilah penyakit ginjal kronik yang mana ginjal mengalami gangguan dalam fungsi eksresi dan fungsi non-eksresi. Penurunan laju filtrasi glomerulus mengakibatkan turunnya klirens kreatinin dan peningkatan kadar kreatinin serum. Hal ini menimbulkan gangguan metabolisme protein dalam usus yang mengakibatkan munculnya gejala klinis seperti anoreksia, nausea maupun vomitus. Peningkatan kreatinin dapat sampai ke otak sehingga mengakibatkan gangguan syaraf, terutama pada neurosensori (Surena, 2010). Dengan menurunnya filtrasi melalui glomerulus ginjal terjadi peningkatan fosfat serum dan penurunan kadar serum kalsium. Penurunan kadar kalsium serum

menyebabkan sekresi parathormon dari kelenjar paratiroid. Penyakit ginjal kronis yang melanjut akan mengakibatkan peningkatan ekskresi protein dalam urine dan hipertensi (Kimmel dan Rosenberg, 2014).

Penyebab umum penyakit ginjal kronis pada anjing dan kucing adalah penyakit ginjal akut yang melanjut, pielonefritis, glomerulonefritis, nefrolitiasis dan ureterolitiasis. Penyebab yang berasal dari penyakit penyakit spesifik seperti FIP dan *polycystic kidney disease* (PKD) pada kucing, sindroma Fanconi, *lyme disease* pada anjing, amyloidosis ginjal, displasia ginjal dan limfoma ginjal (Reynolds dan Lefebvre, 2013; Hall dkk., 2014). Faktor predisposisi penyakit ginjal kronis pada anjing dan kucing meliputi umur, ras, diet dan penyakit periodontal (Lulich dkk., 1992; O'Neill dkk., 2013). Menurut Brown (2010), prevalensi penyakit ginjal kronis pada anjing adalah 0,5 – 1%, sedangkan pada kucing 1% - 3% dan kejadian akan meningkat seiring dengan bertambahnya umur terutama pada kucing. Sedangkan menurut Lulich dkk. (1992), prevalensi kucing penderita penyakit ginjal kronis berumur lebih dari 10 tahun adalah sebesar 10%, umur 15 tahun ke atas sekitar 30% - 50 % (Ross dkk., 2005) dan 28% pada kucing diatas 12 tahun (Bartlett dkk., 2010).

Ras juga merupakan salah satu faktor predisposisi kejadian penyakit ginjal kronis. Prevalensi kejadian penyakit ginjal kronis dua kali lipat pada kucing jenis *Maine Coon*, *Abyssinian*, *Siamese*, *Russian Blue*, dan *Burmese* (Lulich dkk., 1992). Anjing ras yang memiliki kecenderungan mengalami penyakit ginjal kronis antara lain *Cocker Spaniel* (Lees dkk., 1998), *Bull Terrier* (Jones dkk., 1989) dan *Boxer* (Chandler dkk., 2007).

Penyakit periodontal umum terjadi pada kucing yang tua dan diduga merupakan salah satu faktor risiko terjadinya penyakit ginjal kronis pada

kucing (Finch dkk., 2016) dan anjing (Bartlett dkk., 2010). Meskipun demikian faktor tersebut tampaknya bukan secara langsung tetapi karena penyakit periodontal dapat menyebabkan nyeri mulut sehingga akan menurunkan nafsu makan serta berat badan. Oleh sebab itu masih diperlukan penelitian lebih lanjut mekanisme terjadinya penyakit ginjal kronis akibat penyakit periodontal.

Salah satu faktor risiko yang dicurigai dapat mengakibatkan gagal ginjal kronis adalah pakan komersial. Pakan komersial yang mengandung protein tinggi dan bersifat asam akan menekan kalium sehingga mengakibatkan hipokalemia (Brown, 1996). Hipokalemia tersebut akan mengakibatkan kucing mengalami gagal ginjal kronis. Penelitian awal yang dilakukn oleh Dow dkk. (1987) pada kucing yang diberi diet acidifiers berakibat hipokalemia dan azotemia.

Manajemen Terapi

Kontrol status hidrasi

Terapi cairan pada penyakit ginjal kronis sangat penting artinya karena kondisi hipovolemik dan hipotensi adalah akibat dari kurangnya *intake* cairan (Maddison dan Syme, 2010). Gangguan keseimbangan cairan pada penderita gagal ginjal yang mengalami poliuria dikompensasi dengan polidipsi. Oleh sebab itu, jika konsumsi air tidak mampu mengkompensasi maka akan timbul gejala dehidrasi (Ross, 2008). Dehidrasi mengakibatkan turunnya perfusi ginjal dan azotemia pre renal sehingga mengakibatkan semakin buruknya kondisi klinis dan laboratoris (Adams, 2004). Tujuan terapi cairan pengganti adalah mengembalikan volume cairan tubuh kearah normal dan mengurangi gejala klinis uremia (Lee dkk., 2005). Cairan pengganti dapat diberikan melalui beberapa rute seperti oral, intra vena (IV) atau sub kutan (SC). Jika aplikasi oral

tidak memungkinkan maka dapat dilakukan secara IV, SC atau menggunakan *feeding tube*. Namun demikian tujuan utama terapi cairan pengganti secara SC bukan untuk menurunkan kadar BUN dan kreatinin tetapi lebih pada kenyamanan hewan penderita (Adams, 2013).

Koreksi dehidrasi diberikan tergantung dari derajat dehidrasi hewan. Jika derajat dehidrasi 5% maka diberikan 50 ml/kg BB/12 – 24 jam, kecuali hewan mengalami gangguan jantung sehingga pemberian harus diperlambat (Maddison dan Syme, 2010). Dosis perawatan sekitar 50 mL/kg/hari, perlu ditambahkan dengan disesuaikan kondisi hewan. Cairan pengganti awal lebih diutamakan menggunakan larutan elektrolit yang seimbang seperti *lactate Ringer's solution* 75-100 ml / ekor kucing setiap hari atau setiap 2-3 hari tergantung kondisi (Adams, 2013). Pemberian cairan pengganti seperti *Saline Solution* (Natrium Klorida atau NaCl) harus hati-hati, karena dapat meningkatkan konsentrasi NaCl yang mengakibatkan timbulnya oedema dan hipertensi (Roudebush dkk., 2010). Jika setelah pemberian cairan pengganti hewan mengalami oligouria (kurang dari 1-2 ml / kg per jam), maka pemberian harus segera dihentikan guna menghindari terjadinya overhidrasi dan *oedema* (Powell, 2014). Setelah kondisi dehidrasi diperbaiki, pemberian cairan untuk pemeliharaan lebih tepat menggunakan cairan rendah Na (0,45 % NaCl dengan 2,5 % dextrose atau *lactate Ringer's solution* dengan 2,5 % dextrose) (Langston, 2009).

Keseimbangan asam basa

Asidosis metabolik adalah kondisi dimana keseimbangan asam-basa tubuh terganggu karena adanya peningkatan produksi asam atau berkurangnya produksi bikarbonat, ditandai dengan rendahnya

kadar bikarbonat dalam darah. Apabila peningkatan keasaman melampaui sistem penyangga pH, darah akan benar-benar menjadi asam (Schoolwerth dkk., 2006). Asidosis metabolik pada penyakit ginjal kronis bersifat multifaktorial, karena ginjal tidak mampu mensekresi asam (H^+) yang berlebihan (de Brito-Ashurst dkk., 2009). Penurunan sekresi asam terjadi akibat tubulus ginjal tidak mampu mensekresi ammonia (NH_3^-) dan mengabsorpsi natrium bikarbonat (HCO_3^-) (Chen dan Abramowitz, 2014). Asidosis metabolik juga mengakibatkan penurunan ekskresi fosfat dan asam organik (Elliott dkk., 2003).

Konsekuensi klinis yang terkait dengan asidosis metabolik meliputi peningkatan katabolisme protein, anoreksia, mual, muntah, lesu, penyusutan massa otot, dan kekurangan gizi (Elliott dkk., 2003; Wei Chen dan Abramowitz, 2014). Lebih dari 50% kucing penderita penyakit ginjal kronis mengalami kondisi asidosis metabolik (Elliott dkk., 2003; de Morais dkk., 2008). Kucing penderita penyakit ginjal kronis yang diberi *commercial renal diets* (pakan komersial khusus penyakit ginjal) mampu meningkatkan konsentrasi bikarbonat sehingga mencegah terjadinya asidosis metabolik (Ross dkk., 2006). Jacob dkk. (2002) melaporkan bahwa 6 dari 38 anjing penderita penyakit ginjal kronis mengalami asidosis metabolik yang cukup berat. Penelitian oleh Elliot dkk. (2003) menunjukkan bahwa 5 dari 21 kucing mengalami *acidaemia* yang disertai penurunan fungsi ginjal. Satu dari 5 kucing tersebut mengalami asidosis metabolik tanpa disertai peningkatan konsentrasi kreatinin. Dengan demikian, data tersebut menunjukkan bahwa asidosis metabolik umumnya tidak terjadi sampai gagal ginjal stadium akhir.

Hewan penderita penyakit ginjal kronis yang mengalami asidosis metabolik mungkin dapat di

koreksi dengan pemberian natrium bikarbonat oral dengan dosis 8 – 12 mg/kgBB 2 – 3 kali sehari. Pakan dengan formulasi asam basa yang seimbang ditujukan untuk meminimalisir kejadian asidosis pada kucing penderita penyakit ginjal kronis (Sparkes dkk., 2016). Terapi tambahan jarang dilakukan kecuali terjadi perubahan pada konsentrasi bikarbonat darah dan konsentrasi total CO₂ berada pada level < 16 mmol/l. Suplementasi oral kalium sitrat (40-75 mg/kg setiap 12 jam sebagai dosis awal) mungkin bermanfaat untuk mempertahankan bikarbonat darah atau total CO₂ di kisaran level 16-24 mmol / l (Sparkes dkk., 2016). Namun demikian, menurut Roudebush dkk. (2010) tidak ada uji klinis terkontrol yang menyatakan bahwa terapi alkalinisasi secara signifikan mampu memperbaiki dan meningkatkan kondisi anjing penderita penyakit ginjal kronis .

Kontrol hiperfosfatemia

Gangguan metabolisme kalsium dan fosfat merupakan salah satu komplikasi penyakit ginjal kronis yang harus mendapat perhatian, karena mempunyai peran yang sangat besar pada morbiditas dan mortalitas (Tomasello, 2008). Jika fungsi ginjal normal, secara klinis hiperfosfatemia jarang terjadi (Bellasi dkk., 2006;). Pada penyakit ginjal kronis, saat laju filtrasi glomeruli menurun hanya sampai tinggal 20% dari normal maka akan timbul hiperfosfatemia dan selanjutnya akan merangsang peningkatan sekresi hormon paratiroid (Dibartola dan Willard, 2006).

Penyakit ginjal kronis adalah penyebab paling umum dari hiperfosfatemia pada kucing dan anjing dewasa (Kidder dan Chew, 2009). Pengobatan untuk kontrol hiperfosfatemia biasanya menggunakan *intestinal phosphate binding agent* seperti kalsium karbonat, kalsium asetat, alumunium hidroksi, sukrosa

alumunium hidroksi (*sucralfate*), lanthanum karbonat sevelamer HCl dan epakitin (Houston, 2016). Dosis tepat yang direkomendasikan untuk alumunium hidroksi pada kucing tergantung dari level P darah, stadium penyakit, jenis pakan yang diberikan dan respon terhadap rasa alumunium hidroksi tersebut. Data dari Sparkes dkk. (2016) menyebutkan bahwa dosis *intestinal phosphate binding agent* awal untuk kucing adalah: aluminium hidroksida/karbonat 90 mg/kgBB/hari, kalsium karbonat 90 mg/kgBB/hari, kalsium asetat 60 - 90 mg/kgBB/hari, lanthanum karbonat 30 - 90 mg/kgBB/hari dan sevelamer HCl 90 - 160 mg/kgBB/hari.

Intestinal phosphate binding agent bekerja paling efektif jika dicampur dengan pakan atau diberikan 2 jam setelah makan sehingga dapat mengikat P secara maksimal (Chew, 2015). Pada manusia dan kucing, suplementasi oral senyawa seperti chitosan, kalsium karbonat, dan kalium sitrat telah digunakan untuk penanganan hiperfosfatemia (Savica dkk., 2009). Pengobatan dengan menggunakan Pronefra® (kombinasi kalsium karbonat, magnesium karbonat, chitosan, vasoaktif peptida dan ekstrak *Astragalus membranaceus*) efektif menurunkan kadar fosfat dan kreatinin darah sehingga dapat digunakan untuk pengobatan penyakit ginjal kronis stadium awal pada kucing (Bernachon dkk., 2014). Kombinasi pembatasan diet P dan protein dengan atau tanpa penambahan *intestinal phosphate binding agent* (aluminium hidroksida) mampu menurunkan konsentrasi P maupun PTH dan memperpanjang hidup kucing penderita penyakit ginjal kronis (Barber dkk., 1999). Penelitian di Inggris dengan menggunakan *sucralfate* sebagai *phosphate binding agent* pada kucing tidak menunjukkan hasil yang memuaskan (Quimby dan Lappin, 2016). Namun jika memang akan digunakan untuk pengobatan,

dosis yang direkomendasikan untuk kucing adalah 0,25 -0,5 g/kucing/12 jam (McLeland dkk., 2014). Pengobatan dengan Epakitin® (Vetoquinol Inc.) yang mengandung chitosan sebagai absorben (8% ekstrak kepiting dan kulit udang), 10% kalsium karbonat dan 82% laktosa dengan dosis 1 gram/4 kg BB 2 kali sehari dicampur dengan pakan cukup efektif untuk anjing dan kucing. Pemberian Epakitin® pada kucing harus hati hati karena dapat menyebabkan hiperkalsemia (Houston, 2016).

Kontrol renal secondary hyperparathyroidism

Hiperfosfatemia pada penyakit ginjal kronis terjadi akibat kegagalan ginjal dalam mengekskresi fosfat, tingginya asupan fosfat atau peningkatan pelepasan fosfat dari ruang intraseluler (Barber dan Elliott, 1998). Ginjal merupakan organ ekskresi utama bagi fosfat, sehingga hampir tidak mungkin terjadi hiperfosfatemia pada fungsi ginjal yang masih normal. Hiperfosfatemia mengakibatkan berbagai konsekuensi seperti *renal secondary hyperparathyroidism* dan osteodistrofi renal (Nelson dan Feldman, 2004). *Renal secondary hyperparathyroidism* adalah suatu keadaan dimana terjadi hiperaktivitas kelenjar paratiroid dan peningkatan sekresi hormon paratiroid sebagai mekanisme kompensasi untuk mempertahankan kadar fosfat, kalsium dan kalsitriol dalam batas normal pada penderita penyakit ginjal kronis (Marx, 2000). *Renal secondary hyperparathyroidism* terjadi saat sintesis dan sekresi PTH menjadi berlebihan karena kerusakan ginjal (Nagode dkk., 1996).

Kalsitriol adalah Vitamin D dalam bentuk aktif dan berfungsi untuk mengatur penyerapan kalsium dari makanan yang sangat diperlukan untuk berbagai proses metabolisme tubuh serta proses pembentukan tulang (Brody, 1999). Kalsitriol bekerja melalui

ikatan dengan reseptor sel spesifik paratiroid sehingga sintesis dan sekresi PTH dihambat (Silver dkk., 1985). Pemberian kalsitriol juga akan mengembalikan Ca ke level normal sehingga menghambat sekresi PTH dan selanjutnya mencegah terjadinya hiperplasi paratiroid (Chew dan Nagode, 1992).

Menurut Barber dan Elliott (1998) 84% kasus penyakit ginjal kronis pada kucing menunjukkan peningkatan konsentrasi PTH plasma. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa pemberian kalsitriol akan meningkatkan kadar Ca maupun P sehingga perlu dilakukan pemeriksaan kadar Ca dan P serum sebelum pemberiannya (Polzin dkk., 2005). Dengan demikian kalsitriol hanya dapat diberikan setelah kadar P serum normal (Barber dkk., 1999).

Pemberian kalsitriol oral dosis rendah dianggap aman dan efektif untuk mengontrol *renal secondary hyperparathyroidism* pada anjing. Sebaliknya, pemberian dosis rendah pada kucing tidak mempunyai pengaruh yang berarti dalam mengontrol *renal secondary hyperparathyroidism* (Hostutler dkk. 2006). Dosis rendah kalsitriol efektif apabila dimulai pada awal uremia sebelum *renal secondary hyperparathyroidism* melanjut. Pemberian kalsitriol dengan dosis 6,6 ng /kg per hari selama 30 hari pada beberapa anjing penderita penyakit ginjal kronis menunjukkan penurunan sekresi PTH yang cukup berarti (Brown dan Finco, 1995). Penelitian Takahashi dkk. (2002) menunjukkan bahwa pemberian kalsitriol intravena maupun per oral efektif dalam mengontrol *renal secondary hyperparathyroidism*. Namun sebaliknya, studi eksperimental yang dilakukan oleh Kaplan dkk. (1978) menunjukkan bahwa pemberian kalsitriol dengan dosis (400 ng) IV selama 3 hari berturut turut tidak mampu menekan *renal secondary hyperparathyroidism* pada anjing yang mengalami uremia. Pada studi yang lain, pemberian kalsitriol

dengan dosis 30 – 50 ng/kgBB/hari selama 14 minggu pada anjing yang diinduksi gagal ginjal meskipun mampu mengontrol hiperkalsemia namun mengakibatkan penurunan nafsu makan dan berat badan secara drastis (Dzanis dkk., 1991).

Anemia

Salah satu fungsi ginjal adalah menghasilkan eritropoetin untuk merangsang produksi sel darah merah oleh sumsum tulang. Eritropoetin diproduksi terutama di sel interstitial peritubular dari korteks ginjal bagian dalam dan medulla bagian luar ginjal (Erslev dan Besarab, 1997). Stimulus utama untuk sintesis eritropoetin adalah hipoksia ginjal, yang merangsang pengeluaran eritropoetin dari ginjal (Maiese dkk., 2008). Target kerja utama eritropoetin adalah sumsum tulang yang kemudian bekerja untuk meningkatkan produksi eritrosit. Semakin berat penyakit ginjal, semakin sedikit eritropoetin yang dihasilkan (Cook dan Lothrop, 1994). Patogenesis anemia akibat penyakit ginjal kronis bersifat kompleks dan multifaktorial namun demikian penyebab utamanya adalah turunnya kadar eritropoetin (Randolph, 2004). Anemia pada kasus penyakit ginjal kronis pada kucing menunjukkan derajat yang bervariasi (Elliott dan Barber, 1998). Anemia dianggap sebagai faktor risiko dependen maupun independen pada proses penyakit ginjal kronis kucing (Chakrabarti dkk., 2012; Geddes dkk., 2015).

Sejumlah rhEPO telah diproduksi untuk pengobatan pada manusia seperti *epoetin alfa*, *epoetin beta*, *darbepoetin alfa* dan *continuous erythropoietin receptor activators* tetapi obat tersebut juga bisa digunakan baik pada kucing maupun anjing (Chalhoub dkk., 2011). Terapi penyakit ginjal kronis dengan menggunakan *Recombinant*

human erythropoietin (rhEPO) pada kucing telah berhasil mengobati anemia non regeneratif. Kucing penderita menunjukkan peningkatan jumlah eritrosit, peningkatan berat badan, peningkatan nafsu makan, pertumbuhan rambut dan peningkatan aktivitas (Cowgill dkk., 1998; Randolph dkk., 2004; Chalhoub dkk., 2012). Penggunaan rhEPO dengan dosis 500 U SC per hari selama tujuh hari kemudian dilanjutkan tiga kali seminggu selama beberapa bulan pada anjing penderita penyakit ginjal kronis menunjukkan perbaikan kondisi anemia. Selama terapi perlu dilakukan pemantauan yang seksama pada status Fe dan tekanan darah karena salah satu efek samping dari pemberian rhEPO adalah meningkatnya tekanan darah (Bloomberg dkk., 1992). Namun demikian menurut Cowgill dkk. (1998), setelah pemberian beberapa minggu rhEPO, tubuh akan menghasilkan antibodi anti rhEPO sehingga pengobatan hanya bersifat sementara. Dampak yang sama juga terlihat pada pemberian *recombinant feline erythropoietin* (fEPO) pada kucing penderita penyakit ginjal kronis (Randolph dkk., 2004). Pada anjing terjadi hal yang sama dimana 50% anjing yang diterapi dengan rhEPO membentuk antibodi anti rhEPO dan mengalami anemia berat karena kemungkinan rhEPO menginduksi aplasia sel darah merah (Cowgill, 1991). Hal tersebut kemungkinan karena adanya perbedaan sekuensing urutan basa asam amino sebesar 18,7% sehingga berpotensi imunogenik pada anjing (MacLeod dkk., 1998). Menurut Chalhoub dkk. (2011), 12% kucing memberikan respon kesembuhan yang baik setelah pemberian *darbepoietin* dengan dosis awal dosis 0,45 mg / kg sekali seminggu. Sedangkan pemberian *darbepoietin* dengan dosis dosis 1,0 mg / kg sekali seminggu, 62% kucing memberikan respon kesembuhan yang baik. Setelah PCV meningkat menjadi kisaran 25 – 35%,

pemberian *darbepoietin* menurun frekuensi menjadi setiap 2-3 minggu.

Hipertensi

Peran ginjal dalam pengaturan tekanan darah adalah melalui pengaturan volume cairan ekstraseluler dan sekresi renin. Sistem Renin-Angiotensin merupakan sistem endokrin yang penting dalam pengontrolan tekanan darah (Atlas, 2007). Renin disekresi oleh juxtaglomerulus aparatus ginjal sebagai respon penurunan perfusi glomerulus, penurunan asupan garam, ataupun respon dari sistem saraf simpatetik (Thibodeau, 1999). Mekanisme terjadinya hipertensi adalah melalui terbentuknya angiotensin II dari angiotensin I oleh *angiotensin I-converting enzyme* (ACE) (Watanabe dan Mishina, 2007). *Angiotensin I-converting enzyme* memegang peranan fisiologis penting dalam mengatur tekanan darah. Darah mengandung angiotensinogen yang diproduksi hati, yang oleh hormon renin dari ginjal akan diubah menjadi angiotensin I. Oleh ACE yang terdapat di paru-paru, angiotensin I diubah menjadi angiotensin II. Angiotensin II berpotensi besar meningkatkan tekanan darah karena bersifat sebagai *vasoconstrictor* melalui dua jalur, yaitu meningkatkan sekresi hormon antidiuretik (ADH) dan menstimulasi sekresi aldosteron dari korteks adrenal (Mitani dkk., 2013).

Penyakit ginjal kronis merupakan salah satu penyebab terjadinya hipertensi pada hewan kecil yang sudah tua (Jepson dkk., 2007). Penelitian Kobayashi dkk. (1990) menunjukan bahwa prevalensi hipertensi akibat penyakit ginjal kronis pada kucing mencapai 60%. Sedangkan penelitian Syme dkk. (2002) menunjukan bahwa 18% kucing terdiagnosa penyakit ginjal kronis menderita hipertensi. Prevalensi hipertensi akibat penyakit

ginjal kronis pada anjing pada penelitian Cortadellas dkk. (2006) menunjukkan angka sebesar 62%, sedangkan penelitian Bodey dkk. (1996) sebesar 9%. Penelitian lain menunjukkan bahwa hipertensi dapat mengakibatkan kebutaan pada kucing penderita penyakit ginjal kronis (Morgan, 1986).

Angiotensin I-converting enzyme inhibitor (ACEi) dan *calcium channel blocker* (CCB) sudah sering digunakan untuk anjing dan kucing penderita hipertensi (Brown dkk., 2007). Termasuk dalam kelompok ACEi adalah benazepril, enalapril dan temocapril. *Angiotensin I-converting enzyme inhibitor* menghambat kerja ACE secara kompetitif (Lopez-Sendón dkk., 2004), dengan cara menghambat pembentukan angiotensin II (Sweitzer, 2003). Sedangkan yang termasuk golongan CCB adalah amlodipine (Maddison dan Syme, 2010). Menurut Litman (1994) terapi hipertensi pada kucing dapat menggunakan diuretik, *calcium channel blocker* (CCB), β blocker dan ACEi serta diet rendah garam. *Angiotensin I-converting enzyme inhibitor* biasanya direkomendasikan sebagai obat pilihan awal (Ettinger dkk., 1998).

Laporan kasus oleh Yabuki dkk. (2011) menunjukkan bahwa pemberian generasi baru ACEi (temocapril) mampu menurunkan tekanan darah pada anjing penderita penyakit ginjal kronis stadium awal. Pemberian benazepril hidrokorida pada kucing per oral dengan dosis harian 2,5 atau 5 mg (0,92-2,0 mg / kg / hari) selama 2 atau 3 minggu cukup efektif pada penanganan hipertensi akibat penyakit ginjal kronis (Watanabe dan Mishina, 2007). Hasil penelitian Mizutani dkk. (2006) menunjukkan bahwa pemberian tablet benazepril dengan dosis 0,5-1,0 mg/kg BB, sehari sekali mampu menghambat laju kerusakan ginjal dan memperpanjang umur kucing (Mizutani dkk., 2006). Penelitian oleh Morar dkk. (2009) pada kucing

berumur 7 – 14 tahun yang didiagnosa penyakit ginjal kronis dan diberi amlodipine dengan dosis 0,1-0,2 mg/kg (0,625 mg/kucing) menunjukkan bahwa tekanan darah menurun secara signifikan. Hasil yang sama juga ditunjukkan oleh penelitian Maddison dan Syme (2010) yang menyatakan bahwa dosis awal amlodipine 0,625 mg (1/8 tablet)/kucing/hari mampu menurunkan tekanan darah kucing penderita penyakit ginjal kronis. Namun jika dosis tersebut gagal menurunkan tekanan darah (yaitu untuk < 165 mmHg) maka dosis dua kali lipat menjadi 1,25 mg (1/4 tablet)/kucing/hari. Dosis dua kali lipat tersebut mampu menurunkan tekanan darah di hampir semua kucing.

Kontrol hipokalemia

Kalium adalah kation intraseluler utama dalam sel mamalia dan terutama bertanggung jawab untuk pemeliharaan volume intraseluler (DiBartola dan de Moraes, 2006). Keseimbangan kalium dipertahankan terutama lewat regulasi ekskresi ginjal. Ketidakseimbangan kalium (K^+) merupakan salah satu gangguan serius yang dapat terjadi pada gagal ginjal. Frekuensi kejadian hipokalemia akibat penyakit ginjal kronis lebih sering terjadi pada kucing dibandingkan dengan anjing (Ross, 2008). Hipokalemia dapat menyertai poliuria pada penyakit ginjal kronis awal, terutama pada penyakit-penyakit pada tubulus ginjal. Akan tetapi hiperkalemia selalu akan timbul bila pasien mengalami oligouria pada penyakit ginjal kronis. Kondisi hiperkalemia jarang terjadi kecuali pada stadium akhir penyakit ginjal kronis yang biasanya disertai dengan oligouria atau anuria (Price dkk., 2006). Studi retrospektif menunjukkan hipokalemia terjadi pada 20 – 30% kucing penderita penyakit ginjal kronis (Lulich dkk., 1992). Banyak bentuk suplemen kalium tersedia seperti serbuk yang dicampur dengan pakan, tablet

kunyah maupun non - kunyah dan bentuk gel (Wolf, 2015). Selain diet dengan penambahan K, pemberian Kalium glukonat dan kalium sitrat per oral serta kalium klorida parenteral sering digunakan untuk koreksi hipokalemia pada anjing dan kucing (Ross, 2008). Dosis kalium sitrat per oral untuk kucing adalah 50–75 mg/kg PO setiap 12 jam (Polzin dkk., 2005). Suplementasi dengan kalium glukonat atau kalium sitrat dianjurkan jika serum $K < 3,5$ mmol / l ($< 3,5$ mEq / l), dengan dosis awal 1-4 mmol (1-4 mEq) K setiap 12 jam, disesuaikan dengan respon dari kucing (Sparkes dkk., 2016).

Kontrol Proteinuria

Proteinuria adalah manifestasi utama pada penyakit ginjal dan merupakan indikator turunya fungsi ginjal. Proteinuria merupakan gejala utama pada sindrom nefrotik. Perubahan hemodinamik yang dialami nefron berupa peningkatan aliran darah glomerulus dan tekanan intrakapiler glomerulus menyebabkan meningkatnya protein dalam filtrat glomerulus. Meningkatnya jumlah protein yang difiltrasi oleh glomerulus juga disebabkan oleh meningkatnya permeabilitas kapiler glomerulus (Schlondorff, 2008). Protein dalam filtrat glomerulus akan direabsorpsi oleh sel epitel tubulus proksimal, kemudian mengalami proses endositosis, selanjutnya mengalami degradasi oleh lisosom menjadi asam amino (Keane, 2000). Bila nefron mengalami kerusakan maka akan terjadi penurunan laju filtrasi glomeruli yang mana ginjal mengalami gangguan dalam fungsi ekskresi dan fungsi non-eksresi sehingga dapat melanjut menjadi penyakit ginjal kronis (Ruggenti dkk., 2012). Beberapa metode deteksi dapat digunakan untuk mengevaluasi kejadian proteinuria pada anjing dan kucing seperti analisa urin konvensional, penentuan rasio protein urin: kreatinin

(UP/C), pemeriksaan konsentrasi albumin urin (Lees dkk., 2005; Bacic dkk., 2010), *N*-konsentrasi *acetyl-β-d-glucos-aminidase* (Jepson dkk., 2010), *retinol binding protein* (Smets dkk., 2010) Beratnya proteinuria memiliki korelasi dengan perkembangan penyakit ginjal baik pada manusia, anjing maupun kucing (Jacob dkk., 2005; Nabity dkk., 2007).

Saat ini, rasio protein urin: kreatinin (UPC) merupakan *gold standard* untuk uji proteinuria pada anjing maupun kucing. Pengujian tunggal sampel urin yang diambil dengan waktu acak memiliki korelasi kuat dengan jumlah protein urin selama 24 jam (Monroe dkk., 1989). Menurut Jacob dkk. (2005), anjing dengan diagnosa awal CKD disertai azotemia dan nilai UPC > 1,0 akan mengalami kematian lebih cepat dibandingkan anjing penderita CKD dengan nilai UPC < 1,0. Pada anjing, nilai UPC ≥ 0,5 yang berasal dari 3 sampel selama 2 minggu pemeriksaan merupakan bukti kuat dari persisten proteinuria akibat kerusakan ginjal (Center dkk., 1985). Pada kucing, nilai UPC ≥ 1,0 menunjukkan kecurigaan adanya kerusakan pada glomerulus. Sedangkan hasil penelitian Syme dkk. (2006) menunjukkan bahwa nilai UPC antara 0,5 – 1,2 baru memiliki kaitan klinis dengan penyakit ginjal kronis. Sedangkan nilai UPC 1,0 sampai 2 kadang kadang menunjukkan stadium akhir penyakit ginjal kronis pada kucing (Lees dkk., 2005). Semakin rendah nilai UPC maka semakin baik prognosanya (Walker dkk., 2004).

Hasil studi terbaru menunjukkan bahwa pada anjing dan kucing, seperti pada manusia, proteinuria persisten terkait dengan tingginya frekuensi penyakit ginjal kronis (Jacob dkk., 2005). Derajat proteinuria dapat menjadi indeks diagnostik untuk anjing dan kucing penderita penyakit ginjal kronis (Elliott dkk., 2000). Pengobatan dengan ACEi seperti elanapril, benazapril dan lisinopril pada manusia maupun hewan

percobaan mampu menurunkan kejadian proteinuria dan mengurangi laju kerusakan ginjal (Lees dkk., 2004). Hasil studi juga menunjukkan bahwa status proteinuria anjing dan kucing yang diterapi dengan ACEi akan terkoreksi (Grodecki dkk., 1997). Hasil pengobatan elanapril pada anjing penderita penyakit ginjal kronis dengan status proteinuria ringan menunjukkan penurunan kadar protein dan menekan laju kerusakan ginjal (Brown dkk., 2003). Dosis elanapril per oral yang dianjurkan untuk kucing adalah 0,25 sampai 0,5 mg/kg BB, setiap 12 – 24 jam. Sedangkan untuk anjing dosis per oral adalah 0,5 mg/kg BB, PO setiap 12 – 24 jam (Plumb, 2011). Menurut Mizutani (2006) pemberian benazepril 0,5-1 mg/kg benazepril sehari sekali selama 6 bulan secara konsisten mengurangi kejadian proteinuria pada berbagai stadium penyakit ginjal kronis pada kucing.

Manajemen Diet

Pakan penyakit ginjal kronis

Rasa pakan komersial untuk penyakit ginjal kronis pada umumnya memiliki palatabilitas yang rendah jika dibandingkan dengan pakan normal dan kemungkinan disebabkan karena rendahnya kandungan protein, P dan Na tetapi tinggi serat terlarut, kapasitas asam basa, vitamin B kompleks, antioksidan dan asam lemak omega-3. Hal tersebut dapat mengakibatkan rendahnya asupan pakan dan akan memperburuk kondisi hewan (Allen dkk., 2000; Markovich dkk., 2015). Perubahan dari pakan harian ke pakan untuk penyakit ginjal kronis pada kucing harus dilakukan secara bertahap dan membutuhkan waktu paling tidak selama 7 hari. Namun ada perkecualian dimana beberapa kucing membutuhkan waktu 3 sampai 4 minggu (Roudebush dkk., 2009).

Pakan komersial khusus penyakit ginjal untuk anjing penderita penyakit ginjal kronis pada

umumnya mengandung protein terbatas. Pakan dengan kandungan protein rendah (8% dan 17%) mampu menurunkan kadar BUN dan tingkat kematian pada anjing penderita penyakit ginjal kronis (Polzin dkk., 1984). Dalam sebuah penelitian, diperlukan waktu sampai 4 minggu untuk memperoleh nilai UPC normal pada anjing yang diberi diet komersial khusus penyakit ginjal (Lees, 2005). Penelitian Jacob dkk. (2002) menunjukkan bahwa anjing penderita penyakit ginjal kronis yang diberi pakan komersial khusus penyakit ginjal selama 2 tahun menjadi lebih lambat kerusakan ginjalnya dibandingkan dengan anjing penderita yang diberi pakan normal.

Pakan komersial khusus penyakit ginjal pada kucing biasanya mengandung 6-7 g protein per 100 kkal (di atas 5 g/100 kkal direkomendasikan untuk kucing dewasa) (NRC, 2006). Kebutuhan energi untuk kucing berumur di atas 13 tahun kemungkinan akan meningkat sehingga pembatasan protein dapat menyebabkan hilangnya jaringan tubuh (Laflamme dan Hannah, 2013), sehingga dianjurkan diet dengan protein terbatas moderat disertai dengan pengamatan massa tubuh, berat badan dan asupan kalori. Pakan komersial khusus penyakit ginjal pada kucing biasanya kandungan P juga rendah jika dibandingkan dengan pakan normal (Kidder dan Chew, 2009). Pembatasan diet protein sekitar 2,7 g / kg / hari dan asupan energi sekitar 56 kkal / hari mengakibatkan lesi ginjal lebih sedikit pada kucing penderita gagal ginjal dibandingkan dengan konsumsi sekitar 6,8 g protein / kg / hari dan 75 kkal / hari (Adam dkk., 1993).

Penelitian suplementasi antioksidan pada terapi penyakit ginjal kronis menunjukkan hasil yang bervariasi. Suplementasi vitamin E (alfa- tokoferol) pada kucing pada kucing penderita penyakit ginjal kronis mungkin memiliki efek positif dalam

memperbaiki kondisi anemia (Bagnoux dkk., 2013). Namun demikian hasil tersebut berbeda dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Timmons dan Webb (2016). Pemberian suplemen vitamin E dengan dosis 30 IU/hari selama 3 bulan tidak mampu memperbaiki kondisi anemia secara signifikan. Hasil penelitian Yu dan Robinson (2006) menunjukkan bahwa kombinasi antara vitamin E, C dan beta – karoten mampu mengatasi oksidatif stress sehingga akan memperbaiki kondisi anemia.

Manfaat asam lemak omega-3 minyak ikan telah banyak diteliti dan direkomendasikan dalam pengelolaan berbagai macam penyakit termasuk penyakit ginjal kronis (Lenox dan Bauer, 2013). Penelitian yang dilakukan oleh Brown dkk. (1998) menunjukkan bahwa suplementasi pakan dengan asam lemak tidak jenuh majemuk dan antioksidan dapat memberikan efek protektif pada hewan penderita penyakit ginjal kronis. Selanjutnya Brown dkk. (2000) menyatakan bahwa efek protektif asam lemak omega-3 kemungkinan melalui penurunan produksi prostaglandin dan penurunan tekanan kapiler glomerulus. Rentang dosis asam lemak omega-3 yang dianjurkan adalah 10-200 mg/kg PO /24 hari. Forrester dkk. (2010) menganjurkan pakan dengan tambahan asam lemak omega – 3 0,4% sampai 2,5% dari bahan kering untuk anjing penderita penyakit ginjal kronis. Studi retrospektif terhadap kelangsungan hidup dari 146 kucing penderita penyakit ginjal kronis yang diberi pakan normal dan pakan komersial khusus penyakit ginjal menunjukkan bahwa kelangsungan hidup lebih panjang pada kucing dengan pakan komersial khusus penyakit ginjal. Kelangsungan hidup yang panjang tersebut terkait dengan pakan yang mengandung *Eicosapentaenoic acid* (EPA) tinggi (Plantinga dkk., 2005).

Kesimpulan

Berbagai macam strategi pengobatan dan diet dapat digunakan untuk mengelola baik anjing maupun kucing penderita penyakit ginjal kronis. Penyakit ginjal kronis tidak dapat disembuhkan sehingga pengelolaan pengobatan dan diet yang tepat lebih ditujukan untuk memperbaiki kualitas hidup dan memperpanjang hidup hewan.

Daftar Pustaka

- Adams, L. G. (2004). *Chronic renal failure*. In: The 5- Minute Veterinary Consult. 4th edn. Eds L. P. Tilley and F. W. K. Smith. Lippincott William & Wilkins, Philadelphia, PA, USA. : 1124-1125.
- Adams, L.G. (2013). *How I treat anorexia in cats with chronic kidney disease*. Proc World Small Animal Veterinary Assoc Congress Proc.
- Allen, T. A., Polzin, D. J. and Adams, L. G. (2000). *Renal disease*. In: *Small Animal Clinical Nutrition*. 4th edn. Eds M. S. Hand, C. D. Thatcher, R. L. Remillard and P. Roudebush. Mark Morris Institute, Topeka, KS, USA. : 563-598.
- Arora, P. (2014). Chronic Kidney Disease. MedScape. Diakses dari <http://emedicine.medscape.com/article/238798-overview>. Pada tanggal 18 Agustus 2016.
- Arzi, B., Anderson, J.G. and Verstraete, F.J.M. (2008). Oral manifestations of systemic disorders in dogs and cats. *Journal of Veterinary Clinical Science* 1 : 112–124.
- Atlas, S.A. (2007). The renin-angiotensin aldosterone system: Pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *Journal of Managed Care Pharmacy*. 13: 9–20.
- Bacic, A., Kogika, M.M., Barbaro, K.C., Iuamoto, C.S., Simoes, D.M. and Santoro, M.L. (2010). Evaluation of albuminuria and its relationship with blood pressure in dogs with chronic kidney disease. *Veterinary Clinical Pathology* 39 : 203– 209.
- Barber, P.J. and Elliott, J. (1998) Feline chronic renal failure: calcium homeostasis in 80 cases diagnosed between 1992 and 1995. *J Small Anim Pract.* 39 : 108-116.
- Barber, P.J., Rawlings, J.M., Markwell, P.J. and Elliott, J. (1999). Effect of dietary phosphate restriction on renal secondary hyperparathyroidism in the cat. *J Small Anim Pract.* 40:62-70.
- Bargnoux, A., Cristol, J., Jaussent, I., Chalabi, L., Bories, P., Dion, J.J., Henri, P., Delage, M., Dupuy, A.M., Badiou, S., Canaud, B. and Morena, M. (2013). Vitamin E-coated polysulfone membrane improved red blood cell antioxidant status in hemodialysis patients. *Nephrology* 26 :556–563.
- Bartges, J.W. (2012). Chronic Kidney Disease in Dogs and Cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 2012;42:669-692. Bartges JW. Chronic Kidney Disease in Dogs and Cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 42 :669-692.
- Bartlett, P. C., Van Buren, J.W., . Bartlett, A. D. and, Chu.Z (2010). *Research Article Case-Control Study of Risk Factors Associated with Feline and Canine Chronic Kidney Disease*. *Veterinary Medicine International* Vol.2010, Article ID 957570, 1 – 9.
- Bellasi, A., Kooienga, L. and Block, G.A. (2006). Phosphate binders: new products and challenges. *Hemodial Int.* 10: 225–34.
- Bernachon, N., Fournel, S., Gatto, H., Monginoux, P. and McGahie, D. (2014). Effect of a Product Containing the Dietary Phosphate Binders Calcium and Magnesium Carbonate Associated with Other Reno-protectant Substances (Pronefra®) on Blood Parameters and Mineral Balance in Adult Cats. *Intern J Appl Res Vet Med.* Vol. 12 (1) : 8 – 17.
- Bernsteen, L., Gregory, C.R., Aronson, L.R., Lirtzman, R.A. and Brummer, D.G. (1999). Acute toxoplasmosis following renal transplantation in three cats and a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 215(8) :1123-1126.

- Bloomberg, R.M., Pook, H. A., Jacobs, R. M. and Van Gorder, J. M. (1992). Human recombinant eritropoetin therapy in a cat with chronic renal failure. *Can Vet J* Vol. 33 : 612 – 613.
- Bodey, A.R. and Michell, A.R. (1996). Epidemiological study of blood pressure in domestic dogs. *J Small Anim Pract.* 37 :116–125.
- Brody, T. (1999). *Nutritional Biochemistry*. 2nd edn. Academic Press, San Diego, CA, USA. : 575.
- Brown, S.A. (2015). Renal dysfunction in small animals. The Merck Veterinary Manual website. www.merckmanuals.com/vet/urinary_system/noninfectious_diseases_of_the_urinary_system_in_small_animals/renal_dysfunction_in_small_animals.html. Diakses Januari 14.
- Brown, S.A. and Finco, D.R. (1995). *Reassessment of the use of calcitriol in chronic renal failure*. In: Bonagura JD, ed. Kirk's Current Veterinary Therapy XII. Philadelphia: WB Saunders : 963–966.
- Brown, S.A., Atkins, B.C., Carr, R., Cowgill, A., Davidson, L., Egner, M., Elliott, B., Henik J., Labato, R., Littman, M., Polzin, M., Ross, D., Snyder, L.P. and Stepien, R. (2007). "Guidelines for the identification, evaluation, and management of systemic hypertension in dogs and cats," *J Vet Intern Med.* 21 :542–558.
- Brown, S.A., Finco, D.R., Bartges, J.W., Brown, C.A. and Barsanti, J.A. (1998). Interventional nutrition for renal disease. *Clin Tech Small Anim Pract.* 13: 217-223.
- Brown, S.A., Brown, C.A., Crowell, W.A., Barsanti, J.A., Kang, C.W., Allen, T., Cowell, C. and Finco, D.R. (2000) Effects of dietary polyunsaturated fatty acid supplementation in early renal insufficiency in dogs. *J Lab Clin Med.*135 :275-286.
- Brown, S.A., Finco, D.R., Brown, C.A., Crowell, W.A., Alva, R., Ericsson, G.E. and Cooper, T. (2003). Evaluation of the effects of inhibition of angiotensin converting enzyme with enalapril in dogs with induced chronic renal insufficiency. *Am J Vet Res.* 64: 321–327.
- Brown, S.A., Brown, C.A., Crowell, W.A., Basanti, J.A. and Finco D.R. (1996). Does modifying dietary lipids influence the progression of renal failure? *Vet Clin North Am.* 26:1277–1285.
- Burkholder, W.J. (2000). Dietary considerations for dogs and cats with renal disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 216 : 1730-1734.
- Car, B.D. (2001). *Erythropoiesis and erythrokinetics*. In: Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC, eds. *Schalm's Veterinary Hematology* New York: McGraw-Hill,:271—288.
- Center, S.A., Wilkinson, E., Smith, C.A., Erb, H. and Lewis, R.M. (1985). 24-Hour urine protein/creatinine ratio in dogs with protein-losing nephropathies. *J Am Vet Med Assoc.* 187:820–824.
- Chakrabarti, S., Syme, H.M. and Elliott, J. (2012). Clinicopathological variables predicting progression of azotemia in cats with chronic kidney disease. *J Vet Intern Med.* 26: 275–281.
- Chalhoub, S., Langston, C.E. and Eatroff, A. (2011). Anemia Of Renal Disease What it is, what to do and what's new. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 13 : 629–640.
- Chalhoub, S., Langston, C.E. and Farrelly, J. (2012). The use of darbepoetin to stimulate erythropoiesis in anemia of chronic kidney disease in cats: 25 cases. *J Vet Intern Med.* 26(2) :363–369.
- Chandler, M.L., Elwood. C., Murphy, K.F., Gajanayake, I. and Syme, H.M. (2007). Juvenile nephropathy in 37 boxer dogs. *J Small Anim Pract.* 48(12):690-694.
- Chen, W. and Abramowitz, M. K. (2014). Metabolic acidosis and the progression of chronic kidney disease. *BMC Nephrology* 15 : 55.
- Chen, W. and Abramowitz, M. K (2014). Treatment of Metabolic Acidosis in Patients With CKD *Am J Kidney Dis.* Feb; 63(2): 311–317.
- Chew, D.J. (2015). *Chronic Kidney Disease (CKD) in Dogs & Cats - Staging and Management Strategies*. A Presentation to the Virginia Veterinary Medical Association. Virginia Veterinary Conference. : 1 – 22

- Chew, D.J. and Nagode, L.A. (1992). *Kalsitriol in the treatment of chronic renal failure*. In: Kirk BW, Bonagura JD, eds. *Current Veterinary Therapy XI, Small Animal Practice*. Philadelphia: WB Saunders. :857-860.
- Cook, S. M. and Lothrop, C. D. (1994). Serum eritropoetin concentrations measured by radioimmunoassay in normal, polycythemic, and anemic dogs and cats. *J Vet Intern Med.* 8 : 18–25.
- Cortadellas, O., del Palacio, M.J., Bayón, A., Albert, A. and Talavera, J. (2006). Systemic hypertension in dogs with leishmaniasis: Prevalence and clinical consequences. *J Vet Int Med.* 20: 941–947.
- Cowgill, L. D. (1991). *Eritropoetin: Its use in the treatment of chronic renal failure in dogs and cats*. Proc Annu Waltham/OSU Symp Treat Small Anim Dis;15:65–71.
- Cowgill, L.D., James, K.M., Levy, J.K., Browne, J.K., Miller, A., Lobingier, R.T. and Egrie, J.C. (1998). Use of recombinant human eritropoetin for management of anemia in dogs and cats with renal failure. *J Am Vet Med Assoc.* 212: 521-8.
- Crisp, M.S., Chew, D.J., DiBartola, S. P. and Birchard, S. J. (1989). “Peritoneal Dialysis in Dogs and Cats: 27 Cases” (1976-1987). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 195: 1262-1266.
- de Brito-Ashurst, I., Varagunam, M., Raftery, M.J. and Yaqoob, M.M. (2009). Bicarbonate supplementation slows progression of CKD and improves nutritional status. *J Am Soc Nephrol.* 20: 2075–2084.
- de Morais, H.A., Bach, J.F. and diBartola, S.P. (2008). Metabolic acidbase disorders in the critical care unit. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 38: 559–574.
- DiBartola, S.P. and de Morais, H.A. (2006). *Disorders of potassium: Hypokalemia and hyperkalemia*, in DiBartola SP (ed): *Fluid, Electrolyte, and Acid-Base Disorders*. 3rd ed., Philadelphia, Elsevier : 91-121.
- Dibartola, S.P., and Willard, M.D. (2006). *Disorders of phosphorous: hypophosphatemia and hyperphosphatemia*. In: Dibartola SP, ed. *Fluid, electrolyte, and acid-base disorders in small animal practice*. 3rd edn. Missouri: Elsevier. : 195–209.
- Dokuzeylul, B. And Kayar, M.E. A. (2016). Prevalence of systemic disorders in cats with oral lesions. *Veterinarni Medicina*, 61 (4) : 219–223.
- Dow, S.W., Fettman, M.J., LeCouteur, R.A. and Hamar, D.W. (1987). Potassium depletion in cats: Renal and dietary influences. *J Am Vet Med Assoc*;191:1569–1575.
- Dzanic, D.A., Corbellini, C.N., Krook, L. and Kallfelz, F.A. (1991). Effects of 1,25- dihydroxycholecalciferol and 24,25- dihydroxycholecalciferol in dogs with impaired renal function. *J Nutr.* 121(11 Suppl) : S70– S72.
- Elliott, J. (2008). *Hyperphosphataemia And CKD*. <http://www.vettimes.co.uk>. : 1 – 19.
- Elliott, J. and Barber, P.J. (1998). Feline chronic renal failure: clinical findings in 80 cases diagnosed between 1992 and 1995. *J Small Anim Pract.* 39 : 78–85.
- Elliott, J., Rawlings, J.M., Markwell, P.J. and Barber, P.J. (2000). Survival of cats with naturally occurring chronic renal failure: effect of dietary management. *J Small Anim Pract* 41(6): 235-242.
- Elliott, J., Syme, H.M., Reubens, E. and Markwell, P.J. (2003). Assessment of acid-base status of cats with naturally occurring chronic renal failure. *J Small Anim Pract.* 44: 65–70.
- Erslev, A.J. and Besarab, A. (1997). Eritropoetin in the pathogenesis and treatment of the anemia of chronic renal failure. *Kidney Int* 51 : 622-630.
- Ettinger, S.J. and Feldman, E.C. (2005). *Textbook of Veterinary Internal Medicine* Volume II, VI ed. St.Louis: Elsevier Saunders. 622-630.
- Ettinger, S.J., Benitz, A.M., Ericsson, G.F., Cifelli, S., Jernigan, A.D., Longhofer, S.L., Trimboli, W. and Hanson, P.D. (1998). Effects of enalapril maleate on survival of dogs with naturally acquired heart failure. The Long-Term Investigation of Veterinary Enalapril (LIVE) Study Group. *J Am Vet Med Assoc.* 213 : 1573–1577.

- Finch, N.C., Syme, H.M. and Elliott J. (2016). Risk Factors for Development of Chronic Kidney Disease in Cats. *J Vet Intern Med* ;30:602–610.
- Forrester, D.S., Adams, L.G. and Allen, T.A. (2010). *Chronic kidney disease*. In: Hand MS, Thatcher CD, Remillard RL, et al, eds. Small animal clinical nutrition, 5th ed. Topeka, Kan: Mark Morris Institute. : 765–800.
- Geddes, R.F., Elliott, J. and Syme, H.M. (2015). Relationship between plasma fibroblast growth factor-23 concentration and survival time in cats with chronic kidney disease. *J Vet Intern Med*. 29: 1494–1501.
- Grauer, G.F. (2005). Early detection of renal damage and disease in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 35 :581–596.
- Grodecki, K.M., Gains, M.J., Baumal, R., Osmond, D.H., Cotter, B., Valli, V.E. and Jacobs, R.M. (1997). Treatment of X-linked hereditary nephritis in Samoyed dogs with angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor. *J Comp Pathol*. 117 :209–225.
- Hall, J.A., Yerramilli, M., Obare, E., Yu, S. and Jewell, D.E. (2014). Comparison of serum concentrations of symmetric dimethylarginine and creatinine as kidney function biomarkers in healthy geriatric cats fed reduced protein foods enriched with fish oil, L-carnitine, and medium-chain triglycerides. *Vet J*. 202(3):588–596.
- Hostutler, R.A., DiBartola, S.P., Chew, D.J., Nagode, L.A., Schenck, P.A., Rajala-Schultz, P.J. and Drost, W.T. (2006). Comparison of the effects of daily and intermittent-dose kalsitriol on serum parathyroid hormone and ionized calcium concentrations in normal cats and cats with chronic renal failure. *J Vet Intern Med*. 20(6) :1307-1313.
- Houston, D. M. (2016). *Chronic Kidney Disease (CKD) in Dogs & Cats: An update 2016*. centredmv.com/wp.../2016/.../Notes-conférences-Dre-Houston. : 10
- Jacob, F., Polzin, D.J., Osborne, C.A., Neaton, J.D., Kirk, C.A. and Allen, T.A., (2005). Evaluation of the association between initial proteinuria and morbidity rate or death in dogs with naturally occurring chronic renal failure. *J Am Vet Med Assoc*. 226 : 393–400.
- Jepson, R. E., Elliott, J. Brodbelt, D. and Syme, H. M. (2007). “Effect of control of systolic blood pressure on survival in cats with systemic hypertension,” *Journal of Veterinary Internal Medicine*, vol. 21, no. 3 : 402–409.
- Jepson, R.E., Vallance, C., Syme, H.M. and Elliott, J. (2010). Assessment of urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase activity in geriatric cats with variable plasma creatinine concentrations with and without azotemia. *American Journal of Veterinary Research* 71 : 241–247.
- Jones, B.R., Gething, M.A., Badcoe, L.M., Pauli, J.V. and Davies, E. (1989). Familial progressive nephropathy in young Bull Terriers. *N Z Vet J*. 37(2):79-82.
- Kaplan, M.A., Canterbury, J.W., Gavellas, G., Jaffe, D., Bourgoinnie, J.J., Reiss, E. and Bricker N.S. (1978). The calcemic and phosphaturic effects of parathyroid hormone in normal and uremic dog. *Metabolism*, 27 : 1785–1792.
- Keane, W.F. (2000). Proteinuria: Its clinical importance and role in progressive renal disease. *Am J Kidney Dis*. 35(Suppl 1) :S97–S105.
- Kidder, A. and Chew, D. (2009). “Treatment options for hyperphosphatemia in feline CKD: what’s out there?” *J Feline Med Surg.*, vol. 11, no. 11: 913-924.
- Kimmel, P.L. and Rosenberg, M.E. (2014). *Chronic Renal Disease*, Academic Press, San Diego CA: 310–319.
- King, J. N., Gunn-Moore, D. A., Tasker, S., Gleadhill, A. and Strehlau. G. (2006). Tolerability and efficacy of benazepril in cats with chronic kidney disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 20(5) : 1054–1064.
- Kralova, S., Leva, L. and Toman, M. (2009). Polymorphonuclear function in naturally occurring renal failure in dogs. *Veterinarni Medicina* 54 (5) : 236–243.
- Laflamme, D.P. and Hannah, S.S. (2013). Discrepancy between use of lean body mass or nitrogen balance to determine protein requirements for adult cats. *J Feline Med Surg*. 15: 691–697.

- Langston, C.E. (2009) *Fluid treatment for renal failure* (Proceedings) www.veterinarycalendar.dvm360.com/fluid-treatment-renal-failure- : 1 – 4. Diakses tanggal 9 Juni 2016.
- Lawson, J., Elliott, J., Wheeler-Jones, C., Syme, H, and Jepson, R. (2015). Review Renal fibrosis in feline chronic kidney disease: Known mediators and mechanisms of injury. *The Veterinary Journal* 203 :18–26.
- Lees, G.E., Helman, R.G., Homco, L.D., Millichamp, N.J., Hunter, J.F. and Frey M.S. (1998). Early diagnosis of familial nephropathy in English cocker spaniels. *Journal of the American Animal Hospital Association*: Vol. 34, No. 3, pp. 189-195.
- Lees, G.E., Brown, S.A., Elliott, J., Grauer, G.E. and Vaden, S.L. (2005). Assessment and management of proteinuria in dogs and cats: 2004 ACVIM Forum Consensus Statement (small animal). *J Vet Intern Med.* 19 (3) :377-385.
- Lenox, C. E. and Bauer, J.E. (2013). Potential Adverse Effects of Omega-3 Fatty Acids in Dogs and Cats. Review. *J Vet Intern Med* 27 :217–226.
- Littman, M.P. (1994). Spontaneous Systemic Hypertension in 24 Cats. *J Vet Intern Med.* 8:79-86.
- López-Sendón, J., Swedberg, K., McMurray, J., Tamargo, J., Maggioni, A.P., Dargie, H., Tendera, M., Waagstein, F., Kjeldshus, J., Lechat, P. and Torp-Pedersen, C. (2004). Expert consensus document on angiotensin converting enzyme inhibitors in cardiovascular disease. The Task Force on ACE-inhibitors of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J.* 25 :1454–1470.
- MacLeod, J.N., Tetreault, J.W., Lorschy, K.S. and Gu, D.N. (1998). Expression and bioactivity of recombinant canine eritropoetin. *Am J Vet Res* 59: 1144–1148.
- Maddison, J. and Syme, H. (2010). Chronic kidney disease in dogs and cats II: Principles of management continue education *Irish Veterinary Journal* Vol. 63 No. 2 : 106 – 109.
- Maiese, K., Chong, Z.Z. and Shang, Y.C. (2008). Raves and risks for eritropoetin. *Cytokine Growth Factor Rev.* 19 :145-155.
- Markovich, J. E., Freeman, L. M., Labato, M. A. and Cailin, R. (2015). Survey of dietary and medication practices of owners of cats with chronic kidney disease. *J Feline Med Surg*; 17: 979–983.
- Marx, S.J. (2000). Hyperparathyroid and hypoparathyroid disorders. *N Engl J Med* 343(25) :1863-1875.
- McLeland, S.M., Lunn, K.F., Duncan, C.G., Refsal, K.R. and Quimby, J.M. (2014). Relationship among serum creatinine, serum gastrin, calcium-phosphorus product, and uremic gastropathy in cats with chronic kidney disease. *J. Vet. Intern. Med.* 28: 827-837.
- Mitani, S., Yabuki, A., Taniguchi, K. And Yamato, O. (2013). Association between the intrarenal renin-angiotensin system and renal injury in chronic kidney disease of dogs and cats. *J Vet Med Sci.* 75 :127–133.
- Mizutani, H., Koyama, H., Watanabe, T., Kitagawa, H., Nakano, M., Kajiwaru, K. and King, J. N. (2006). Evaluation of the Clinical Efficacy of Benazepril in the Treatment of Chronic Renal Insufficiency in Cats. *J Vet Intern Med* 20 :1074–1079.
- Monroe, W.E., Davenport, D.J. and Saunders G.K. (1989). Twenty-four hour urinary protein loss in healthy cats and the urinary protein-creatinine ratio as an estimate. *Am J Vet Res.* 50 :1906–1909.
- Morar, D., Falcă, C., Moł, T., Cristina, P., Ciulan, V. and Simiz, F. (2010). Blood Pressure In Cats With Chronic Renal Failure. *Lucrări Stiinlifice Medicină Veterinară* Vol. Xliii (1) Timisoara. : 319 – 324.
- Morar, D., Falcă, C., Moł, T., Cristina, P., Galbenu, P L. and Ciulan, V. (2009). Effect Of Amlodipine On Blood Pressure In Cats With Chronic Renal Failure. *Lucrări Stiinlifice Medicină Veterinară* Vol. XLII (2), Timisoara. : 231 – 235
- Morgan, R.V. (1986) Systemic hypertension in four cats: ocular and medical findings. *J Am Anim Hosp Assoc.* 22 :615-621.
- Nabity, M. B. Boggess, M. M., Kashtan, C. E. and Lees, G. E. (2007). Day-to-Day Variation of

- the Urine Protein : Creatinine Ratio in Female Dogs with Stable Glomerular Proteinuria Caused by X-Linked Hereditary Nephropathy. *J Vet Intern Med.* 21 :425–430.
- National Research Council. *Nutrient requirements of dogs and cats.* Washington, DC: National Academies Press, 2006. DOI: 10.17226/10668.
- Neel, J.A. and Grindem, C.B. (2000). Understanding and evaluating renal function. *Vet Med.* :555-566.
- Nelson, R.W. and Couto, C.G. (2009). *Small animal internal medicine*, 4th ed. ed. Edinburgh: Mosby. : 653 – 660.
- Nelson, R.W. and Feldman, E.C. (2004). *Hypercalcemia and primary hyperparathyroidism.* In: Feldman EC, Nelson RW, eds. *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction.* 3rd ed. St. Louis: WB Saunders; :659-715.
- O'Neill, D. G., Elliott, J., Church, D.B., McGreevy, P.D., Thomson, P.C. and Brodbelt, D.C. (2013). Chronic kidney disease in dogs in UK veterinary practices: prevalence, risk factors, and survival. *J Vet Intern Med.*;27(4):814–821.
- Plumb, D.C. (2011). *Veterinary Drug Handbook.* 7th ed. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, USA. 1567.
- Polzin, D. J. and Osborne, C. A. (1995). *Pathophysiology of renal failure and uremia.* In *Canine and Feline Nephrology and Urology.* Eds C. A. Osborne, D. R. Finco. Philadelphia, Williams & Wilkins. : 335-367.
- Polzin, D., Ross, S. and Osborne, C. (2005). Clinical benefit of kalsitriol in canine chronic kidney disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 19: 433 – 437.
- Polzin, D.J. (2011) Chronic Kidney Disease in Small Animals. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 41:15-30.
- Polzin, D.J., Osborne, C.A. and Ross S. (2010). *Chronic Kidney Disease.* In: Ettinger SJ, Feldman EC, eds. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, 7th ed. St. Louis: Elsevier Saunders. : 1900-2021.
- Polzin, D.J., Osborne, C.A. and Ross, S. (2005). Chronic kidney disease, in SJ Ettinger, Feldman EC (eds): *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, ed 6. Philadelphia, WB Saunders. : 1756–1785.
- Polzin, D.J., Osborne, C.A. and Ross, S. (2005). *Chronic Kidney Disease.* In: Ettinger SJ, Feldman EC, eds. *Textbook of veterinary internal medicine : diseases of the dog and cat*, 6th ed. / Stephen J. Ettinger, Edward C. Feldman. ed. St. Louis, Miss. ; Oxford: Elsevier Saunder :1756-1785.
- Polzin, D.J., Osborne, C.A., Hayden, D.W. and Stevens, J.B. (1984). Influence of modified protein diets on morbidity, mortality, and renal function in dogs with induced chronic renal failure. *Am J Vet Res.* 45 :506- 517.
- Polzin, D.J., Ross, S. and Osborne, C.A. (2009). *Kalsitriol.* In: Bonagura J.D. & Twedt D.C. (Eds), *Kirk's Current Veterinary Therapy.* XIV. Saunders Elsevier, St Louis, Missouri. : 892-895.
- Powell, L.L. (2014). *Top 5 Indications For Fluid Therapy.* www.veterinaryteambrief.com. : 10 – 12. Diakses tanggal 9 Juni 2016
- Price, S. A. and Wilson, L. M. (2005). *Patofisiologi: konsep klinis proses-proses penyakit* (6 ed.). Jakarta: EGC.
- Quimby, J. and Lappin, M. (2016). Evaluating Sucralfate as a Phosphate Binder in Normal Cats and Cats with Chronic Kidney Disease. *J Am Anim Hosp Assoc.* 52(1) :8-12.
- Randolph, J. E., Scarlett, J., Stokol, T. and Macleod, J. N. (2004). Clinical efficacy and safety of recombinant canine eritropoetin in dogs with anemia of chronic renal failure and dogs with recombinant human eritropoetin-induced red cell aplasia. *J Vet Intern Med* 18 : 81-91.
- Randolph, J.E., Scarlett, J.M., Stokol, T., Saunders, K.M. MacLeod, J.N. (2004). Expression, bioactivity, and clinical assessment of recombinant feline eritropoetin. *Am J Vet Res* 65: 1355–1366.
- Reynolds, B.S. and Lefebvre, H.P. (2013). Feline CKD: Pathophysiology and risk factors – What

do we know? *Journal of Feline Medicine and Surgery* 15 (Suppl. 1), 3–14.

- Ross, S. (2008). *Diagnosis and Management of Chronic Kidney Disease in Dogs and Cats* Proceedings, The 15th Congress of FAVA FAVA -OIE Joint Symposium on Emerging Diseases Bangkok, Thailand : S89 – S93.
- Roudebush, P., Polzin, D. J., Adams, L. G., Towell, T. L. and Forrester, S. D. (2010). REVIEW. An evidence based review of therapies for canine chronic kidney disease. *Journal of Small Animal Practice* 51 : 244–252.
- Roudebush, P., Polzin, D. J., Ross, S. J., Towell, T. L., Adams, L. G. and Forrester, S. D. (2009). Therapies for feline chronic kidney disease. What is the evidence? *Journal of Feline Medicine & Surgery* 11 : 195-210.
- Ruggenti, P., Cravedi, P. and Remuzzi, G. (2012). Mechanisms and treatment of CKD. *J Am Soc Nephrol.* 23: 1917–1928.
- Savica, V., Calò, L. A., Monardo, P., Davis, P. A., Granata, A., Santoro, D., Savica, R., Musolino, R., Comelli, M. C. and Bellinghieri, G. (2009). “Salivary phosphate- binding chewing gum reduces hyperphosphatemia in dialysis patients,” *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 20, no. 3: 639–644.
- Schlondorff, D.O. (2008). Overview of factors contributing to the pathophysiology of progressive renal disease. *Kidney Int.* 74: 860-866.
- Schoolwerth, A.C., Kaneko, T.M., Sedlacek, M., Block, C.A. and Remillard, B.D. (2006). Acid-base disturbances in the intensive care unit: metabolic acidosis. *Semin Dial.* 19 :492-495.
- Sharon, K., Theisen, S.K., DiBartola, S.P., Radin, J.M., Chew, D.J., Tony Buffington, C.A. and Dow, S.W. (1997). Muscle Potassium Content and Potassium Gluconate Supplementation in Normokalemic Cats With Naturally Occurring Chronic Renal Failure. *J Vet Intern Med* 11 : 212-217.
- Silver, J., Russell, J. and Sherwood, L.M. (1985). Regulation by vitamin D metabolites of messenger ribonucleic acid for preproparathyroid hormone in isolated bovine parathyroid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 82 : 4270–4273.
- Smets, P.M., Meyer, E., Maddens, B.E., Duchateau, L. and Daminet, S. (2010). Urinary markers in healthy young and aged dogs and dogs with chronic kidney disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 24 : 65–72.
- Sparkes, A. H., Caney, S., Chalhoub, S., Elliott, J., Finch, N., Gajanayake, I., Langston, C., Lefebvre, H.P., White, J. and Quimby, J. (2016). ISFM Consensus Guidelines on the Diagnosis and Management of Feline Chronic Kidney Disease. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 18 : 219–239.
- Surrena, H. (ed). 2010. *Handbook for Brunner & Suddarth's Textbook of Medical- Surgical* 12th edition. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 530 Walnut Street, Philadelphia, PA 19106. 590.
- Sweitzer, N.K. (2003). What Is an Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor? *Circulation.* 108 :e16-e18.
- Syme, H.M., Markwell, P.J., Pfeiffer, D. and Elliott, J. (2006). Survival of cats with naturally occurring chronic renal failure is related to severity of proteinuria. *J Vet Intern Med.* 20 :528–535.
- Takahashi, F., Furuichi, T., Yorozu, K., Kawata, S., Kitamura, H., Kubodera, N. and Slatopolsky, E. (2002). Effects of i.v. and oral 1,25-dihydroxy-22-oxavitamin D3 on secondary hyperparathyroidism in dogs with chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 17 [Suppl 10] : 46–52.
- Thibodeau, GA. (1999). *Anatomy and Physiology.* St. Louis, MO. Mosby. : 822-846.
- Tomasello, S. (2008). Secondary Hyperparathyroidism and Chronic Kidney Disease. *Diabetes Spectrum* 21(1): 19-25.
- Vaden, S.L. (2005). *Glomerular disease.* In: Ettinger SJ, Feldman EC, editors. *Textbook of Veterinary Internal Medicine.* 6th ed. St Louis, Missouri: Saunders (Elsevier) : 1786 -1800.

- Walker, D., Syme, H.M., Markwell, P. and Elliott, J. (2004). Predictors of survival in healthy, non-azotaemic cats. *J Vet Intern Med.* 18 : 417.
- Watanabe, T. And Mishina, M. (2007). Effects of Benazepril Hydrochloride in Cats with Experimentally Induced or Spontaneously Occurring Chronic Renal Failure *J. Vet. Med. Sci.* 69 (10) : 1015–1023.
- Wellman, M.L., DiBartola, S.P. and Kohn, C.W. (2012). *Applied physiology of body fluids in dogs and cats*. In: DiBartola SP, ed. Fluid, electrolyte, and acid-base disorders in small animal practice. 4th ed. St. Louis (MO): Elsevier Saunders :15.
- Wolf, A.M. (2015). *Chronic Progressive Renal Disease in the Cat: Recognition and Management* www.colovma.org/resource.
- Yabuki, A., Mizukami, K., Sawa, M., Mitani, S. and Yamato, O. (2011). Early Stage of Chronic Kidney Disease with Renal Injury Caused by Hypertension in a Dog. Case Reports in *Veterinary Medicine* Vol. 1, Article ID 149648, : 1 – 4.
- Yu, S. and Robinson, P.I. (2006). Dietary supplements of vitamins E and C and beta-carotene reduce oxidative stress in cats with renal insufficiency. *Vet Res Commun.* 30 : 403–413.
- Yu, S., Gross, K. L. and Allen, T. A. (2006). A renal food supplemented with vitamins E, C and beta-carotene reduces oxidative stress and improves kidney function in client-owned dogs with stages 2 or 3 kidney disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 20 : 1537.

Gambaran Histopatologi Rumen dan Retikulum Sapi Bali Akibat Adanya Benda Asing

Histology Examination on Rumen and reticulum of Bali Cattle's Various contained in Foreign Bodies

**Eldarya Envisari Depari¹, Annas Farhani¹,
I Wayan Batan², I Made Kardena³**

¹Pendidikan Profesi Dokter Hewan,

²Laboratorium Diagnosis Klinik Hewan, ²Laboratorium Manajemen dan Penyakit Sapi Bali,

³Laboratorium Patologi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana

Jln. Sudirman, Denpasar, Bali, Indonesia

Telp. : 0361-223791; Email : bobbatan@yahoo.com

Abstract

Rumen and reticulum hold an important role in the ruminant's digestive tract. During the meal, Bali cattle accidentally ingest foreign objects because they can't distinguish between foreign body object and feed. Cattles do not really chew food before swallowing. This study aims to determine the existence of a foreign body in the stomach and histopathological overview of Bali cattle rumen and reticulum due to a variety of foreign objects. This study used 10 samples of cattle Bali consisting of nine samples of rumen and reticulum contained foreign objects (plastic, metal, wood and stone) and one normal sample of the rumen and reticulum Bali cattle. Samples were obtained from Slaughter House at Mambal, Abian Semal District, Badung regency, Bali. Based on the results of research conducted on the rumen and reticulum Bali cattle, there are a variety of foreign objects such as plastic, metal, wood and stone. Histopathological changes in the mucosa of the rumen and reticulum form of inflammatory cell infiltration from mild to severe. Conclusions from this research that found a foreign body object in the rumen and reticulum Bali cattle, and foreign body objects cause tissue destruction.

Keywords : Bali cattle, rumen, reticulum, foreign bodies.

Abstrak

Rumen dan retikulum memegang peranan penting dalam saluran pencernaan ruminansia., Sapi bali secara tidak sengaja menelan benda asing pada saat makan, karena mereka tidak dapat membedakan antara benda asing dan pakan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya benda asing dalam lambung dan gambaran histopatologi rumen dan retikulum sapi bali akibat berbagai benda asing. Penelitian ini menggunakan 10 sampel dari sapi bali yang terdiri dari sembilan sampel rumen dan retikulum yang terdapat benda asing (plastik, logam, kayu dan batu) dan satu sampel rumen dan retikulum sapi bali yang normal. Sampel diperoleh dari Rumah Potong Hewan (RPH) Desa Mambal, Kecamatan Abian Semal, Kabupaten Badung, Bali. Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan terhadap rumen dan retikulum sapi bali, terdapat berbagai benda asing berupa plastik, logam, kayu dan batu. Perubahan histopatologi pada mukosa rumen dan retikulum berupa infiltrasi sel radang dari ringan sampai berat. Kesimpulan dari penelitian ini bahwa ditemukan adanya benda asing dalam rumen dan retikulum sapi bali, dan benda asing tersebut mengakibatkan kerusakan jaringan.

Kata kunci : Sapi, Bali, rumen, retikulum, benda asing.

Pendahuluan

Sapi bali merupakan sapi asli Indonesia yang merupakan hasil domestikasi dari banteng (*Bibos banteng*), hingga saat ini masih hidup liar di Taman Nasional Bali Barat, Taman Nasional Baluran, dan Taman Nasional Ujung Kulon. Sapi bali memiliki keunggulan dan sifat karakteristik yang berbeda dengan sapi lainnya dan menyebar hampir diseluruh wilayah Indonesia dan juga banyak dipelihara di Malaysia, Filipina dan Australia bagian utara (Batan, 2006; Oka *et al.*, 2012).

Lingkungan sekitar pemeliharaan sapi sangat berpengaruh dalam penyediaan pakan bagi sapi bali. Sapi bali biasanya dipelihara dengan cara dilepaskan di lahan pertanian dan dibiarkan mencari makan sendiri, diikat di bawah pohon atau dikandangkan dengan memberikan pakan berupa hijauan atau rumput (Suwandi, 1997). Namun, seiring dengan berkembangnya pembangunan di Bali menyebabkan semakin berkurangnya lahan hijau yang dapat digunakan untuk penggembalaan sapi, sehingga sapi sering dilepaskan untuk mencari makan sendiri dan berkeliaran di lingkungan yang terdapat banyak sampah.

Sapi yang dilepaskan kemungkinan menelan benda asing karena mereka tidak dapat membedakan bahan plastik, logam, kayu, karet dan batu dalam pakan dan tidak benar-benar mengunyah pakan sebelum menelan (Constable, 2012). Hal ini bisa terjadi pada saat sapi digembalakan di padang rumput yang terdapat sampah. Benda asing akan menyebabkan komplikasi yang berbeda sesuai dengan sifat benda asing dan cara masuk ke dalam organ pencernaan (Sumieka, 2010).

Ruminansia mempunyai lambung ganda, ada sebanyak empat bagian, yaitu rumen, retikulum,

omasum, dan abomasum. Rumen dan retikulum memegang peranan penting dalam saluran pencernaan ruminansia. Proses fermentasi pakan terjadi di dalam rumen dan siklus utama motilitas rumen selalu dimulai dengan kontraksi retikulum (Braun dan Jacquat, 2011).

Hewan ruminansia yang secara tidak sengaja menelan benda asing adalah hewan yang kekurangan nutrisi dan manajemen pakannya kurang baik, terutama di negara-negara berkembang yang standar manajemen hewannya tidak baik (Nugusu *et al.*, 2013; Abdelaal dan EL-Maghawry, 2014). Adanya benda asing dalam lambung-lambung ternak sapi telah dilaporkan terjadi di Nigeria, Jordania, dan Sudan (Anwar *et al.*, 2013). Hal ini berdampak secara ekonomi dan dapat menyebabkan penurunan produksi sapi dan juga menyebabkan kematian pada sapi. Di Indonesia belum ada laporan adanya berbagai benda asing dalam rumen dan retikulum sapi bali, begitu pula gambaran histopatologinya. Tujuan penelitian ini adalah mengamati gambaran histopatologi rumen dan retikulum Sapi Bali akibat adanya benda asing.

Materi dan Metode

Penelitian ini menggunakan 10 sampel rumen dan retikulum sapi bali, terdiri dari atas sembilan sampel yang terdapat berbagai benda asing dan satu sampel yang tidak terdapat benda asing. Sampel diperoleh dari Rumah Potong Hewan Desa Mambal, Kecamatan Abiansemal, Kabupaten Badung, Bali.

Sampel jaringan berupa rumen dan retikulum sapi bali diambil setelah dilakukan pengamatan dan pemeriksaan secara patologi anatomi, setelah sapi di sembelih dan organ pencernaannya dikeluarkan

dari rongga abdomen. Rumen dan retikulum di buka untuk mengetahui ada tidaknya benda asing di dalam organ tersebut dan dilakukan pengamatan terhadap perubahan yang ditimbulkan akibat benda asing secara patologi anatomi, selanjutnya jaringan yang mengalami perubahan dipotong dengan ukuran 1x1 cm dan disimpan dalam larutan *Neutral Buffer Formalin 10%* (NBF) kemudian dilanjutkan dengan pembuatan preparat histopatologi sesuai dengan metode yang dilakukan oleh Muntiha (2001) di Laboratorium Patologi Veteriner, Balai Besar Veteriner Denpasar, Bali. Variabel penelitian ini adalah gambaran histopatologis rumen dan retikulum sapi bali yang terdapat berbagai benda asing. Gambaran histopatologis rumen sapi bali yang terdapat berbagai benda asing diamati dengan mikroskop cahaya. Hasil pengamatan dianalisis secara deskriptif.

Hasil dan Pembahasan

Hasil penelitian dari sampel rumen dan retikulum yang terdapat berbagai benda asing dikategorikan menurut jenis dari benda asing yang diperoleh. Benda asing ditemukan di dalam rumen dan retikulum sapi bali dan berada di antara makanan. Benda asing yang ditemukan pada setiap sapi berbeda bentuk, ukuran, dan jenisnya, seperti: plastik (tali tambang berukuran sedang, tali tambang berukuran besar, kantong plastik, tutup sikat gigi, dan bungkus makanan berupa aluminium foil), logam (kawat dan baterai), kayu (biji mangga) dan batu (keramik). Dalam penelitian ini benda asing jenis plastik paling banyak ditemukan (Gambar 1). Hal ini senada dengan laporan Tesyafe dan Chanie (2012) mengenai benda asing pada ternak yang dipotong di Jimma Municipal Abattoir, Ethiopia Barat Daya,

bahwasanya di dalam rumen paling sering ditemukan benda asing bukan logam seperti kantong plastik, tali, rambut, dan kulit. Plastik adalah benda asing yang paling sering diamati dalam rumen (Igbokwe *et al.*, 2003; Roman dan Hiwot, 2010).

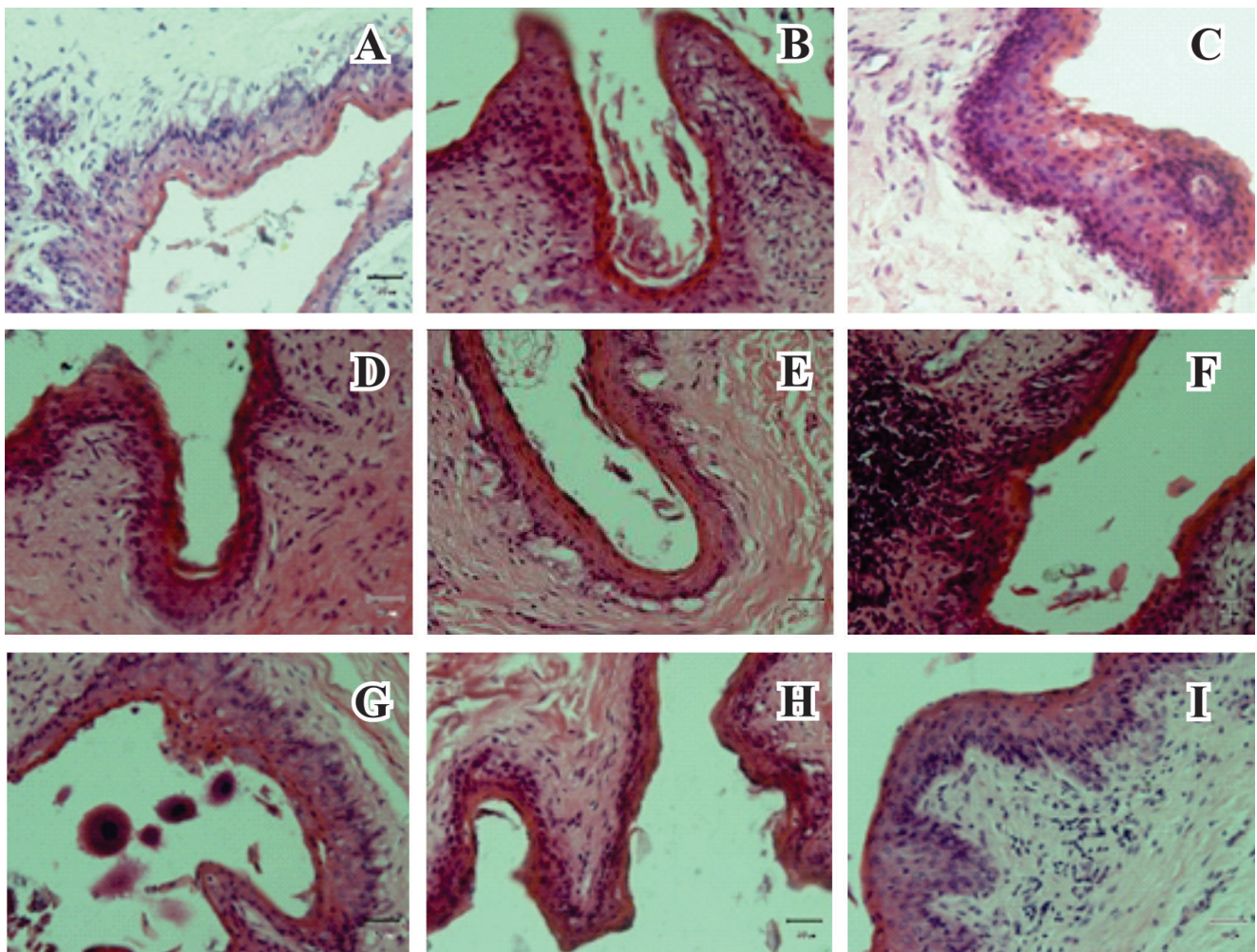


Gambar 1. Benda asing yang ditemukan pada rumen (1A) sapi bali berupa bungkus makanan, kantong plastik, tali tambang plastik, tutup sikat gigi, keramik, biji mangga kering, kawat, dan batu baterai, sedangkan pada retikulum (1B) ditemukan tutup botol air mineral, tali tambang plastic, kabel, kemasan permen, kayu, batu, uang logam dan pembuka minuman kaleng.

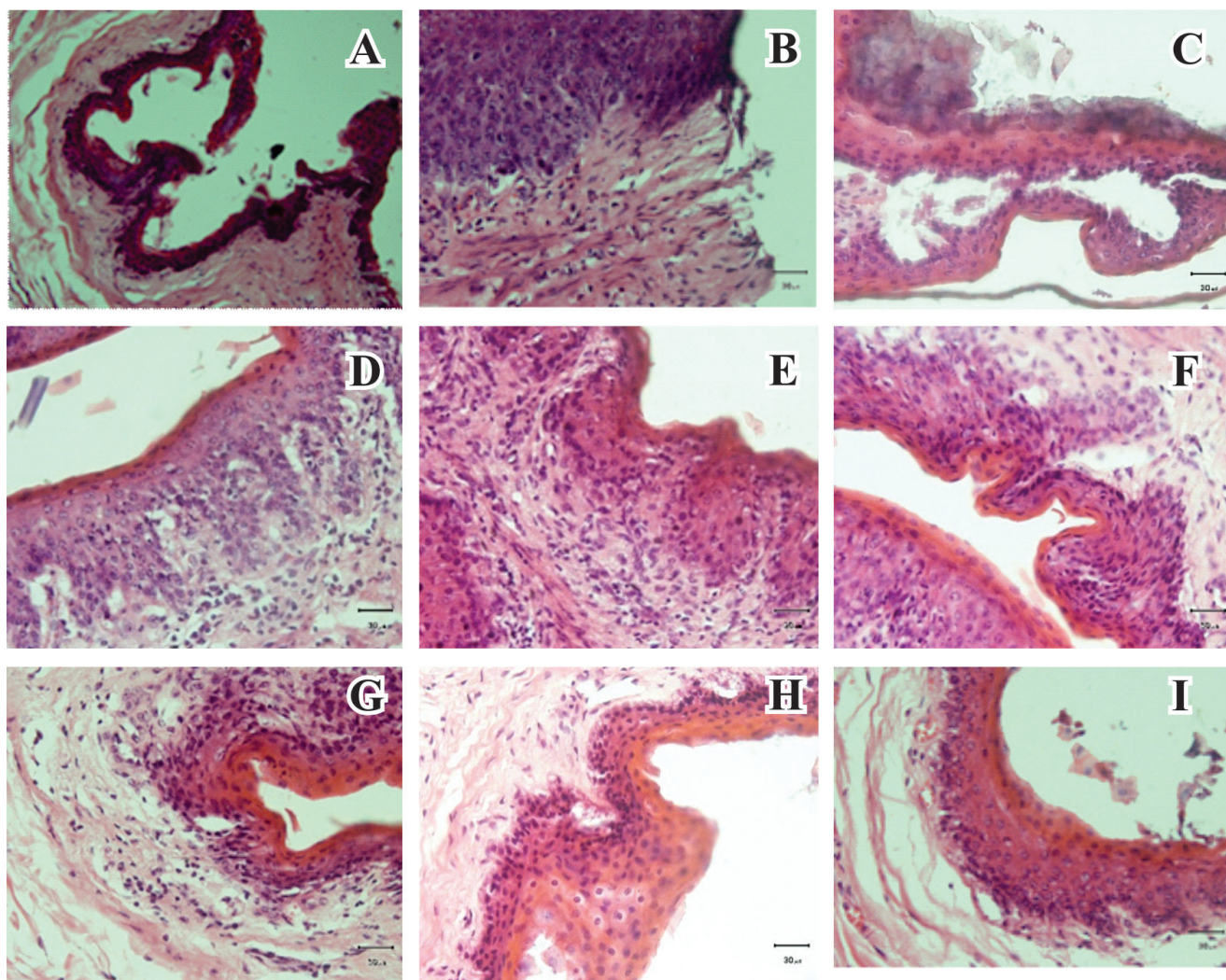
Dalam penelitian ini perubahan histopatologi pada retikulum (Gambar 1) ditemukan berupa

infiltrasi sel-sel radang dan tidak adanya kerusakan yang berarti pada retikulum sapi bali. Benda asing berupa plastik dapat menimbulkan kerusakan berupa hiperplasia hingga ke bawah submukosa dan menunjukkan kerusakan pada jaringan (Bakhiet, 2011). Namun, pada penelitian ini benda asing yang ditemukan hanya menimbulkan infiltrasi sel radang. Gambaran histopatologi retikulum sapi bali yang terdapat berbagai benda asing jenis logam disajikan pada Gambar 2.

Gambaran histopatologi rumen sapi bali (Gambar 3) yang terdapat berbagai benda asing jenis logam seperti kawat teramati terjadi infiltrasi sel radang. Pada rumen yang ditemukan adanya baterai teramati infiltrasi sel radang berat. Benda asing yang tajam pada rumen dapat menyebabkan *traumatic pericarditis*, *traumatic reticuloperitonitis* (TRP), *abscess reticular*, hernia diafragma, gangguan pencernaan, abses hati, abses limpa, pecahnya arteri gastro-epiploika kiri, radang selaput dada, dan abses mediastinum.



Gambar 2. Gambaran histopatologi retikulum sapi bali yang ditemukan benda asing berupa (A) kabel, adanya infiltrasi sel radang ringan; (B) tutup botol plastic, adanya infiltrasi sel radang ringan; (C) Tali tambang, diamati infiltrasi sel radang sedang; (D) bungkus permen berupa aluminium foil, teramati adanya infiltrasi sel radang yang bersifat ringan; (E) tutup kaleng, diamati adanya infiltrasi sel radang yang bersifat ringan; (F) uang logam, teramati adanya infiltrasi sel radang yang bersifat sedang; (G) batu kecil dan (H) potongan kayu diamati tidak ada perubahan yang disebabkan benda asing; (I) Biji mangga, teramati adanya infiltrasi sel radang yang bersifat ringan.



Gambar 3. Gambaran histopatologi rumen sapi bali yang terdapat berbagai benda asing jenis logam seperti (A) Kawat, infiltrasi sel radang sedang; (B) Baterai, infiltrasi sel radang berat; (C) bungkus makanan, infiltrasi sel radang ringan; (D) kantong plastik, infiltrasi sel radang sedang; (E) Tali tambang berukuran besar, Infiltrasi sel radang berat; (F) Tali tambang berukuran sedang, Infiltrasi sel radang berat; dan (G) Tutup sikat gigi, Infiltrasi sel radang sedang; (H) kayu, infiltrasi sel radang ringan. dan (I) Keramik, infiltrasi sel radang ringan.

Pada penelitian ini benda asing yang ditemukan berupa baterai dan kawat kecil yang berlekuk dan tidak tajam, sehingga hal tersebut tidak menimbulkan gangguan seperti pernyataan sebelumnya (Al-abbadi *et al.*, 2014).

Menurut Omid dan Mozaffari (2014), struktur mukosa retikulum yang mirip sarang lebah membuat benda asing dapat berdiam di dalam retikulum, dan kontraksi retikulum yang kuat akan mendorong benda asing tajam menembus dinding retikulum dan

menyebabkan *traumatic reticuloperitonitis*. Benda asing di dalam rumen dapat menyebabkan peluruhan dan pengerdilan papilla rumen, respons inflamasi dan hiperplasia muncul karena adanya tekanan pada dinding rumen yang diakibatkan oleh benda asing (Vanita *et al.*, 2010).

Infiltrasi sel radang yang ditemukan pada retikulum diduga karena respons jaringan pada retikulum terhadap benda asing yang berada di dalam retikulum tersebut, ukuran benda asing juga

berpengaruh terhadap tingkat kerusakan yang ditimbulkan. Kemungkinan pula benda asing yang ditemukan saat penelitian ini belum terlalu lama berada di dalam retikulum sehingga belum cukup waktu untuk benda asing tersebut menimbulkan kerusakan pada retikulum. Saat dilakukan pembedahan, posisi benda asing tersebut berada ditengah-tengah ingesta rumen atau retikulum, hal tersebut juga dapat memengaruhi tingkat kerusakan pada rumen dan retikulum, karena benda asing tidak selalu bersentuhan langsung dengan permukaan mukosa. Jumlah dan lamanya benda asing berada dalam rumen dan retikulum juga dapat memengaruhi tingkat kerusakan (Nugusu *et al.*, 2013). Benda asing yang mempunyai ukuran relatif besar, seperti plastik dan benda asing lain yang tersangkut di retikulum dan rumen dalam waktu tertentu dapat menyebabkan impaksi dan kematian hewan (Khan *et al.*, 1999).

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan terhadap rumen dan retikulum sapi bali, ditemukan berbagai benda asing berupa plastik, logam, kayu dan batu. Perubahan histopatologi pada mukosa rumen dan retikulum berupa infiltrasi sel radang dari ringan sampai berat. ukuran benda asing juga berpengaruh terhadap tingkat kerusakan yang ditimbulkan. Kesimpulan dari penelitian ini adalah benda asing ditemukan pada rumen dan retikulum sapi bali dan benda asing tersebut menimbulkan kerusakan jaringan mukosa rumen dan retikulum.

Kesimpulan

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ditemukan adanya benda asing dalam rumen dan retikulum sapi bali, dan benda asing tersebut mengakibatkan kerusakan jaringan.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih penulis ucapkan kepada drh. I Ketut Eli Supartika, M.Sc dan staff Laboratorium Patologi, Balai Besar Veteriner Denpasar dalam pembuatan preparat histopatologi, serta seluruh pegawai Rumah Potong Hewan Mambal yang telah membantu dalam pengambilan sampel.

Daftar Pustaka

- Abdelaal, A. M., and EL-Maghawry, S (2014) Selected Studies on Foreign Body Impaction in Goats with Special Reference to Ultrasonography. *Vet World*. 7(7): 522-527.
- Abebe, F., and Nuru, M (2011) Prevalence of Indigestible Foreign Body Ingestion in Small Ruminants Slaughtered at Luna Export Abattoir, East Shoa, Ethiopia. *J. Anim. Vet. Adv* 10(12): 1598-1602.
- Al-abbadi, os., abu-seida, am., and al-hussainy, sm (2014) Studies on Rumen Magnet Usage to Prevent Hardware Disease in Buffaloes. *Vet World*. 7 (6) : 408-411.
- Anwar, K., Khan, I., Aslam, A., Mutjaba, M., Din, A., Amin, Y., and Ali, Z (2013) Prevalence Of Indigestible Rumen And Retikulum Foreign Bodies In Achai Cattle at Different Regions Of khyber Pakhtunkhwa. *ARPN Journal of Agricultural and Biological Science*. 8(8): 580-586.
- Bakhiet, O. A (2008) Studies on The Rumen Pathology of Sudanese Desert Sheep in Slaughter House *Scientific Research and Essay* 3(7): 294-298.
- Batan, I.W (2006) Sapi bali dan penyakitnya. Denpasar; Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana.
- Braun U, Jacquat, D (2011) Ultrasonography of the retikulum in 30 healthy Saanen goats. *Acta Veterinaria Scandinavica* 53:19. doi: 10.1186/1751-0147-53-19.
- Ghanem, M. M (2010) A Comparative Study on Traumatic Reticuloperitonitis and Traumatic

- Pericarditis in Egyptian Cattle Turk. *J. Vet. Anim. Sci.* 34(2): 143-153.
- Igbokwe, I. O., M. Y. Kolo., and G. O. Egwu (2003). Rumen Impaction in Sheep with Indigestible Foreign Body in The Semi Arid Region of Nigeria. *Small Ruminant Res.* 49(3): 141-147.
- Kahn, J.M., G. Habib dan M.M Siddiqui, (1999) Prevalence of foreign indigestible materials in the reticulo-rumen of adult buffaloes. Pak. *Vet. J.* 19(4): 176-177.
- Kumar, V., and Dhar, P (2013) Foreign Body Impaction in A Captive Sambar (Rusa unicolor), *Vet world*, 6(1): 49-50.
- Nugusu, S., Velappagounder, R., Unakal, C., and Nagappan, R (2013) Studies on Foreign Body Ingestion and Their Related Complications in Ruminants Associated with Inappropriate Solid Waste Disposal in Gondar Town, North West Ethiopia. *International Journal of Animal and Veterinary Advances* 5(2): 67-74.
- Oka, I. G. L., Suyadnya, I. P., Putra, S., Suarna, I. M., Suparta, I. N., Saka, I. K., Suwiti, Ni. K., Antara, I. M., Puja, I. N., Sukanata, I. W., Oka, A. A., and Mudita, I. M (2012) Sapi Bali Sumber Daya Genetik Asli Indonesia: Denpasar. Udayana University Press. ISSN: 978-602-9042-91-7. 1-16.
- Omid, A. Mozaffari AA (2014) Reticulo-cutaneous fistula due to the ingestion of a long metallic rod in a cow. *Asian Pac J Trop Biomed.* 4 (7) : 586-588.
- Roman, T., and Hiwot, Y (2010) Occurrence of Rumen Foreign Bodies in Sheep and Goats Slaughtered at The Addis Ababa Municipality Abattoir. Ethiopian. *Vet. J.*, 14(1): 91-100.
- Saulawa, M. A., Ukashatu, S., Garba, M. G., Magaji, A. A., Bello, M. B., and Magaji, A. S (2012) Prevalence of Indigestible Substances in The Rumen and Retikulum of Small Ruminants Slaughtered at Katsina Central Abattoir, Katsina State, Northwester Nigeria. *Scientific Journal of Pure and Applied Sciences* 1(1) 17-21.
- Suwandi (1997) Peranan Mikroba Rumen Pada Ternak Ruminansia. Bogor. *Lokakarya Fungsional Non Penelitian.* 13-19.
- Tesfaye, D., and Chanie, M (2012) Study on Rumen and Retikulum Foreign Bodies in Cattle Slaughtered at Jimma Municipal Abattoir, South West Ethiopia. *Am-Euras. J. Sci. Res.*, 7 (4): 160-167.
- Vanitha, V., A. P Nambi., B. Gowri., and S, Kavitha (2010) Rumen Impaction in Cattle with Indigestible Foreign Bodies in Chennai. *Tamil Nadu J. Vet. Anim. Sci. Univ.*, 6(3): 138-140.

Kemampuan Reagen Curcumax Mendeteksi Boraks dalam Bakso yang Direbus

Capability of Curcumax reagent to detect borax in boiled meatballs

Erna Dwi Astuti¹, Widagdo Sri Nugroho²

¹Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada

²Laboratorium Kesehatan Masyarakat Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan,
Universitas Gadjah Mada, Jl Fauna no 2, Karangmalang, Yogyakarta
Telepon/Fax: 0274-560866. Email: weesnugroho@ugm.ac.id

Abstract

Borax is a harmful compound to human health but sometimes was used illegally as preservative in meatball. Curcumax reagent is a compound which developed from the previous borax detector base on tumeric extract. This reagen was developed as an easy kit to apply in the field. This study aims were to determine accuracy of sight observation and spectrophotometer to detected borax in boiled meatballs which tested by Curcumax and to determine the effect of boiling on the borax presence in the meatballs. This study was using meatballs group as a control and another meatballs group preserve with borax 0.5%. Each treatment group was boiled in 0, 5, 10, and 15 minutes and each treatment unit had three replications which consist five meatballs each of them. Borax detection was done by mixing 1ml Curcumax reagent into 1 ml meatball extract. Qualitative examination of borax presence in the meatballs was known based on the color changing of tested meatball's extract from yellow became orange (direct sight with eyes). The Quantitaive analysis was done by measured using spectrophotometer base on wave-length (λ) at 570 nm. Data was analyzed with ANOVA and continued by Least Significant Difference (LSD) analysis. Borax detection using curcumax based on sight sense against color change giving an inconsistence result. Meanwhile quantitative measurement by spectrophotometer more accurate than one. Curcumax had been detected borax in meatball which boiled for 15 minutes.

Keywords : borax, meatballs, Curcumax, spectrophotometry

Abstrak

Boraks merupakan zat kimia yang berbahaya bagi kesehatan masyarakat namun seringkali digunakan dalam bakso. Pengembangan alat deteksi boraks yang praktis sangat diperlukan di lapangan. Reagen Curcumax adalah hasil pengembangan alat deteksi boraks yang berbahan dasar ekstrak kunyit. Penelitian ini bertujuan mengetahui ketelitian pengamatan indra penglihatan dan spektrofotometer dalam mendeteksi boraks dalam bakso yang direbus yang diuji menggunakan reagen Curcumax dan mengetahui pengaruh perebusan terhadap keberadaan boraks dalam bakso. Penelitian ini menggunakan kelompok bakso kontrol dan kelompok bakso boraks 0,5% dengan perlakuan perebusan selama 0, 5, 10 dan 15 menit. Setiap unit perlakuan dilakukan ulangan sebanyak 3 kali yang masing-masing terdiri dari 5 butir bakso. Pemeriksaan kandungan boraks dilakukan dengan cara 1 ml ekstrak bakso diuji dengan 1 ml reagen Curcumax. Penilaian keberadaan boraks secara kualitatif didasarkan pada perubahan warna ekstrak bakso yang berubah dari kuning menjadi oranye. Pemeriksaan kuantitatif dilakukan dengan cara mengukur intensitas warna ekstrak bakso yang telah ditetesi Curcumax dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 570 nm. Data dianalisis dengan ANOVA dan dilanjutkan dengan analisis *Least Significant Difference*(LSD). Penilaian kualitatif boraks berdasarkan pengamatan indra penglihatan memberikan hasil yang tidak konsisten sementara penilaian berdasarkan spektrofotometer lebih akurat. Perebusan mengurangi kandungan boraks dalam bakso. Reagen Curcumax mampu mendeteksi boraks dalam bakso yang direbus hingga 15 menit.

Kata kunci : boraks, bakso, Curcumax, spektrofotometer

Pendahuluan

Boraks merupakan zat kimia yang tidak termasuk sebagai bahan tambahan pangan namun beberapa kali digunakan dalam pembuatan bakso. Penambahan boraks dalam bakso bertujuan agar bakso menjadi kenyal dan awet. Boraks adalah zat yang digunakan untuk anti jamur, bahan pengawet kayu, dan bahan antiseptik pada kosmetik. Senyawa tersebut juga digunakan sebagai insektisida untuk membunuh semut, kecoa, dan lalat (Sugiyatmi, 2006). Asam borak juga digunakan dalam pemeliharaan ayam potong terutama untuk pengendalian jamur dan kutu pada *litter*/alas kandang. Sander *et al.* (1991) menemukan bahwa dosis asam borak sebesar $2,95 \pm 0,35$ g/kg BB pada ayam umur satu hari (*day old chick/DOC*) mampu menimbulkan kematian namun hanya menimbulkan toksisitas ringan pada ayam yang lebih dewasa. Penelitian tersebut juga dibuktikan bahwa dengan pemberian asam borak dengan dosis 500 ppm atau 1250 ppm dalam pakan selama 3 minggu tidak cukup meningkatkan residu asam borak di dalam jaringan ayam.

Kontaminasi boraks dalam jumlah yang besar di dalam makanan menyebabkan keracunan pada manusia dengan gejala klinis yaitu batuk, iritasi mata, muntah, kesulitan bernafas, toksisitas pada sel, dan terkadang kematian (See *et al.*, 2010). Di Kuala Lumpur Malaysia, Yiu *et al.* (2008) mendapatkan fakta bahwa di dalam bakso ikan ditemukan kandungan asam borak dengan konsentrasi yang bervariasi dari $0,86\mu\text{g/g}$ sampai dengan $1,58\mu\text{g/g}$. Litovitz *et al.* (2008) yang disitasi oleh See *et al.* (2010) menyebutkan bahwa bayi yang baru lahir dapat meninggal apabila mengonsumsi asam borat dengan dosis 3-6 g sementara untuk orang dewasa dengan dosis 15-20 g. Fakta tersebut menarik dihubungkan

dengan bakso yang dijual di Indonesia yang juga sering diberitakan mengandung borak. Keberadaan bakso yang dimasukkan dalam panci panas (direbus) beberapa saat sebelum disajikan menarik untuk diketahui dampaknya terhadap konsentrasi boraks di dalamnya.

Curcumax adalah nama reagen yang diformulasikan Arifin *et al.* (20012) terdiri dari campuran asam klorida pekat, *polyvinyl alcohol* (PVA), kunyit, dan akuades. Reagen Curcumax mampu mendeteksi boraks dalam bakso hingga konsentrasi 0,5%. Reagen ini praktis dan mudah digunakan di lapangan (Arifin *et al.*, 2012).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan reagen Curcumax mendeteksi boraks berdasarkan pengamatan indera penglihatan dan spektrofotometer, serta mengetahui pengaruh pemanasan terhadap keberadaan boraks di dalam bakso.

Materi dan Metode

Bakso dibuat menjadi 2 kelompok, yaitu kelompok kontrol (tanpa boraks) dan kelompok yang mengandung boraks 0,5%. Masing-masing kelompok diberi perlakuan perebusan ulang dengan waktu 0, 5, 10, dan 15 menit. Setiap perlakuan waktu perebusan pada bakso boraks dibuat 3 ulangan dan setiap ulangan terdiri 5 butir bakso. Pengujian keberadaan borak dilakukan dengan dua metode. Metode pertama secara kualitatif yaitu pengamatan langsung dengan indera penglihatan dan metode kedua dengan pengukuran absorbansi berdasarkan panjang gelombang menggunakan spektrofotometer.

Metode pengujian boraks dalam bakso. Setiap bakso sampel ditimbang 5 gram diekstraksi dengan

10 ml etanol analisis, selanjutnya 1 ml ekstrak sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambah dengan 1 ml reagen Curcumax. Campuran ekstrak sampel dengan reagen Curcumax divortex hingga homogen kemudian dilakukan penilaian. Ekstrak sampel yang mengandung boraks akan berubah warna menjadi oranye. Penilaian metode pertama dilakukan dengan mengamati berdasarkan indra penglihatan terhadap perubahan warna ekstrak sampel. Data yang diperoleh berupa jumlah sampel bakso yang mengalami perubahan warna menjadi oranye (mengandung borak) dari setiap unit perlakuan dan dinyatakan dalam satuan presentase. Metode kedua dengan pengukuran absorbansi yaitu dengan memasukkan 2 ml hasil reaksi antara ekstrak bakso dengan reagen Curcumax (sebagai standar) ke dalam kuvet yang digunakan pada alat spektrofotometer. Selanjutnya penilaian perubahan warna diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 570 nm (Yiu *et al.* 2008 dengan modifikasi). Angka absorbensia yang ditunjukkan spektrofotometer dicatat untuk dianalisis. Semua data dianalisis menggunakan *Analysis of Varian* (ANOVA) dan uji dilanjutkan dengan *least significant difference* (LSD) apabila ada perbedaan antar kelompok perlakuan.

Hasil dan Pembahasan

Pengujian Bakso yang Mengandung Boraks dengan Reagen Curcumax

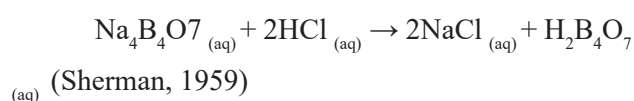
Asam borak, menurut (Murray, 2005) masih diperbolehkan dikonsumsi manusia dengan standar *Acceptable Daily Intake* (ADI) sebesar 0,88mg/kg BB per hari. Penentuan tersebut berdasarkan *no observable adverse effect level* (NAOEL) pada anjing, namun dosis tersebut tidak menimbulkan

risiko pada manusia. Kandungan borak di dalam makanan di Indonesia belum diatur meskipun demikian perlu dihindari konsumsi zat tersebut terlebih tidak diketahui kadar di dalam makanan.

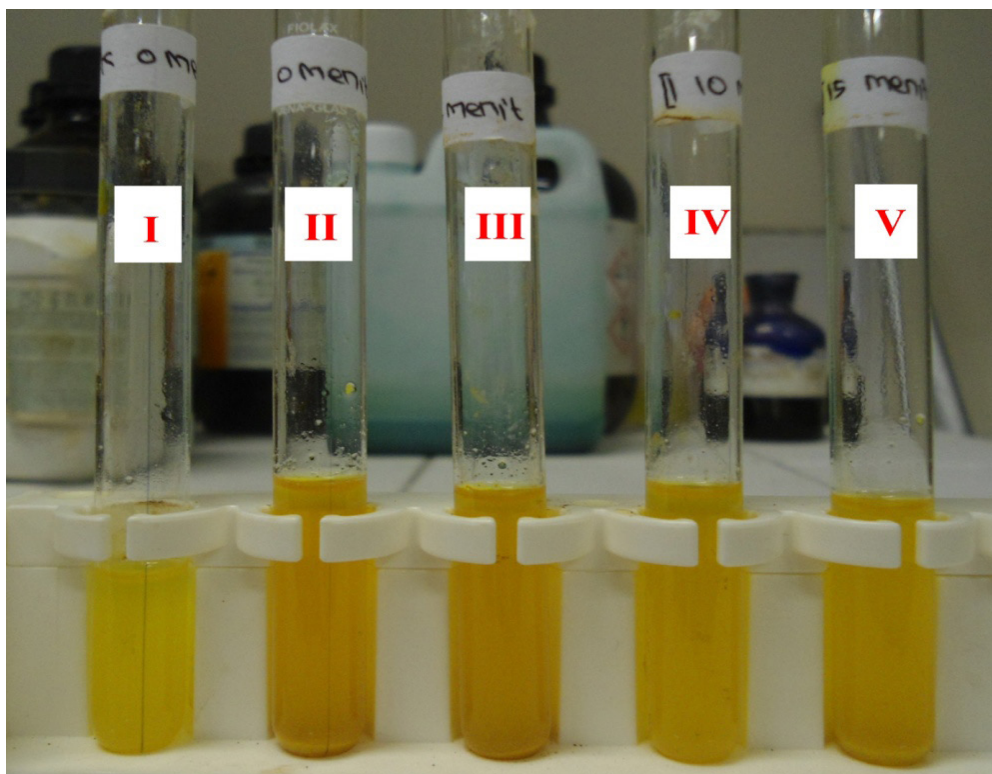
Pemeriksaan menggunakan reagen Curcumax sejalan dengan pendapat Mizura *et al.* (1991) karena senyawa kunyit (*curcumin*) merupakan senyawa yang spesifik untuk menguji asam borak di dalam bahan pangan dibandingkan dengan senyawa *carminic*. Curcumax adalah reagen yang mengandung kurkumin (kunyit). Pengamatan hasil uji dengan menggunakan indra penglihatan memperlihatkan bahwa bakso yang mengandung boraks ditandai dengan perubahan warna ekstrak bakso menjadi oranye, sedangkan ekstrak bakso yang tidak mengandung boraks berwarna kuning (Gambar 1).

Kandungan kurkumin dalam reagen Curcumax yang merupakan indikator untuk $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ atau H_3BO_3 yang memberikan warna merah oranye atau mendekati merah bata tergantung dari jumlah konsentrasi asam boraks dalam bakso. Ekstrak bakso yang tidak mengandung boraks menunjukkan hasil negatif ditandai dengan ekstrak yang tetap berwarna kuning (AOAC, 1990).

Asam klorida merupakan senyawa kimia yang digunakan untuk menguraikan senyawa organik. Asam klorida pada uji boraks dalam bakso ini berfungsi untuk memisahkan senyawa boraks dan bahan-bahan organik di dalam ekstrak daging. Saat boraks terpisah dengan ekstrak daging, boraks akan segera teridentifikasi oleh kombinasi PVA dan kurkumin. Reaksi yang terjadi antara boraks dalam bakso dengan HCl dalam reagen Curcumax adalah :



Polimer *polyvinyl alcohol* (PVA) akan bereaksi dengan boraks membentuk massa liat karena terjadi



Gambar 1. Perubahan warna ekstrak bakso, kontrol 0 menit (No I) kuning. Warna ekstrak bakso boraks yang mengalami perebusan kembali 0, 5, 10 dan 15 menit (No II, III, IV, V) berubah warna menjadi oranye.

crosslinked polimer. *Polyvinyl alcohol* juga dapat mencegah kerusakan kunyit (kurkumin) oleh HCl. Perubahan warna dijelaskan oleh Grynkievicz dan Slifiski (2012) seperti reaksi berikut:

$H_2B_4O_7 + \text{curcumin} \rightarrow \text{rosocyanine}$ (warna merah oranye).

Rosocyanine dapat terbentuk ketika terjadi reaksi antara kurkumin dengan boraks sehingga menyebabkan warna merah oranye hingga merah pada produk pangan yang mengandung boraks (Grynkievicz and Slifiski, 2012).

Hasil pengujian reagen Curcumax terhadap ekstrak bakso yang diberi boraks konsentrasi 0,5% menunjukkan hasil positif dari semua sampel (60 bakaso). Tabel 1 memperlihatkan hasil uji analisis berdasarkan pengelihan, prosentase bakso kontrol (tanpa boraks) berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan bakso yang mengandung boraks (ANOVA). Pengamatan

diantara kelompok bakso boraks yang direbus juga ditemukan adanya perbedaan yang nyata ($P < 0,05$).

Tabel 1. Presentase perubahan warna ekstrak bakso boraks dan non boraks dengan perlakuan perebusan yang diuji dengan reagen Curcumax

Kelompok perlakuan	Presentase bakso setiap perlakuan (15 sampel) yang berubah warna (%) berdasarkan waktu perebusan			
	Menit 0	Menit 5	Menit 10	Menit 15
Bakso kontrol	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Bakso boraks 0,5%	100 ^{a,1,3}	93 ^{a,2,3}	47 ^{a,1,2,3}	73 ^{a,3}

Keterangan : Penandaan huruf sama di dalam kolom atau angka yang sama di dalam baris pada Tabel 1 menunjukkan adanya perbedaan signifikan ($P < 0,05$).

Analisis lanjut dengan LSD menunjukkan bahwa efek waktu perebusan kembali bakso boraks pada menit ke 0 (sebelum direbus kembali) berbeda nyata dengan bakso boraks yang direbus lagi selama

10 menit. Perbedaan nyata ($P < 0,05$) juga terjadi antara bakso boraks yang direbus selama 5 menit dengan bakso boraks yang direbus selama 10 menit. Namun tidak ada perbedaan nyata pada bakso boraks yang direbus selama 15 menit dengan lama perebusan bakso kontrol maupun terhadap 3 perlakuan perebusan sebelumnya (0, 5, dan 10 menit).

Uji dengan spektrofotometer dalam penelitian ini menggunakan panjang gelombang 570 nm. Analisis ANOVA dari data hasil pengukuran absorbansi pada Tabel 2 menunjukkan adanya perbedaan nyata ($P < 0,05$) antara bakso kontrol dengan bakso yang mengandung boraks. Analisis berdasarkan waktu perebusan bakso yaitu 0 menit, 5 menit, 10 menit dan 15 menit memperlihatkan tidak ada perbedaan ($P > 0,05$) pada kelompok bakso kontrol maupun kelompok bakso boraks.

Tabel 2. Hasil pengukuran absorbansi terhadap panjang gelombang menggunakan spektrofotometer

Perlakuan	Rerata nilai absorbensia ekstrak setiap perlakuan berdasarkan waktu perebusan (Å)			
	Menit 0	Menit 5	Menit 10	Menit 15
Bakso kontrol	0,45 ^b	0,47 ^b	0,36 ^b	0,44 ^b
Bakso boraks	0,83 ^b	0,71 ^b	0,67 ^b	0,58 ^b

Keterangan : Penandaan huruf sama di dalam kolom menunjukkan adanya perbedaan signifikan ($P < 0,05$).

Data hasil pengujian menggunakan panjang gelombang pada waktu rebus kelompok kontrol relatif stabil dengan rerata 0,43 Å. Nilai absorbansi berdasarkan lamanya waktu perebusan pada kelompok bakso yang mengandung boraks mengalami penurunan. Bakso yang belum direbus ulang mempunyai rerata nilai absorbansi sebesar 0,83 Å, menurun menjadi 0,71 Å pada 5 menit perebusan

dan berturut-turut menjadi 0,67 Å dan 0,58 Å pada 10 dan 15 menit perebusan. Penurunan absorbansi ini terjadi karena spektrum warna yang ditangkap oleh spektrofotometer semakin kecil dan memiliki sifat meneruskan cahaya atau lebih transparan, yaitu dari warna oranye ke kuning. Warna oranye akan menghasilkan absorbansi yang lebih tinggi dari warna kuning. Ekstrak bakso yang mengandung boraks akan berwarna oranye dan warna akan menjadi lebih muda jika kandungan boraksnya berkurang. Berdasarkan hasil pengukuran absorbansi terhadap panjang gelombang tersebut dapat disimpulkan bahwa perebusan kembali pada bakso yang mengandung boraks dapat menyebabkan penurunan kadar boraks di dalam bakso yang digambarkan dengan semakin menurunnya angka absorbensia seiring lamanya perebusan.

Hasil pengukuran menggunakan spektrofotometer terlihat kemampuan deteksi yang lebih tinggi dibandingkan indra penglihatan manusia dalam menangkap spektrum warna secara akurat. Hal ini terlihat dengan perbedaan kecenderungan antara hasil indera penglihatan dengan spektrometer terutama pada menit 10 ke 15. Pada penglihatan terlihat naik sementara pada hasil spektrofotometer konsisten turun. Pengujian dengan spektrofotometer memberikan parameter yang menunjukkan kemampuan reagen Curcmax bereaksi dengan boraks dalam masing-masing bakso. Hal ini sejalan dengan penelitian Yiu *et al.* (2008) yang memperlihatkan bahwa efek pemanasan akan menurunkan kadar borak di dalam makanan. Pemanasan/perebusan bakso yang mengandung boraks dapat mengurangi kandungan boraks di dalam bakso. Hal ini disebabkan karena boraks memiliki sifat mudah menguap dengan pemanasan dan kehilangan satu molekulnya pada suhu 100°C yang secara perlahan berubah menjadi asam metaborat (HBO_3). Hilangnya satu molekul

menyebabkan ikatan boraks dalam bakso menjadi lemah (Keenan *et al.*, 1992).

Modifikasi reagen curcumin yang dilakukan Arifin *et al.* (2008) yaitu Curcumin merupakan langkah untuk memudahkan pengujian di lapangan. Reagen Curcumin merupakan penyempurnaan dari alat deteksi boraks yang telah sering digunakan sebelumnya, yaitu kertas kunyit. Reagen Curcumin dan kertas kunyit mempunyai prinsip yang sama, yaitu di dalam rimpang kunyit terdapat kandungan minyak atsiri kurkumin yang merupakan indikator bagi *natrium tetraboraks* atau asam boraks yang memberikan warna merah oranye dan diubah menjadi hijau gelap oleh penambahan ammonia, tetapi menjadi merah oranye bila ditambahkan asam Grynkwicz and Slifski (2012).

Reagen Curcumin merupakan deteksi boraks yang praktis dan pengujiannya dapat dilakukan di luar laboratorium karena mengurangi risiko operator terkena bahan kimia yang berbahaya (HCl pekat). Berbeda dengan kertas kunyit yang perlu penambahan asam klorida pekat setelah ekstraksi bakso. Asam klorida pekat merupakan salah satu zat kimia berbahaya karena sifatnya yang mudah menguap sehingga penggunaan harus dilakukan di ruang basa. Asam klorida pekat mudah terbakar dan menyebabkan iritasi pada kulit (Arifin *et al.*, 2012).

Interpretasi pengujian reagen Curcumin lebih cepat dibandingkan dengan kertas kunyit. Kertas kunyit membutuhkan waktu kurang lebih 2 menit untuk melihat hasil interpretasi, sedangkan reagen Curcumin hanya membutuhkan waktu 5 detik untuk melihat hasil interpretasi (Arifin *et al.*, 2012). Penelitian ini semakin menguatkan bahwa bahwa reagen Curcumin merupakan alat uji yang terukur berdasarkan parameter (kuantitatif) absorbensi warna.

Kesimpulan

Pemanasan menurunkan keberadaan boraks dalam bakso. Pengamatan dengan spektrofotometer terhadap perubahan warna reagen Curcumin dalam ekstrak bakso yang mengandung boraks lebih tepat dibandingkan uji kualitatif dengan penglihatan. Reagen curcumin mampu mendeteksi borak dalam bakso yang direbus hingga 15 menit.

Daftar Pustaka

- Arifin, M., Wijaya, A.E., Kusumawardani, A.S., Lutfatin, R.I., Astuti, E.D. 2012. *Laporan Akhir PKM-P Curcumin Reagen Praktis Penguji Kandungan Boraks pada Bakso*. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemist). 1990. *Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemist, USA. 2* : 1145, 1146.
- Dufour, L., Sander, J.E., Wyatt, R.D., Rowland, G.N., Page, R.K. 1992. *Experimental Exposure Of Broiler Chicken To Boric Acid To Assess Clinical Signs And Lesions Of Toxicosis. Avian Dis.* 36 (4):1007-1011.
- Grynkwicz, G., Slifski, P. 2012. *Curcumin and Curcuminoid in Quest for Medicinal Status. ACTA ABP.* 59 : 205.
- Keenan, C.W., Kleinfelter, D.C., Wood, J.H. 1992. *Ilmu Kimia untuk Universitas edisi keenam Jilid 2*. Penerbit Erlangga. Jakarta 126-143.
- Mizura, S.S., Tee, E.S., Ooi, H.E. 1991. *Determination of Boric Acid in Foods: Comparative Study of Three Methods. J. Sci. Food Agric.* 55:261-268
- Murray, F. 2005. *Risk Assessment of Mattresse ith Borate-Treated Cotton Batting Before and After the Rollest Test*. <http://www.jonesfiber.com/borontoicity-thefact.pdf>. Diakses 2 Desember 2012.
- Sander, J.E., Dufour, L., Wyatt, R.D., Bush, P.B., Page, R.K. 1991. *Acute Toxicity Of Boric Acid*

- And Boron Tissue Residues After Chronic Exposure In Broiler Chicken. *Avian Dis.* 35 (4):745-749
- See, A.S., Salleh, A.B, Bakar, F.A., Yuso, NA., Abdulmir, A.S., Heng, L.Y. 2010. Risk and Health Effect of Boric Acid. *Am. J. Applied Sci.* 7(5):620-627
- Sherman, H.C. 1959. *Chemistry of Food and Nutrition.* The Macmillan Company. New York. 247.
- Sugiyatmi. S. 2006. *Analisis Faktor-Faktor Risiko Pencemaran Bahan Toksik Boraks Dan Pewarna Pada Makanan Jajanan Tradisional Yang Dijual Di Pasar-Pasar Kota Semarang Tahun 2006.* Tesis. Universitas Diponegoro. Semarang. 7.
- Yiu, P.H., See, J., Rajan, A, Bong, A.F.J. 2008. Boric Acid in Fresh Noodles and Fish Ball. *Am. J. Agril. & Biol.Sci.* 3(2):476-481

Korelasi Berat Badan dan Umur Sapi terhadap Berat, Volume Cairan dan Konsentrasi Prostaglandin $F_2\alpha$ pada Vesikula Seminalis

Correlation between Weight, Fluid Volume and Prostaglandin $F_2\alpha$ in Seminal Vesicle of Cattle

Naela Wanda Yusria Dalimunthe¹, Agung Budiyanto², Erna Prawita Setyowati³, Agustina Dwi Wijayanti⁴,

¹ Program Studi Kesehatan Hewan, Sekolah Vokasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta
 Jl. Yacaranda Sekip Unit II, Yogyakarta 55281, Telp: +62 274 581124,

Email : d3keswan.sv.ugm.ac.id, Email: dalimunthe_naela@yahoo.com; naela.wanda@ugm.ac.id

² Departemen Reproduksi dan Obstetri, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

³ Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta Sekip Utara, Yogyakarta, 55281,
 Telp: (0274)543120, Fax : (0274)543120, Email : farmasi@ugm.ac.id

⁴ Departemen Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

Abstract

Seminal vesicles were collected from 60 heads of Bulls which butchered in slaughter house (RPH) Yogyakarta. The aims of this study are knowing the relationship between body weight, age, fluids volume and concentration of prostaglandin $F_2\alpha$ ($PGF_2\alpha$) in seminal vesicle of beef cattle. Those seminal vesicles were gathered from bulls which recorded its body weight and age then measured its seminal vesicles for weight, fluids volume and $PGF_2\alpha$ levels. The $PGF_2\alpha$ level was measured by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Statistical analysis was performed using one way – analysis of varian, regression and correlation with $P < 0.05$. Body weight of bulls showed positive correlation with the weight of seminal vesicle and its fluids volume. However, $PGF_2\alpha$ levels were not correlated with the body weight of cattle. Weight of seminal vesicles also exhibited positive correlation with volume of vesicle fluids but no correlation with $PGF_2\alpha$ levels. Based on the age of bulls, there were no correlation with the weight of seminal vesicles, seminal fluids volume and $PGF_2\alpha$ levels. Those result indicated that the weight and fluids volume were affected by the body weight of bulls although the $PGF_2\alpha$ levels have a standard of development which seems affected by other factors such as concentration of androgen hormone.

Keywords : cattle, body weight, age, seminal vesicle, $PGF_2\alpha$

Abstrak

Vesikula seminalis dikoleksi dari 60 ekor sapi yang dipotong di Rumah Potong Hewan Yogyakarta. Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui hubungan antara berat badan, umur, volume cairan dan konsentrasi prostaglandin $F_2\alpha$ ($PGF_2\alpha$) dari vesikula seminalis sapi potong. Tingkat konsentrasi $PGF_2\alpha$ diukur menggunakan *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) kit. Analisa statistik dilakukan menggunakan *one way ANOVA*, regresi dan korelasi dengan $P < 0.05$. Berat badan sapi menunjukkan korelasi positif terhadap berat vesikula seminalis dan volume cairan yang dihasilkan. Konsentrasi $PGF_2\alpha$ tidak berkorelasi terhadap berat sapi. Berat vesikula seminalis memiliki korelasi positif terhadap volume vesikula seminalis tetapi tidak berkorelasi dengan konsentrasi $PGF_2\alpha$. Berdasarkan pada umur sapi, parameter tersebut tidak berkorelasi dengan berat vesikula seminalis, volume cairan seminalis dan konsentrasi $PGF_2\alpha$. Hasil tersebut mengindikasikan bahwa tingkat konsentrasi $PGF_2\alpha$ memiliki standar perkembangan tersendiri yang kemungkinan dipengaruhi oleh faktor lain seperti konsentrasi hormon androgen.

Kata kunci: sapi potong, berat badan, umur, vesikula seminalis, $PGF_2\alpha$

Pendahuluan

Sapi jantan lokal merupakan aset yang harus dikembangkan semaksimal mungkin agar tepat guna dalam pengembangan tersebut diperlukan informasi yang akurat dari sapi yang secara fisik hidup di suatu wilayah dan dapat dikomparasikan dengan literatur global yang sudah ada (Rahman *et al.*, 2010). Telah diketahui bahwa sapi jantan memiliki organ vesikula seminalis yang mampu mensekresikan berbagai jenis hormon seperti testosteron, estrogen, dan prostaglandin (Pemayun dkk, 2012; Shinde *et al.*, 2014). Kelenjar vesikula seminalis pada sapi berbentuk kompak berlobus dan memiliki duktus sekretori/saluran pengeluaran intralobularis yang berbentuk sedikit melingkar dan bergabung menjadi duktus sekretori utama. Sel kolumnar sekretoris memiliki sedikit droplet lemak dan glikogen sehingga mampu memberikan reaksi positif alkaline phosphatase. Sedangkan sel basal ditandai dengan adanya droplet lemak yang besar. Sekitar 50% material lemak merupakan kolesterol dan turunannya, 25% berupa trigliserid, dan 10% phospholipid (Dellmann and Eurell, 1998). Produk sekresi vesikula seminalis bersifat gelatinous (likat), berwarna putih hingga putih kekuningan dan kaya akan fruktosa yang akan berfungsi sebagai sumber energi bagi spermatozoa yang diejakulasikan (Miki, 2007).

Vesikula seminalis adalah salah satu kelenjar asesoris pada saluran alat kelamin jantan. Ukuran dan anatominya sangat bervariasi di antara berbagai spesies hewan (JainudeenandHafez, 2000). Masing-masing dari vesikula terhubung dengan pelvis urethra di daerah vesika urinaria, yang artinya duktus ekskretorius terbuka melalui *colliculis seminalis*. Vesikula seminalis mensekresikan sejumlah cairan untuk menambah

volume dan nutrisi bagi semen. Vesikula seminalis tidak berfungsi untuk menyimpan sperma (Miki, 2007). Hal ini berarti cairan semen merupakan medium yang mendukung kehidupan spermatozoa. Dua vesikula seminalis berkontribusi menghasilkan sekitar 60% dari volume air mani. Cairan dari vesikula seminalis memiliki konsistensi kental, kekuningan, dan basa yang disekresikan ke dalam saluran ampula. Cairan ini berisi lendir, gula fruktosa (yang menyediakan sebagian besar energi bagi sperma), enzim *coagulating*, asam askorbat, dan regulator local bernama prostaglandin (Jainudeen dan Hafez, 2000). Beberapa peneliti melaporkan bahwa kelenjar vesikula seminalis mensekresikan $PGF_2\alpha$. Semen manusia mengandung sejumlah besar prostaglandin yang diproduksi dari kelenjar vesikula seminalis dan telah dibuktikan teridentifikasi dalam konsentrasi tinggi pada vasektomi (Gonzales, 2001).

Glandula vesikula seminalis diketahui mensekresikan hormon prostaglandin $F_2\alpha$ tetapi belum banyak kajian mengenai konsentrasi $PGF_2\alpha$ dari cairan yang dikoleksi langsung dari glandula tersebut. Informasi mengenai hormon $PGF_2\alpha$ dari sapi lokal dan hubungannya dengan berat badan maupun umur juga belum banyak dilaporkan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui morfologi glandula vesikula seminalis dari sapi jantan yang ada di Yogyakarta serta mengetahui hubungan antara berat dan umur sapi terhadap berat glandula vesikula seminalis, volume cairan yang dihasilkan dan konsentrasi $PGF_2\alpha$.

Materi dan Metode

Dalam penelitian ini dipakai vesikula seminalis dari 60 ekor sapi jantan dengan berbagai

macam bangsa sapi (28 ekor sapi PO, 7 ekor sapi Simental, 4 ekor sapi Limousin, 5 ekor sapi LimPO, 11 ekor sapi SimPO dan 5 ekor sapi Brahman Cross) yang dipotong di Rumah Potong Hewan (RPH) Yogyakarta. Dokumentasi sampel berdasarkan pada berat dan umur sapi. Proses pengambilan kelenjar vesikula seminalis dilakukan sesuai standar operasional prosedur pematangan hewan besar yang berlaku di RPH.

Pengambilan Cairan Vesikula Seminalis

Proses penimbangan dan pengukuran dilakukan segera setelah vesikula seminalis sampai di laboratorium dengan menggunakan timbangan dan penggaris standar kemudian dilanjutkan dengan pengoleksian cairan vesikula seminalis. Cairan vesikula seminalis dikoleksi dengan cara masase yang dilakukan dengan mengurut vesikula dari ujung organ ke arah *ductus secretorius* segera di aspirasi menggunakan spuit 1 ml. Cairan yang diperoleh selanjutnya dimasukkan ke dalam vial dan disimpan pada temperatur -4°C sampai saat digunakan.

Analisis Hormon

Pengukuran konsentrasi $\text{PGF}_2\alpha$ dilakukan dengan menggunakan analisis hormon $\text{PGF}_2\alpha$ dengan metode ELISA di laboratorium Fisiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada. Sebanyak 30 sampel dipilih secara acak untuk mewakili semua bangsa sapi yang dipergunakan dan dikombinasikan dengan kit yang dipesan dari (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) ELISA kit (CEA749Ge) dengan metode *Indirect ELISA* (*Competitive ELISA*) dalam 96 *well-plate* untuk mengetahui konsentrasi $\text{PGF}_2\alpha$.

Analisis Data

One way ANOVA, regresi dan korelasi digunakan untuk menganalisa data parameter yang terdistribusi normal dengan varians-nya. Angka kepercayaan yang dipergunakan adalah $P < 0.05$ untuk menyatakan data statistik yang signifikan dan metode Tukey's test digunakan untuk membandingkan data distribusi normal dan metode Dunn's digunakan apabila uji normal gagal dilakukan (Setyawan *et al.*, 2015). Seluruh nilai rerata yang disampaikan berupa *mean* dan *standar error of mean* ($\text{mean} \pm \text{SEM}$).

Hasil dan Pembahasan

Rata rata berat sapi yang dipergunakan adalah 441.5 ± 30.6 kg dengan rerata umur 2.3 ± 0.2 tahun. Berat kelenjar vesikula seminalis sebesar 85.9 ± 13.4 g dengan volume cairan sebanyak 10.4 ± 4.0 ml dan konsentasi $\text{PGF}_2\alpha$ rata-rata 6.4 ± 0.3 pg/ml seperti terlihat pada Tabel 1. Vesikula seminalis atau juga dikenal sebagai glandula vesikula merupakan kelenjar asesori hewan memiliki peran yang nyata dan penting dalam mengatur fungsi neuroendokrin dan berbagai perilaku reproduksi dan sosial dengan struktur berlobus terletak di dekat leher kandung kemih dan sisi lateral ampula (Jainudeen and Hafez, 2000). Panjang glandula vesikula seminalis menurut Hafez (2000) adalah 13 cm sedangkan Getty (1975) melaporkan bahwa panjang glandula tersebut adalah 10 – 12 cm. Whittier (1993) menuliskan bahwa panjang glandula seminalis adalah 4 – 5 inchi atau 10.2 – 12.7 cm dan Rahman *et al.* (2010) menyatakan panjang vesikula seminalis sebelah kanan dan kiri berurutan adalah 9.4 cm dan 8.6 cm. Berdasarkan referensi tersebut di atas maka panjang glandula vesikula seminalis pada penelitian ini (11.9 ± 1.5 cm)

Tabel 1. Rerata data (*mean ± SEM*) dari seluruh sampel yang diperiksa (n=60).

Berat Sapi (kg)	Umur (tahun)	Berat V. Seminalis (g)	Volume Cairan (ml)	Panjang Vesikula Seminalis (cm)	Lebar Vesikula Seminalis (cm)	Konsentrasi PGF ₂ α (pg/ml)
441.5 ± 30.6	2.3 ± 0.2	85.9 ± 13.4	10.4 ± 4.0	11.9 ± 1.5	6.7 ± 1.5	6.4 ± 0.3

Tabel 2. Distribusi berat dan volume cairan vesikula seminalis serta konsentrasi PGF₂α dari beberapa kelompok berat sapi dengan kisaran umur antara 1-4 tahun.

Kelompok Berat	Berat V. Seminalis (g)	Volume Cairan V. Seminalis (ml)	Panjang Vesikula Seminalis (cm)	Lebar Vesikula Seminalis (cm)	Konsentrasi PGF ₂ α (pg/ml)
200 – 380 kg	64.1 ± 6.3 ^a	5.2 ± 0.9 ^a	9.4 ± 0.5	6.1 ± 0.1 ^a	5.6 ± 0.4
381 – 570 kg	91.5 ± 8.7 ^{ab}	10.7 ± 1.7 ^b	13.1 ± 2.1	6.6 ± 0.2 ^a	6.2 ± 0.6
571 – 750 kg	120.6 ± 13.6 ^b	20.5 ± 4.4 ^c	12.5 ± 0.4	7.8 ± 0.4 ^b	8.1 ± 1.9

^{a,b} superscript yang berbeda dalam kolom menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0.05), n = 60.

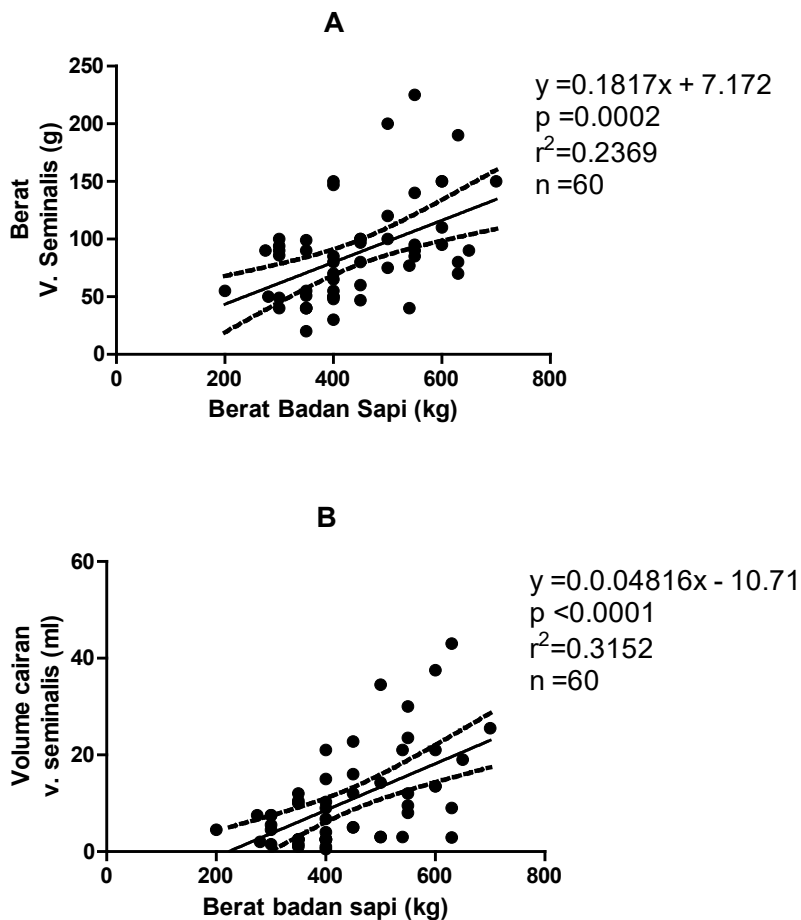
tergolong normal. Berat glandula vesikula seminalis yang diperoleh dalam penelitian ini (85.9 ± 13.4 g) menunjukkan angka yang sedikit lebih tinggi dari laporan yang diberikan oleh Hafez (2000) maupun Rahman *et al.* (2010) yaitu 75 g dan 38.4 g.

Pengaruh berat badan sapi

Pada Tabel 2 terlihat bahwa berat vesikula seminalis pada kelompok berat 200 – 380 kg (64.1 ± 6.3 g) lebih rendah secara signifikan (P<0.05) dibandingkan dengan kelompok berat badan 571 – 750 kg (120.6 ± 13.6 g). Volume cairan vesikula seminalis memiliki perbedaan yang nyata diantara ke 3 kelompok berat yang dipergunakan yaitu kelompok berat badan 200 – 380 kg memiliki volume cairan (5.2 ± 0.9 ml) yang lebih rendah dari pada kelompok berat badan 381 – 570 kg (10.7 ± 1.7 ml) sedangkan kelompok berat badan 571 – 750 kg memiliki volume cairan tertinggi (20.5 ± 4.4 ml) dibandingkan 2 kelompok lainnya. Sedangkan konsentrasi PGF₂α

tidak menunjukkan adanya perbedaan diantara ke 3 kelompok berat badan tersebut. Perbedaan yang signifikan tersebut dilanjutkan dengan pemeriksaan besarnya pengaruh berat badan sapi terhadap variabel yang ada menggunakan analisa regresi dan korelasi seperti pada Gambar. Hasil perhitungan menunjukkan bahwa berat sapi memiliki korelasi terhadap berat vesikula seminalis dengan r² sebesar 0.24 dan angka kepercayaan P=0.0002. Sedangkan korelasi antara berat sapi terhadap volume cairan diperoleh r² sebesar 0.32 dan angka kepercayaan P<0.0001.

Berat badan sapi memiliki korelasi yang signifikan terhadap berat vesikula seminalis dan demikian juga dengan volume cairan, panjang dan lebar vesikula seminalis yang menunjukkan korelasi positif seperti pada Tabel 4. Hal tersebut sesuai dengan pendapat (Jainudeen and Hafez, 2000) yang mengatakan bahwa ukuran glandula vesikula seminalis mengikuti pertumbuhan tubuh dan cenderung bervariasi pada setiap spesies.



Gambar. Hasil analisa regresi dan korelasi antara berat badan sapi terhadap berat vesikula seminalis (A) dan volume cairan vesikula seminalis (B).

Tabel 3. Pengaruh umur sapi jantan terhadap berat dan volume cairan vesikula seminalis serta konsentrasi PGF₂α.

Kelompok Umur	Berat V. Seminalis (g)	Volume Cairan V. Seminalis (ml)	Panjang Vesikula Seminalis (cm)	Lebar Vesikula Seminalis (cm)	Konsentrasi PGF ₂ α (pg/ml)
1.0 – 1.9 tahun	71.8 ± 10.1	7.6 ± 2.1	15.3 ± 5.9	6.1 ± 0.1 ^a	9.4 ± 2.9
2.0 – 2.9 tahun	95.2 ± 10.6	10.9 ± 2.1	11.9 ± 0.3	6.6 ± 0.2 ^b	6.5 ± 0.8
3.0 – 3.9 tahun	84.3 ± 8.4	11.7 ± 2.5	10.3 ± 0.5	7.8 ± 0.4 ^b	5.6 ± 0.3

^{a,b} superscript yang berbeda dalam kolom menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0.05), n = 60.

Pengaruh umur sapi

Umur sapi tidak menunjukkan adanya pengaruh terhadap berat, volume cairan, panjang dan lebar vesikula seminalis serta konsentrasi PGF₂α seperti terlihat pada Tabel 3 berikut. Kelompok umur 1.0–1.9 tahun memiliki berat vesikula seminalis

(71.8 ± 10.1 g) yang tidak berbeda dengan kelompok umur 2.0–2.9 tahun (95.2 ± 10.6 g) dan 3.0–3.9 tahun (84.3 ± 8.4 g). Demikian juga dengan volume cairan dan konsentrasi PGF₂α yang tidak menunjukkan perbedaan signifikan dari ke 3 pengelompokan umur yang ditentukan.

Tabel 4. Korelasi antara berat dan umur sapi terhadap berat, volume cairan, ukuran vesikula seminalis dan konsentrasi PGF₂α.

Regresi dan korelasi	Nilai R ²	Nilai P	Signifikansi
Berat sapi vs Berat vesikula seminalis	0.2369	0.0002	Signifikan
Berat sapi vs Volume cairan vesikula seminalis	0.3152	< 0.0001	Signifikan
Berat sapi vs Panjang vesikula seminalis	0.1495	0.0032	Signifikan
Berat sapi vs Lebar vesikula seminalis	0.1370	0.0050	Signifikan
Berat sapi vs Konsentrasi PGF ₂ α	0.0018	0.8414	Tidak
Umur sapi vs Berat vesikula seminalis	0.0137	0.4092	Tidak
Umur sapi vs Volume cairan vesikula seminalis	0.0386	0.1673	Tidak
Umur sapi vs Panjang vesikula seminalis	0.0092	0.4909	Tidak
Umur sapi vs Lebar vesikula seminalis	0.0154	0.3718	Tidak
Umur sapi vs Konsentrasi PGF ₂ α	0.0020	0.8435	Tidak

Pada penelitian ini diketahui bahwa umur sapi tidak menunjukkan adanya pengaruh terhadap berat dan volume cairan vesikula seminalis serta konsentrasi PGF₂α. Hasil analisa korelasi yang dilakukan pada faktor umur terhadap parameter lain juga tidak ditemukan adanya korelasi yang signifikan seperti yang dapat dilihat di Tabel 4. Hal ini sekilas tampak berbeda dengan laporan Jainudeen dan Hafez (2000) bahwa faktor umur memiliki pengaruh terhadap ukuran dan aktivitas vesikula seminalis pada beberapa hewan, (Rahman *et al.*, 2010) juga menyatakan seiring dengan bertambahnya umur seekor sapi, ukuran vesikula seminalis akan bertambah dan telah diketahui bahwa terdapat korelasi positif antara umur hewan dengan ukuran vesikula seminalis terutama antara umur 2 tahun dibanding umur 4 tahun. Namun Rahman *et al.* (2010) menambahkan bahwa ukuran dan berat glandula vesikula seminalis pada sapi umur 2-3 tahun tidak berbeda nyata. Berdasarkan rentang umur pada laporan tersebut maka umur sapi yang dipergunakan pada penelitian ini dapat dikategorikan pada kelompok sapi muda sehingga pengaruh umur tidak signifikan berbeda.

Konsentrasi PGF₂α tidak terpengaruh dengan umur sapi maupun berat badan sapi. Hal ini lebih

disebabkan karena sapi yang dipotong di RPH didominasi oleh sapi potong yang kemungkinan besar tidak pernah dimanfaatkan sebagai pejantan sehingga aktifitas hormon androgennya sebatas kadar yang diperlukan untuk pertumbuhan dan pemeliharaan sistem reproduksi jantan saja. Kemungkinan tersebut didasarkan pada beberapa laporan sebelumnya bahwa pertumbuhan dan aktifitas sekresi pada glandula vesikula seminalis dipengaruhi oleh tingkat konsentrasi hormon androgen yang ditentukan oleh aktifitas seksual dan libidonya (Gonzales, 2001).

Kajian faktor berat dan umur sapi terhadap berat dan volume cairan vesikula seminalis serta konsentrasi PGF₂α diperoleh beberapa hubungan yang telah diterangkan sebelumnya. Hal yang menarik adalah bahwa konsentrasi PGF₂α diketahui tidak memiliki perbedaan di antara kelompok faktor yang telah ditentukan dan tidak menunjukkan adanya korelasi dengan faktor-faktor tersebut. Hal tersebut menunjukkan bahwa konsentrasi PGF₂α dalam cairan vesikula seminalis dipengaruhi oleh faktor lain yang lebih spesifik. Almenara *et al.* (2000) melaporkan bahwa beberapa peneliti yang mencoba mengetahui hubungan konsentrasi PGF₂α dalam plasma semen dengan faktor luar diperoleh bahwa

pemberian injeksi testosteron atau hormon androgen lain mampu meningkatkan aktifitas sekresi sekaligus meningkatkan berat organ vesikula seminalis. Sedangkan Masoumi *et al.* (2011) melaporkan bahwa injeksi $PGF_2\alpha$ pada sapi dengan libido rendah dapat meningkatkan kualitas ejakulat, konsentrasi testosteron dan libido. Hubungan yang saling mempengaruhi ini menunjukkan bahwa konsentrasi $PGF_2\alpha$ ditentukan oleh tingkat konsentrasi hormon androgen yang menentukan aktifitas seksual dan libidonya seperti yang dikemukakan oleh Gonzales (2001). Dengan kata lain, konsentrasi $PGF_2\alpha$ sebanding dengan konsentrasi hormon androgen salah satunya testosteron dan keseluruhan sistem endokrin tersebut berkembang bersama dengan proses pubertas hewan (Hafez, 2000).

Hormon $PGF_2\alpha$ yang terkandung di dalam cairan vesikula seminalis dapat diukur dengan menggunakan metode ELISA yang artinya semakin membuka kesempatan untuk menggunakan kelenjar vesikula seminalis dari limbah pematangan sapi sebagai sumber penghasil hormon $PGF_2\alpha$ dengan metode ekstraksi seperti yang telah dilaporkan Pemayun dkk. (2012). Volume cairan vesikula yang tinggi dapat diperoleh dari sapi dengan berat badan yang tinggi meskipun konsentrasi $PGF_2\alpha$ tidak dapat dipastikan tinggi namun dimungkinkan untuk mendapatkan jumlah total hormon $PGF_2\alpha$ yang lebih banyak.

Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diperoleh dari penelitian ini adalah konsentrasi hormon $PGF_2\alpha$ dapat terukur di dalam cairan vesikula seminalis dengan kadar tertentu dan tidak ditemukan adanya pengaruh dari berat hidup maupun umur sapi. Berat

badan sapi memiliki korelasi positif terhadap berat, volume cairan, panjang dan lebar vesikula seminalis tetapi tidak ditemukan adanya pengaruh terhadap konsentrasi $PGF_2\alpha$. Umur sapi antara 1.0–3.9 tahun tidak memiliki pengaruh terhadap berat dan ukuran vesikula maupun volume cairan vesikula seminalis.

Daftar Pustaka

- Almenara, A, Escalante, G, Gazzo, E, Gonzales, GF. 2000. Transillumination to evaluate spermatogenesis: Effect of testosterone enanthate in adult male rats. *Arch Androl*; 46: 21-8.
- Dellmann, H.D and J. Eurell, 1998. *Veterinary Histology*. Fifth Edition. Williams and Wilkins Publishing. Philadelphia. USA. pp: 238-243.
- Getty, R. 1975. Sisson and Grossman's *The Anatomy of the Domesticated Animals*. Fifth Edition. Philadelphia: Saunders. pp: 942-946.
- Gonzales, GF. 2001. Function of seminal vesicles and their role on male fertility. *Asian J Androl* 3:251-258.
- Hafez, ESE. 2000. *Anatomy of Male Reproduction*. "In *Reproduction in Farm Animals*". Hafez (7 th ed.). Lippincott William & Wilkins. A Wolter Kluwer Company. pp: 8-9.
- Jainudeen, MR, dan Hafez, ESE. 2000. Gestation, prenatal, physiology, and parturition. In: *Reproduction in Farm Animals*, Edisi ke 7. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. pp: 140-141.
- Masoumi, R, Towhidi, A, Javaremi, AN, Nabisadeh, H, Zhandi, M. 2011. Influence of $PGF_2\alpha$ on semen quality and libido in Holstein bulls. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*; 35(1): 1-6.
- Miki, K. 2007. Energy Metabolism and Sperm Function. *Soc Reprod Fertil Suppl*. 65:309-25.
- Pemayun, TGO, Mahaputra, L, Ismudiono, Soetjipto. 2012. Kadar Prostaglandin $F_2\alpha$ pada produk

biakan sel Monolayer vesikula seminalis dan endometrium sapi Bali dengan penambahan hipotaurin, *Jurnal Kedokteran Hewan*, Vol. 6, No. 1.

Rahman, MS, Islam, MS, Rahman, MT, Parvez, NH, Rahman, MM. 2010. Morphometric analysis of vesicular glands of indigenous bull. *Int. J. Sustain. Crop Prod.* 5(1):11-14.

Setyawan, EMN, Kim, MJ, Oh, HJ, Kim, GA, Jo, YK, Lee, SH, Choi, YB, Lee, BC. 2015. Maintaining canine sperm function and osmolyte content with multistep freezing

protocol and different cryoprotective agents. *Cryobiology* 71: 344–349.

Shinde, S, Mahmood, S, Singh, G, and Verma, MR. 2014. Association between the seminal vesicle weight and certain steroids in buffaloes (*Bubalus bubalis*), *Veterinary World* 7(1): 21-25.

Whittier, JC. 1993. Reproductive Anatomy and Physiology of the Bull, University of Missouri Extension. University Extension Agricultural Publications. Columbia. <http://extension.missouri.edu/p/G2016>.

Kerusakan Usus pada Mencit (*Mus musculus*) yang Diinokulasi Larva 3 (L3) *Anisakis* spp.

Intestinal Damage in Mice (*Mus musculus*) Inoculated with Third Stage larvae (L3) *Anisakis* spp.

Febrina Dian Permatasari¹, Poedji Hastutieki¹, Lucia Tri Suwanti²

¹Departemen Parasitologi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

²Peneliti Insitute Tropical Diseases

Email: drhfebrinadianp@gmail.com

Abstract

This study aims to be show damage in the intestine of mice caused by inoculation of the larvae of *Anisakis* spp. alive and who has died because of a warming 75°C for 7 minutes. Eighteen male mice (*Mus musculus*) were divided into three groups: control group, a group of mice were inoculated the larvae of *Anisakis* spp. alive and groups of mice were inoculated the larvae of *Anisakis* spp. who have died. 48 hours post inoculation, the mice's intestines necropsy performed later performed HE staining to identify and scoring intestinal histopathology. The results showed inoculation of the larvae of *Anisakis* spp. either alive or dead induce histological changes in the intestine in the form of infiltration of inflammatory cells, epithelial changes and structural changes in the intestinal mucosa.

Keywords: Third stage larvae *Anisakis* spp., Intestinal damage, histopathology, *Mus musculus*

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk melihat gambaran kerusakan pada usus mencit yang ditimbulkan akibat inokulasi larva *Anisakis* spp. dalam keadaan hidup dan yang telah mati karena mengalami pemanasan 75°C selama 7 menit. Delapan belas ekor mencit (*Mus musculus*) dibagi menjadi tiga kelompok yaitu kelompok kontrol, kelompok mencit yang diinokulasi larva *Anisakis* spp. dalam keadaan hidup dan kelompok mencit yang diinokulasi larva *Anisakis* spp. yang telah mati. 48 jam post inokulasi, dilakukan nekropsi usus mencit untuk kemudian dilakukan pewarnaan HE untuk mengidentifikasi dan skoring histopatologi usus. Hasil penelitian menunjukkan inokulasi larva *Anisakis* spp. baik dalam keadaan hidup maupun mati menimbulkan perubahan gambaran histologi pada usus berupa infiltrasi sel radang, perubahan epitel dan perubahan struktur mukosa pada usus.

Kata kunci : Larva tiga *Anisakis* spp., kerusakan usus, histopatologi, *Mus musculus*

Pendahuluan

Anisakiasis merupakan infeksi parasit pada manusia dan hewan yang disebabkan oleh larva nematoda dari famili Anisakidae yaitu *Anisakis* spp. yang memiliki predileksi pada usus ikan. Larva *Anisakis* banyak ditemukan pada ikan dan mamalia laut di laut utara, samudra Atlantik dan samudra Pasifik bagian utara. Penelitian menunjukkan bahwa prevalensi 80% ikan terdapat parasit ini

(Daschneret *al.*, 2012). Kasus anisakiasis tersebar di berbagai belahan dunia, terutama daerah atau negara dengan konsumsi ikan mentah tinggi yang menjadi salah satu penyebab paling umum alergi makanan (Lindqvist *et al.*, 1993). Manusia terinfeksi *Anisakis* spp. bila memakan ikan mentah, penggaraman dan pengasapan kurang sempurna. Pemasakan kurang matang yang mengandung larva *Anisakis* spp. yang dapat menginduksi dua masalah utama yang sering

dikaitkan dengan gejala klinis mirip dengan infeksi bakteri atau virus gastroenteritis.

Belum banyak informasi tentang kejadian *Anisakis* di Indonesia. Pengamatan Hariyadi (2006) pada ikan di beberapa perairan Indonesia menunjukkan prevalensi larva *Anisakidae* yang cukup tinggi pada ikan Ekor Kuning di Selat Sunda sebesar 67%, Laut Bali sebesar 67% dan Laut Nusa Tenggara Timur sebesar 17%, ikan Tuna di Laut Bali menunjukkan prevalensi larva *Anisakidae* sebesar 67% dan Laut Nusa Tenggara Timur sebesar 17% dan prevalensi larva *Anisakidae* pada ikan Kerapu di Selat Sunda sebesar 25%, Laut Bali sebesar 43% dan Laut Nusa Tenggara Timur sebesar 17%.

Pasien yang terkena Anisakiasis terutama berasal dari antigen somatik yang berasal dari larva hidup atau mati (Moneo *et al.*, 2005) pada produk ikan yang disebabkan *allergen* dari *Anisakis* spp. yang tahan terhadap panas dan pepsin yaitu protein Tropomyosin (Caballero *et al.*, 2008). Meskipun dimasak pada 70°C atau didinginkan -20°C selama 72 jam yang diyakini dapat menghancurkan infektivitas parasit ini, namun ternyata kemampuan untuk mendenaturasikan protein tidak dapat dihilangkan (Caballero and Moneo 2004). Pengasapan dan penggaraman dengan menggunakan lemon atau cuka juga tidak dapat membunuh parasit ini terbukti larva *A. simplex* dapat bertahan dalam cuka hingga 51 hari (Oshima, 1972). Penelitian yang dilakukan oleh Raharjo (2016) tentang preservasi pangan memberikan hasil bahwa memasak ikan laut dengan metode pemanasan dengan suhu 75°C selama tujuh menit mematikan seluruh larva *Anisakis* spp., namun hal ini belum dibuktikan apakah protein Tropomyosin terdenaturasi atau tidak hingga dapat menimbulkan perubahan histologi pada usus. Perlu penelitian apakah larva

Anisakis spp. baik dalam keadaan hidup atau mati akan mengakibatkan perubahan histopatologi pada usus mencit jika diinokulasikan secara oral yang nantinya hasil penelitian ini akan membuktikan apakah larva *Anisakis* spp. yang telah mati tetap dapat menimbulkan kerusakan pada usus.

Materi dan Metode

Penelitian ini menggunakan hewan coba mencit jantan sebanyak 18 ekor, alkohol *absolut*, 70%, 80%, 90% dan 96%, *xylene*, parafin cair, *xylol*, antibodi IFN- γ (D-17) Sc-9344 *Santa Cruz Biotechnology*, antibodi TNF- α (52B83) Sc-52746 *Santa Cruz Biotechnology*, *Endogen Peroksida* 0,5%, antigen *retrieval declocking chamber*, *Phospat Buffer Saline* (PBS) pH 7,4, *sniper*, *universal link*, *Trekavidin-HRP label*, *DAB*, substrat buffer, *hematoxylin*, dan aquades.

Peralatan penelitian yang digunakan adalah kandang hewan coba, sonde mencit, tempat minum, mikroskop cahaya Nikon Eclipse Ci®, opti lab, spuit satu cc, gloves, masker, kapas steril, papan seksi, *dissecting set*, timbangan digital.

Prosedur penelitian meliputi: koleksi larva *Anisakis* spp sebanyak 200 larva, identifikasi larva *Anisakis* spp berdasarkan Iglesias *et al.*,(2001), pemanasan larva *Anisakis* spp sebanyak 60 larva dengan suhu 75°C selama tujuh menit dengan menggunakan *microwave*. Terdapat tiga kelompok perlakuan, yaitu kelompok kontrol, perlakuan 1 dan perlakuan 2 masing-masing kelompok terdapat enam ekor mencit. Kelompok kontrol tidak diberikan perlakuan apapun, perlakuan 1 masing-masing mencit diinokulasi sepuluh larva *Anisakis* spp.tanpa pemanasan secara oral, dan perlakuan 2 masing masing mencit diinokulasi secara oral sepuluh larva

Anisakis spp yang telah dipanaskan, pembedahan mencit dan pengamatan gambaran histologi kerusakan pada usus mencit dengan pewarnaan HE. Data gambaran histopatologi yang diperoleh dianalisis secara non parametrik dengan skoring berdasarkan (Erben *et al.*, 2014) dan diuji Kruskal-Wallis. Analisis data dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak komputer SPSS 23 *for windows*.

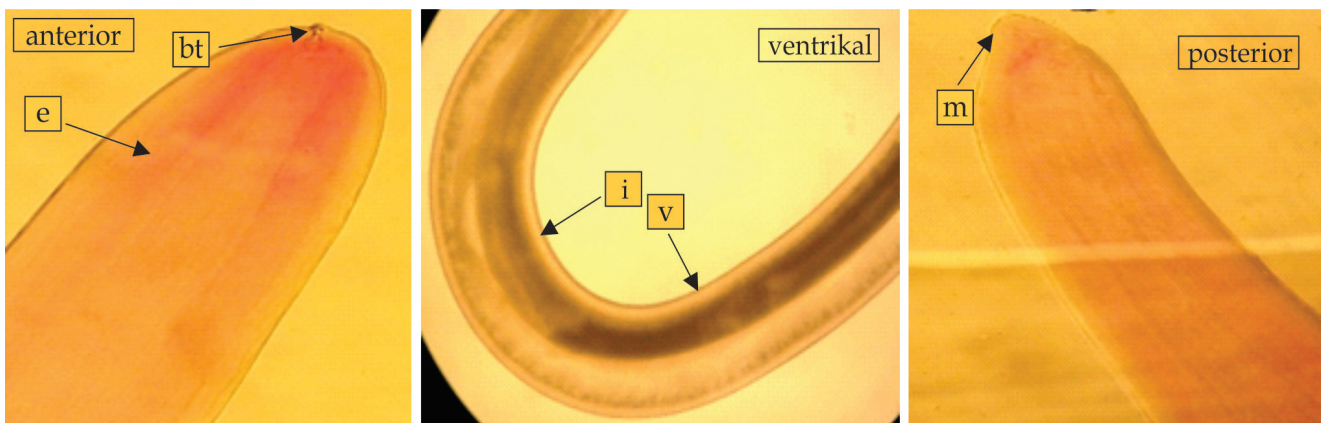
Hasil dan Pembahasan

Hasil identifikasi larva *Anisakis* spp. yang terlihat pada pewarnaan carmin dengan perbesaran 40x. Pada bagian anterior dapat terlihat *boring tooth* yang memiliki fungsi untuk membantu larva *Anisakis* spp. saat penetrasi pada jaringan, pada esophagus bagian dorsal memiliki peran untuk sekresi enzim ekstraseluler (Buzzel and Sommerville, 1985) dan sebagai tempat mensekresikan produk ES yaitu tropomyosin.

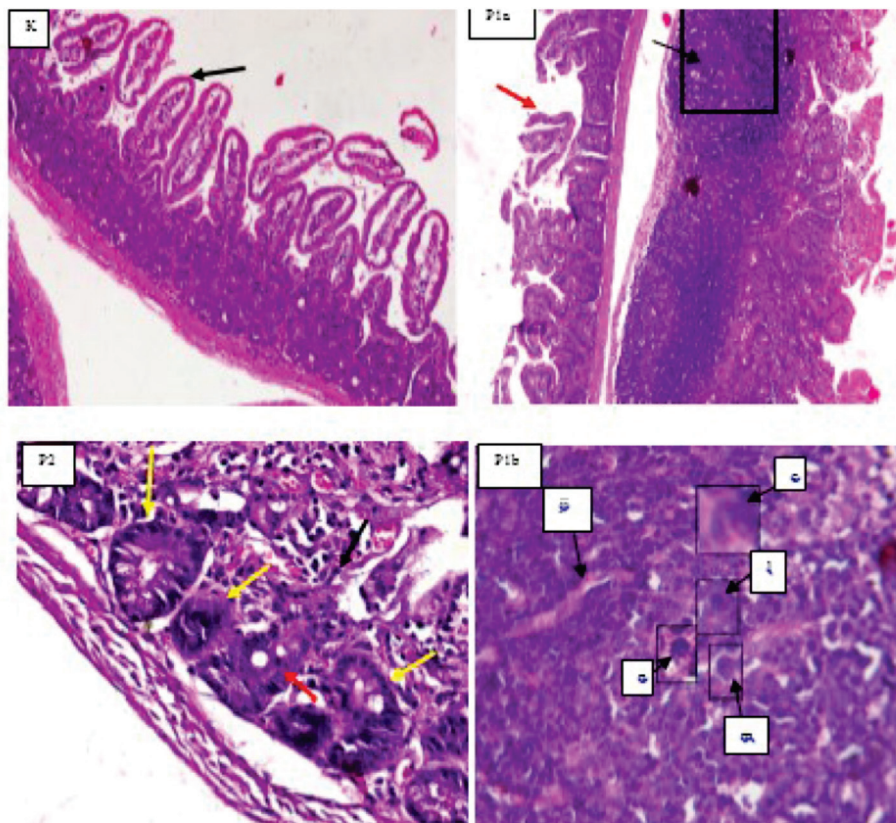
Pada bagian posterior larva *Anisakis* spp. tipe I terdapat mucron, inilah yang membedakannya dengan *Anisakis* tipe II dan pada bagian ventrikal tampak ventrikulus lebih panjang dibandingkan dengan *Anisakis* tipe II yang memiliki ventrikulus lebih pendek (Mattiucci *et al.*, 2013).

Hasil histopatologi kelompok kontrol, kelompok mencit yang diinokulasi larva *Anisakis* spp. dalam keadaan hidup dan kelompok yang diinokulasi larva *Anisakis* spp. yang telah mati yaitu pada kelompok kontrol terlihat vili normal dan tidak terdapat infiltrasi sel radang. Pada kelompok P1a dengan perbesaran 200x terlihat bentukan granuloma dan vili ruptur dan jika dilihat dengan perbesaran 400x (Gambar P1b) terlihat bentukan granuloma terdiri dari jaringan ikat, eosinofil, neutrofil, limfosit, dan makrofag. Pada kelompok P2 dengan perbesaran 400x terlihat infiltrasi sel radang namun tidak membentuk bentukan granuloma, terdapat abses kriptal dan irregular kriptal.

Tingkat nekrosis pada kelompok kontrol memiliki nilai rata-rata 0, pada kelompok mencit yang diinokulasi larva *Anisakis* spp. dalam keadaan hidup menunjukkan nilai rata-rata sebesar 20,33 dan kelompok mencit yang diinokulasi larva *Anisakis* spp. yang telah mati memiliki nilai rata-rata sebesar 12,50. Pada mencit yang diinokulasi larva *Anisakis* spp. dalam keadaan hidup memiliki nilai rata-rata lebih tinggi dibandingkan dengan mencit yang diinokulasi larva *Anisakis* spp. yang telah mati, ini memiliki arti larva hidup *Anisakis* spp. lebih banyak menimbulkan nekrosis.



Gambar 1 Identifikasi larva *Anisakis* spp. dengan perbesaran 40x Keterangan e: esophagus; bt: *boring tooth*; i: intestinal; v: ventrikulus; m: mucron.



Gambar 2. Gambaran histopatologi usus mencit dengan pewarnaan HE.

Keterangan:

- K : Kontrol usus mencit perbesaran 200x. Tanda panah hitam menunjukkan vili normal.
- P1a: usus mencit yang diinokulasi larva *Anisakis* spp. dalam keadaan hidup perbesaran 200x. Tanda panah hitam menunjukkan bentukan granuloma dan tanda panah berwarna merah menunjukkan vili ruptur.
- P2 : usus mencit yang diinokulasi larva *Anisakis* spp. yang telah mati. Tanda panah berwarna hitam menunjukkan infiltrasi sel radang. Tanda panah berwarna merah menunjukkan kriptas abses. Tanda panah berwarna kuning menunjukkan irregular kriptas.
- P1b: usus mencit perbesaran 400x. Keterangan: ji: jaringan ikat; l: limfosit; m: makrofag; e: eosinophil; n: neutrophil.

Tabel 1. Rerata dan Simpangan Baku nekrosis usus mencit yang diinokulasi larva *Anisakis* spp. secara oral

Kelompok perlakuan	Nekrosis (X ± SB)
K (-)	0,00 ^a ± 0,00
P1	20,33 ^b ± 4,274
P2	12,50 ^b ± 7,064

Keterangan : Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan terdapat perbedaan yang nyata (P<0,05)

Setelah dikonsumsi, larva bisa dieliminasi baik dengan dimuntahkan dan dikeluarkan melalui feses. Larva *Anisakis* spp. dapat menembus dinding saluran pencernaan. Sebagai konsekuensi yang terakhir,

terjadi reaksi granulomatosa lokal (Mattiucci *et al.*, 2011) hal ini sependapat dengan hasil penelitian bahwa hasil histopatologi pada usus mencit yang diinfeksi larva hidup *Anisakis* spp. menimbulkan lesi granuloma (Gambar 2).

Hasil penelitian menunjukkan histopatologi pada usus mencit yang diinokulasi larva hidup *Anisakis* spp. lebih berat dibandingkan dengan larva *Anisakis* spp. yang telah mati berdasarkan referensi menurut Erben *et al.*, (2014) (Lampiran 1), hal ini sependapat dengan Audicana and Kennedy (2008) bahwa larva yang masih hidup dapat menyebabkan sensitisasi dengan cara mengeluarkan enzim

proteolitik yang diperlukan untuk penetrasi jaringan dengan menggunakan *boring tooth* (Fukuda *et al.*, 1990) dan melepaskan protein eksresi-sekresi yaitu tropomyosin yang disimpan dalam kelenjar eksretori parasit (*excretory gland*) (Gomez-aguado *et al.*, 2003), ventrikulus dan permukaan luminal dari epitel usus parasit (Caballero *et al.*, 2008) yang memiliki sifat resistensi yang tinggi terhadap pemanasan dan digesti oleh enzim pepsin.

Larva *Anisakis* spp. dalam keadaan hidup seandainya terpotong sebagian atau sepertiga bagian tubuhnya, larva ini tetap mempertahankan invasinya pada jaringan gastrointestinal hingga bagian submukosa (Asami and Inoshita, 1967) namun kemungkinan untuk menginduksi produksi antibodi spesifik masih belum jelas.

Perlakuan pemanasan pada larva *Anisakis* spp. tidak dapat merusak ikatan IgE-protein tropomyosin yang memiliki berat molekul rendah yaitu 41kDa yang tahan terhadap panas dan berpotensi menyebabkan alergi (Moneo *et al.*, 2005).

Kesimpulan dari penelitian ini adalah Inokulasi larva *Anisakis* spp. baik dalam keadaan hidup maupun mati menimbulkan perubahan gambaran histology pada usus berupa infiltrasi sel radang, perubahan epitel dan perubahan struktur mukosa pada usus. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui apakah terdapat produk respon imun yang mungkin berkontribusi terhadap terjadinya kerusakan pada usus yang diinokulasi larva *Anisakis* spp.

Kesimpulan

Hasil penelitian menyimpulkan bahwa inokulasi larva *Anisakis* spp. baik dalam keadaan hidup maupun mati menimbulkan perubahan

gambaran histologi pada usus berupa infiltrasi sel radang, perubahan epitel dan perubahan struktur mukosa pada usus.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terimakasih sebesar-besarnya kepada Allah SWT, orang tua Achmad Effendi A.Ma dan ibunda tercinta Suyanti serta adik Achmad Zulkifli dan Achmad Thoriq Ivanda yang selalu memberikan dukungan dan semangat serta bantuan doa dan materiil. Semua staff dan karyawan di Lab Patologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga yang telah mengerjakan preparat untuk pewarnaan HE.

Daftar Pustaka

- Asami K and Inoshita Y (1967) Experimental anisakiasis in guinea pigs: Factors influencing infection of larvae in the host. *Japanese J of Parasitol* 16: 415–422.
- Audicana, T.M and Kennedy, M.W. 2008. *Anisakis simplex*: from obscure infectious worm to inducer of immune hypersensitivity. *Clin Microbiol Rev.* 21(2):360-379.
- Buzzell, G.R and Sommerville, R.I (1985) The structure of the oesophagus in the third-stage infective larva of *Anisakis* sp. (Nematoda: Anisakidae). *Trans Am Microsc Soc.* 104: 86-94.
- Caballero, M.L and Moneo, I (2004) Several allergens from *Anisakis simplex* are highly resistant to heat and pepsin treatments. *Parasitol Res.* 15:1-7.
- Caballero, M.L. Moneo, I. Gomez-Aguado, F. Corcuera, M.T. Casado, I and Rodriguez- Perez, R (2008) Isolation of *Anisakis* s 5, an excretory-secretory and highly heat-resistant allergen useful for the diagnosis of *Anisakis* larvae sensitization. *Parasitol Res.* 103(5):1231-1233.
- Daschner, A. Cuéllar, C and Rodero, M., 2012. The *Anisakis* allergy debate: does an evolutionar-

- yapproach help? *Trends Parasitol.*28:9–15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2011.10.001>. Diakses pada tanggal 7 Agustus 2016.
- Erben, U. Loddenkemper, C. Doerfel, K. Spieckermann, S. Haller, D. Heimesaat, M.M. Zeitz, M. Siegmund, B and Kühl, A.A (2014) A guide to histomorphological evaluation of intestinal inflammation in mouse models. *Int J Clin Exp Pathol.* 7(8):4557-4576.
- Fukuda T, Tongu Y and Ishii A (1990) Ultrastructural changes in the oesophagus, intestine, and excretory organ of larval *Anisakis* (Ascaridoidea: Nematoda) after incubation in artificial gastric juice. *Jpn J Parasitol* 39: 1-6.
- Gomez-Aguado, F. Picazo, A. Caballero, M.L. Moneo, I. Asturias, J.A and Corcuera, M.T (2003) Ultrastructural localization of *Anisakis simplex*, a major allergen from the fish parasite *Anisakis simplex*. *Parasitol Res.* 89:379–380.
- Hariyadi, A.S (2006) Pemetaan infestasi cacing parasitik dan risiko zoonosis pada ikan laut di perairan Indonesia Bagian Selatan. Bogor. IPB.
- Iglesias, L. Valero, A. Banitez, R. and Adroher, F.J (2001) In vitro cultivation of *Anisakis simplex*: pepsin increases survival and moulting from fourth larval to adult stage. *Parasitol.* 123:285-291.
- Lindqvist, A. Ikezawa, Z. Tanaka, A and Yman, L (1993) Seafood specific IgE in atopic dermatitis. *Ann Allergy.* 70:58.
- Mattiucci, S. Paoletti, M. Borrini, F. Palumbo, M. Palmieri, R.M and Gomes, V (2011) First molecular identification of the zoonotic parasite *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in a paraffin-embedded granuloma taken from a case of human intestinal anisakiasis in Italy. *BMC Infect Dis.* 11:82.
- Mattiucci, S. Fazii, P. De Rosa, A. Paoletti, M. Megna, A. S. Glielmo, A. De Angelis, M. Costa, A. Meucci, C. Calvaruso, V. Sorrentini, I. Palma, G. Bruschi, F and Nascetti, G (2013) Anisakiasis and gastroallergic reactions associated with *Anisakis pegreffii* infection, Italy. *Emerg Infect Dis.* 19:496-499.
- Moneo, I. Caballero, M.L. Gonzalez-Munoz, M. Rodriguez-Mahillo, A.I. Rodriguez-Perez, R and Silva, A (2005) Isolation of a heat-resistant allergen from the fish parasite *Anisakis simplex*. *Parasitol Res.*96: 285-289.
- Oshima, T (1972) Anisakis and Anisakiasis in Japan and adjacent areas. *Prog Med Parasitol Jpn.* 4:305-393.
- Raharjo, H.M (2016) Pengaruh Waktu Preservasi Fillet Ikan Kerapu (*Epinephelus* sp) Dengan Pemanasan, Pendinginan dan Pengaraman Terhadap Daya Tahan Hidup Larva Anisakidae. Tesis. Magister Ilmu Penyakit dan Kesehatan Masyarakat Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

Perlakuan Celup Puting setelah Pemerahan terhadap Keberadaan Bakteri Patogen, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, dan *E. coli* pada Sapi Perah Penderita Mastitis Subklinis di Peternakan KUNAK Bogor

Teat Dipping Treatment after Milking Process to The Presence of Pathogenic Bacteria, Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae, and E. coli in Dairy Cattle with positive Subclinical Mastitis at Kunak Bogor

Herwin Pisestyani¹, Etih Sudarnika¹, Rachmi Ramadhanita², Abdul Zahid Ilyas¹, Ardilasunu Wicaksono¹, Chaerul Basri¹, Arifin Budiman Nugraha³, Mirnawati B. Sudarwanto¹

¹Divisi Kesehatan Masyarakat Veteriner, Departemen Ilmu Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

²Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

³Divisi Parasitologi Entomologi Kedokteran, Departemen Ilmu Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

Jl. Agatis Kampus IPB Darmaga Bogor 16680

Email: herwinpi@gmail.com

Abstract

Mastitis is udder inflammation that can be caused by the entry of pathogenic bacteria through the teat. One of the treatments that can prevent bacteria infection is teat dipping. This research was aimed to identify the effect of teat dipping after milking to the presence of pathogenic bacteria that cause subclinical mastitis (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, and *Escherichia coli*) and the presence of pathogenic bacteria that cause subclinical mastitis by quarter of udder. Milk samples were taken from normal lactation period of dairy cows, clinically healthy, and positive subclinical mastitis status when the intervention was applied. Sixty seven samples of quarters from 18 dairy cows were identified to the presence of pathogenic bacteria that cause subclinical mastitis before teat dipping and at 1st, 2nd, and 3rd months after teat dipping. Identification of the presence of pathogenic bacteria was done by culturing samples on selective agar media. The presence of common pathogenic bacteria, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli* decreased significantly after teat dipping, while *Streptococcus agalactiae* and other pathogenic bacteria did not decrease significantly. The presence of pathogenic bacteria based on the quarter of udder did not show the significance difference. Application of teat dipping after milking was able to decrease the presence of pathogenic bacteria that cause subclinical mastitis.

Keywords: pathogenic bacteria, subclinical mastitis, teat dipping

Abstrak

Mastitis merupakan peradangan ambung yang dapat disebabkan oleh masuknya bakteri melalui lubang puting. Salah satu kegiatan yang dapat mencegah infeksi bakteri ke dalam jaringan internal ambung adalah celup puting setelah pemerahan. Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi pengaruh celup puting setelah pemerahan terhadap keberadaan bakteri patogen, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, dan *Escherichia coli* pada sapi perah positif mastitis subklinis serta menganalisa keberadaan bakteri tersebut berdasarkan posisi puting. Sampel susu yang digunakan berasal dari sapi perah dalam masa laktasi normal, sehat secara klinis, dan positif menderita mastitis subklinis sebelum diberi perlakuan celup puting. Sejumlah 67 sampel kuartir dari 18 ekor sapi perah diidentifikasi terhadap keberadaan bakteri patogen, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, dan *E. coli*

sebelum perlakuan celup puting dan pada bulan ke-1, ke-2, dan ke-3 setelah perlakuan celup puting. Keberadaan bakteri patogen diidentifikasi dengan cara melihat zona hemolisa pada media agar darah, sedangkan bakteri lainnya dibiakkan pada media agar selektif sesuai dengan jenis bakteri yang akan diidentifikasi. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa keberadaan bakteri patogen, *Staphylococcus aureus*, dan *Escherichia coli* mengalami penurunan yang nyata setelah diberi perlakuan celup puting, sedangkan *Streptococcus agalactiae* tidak mengalami penurunan yang nyata. Posisi puting tidak berpengaruh terhadap keberadaan bakteri patogen, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, dan *E. coli*. Simpulan dari penelitian ini adalah aplikasi celup puting setelah pemerahan dapat mengurangi keberadaan bakteri patogen pada sapi perah penderita mastitis subklinis.

Kata kunci: bakteri patogen, celup puting, mastitis subklinis

Pendahuluan

Susu merupakan bahan makanan yang mengandung nutrisi penting sehingga sangat baik untuk dikonsumsi masyarakat, namun produksi susu di Indonesia masih kurang maksimal sehingga belum mampu memenuhi kebutuhan konsumsi susu dalam negeri. Indonesia mengimpor susu sebanyak 900.000 ton atau 70% dari kebutuhan nasional pada tahun 2012 (DITJENNAK KESWAN, 2013). Kawasan Usaha Peternakan (KUNAK) Bogor memiliki target produksi susu sebanyak 20.000 liter/hari pada tahun 2013, namun sampai akhir tahun 2013 kawasan ini hanya mampu mencapai 40% dari target yakni 8.000 liter/hari (GKSI, 2013). Banyak faktor yang menyebabkan produksi susu kurang maksimal, salah satunya penyakit yang sering dialami oleh ternak perah yaitu radang ambing atau yang dikenal sebagai mastitis. Saat ini mastitis masih menjadi masalah utama yang terjadi di peternakan rakyat (Nurhayati & Martindah, 2014).

Mastitis merupakan peradangan pada jaringan internal ambing (Subronto, 2003). Secara ekonomi, mastitis sangat merugikan peternak karena dapat menurunkan produksi susu. Prevalensi mastitis pada sapi perah di Indonesia sangat tinggi (85%) dan sebagian besar merupakan infeksi yang bersifat subklinis (Poeloengan, 2010). Mastitis subklinis tidak menampakkan gejala klinis sehingga sering tidak disadari oleh peternak. Penyebab terjadinya

mastitis diantaranya yaitu kuman patogen (infeksius) seperti bakteri dan virus; kerusakan fisik ambing (*udder and teat injury*); serta paparan bahan kimia iritan yang mampu merusak jaringan interna ambing, namun sebagian besar kejadian mastitis disebabkan oleh bakteri. Bakteri yang dapat menyebabkan mastitis diantaranya yaitu *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Escherichia freundii*, *Aerobacter aerogenes*, dan *Klebsiella pneumoniae* (Poeloengan, 2010). Menurut penelitian-penelitian sebelumnya, bakteri penyebab mastitis yang paling sering ditemukan yaitu *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus epidermidis*, dan *Escherichia coli*, sehingga efektivitas upaya pengendalian mastitis terhadap keberadaan bakteri-bakteri tersebut penting untuk dipelajari. Keberadaan mikroba patogen penyebab mastitis dapat berbeda untuk setiap puting pada seekor sapi terkait dengan kontak puting terhadap alas kandang dan urutan puting yang diperah.

Proses penularan agen penyebab mastitis dapat terjadi pada saat pemerahan susu secara manual melalui tangan pemerah, air yang dipakai untuk membersihkan ambing, kain lap atau peralatan lain yang dipakai pada saat pemerahan (Supar dan Ariyanti, 2008). Mikroba yang menyebabkan terjadinya mastitis dapat berasal dari luar ambing

yang masuk melalui puting saat proses pemerahan ataupun setelah proses pemerahan saat kondisi lubang puting masih terbuka. Salah satu kegiatan setelah pemerahan yang dapat menurunkan kejadian mastitis adalah celup puting (Putri dkk., 2015). Tindakan celup puting dengan menggunakan antiseptik bertujuan untuk mencegah masuknya bakteri ke dalam ambung melalui lubang puting. Larutan yang umum digunakan untuk celup puting yaitu *Iodine*, *Chlorhexidine*, *Chlorin 4%*, dan alkohol 70% (Siregar, 2010).

Efektivitas aplikasi celup puting untuk mengurangi keberadaan bakteri patogen penyebab mastitis subklinis belum banyak diteliti sehingga perlu dilakukan penelitian untuk mengidentifikasi pengaruh aplikasi celup puting terhadap keberadaan bakteri patogen penyebab mastitis subklinis baik secara keseluruhan maupun berdasarkan posisi puting. Penelitian ini bertujuan mengkaji pengaruh aplikasi celup puting setelah pemerahan terhadap keberadaan bakteri patogen, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, dan *Escherichia coli*, serta menganalisa keberadaan bakteri tersebut berdasarkan posisi puting perah di Kawasan Usaha Peternakan (KUNAK) Kecamatan Cibungbulang Kabupaten Bogor.

Materi dan Metode

Pengambilan sampel dilakukan di Kawasan Usaha Ternak (KUNAK) Kecamatan Cibungbulang Kabupaten Bogor. Penelitian ini diawali dengan memilih peternak yang mempunyai sapi dalam masa laktasi normal, sehat secara klinis, dan positif mastitis subklinis sebelum diberi perlakuan celup puting. Masa laktasi normal pada sapi perah adalah bulan ke-3 sampai bulan ke-5 *postpartus* saat sapi perah

sedang memproduksi susu. Pemilihan sapi perah yang berada dalam masa laktasi normal dilakukan untuk mencegah terjadinya hasil uji positif palsu terhadap pengujian mastitis subklinis yang dapat disebabkan oleh kondisi fisiologis normal ternak, yaitu pada masa awal laktasi dan akhir laktasi. Pengujian mastitis subklinis dilakukan menggunakan pereaksi IPB-1. Pereaksi IPB-1 akan bereaksi dengan DNA dari inti sel somatis pada susu yang berasal dari sapi yang menderita mastitis subklinis, sehingga terbentuk massa kental seperti gelatin (Sudarwanto, 1998). Berdasarkan hasil pemilihan tersebut, diperoleh 18 ekor sapi dengan jumlah puting sebanyak 67 kuartir yang digunakan dalam penelitian.

Peternak yang memiliki sapi yang dijadikan sampel penelitian, diberi penyuluhan dan diberi bantuan alat celup puting (*teat dipper*) serta larutan antiseptik. Penyuluhan yang diberikan meliputi pengetahuan tentang mastitis subklinis dan kualitas susu serta proses dan waktu perlakuan celup puting. Pencelupan puting dilakukan setelah pemerahan oleh peternak di kandang masing-masing dengan cara mencelupkan puting ke dalam *teat dipper* yang berisi larutan antiseptik selama 5-10 detik untuk setiap puting. Perlakuan celup puting diberikan selama 3 bulan pengamatan, yaitu pada saat sapi perlakuan masih berada dalam rentang masa laktasi normal, sehingga mencegah terjadinya kesalahan pembacaan hasil uji mastitis subklinis. Pengambilan dan pengujian sampel dilakukan sebelum perlakuan celup puting (bulan ke-0) dan pada bulan ke-1, ke-2, dan ke-3 setelah perlakuan celup puting.

Proses pengambilan sampel diawali dengan membersihkan ambung sapi yang akan diperah dengan air bersih lalu dilap, susu pancaran pertama dibuang dan pancaran selanjutnya diambil sebanyak 10 ml dari setiap kuartir dan ditampung dalam botol sampel

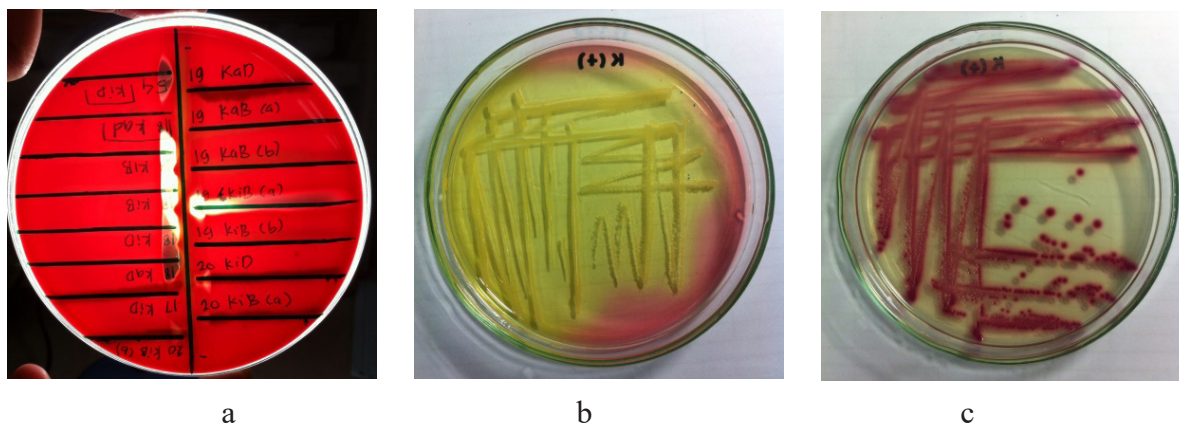
yang telah diberi kode, kemudian botol ditutup rapat dan disimpan ke dalam *cool box* dengan suhu ± 4 °C.

Alat yang digunakan pada tahap pengambilan sampel yaitu botol sampel yang telah diberi kode, lap bersih, *ice pack*, dan *cool box*. Alat yang digunakan pada tahap pengujian di laboratorium yaitu pembakar bunsen, vortex, ose, inkubator serta cawan petri yang telah diberi kode sampel dan diisi media. Selain itu, digunakan pula *paddle* untuk uji IPB Mastitis dan alat untuk celup puting (*teat dipper*). Bahan yang digunakan adalah pereaksi IPB-1, alkohol 70%, *povidone iodine* 1% dan gliserin 10%, sampel susu, *Blood Agar Base* (Oxoid® CM0055), *Mannitol Salt Agar* (Oxoid® CM0085), dan *Coliform Selective Medium* (Oxoid® CM1046).

Prosedur Identifikasi Keberadaan Bakteri

Sampel susu kuartir digores sebanyak 1 ose pada masing-masing media agar. Media *Blood Agar* untuk mengidentifikasi keberadaan bakteri patogen, *Mannitol Salt Agar* untuk mengidentifikasi keberadaan *S. aureus*, serta *Coliform Selective Medium* untuk mengidentifikasi keberadaan *E. coli*. Masing-masing biakkan diinkubasikan selama 20-24 jam pada suhu 35-37 °C. Keberadaan bakteri patogen yang tumbuh

pada *Blood Agar* diidentifikasi dengan mengamati terbentuknya zona hemolisa (bening) di sekeliling koloni bakteri. Koloni yang diduga *S. agalactiae* yaitu membentuk hemolisis tidak sempurna (hemolisis alpha) dilanjutkan dengan uji CAMP (*Christie, Atkins, Munch-Peterson*). Uji CAMP dilakukan pada *Blood Agar* dengan bakteri *S. aureus* sebagai penanda kemudian diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37 °C. Setelah inkubasi, koloni *S. agalactiae* akan memperlihatkan hasil uji positif yang ditunjukkan dengan terjadinya zona hemolisis berbentuk mata anak panah di sebelah goresan *S. aureus* (Gambar 1a). Media *Mannitol Salt Agar* merupakan media selektif bagi pertumbuhan *S. aureus* yang dapat membedakan dengan spesies *Staphylococcus* lainnya. *S. aureus* ditunjukkan dengan tumbuhnya koloni berwarna kuning dan media agar berubah dari warna merah menjadi kuning (Gambar 1b) sedangkan bakteri *Staphylococcus sp* lainnya membentuk koloni berwarna merah muda. Media *Coliform Selective Medium* digunakan untuk membedakan *E. coli* dengan jenis bakteri koliform yang lain. *E. coli* akan membentuk koloni berwarna ungu (Gambar 1c) sedangkan bakteri koliform yang lain akan membentuk koloni berwarna merah muda, biru ataupun tidak berwarna.



Gambar 1. (a) hasil positif uji CAMP (b) kontrol positif *S. aureus* pada media *Mannitol Salt Agar* (c) kontrol positif *E. coli* pada media *Coliform Selective Medium*

Keberadaan bakteri dihitung dengan menjumlahkan bakteri yang dapat tumbuh pada masing-masing media (positif), sedangkan yang tidak tumbuh maka dinyatakan negatif.

Analisis Data

Data dianalisis dengan uji khi-kuadrat dengan tingkat kepercayaan 95% untuk mengetahui perbedaan persentase puting yang terinfeksi bakteri patogen pada setiap bulan pengamatan, dan perbedaan persentase puting yang terinfeksi bakteri pathogen menurut posisi puting.

Hasil dan Pembahasan

Keberadaan Bakteri Patogen Penyebab Mastitis Subklinis setelah Aplikasi Celup Puting

Keberadaan bakteri patogen penyebab mastitis subklinis dapat bersifat kompleks, artinya beberapa jenis bakteri patogen dapat berada pada puting yang sama. Aplikasi celup puting menggunakan larutan *povidone iodine* 1% dan gliserin 10% secara umum dapat menurunkan keberadaan bakteri patogen penyebab mastitis subklinis, namun penurunan yang terjadi tidak merata pada semua jenis bakteri.

Berdasarkan Tabel 1, keberadaan bakteri patogen, *S. aureus*, dan *E. coli* mengalami penurunan yang nyata setelah diberi perlakuan celup puting, sedangkan *S. agalactiae* tidak mengalami penurunan yang nyata. Keduanya hanya mengalami penurunan pada bulan ke-2 setelah diberi perlakuan celup puting.

Povidone iodine mempunyai spektrum luas dan merupakan *iodine* kompleks yang berfungsi sebagai antiseptik yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba yang ada di dalam atau di atas jaringan hidup (Brooks dkk., 2008). Aplikasi celup puting menggunakan *povidone iodine* dapat menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara melapisi lubang puting, sehingga mikroba yang masuk ke dalam lubang puting terlapisi oleh zat iodium yang dapat merusak dinding sel bakteri bagian luar dan membran sel, kemudian menembus sitoplasma sampai ke inti sel dengan merusak metabolisme sel mikroba sehingga perkembangbiakan bakteri akan terhambat sampai akhirnya bakteri mati (Mahardhika dkk., 2012). Penggunaan *povidone iodine* adalah solusi sederhana dan ekonomis untuk mengurangi infeksi. Penurunan yang nyata pada keberadaan bakteri patogen, *S. aureus*, dan *E. coli* menunjukkan bahwa *povidone iodine* efektif untuk menurunkan keberadaan bakteri-bakteri tersebut.

Tabel 1. Persentase puting yang terinfeksi bakteri patogen penyebab mastitis subklinis karena perlakuan celup puting pada setiap bulan pengamatan

Jenis bakteri	Persentase puting yang terinfeksi (%) (Selang kepercayaan 95%)				χ^2	P
	Bulan ke-0 (n=67)	Bulan ke-1 (n=67)	Bulan ke-2 (n=67)	Bulan ke-3 (n=65)		
Bakteri patogen	97 (90-99)	87 (76-93)	63 (51-73)	34 (24-46)	74.625	<0.0001*
<i>S. agalactiae</i>	16 (9-27)	13 (7-24)	9 (4-18)	9 (4-18)	2.423	0.4893
<i>S. aureus</i>	75 (63-84)	55 (43-67)	39 (28-51)	23 (15-35)	38.868	<0.0001*
<i>E. coli</i>	52 (40-64)	30 (20-42)	13 (7-24)	8 (3-17)	41.376	<0.0001*

* Menunjukkan perbedaan yang nyata pada P<0.05

Penurunan yang terjadi tidak merata pada semua jenis bakteri, meskipun *povidone iodine* merupakan antiseptik yang memiliki spektrum luas. Hal tersebut dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, salah satunya adalah faktor patogenitas dari bakteri yang dapat mempengaruhi efektivitas *povidone iodine* (Connors, 1992). Selain itu, sanitasi kandang yang buruk dapat menurunkan efektivitas perlakuan celup puting dalam menurunkan keberadaan bakteri. Proses sanitasi kandang di KUNAK sangat bergantung pada ketersediaan air. Kondisi wilayah kandang mengalami kekeringan pada bulan ke-3 karena memasuki musim kemarau sehingga sanitasi kandang tidak terjaga dengan baik. Keberadaan *S. agalactiae* tidak mengalami penurunan pada bulan tersebut, hal ini dapat terjadi karena *S. agalactiae* tahan pada kondisi lingkungan yang kering (Ryan and Ray, 2004). Selain itu, *S. agalactiae* memiliki kapsul polisakarida yang menjadi faktor patogenitas sehingga *S. agalactiae* dapat lebih tahan terhadap pemberian antiseptik, terlebih pada kondisi lingkungan yang mendukung keberadaan bakteri tersebut seperti kondisi sanitasi yang buruk pada bulan ke-3. Menurut Songer and Post (2005), pengendalian infeksi *S. agalactiae* pada kasus mastitis subklinis lebih efektif menggunakan injeksi antibiotik intramamari pada periode kering kandang. Keberadaan bakteri patogen selain yang

diidentifikasi juga tidak mengalami penurunan pada bulan ke-3 diduga terkait dengan kondisi sanitasi kandang yang buruk.

E. coli merupakan bakteri yang keberadaannya sangat terkait dengan sanitasi yang buruk, namun *E. coli* tetap mengalami penurunan meskipun pada bulan ke-3 kondisi sanitasi kandang tidak terjaga. *E. coli* memiliki banyak serotipe dengan tingkat patogenitas yang berbeda-beda. *E. coli* yang terdapat pada kasus mastitis subklinis merupakan serotipe yang menyerupai *E. coli* dalam usus sehingga pengendaliannya cukup efektif dengan menggunakan antiseptik spektrum luas (White, 2006). Efektivitas *povidone iodine* terhadap keberadaan *E. coli* cukup tinggi sehingga dapat menurunkan keberadaan bakteri tersebut meskipun pada keadaan kondisi sanitasi kandang yang buruk.

Keberadaan Bakteri Patogen Penyebab Mastitis Subklinis berdasarkan Posisi Puting

Asosiasi keberadaan bakteri patogen terhadap posisi puting diteliti dengan menguji keberadaan bakteri pada sampel susu dari setiap kuartir pada pengamatan bulan ke-0 (sebelum perlakuan) sampai dengan bulan ke-3 setelah perlakuan, sehingga diperoleh besaran sampel untuk setiap posisi puting seperti tertera pada Tabel 2.

Tabel 2 Persentase puting yang terinfeksi bakteri patogen penyebab mastitis subklinis berdasarkan posisi puting pada perlakuan celup puting

Posisi puting	Jumlah pengamatan (n)	Persentase puting yang terinfeksi (%) (Selang kepercayaan 95%)	χ^2	P
Kanan depan	60	58 (43-71)	2.372	0.4988
Kiri depan	68	69 (55-80)		
Kanan belakang	64	64 (50-75)		
Kiri belakang	68	55 (41-68)		

Bakteri patogen penyebab mastitis subklinis yang masuk ke dalam ambing melalui lubang puting dapat berasal dari lingkungan kandang sehingga kontak tubuh sapi dengan alas kandang dapat mempengaruhi keberadaan bakteri tersebut. Posisi rumen sapi yang berada di bagian tubuh sebelah kiri menyebabkan sapi lebih nyaman berbaring ke sebelah kanan pada saat ruminansi agar tidak menekan rumen. Selain itu, posisi jantung yang berada di sebelah kiri juga menyebabkan sapi lebih nyaman berbaring ke sebelah kanan pada saat istirahat karena posisi berbaring ke sebelah kanan dapat menurunkan tekanan darah sehingga dapat meningkatkan kualitas istirahat (Muttaqin, 2009).

Kecenderungan sapi berbaring ke sebelah kanan menyebabkan puting sebelah kanan lebih sering berkontak dengan alas kandang termasuk pada saat kondisi alas kandang belum dibersihkan, sehingga dapat meningkatkan risiko penularan bakteri patogen penyebab mastitis subklinis yang berasal dari lingkungan kandang. Namun, berdasarkan hasil penelitian ini keberadaan bakteri patogen berdasarkan posisi puting tidak memiliki perbedaan yang nyata, yang ditunjukkan oleh hasil uji khi-kuadrat dengan nilai $P > 0.05$ (Tabel 2). Hal tersebut dapat disebabkan karena identifikasi keberadaan bakteri patogen berdasarkan posisi puting dilakukan sebelum dan selama diberikan perlakuan celup puting, sehingga dapat menurunkan risiko masuknya bakteri melalui lubang puting.

Tidak terlihatnya perbedaan yang nyata terhadap keberadaan bakteri patogen berdasarkan posisi puting juga dapat disebabkan karena bakteri patogen tersebut dapat menular dari satu puting ke puting yang lain melalui tangan pemerah. Pemerah umumnya mencuci tangan setiap akan melakukan

pemerahan pada sapi yang berbeda, namun pemerah biasanya tidak mencuci tangan kembali saat melakukan pemerahan dari satu puting ke puting lainnya pada seekor sapi. Hal tersebut dapat meningkatkan risiko penularan bakteri patogen penyebab mastitis subklinis pada puting yang terakhir diperah.

Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah keberadaan bakteri patogen, *Staphylococcus aureus*, dan *Escherichia coli* mengalami penurunan yang nyata setelah diberi perlakuan celup puting, sedangkan, *Streptococcus agalactiae* tidak mengalami penurunan yang nyata. Keberadaan bakteri patogen tidak dipengaruhi oleh posisi puting.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih disampaikan kepada Dirjen Dikti yang telah mendanai penelitian ini melalui Penelitian Strategis Unggulan IPB dengan skim Penelitian Unggulan sesuai Mandat Divisi, Institut Pertanian Bogor, Dana DIPA IPB tahun anggaran 2015 nomor 571/IT3.11/PL/2015.

Daftar Pustaka

- Brooks, G. F., Butel, J. S., Morse, S. A. (2008). Mikrobiologi Kedokteran. Ed ke-23. Nugroho, E., Maulany, penerjemah.. Terjemahan dari: *Medical Microbiology*. EGC. Jakarta. Indonesia: 544 hlm.
- Connors, K. A. (1992). Stabilitas Kimiawi Sediaan Farmasi. Ed ke-2. Gunawan, D., penerjemah. Terjemahan dari: *Chemical Stability Pharmaceuticals*. IKIP Semarang Press. Semarang. Indonesia: hlm 268.

- [DITJENNAK KESWAN] Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan. (2013). Statistik Peternakan Tahun 2012. Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan. Jakarta. Indonesia.
- [GKSI] Gabungan Koperasi Susu Indonesia. (2013). Profil Koperasi Primer. <http://gksijawabarat.co.id/>. Diakses pada tanggal 21 Februari 2016.
- Mahardhika, O., Sudjatmogo, Suprayogi, T. H. (2012). Tampilan total bakteri dan pH pada susu kambing perah akibat *dipping* desinfektan yang berbeda [Total bacteria and pH of goat milk with various udder dipping methods]. *Anim. Agric. J.* 1(1):819-828.
- Muttaqin, A. (2009). Asuhan Keperawatan Klien dengan Gangguan Sistem Kardiovaskular. Nurachmach E, editor. Salemba Medika. Jakarta. Indonesia: 20.
- Nurhayati, I., Martindah, E. 2015. Pengendalian mastitis subklinis melalui pemberian antibiotik saat periode kering pada sapi perah. *Wartazoa.* 25(2): 65-74.
- Poeloengan, M. (2010). Aktivitas Air Perasan dan Ekstrak Etanol Daun Encok terhadap Bakteri yang Diisolasi dari Sapi Mastitis Subklinis [Activity water extract and ethanol extraction of *Plumbago Zeylanica* L. leaves against bacteria isolated from sub clinical mastitis in cattle]. Di dalam: Sani, Y., Natalia, L., Brahmantiyo, B., Pujiastuti, W., Sartika, T., Nurhayati, Anggraeni, A., Matondang, R.H., Martindah, E., Estuningsih, S.E., editor. *Teknologi Peternakan dan Veteriner mendukung Industrialisasi Sistem Pertanian untuk Meningkatkan Ketahanan Pangan dan Kesejahteraan Peternak. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner; 2009 Agu 13-14; Bogor, Indonesia.* Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan. Bogor: 300-305.
- Putri, P., Sudjatmogo, Suprayogi, T. H. (2015). Pengaruh lama waktu *dipping* dengan menggunakan larutan kaporit terhadap tampilan total bakteri dan derajat keasaman susu sapi perah [The effect of durations time of dipping with kaporit on total bacteria and pH of dairy cows milk]. *Anim. Agric. J.* 4(1):132-136.
- Ryan, K. J. and Ray, C.G. (2004). *Sherris Medical Microbiology*. 4th ed. McGraw-Hill. Boston. USA: 273-296.
- Siregar, A. Z. 2010. Pengaruh celup puting sari buah mengkudu (*Morinda Citrifolia* L) terhadap kasus mastitis subklinis pada sapi perah berdasarkan pemeriksaan *total plate count*. <http://www.fkh.unair.ac.id/artikel11/2010/ARTIKEL%20ILMIAH%20A.pdf>. [3 Februari 2015].
- Songer, J. G. and Post, K.W. (2005). *Veterinary Microbiology Bacterial and Fungal Agents of Animal Disease*. Elsevier Saunders. Philadelphia. USA: 448 p.
- Subronto. (2003). Ilmu Penyakit Ternak I. Gajah Mada Univ. Press. Yogyakarta. Indonesia: 701 hlm.
- Sudarwanto, M.B. (1998). Pereaksi IPB-1 sebagai pereaksi alternatif untuk mendeteksi mastitis subklinis [The IPB-1 reagent as an alternative tool to detect subclinical mastitis]. *Med. Vet.* 5(1):1-5.
- Supar, Ariyanti, T. (2008). Kajian pengendalian mastitis subklinis pada sapi perah [Studies on subclinical mastitis control in the dairy cows]. Di dalam: Diwyanto, K., Wina, E., Priyanti, A., Natalia, L., Herawati, T., Purwandaya, B., editor. *Semiloka Nasional Prospek Industri Sapi Perah Menuju Perdagangan Bebas 2020; 2008 Apr 21; Jakarta, Indonesia.* Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan. Bogor. Indonesia: hlm 360-366.
- White, D.G. (2006). Antimicrobial resistance in pathogenic *Escherichia coli* from animals. Di dalam: Aarestrup, F.M, editor. *Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin*. Am. Soc. for Microbiol. Press. Washington DC. USA: hlm 145-166.

Pengendalian Folikulogenesis Ovarium dengan Pemberian Ekstrak Biji Kapas

Folliculogenesis Control in Ovarian with the Cottonseed Extract

Siska Adelya Ramadhani¹, Iman Supriatna^{1,2}, Ni Wayan Kurniani Karja², Adi Winarto³

¹Program Studi Biologi Reproduksi, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor

²Departemen Klinik Reproduksi dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

³Departemen Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

Jl. Agatis Kampus IPB Dramaga Bogor, 16680

Email : iman_sprtn@yahoo.com

Abstract

Gosipol is a substances contained in extracted cotton seed which is thought to have the antifertility ability therefore it is often used as a herbal contraceptive. The aim of this study were to assess the folliculogenesis in mice after administrated with cottonseed extract. 60 female mice strain DDY which was 14-15 weeks old and 30-35 g body weight were divided into five groups and given cottonseed extract each 0; 1,5; 2,1 and 2,7 g/kg BW for 5, 10, 15, 24, and 24 + 10 days (without cottonseed treatment). At the end of the treatment period, mice was euthanasia to observe follicular development histomorphology (each three mice of each treatment). Mice estrous status were evaluated based on the description of the vaginal smear cells with Giemsa staining. The results showed that the number of developing follicles was low ($P < 0.05$) compared with control after 5 days cottonseed extract administration at dose 2,7 g/kg BW that were $23 \pm 3,6$. At dose 1,5 and 2,1 g/kg BW the number of follicles was low after 24 days that were $25 \pm 10,4$ and $27 \pm 3,5$. Recovery effects of follicle number after cottonseed extract administration for 24 days was the best at a dose of 1,5 g/kg BW. Prolonge of estrous cycle ocured in mice which were administrated the cottonseed extract of at all dose treatment. In conclusion, although the decrease in the number of developing follicles and prolonge of estrous cycles occurred after cottonseed extract administration, but these effects are reversible after the administration ended.

Keywords: antifertility, cotton seed, folliculogenesis, gossypol

Abstrak

Gosipol adalah zat yang terkandung dalam ekstrak biji kapas dan diduga mempunyai kemampuan antifertilitas sehingga sering digunakan sebagai bahan herbal kontrasepsi. Penelitian ini bertujuan mengkaji gambaran folikulogenesis pada mencit yang diberi ekstrak biji kapas. Sebanyak 60 ekor induk mencit betina strain DDY berumur 14-15 minggu dengan bobot badan 30-35 g dibagi menjadi 4 kelompok dan diberi ekstrak biji kapas masing-masing 0; 1,5; 2,1 dan 2,7 g/kg BB selama 5, 10, 15, 24 dan 24 + 10 hari (tanpa pemberian ekstrak biji kapas). Pada setiap akhir waktu pengamatan, mencit di-euthanasia untuk mengamati histomorfologi perkembangan folikel (masing-masing tiga ekor dari tiap perlakuan). Status estrus mencit dievaluasi berdasarkan gambaran sel dari ulas vagina dengan pewarnaan Giemsa. Hasil penelitian menunjukkan bahwa jumlah folikel rendah ($P < 0,05$) dibandingkan dengan kontrol setelah 5 hari pemberian ekstrak biji kapas dengan dosis 2,7 g/kg BB yaitu $23 \pm 3,6$. Pada dosis 1,5 dan 2,1 g/kg BB jumlah folikel menjadi rendah setelah 24 hari yaitu $25 \pm 10,4$; $27 \pm 3,5$. Efek pemulihan jumlah folikel setelah pemberian ekstrak biji kapas selama 24 hari paling baik pada dosis 1,5 g/kg BB. Pemanjangan siklus estrus terjadi pada mencit yang diberi ekstrak biji kapas pada semua dosis perlakuan. Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa walaupun terjadi penurunan jumlah folikel yang berkembang dan terjadi pemanjangan siklus estrus setelah pemberian ekstrak biji kapas, tetapi efek tersebut bersifat *reversible* setelah pemberian dihentikan.

Kata kunci: antifertilitas, biji kapas, folikulogenesis, gosipol

Pendahuluan

Fertilitas merupakan kemampuan organ reproduksi untuk bekerja optimal dalam menjalankan fungsi fertilisasi. Pada betina, fertilitas berkaitan erat dengan folikulogenesis yaitu proses pertumbuhan dan perkembangan folikel yang terjadi di ovarium (Leung dan Adashi, 2004). Beberapa faktor dapat memengaruhi folikulogenesis seperti integrasi sinyal ekstraovarian dan intrafolikuler (Webb *et al.*, 2003), endokrinologi (Paris *et al.*, 2009), perkembangan gonad, serta kondisi nutrisi (Chavatte-Palmer *et al.*, 2014). Oleh karena itu, pengendalian folikulogenesis dapat dijadikan sebagai salah satu cara untuk mencegah terjadinya fertilisasi dan dapat digunakan sebagai salah satu metode kontrasepsi.

Banyak zat tumbuhan telah dipercaya mempunyai aktivitas sebagai antifertilitas sehingga sering digunakan sebagai bahan kontrasepsi. Salah satu tumbuhan yang mengandung zat antifertilitas adalah tanaman kapas karena memiliki kandungan zat aktif berupa gosipol (Singla dan Garg, 2013). Banyak penelitian telah dilakukan untuk mengkaji pengaruh pemberian ekstrak biji kapas untuk mengetahui pengaruhnya terhadap reproduksi pada hewan model. Pemberian gosipol secara oral sebanyak 30 mg/kgBB setiap hari selama lima minggu mampu menurunkan fertilitas (Singla dan Garg, 2013) tikus jantan tanpa menurunkan libido (Hadley *et al.*, 1981). Pemberian gosipol pada hewan jantan juga tidak memengaruhi laju pertumbuhan tikus, bobot testis, dan kelenjar aksesori seksual (White *et al.*, 1988), sedangkan pada betina, pemberian 25 mg/kg gosipol pada tikus betina menyebabkan ketidakteraturan siklus estrus lebih dari 75% (Lin *et al.*, 1985) serta memperpanjang durasi siklus estrus (Lagerlof dan Tone, 1985). Gosipol yang diinjeksikan secara intrauteri mampu memengaruhi

jumlah ovum yang terfertilisasi, implantasi embrio, perkembangan embrio, dan jumlah anak (Lin *et al.*, 1994a). Efek tersebut bersifat *reversible* apabila pemberian gosipol dihentikan (Gadelha *et al.*, 2014a). Penelitian pada sapi dilaporkan bahwa gosipol yang dicampur dalam pakan mengakibatkan folikel besar (>5 mm) pada ovarium relatif sedikit dibandingkan dengan yang diberi makan kedelai (Gadelha *et al.*, 2014a). Walaupun sudah banyak penelitian yang dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak biji kapas pada hewan coba, tetapi belum ditemukan laporan tentang pengaruh pemberian ekstrak biji kapas terhadap gambaran folikulogenesis. Oleh karena itu penelitian ini bertujuan mengkaji pengendalian folikulogenesis ovarium dan status siklus estrus mencit setelah pemberian ekstrak biji kapas.

Materi dan Metode

Ekstraksi Biji Kapas

Biji kapas diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Pemanis dan Serat (Balittas), Malang Provinsi Jawa Timur yang dikoleksi dari tanaman kapas umur 5 bulan. Biji kapas kering digerus kemudian disaring untuk mendapatkan serbuk simplisia. Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi (perendaman) yang dilanjutkan dengan evaporasi pada suhu 68 °C (Chandrashekar *et al.*, 2013).

Kajian pemberian ekstrak biji kapas terhadap gambaran folikulogenesis dengan histomorfologi

Hewan yang digunakan adalah 60 ekor mencit induk (*Mus musculus* L. DDY) umur 14 - 15 minggu dengan rata-rata berat badan 30 - 35 g.

Mencit diadaptasikan selama dua minggu dan diberi obat cacing (Combantrin®) 1,4 mg/kg BB. Mencit dipelihara secara kelompok di rumah sakit hewan pendidikan IPB (lima ekor mencit perkandang). Selama pemeliharaan mencit diberi 5 g pakan perhari berupa *pellet* (Indo Feed®) dan air minum diberikan secara *ad libitum*. Siklus pencahayaan diatur terang (06.00 - 18.00) dan gelap (18.00 - 6.00). Penggunaan hewan coba dalam penelitian ini sudah mendapatkan persetujuan dari Komisi Etik Hewan IPB nomor 15 – 2016 IPB.

Mencit dibagi menjadi empat kelompok (15 ekor setiap perlakuan) dan diberi ekstrak biji kapas dengan dosis 0; 1,5; 2,1 dan 2,7 g/kg BB selama 5 hari (D0-5; D1,5-5; D2,1-5 dan D2,7-5), 10 hari (D0-10; D1,5-10; D2,1-10 dan D2,7-10), 15 hari (D0-15; D1,5-15; D2,1-15 dan D2,7-15), dan 24 hari (D0-24; D1,5-24; D2,1-24 dan D2,7-24). Ekstrak biji kapas diberikan secara oral menggunakan *syringe* sonde dengan pelarut *carboxy methyl cellulose* (CMC) 0,2% pada fase proestrus dan didefinisikan sebagai hari pertama (H1) pemberian ekstrak biji kapas. Pada setiap akhir periode pemberian ekstrak biji kapas, mencit di-*euthanasia* untuk mengamati folikulogenesis berdasarkan gambaran histomorfologi perkembangan folikel (masing-masing 3 ekor dari tiap perlakuan). Sedangkan untuk sampel *reversible* diambil 10 hari setelah pemberian ekstrak biji kapas selama 24 hari dihentikan.

Pengamatan histomorfologi dilakukan dengan *euthanasia* mencit dengan metode *extinguish* secara *intracardial* setelah dianestesi dengan ketamin dan xylazin. Preparat histologi ovarium diwarnai dengan hematoxylin-eosin (HE). Folikulogenesis diamati dengan melihat jumlah folikel primer, sekunder, dan tersier (Myers *et al*, 2004) sesuai dengan klasifikasi

folikel pada ovarium mencit menurut Peters (1969). Folikel primordial ditandai dengan diameter oosit < 20 µm dan oosit mulai dikelilingi selapis sel epitel pipih. Folikel primer ditandai dengan diameter oosit > 20 µm dan oosit dikelilingi selapis sel epitel kuboid (sel granulosa) dan zona pelusida. Folikel sekunder ditandai dengan diameter oosit 70 µm dan oosit dikelilingi beberapa lapis sel granulosa, zona pelusida, sudah mulai ada antrum yang tersebar pada lapisan granulosa. Folikel tersier ditandai dengan diameter oosit 70 µm dan oosit dikelilingi beberapa lapis sel granulosa, zona pelusida, antrum yang tersebar berkembang menjadi satu kesatuan antrum.

Kajian siklus estrus mencit berdasarkan gambaran sel ulas vagina dengan pewarnaan Giemsa

Pengamatan terhadap siklus estrus dilakukan mulai dari hari pertama (H1) sampai hari pengambilan ovarium yaitu setelah hari ke-5,10, 15, 24 dan 34 pemberian ekstrak biji kapas. Ulas vagina dilakukan dengan bantuan *cottonbud* dan NaCl fisiologis yang diulas 3-5 kali selanjutnya diulas pada gelas obyek, kemudian diwarnai dengan Giemsa, prerapat diamati di bawah mikroskop (Olympus CX31) dengan perbesaran obyektif 10-40 kali. Pada ulas vagina ditentukan fase yang sedang dialami hewan coba melalui tipe sel, proporsi masing-masing sel, dan keberadaan leukosit.

Analisis Data

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) pola faktorial dengan 2 faktor perlakuan yaitu lama waktu pemberian dan dosis. Data berupa jumlah folikel berkembang, persentase jumlah folikel primer, sekunder, dan tersier dianalisis dengan analisis varian (ANOVA). Perbedaan hasil

ANOVA dilanjutkan dengan *Duncan multiple range test* (DMRT) pada taraf 5%. Data diolah menggunakan program SPSS versi 16.

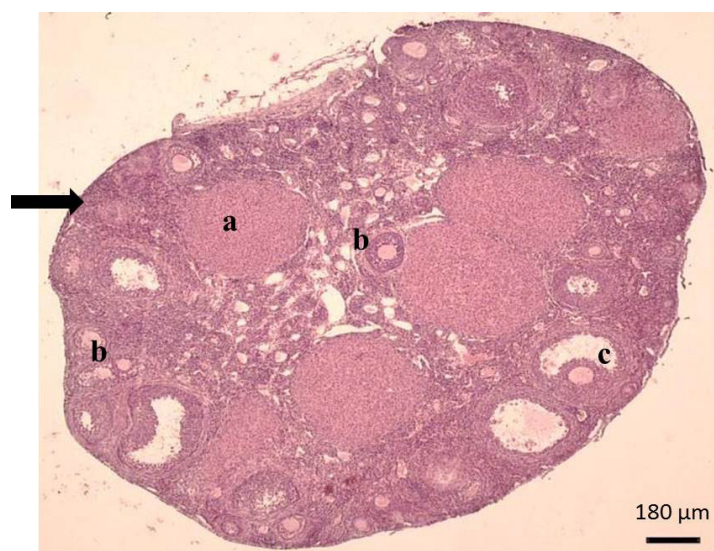
Hasil dan Pembahasan

Hasil pengamatan mikroskopis berdasarkan histologi dari ovarium mencit dalam penelitian ini didapatkan bahwa pada ovarium terdapat folikel yang beragam. Keragaman folikel dapat dilihat dari hasil histologi ovarium (Gambar 1).

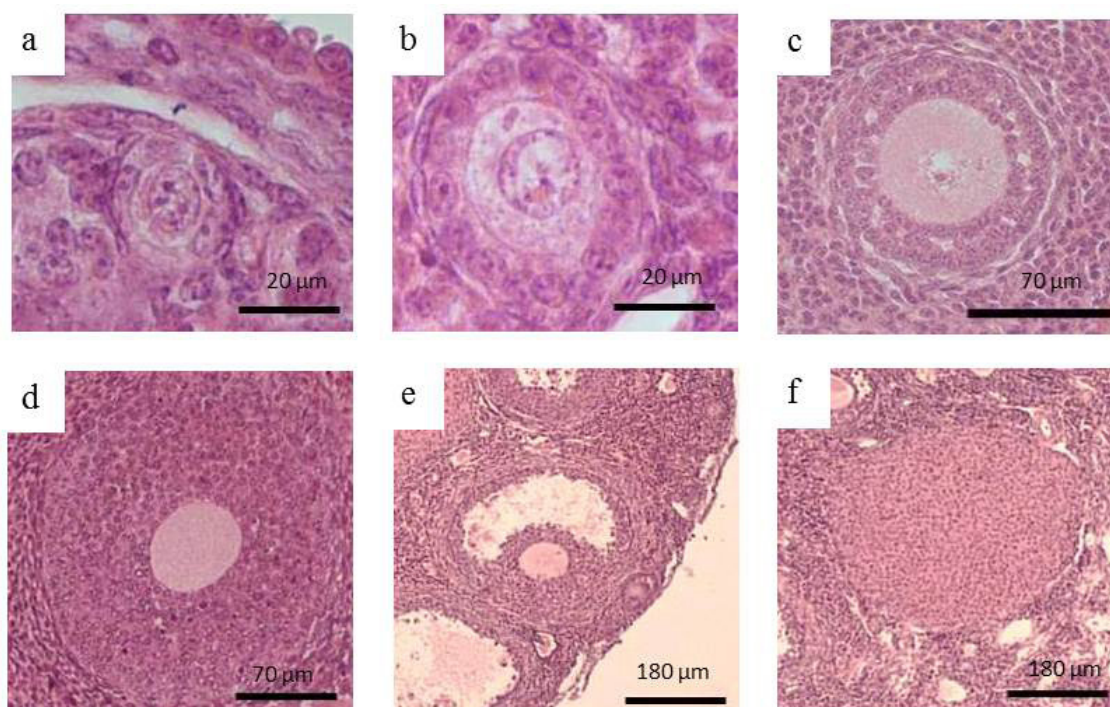
Adanya keragaman folikel tersebut menunjukkan bahwa terjadi perkembangan folikel di dalam ovarium. Folikel-folikel yang ditemukan adalah folikel primordial, primer, sekunder, dan tersier. Folikel primordial cenderung ditemukan di daerah korteks ovarium dan terdapat oosit yang dikelilingi oleh satu lapis sel granulosa lebih pipih dari sel kuboid. Folikel primer (Gambar 1a) juga ditemukan di daerah korteks ovarium yang ditandai dengan oosit dan zona pelusida yang dikelilingi oleh satu lapis sel granulosa kuboid dan satu lapisan luar sel pipih. Folikel sekunder (Gambar 1b) berada di

seluruh ovarium yang ditandai dengan oosit dikelilingi oleh beberapa lapis sel granulosa kuboid. Folikel tersier (Gambar 1c) juga berada di seluruh ovarium yang ditandai dengan oosit dikelilingi oleh beberapa lapis sel granulosa kuboid dan berkembangnya antrum. Selain itu juga ditemukan *corpus luteum* (Gambar 1a) yang menunjukkan bahwa oosit telah diovulasikan. Pengelompokan folikel pada penelitian ini mengacu pada laporan Scudamore (2014) yang mengelompokkan folikel ovarium berdasarkan penampilan morfologi lapisan sel granulosa seperti yang disajikan pada Gambar 2.

Pertumbuhan dan perkembangan folikel mencakup pertumbuhan oosit, proliferasi sel granulosa, pembentukan antrum, aktivasi reseptor *follicle stimulating hormone* (FSH) dan *luteinizing hormone* (LH), pembentukan hormon estrogen hingga oosit diovulasikan (Leung dan Adashi, 2004). Secara histomorfologi terlihat bahwa pada saat pertumbuhan terjadi pertambahan ukuran folikel dari folikel primordial, folikel primer, dan folikel sekunder.



Gambar 1. Ovarium mencit (kontrol). *Corpus luteum* (a), folikel sekunder (b), folikel tersier (c), korteks ovarium (→).



Gambar 2. Perkembangan folikel ovarium. Folikel primordial (a), folikel primer (b), folikel sekunder (c dan d), folikel tersier (e), *corpus luteum* (f).

Folikulogenesis dimulai dari perekrutan folikel primordial dalam jumlah banyak yang dijumpai pada bagian korteks ovarium. Perekrutan tersebut diatur oleh tekanan jaringan dalam stroma pada korteks ovarium. Kepadatan stroma menurun secara bertahap dari korteks hingga bagian medula (Woodruff dan Shea, 2011). Folikulogenesis dimulai saat folikel primordial menuju arah medula yang lebih lunak. Hal tersebut memicu selesainya istirahat meiosis oosit dalam folikel primordial (Silber, 2015) dan berkembang menjadi folikel primer kemudian folikel sekunder. Folikel sekunder mulai terjadi pembentukan antral kecil dan tersebar, selanjutnya antral menyatu sehingga terbentuk folikel tersier. Pada masa pembentukan antrum terjadi dinamika folikel antral yang terdiri atas perekrutan, seleksi, dominan dan atresi. Selama perkembangan jumlah folikel terus berkurang hingga mencapai folikel preovulasi (Senger, 2005).

Tabel 1 menyajikan jumlah total folikel berkembang dalam ovarium setelah pemberian ekstrak biji kapas. Jumlah folikel berkembang setelah pemberian ekstrak biji kapas selama 5, 10, dan 15 hari menunjukkan bahwa mencit yang diberi ekstrak biji kapas dengan dosis 2,7 g/kg BB memiliki jumlah folikel lebih rendah ($P < 0,05$) dibandingkan dengan dosis 1,5 dan 2,1 g/kg BB. Efektivitas ekstrak biji kapas dengan dosis 2,7 g/kg BB sama pada pemberian 5, 10, 15, dan 24 hari. Berdasarkan hasil tersebut diketahui bahwa pemberian ekstrak biji kapas paling efektif selama 5 hari dengan dosis 2,7 g/kg BB. Pemberian ekstrak biji kapas selama 24 hari menunjukkan jumlah folikel berkembang rendah ($P < 0,05$) pada semua dosis perlakuan dibandingkan dengan kelompok pemberian ekstrak biji kapas selama 5, 10, dan 15 hari. Perbedaan jumlah folikel berkembang dapat disebabkan lama waktu pemberian dan dosis yang diberikan (Camara *et al*, 2015; Sirard *et al*, 2006).

Tabel 1. Jumlah folikel berkembang pada mencit setelah pemberian ekstrak biji kapas

Waktu pemberian	Kontrol	1,5 g/kg BB	2,1 g/kg BB	2,7 g/kg BB
5 hari	24 ± 4,5 ^{de}	33 ± 10,4 ^{bcd}	42 ± 10,0 ^{abc}	23 ± 3,6 ^{de}
10 hari	19 ± 8,5 ^e	36 ± 4,5 ^{bcd}	31 ± 4,9 ^{bcd}	23 ± 5,0 ^{de}
15 hari	33 ± 7,4 ^{bcd}	30 ± 12,7 ^{bcd}	37 ± 12,5 ^{bcd}	19 ± 12,4 ^e
24 hari	34 ± 12,3 ^{bcd}	25 ± 10,4 ^{de}	27 ± 3,5 ^{cd}	25 ± 10,1 ^{de}
34 hari	44 ± 7,6 ^{ab}	53 ± 10,8 ^a	29 ± 6,2 ^{bcd}	36 ± 6,0 ^{bcd}

Keterangan: huruf kecil yang berbeda pada setiap baris di antara kelompok perlakuan di atas menunjukkan perbedaan nyata ($P < 0,05$)

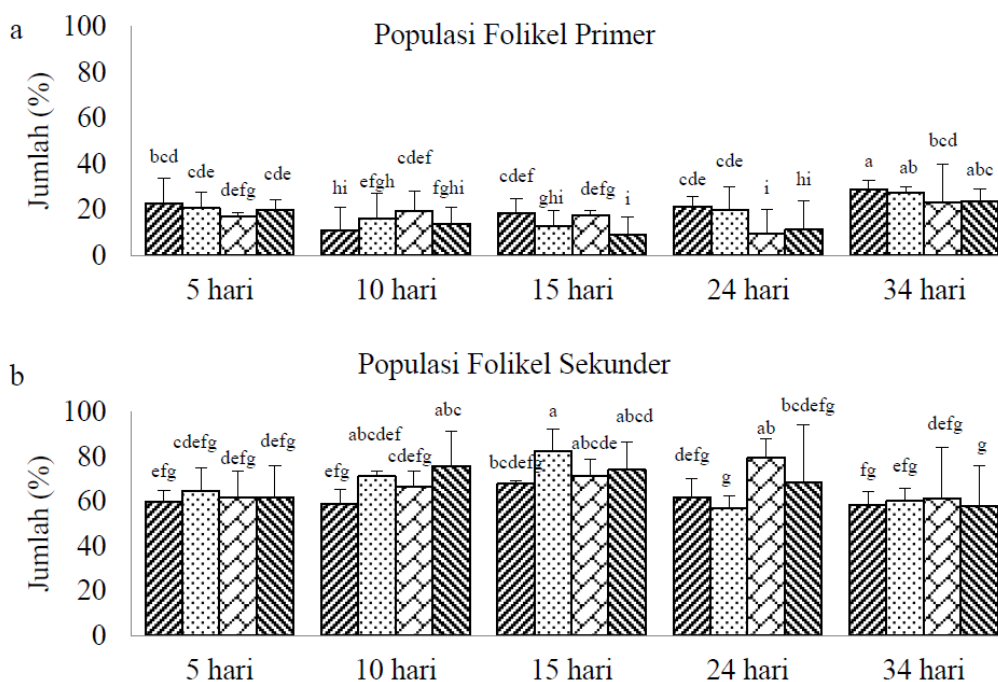
Penurunan jumlah folikel diduga disebabkan oleh folikel yang banyak mengalami atresia sehingga hanya sedikit yang berkembang (Camara *et al.*, 2015). Gadelha *et al.*, (2014a) juga melaporkan bahwa pemberian gosipol secara subkutan dengan dosis 25 mg/kg/hari juga menyebabkan banyak folikel yang mengalami atresia. Atresia pada folikel besar akan menyebabkan kerusakan pada lapisan kumulus yang akan mengakibatkan gangguan perkembangan embrio (Sirard *et al.*, 2006). Selain itu folikel atresia akan menghasilkan oosit yang sulit menyelesaikan metafase II (Nasim *et al.*, 1995). Gosipol merusak kompetensi meiosis yang diperoleh pada saat perkembangan folikel. Hal ini berdasarkan pernyataan Cecconi (2002) bahwa kemampuan meneruskan meiosis diperoleh bersamaan dengan pembentukan antrum. Pemberian ekstrak biji kapas walaupun memengaruhi ovarium tetapi tidak menyebabkan perubahan berat badan yang mengindikasikan tanda-tanda toksisitas. Hasil ini sesuai dengan penelitian pada domba yang diteliti oleh Camara *et al.* (2015).

Penghentian pemberian ekstrak biji kapas selama 10 hari menunjukkan jumlah folikel berkembang mengalami peningkatan ($P < 0,05$) dibandingkan dengan jumlah folikel berkembang setelah pemberian selama 24 hari. Pada dosis kontrol (0 g/kg BB) dan 1,5 g/kg BB menunjukkan jumlah yang lebih tinggi ($P < 0,05$) dibandingkan

dengan dosis 2,1 dan 2,7 g/kg BB. Berdasarkan hal tersebut diketahui bahwa terjadi pemulihan ovarium yang dilihat dari jumlah folikel berkembang setelah penghentian pemberian ekstrak terjadi hingga dosis 2,7 g/kg BB. Efek pemulihan tersebut paling baik terlihat setelah penghentian pemberian ekstrak biji kapas pada dosis paling rendah yaitu 1,5 g/kg BB.

Data pada Gambar 3 menunjukkan masing-masing populasi folikel primer (3a), sekunder (3b) dan tersier (3c). Persentase populasi folikel primer setelah pemberian ekstrak biji kapas selama 15 dan 24 hari lebih rendah ($P < 0,05$) dibandingkan dengan 5 dan 10 hari. Jumlah folikel primer setelah pemberian ekstrak biji kapas selama 15 hari dengan dosis 2,7 g/kg BB memiliki persentase jumlah folikel yang sama dengan pemberian ekstrak biji kapas selama 24 hari dengan dosis 2,1 dan 2,7 g/kg BB. Penghentian pemberian ekstrak selama 10 hari menunjukkan terjadi peningkatan jumlah folikel primer pada semua dosis perlakuan.

Persentase populasi folikel sekunder dan tersier belum bisa diduga karena jumlahnya yang fluktuatif ($P < 0,05$) antara kelompok kontrol dan perlakuan. Hasil pengamatan tersebut berbeda dengan penelitian pada jumlah folikel besar pada sapi yang menerima 5 g gosipol per hari yang mengalami penurunan kuantitas (Randel *et al.*, 1996). Keberadaan folikel tersier tidak jelas berubah



Gambar 3. Rata-rata jumlah folikel pada potongan histologi setelah pemberian ekstrak biji kapas. Folikel berkembang (a), primer (b), sekunder (c), dan tersier (d).
 █ kontrol, █ 1,5 g/kg BB, █ 2,1 g/kg BB, █ 2,7 g/kg BB.

Keterangan: huruf kecil yang berbeda pada setiap histogram di antara kelompok perlakuan di atas menunjukkan perbedaan nyata ($P < 0,05$)

dari jumlahnya akibat pemberian ekstrak biji kapas namun pada perluasan perkembangan kumulus yang menjadi lapisan oosit pada folikel besar mengalami hambatan karena pemberian gosipol (Lin *et al*, 1994b).

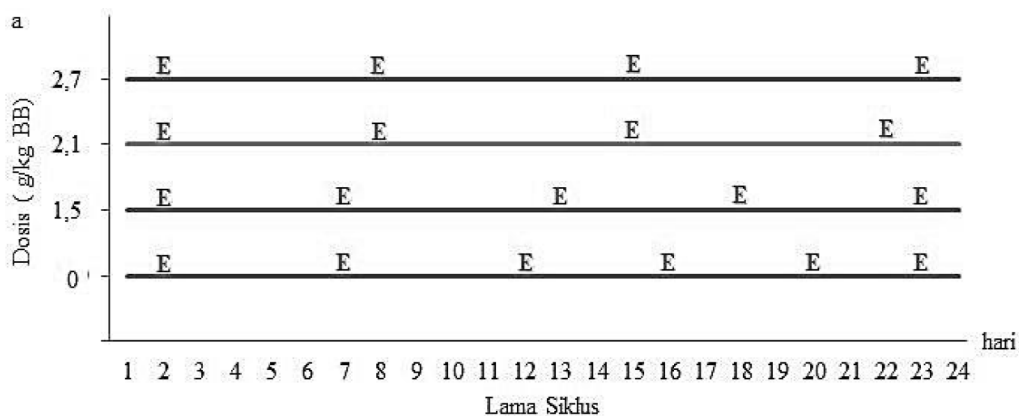
Data pada Gambar 3 memperlihatkan folikel primer ditemukan dalam jumlah lebih sedikit dibandingkan folikel sekunder setelah pemberian ekstrak biji kapas. Hal tersebut menyebabkan jumlah folikel yang direkrut dan diseleksi untuk menjadi folikel dominan berkurang. Penurunan tersebut berdampak pada jumlah ovulasi selanjutnya. Folikel sekunder setelah pemberian ekstrak biji kapas masih banyak ditemukan, namun pada proses perkembangan menjadi folikel tersier tidak banyak folikel yang mampu terus berkembang. Folikel yang telah berkembang menjadi folikel sekunder kemungkinan telah atresi (Camara *et al.*, 2015).

Akumulasi gosipol memengaruhi jumlah folikel yang sedang aktif berkembang (Gadelha *et al*, 2014b). Folikel primordial dan primer membutuhkan banyak nutrisi untuk melanjutkan perkembangan sehingga apapun zat yang diberikan akan memengaruhi perkembangan folikel tersebut. Gosipol bersifat sitotoksik (Randel *et al*, 1992) dan berkemampuan meningkatkan pembentukan *reactive oxygen species* (ROS) sehingga menginduksi stres oksidatif (Kovaci, 2003; Fornes *et al*, 1993) serta terjadi apoptosis pada folikel (Moon *et al*, 2011). Folikel pada masa awal perkembangan hanya dipengaruhi oleh nutrisi dan bebas dari pengaruh gonadotropin. Hal tersebut berkemungkinan menyebabkan kemunculan folikel primer menjadi lebih sedikit dibandingkan folikel sekunder dan tersier yang perkembangannya juga dipengaruhi oleh stimulasi gonadotropin (Baerwald, 2009).

Jumlah folikel ovarium memengaruhi jumlah oosit dan kompetensi perkembangan oosit (Mossa *et al*, 2007). Pemberian ekstrak biji kapas berkaitan dengan lingkungan folikel yang dapat memengaruhi fertilitas betina (Sirard *et al*, 2006). Beberapa studi menyatakan kerusakan akibat gosipol juga disebabkan oleh hambatan sekresi *adrenocorticotropic hormone* (ACTH), hambatan pembentukan *cyclic adenosine monophosphate* (cAMP) pada sel-sel luteal (Lin *et al*, 1994b), gangguan komunikasi interseluler (Hervé *et al*, 1996), gangguan metabolisme energi seluler,

gangguan transpor ion melalui membran, penurunan steroidogenesis yaitu estrogen dan progesteron (Gadelha *et al*, 2014b).

Perubahan di dalam ovarium dipengaruhi oleh respon terhadap perubahan hormonal yang diamati dari perubahan siklus estrus. Gosipol menyebabkan pemanjangan siklus estrus dengan meningkatkan durasi fase metestrus dan diestrus (Gadelha *et al*, 2014a). Gambaran perbedaan siklus estrus pengamatan 24 hari dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. a Siklus estrus mencit setelah pemberian ekstrak biji kapas selama 24 hari.
 b Pencapaian fase siklus estrus selama 24 hari pemberian ekstrak biji kapas.

Keterangan: P = proestrus, E = estrus, M = metestrus, D = diestrus

Hasil pemberian ekstrak biji kapas selama waktu tertentu yaitu 5, 10, 15, dan 24 hari menyebabkan status reproduksi pada hari mencit dikorbankan menjadi tidak seragam. Ketidakseragaman tersebut terlihat dari perbedaan fase dalam siklus estrus yang dialami mencit. Pengamatan selama 24 hari menunjukkan bahwa secara normal mencit mengalami 6 kali estrus sedangkan mencit yang diberikan perlakuan dosis ekstrak biji kapas 1,5 g/kg BB mengalami 5 kali estrus dan mencit yang diberikan perlakuan dosis ekstrak biji kapas 2,1 dan 2,7 g/kg BB mengalami 4 kali estrus. Gosipol menyebabkan pemanjangan siklus estrus dengan meningkatkan durasi fase metestrus dan diestrus (Gadelha *et al*,

2014a) sehingga durasi siklus estrus melebihi 5 hari. Pemanjangan siklus estrus menyebabkan durasi folikulogenesis menjadi lebih panjang.

Kesimpulan

Berdasarkan data yang terkompilasi dari hasil penelitian disimpulkan bahwa folikulogenesis ovarium mencit dipengaruhi oleh pemberian ekstrak biji kapas sehingga terjadi penurunan jumlah folikel berkembang dan perpanjangan durasi siklus estrus. Penurunan tersebut bersifat sementara sehingga berpotensi dapat digunakan sebagai bahan kontrasepsi. Perlu dilakukan kajian lebih lanjut

tentang penyebab menurunnya folikulogenesis dan perpanjangan siklus estrus sehingga pemanfaatan dapat diketahui dengan lebih pasti dan luas.

Daftar Pustaka

- Baerwald, A.R. (2009). Human antral folliculogenesis: what we have learned from the bovine and equine models. *Anim. Reprod.* 6 (1): 20-29.
- Bansode, F.W. (1994). Genotoxic effects of gossypol acetate on the ovary of *Rhinopoma kinneari* wroughton (Microchiroptera: Mammalia). *Contraception.* 49 (4): 601-607.
- Câmara, A.C.L., Gadelha, I.C.N., Borges, P.A.C., de Paiva, S.A., Melo, M.M. and Soto-Blanco, B. (2015). Toxicity of gossypol from cottonseed cake to sheep ovarian follicles. *PLoS ONE.* 10 (11): 1-11.
- Cecconi, S. (2002). Growth and differentiation of small ovarian follicles in mammals: problems and future perspective. *Reprod. Dev.* 48 (5): 431-445.
- Chandrashekar, R., Kumar, A.K., Reddy, Y.R., Chaitanya, P.J., Bhavani, N.L., and Pochampalli, J. (2013). Isolation of gossypol and analysis of phytochemicals in seed extract of Bt and non Bt varieties of cotton. *Pharm. Phytochem.* 2 (1): 1-8.
- Chavatte-Palmer, P., Dupont, C., Debus, N., and Camous, S. (2014). Nutritional programming and the reproductive function of the offspring. *Anim. Product. Sci.* 54 (4): 1166–1176.
- Fornes, M.W., Barbieri, A.M., and Burgos, M.H. (1993). Sperm motility loss induced by gossypol: relation with OH scavengers, motile stimulators dan malondialdehyde production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 195 (3): 1289-1293.
- Gadelha, I.C.N., Fonsesa, N.B.S., Oloris, S.C.S., Melo, M.M., and Blanco, S.B. (2014a). Gossypol toxicity from cottonseed products. *Sci. World. J.* 14 (4): 1-9.
- Gadelha, I.C.N., de Macedo, M.F., Oloris, S.C.S., Melo, M.M., and Blanco, S.B. (2014b). Gossypol promotes degeneration of ovarian follicle in rats. *Sci. World. J.* 14 (1): 1-7.
- Galvao, K.N., Santos, J.E.P., Coscioni, A.C., Juchem, S.O., Chebel, R.C., Sisco, W.M., and Villasenor, M. (2006). Embryo survival from gossypol-fed heifers after transfer to lactating cows treated with human chorionic gonadotropin. *Dairy. Sci.* 89 (6): 2056-2064.
- Hadley, M.A., Lin, Y.C., and Dym, M. (1981). Effect of gossypol on the reproductive system of male rats. *Andrology.* 2 (4): 190-199.
- Hafez, E.S.E., and Hafez, B. (2000). *Reproduction in Farm Animal. Chapter 5.* 7th ed. USA (US): Lippincot Williams and Walkins.
- Hahn, D.W., Rusticus, C., Probst, A., Homm, R., and Johnson, A.N. (1981). Antifertility and endocrine activities of gossypol in rodents. *Contraception.* 24 (1): 97-105.
- Hervé, J.C., Pluciennik, F., Bastide, B., Cronier, L., Verrecchia, F., Malassiné, A., Joffre, M., and Deleze, J. (1996). Contraceptive gossypol blocks cell-to-cell communication in human and rat cells. *Eur. J. Pharmacol.* 313 (3): 243–255.
- Kovaci, P. (2003). Mechanism of drug and toxic action of gossypol: focus on reactive oxygen species and elektron transfer. *Curr. Medicin. Chem.* 10 (24): 2711-2718.
- Lagerlof, R.K., and Tone, J.N. (1985). The effect of gossypol acetic acid on female reproduction. *Drug. and Chem. Toxic.* 8 (6): 469-482.
- Leung, P.C.K., and Adashi, E.Y. (2004). *The Ovary.* 2nd ed. USA (US): Elsevier Academic Pr.
- Lin, Y.C., Fukaya, T., Rikihisa, Y., and Walton, A. (1985). Gossypol in female fertility control: ovum implantation and early pregnancy inhibited in rats. *Life. Sci.* 37 (5): 39-47.
- Lin, Y.C., Coskun, S., and Sanbuissho, A. (1994a). Effect of gossypol on in vitro bovine oocyte maturation and steroidogenesis in bovine granulosa cells. *Theriogenology.* 41 (4): 1601-1611.
- Lin, Y.C., Sanbuissho, A., Coskun, S., and Rikihisa, Y. (1994b). Inhibition of in vitro fertilization

- and early embryonic development in hamsters by gossypol. *Life Sci.* 55 (14): 1139-1145.
- Moon, D.O., Choi, Y.H., Moon, S.K., Kim, W.J., and Kim, G.Y. (2011). Gossypol decreases tumor necrosis factor- α -induced intercellular adhesion molecule-1 expression via suppression of NF- κ B activity. *Food. Chem. Toxicol.* 49 (1): 999-1005.
- Mossa, F., Berlinguer, F., Succu, S., Madeddu, M., Bebbere, D., Leoni, G.G., and Naitana, S. (2007). Follicle number affects in vitro developmental competence of sheep oocytes. *Biol. Reprod.* 2 (7): 1-7.
- Myers, M., Britt, K.L., Wreford, N.G.M., Ebling, F.J.P., and Kerr, J.B. (2004). Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary. *Reproduction.* 127(4):569–580.
- Nasim, A., Schrick, F.N., Butcher, R.L., and Inskeep, E.K. (1995). Effect of persistent follicles on early embryonic losses in beef cows. *Biol. Reprod.* 52 (5): 1129-1135.
- Paris, M.C.J., Andersen, C.Y., and Shaw, J.M. (2009). Ovarian cryopreservation and grafting: its potential for human reproductive biology and animal conservation. *Anim. Reprod.* 6 (1): 96-113.
- Peters, H. (1969). The development of the mouse ovary from birth to maturity. *Endocrinology.* 62 (9): 98-116.
- Randel, R.D., Chase, C.C., and Wyse, S.J. (1992). Effects of gossypol and cottonseed products on reproductive of mammals. *Anim. Sci.* 70 (5): 1628-1638.
- Randel, R.D., Willard, S.T., Wyse, S.J., and French, L.N. (1996). Effects of diets containing free gossypol on follicular development, embryo recovery and corpus luteum function in brangus heifers treated with bFSH. *Theriogenology.* 45 (6): 911-922.
- Scudamore, C.L. (2014). *Histology of the Mouse.* England (UK): John Wiley and Son.
- Senger, P.L. (2005). *Pathways to Pregnancy and Parturition second revised edition.* Washington (US): Current Conception, Inc.
- Silber, S. (2015). Unifying theory of adult resting follicle recruitment and fetal oocyte arrest. *Reprod. Biomed. Online.* 31 (5): 472-475.
- Singla, N., and Garg, M. (2013). Effect of crude cottonseed oil containing gossypol on fertility of male and estrous cycle of female *Bandicota bengalensis* Gray and Hardwicke. *Appl. Anim. Res.* 41 (2): 156-165.
- Sirard, M.A., Richard, F., Blondin, P., and Robert, C. (2006). Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology.* 65 (6): 126–136.
- Webb, R., Nicholas, B., Gong, J.G., Campbell, B.K., Gutierrez, C.G., Garverick HA, and Armsrong DG. (2003). Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. *Reproduction.* 61 (3): 71-90.
- White, I.G., Vishwanath R, Swan MA, Brown-Woodman PD. 1988. Studies of the mechanism of action of gossypol as a male antifertility agent. *Contraception.* 37 (3): 1-8.
- Woodruff, T.K., and Shea, L.D. (2011). A new hypothesis regarding ovarian follicle development: ovarian rigidity as a regulator of selection and health. *Assist. Reprod. Genet.* 28 (1): 3-6.

Respons Imun Ayam Petelur Pascavaksinasi *Newcastle Disease* dan *Egg Drop Syndrome*

Immune Response of Layer Against Newcastle Disease and Egg Drop Syndrome Vaccines

**Gusti Ayu Yuniati Kencana¹, I Nyoman Suartha², Daniel Raja Bonar Nainggolan³,
 Agatha Serena Lumban Tobing³,**

¹Laboratorium Virologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana, Denpasar

²Laboratorium Penyakit Dalam, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana, Denpasar

³Program Pendidikan Dokter Hewan, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana, Denpasar

Email: yuniatikencana@gmail.com, yuniati_kencana@unud.ac.id

Abstract

Some viral diseases in poultry could lead to huge losses to the farmers. Newcastle Disease (ND) and Egg Drop Syndrome (EDS) are a group of infectious viral disease that can cause the decrease in egg production. Newcastle Disease is caused by Avian paramyxovirus type 1 (PMV-1) Paramyxoviridae family. The causative agent of EDS is Duck adenovirus-I Adenoviridae family. Both of these diseases affect the economic losses to the poultry. The main action to prevent hens from ND and EDS virus diseases is vaccination. The success of vaccination can be tested by serology. ND and EDS virus characteristically agglutinate hen's erythrocyte they have Hemagglutinine protein on virus envelope so can be tested by hemagglutination. The study was conducted on a commercial poultry farm in order to determine the success of vaccination against ND and EDS. The hens were vaccinated by Newcastle Disease-Infectious Bronchitis- Egg Drop Syndrome (ND-IB-EDS) inactivated vaccines. Serological test was conducted in pre and post vaccination by using microtiter hemagglutination test. The antibody titre is expressed in units of HI log₂. The results of the study, the mean antibody titer against ND pre vaccination was $4,53 \pm 1,356$ HI log₂ and antibody titre in 2nd, 3rd and 4th week were $8,67 \pm 0,617$ HI log₂, $7,73 \pm 1,335$ HI log₂ and $5,20 \pm 0,862$ HI log₂ post vaccination. Antibody titre against EDS pre vaccination was $0 \pm 0,000$ HI log₂ and antibody titre post vaccination in 2nd, 3rd and 4th week were $7 \pm 1,363$ HI log₂, $7,27 \pm 1,438$ HI log₂ and $7,6 \pm 1,056$ HI log₂. It showed that ND-IB-EDS inactivated vaccines is serological protective for ND and EDS titres.

Keywords: *Newcastle Disease, Egg Drop Syndrome, ND-IB-EDS inactivated vaccines, serology.*

Abstrak

Beberapa penyakit virus pada unggas dapat menyebabkan kerugian yang sangat besar pada peternak. Penyakit *Newcastle Disease* (ND) dan penyakit *Egg Drop Syndrome* (EDS) adalah kelompok penyakit virus menular yang dapat mengakibatkan penurunan produksi telur. Penyakit ND disebabkan oleh *Avian Paramyxovirus* tipe 1 (APMV-1) familia *Paramyxoviridae*. Agen penyebab penyakit EDS adalah *Duck Adenovirus* familia *Adenoviridae*. Kedua penyakit tersebut berdampak terhadap kerugian ekonomi pada peternakan ayam. Tindakan utama untuk mencegah penyakit ND maupun EDS dengan vaksinasi. Keberhasilan vaksinasi dapat diuji secara serologi. Virus ND dan EDS dapat mengaglutinasi eritrosit ayam karena mempunyai protein hemagglutinin pada amplop virus sehingga dapat diuji dengan uji hemagglutinasasi dan hambatan hemagglutinasasi. Penelitian dilakukan pada peternakan ayam petelur komersial guna mengetahui keberhasilan vaksinasi terhadap ND dan EDS. Ayam divaksinasi dengan vaksin *Newcastle Disease-Infectious Bronchitis-Egg Drop Syndrome* (ND-IB-EDS) inaktif. Uji serologi dilakukan pra dan pascavaksinasi menggunakan uji hemagglutinasasi teknik mikrotiter.

Titer antibodi dinyatakan dengan satuan HI log₂. Hasil penelitian menunjukkan rerata titer antibodi ND pravaksinasi sebesar $4,53 \pm 1,356$ HI log₂, sedangkan titer antibodi pascavaksinasi minggu ke-2 sebesar $8,67 \pm 0,617$ HI log₂, minggu ke-3 sebesar $7,73 \pm 1,335$ HI log₂ dan minggu ke-4 sebesar $5,20 \pm 0,862$ HI log₂. Rerata titer antibodi EDS pravaksinasi sebesar $0 \pm 0,000$ HI log₂, sedangkan pada minggu ke-2, 3 dan 4 pascavaksinasi masing-masing sebesar $7 \pm 1,363$ HI log₂, $7,27 \pm 1,438$ HI log₂ dan $7,6 \pm 1,056$ HI log₂. Disimpulkan bahwa secara serologi vaksin inaktif ND-IB-EDS mampu menghasilkan titer antibodi ND dan EDS yang protektif

Kata kunci: *Newcastle Disease*, *Egg Drop Syndrome*, vaksin ND-IB-EDS inaktif, serologi.

Pendahuluan

Newcastle Disease (ND) adalah penyakit virus unggas penting yang dapat mengakibatkan kerugian besar pada peternakan ayam (Orsi *et al.*, 2010). Penyakit ND mengakibatkan kerugian ekonomi sangat besar yang ditemukan hampir di seluruh peternakan ayam (Aldous *et al.*, 2003). Gejala penyakit ND ditandai dengan kelainan pada saluran pernapasan, saluran pencernaan dan sistem saraf pusat. Tanda klinis penyakit ND tergantung pada strain virus, spesies inang, umur inang, lingkungan dan status kekebalan ayam (Al-Habeeb *et al.*, 2013). Pada ayam, gejala ND secara umum adalah hilangnya nafsu makan, lesu, penurunan produksi telur, radang trakea dan radang konjungtiva (Ashraf and Shah, 2014). Penyakit ND dapat menginfeksi berbagai spesies burung domestik dan liar, namun tingkat keparahan penyakit sangat bervariasi, mulai dari penyakit perakut dengan tingkat mortalitas hampir 100% sampai penyakit subklinis tanpa lesi (Cattoli *et al.*, 2011). Berdasarkan virulensinya, virus ND dikelompokkan menjadi 3 galur, yaitu: velogenik, mesogenik dan lentogenik. Alexander and Senne (2008^b) mengelompokkan bahwa berdasarkan atas gejala klinisnya ada lima patotipe virus ND yakni *viscerotropic velogenic*, *neurotropic velogenic*, *mesogenic*, *lentogenic* atau *respiratoric* dan tipe *asymptomatic*.

Di Indonesia penyakit ND dikenal dengan sebutan penyakit *Tetelo*, sedangkan di Bali dikenal dengan penyakit *gerubug*. Kejadian penyakit ND bersifat akut sampai kronis, dapat menyerang semua jenis unggas terutama ayam, baik ayam ras maupun ayam bukan ras (buras). Kasus ND merupakan ancaman yang serius bagi industri peternakan unggas di Indonesia karena ND bersifat endemik. Wabah ND pertama kali terjadi di Jawa (Indonesia) tahun 1926 (Saliu *et al.*, 2009; Moomivand *et al.*, 2013). Penyakit *Newcastle Disease* disebabkan oleh virus *Avian Paramyxovirus type-1* (APMV-1) (OIE, 2012).

Virus ND mempunyai sifat spesifik yakni dapat mengaglutinasi sel darah merah ayam, hal ini terjadi akibat adanya protein yang terdapat pada amplop virus yang disebut hemagglutinin. Proses terjadinya hemagglutinasi karena adanya ikatan antara hemagglutinin virus ND dengan reseptor sel, yaitu mukoprotein yang terdapat pada permukaan eritrosit (OIE, 2012).

Egg Drop Syndrome (EDS) disebabkan oleh *duck adenovirus-1* genus *Atadenovirus* familia *Adenoviridae* (Salihu *et al.*, 2010; Hafez, 2011), merupakan penyebab utama penurunan produksi telur yang pada unggas dan dapat menimbulkan kerugian ekonomi yang parah (Begum *et al.*, 2013). Ayam terserang penyakit EDS terutama terjadi pada saat puncak produksi. Kasus EDS dilaporkan telah

terjadi di beberapa peternakan ayam ras petelur di Bali, sedangkan di Kupang pernah bersifat mewabah (Ditjennak, 2014). Penularan penyakit EDS dapat terjadi secara vertikal maupun horizontal (Suresh *et al.*, 2013). Unggas yang terinfeksi EDS menunjukkan beberapa gejala klinis diantaranya adalah: kerabang telur yang lembek, perubahan bentuk telur dan hilangnya warna kerabang atau kerabang telur menjadi lebih pucat (Badar *et al.*, 2006). Virus EDS dapat ditularkan melalui udara tercemar, tumbuh di epitel permukaan rongga hidung kemudian diikuti dengan viremia dan antigen dapat terdeteksi di jaringan limfoid (Hafez, 2011). Unggas yang terinfeksi virus EDS menyebabkan ovarium menjadi tidak aktif, kemudian terjadi atropi pada *oviduct* dan *uterus* sehingga mempengaruhi produksi dan kualitas telur (CFSPH, 2006; Ibrahim *et al.*, 2011).

Pengobatan yang efektif untuk infeksi virusND maupun EDS belum ada. Strategi utama yang dapat dilakukan untuk mencegah munculnya penyakit ND maupun EDS adalah dengan vaksinasi dan peningkatan biosekuriti. Sejauh ini program pencegahan terhadap penyakit ND di Indonesia sudah dilaksanakan secara intensif, baik menggunakan vaksin aktif maupun vaksin inaktif. Vaksinasi bertujuan untuk memperoleh kekebalan spesifik yang protektif guna menghadapi kasus lapangan (Hewajuli and Dharmayanti, 2015; Kencana *et al.*, 2015). Penggunaan vaksin aktif maupun inaktif tunggal maupun kombinasi telah diterapkan secara luas pada peternakan unggas (Kencana, *et al.*, 2015; Kencana *et al.*, 2016; Wibowo *et al.*, 2010). Adanya perkembangan kasus penyakit viral yang terjadi secara bersamaan pada peternakan ayam petelur serta untuk meningkatkan efisiensi dalam pemberian vaksin maka digunakanlah vaksin kombinasi.

Vaksin EDS yang tersedia umumnya adalah vaksin inaktif sediaan tunggal maupun kombinasi. Penggunaan vaksin kombinasi sangat menguntungkan bagi peternak karena efisiensi waktu dan lebih ekonomis jika dibandingkan dengan pemberian vaksin tunggal. Keuntungannya karena vaksin kombinasi dapat diberikan sekaligus untuk mencegah lebih dari satu penyakit tergantung kombinasinya sehingga menurunkan tingkat stres pada ayam akibat vaksinasi yang berulang.. Penggunaan vaksin kombinasi kadangkala juga dapat mempengaruhi efektivitas vaksin dalam menginduksi pembentukan titer antibodi yang protektif (Cardoso *et al.*, 2005). Hasil penelitian dengan vaksin kombinasi Sanovac ND-AI ternyata mampu merangsang titer antibodi protektif baik pada ayam SPF maupun pada aplikasi lapangan (Kencana *et al.*, 2015; Kencana *et al.*, 2016). Namun demikian perlu pula diketahui bahagaimanakah respons imun ayam petelur terhadap ND dan EDS jika divaksinasi dengan vaksin tiga kombinasi antigen yakni ND-IB-EDS.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui respons imun ND dan EDS ayam petelur yang divaksin dengan vaksin inaktif kombinasi ND-IB-EDS. Pemeriksaan terhadap titer antibodi pascavaksinasi dilakukan pada minggu ke-2, 3 dan 4. Terjadinya peningkatan titer antibodi ND dan EDS pascavaksinasi diuji dengan uji serologi hemaglutinasi dan hambatan hemaglutinasi (HA/HI) (OIE., 2012).

Penelitian ini merupakan penelitian bersama antara Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana dengan PT Sanbio Laboratories yang merupakan produsen vaksin unggas di Indonesia, berkedudukan di Wanaherang, Gunung Putri, Bogor, Jawa Barat. Dalam upaya pengendalian penyakit ND maupun EDS, maka PT. Sanbio telah

membuat vaksin kombinasi inaktif ND-IB-EDS yang diberi nama vaksin Sanavac ND-IB-EDS dan telah dipasarkan serta banyak digunakan di peternakan komersial. Penelitian ini dilakukan di peternakan ayam petelur komersial di Kecamatan Penebel, Kabupaten Tabanan, Bali yang merupakan pusat peternakan ayam petelur di Kabupaten Tabanan. Lokasi ini dipilih karena sebelumnya pernah terjadi kasus ND dan kecurigaan terhadap penyakit EDS karena terjadi penurunan produksi yang sangat drastis pada peternakan ayam petelur. Penelitian ini terutama untuk mengetahui respons imun ayam petelur terhadap ND dan EDS. Monitoring terhadap hasil vaksinasi dilakukan untuk mengetahui titer antibodi pascavaksinasi guna mencegah terjadinya kerugian peternak akibat kegagalan vaksinasi.

Materi dan Metode

Sampel penelitian adalah ayam petelur jenis *Isa Brown* yang dipelihara di peternakan komersial milik mitra PT. Sanbio, di Desa Senganan Kecamatan Penebel, Kabupaten Tabanan, Bali. Berdasarkan catatan vaksinasi, ayam petelur sudah pernah divaksinasi sebelumnya dengan vaksin ND aktif pada umur 3 hari dan diulang pada umur 2 minggu dengan vaksin inaktif. Pada penelitian ini, ayam divaksin untuk ketiga kalinya pada umur 14 minggu yakni menjelang masa bertelur dengan vaksin inaktif kombinasi Sanavac ND-IB-EDS^R. Vaksin kombinasi ND-IB-EDS yang digunakan memiliki kandungan antigen *Newcastle Disease strain* LaSota $\geq 10^{9.5}$ EID50, *Infectious Bronchitis strain* Massachussets H52 $\geq 10^{6.5}$ EID50 dan *Egg Drop Syndrome strain* ≥ 32000 HAU. Vaksinasi dilakukan dengan cara injeksi intramuskuler (i.m) pada otot paha dengan satu dosis vaksin (volume 0,5 ml)/ekor. Sebanyak

15 ekor ayam dipakai untuk sampel penelitian yang diambil darahnya secara acak, yakni satu kali sebelum vaksinasi dan tiga kali setelah vaksinasi yang diperiksa titer antibodi ND dan EDS. Total sampel serum yang digunakan sebanyak 60 sampel. Keberhasilan vaksinasi dalam merangsang terbentuknya titer antibodi protektif terhadap ND dan EDS dideteksi secara serologi dengan uji hambatan hemaglutinasi (HI). Respons antibodi dinyatakan protektif apabila sesuai dengan standar ASEAN, untuk vaksin ND inaktif dan EDS pada ayam apabila memiliki titer antibodi lebih besar dari 16 HI Unit atau 4 HI log₂ (ACFAF, 2012).

Pengambilan darah ayam dengan cara ayam dibaringkan pada posisi rebah dorsal. Selanjutnya darah diambil melalui *vena brachialis* (vena di daerah sayap) dengan menggunakan spuit 3 ml. Daerah tempat pengambilan darah didesinfeksi terlebih dahulu dengan alkohol 70% guna mencegah terjadinya kontaminasi pada saat pengambilan sampel. Darah diambil sebanyak 1 ml, selanjutnya spuit diletakkan secara horizontal selama 1 jam pada suhu ruangan hingga serum keluar, kemudian sampel darah dalam spuit dimasukkan kedalam *cool box* dan diinkubasikan selama 18 jam pada suhu 4°C didalam *refrigerator*. Semua sampel darah dikeluarkan dari *refrigerator*, kemudian serum dipisahkan dari bekuan darah, selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 1000 rpm selama 10 menit. Serum ditampung dengan tabung mikro selanjutnya diinaktivasi terlebih dahulu dalam penangas air dengan suhu 56°C selama 30 menit sebelum dilakukan uji serologi. Tujuannya adalah untuk menginaktivkan autohemolisin yang ada dalam serum. Sampel serum yang telah disiapkan selanjutnya diuji dengan uji HI.

Untuk uji HA/HI dibutuhkan eritrosit unggas dengan konsentrasi 1%. Idealnya sel darah merah

ayam diambil dari ayam SPF, namun kalau tidak ada ayam SPF maka cara pembuatan suspensi eritrosit 1% dilakukan sesuai dengan prosedur dari (OIE, 2012) yang telah dimodifikasi. Caranya adalah sebagai berikut: darah ayam diambil sebanyak 2,5 ml dengan menggunakan *disposable syringe* 3 ml yang telah diisi dengan EDTA cair sebanyak 0,5 ml. Sel darah merah selanjutnya dicuci dengan ditambahkan PBS ke dalam larutan darah sampai volume 10 ml lalu dihomogenkan perlahan-lahan agar sel darah merah tidak rusak, kemudian disentrifuse selama 10 menit dengan kecepatan 2500 rpm. Supernatan dipisahkan dari endapan sel darah merah lalu ditambahkan PBS sampai volume 2/3 tabung. Proses selanjutnya dilakukan pencucian darah sebanyak tiga kali. Nilai *Packed Cell Volume* (PCV) eritrosit yang telah dicuci selanjutnya dibaca dengan *PCV reader*. Suspensi eritrosit 1% dibuat dengan cara mengencerkan darah yang telah diketahui PCVnya lalu ditambahkan larutan PBS sesuai dengan perhitungan: $V_1C_1=V_2C_2$, dimana V_1 adalah volume yang diketahui, V_2 adalah volume yang diketahui, C_1 adalah konsentrasi yang diketahui sedangkan C_2 adalah konsentrasi yang dicari. Setelah didapat nilai konsentarsi sel darah merah 1% maka dilanjutkan pada uji hemaglutinasi (HA/HI).

Uji hemaglutinasi digunakan untuk menguji antigen, selanjutnya untuk mempersiapkan antigen 4 HA unit yang akan digunakan pada uji HI. Teknik uji yang digunakan adalah hemaglutinasi mikrotiter dengan memakai plat mikro berbentuk dasar U 96 sumuran. Pada setiap lubang plat mikro 96 sumuran masing-masing diisi dengan 0,025 mL PBS menggunakan *microdropper*. Suspensi antigen yang akan diuji kemudian ditambahkan pada lubang pertama dan kedua dan selanjutnya dilakukan pengenceran berseri kelipatan dua mulai dari lubang

kedua sampai lubang kesebelas dengan menggunakan *microdiluter*. Sebanyak 0,025 ml PBS ditambahkan pada lubang ke satu sampai dua belas kemudian di *shaker*. Ditambahkan suspensi sel darah merah 0.05 ml ke dalam semua sumuran plat mikro selanjutnya di *shaker* kembali. Plat mikro diinkubasikan selama 1 jam pada suhu kamar sambil diamati ada tidaknya reaksi aglutinasi yang ditandai dengan bentukan serupa pasir berwarna merah pada dasar sumuran plat mikro. Titer virus yang diuji dinyatakan sebagai pengenceran tertinggi virus yang masih mampu mengaglutinasi eritrosit 1% secara sempurna (OIE, 2012). Tier 4 unit HA digunakan untuk bahan uji Hambatan Hemagutinasi (HI).

Uji HI diawali dengan cara sebagai berikut: Pada setiap sumuran plat mikro diisi dengan 0,025 ml PBS. Sumuran pertama dan kedua ditambahkan dengan serum yang selanjutnya diencerkan secara berseri kelipatan dua mulai dari lubang kedua sampai lubang kesepuluh dengan menggunakan *microdiluter*. Masing-masing 0,025 mL suspensi antigen 4 HA unit ditambahkan ke dalam sumuran pertama sampai kesebelas, sedangkan sumuran keduabelas ditambahkan dengan 0,025 PBS. Plat mikro kemudian di *shaker* selama 30 detik selanjutnyadidiamkan selama 30 menit. Setelah 30 menit, kedalam sumuran pertama sampai keduabelas ditambahkan 0,05 mL suspensi sel darah merah 1% dan di *shaker* selama 30 detik. Plat mikro selanjutnya diinkubasikan selama 1 jam pada suhu kamar, selanjutnya dibaca setiap 15 menit sampai maksimal satu jam. Titer HI yang diuji dinyatakan sebagai antilog pengenceran tertinggi dari serum yang masih mampu mengaglutinasi eritrosit 1% secara sempurna (OIE, 2012).

Analisis data titer antibodi pravaksinasi dan pascavaksinasi dihitung rataannya per periode

pengambilan serum dan dinyatakan dalam HI log₂. Data titer antibodi yang diperoleh setiap minggunya dianalisis menggunakan uji sidik ragam *Univariate* dilanjutkan dengan uji Duncan dan uji regresi menggunakan perangkat lunak *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 17 for windows*.

Hasil dan Pembahasan

Hasil pemeriksaan titer antibodi *Newcastle Disease* dan *Egg Drop Syndrome* ayam petelur yang divaksin ND-IB-EDS inaktif dimuat pada Tabel 1. Rerata titer antibodi HI pravaksinasi dan pascavaksinasi dihitung dan dinyatakan dengan satuan HI log₂.

Tabel 1. Rerata titer antibodi ND dan EDS ayam petelur (HI log₂)

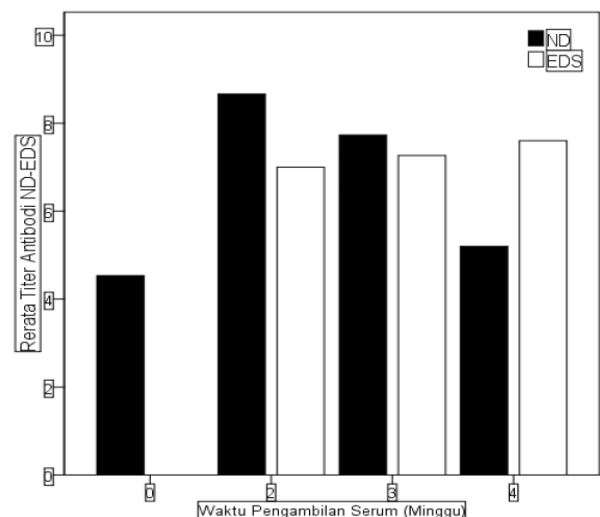
Waktu Pengambilan Sampel (Minggu)	Rerata titer antibodi (HI log ₂)	
	ND	EDS
0	4,53 ± 1,356 ^a	0,0 ± 0,000 ^a
2	8,67 ± 0,617 ^c	7,0 ± 1,363 ^b
3	7,73 ± 1,335 ^b	7,27 ± 1,438 ^b
4	5,20 ± 0,862 ^a	7,60 ± 1,056 ^b

Keterangan : Huruf (superskrip) yang berbeda menunjukkan berbeda sangat nyata (P<0,01), sebaliknya huruf (superskrip) yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata (P>0,05).

Hasil pemeriksaan rerata titer antibodi ND dan EDS pada minggu ke-0 (pravaksinasi) ayam petelur masing-masing adalah 4,53 HI log₂ dan 0 HI log₂. Titer antibodi tersebut menunjukkan bahwa ayam petelur masih memiliki kekebalan protektif terhadap ND namun titer antibodi EDS tidak protektif. Oleh karena itu perlu dilakukan

vaksinasi guna meningkatkan daya proteksi spesifik terhadap ND dan EDS guna mencegah terinfeksi kasus lapangan. Pemeriksaan titer antibodi ND dan EDS pravaksinasi bertujuan untuk mengkonfirmasi titer antibodi pada ayam petelur. Titer antibodi yang tinggi pada saat divaksinasi akan dapat menetralsir antigen vaksin yang digunakan sehingga menyebabkan berkurangnya respons terhadap vaksin yang diberikan dan dapat mengakibatkan kegagalan vaksinasi (Kencana *et al.*, 2016).

Respons antibodi ayam terhadap vaksin ND dan EDS pascavaksinasi dapat diuji secara serologis dengan uji hambatan hemaglutinasi (HI). Uji diagnostik ini yang paling banyak dilakukan di dunia, karena mampu mendeteksi respons antibodi terhadap glikoprotein virus ND (OIE., 2012; WHO., 2009). Deteksi antibodi terhadap EDS juga diuji dengan uji hambatan hemaglutinasi (HI) (Bidin *et al.*, 2007). Uji HI sering dipilih untuk mendiagnosis penyakit ND karena cepat, murah dan akurat (Badar *et al.*, 2006). Rataan titer antibodi ND dan EDS ayam petelur pra dan pascavaksinasi dimuat pada Gambar 1



Gambar 1. Titer antibodi ND dan EDS ayam petelur pada pengambilan serum pravaksinasi (minggu ke-0) dan minggu ke- 2, 3, 4 pascavaksinasi

Rataan titer antibodi ND pascavaksinasi adalah sebesar $4,53 \pm 1,356$ unit HI log₂, titer ini meskipun masih tergolong protektif namun berada pada ambang batas bawah. Hal ini disebabkan karena masih adanya rangsangan antigen vaksin dalam membentuk respons imun, tetapi berada di bawah ambang batas titer protektif ND (4 HI log₂) sehingga dibutuhkan vaksinasi ulangan (*booster*) untuk merangsang kembali respons imun terhadap ND. Sementara itu, rata-rata titer antibodi EDS pada minggu ke-0 adalah 0 HI log₂. Hal ini disebabkan karena belum ada rangsangan antigen vaksin EDS sebelumnya karena vaksinasi EDS baru pertama kali diberikan pada umur 14 minggu.

Pada minggu ke-2 pascavaksinasi titer antibodi ayam terhadap ND dan EDS mengalami peningkatan yang sangat signifikan 8,67 HI unit log₂ dan 7 HI unit log₂. Hasil penelitian terdahulu dengan vaksin Sanovac ND-AI menunjukkan keberhasilan vaksinasi dengan terbentuknya titer antibodi protektif pada 2 dan 3 minggu pascavaksinasi (Kencana *et al.*, 2015). Pembentukan titer antibodi pada saat vaksinasi ulangan (*booster*) lebih cepat dibandingkan pada vaksinasi pertama, hal ini diakibatkan karena terbentuknya sel memori setelah vaksinasi pertama yang mempercepat respons antibodi pada vaksinasi ulangan (Kencana *et al.*, 2016). Sel T memori segera mengenali antigen yang pernah terpapar sebelumnya dan membantu sel B untuk berproliferasi dan menghasilkan sel plasma, yang kemudian akan membentuk antibodi. Pada penelitian ini respons imun yang terbentuk kemungkinan disebabkan karena dua hal yaitu akibat pernah terpapar virus ND maupun EDS pada infeksi alami yang sifatnya subklinis. Kemungkinan kedua adalah akibat vaksinasi ND-IB-EDS pada umur 14 minggu.

Pada minggu ke-3 pascavaksinasi, titer antibodi ND adalah 7,73 HI log₂. Titer tersebut mengalami penurunan, meskipun demikian secara serologi masih tergolong titer antibodi yang protektif. Pada minggu ke-3 rata-rata titer antibodi EDS adalah 7,27 HI unit log₂. Pada pemeriksaan sampel minggu ke-4 titer antibodi ND sebesar 5,20 HI unit log₂ (titer antibodi menurun) namun masih tergolong batasan titer protektif. Rataan titer EDS minggu ke-4 pascavaksinasi tidak meningkat nyata ($P > 0,05$) tetapi masih di atas batas nilai ambang protektif. Adanya peningkatan titer antibodi yang berlangsung lambat terjadi karena kandungan *adjuvant* dalam vaksin inaktif sehingga dapat memperlambat proses pelepasan antigen dalam tubuh dalam merangsang pembentukan kekebalan. *Adjuvant* berfungsi untuk membantu meningkatkan respons seluler atau humoral terhadap antigen (Aiyer *et al.*, 2013). Pada minggu tertentu terjadi penurunan titer yang disebabkan oleh waktu paruh antibodi. Waktu paruh antibodi adalah waktu yang diperlukan titer antibodi berkurang menjadi setengah dari titer antibodi puncak (Kencana *et al.*, 2016).

Berdasarkan hasil uji serologi, rata-rata titer antibodi hasil vaksinasi dengan vaksin ND-IB-EDS tergolong titer antibodi yang protektif karena lebih besar dari 2⁴ HI unit. Pemeriksaan serum hendaknya rutin dilakukan pascavaksinasi dengan tujuan untuk mengetahui respons imun ayam terhadap vaksin yang diberikan. Disamping itu besarnya titer antibodi pascavaksinasi juga menunjukkan potensi vaksin yang digunakan (Kencana *et al.*, 2015). Tingkat homologitas antara virus vaksin dengan virus lapangan dipercaya sangat mempengaruhi keberhasilan vaksinasi

(Cho *et al.*, 2008). Perbedaan tingkat respons antibodi pascavaksinasi pada ayam dapat dipengaruhi oleh beberapa aspek diantaranya: kemungkinan adanya perbedaan sifat antigenik dari virus vaksin yang digunakan, kualitas antigen, serta kandungan komposisi *adjuvant* (Indriani *and* Dharmayanti, 2013). Penelitian terhadap titer antibodi ND-EDS pascavaksinasi dengan vaksin kombinasi inaktif ND-IB-EDS sangat diperlukan untuk mengetahui potensi vaksin dalam memicu kekebalan protektif pada ayam petelur di lapangan. Upaya ini dilakukan guna mencegah terjadinya kegagalan vaksinasi yang dapat merugikan peternak. Hasil analisis rerata titer antibodi ayam petelur pascavaksinasi dengan vaksin kombinasi ND-IB-EDS ternyata mampu merangsang pembentukan respons imun protektif terhadap ND maupun EDS, sedangkan pemeriksaan titer antibodi IB pada penelitian ini tidak dilakukan. Mayahi *et al* (2013) melaporkan bahwa vaksin aktif ND-IB mampu merangsang pembentukan titer antibodi pada ayam pedaging. Periode pengambilan sampel berpengaruh terhadap tinggi rendahnya titer antibodi ND maupun EDS pascavaksinasi. Perlu diperhatikan pula bahwa penggunaan vaksin secara extensive dapat menyebabkan terjadinya modifikasi genetik terutama virus yang sifatnya patogenik (Ashraf *and* Shah., 2014).

Kesimpulan

Hasil analisis rerata titer antibodi ayam petelur pascavaksinasi dengan vaksin ND-IB-EDS ternyata secara serologi mampu merangsang terbentuknya titer antibodi protektif t ND maupun EDS. Vaksin kombinasi ND-EDS-IB aman digunakan dilapangan untuk vaksinasi ayam petelur. Perlu juga diperhatikan

agar titer antibodi ayam petelur sebelum divaksinasi tidak sampai nol karena ayam sangat riskan tertular penyakit ND maupun AI. Sebaliknya titer antibodi yang tinggi pada vaksinasi juga tidak disarankan, karena akan mengakibatkan terjadinya netralisasi terhadap vaksin yang diberikan. Perlu juga dilakukan penelitian terhadap titer antibodi IB pada ayam petelur

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada PT Sanbio Laboratories atas segala fasilitas dan kerjasama penelitian, serta semua pihak yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan penelitian ini.

Daftar Pustaka

- (ACFAF) ASEAN Cooperation in Food, Agriculture and Forestry. 2012. ASEAN Standards for Animal Vaccines, Second Edition. Livestock Publication Series. <http://www.asean.org/communities/asean-economiccommunity/category/publication-3>. (2 April 2016).
- Aiyer-Harini P., Ashok-Kumar H.G., Kumar GP., Shivakumar N. 2013. An Overview of Immunologic Adjuvants-A Review. *J Vaccines Vaccine* 4(1): 1-4.
- Aldous EW, Mynn JK, Banks J, Alexander DJ (2003). A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence of the fusion protein gene. *J. Avian Pathol.* 32, 239-256.
- Alexander D.J. and Senne D.A. 2008^b. Newcastle Disease and Other Avian Paramyxoviruses. *In: A Laboratory Manual for the Isolation, Identification and Characterization of Avian Pathogens*, Dufour-Zavala L. (Editor in Chief) Swayne D.E., Glisson J.R., Jackwood

- M.W., Pearson J.E., Reed W.M., Woolcock P.R., 4th ed., American Association of Avian Pathologists, Athens, GA, 135–141.
- Al-Habeeb M.A., Mohamed M.H.A., Sharawi S. 2013. Detection and characterization of Newcastle disease virus in clinical samples using real time RT-PCR and melting curve analysis based on matrix and fusion genes amplification. *Veterinary World* 6(5):239-243.
- Ashraf, A and Shah, M. S. 2014. Newcastle Disease: Present status and future challenges for developing countries. *African Journal of Microbiology Research* 8(5): 411-416.
- Badar, S.T., Siddique, M., Ali, R., dan Rasool, M.H. 2006. Serological Status of Egg Drop Syndrome in Breeders and Commercial Layers in Manshera District. *Pakistan vet. J.* 26(1): 33-35.
- Begum, J.A., Chowdhury, E.H., Parvin, R., Matin, M.A., Giasuddin, M., Bari, A.S.M., Islam, M.R. 2013. Detection of Egg Drop Syndrome Virus by Polymerase Chain Reaction. *International Journal of Livestock Research* 3(2): 112-116.
- Bidin, Z., Lojkic, I., Mikec, M., Pokric, B. 2007. Naturally Occurring Egg Drop Syndrome Infection in Turkeys. *ACTA VET BRNO* 76: 415-421.
- Cattoli, G., Susta, L., Terregino, C., Brown, C. 2011. Newcastle disease: a review of field recognition and current methods of laboratory detection. *JVDI* 23(4): 637-656.
- Cardoso, W.M., Aguiar, F.J.L.C., Romão, J.M., Oliveira, W.F., Salles, R.P.R., Teixeira, R.S.C., Sobral, M.H.R. 2005. Effect of Associated Vaccines on the Interference between Newcastle Disease Virus and Infectious Bronchitis Virus in Broilers. *Brazilian J of Poultry Sci* 7(3): 181-184.
- (CFSPH) The Center for Food Security and Public Health. 2006. *Egg Drop Syndrome*. www.cfsph.iastate.edu.(18 Oktober 2015).
- Cho S.H., Kwon H.J., Kim T.E., Kim J.H., Yoo H.S., Park M.H., Park Y.H. & Kim S.J. (2008). Characterization of a recombinant Newcastle disease virus vaccine strain. *Clin. Vaccine Immunol.*, 15 (10), 1572–1579.
- Ditjennak. 2014. *Manual Penyakit Unggas*. Direktorat Kesehatan Hewan Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan Kementerian Pertanian. Hal 36.
- Hafez M. 2011. Avian Adenoviruses Infections with Special Attention to Inclusion Body Hepatitis/ Hydropericardium Syndrome and Egg Drop Syndrome. *Pak Vet J* 31(2): 85-92.
- Hewajuli, D.A dan Dharmayanti, N.L.P.I. 2015. Peran Sistem Kekebalan Non-spesifik dan Spesifik pada Unggas terhadap Newcastle Disease. *Wartazoa* Vol. 25(3): 135-146.
- Indriani R, Dharmayanti INLP. 2013. Studi Efikasi Vaksin Bivalen AI Isolat Lokal terhadap Beberapa Karakter Genetik Virus AI subtype H5N1. *Jurnal Biologi Indonesia* 9(1): 21-30.
- Kencana, GA.Y., Suartha, IN., Simbolon, MP., Handayani, AN., Ong, S., Syamsidar., Kusumastuti, A. 2015. Respon Antibodi Terhadap Penyakit Tetelo pada Ayam yang Divaksin Tetelo dan Tetelo-Flu Burung. *Jurnal Veteriner* Vol 16 (2): 283-290.
- Kencana, GAY., Suartha, N., Paramita, NMAS., Handayani, AN. 2016. Vaksin Kombinasi Newcastle Disease dengan Avian Influenza Memacu Imunitas Protektif Pada Ayam Petelur Terhadap Penyakit Tetelo dan Flu Burung. *Jurnal Veteriner* Vol 17(2): 257-264.
- Mayahi, M., Talazadeh, F., Aslahi, H. 2013. Effect of the Commercial Mixed Live Newcastle Disease and Infectious Bronchitis Vaccines and the Use of Two Separate Vaccines Given Simultaneously on Systemic Antibody Responses. *Iranian Journal of Virology*. 7(3): 17-21
- Moomivand, H., Bassami, M.R., Faramarzi, S., Stabraghil, E., Ghaedi, A., Ghabel, H., Zarghami, A., Banaei, M. 2013. Serological and Clinical Survey of Newcastle Disease in

- Broiler Chickens of East Azarbayjan by HI Tests. *Euro J Exp Bio* 3(6):311-314.
- OIE (2012). Newcastle disease. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 2.3.14. <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online>.
- Orsi MA., Doretto Jr, L, Camillo SCA., Reischak D., Ribeiro S.A.M., Ramazzoti A., Mendonça A.O., Spilki FR., Buzinaro M.G., Ferreira HL., Arns CW. 2010. Prevalence of Newcastle Disease virus in Broiler chickens (*Gallus gallus*) in Brazil. *Brazilian J. Microbiol.* 41:349-357.
- Salihu, A.E., Joannis, T.M., Onwuliri, F.C., Ibu, J.O., Masdooq, A.A., Muazu, A., Haruna, G., Ngbede, J. 2010. Serological Evidence of Egg Drop Syndrome'1976 (EDS'76) in Free-range Chickens at Chicken Market Sites in Jos, Nigeria. *Turk. J. Vet. Anim. Sci* 34(4): 403-406.
- Saliu, O.J., Sanda, M.E., Audu, S.I. 2009. Adoption of Vaccination Against Newcastle Disease by Rural Poultry Women Farmers in the North Central Zone of Nigeria. *Int. J. Poult. Sci* 8 (5): 500-503.
- Suresh, P., Shoba, K., Rajeswar, J.J. 2013. Incidence of egg drop syndrome – 1976 in Namakkal district, Tamil Nadu, India. *Vet. World* 6(6):350-353.
- Wibowo, M.H., Amanu, S. 2010. Perbandingan Beberapa Program Vaksinasi Penyakit *Newcastle Disease* pada Ayam Buras. *J. Sain Vet. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.* 28 (1): 1-9.
- World Organization for Animal Health. 2009. *Newcastle Disease: Aetiology, Diagnosis, Prevention, and Control References, OIE Technical Disease Cards.* OIE Scientific and Technical Department, Thailand.

Ekspresi IL – 1 β pada Proses Kesembuhan Fraktur Os Femur Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Ovariectomi yang Diterapi dengan Ekstrak Cikal Tulang (*Cissus quadrangularis*)

IL - 1 β Expression in Fracture Healing on Os Femur of ovariectomized Rats (*Rattus norvegicus*) With Therapy Of *Cissus Quadrangularis* Extract

Ira Sari Yudaniayanti, Bambang Sektiari Lukiswanto, M. Zainal Arifin

Departemen Klinik Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga,
 Kampus C UNAIR Mulyorejo Surabaya 60115
 Email : irasari.vet@gmail.com

Abstract

This study aims to determine the potential of the *Cissus quadrangularis* extract to decreased the expression of IL-1 β so that it can to inhibit bone resorption and osteoporosis fracture healing is not delayed union. Forty rats adapted for 1 week, and then divided into four groups with 10 replications. P0 (sham-operated + Osteotomy + CMC Na); P1 (ovariectomy + Osteotomy + CMC Na); P2 (ovariectomy + Osteotomy + Raloxifene 5.4 mg / kg); P3 (ovariectomy + Osteotomy + CQ 750 mg / kg). Osteoporosis induced is made by bilateral ovariectomy in rats, then to make sure that osteoporosis is already happened, 8 weeks post-ovariectomy performed radiology examinations on the femur, then the osteotomy action. IL1- β expression observations performed in at the 2nd week and 6th week after osteotomy through the immunohistochemistry examination. The results of immunohistochemistry examination in the 2nd week showed an increased expression of IL1- β in all groups of rat that did ovariectomy (P1, P2 and P3) were significantly different ($p < 0.05$) with a rat group that didn't ovariectomy, as well P2 dan P3 were significantly different with P1. The Results of immunohistochemistry examination in the 6th week showed the same pattern with the 2nd week and there is increased IL-1 β expression in all groups of rat compared with the results of the examination in the 2nd week. Based on these results it can be concluded that *Cissus quadrangularis* extract and Raloxifen can decreased the expression of IL-1 β , and the results that don't significantly different, so that these both materials can to inhibit bone resorption and osteoporosis fracture healing don't get delayed union.

Keywords: *Cissus quadrangularis* Extract, IL – 1 β , osteoporosis, ovariectomy, healing fracture of femur

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi ekstrak *Cissus quadrangularis* (Cq) dalam menurunkan ekspresi IL-1 β sehingga mampu menghambat resorpsi tulang dan kesembuhan fraktur osteoporosis tidak mengalami keterlambatan (*delayed union*). Empat puluh ekor tikus putih diadaptasikan selama 1 minggu, selanjutnya dibagi menjadi empat kelompok dengan 10 ulangan. P0 (Non ovariectomi + Osteotomi + CMC Na); P1 (Ovariectomi + Osteotomi + CMC Na); P2 (Ovariectomi + Osteotomi + Raloxifene 5,4 mg/kg BB); P3 (Ovariectomi + Osteotomi + Cq 750 mg/kg BB). Induksi osteoporosis dilakukan dengan cara ovariectomi pada tikus, selanjutnya untuk memastikan bahwa sudah terjadi osteoporosis, 8 minggu pasca ovariectomi dilakukan pemeriksaan radiologi pada tulang femur, kemudian dilakukan tindakan osteotomi. Pengamatan ekspresi IL1- β dilakukan pada minggu ke-2 dan minggu ke-6 pasca osteotomi melalui pemeriksaan imunohistokimia. Hasil pemeriksaan imunohistokimia pada minggu ke-2 menunjukkan adanya peningkatan ekspresi IL1- β pada semua kelompok tikus yang dilakukan ovariectomi (P1, P2 dan P3) yang berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan kelompok tikus yang tidak di ovariectomi, demikian juga P2 dan P3 berbeda nyata dengan P1. Hasil pemeriksaan imunohistokimia pada minggu ke-6 menunjukkan pola yang sama dengan minggu ke-2 dan terdapat peningkatan ekspresi IL1- β pada semua kelompok tikus dibandingkan dengan hasil pemeriksaan pada minggu ke-2. Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak

Cissus quadrangularis dan Raloxifen mampu menurunkan ekspresi IL-1 β dengan hasil yang tidak berbeda nyata, sehingga kedua bahan tersebut mampu menghambat resorpsi tulang dan kesembuhan fraktur osteoporosis tidak mengalami keterlambatan (*delayed union*)

Kata Kunci : Ekstrak *Cissus quadrangularis*, IL – 1 β , osteoporosis, ovariectomi, kesembuhan fraktur femur.

Pendahuluan

Osteoporosis adalah penurunan massa tulang yang menyebabkan fraktur traumatik atau atraumatik. Pengobatan osteoporosis yang sudah lanjut dengan komplikasi fraktur merupakan hal yang sangat sulit, dan memerlukan waktu lama dan biaya yang cukup besar (Jones *et al.*, 2002). Defisiensi estrogen adalah salah satu faktor penting penyebab terjadinya osteoporosis. Defisiensi estrogen ini biasanya sering dialami wanita menopause maupun hewan-hewan betina yang diovariectomi (Kalu, 1991; Zaid *et al.*, 2012). Defisiensi estrogen akan menyebabkan peningkatan produksi dari IL-1, IL-6, dan TNF α , yang akan meningkatkan terjadinya osteoklastogenesis dan berlanjut dengan kehilangan tulang (Nazrun *et al.*, 2012; Malutan *et al.*, 2014). Estrogen juga merangsang ekspresi dari osteoprotegerin (OPG) dan TGF- β oleh osteoblas dan sel stroma, yang selanjutnya berfungsi menghambat resorpsi tulang dan mempercepat/merangsang apoptosis osteoklas (Bell, 2003).

Sitokin IL-1 α dan IL-1 β mempunyai peran penting terhadap destruksi tulang dengan cara membentuk osteoklas dan meningkatkan aktivitas osteoklas. Peranan utama IL-1 β pada metabolisme tulang adalah menstimulasi resorpsi tulang dan menghambat formasi tulang (Ardo & Sunariani, 2005). Berkaitan dengan peranan tersebut, maka sitokin IL-1 α dan IL-1 β sebenarnya juga diperlukan pada fase awal maupun akhir pada proses kesembuhan tulang, keduanya berperan dalam merekrut sel

mesenchymal (MSC). Selanjutnya MSC dirangsang untuk berdiferensiasi menjadi kondrosit dan osteoblas (Dimitriou *et al.*, 2005; Schmidt-Bleek *et al.*, 2009). Sitokin inflamasi yang berlebihan pada fase awal proses kesembuhan fraktur akan memperpanjang fase inflamasi, sehingga mengganggu pembentukan kalus dan meningkatkan waktu penyembuhan (Claes *et al.*, 2012). Pada fase akhir kesembuhan fraktur yaitu fase remodeling, sitokin IL-1 α dan IL-1 β sebenarnya juga diperlukan untuk meningkatkan aktivitas osteoklas yang berperan mengganti *woven bone* yang terbentuk pada tahap awal pembentukan kalus menjadi tulang lamelar untuk mengembalikan dan meningkatkan kekuatan tulang (Gerstenfeld *et al.*, 2007), namun bila jumlahnya berlebihan akan menyebabkan gangguan pematangan kalus yang berpengaruh terhadap kekuatan tulang (Ke-RongDai, 2005).

Proses kesembuhan fraktur pada penderita osteoporosis berbeda dengan fraktur pada tulang yang normal. Pada penderita osteoporosis terjadi peningkatan jumlah dan aktivitas osteoklas. Xu *et al.* (2003), menyatakan adanya peningkatan aktivitas osteoklas meresorpsi tulang yang melebihi aktivitas osteoblas dalam pembentukan tulang pada penderita osteoporosis ataupun pada individu yang dilakukan ovariectomi akan menyebabkan gangguan penyembuhan fraktur yang terjadi, khususnya pada fase awal tahap kesembuhan fraktur. Aktivitas osteoblas sangat diperlukan pada fase awal penyembuhan fraktur untuk membentuk

matriks tulang dan meregenerasi defek tulang yang terjadi, oleh karena itu bila aktivitas osteoblas lebih lambat daripada aktivitas osteoklas maka tahap awal pembentukan kalus akan terhambat.

Berbagai jenis obat telah dikembangkan untuk terapi osteoporosis, kebanyakan obat-obat tersebut bekerja dengan cara menghambat resorpsi tulang. Kilic and Sagiroglu (2013), menyatakan bahwa sesungguhnya terapi yang efektif untuk osteoporosis tidak hanya mampu menghambat resorpsi tulang, namun juga mampu menstimulasi pembentukan tulang terutama pada penderita osteoporosis yang mengalami fraktur. Potu *et al.*(2009) menyatakan bahwa rata-rata proliferasi dan aktivitas biologi dari osteoblas mengontrol rata-rata pembentukan tulang, oleh karena itu percepatan pertumbuhan osteoblas merupakan faktor kunci yang menentukan efisiensi perbaikan kerusakan tulang.

Tanaman Cikal tulang (*Cissus quadrangularis*/(CQ) merupakan salah satu tanaman tradisional yang cukup potensial, karena tanaman ini mengandung kalsium, fosfat, dan fitoestrogen (Sabri dkk., 2009). Penelitian ekstrak tanaman cikal tulang (*Cissus quadrangularis*/(CQ) telah banyak dilakukan. Hasil penelitian-penelitian tersebut membuktikan bahwa tanaman ini efektif memperbaiki kerusakan tulang baik dikarenakan osteoporosis maupun akibat fraktur dengan cara pembentukan tulang baru. Dilaporkan beberapa penelitian bahwa tanaman cikal tulang (*Cissus quadrangularis*/(CQ) mempunyai efek osteogenik yaitu mampu meningkatkan diferensiasi dan aktivitas osteoblas (Parisuthiman *et al.*, 2009; Potu *et al.*, 2009; Sabri dkk., 2009; Shirwaikar *et al.*, 2003; Deka *et al.*, 1994). Namun demikian mekanisme efek osteogenik dari tanaman cikal tulang (*Cissus quadrangularis*/(CQ) belum dapat diketahui secara jelas dan juga belum pernah diteliti

potensi tanaman ini untuk memperbaiki kerusakan tulang akibat fraktur yang terjadi pada penderita osteoporosis.

Berdasarkan uraian tersebut diatas, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui efektifitas tanaman cikal tulang (*Cissus quadrangularis*/(CQ) sebagai *osteogenic agents* yang mampu memperbaiki kerusakan tulang khususnya pada kejadian fraktur pada penderita osteoporosis dengan melihat kemampuan tanaman ini dalam mengendalikan aktivitas osteoklas dalam meresorpsi tulang, sehingga proses kesembuhan fraktur pada tulang yang mengalami osteoporosis tidak terganggu.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui potensi ekstrak CQ dalam menurunkan ekspresi IL-1 β sehingga mampu menghambat resorpsi tulang dan kesembuhan fraktur osteoporosis tidak mengalami keterlambatan (*delayed union*)

Hipotesis penelitian ini adalah Ekstrak tanaman cikal tulang (*Cissus quadrangularis*/(CQ) mampu menurunkan ekspresi IL-1 β sehingga mampu menghambat resorpsi tulang dengan meningkatkan apoptosis osteoklas.

Materi dan Metode

Unit eksperimen yang digunakan pada penelitian ini adalah 40 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina strain *Wistar*, berumur 2,5 bulan dengan berat berkisar antara 150 - 200 gram dan dalam keadaan sehat, yang ditandai dengan bulu mengkilat, mata bersinar dan gerakan yang lincah. Setiap tikus diberi pakan standar sebanyak $\pm 10\%$ dari berat badan (BR 511 : mengandung protein 20%, Abu 5,92%, serat kasar 5,01%, Ca 0,88% dan P 0,61%) dan air minum aquabidestilata secara *ad libitum*. Tikus ditempatkan pada kandang plastik

dengan ukuran 40 cm X 30 cm yang berisi 3 ekor tikus perkandungnya. Penggunaan Hewan Model telah dimintakan sertifikat Laik Etik Penelitian dari Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Obat-obat yang digunakan pada penelitian ini adalah Ketamil (ketamine HCl, Ilium), Xyla (xylazine, Holland), Atropine Sulfas (PT. Ethica), Interflox (enrofloxacin).

Bahan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman Cikal tulang (*Cissus quadrangularis*) yang diperoleh dari Kebun Raya Purwodadi, Pasuruan, serta Raloxifene produksi Elly Lily, USA.

Pembuatan Ekstrak Tanaman Cikal tulang (*Cissus quadrangularis*) dengan metode sebagai berikut ; daging batang dan daun Cikal tulang (*Cissus quadrangularis*) dicuci, dipotong kecil-kecil, diangin-anginkan pada udara kering dan dihancurkan atau digiling hingga menjadi serbuk kering. Serbuk kering diekstraksi menggunakan metode maserasi yaitu bahan kering direndam dengan etanol 96%, kemudian dilakukan sonifikasi selama 10 menit. Selanjutnya diamkan selama semalam, dan disaring dengan kertas saring. Sisa/ampas ditambah lagi dengan etanol 96% diaduk kembali seperti semula, langsung disaring. Langkah tersebut diulang hingga dihasilkan larutan ke-tiga. Ketiga larutan dikumpulkan dan diuapkan menggunakan alat *rotavapour* sehingga didapatkan ekstrak kental. Ekstrak kemudian disimpan dalam lemari pendingin agar tidak mudah rusak.

Empat puluh ekor tikus putih diadaptasikan selama 1 minggu, selanjutnya dibagi menjadi empat kelompok yaitu P0 (NOV), P1 (OV), P2, dan P3 masing-masing dengan 10 ulangan. Tikus kelompok P0 (NOV) (Kontrol negatif) : hewan coba normal tanpa pemberian obat, dilakukan *sham operated* dan osteotomi pada diafisis tulang femur, tikus kelompok

P1 (OV) (Kontrol positif): dilakukan ovariektomi dan dilakukan osteotomi pada diafisis tulang femur. P2 : tikus dilakukan ovariektomi, osteotomi pada diafisis tulang femur dan diberi terapi Raloxifene (5,4 mg/kg BB) (Potu *et al.* , 2009). P3 : tikus dilakukan ovariektomi dan osteotomi pada diafisis tulang femur dan diberi terapi ekstrak *Cissus quadrangularis* 750 mg/kg BB. Dosis Raloxifen dan ekstrak *Cissus quadrangularis* yang digunakan dalam penelitian ini berdasarkan penelitian yang sebelumnya (Potu *et al.*, 2009).

Pembuatan model tikus defisiensi estrogen pada kelompok P1, P2 , dan P3 dilakukan dengan ovariektomi bilateral. Prosedur ovariektomi dilakukan sesuai dengan metode yang dilakukan oleh Kaveh *et al* (2010), sebagai berikut; dilakukan insisi pada garis tengah (linea mediana) yaitu tepat di belakang/posterior umbilicus ke arah caudal. Panjang irisan dibuat secukupnya kira-kira 2-3 cm. Lapisan yang terinsisi meliputi kulit kemudian subkutan dan fasia, selanjutnya daerah di bawah subkutan dipreparir hingga terlihat garis linea alba. Muskulus daerah linea alba dijepit dan angkat sedikit, kemudian dilakukan insisi dengan menggunakan scalpel, hingga ruang abdomen terlihat. Setelah dinding abdomen terbuka, organ reproduksi dicari menggunakan kait ovariohisterektomi (*Spay hook*) dengan mengidentifikasi corpus uteri yang terletak di bawah vesica urinaria bagian dorsal, ditelusuri ke arah cranial kornua kiri sampai ditemukan ovarium kiri. Ligamentum dan pembuluh darah dijepit dengan menggunakan arteri klem tepat di sebelah cranial ovarium, pasang satu arteri klem lagi bersebelahan dengan klem pertama. Selanjutnya dilakukan pengikatan (ligasi) pembuluh darah beserta pengantung ovarium pada bagian anterior (depan) dari arteri klem dengan menggunakan benang *absorbable (cat gut chromic 3-0)*, kemudian potong

menggunakan scalpel diantara dua arteri klem yang telah terpasang tersebut dan dipastikan tidak terjadi pendarahan serta semua jaringan ovarium terangkat. Selanjutnya pada bagian caudal ovarium di pasang arteri klem dan dilakukan pengikatan (ligasi) pembuluh darah uterina beserta penggantungnya persis pada bagian posterior (belakang) arteri klem yang telah terpasang tadi dengan menggunakan benang *absorbable (cat gut chromic3-0)*, setelah itu dilakukan pemotongan menggunakan scalpel di antara ligasi dan klem caudal. Klem dilepas dan sisa potongan jaringan uterus dibiarkan masuk kembali ke rongga abdomen. Selanjutnya, ovarium kanan ditarik keluar dari insisi, kemudian dilakukan prosedur yang sama seperti prosedur mengangkat ovarium kiri.

Pasca pengangkatan ovarium, rongga abdomen diirigasi menggunakan antibiotik (*ampicilin*) untuk mencegah infeksi. Selanjutnya, dilakukan penjahitan untuk menutup luka insisi. Lapisan peritonium dijahitkan dengan jahitan terputus sederhana menggunakan *cat gut* sedangkan kulit dijahit dengan pola matras silang menggunakan benang *silk 3-0*.

Prosedur osteotomi dilakukan setelah dilakukan pemeriksaan radiologi untuk memastikan bahwa tulang femur pada tikus ovariektomi sudah mengalami osteoporosis. Berdasarkan hasil pemeriksaan radiologi menunjukkan bahwa pada kelompok tikus yang diovariektomi terlihat adanya penurunan radiopasitas terutama pada bagian metafisis femur yang berbeda nyata dengan kelompok tikus yang tidak diovariektomi (Gambar 1).

Setelah dipastikan sudah terjadi osteoporosis, selanjutnya semua tikus pada kelompok P0 (NOV), P1 (OV), P2, dan P3 dilakukan prosedur osteotomi pada daerah diafisis femur dengan pemasangan intramedulary pin dengan ukuran diameter 1mm. Pemilihan osteotomi pada daerah diafisis karena

proses kesembuhan fraktur pada daerah tersebut cukup kompleks baik secara selular maupun molekular dan berpotensi cukup besar untuk terjadinya *delayed union* dan *non union* terutama pada kasus osteoporosis (Nikolaou *et al*, 2009; Kyllönen *et al*, 2015).

Seluruh prosedur operasi baik pada ovariektomi maupun osteotomi dilakukan anestesi menggunakan kombinasi ketamine (50 mg/kg bb) dan xylazine (10mg/kg bb) (Flecknell, 2009). Perawatan pasca operasi adalah perawatan luka operasi dengan memberikan salep antibiotik dan injeksi intramuskular enrofloxacin 10 mg/Kg BB selama 2 hari untuk terapi profilaksis, agar tidak terlalu mengganggu hasil penelitian.

Dua hari setelah dilakukan osteotomi pada kelompok P2 mulai diberikan raloxifine 5,4 mg/kg BB, P3 diberikan ekstrak tanaman *Cissus quadrangularis* 750 mg/kg BB, sedang pada PO (NOV) dan P1 (OV) diberikan CMC Na peroral. Masing-masing perlakuan pada kelompok tersebut diberikan selama 2 minggu untuk kelompok pengamatan 2 minggu (fase *reparatif*) dan 6 minggu untuk kelompok pengamatan 6 minggu (fase *remodeling*).

Pengamatan ekspresi IL1- β dilakukan pada minggu ke-2 dan minggu ke-6 pasca osteotomi melalui pemeriksaan imunohistokimia. Hal ini bertujuan untuk mengetahui ekspresi IL1- β pada awal dan akhir proses kesembuhan fraktur juga mengetahui peranan IL1- β dalam kesembuhan fraktur. Pengumpulan sampel dilakukan dengan cara mengambil masing-masing 5 ekor tikus pada semua kelompok perlakuan baik pada pengamatan minggu ke-2 maupun ke-6, untuk dilakukan euthanasi dan nekropsi, kemudian diambil bagian tulang femur yang di osteotomi setelah dibersihkan dari muskulus yang ada disekitarnya dan dibuat preparat imunohistokimia.

Pemeriksaan ekspresi IL-1 β dilakukan menggunakan pewarnaan imunohistokimia. Jumlah sel pengeksresi IL-1 β adalah jumlah sel pada sayatan jaringan tulang femur yang memberikan reaksi positif terhadap *mouse monoclonal antibody* (mAb terhadap IL-1 β) dengan metode Imunohistokimia yang diamati 5 lapang pandang.

Data kuantitatif dari penelitian ini yaitu ekspresi IL-1 β , dianalisis menggunakan SPSS 20.0 for windows software (SPSS, Chicago, IL, USA). Perbedaan diantara kelompok perlakuan dievaluasi menggunakan ANOVA, dilanjutkan dengan Uji *Least Square Differences* (LSD) (Ghozali, 2006).

Hasil dan Pembahasan

Hasil pemeriksaan imunohistokimia dan penghitungan ekspresi IL-1 β dapat dilihat pada Tabel 1, serta Gambar 2 dan 3. Hasil pemeriksaan imunohistokimia pada minggu ke-2 menunjukkan ada peningkatan ekspresi IL-1 β pada kelompok P1, P2 dan P3 yang berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan kelompok tikus tidak di ovariektomi (P0). Hal ini menunjukkan bahwa ovariektomi dapat menyebabkan peningkatan produksi dari IL-1, IL-

6, dan TNF α lebih lanjut. Kelompok tikus PO, yaitu tikus yang tidak diovariektomi menunjukkan ekspresi IL-1 β paling rendah, hal ini dikarenakan pada kelompok ini tidak terjadi defisiensi estrogen. Dalam keadaan normal estrogen dalam sirkulasi mencapai sel osteoblas, dan beraktivitas melalui reseptor yang terdapat di dalam sitosol sel tersebut, mengakibatkan menurunnya sekresi sitokin seperti: Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6) dan Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF- α), merupakan sitokin yang berfungsi dalam penyerapan tulang (Waters *et al.*, 1999).

Ekspresi IL-1 β pada P2 dan P3 pada minggu ke-2 lebih rendah dibanding P1, meskipun masih tinggi dibanding P0, hal ini dikarenakan proses yang sama dengan P1 yaitu akibat ovariektomi, tetapi karena P2 dan P3 diberikan terapi yaitu pada P2 dengan Raloxifen dan P3 dengan *Cissus quadrangularis* sehingga peningkatan ekspresi IL-1 β tidak terlalu tinggi. Raloxifen dapat menekan ekspresi IL-1 β dengan cara mengurangi aktivitas osteoklas, karena obat antiosteoporosis ini termasuk golongan antiresorptif dengan mekanisme kerjanya diduga melibatkan TGF β_3 yang dihasilkan oleh osteoblas dan osteoklas yang berfungsi menghambat

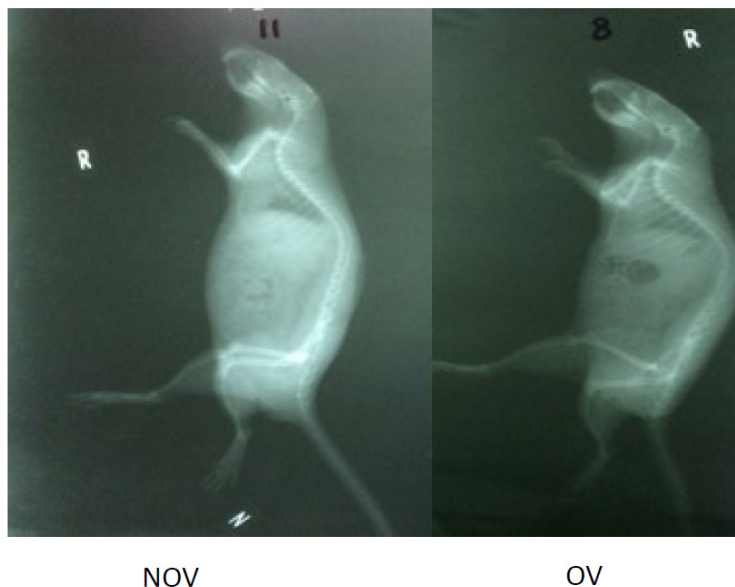
Tabel 1. Rata-rata dan Standar Deviasi Ekspresi IL-1 β pada Fraktur Femur Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) pada masing-masing Kelompok Perlakuan

No.	Kelompok Perlakuan	IL-1 β (Mg ke-2)	IL-1 β (Mg ke-6)
1.	P0 (NOV + Osteotomi + CMC Na)	4,8 \pm 1,3 ^a	6,8 \pm 1,3 ^a
2.	P1 (OV + Osteotomi + CMC Na)	11 \pm 2,12 ^b	16,8 \pm 1,8 ^d
3.	P2 (OV + Osteotomi + RLX)	7 \pm 1,41 ^c	11 \pm 1,6 ^b
4.	P3 (OV + Osteotomi + CQ)	8 \pm 1,41 ^c	12 \pm 1,41 ^b

Keterangan: - Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan ada perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) di antara perlakuan.
- Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan ada perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) di antara perlakuan.

deferensiasi osteoklas. Aksi raloksifen diperantarai oleh ikatan raloksifen pada reseptor estrogen (Cao *et al.*,2002; Rosen, 2005; Kanakamani and Tandon, 2008). *Cissus quadrangularis* menekan ekspresi

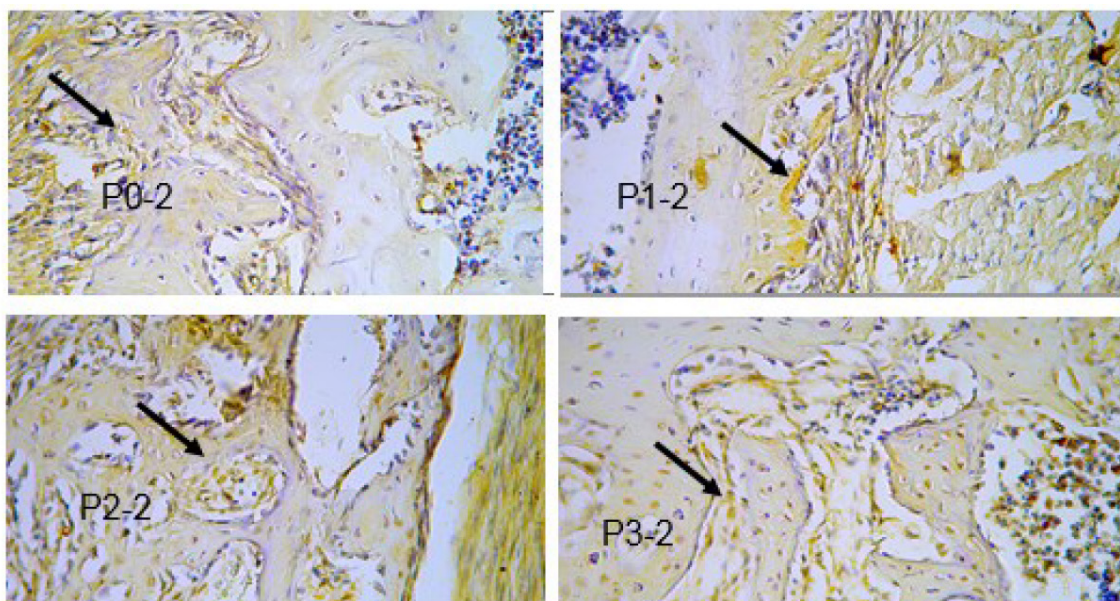
IL-1 β selain dengan cara meningkatkan aktivitas osteoblas, juga mempunyai efek antimikrobal sehingga dapat menekan tingkat inflamasi (Potu *et al.*, 2009).



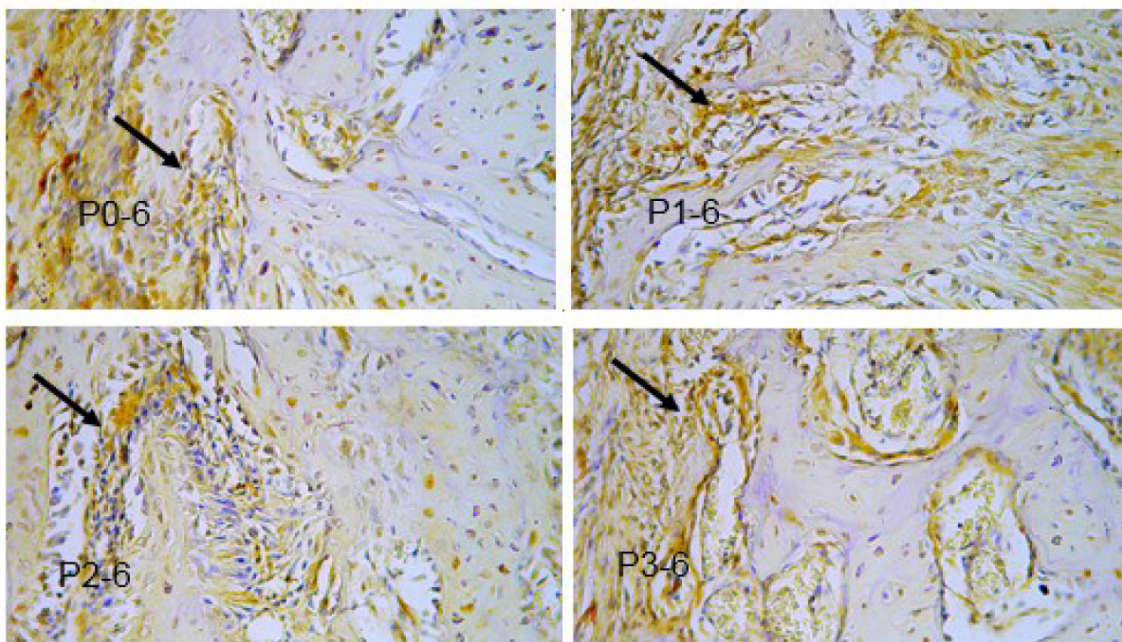
Gambar 1. Gambaran Radiologi densitas tulang antara tikus yang tidak diovariectomi (NOV) dengan tikus yang diovariectomi (OV)

Ekspresi IL1- β pada minggu ke-6, terjadi pola yang sama dengan minggu ke-2, yaitu ekspresi tertinggi terdapat pada kelompok P1 (OV), dan yang

terendah pada kelompok P0(NOV) yang berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan kelompok perlakuan yang lain.



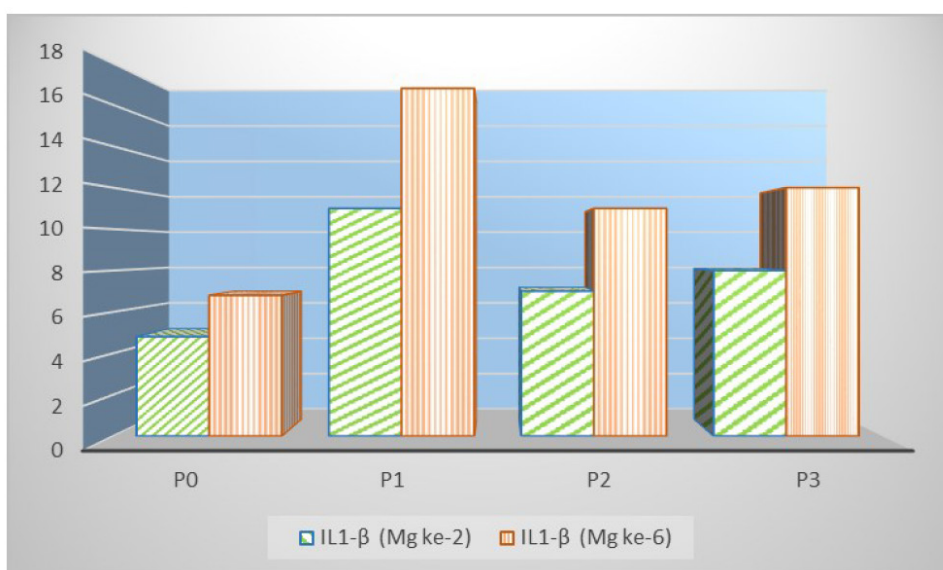
Gambar 2. Hasil pemeriksaan imunohistokimia ekspresi IL1- β minggu ke-2 pada semua kelompok perlakuan tanda panah menunjukkan sel yang mengekspresikan IL1- β (warna coklat) (pembesaran 400X)



Gambar 2. Hasil pemeriksaan imunohistokimia ekspresi IL1-β minggu ke-6 pada semua kelompok perlakuan tanda panah menunjukkan sel yang mengekspresikan IL1-β (warna coklat) (pembesaran 400X)

Hasil pemeriksaan imunohistokimia pada minggu ke-6 menunjukkan peningkatan ekspresi IL1-β pada semua kelompok tikus dibandingkan dengan hasil pemeriksaan pada minggu ke-2. (Gambar 4). Hal ini sesuai dengan pendapat Mountziaris and Mikos (2008), bahwa setelah fase proliferasi IL1-β

mengalami penurunan dan selanjutnya kadar IL1-β akan meningkat lagi pada fase remodeling berkaitan dengan fungsi IL1-β mendukung osteoklas dalam mengikis/merusak *hard callus* yang terbentuk dengan tujuan mengembalikan struktur asli dan kompetensi biomekanik tulang yang mengalami fraktur.



Gambar 4. Grafik Ekspresi IL1-β pada minggu ke-2 dan ke-6 pada semua kelompok perlakuan

Berdasarkan hasil penelitian ini, dapat membuktikan bahwa *Cissus quadrangularis* mampu menurunkan ekspresi IL-1 β pada tikus yang diovariectomi. Hal ini dibuktikan pada kelompok P2 dan P3, meskipun dalam kondisi defisiensi estrogen akibat ovariectomi, tetapi karena diterapi dengan raloxifen (P2) dan *Cissus quadrangularis* (P3), yang kedua bahan obat tersebut bekerja pada reseptor estrogen sehingga dapat membantu mengembalikan fungsi estrogen yang dalam keadaan normal bersirkulasi mencapai osteoblas, dan beraktivitas melalui reseptor yang terdapat di dalam sitosol sel tersebut, mengakibatkan menurunnya sekresi sitokin seperti: Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6) dan Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF- α), merupakan sitokin yang berfungsi dalam penyerapan tulang (Waters *et al.*, 1999).

Yamaguchi (2002) menyatakan bahwa phytoestrogen yang terkandung dalam *Cissus quadrangularis* yaitu isoflavon, ligni, coumestan, triterpan, glikosida, dan asiklik yang mampu mengikat reseptor beta estrogen pada osteoblas dan bisa merangsang proliferasi osteoblast. Mekanisme molekuler yang menjelaskan potensi *Cissus quadrangularis* dalam meningkatkan osteogenesis masih harus dieksplorasi. Namun, beberapa bukti menunjukkan bahwa pensinyalan Wnt mungkin mempunyai pengaruh yang cukup berarti, karena jalur Wnt ini telah terbukti mempunyai peran penting dalam mengendalikan osteoblastogenesis dan pembentukan tulang (Potu *et al.*, 2009).

Hasil yang sama juga ditunjukkan pada penelitian Muthusami *et al* (2011) yang menyatakan bahwa terapi ekstrak *Cissus quadrangularis* mampu menurunkan kadar IL-1 β pada media sell *human osteoblast like SaOS-2*, selanjutnya penurunan kadar

IL-1 β tersebut dapat memacu peningkatan protein IGFBP 3 yang berakibat penurunan proses degradasi protein yang menunjang proses kesembuhan tulang.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak *Cissus quadrangularis* dan Raloxifen mampu menurunkan aktivitas osteoklas pada tulang osteoporosis yang ditandai dengan menurunnya ekspresi IL-1 β dengan hasil yang tidak berbeda nyata, sehingga kedua bahan tersebut mampu menghambat resorpsi tulang dan kesembuhan fraktur osteoporosis tidak mengalami keterlambatan (*delayed union*).

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih diucapkan kepada Menristek-Dikti yang telah mendanai penelitian ini melalui skim Program Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi (PUPT), tahun anggaran 2015-2016

Daftar Pustaka

- Ardo K, Sunariani J. 2003. The Role of Interleukin-1 β , Interleukin-6, Tumour Necrosis Factor- α and Interferon γ in Bone Remodelling Process during Orthodontic Treatment. University of Airlangga;316-20
- Bell, NH. (2003). RANK ligand and the regulation of skletal remodeling. *J Clin Invest*; (111):1120-22.
- Cao Y, Mori S, Mashiba T, Westmore MS, Ma L, Sato M. (2002). Raloxifene, estrogen, and alendronate affect the processes of fracture repair differently in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res* 2002;17-12:2237-46.
- Claes, L., Recknagel, S., Ignatius, A. (2012). Fracture healing under healthy and inflammatory

- conditions. *Nat Rev Rheumatol* ;8:133–43.
- Deka, D.K., Lahon, L.C., Saikia, J., Mukit, A. (1994). Effect of *Cissus quadrangularis* in accelerating healing process of experimentally fractured radius - ulna of dog: A preliminary study. *Ind J Pharmacol* 26:44-8.
- Dimitriou R, Tsiridis E, and Giannoudis P V. 2005. Current concepts of molecular aspects of bone healing, *Injury* (vol. 36), No. 12, pp. 1392-404. URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16102764>.
- Flecknell, P. (2009). *Laboratory Animal Anaesthesia*. Academic Press is an imprint of Elsevier Edition 3rd.
- Gerstenfeld LC, Edgar CM, Kakar S, *et al*, 2007. Osteogenic Growth Factors and Cytokines and Their Role in Bone Repair. In (Bronner F, Farach-Carson MC, Mikos AG, eds). *Engineering of Functional Skeletal Tissues*. Springer-Verlag. London. 17-45.
- Ghozali, I. (2006). *Statistik Non-Parametrik Teori dan Aplikasinya dengan Program SPSS*. Badan Penerbit Universitas Diponegoro. Semarang.
- Jones, D.H., Kong, Y.Y., Penninger, J.M. (2002). Role of RANKL and RANK in bone loss and arthritis. *Ann Rheum Dis*;2:1132-9.
- Kalu, D.N. (1991) The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner.*;15(3): 175-91.
- Kanakamani, J., Tandon, N. (2008). Newer therapies in osteoporosis. *Indian Journal of Rheumatology. Review Article*. Vol.3, No 4; pp. 148–157
- Kaveh, K., Ibrahim, R., Abu Bakar, M.Z., and Ibrahim, T.A. (2010). Osteoporosis Induction in Animal Model. *Am. Jour. of Animal and Veterinary Sciences* 5 (2): 139-145
- Ke-Rong Dai and Yong-Qiang Hao. 2005. Quality of Healing Compared Between Osteoporotic Fracture and Normal Traumatic Fracture. Review. Department of Orthopaedics, Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University, school of Medicine, 639 Zhizaoju Road, Shanghai, China
- Killic, T.O. and Sagiroglu C. (2013). Anabolic Agents as New Treatment Strategy in Osteoporosis. *Intech Open Science*. hlm. 241-257.
- Kyllönen, L., D'Este, M., Alini, M., Eglin, D. (2015). Local drug delivery for enhancing fracture healing in osteoporotic bone. *Acta Biomaterialia* 11 412–434
- Malutan, A.M., Dan, M., Nicolae, C., Carmen, M. (2014). Proinflammatory and anti-inflammatory cytokine changes related to menopause. *Prz Menopausalny*; 13(3): 162-168
- Mountziaris, P.M, and Mikos, A.G. (2008). Modulation of the inflammatory response for enhanced bone tissue regeneration. *Tissue Engineering Part B: Reviews*; 14, 179-86
- Muthusami, S., Ramachandran, I, Krishnamoorthy, S., Govindan, R., Narasimhan, S. (2011). *Cissus quadrangularis* augments IGF system components in human osteoblast like SaOS-2 cells. *Growth Hormone & IGF Research* 21: 343–348
- Nazrun, A.S., Norazlina, Norliza M., and Nirwana S.I. (2012). The Anti-Inflammatory Role of Vitamin E in Prevention of Osteoporosis. *Advances in Pharmacological Sciences*. Volume 2012, Article ID 142702, 7 pages
- Nikolaou, V.S., Efstathopoulos, N., Kontakis, G., Kanakaris, N.K., Giannoudis, P.V. (2009). The influence of osteoporosis in femoral fracture healing time. *Injury* ;40:663–8.
- Parisuthiman, D., Singhatanadgit, W., Dechatiwongse, T., Koontongkaew, S. (2009). *Cissus quadrangularis* extract enhances biomineralization through up-regulation of MAPK-dependent alkaline phosphatase activity in osteoblasts. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal*;45: 194-200.
- Potu, B.K., Bhat, K.M.R, Rao, M.S., Nampurath, G.K., Chamallamudi, M.R., Nayak, S.R., Muttigi, M.S. (2009). Petroleum ether extract of *cissus quadrangularis* (linn.) enhances bone marrow mesenchymal stem cell proliferation and facilitates osteoblastogenesis. *Clinics*.;64(10):993-998.
- Rosen dan Clifford. (2005). Postmenopausal Osteoporosis. *N Engl J. Med.*;353: 595-603

- Sabri, M., Nurhidayat, Sigit, K., Priosoeryanto, B.P., Manalu, W. (2009). Analysis of phytochemical and mineral content of Sipatah-patah Plant (*Cissus quadrangularis*) from Aceh as osteoporosis premedication. *J Rona Lingkungan* 2: 109-117.
- Schmidt-Bleek K, Schell H, Kolar P, Pfaff M, Perka C, Buttgerit F, Duda G and Lienau J. 2009. Cellular composition of the initial fracture hematoma compared to a muscle hematoma: A study in sheep, *J Orthop Res* (vol. 27), No. 9, pp. 1147-51. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19382195
- Sfeir C, Ho L, Doll BA, *et al* (2005). Fracture Repair. In (Lieberman JR, Friedlander GE, eds). *Bone Regeneration and Repair, Biology and Clinical Application* Humana Press, Totowa. New Jersey. 21-44.
- Shirwaikar, A., Khan, S., Malini, S. (2003). Antiosteoporotic effect of ethanol extract of *Cissus quadrangularis* Linn. on ovariectomized rat. *J Ethnopharmacol* 89: 245-250
- Waters, K.M., Rickard, D.J., Gebhart, J.B. (1999). Potential roles of estrogen receptor- α and - β in the regulation of human osteoblast functions and gene expression. The menopause at the millenium. *The Proceeding of the 9th International Menopause Society World Congress on Menopause*. October 17-21; Yokohama, Japan.
- Xu, S.W., Yu, R., Zhao, G.F., Wang, J.W. (2003). Early period of fracture healing in ovariectomized rats. *Chin J Traumatol*. 6:160-6.
- Yamaguchi, M. (2002). Isoflavone and bone metabolism: its cellular mechanism prevention role in bone loss. *J. Health Sci*. 48(3):209-220.
- Zaid, S.S.M., Sulaiman, S.A., Othman, N.H., Soelaiman, I.-N., Shuid, A.N., Mohamad, N. and Muhamad, N. (2012). Protective Effects of Tualang Honey on Bone Structure in Experimental Postmenopausal Rats. *J. Clinics*, vol. 67, no. 7, pp. 779-784.

Ekstrak Air Rumput Kebar (*Biophytum petersianum Klotzch*) sebagai Penghambat Perkembangan Telur Cacing Gastrointestinal Ruminansia Secara in Vitro

Kebar Grass (Biophytum petersianum klotzch) Extract as in vitro ruminant gastrointestinal worms Egg's Growth Deterrent.

Alnita Baaka, Isti Widayati, Noviyanti

Fakultas Peternakan, Universitas Papua, Manokwari, Papua Barat
Email:alnita.baaka@gmail.com

Abstract

Gastrointestinal worm disease in cattle is scathing for the breeder's as it lowers cattle's productivity and inflict major economic loss. Furthermore, the interaction between cattle, man and the environment might bring out the risk of zoonotic diseases (diseases which can spread between man and animals). Kebar grass contains phytochemical elements such as alkaloid, saponin, tannin, glycoside and flavonoid. Those elements have the potential as an alternate anthelmintic in the effort to utilize the endemic biodiversities of Papua. This research is performed at Faculty of Animal Husbandry Animal Health Laboratory and Faculty of Math and Natural Science Microbiology Laboratory of Universitas Papua, for 8 months. The leaves and the stems of the kebar grass were collected and stored at room temperature. The Kebar grass extract was divided into 3 parts, i.e. fresh extract, wind dried extract and sun dried extract. Fresh fecal samples were collected and examined with the native method. The samples where nematodes eggs are found is treated with kebar grass extract. As a comparison, positive control is made with oxfendazole and negative control is made nematodes larvae fertilization. Fecal cultures and grass extract mixture is left alone for 7 days in room temperature and examined under microscope with 400x fortification to see whether there is any development of the nematodes' eggs. The obtained data is analyzed by tabulation and descriptive method. The result is the samples mixed with kebar grass extract show no development of nematodes' egg. As a comparison, the negative control which is observed with baerman method shows development of nematodes' eggs. It can be concluded that the effect of kebar grass extract can deter nematodes' egg development.

Key words : nematodes egg, gastrointestinal, kebar grass (*Biophytum petersianum Klotzch*), *liquid extract, anthelmintik*

Abstrak

Penyakit cacing gastrointestinal pada ternak sapi sangat merugikan peternak karena dapat menurunkan produktivitas ternak dan menimbulkan kerugian ekonomi yang sangat besar. Selain itu, adanya interaksi antara ternak, manusia dan lingkungan memunculkan kemungkinan timbulnya bahaya penyakit zoonosis (penyakit yang dapat menular antara ternak dan manusia). Rumput Kebar (*Biophytum petersianum Klotzch*) mengandung bahan fitokimia seperti alkaloid, saponin, tanin, glikosida dan flavonoid. Bahan-bahan tersebut memiliki potensi sebagai anthelmintik alternatif dalam upaya pemanfaatan keanekaragaman hayati endemik Papua. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kesehatan Hewan FAPET dan Laboratorium Mikrobiologi FMIPA UNIPA Manokwari, selama 8 bulan. Bagian daun dan batang dari rumput kebar dikoleksi kemudian disimpan pada suhu ruang. Ekstrak air rumput kebar dibagi 3 yaitu ekstrak rumput kebar segar, kering angin dan kering jemur di bawah matahari. Sampel feses segar dikoleksi dan diperiksa dengan metode natif. Feses yang ditemukan telur cacing nematoda diberi perlakuan dengan ekstrak air rumput kebar. Sebagai pembanding, dibuat kontrol positif dengan oxfendazole dan kontrol negatif dengan pemupukan larva cacing. Kultur feses dan ekstrak dibiarkan selama 7 hari pada suhu ruangan, dan diperiksa menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 400x, untuk melihat ada tidaknya perkembangan telur cacing. Data yang diperoleh dianalisis secara tabulasi dan deskriptif. Hasil yang diperoleh yakni pada ekstrak air rumput kebar segar dan kering angin juga kontrol positif tidak ditemukan adanya perkembangan telur cacing, sebagai pembanding pada kontrol negatif dengan menggunakan metode baerman ditemukan adanya larva cacing yang berkembang. Sehingga dapat disimpulkan bahwa pengaruh ekstrak air rumput kebar dapat menghambat perkembangan telur cacing nematoda.

Kata Kunci: Telur nematoda, gastrointestinal, rumput Kebar (*Biophytum petersianum Klotzch*), ekstrak air, anthelmintik

Pendahuluan

Penyakit cacing gastrointestinal pada ternak sapi sangat merugikan peternak dengan menurunkan produktivitas ternak dan menimbulkan kerugian ekonomi yang sangat besar. Selain itu, adanya interaksi antara ternak, manusia dan lingkungan memunculkan kemungkinan timbulnya bahaya penyakit ini bersifat zoonosis (penyakit yang dapat menular antara ternak dan manusia).

Di Indonesia angka kejadian cacingan pada sapi sebagai salah satu jenis ternak sangat bervariasi, yaitu sebesar 96% di Padang (Harminda, 2011), 61,46% di Palembang (Nofyan *et al.*, 2010), 75% di Kabupaten Gowa Sulawesi Selatan (Purwanta *et al.*, 2009), 44,23% di Kabupaten Manokwari (Junaidi *et al.*, 2014), 47% di eks-Karesidenan Banyumas (Munadi, 2011), 62,5% di Kabupaten Purworejo, 70,7% di Kabupaten Magelang, 71,1% di Kabupaten Boyolali, 66,8% di Kabupaten Klaten, 57,4% di Kabupaten Wonogiri, 58,6% di Kabupaten Karanganyar, 64% di Kabupaten Temanggung dan 69,3% di Kabupaten Batang (Purwaningsih, 2013).

Berdasarkan pengetahuan tentang siklus hidup cacing baik itu di hewan/manusia sebagai inang (*hospes*), hewan/manusia sebagai perantara (*reservoir*) dan lingkungan, maka cara yang paling tepat untuk mengurangi ataupun mengeliminir infeksi cacing gastrointestinal adalah dengan memutus atau mengganggu siklus hidup cacing. Pemberian obat cacing komersil merupakan sampai saat ini masih digunakan untuk memutus atau mengganggu siklus hidup cacing. Pada prakteknya, pemberian obat cacing komersil ini memiliki beberapa kelemahan antara lain harga yang tidak terjangkau oleh peternak, serta komponen obat cacing mengandung beberapa residu kimia yang bersifat toksik (Kaemmerer dan Butenkotter, 1973). Penggunaan obat cacing pada

hewan ternak menyebabkan residu kimia terdapat pada daging hewan. Apabila pemberiannya dalam waktu singkat sebelum hewan dipotong, residu tersebut akan membahayakan kesehatan manusia apabila daging tersebut dikonsumsi.

Pengobatan anthelmentik menggunakan tanaman merupakan produk natural, ramah lingkungan dan dapat dijangkau dengan harga yang murah. Pengobatan menggunakan tanaman saat ini merupakan salah satu topik penelitian yang saat ini sangat didukung oleh berbagai lembaga penelitian di berbagai negara karena mampu mengangkat nilai-nilai keanekaragaman hayati dan konservasi. Penelitian tentang tanaman herbal sebagai anthelmentik dan obat-obatan lainnya bagi hewan di Tanah Papua sendiri masih sangat dibutuhkan mengingat kurangnya petugas kesehatan hewan di berbagai daerah serta kondisi geografis yang sangat sulit dijangkau untuk pengobatan konvensional dari petugas kesehatan hewan.

Rumput Kebar (*Biophytum petersianum* Klotzch) sebagai tanaman endemik Papua telah diteliti memiliki berbagai khasiat diantaranya sebagai antiinflamasi, imunostimulan, serta mampu meningkatkan performa reproduksi hewan (Sadsoeitoeboen, 2005; Grønhaug, *et al.*, 2008; Unitley, 2013). Di negara Afrika, tumbuhan ini digunakan sebagai obat luka karena sengatan dan gigitan ular, serta sebagai obat sakit perut (Inngjerdigen, *et al.*, 2004; 2006; 2008).

Beberapa jenis senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada tanaman yang memiliki efek anthelmentik yaitu alkaloid, minyak atsiri, flavonoid, saponin, enzim serta tanin terkondensasi. Senyawa ini terbukti secara ilmiah mampu bekerja secara *in vitro* dan *in vivo* untuk menghambat pertumbuhan berbagai stadium cacing atau membunuh cacing

dewasa gastrointestinal pada ternak. Beberapa komponen tanaman tersebut seringkali lebih efektif ketika bekerja secara sinergis sebagai anthelmintik (Hrckova, *et al.*, 2013). Adanya kandungan fitokimia seperti alkaloid, saponin, tanin, dan flavonoid yang terkandung dalam rumput kebar, diharapkan memiliki potensi sebagai anthelmintika alternatif serta merupakan salah satu upaya dalam pemanfaatan keanekaragaman hayati endemik di Papua. Tujuan dari penelitian ini adalah melihat pengaruh ekstrak air rumput kebar terhadap daya hambat pertumbuhan cacing gastrointestinal pada ternak. Diperoleh ekstrak air rumput kebar yang dapat menghambat pertumbuhan cacing gastrointestinal pada ternak bagi khasanah pengembangan ilmu pengetahuan khususnya bagi peternak-peternak yang berdomisili di Papua.

Materi dan Metode

Tempat Penelitian

Sampel yang diambil adalah sampel Rumput Kebar segar. Pengambilan sampel rumput Kebar segar dilakukan di Distrik Kebar yang berjarak 150 km Barat Daya dari kota Manokwari yang dapat ditempuh dengan pesawat udara selama 45 menit atau dengan kendaraan darat selama 10 – 12 jam. Pengambilan sampel feses dilakukan dengan mengambil sampel feses segar dari sapi pada Distrik Prafi, Kabupaten Manokwari. Percobaan *in vitro* dilaksanakan di laboratorium Kesehatan Hewan FAPET dan Laboratorium Mikrobiologi FMIPA, Universitas Papua.

Pengumpulan dan penyediaan Rumput Kebar

Bahan yang digunakan adalah Rumput Kebar segar. Sebelum digunakan dan dibuat ekstrak,

rumpun dibersihkan. Bagian rumput yang digunakan adalah daun, batang, dan akar. Selanjutnya sampel dibagi menjadi tiga, untuk dibuat ekstrak yakni rumput kebar segar, kering angin, dan kering dengan penjemuran dibawah sinar matahari.

Pembuatan ekstrak Rumput Kebar segar

Sebanyak 50 gram Rumput Kebar segar yang belum lama dicabut dicuci dengan air hingga bersih. Seluruh bagian rumput (daun, batang, dan akar) direndam dalam air 200 ml yang bersuhu 90°C. Rumput dan air diaduk hingga dingin, kemudian diblender. Campuran rumput dan air disaring, supernatan disimpan pada refrigerator suhu 4°C untuk penggunaan selanjutnya (Kardel, *et. al.*, 2013).

Pembuatan ekstrak Rumput Kebar kering angin

Rumput Kebar segar dikeringkan pada suhu kamar (25-30°C) selama 7 hari. Setiap dua kali sehari rumput dibolak-balik untuk mempercepat proses pengeringan. Setelah 7 hari, sebanyak 50 gr rumput kebar yang telah dikeringkan dijadikan serbuk dengan menggunakan blender. Serbuk rumput kebar direndam dalam 400 ml air lalu diinkubasi pada suhu 90°C selama 2 jam. Setelah dingin, larutan ini kemudian disimpan pada refrigerator suhu 4°C untuk penggunaan selanjutnya.

Pembuatan ekstrak Rumput Kebar Kering di bawah Matahari

Rumput Kebar segar dikeringkan di bawah sinar matahari (25-30°C) selama 7 hari. Setiap pagi rumput dijemur dan sore hari rumput dipindahkan di ruangan tertutup. Setelah 7 hari, sebanyak 50 gr rumput kebar yang telah dijemur dijadikan bubuk menggunakan blender. Bubuk direndam dalam 400 ml air lalu diinkubasi pada suhu 90°C selama 2 jam.

Setelah dingin, larutan ini kemudian disimpan pada refrigerator suhu 4°C untuk penggunaan selanjutnya.

Penyiapan Sampel Feses

Sampel feses yang akan digunakan dalam pengujian ini adalah sampel feses sapi yang terinfeksi cacing nematoda. Pada tahapan survei awal, feses sapi diambil dari rektum melalui palpasi rektal, lalu dimasukkan ke dalam tabung berisi formalin 10% untuk tujuan pemeriksaan ada tidaknya telur cacing nematoda dengan metode natif (lokasi pengambilan sampel feses yang jauh). Sampel feses sapi yang positif mengandung telur cacing nematoda selanjutnya dikoleksi ulang tanpa menggunakan formalin 10%, kemudian simpan pada suhu kamar untuk kepentingan perlakuan, kontrol positif, dan kontrol negatif.

Aplikasi ekstrak rumput kebar dalam penghambatan perkembangan telur cacing nematoda

Aplikasi rumput kebar dalam penghambatan perkembangan telur cacing nematoda dibagi dalam 3 perlakuan (ekstrak rumput kebar segar, ekstrak rumput kebar kering angin, dan ekstrak rumput kebar kering jamur). Pengulangan sebanyak 3 kali pada setiap sampel sehingga jumlah sampel yang diberi perlakuan sebanyak 9 sampel ditambah masing-masing sebanyak 1 kontrol positif dan 1 kontrol negatif sebagai pembanding.

1. Perlakuan : Setiap ekstrak rumput kebar 16 ml (segar, kering angin, kering jamur) dicampur dengan 3 gram feses sapi yang positif mengandung telur cacing nematoda.
2. Kontrol positif : Sebanyak 1 gram oxfendazole dicampur dengan 8 ml air dan 3 gram feses.

3. Kontrol negatif dengan metode kultur larva (pupukan larva) :

Sampel tinja dimasukkan ke dalam cawan atau nampan dan tambahkan vermiculate atau dapat diganti dengan arang atau serbuk kayu yang gunanya untuk menjaga kelembaban dengan perbandingan 1 : 1 kemudian diaduk hingga campurannya kelihatan halus dan merata sambil diberi air secukupnya agar pupukan larva menjadi lembab tetapi tidak basah. Selanjutnya campuran tersebut dimasukkan ke dalam botol selai atau cawan petri dan ratakan permukaannya sambil ditekan perlahan hingga kelihatan agak padat, kemudian bersihkan dinding botol bagian atas permukaan pupukan dari sisa kotoran yang menempel menggunakan kapas/tissue, selanjutnya botol tersebut ditutup agak longgar dan diberi label. Pupukan larva simpan pada suhu kamar dan tidak kena sinar matahari langsung selama 7 - 9 hari, setiap 2-3 hari sekali pupukan larva tersebut dilihat/diperiksa agar kelembabannya terjaga dan bila kelihatan agak kering tambahkan air secukupnya dengan cara disemprot menggunakan hand spray. Ketiga sampel perlakuan, kontrol positif dan negatif disimpan pada suhu ruang selama 7 hari. Pada hari ke 7 dilakukan pengamatan perkembangan larva.

4. Pemanenan kultur larva :
Pemisahan larva infeksi dari feses dilakukan dengan Metode *Baermann* (Gibbons *et al.*, 2014) yang telah dimodifikasi, yaitu sebuah corong kaca dimasukkan ke dalam gelas kerucut berisi air yang hampir penuh. Pada mulut corong kaca di atasnya diletakkan feses sapi yang telah dikultur selama 7 hari. Feses

dibiarkan terendam pada corong kaca selama 30 menit. Larva akan turun dengan sendirinya pada air di dalam gelas. Larva yang berada di dasar gelas diambil menggunakan pipet kemudian ditetaskan pada *object glass* ditutup dengan kaca penutup dan diamati di bawah mikroskop.

Analisis data

Data yang diperoleh kemudian dianalisis secara tabulasi dan deskriptif.

Hasil dan Pembahasan

Penelitian efek ekstrak air rumput Kebar sebagai penghambat perkembangan telur cacing gastrointestinal ruminansia secara *in vitro* dilakukan pada 3 kelompok perlakuan dengan masing-masing 3 kali replikasi. Kelompok 1 perlakuan feses yang mengandung telur cacing direndam dengan ekstrak air rumput kebar segar (50 gram rumput dengan 200 ml air), kelompok 2 perlakuan feses yang mengandung telur cacing direndam dengan ekstrak air rumput kebar kering angin (50 gram dengan 400 ml air), kelompok 3 perlakuan feses yang mengandung telur cacing direndam dengan ekstrak air rumput Kebar kering jemur matahari (50 gram dengan 400 ml air). Sebagai kontrol negatif larva cacing diperoleh dari hasil pemupukan larva pada feses, sebagai kontrol positif feses yang mengandung telur cacing direndam dalam obat cacing oxfendazol. Dalam penelitian penghambatan perkembangan telur cacing ini, pengamatan dan pencatatan hasil pengamatan dilakukan setiap hari selama 7 sampai 9 hari. Telur cacing nematoda pada saluran gastrointestinal ruminansia akan mengalami perkembangan pada

lingkungan dan feses kemudian menetas menjadi larva pada hari ke 7 (Kosasih, 2003).

Sampel feses yang digunakan dalam penelitian ini adalah feses sapi yang telah diperiksa terlebih dahulu dengan metode natif. Hasil pemeriksaan natif menunjukkan sampel feses positif mengandung telur cacing nematoda. Adapun tahapan dalam penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 1 - 4.



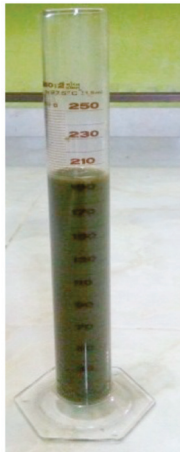
Gambar 1. Rumput Kebar Segar



Gambar 2. Penghalusan Rumput Kebar Menggunakan Blender



Gambar 3. Penyaringan Ekstrak Segar Rumput Kebar

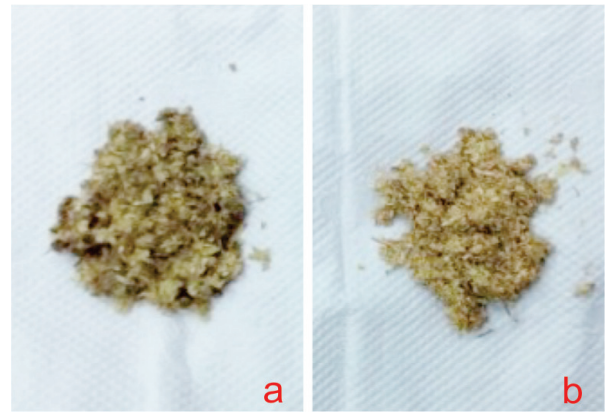


Gambar 4 Sediaan Ekstrak Segar Rumput Kebar

Proses pembuatan ekstrak rumput kebar kering angin dan kering jemur pada penelitian ini ditampilkan pada Gambar 05 sampai 07.



Gambar 5. Penghalusan Rumput Kebar



Gambar 6. Serbuk Rumput Kebar Kering (a) kering angin; (b) kering jemur



Gambar 7. Ekstrak rumput Kebar kering

Aplikasi ekstrak rumput kebar terhadap telur cacing nematoda, kontrol positif dan kontrol negatif ditampilkan pada Gambar 08.

Hasil pengamatan dari aplikasi ekstrak rumput kebar terhadap perkembangan telur cacing nematoda gastrointestinal sapi dapat dilihat pada Tabel 1.



Gambar 8. a – c. Aplikasi ekstrak rumput kebar terhadap telur cacing nematoda d. Kontrol positif (Oxfendazole) e. Kultur larva cacing

Tabel 1. Hasil pengamatan perkembangan telur cacing nematoda

Perlakuan	Pengamatan hari ke							Keterangan
	1	2	3	4	5	6	7	
Ekstrak air rumput kebar segar								
Replikasi 1	-	-	-	-	-	-	+	Ada telur cacing (tipe Strongyl) tapi tidak berkembang (embrio di dalam telur tetap segmented dan tidak menetas menjadi larva sampai hari ke 7)
Replikasi 2	-	-	-	-	-	-	-	-
Replikasi 3	-	-	-	-	-	-	-	-
Ekstrak air rumput kebar kering angin								
Replikasi 1	-	-	-	-	-	-	-	-
Replikasi 2	-	-	-	-	-	-	+	Ada telur cacing (tipe Strongyl), tapi tidak berkembang
Replikasi 3	-	-	-	-	-	-	+	Ada telur cacing (tipe Strongyl), tapi tidak berkembang
Ekstrak air rumput kebar kering matahari								
Replikasi 1	-	-	-	-	-	-	-	-
Replikasi 2	-	-	-	-	-	-	-	-
Replikasi 3	-	-	-	-	-	-	-	-
Kontrol positif (Oxfendazole)								Ada telur cacing (<i>Trichuris</i> sp.) tapi tidak berkembang
Kontrol negatif (kultur larva)								Ada perkembangan telur cacing menetas menjadi larva cacing

Ket. (+) : tidak ada perkembangan telur cacing, (-) : ada perkembangan telur cacing

Pengamatan pada sampel yang diberikan ekstrak air rumput kebar dilakukan setiap hari. Tabel 1 menunjukkan perkembangan telur cacing tipe strongyl dari gastrointestinal sapi dapat dihambat dengan perlakuan ekstrak air rumput kebar segar dan ekstrak air rumput kebar kering angin setelah pengamatan sampai hari ke 7, sehingga tidak dilakukan pemanenan. Telur cacing yang tidak berkembang karena ditambahkan ekstrak rumput kebar segar dan ekstrak rumput kebar kering angin dapat dilihat pada Gambar 9.

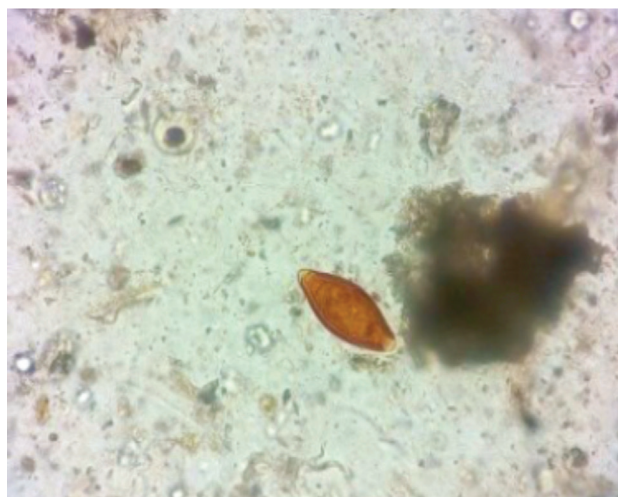
Hasil yang diperoleh ini sama seperti pada kontrol positif dengan oxfendazol yang juga dapat menghambat perkembangan telur cacing dari jenis *Trichuris* sp seperti pada Gambar 10. Berbeda halnya pada kontrol negatif yang mana tidak dilakukan pengamatan setiap hari. Selain itu feses tidak diberi penambahan ekstrak rumput kebar ataupun obat cacing sintetik menunjukkan adanya perkembangan

telur cacing dan menetas menjadi larva setelah pengamatan pada hari ke 7. Larva cacing nematoda dari kontrol negatif dapat dilihat pada Gambar 12.

Dengan demikian, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak air rumput kebar dan obat cacing oxfendazol memiliki efek dapat menghambat perkembangan telur cacing gastrointestinal sapi. Pada ekstrak air rumput kebar kering jemur matahari tidak ditemukan telur cacing maupun larva cacing setelah 7 hari, hal ini mungkin disebabkan karena jumlah telur cacing yang terlalu sedikit sehingga tidak dapat diamati. Selain itu dapat juga dipengaruhi oleh proses pengeringan rumput kebar dengan paparan sinar matahari langsung ternyata dapat mengurangi bahkan menghilangkan kandungan fitokimia pada tanaman berkhasiat obat (Hernani, 2009). Berdasarkan hasil yang diamati, dapat disimpulkan bahwa pengaruh ekstrak air rumput kebar dapat menghambat perkembangan telur cacing nematoda.



Gambar 9. Telur cacing pada ekstrak rumput Kebar segar & kering angin (strongyl)



Gambar10. Telur cacing pada kontrol positif (trichuris)



Gambar 11. Pemanenan larva cacing dari kontrol negatif



Gambar12. Perkembangan telur cacing menjadi larva

Kesimpulan

Penelitian dapat disimpulkan bahwa ekstrak air rumput kebar dapat mempengaruhi penghambatan perkembangan telur cacing nematoda.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi melalui Penelitian Dosen Pemula.

Daftar Pustaka

- Deari Hata Harminda. 2011. Infestasi Parasit Cacing *Neoscaris vitulorum* pada Ternak Sapi Pesisir di Kecamatan Lubuk Kilangan Kota Padang. Skripsi. Fakultas Peternakan, Universitas Andalas.
- Dhewiyanty V, Tri RS dan Ari HY. 2015. Prevalensi dan Intensitas Larva Infektif Nematoda Gastrointestinal Strongylida dan Rhabditida pada Kultur Feses Kambing (*Capra*, sp.) di Tempat Pemotongan Hewan Kambing Pontianak. *Jurnal Protobiont*. Vol. 4 (1): 178-183.

- Gibbons LM, Jacobs DE, Fox MT, and Hansen J. 2014. The RVC/FAO Guide to Veterinary Diagnostic Parasitology. Diakses 5 Mei 2017. <http://www.rvc.ac.uk/Review/Parasitology/Index/Index.htm>
- Grønhaug TE, Glæserud S, Skogsrud M, Ballo N, Bah S, Diallo D, Paulsen BS. 2008. Ethnopharmacological survey of six medicinal plants from Mali, West-Africa. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. 4:26.
- Hernani dan Nurdjanah R. 2009. Aspek Pengeringan dalam Mempertahankan Kandungan Metabolit Sekunder pada Tanaman Obat. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian Bogor. *Perkembangan Teknologi TRO 21* (2). ISSN 1829-6289. Hal: 33-39.
- Hrckova G dan Velebny S. 2013. Pharmacological Potential of Selected Natural Compounds in the Control of Parasitic Diseases, Springer Briefs in Pharmaceutical Science & Drug Development, DOI: 10.1007/978-3-7091-1325-7_2.
- Inngjerdigen KT, Nergard CS, Diallo D, Mounkoro PP, Paulsen BS. 2004. An ethnopharmacological survey of plants used for wound healing in Dogonland, Mali, West Africa. *Journal of ethnopharmacology*. 92:233244.
- Inngjerdigen KT, Coulibaly A, Diallo D, Michaelsen TE, Paulsen BS. 2006. A complement fixing polysaccharide from *Biophytum petersianum* Klotzsch, a medicinal plant from Mali, West Africa. *Biomacromolecules* 7:48-53.
- Inngjerdigen M, Inngjerdigen KT, Patel TR, Allen S, Chen X, Rolstad B, Morris GA, Harding SE, Michaelsen ET, Diallo D, Paulsen BS. 2008. Pectic polysaccharides from *Biophytum petersianum* Klotzsch, and their activation of macrophages and dendritic cells. *Glycobiology* 18(12):1074-1084.
- Junaidi M., Sambodo P., Nurhayati D. 2014. Prevalensi Nematoda pada sapi Bali di Kabupaten Manokwari. *Jurnal Sain Veteriner* FKH UGM. Vol. 32 No.2.
- Kaemmerer, K., Butenkotter, S., 1973. The problem of residues in meat of edible domestic animals after application or intake of organophosphate esters. *Residue Res.* 46.1.
- Kardel, M., Taube F., Schulz H., Schutze W., and Gierus M. 2013. Different approaches to evaluate tannin content and structure of selected plant extracts-review and new aspects. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 86: 154-166.
- Kosasih, Z. 2003. Metode Larval Culture sebagai Teknik Untuk Mengidentifikasi Jenis Cacing Nematoda Saluran Pencernaan pada Ruminansia Kecil. Balai Penelitian Veteriner Bogor. *Prosiding Temu Teknis Fungsional Non Peneliti*: 74-80.
- Munadi. 2011. Tingkat Infeksi Cacing Hati Kaitannya dengan Kerugian Ekonomi Sapi Potong yang disembelih di Rumah Potong Hewan Wilayah Eks-Kresidenan Banyumas. *Agripet* Vol.11 (1):45-50.
- Nofyan E., Kamal M., dan Rosdiana I. 2010. Identitas Jenis Telur Cacing Parasit Usus pada Ternak Sapi (*Bos sp.*) dan Kerbau (*Bubalus sp.*) di Rumah Potong Hewan Palembang. *Jurnal Penelitian Sains*. 10:06-11.
- Purwaningsih. 2013. Kajian Lintas sektoral dan Analisis Nilai Ekonomi Infestasi Parasit Gastrointestinal pada Pedet di Jawa Tengah. [Thesis]. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada.
- Purwanta, Nuraeni, Hutauruk JD. dan Setiawaty S. 2009. Identifikasi Cacing Saluran Pencernaan (Gastrointestinal) pada Sapi Bali melalui Pemeriksaan Tinja di Kabupaten Gowa. *Jurnal Agrisistem* Vol.5(1):10-21.
- Sadsoeitoeboen PD. 2005. Manfaat Ekstrak Rumput Kebar (*Biophytum petersianum*) terhadap Penampilan Reproduksi Mencit Putih Betina. [Tesis]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.

Morfologi Hemipenis Biawak Air (*Varanus salvator bivittatus*)

Morphology of the Hemipenes of Water Monitor lizard (Varanus salvator bivittatus)

Mahfud¹, Adi Winarto², Chairun Nisa²

¹Program Studi Pendidikan Biologi, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan,
 Universitas Muhammadiyah Kupang
 Jl. KH. Ahmad Dahlan No. 17 Walikota Kupang-NTT, 82558
 Email : mahfud.aph@gmail.com

²Bagian Anatomi, Histologi dan Embriologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor
 Jl. Agatis Kampus IPB Dramaga Bogor 16680
 Email : winawyn@yahoo.com, 4chnisa@yahoo.com

Abstract

Varanus salvator bivittatus has a pair of hemipenes, which is macroscopic anatomically like the copulatory organ in other amniotes, cylindrical-shaped (*truncus*) with quite flexible, and it located on the base of the caudal tail of the cloaca. However, information about the microscopic anatomy of hemipenes of this animal is scientifically unpublicized. Therefore, the aim of this research is to study the microscopic anatomy of hemipenes of male *Varanus salvator bivittatus*. The animals were sacrificed by exsanguination under deep anesthetized and fixed in 4 % paraformaldehyde through perfusion then observed visceral site and morphometric. Histomorphological evaluation was obtained by paraffin preparation with section thickness of 3-4 μm then stained in Hematoxylin-Eosin (HE) and Masson's Trichrome (MT). The results showed that truncus of hemipenes was lined by stratified squamous epithelium and supported with thick of dense connective tissue and contain cavernous body and blood vessels are found, the muscles not found. The presence of connective tissue that supported in the down part sometimes make hemipenes are rigid while prurient condition. In the caudal of truncus hemipenes there is retractor muscle of hemipenes which arranged by striated muscles. Hemipenes is flexible because contain with much of blood vessel that found in truncus hemipenes.

Keyword: *Varanus salvator bivittatus*, hemipenes, morphology.

Abstrak

Hemipenis biawak *Varanus salvator bivittatus* secara morfologi seperti organ kopulatori pada amniota lainnya, berjumlah sepasang, berbentuk silinder (*truncus*) yang cukup fleksibel dan terletak di pangkal ekor kaudal dari kloaka. Sejauh ini publikasi ilmiah mengenai struktur mikroskopis hemipenis hewan ini belum ditemukan. Oleh Karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mempelajari morfologi hemipenis *Varanus salvator bivittatus* jantan, baik secara makroskopis maupun mikroskopis. Dua ekor biawak jantan dewasa yang digunakan dalam penelitian ini dianestesi, dilakukan *exanguinasi*, dan difiksasi dengan paraformaldehid 4% secara perfusi. Sampel jaringan untuk sediaan histologis dibuat dengan metoda parafin. Blok parafin disayat dengan ketebalan 3-4 μm , diwarnai dengan *hematoxylin eosin* (HE) dan *Masson's trichrome* (MT). Hasil pengamatan menunjukkan bahwa mukosa *truncus* hemipenis dilapisi oleh epitel pipih banyak lapis, ditunjang oleh jaringan ikat padat yang di bawahnya ditemukan *corpus cavernous* dengan banyak pembuluh darah, namun tidak ditemukan adanya otot. *Corpus cavernous* dengan banyak pembuluh, menyebabkan hemipenis ini bersifat mudah membesar, namun kaku karena ditopang oleh jaringan ikat padat. Bagian kaudal *truncus* hemipenis terdapat otot retractor hemipenis yang disusun oleh lurik.

Kata Kunci: *Varanus salvator bivittatus*, *truncus* hemipenis, morfologi.

Pendahuluan

Varanus salvator bivittatus adalah subspecies dari *Varanus salvator* atau yang dikenal dengan biawak air. Hewan ini merupakan subspecies biawak endemik Indonesia yang hanya ditemukan di Jawa (Canto, 2007), Bali dan Nusa Tenggara (kecuali Pulau Timor) (Shine *et al.*, 1996).

Biawak air termasuk kategori Appendiks II dalam daftar CITES (The Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora) (Gumilang dkk., 2003). Hal ini berarti biawak air dapat diperdagangkan di pasar internasional dengan kuota yang telah ditetapkan. Hasil survei menunjukkan bahwa lebih dari satu juta biawak *V. salvator* diambil dari alam setiap tahun untuk dibunuh dan dikuliti, dengan jumlah terbesar berasal dari Indonesia, khususnya Sumatera dan Kalimantan (Jenkins and Broad, 1994). Jika eksploitasi *V. salvator* terus terjadi, akan mengakibatkan penurunan jumlah populasi hewan ini di alam dan tidak menutup kemungkinan *V. salvator* akan dikategorikan dalam Appendiks I CITES seperti halnya pada *V. komodoensis*.

Populasi liar *V. s. bivittatus* di alam diduga semakin berkurang, sementara informasi ilmiah mengenai hewan ini, khususnya yang berkaitan dengan sistem organ tubuhnya masih sangat sedikit dilaporkan. Publikasi ilmiah mengenai sistem organ masih terbatas pada anatomi makroskopis organ reproduksi jantan (Mahfud dkk., 2015). Sejauh ini, informasi mengenai morfologi organ reproduksi masih didominasi oleh reptil jenis lain, misalnya pada kura-kura *Phrynops geoffroanus* (Cabral *et al.*, 2011), ular *Seminatrix pygaea* (Sever, 2004), ular *Bittis arietans arietans* (Karim, 1998), ular *Crotalus durissus terrificus* (Porto *et al.*, 2013), dan biawak *Varanus marmoratus* (Prades *et al.*, 2013).

Salah satu keunikan yang terdapat pada organ reproduksi *V. s. bivittatus* jantan seperti yang dilaporkan (Mahfud dkk., 2015) adalah memiliki sepasang hemipenis. Hemipenis (seperti halnya penis pada mamalia) adalah organ seksual pada biawak yang digunakan sebagai organ kopulatori (Kardong, 2008), yang juga terdapat pada kelompok squamata lainnya. Hemipenis digunakan secara bergantian ketika kawin dengan biawak betina dan biasanya hanya salah satu yang digunakan untuk kopulasi (MNH, 2009). Sepasang hemipenis hewan ini tersimpan di pangkal ekor kaudal dari kloaka (Mahfud dkk 2015), yang menyebabkan bentuk ekor biawak jantan berbeda dibandingkan betina, sehingga dapat dijadikan sebagai salah satu ciri untuk menentukan jenis kelamin biawak (MNH, 2009).

Tulisan yang merupakan hasil penelitian ini dimaksudkan untuk memberikan informasi tentang morfologi hemipenis *V. s. bivittatus* jantan, baik secara makroskopis maupun mikroskopis, diharapkan dapat memberikan manfaat dalam memperkaya informasi biologi sistem reproduksi dari keanekaragaman hewan di Indonesia, serta dapat dijadikan sebagai acuan dalam penelitian-penelitian yang berhubungan dengan sistem reproduksi *V. s. bivittatus* untuk menunjang upaya konservasi *ex situ*.

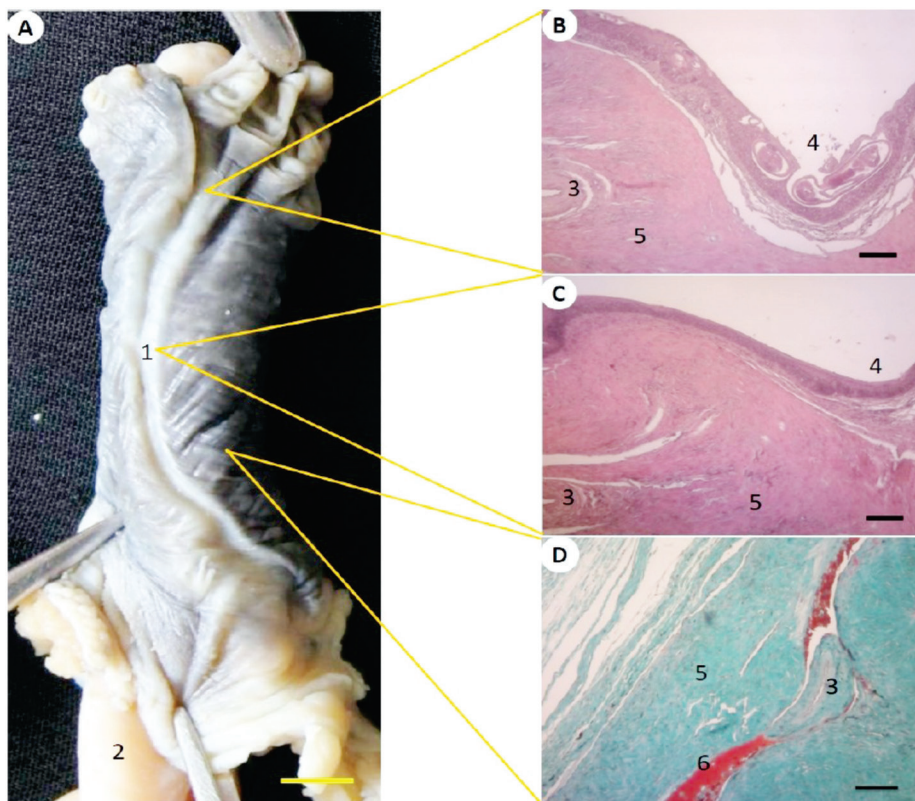
Materi dan Metode

Penelitian ini menggunakan dua ekor biawak *V. salvator bivittatus* jantan dewasa dengan panjang 45.60 ± 6.51 cm SVL dan berat 1.4 ± 0.28 kg yang didapat dari wilayah Bogor pada tahun 2013. Hewan dianestesi dengan menggunakan kombinasi ketamin 50mg/kg BB dengan xylazine 10 mg/kg BB secara intramuskular. Saat hewan teranestesi, dilakukan proses pengeluaran darah (*exanguinasi*),

yaitu dengan menyayat atrium kanan jantung dan memasukkan larutan NaCl Fisiologis 0,9% menggunakan kanul ke ventrikel kiri jantung sampai cairan yang keluar dari atrium kanan jantung terlihat bening, selanjutnya dilakukan proses fiksasi dengan menggantikan larutan NaCl Fisiologis 0,9% dengan larutan paraformaldehida 4% secara perfusi pada saat jantung masih berdenyut.

Pengamatan makroskopis dilakukan dengan mengeluarkan hemipenis dari pangkal ekor, dengan cara memasukkan air menggunakan spuit. Untuk pengamatan histologi, sampel jaringan untuk sediaan histologis menggunakan metode paraffin, disayat dengan ketebalan 3-4 μm , dideparafinisasi dan

rehidrasi, kemudian diwarnai dengan pewarnaan *Hematoxylin* dan *Eosin* (HE) (merupakan pewarnaan standar untuk mengetahui struktur umum sel maupun jaringan dalam suatu organ) dan *Masson's trichrome* (MT) (untuk mengetahui keberadaan jaringan ikat dalam suatu organ), mengacu pada Kiernan (1990), dilanjutkan dengan proses dehidrasi, *clearing* dan *mounting*. Hasil pewarnaan diamati dan difoto menggunakan mikroskop yang dilengkapi dengan alat fotografi (mikrofotografi). Pengamatan dilakukan untuk mengetahui struktur histologis hemipenis. Semua hasil pengamatan dan data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif.

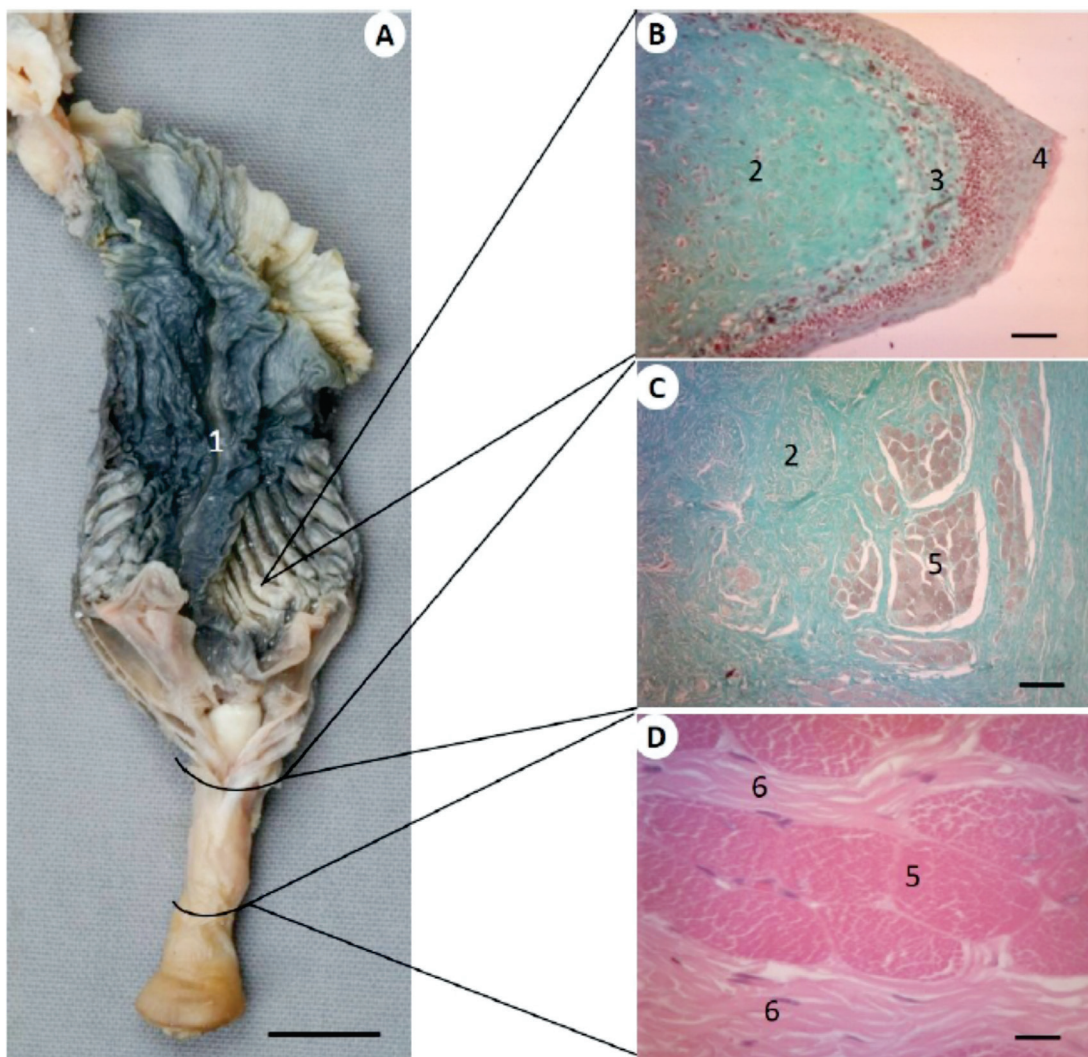


Gambar 1. Morfologi hemipenis biawak *V. s. bivittatus*. Hemipenis dalam kondisi ereksi (A= Tampak Dorsal, ↑ arah kranial) (Mahfud dkk 2015); Gambaran histologi sayatan melintang jaringan hemipenis daerah kaput (B), medial (C) dan kaudal (D). 1. *sulcus spermaticus*, 2. otot retraktor, 3. pembuluh darah, 4. lekukan *sulcus spermaticus*, 5. *corpus cavernosus* hemipenis yang disusun oleh jaringan ikat dengan serabut kolagen, 6. eritrosit. Pewarnaan B, C = HE, D = MT. Bar: A = 1 cm, B, C, D = 100 μm .

Hasil dan Pembahasan

Hemipenis *V. s. bivittatus* merupakan organ berongga berbentuk silinder (*truncus*) yang terletak di pangkal ekor kaudal dari kloaka (Gambar 1A) (Mahfud dkk., 2015). *Truncus* hemipenis dilapisi oleh epitel pipih banyak lapis yang didukung oleh jaringan ikat padat dan di bawahnya ditemukan *corpus cavernosus* dengan cukup banyak pembuluh darah vena di dalamnya (Gambar 1B, 1C, 1D). Hal inilah yang menyebabkan *truncus* hemipenis

hewan ini cukup fleksibel untuk membesar karena berisi darah sebelum kopulasi. Menurut Porto *et al.* (2013), adanya tekanan darah di dalam pembuluh darah *corpus cavernosus*, menyebabkan hemipenis dapat melakukan ereksi dan pada saat yang sama otot propulsor mendorong hemipenis sampai terjadi kopulasi. Pembuluh darah ini bertanggung jawab untuk drainase darah dari hemipenis setelah terjadi kopulasi, sehingga hemipenis mengecil dan dapat ditarik masuk kembali ke ruangan di pangkal ekor.



Gambar 2. Struktur bagian kaudal dan otot retraktor hemipenis biawak *V. s. bivittatus* dalam kondisi tidak ereksi (A= tampak ventral, ↓ arah kaudal) (Mahfud dkk); Gambaran histologi sayatan melintang lipatan mukosa hemipenis (B), daerah penyatuan otot retraktor dengan hemipenis (C) dan otot retraktor (D). 1. sulcus spermaticus, 2. jaringan ikat dengan bentuk seperti tendon, 3. lamina propia, 4. epitel pipih banyak lapis, 5. otot retraktor yang disusun oleh otot lurik, 6. jaringan ikat longgar. Pewarnaan B, C = MT, D = HE. Bar: A = 1 cm, B = 50 μ m, C = 100 μ m, D = 10 μ m.

Bagian *corpus cavernous* banyak ditemukan pembuluh darah, akan tetapi tidak ditemukan adanya kelenjar dan otot polos (Gambar 1D). Hemipenis yang disusun oleh *corpus cavernous* tanpa otot polos juga ditemukan pada kura-kura *P. geoffroanus* (Cabral *et al.*, 2011) dan ular *Bittis arietans arietans* (Karim, 1998). Hal ini berbeda pada ular *Crotalus durissus terrificus* (Porto *et al.*, 2013) dan penis mamalia (Goldstein and Padma-Nathan, 1990) pada umumnya seperti pada *Tamandua tetradactyla* (Rossi *et al.*, 2012), Trenggiling (*Manis javanica*) (Akmal, 2014), dan muncak (*Muntiacus muntjak muntjak*) (Wahyuni, 2012), bahwa sebagian besar parenkim *corpus cavernous* terdiri atas bundel otot polos yang berelaksasi atau kontraksi saat kopulasi.

Saat dalam keadaan tidak ereksi (Gambar 2A), kaput hemipenis terletak di bagian kaudal, sedangkan pada saat ereksi (Gambar 1A), hemipenis akan keluar dari sisi lateral kloaka, sehingga letak kaput hemipenis berpindah di bagian kranial (Mahfud dkk., 2015). Pada kaput hemipenis ditemukan lipatan mukosa (Gambar 1A, 1B) yang ditutup oleh epitel pipih banyak lapis yang di bawahnya ditopang oleh jaringan ikat dengan serat kolagen (Gambar 2B). Gambaran ini berbeda dengan yang ditemukan pada pada ular yang ditutupi oleh tonjolan-tonjolan (*papillae*) berbentuk seperti duri (Karim, 1998; Porto *et al.*, 2013), agar proses perkawinan berlangsung cukup lama untuk proses fertilisasi (Kardong, 2008; MNH, 2009; Porto, 2013).

Spermatozoa pada kelompok reptilia, disalurkan dari *ductus deferens* melalui *sulcus spermaticus* (MNH, 2009). *Sulcus spermaticus* merupakan saluran lanjutan dari *ductus deferens* menuju hemipenis, sehingga pada saat kopulasi sperma diejakulasi ke saluran reproduksi betina melalui *sulcus spermaticus* yang terdapat di dalam

hemipenis sebagai organ kopulatori (Kardong, 2008). Saluran ini ditemukan di salah satu sisi luar dinding hemipenis berupa lekukan pada saat ereksi, mulai dari bagian caput sampai radiks hemipenis (Gambar 1A, 1B) (Mahfud dkk., 2015). Dua pembuluh darah juga teramati berjalan bersama-sama di dekat *sulcus spermaticus* (Gambar 1B, 1C). Saluran seperti ini berbeda strukturnya pada ular. Menurut Kardong (2008), *sulcus spermaticus* pada ular berbentuk seperti huruf Y karena kedua hemipenis di daerah kaudal menyatu, sehingga *sulcus spermaticus* ikut menyatu di daerah kaudal.

Saat ereksi, di tengah bagian kaput hemipenis ditemukan penonjolan seperti kepala putik, agak keras dengan konsistensi seperti tendon, dan berwarna putih (Gambar 1A, 1B). Saat dalam keadaan tidak ereksi, jaringan tersebut berada di dasar *truncus* hemipenis yang berhubungan langsung dengan otot retraktor hemipenis (Gambar 2A). Secara histologis, penonjolan tersebut disusun oleh jaringan ikat dengan serabut kolagen (Gambar 2B), sedangkan otot retraktor hemipenis yang berhubungan langsung dengan hemipenis dan tonjolan tersebut disusun oleh otot lurik (Gambar 2C, 2D). Otot retraktor atau yang biasa dikenal sebagai otot propulsar (Karim, 1998), akan menarik hemipenis kembali ke dalam kantung yang terletak di pangkal ekor setelah kopulasi. Proses ini biasa disebut invaginasi. Selama ereksi, relaksasi otot retraktor menyebabkan masing-masing hemipenis akan keluar melalui lubang di pangkal ekor, yang biasa disebut evaginasi (Kardong, 2008).

Kesimpulan

Biawak *V. s. bivittatus* memiliki sepasang hemipenis berbentuk tabung (*truncus*) yang terdapat di pangkal ekor. Mukosa *truncus* dilapisi oleh epitel

pipih banyak lapis, ditunjang oleh jaringan ikat padat dan di bawahnya ditemukan *corpus cavernous*, namun tidak ditemukan jaringan otot seperti halnya pada sebagian reptil dan mamalia pada umumnya. *Truncus* hemipenis cukup fleksibel untuk memperbesar pada saat ereksi karena *corpus cavernous* disusun oleh banyak pembuluh darah dan ditopang oleh jaringan ikat.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan Republik Indonesia yang telah membiayai penelitian ini, serta Ibu Rr. Sri Catur Setyawatiningsih, S.Si., M.Si yang telah mendonasikan dua ekor biawak *V. s. bivittatus* jantan sebagai bahan penelitian.

Daftar Pustaka

- Akmal, Y. (2014). Karakteristik morfologi organ reproduksi jantan trenggiling (*Manis javanica*). Tesis. Program Studi Anatomi dan Perkembangan Hewan. Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Cabral, S. R. P., de Souza, S. L. R., Franco-Belussi, L., Zieri, R., Zago, C. E. S., and de Oliveira, C. (2011). Anatomy of the male reproductive system of *Phrynops geoffroanus* (Testudines: Chelidae). *Acta Scientiarum. Biol. Sc.* 33 (4): 487-492. doi: 10.4025/actascibiolsci.V33i4. 8091
- Canto, R. D. (2007). Notes on the occurrence of *Varanus auffmanbergi* on Roti Island. *Biawak.* 1 (1): 24-25.
- Goldstein, A. and Padma-Nathan, H. (1990). The microarchitecture of the intracavernosal smooth muscle and the cavernosal fibrous skeleton. *J. Urology.* 144: 1144-1146.
- Gumilang, R., Mardiasuti, A. dan Priyono, A. (2003). Populasi dan penyebaran biawak air asia (*Varanus salvator*) di suaka margasawa pulau rambut, Jakarta. Dalam: *Prosiding Seminar Hasil Penelitian.* Bogor, 8 Mei 2003. Bogor: Departemen Konservasi Sumberdaya Hutan Institut Pertanian Bogor. Hlm 163-171.
- Jenkins, M. and Broad, S. (1994). *International trade in reptile skins: A review and analysis of the main consumer markets, 1983-91* Traffic International Cambridge.
- Kardong, K. V. (2008) *Vertebrates: Comparative Anatomy, Function, Evolution.* 5th ed. McGraw-Hill. Boston. USA: 565-572
- Karim, S. A. (1998). Macroscopic and microscopic anatomy of the hemipenes of the snake *Bittis arietans arietans*. *JKAU: Sci.* 10: 25-38.
- Kiernan, J. A. (1990) *Histological and Histochemiscal Method* 2nd ed. Pergamon Press. England.
- Mahfud, Nisa', C. dan Winarto, A. (2015). Anatomi organ reproduksi jantan biawak air asia, *Varanus salvator* (Reptil: Varanidae). *Acta Vet. Indones.* 3 (1):1-7.
- (MNH) Museum of Natural History. 2009. Hemipenes of snakes and lizards. Retrieved from <http://cumuseum.colorado.edu/exhibits/objects/hemipenes-snakes-and-lizards>. Diakses pada tanggal 10 Maret 2013.
- Porto, M., de Oliveira, M. A., Pissinatti, L., Rodrigues, R. L., Rojas-Moscoco, J. A., Cogo, J. C., Metzke, K., Antunes, E., Nahoum, C. and Mónica, F. Z. (2013). The evolutionary implications of hemipenial morphology of rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* (Laurent, 1768) (Serpentes: Viperidae: Crotalinae). *PloS one,* 8 (6): 1-8. doi:10.1371/journal.pone.0066903
- Prades, R. B., Lastica, E. A. and Acorda, J. A. (2013). Ultrasonography of the urogenital organs of male water monitor lizard (*Varanus marmoratus*, Weigmann, 1834). *Philipp. J. Vet. Anim. Sci.* 39 (2): 247-258.
- Rossi, L.F., Luaces, J.P., Marcos A.H. J., Cetica, P.D., Jimeno, G.P. and Merani, M.S. (2012). Anatomy and histology of the male reproductive tract and spermatogenesis fine structure in the lesser anteater (*Tamandua*

tetradactyla, myrmecophagidae, xenarthra): Morphological evidences of reproductive functions. *Anat. Histol. Embryol. J. Vet. Med.* 1-10. doi: 10.1111/ahe.12008

Sever, D.M. (2004). Ultrastructure of the reproductive system of the black swamp snake (*Seminatrix pygaea*). Iv. Occurrence of an ampulla ductus deferentis. *J Morphol.* 262: 714-730.

Shine, R., Harlow, P.S. and Keogh, J.S. (1996). Commercial harvesting of giant lizards: The

biology of water monitors *varanus salvator* in southern sumatra. *Biol. Conservation.* 77: 125-134.

Wahyuni, S. (2012). Karakterisasi reproduksi muncak, *Muntiacus muntjak muntjak* jantan: Kajian anatomi, profil metabolisme testoteron, dan spermatogenesis selama periode pertumbuhan ranggah. Disertasi. Program Studi Biologi Reproduksi. Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.

Pendekatan Diagnosis *Avian Influenza Virus* dan *Newcastle Disease Virus* pada Kasus Lapangan Ayam Petelur: Immunopatologis Streptavidin Biotin

Diagnosis Approach Avian Influenza Virus and Newcastle Disease Virus at Layer Field Case: Streptavidin Biotin Immunopatologis

Maya Ekaningtias¹, Hastari Wuryastuty², Wasito²

¹Program Studi Bioteknologi, Sekolah Pasca Sarjana, Universitas Gadjah Mada

²Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada

Email: mentias4life@gmail.com

Abstract

Poultry can be infected not only by one type of virus, but also by more than one type of virus. *Avian influenza virus* (AIV) and *Newcastle disease virus* (NDV) are two important pathogens in poultry that can cause recurrent outbreaks and often lead to clinical symptoms and pathological lesions similar in poultry with high morbidity and mortality causing significant economic losses to the poultry industry. This study aims to detect and differentiate pathogenic viruses in commercial laying chickens with similar clinical symptoms, especially torticollis and curled toe paralysis, and anatomic pathological lesions, such as foci necrotic hemorrhages in the digestive tract by applying streptavidin-biotin immunohistochemical immunological test (IHC SB).

Samples (chickens) were taken from the cases of the disease in poultry in several commercial poultry farms. The layer chickens in which showed clinical symptoms of torticollis and curled toe paralysis, and hemorrhagic lesions in the lungs and / or digestive system are suspected of having AIV and NDV infections. After being necropsied, then lungs and gastrointestinal tract were tested IHC SB. The IHC SB results were examined with a digital microscope camera system. The results of the present study indicated that AIV antigen was detected in the lungs, but not in the digestive tract, whereas, NDV was detected in the digestive tract, but not in the lungs.

It was concluded, that the IHC SB can be applied for confirmation of the diagnosis of AIV and NDV and indicated, that the commercial laying chickens with clinical symptoms of torticollis and curled toe paralysis, as well as pathological hemorrhagic lesions in the gastrointestinal tract could be infected by both viruses.

Keywords: AIV, NDV, IHC SB, torticollis, paralysis

Abstrak

Unggas tidak hanya dapat terinfeksi oleh satu jenis virus, tetapi dapat juga terinfeksi oleh lebih dari satu jenis virus. *Virus avian influenza* dan *Newcastle disease* adalah dua patogen penting pada unggas yang dapat menyebabkan wabah berulang dan seringkali menimbulkan gejala klinis dan lesi patologis yang serupa pada unggas dengan morbiditas dan mortalitas tinggi sehingga menyebabkan kerugian ekonomis yang besar pada industri perunggasan. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi AIV dan/atau NDV pada ayam petelur komersial dengan gejala klinis serupa, terutama tortikollis dan paralisis kaki serta lesi patologis anatomis berupa foki nekrotik hemoragis pada saluran pencernaan dengan uji imunologis imunohistokimia *streptavidin biotin* (IHK SB). Sampel diambil dari kasus-kasus penyakit pada unggas di peternakan ayam petelur komersial. Ayam petelur tersebut menunjukkan gejala klinis tortikollis dan paralisis kaki, serta lesi hemoragis pada paru-paru dan/atau sistem pencernaan yang diduga terinfeksi AIV dan NDV. Setelah unggas dinekropsi, paru-paru dan saluran pencernaan diuji IHK SB kemudian diamati di bawah *microscope digital camera system*. Hasil penelitian ini membuktikan, bahwa dengan pewarnaan IHK SB, antigen AIV dapat dideteksi pada paru-paru, tetapi tidak pada saluran pencernaan, sedangkan NDV dapat dideteksi pada saluran pencernaan, tetapi tidak pada paru-paru. Berdasarkan hasil penelitian ini disimpulkan, bahwa IHK SB dapat diaplikasikan untuk peneguhan diagnosis AIV dan NDV dan terbukti, bahwa pada ayam petelur komersial dengan gejala klinis tortikollis dan paralisis kaki, serta lesi patologis hemoragis pada saluran pencernaan terinfeksi kedua macam virus tersebut.

Kata kunci: AIV, NDV, IHK SB, tortikollis, paralisis

Pendahuluan

Avian influenza virus (AIV) dan *Newcastle disease virus* (NDV) adalah dua patogen penting pada unggas yang dapat menyebabkan wabah berulang dan seringkali menimbulkan gejala klinis dan lesi patologis yang serupa pada unggas dengan morbiditas dan mortalitas tinggi sehingga menyebabkan kerugian ekonomis yang besar pada industri perunggasan. Wabah *avian influenza virus* (AIV) merupakan penyakit unggas menular yang disebabkan oleh virus *influenza* tipe A, famili *Orthomyxoviridae*. Penyakit AI dilaporkan mewabah di Indonesia pada akhir tahun 2003 dan diketahui sebagai subtype H5N1. Berdasarkan patogenisitasnya, AIV dibedakan menjadi *highly pathogenic avian influenza* (HPAI) dan *low pathogenic avian influenza* (LPAI). Virus AI terutama subtype H5 dan H7 yang termasuk HPAI mampu menyebabkan morbiditas dan mortalitas yang tinggi pada ternak ayam komersial di Indonesia, serta dapat menyebabkan infeksi sistemik pada berbagai organ unggas (Alexander, 1982; Swayne and Pantin-Jackwood 2008; Wasito *et al.*, 2014). Di Indonesia, LPAI berhasil diisolasi dari itik dan burung pelikan pada tahun 1983 (Ronohardjo dkk., 1985). Infeksi LPAI diketahui menyebabkan morbiditas tinggi (>50%) dan mortalitas rendah (<5%), tetapi laju mortalitas dapat sangat tinggi pada unggas muda jika disertai infeksi patogen sekunder (Swayne and Pantin-Jackwood, 2008). Gejala klinis LPAI, berupa perubahan patofisiologis pada saluran pernapasan, pencernaan, reproduksi, dan urinaria (Swayne and Pantin-Jackwood, 2008).

Penyakit ND pertama kali terjadi di Indonesia, yaitu Pulau Jawa pada tahun 1926 (Quinn *et al.*, 2002). Pada awal tahun 2011, kasus ND mewabah pada peternakan ayam pedaging secara merata di Sumatra, Jawa, Bali, Kalimantan dan Sulawesi dan meningkat

jika dibandingkan dengan yang terjadi pada tahun 2009 dan 2010. Penyakit ND disebabkan oleh galur virulen serotipe *avian paramyxovirus* tipe 1 (APMV-1), genus *Avulavirus*, subfamili *Paramyxovirinae*, famili *Paramyxoviridae* (Alexander and Senne, 2008). Berdasarkan tingkat virulensinya pada ayam, NDV dibagi menjadi tiga patotipe, yaitu tipe velogenik (sangat virulen), mesogenik (virulensi rendah) dan lentogenik (kurang virulen) (Quinn *et al.*, 2002; Pattison *et al.*, 2008). Pada umumnya, NDV virulensi rendah menyebabkan penyakit subklinis dengan morbiditas rendah, sedangkan isolat NDV virulen dapat mengakibatkan kematian yang cepat pada unggas (Kapczynski *et al.*, 2013).

Virus ND kadang-kadang bersama dengan AIV menginfeksi unggas dan memiliki kesamaan yang signifikan dengan AIV dalam menyebabkan kematian pada unggas di industri perunggasan (Ge *et al.*, 2007). Gejala klinis NDV pada unggas berupa gejala syaraf yang menonjol yang menunjukkan, ataksia, hilang keseimbangan, kepala berputar-putar tidak beraturan (tortikolis) ataupun rebah di atas punggung, paralisis kaki (Alexander and Senne, 2008; Cattoli *et al.*, 2011). Gejala klinis NDV tersebut mirip dengan gejala klinis pada unggas yang terinfeksi AIV (Perkins and Swayne, 2001; Cattoli *et al.*, 2011) dengan tingkat mortalitasnya mencapai 100% (Pattison *et al.*, 2008). Hal tersebut terlihat pada kasus penyakit ayam yang dibawa ke Laboratorium Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada maupun yang ditemukan di lapangan, sehingga menyulitkan dalam peneguhan diagnosis. Metode diagnostik saat ini, seperti isolasi virus dan pemeriksaan serologis konvensional, memakan waktu dan tenaga yang intensif, maka metode yang cepat dan sensitif dibutuhkan untuk mendeteksi dan membedakan antara virus-virus tersebut.

Metode imunologis imunohistokimia telah diaplikasikan sebagai uji kualitatif yang efektif, akurat, mudah dilaksanakan, dan biaya terjangkau untuk mendeteksi keberadaan antigen virus pernafasan unggas, seperti virus AI (Rimmelzwaan *et al.*, 2001; Gu *et al.*, 2007; Kalthoff *et al.*, 2008; Chamnanpood *et al.*, 2011) dan NDV (Oldoni *et al.*, 2005; Wakamatsu *et al.*, 2006). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui dan menentukan aplikasi uji imunologis imunohistokimia *streptavidin biotin* (IHK SB) untuk mendeteksi virus, terutama AIV dan NDV penyebab penyakit pada ayam petelur komersial dengan gejala klinis serupa, terutama tortikolis dan paralisis kaki, serta lesi patologis anatomis berupa perdarahan berbintik pada saluran pencernaan. Selain itu, untuk mendeteksi apakah penyakit pada ayam petelur komersial dengan gejala klinis serupa tersebut disebabkan oleh infeksi campuran antara AIV dan NDV. Dengan penerapan uji IHK SB yang cepat, tepat, dan akurat, serta efisien dan efektif dalam peneguhan diagnosis infeksi campuran AIV dan NDV yang berdasarkan gejala klinis dan lesi patologis terlihat serupa, diharapkan dapat membantu dalam penentuan strategi pencegahan dan pengendalian yang tepat dalam upaya *biosurveillance*, *biosecurity* dan *biosafety* terhadap kedua macam virus tersebut.

Materi dan Metode

Sampel penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari kasus-kasus lapangan di peternakan ayam petelur komersial di Jawa Tengah (tahun 2013-2015) dan sampel koleksi Laboratorium Patologi dan Laboratorium Ilmu Penyakit Dalam, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada. Sampel unggas diambil dari peternakan ayam

petelur yang memiliki gejala gangguan sistem syaraf, berupa tortikolis dan paralisis, serta lesi hemoragis pada paru-paru dan/atau sistem pencernaan. Sampel yang digunakan berupa jaringan (usus dan paru-paru) kemudian difiksasi formalin 10% untuk uji imunopatologis IHK SB.

Uji imunopatologis imunohistokimia *streptavidin biotin*

Pada awalnya untuk uji imunopatologis imunohistokimia *streptavidin biotin*, sediaan histopatologis paru-paru dan proventrikulus (preparat) di-deparafinisasi dengan xilen 3 kali, rehidrasi dengan larutan etanol konsentrasi bertingkat menurun, yaitu 100%, 95%, dan 50%, masing-masing 2 menit. Selanjutnya, dicuci dengan aquades 2 kali, kemudian PBS pH 7,2 1 kali. Pada proses awal, preparat ditandai dengan *pap pen* untuk menghindari tumpahnya reagensia pada saat proses pewarnaan. Selanjutnya, preparat direndam dalam *peroxidase quenching solution* (hidrogen peroksida/ H₂O₂ 3%) yang dibuat dari campuran 30% H₂O₂ (1 bagian) dan metanol absolut (9 bagian) selama 10 menit untuk menginaktivasi aktifitas peroksidase endogen, dicuci PBS pH 7,2 3 kali. Selanjutnya, dilakukan pewarnaan imunohistokimia *streptavidin biotin* (IHK SB) (Invitrogen, produk Histostain®SP). Pada awalnya, preparat diletakkan pada *staining chamber* dan diberi perlakuan dengan urutan sebagai berikut: a. Diberi 2 tetes (100µl) *serum blocking solution* dan diinkubasi 10 menit. Selanjutnya, preparat diberi 2 tetes (100µl) antibodi primer (antibodi poliklonal anti-nukleoprotein AIV atau antibodi poliklonal anti-nukleoprotein NDV), diinkubasi 45 menit, dan dicuci dengan larutan PBS pH 7,2 3 kali masing-masing 2 menit, b. Preparat diberi 2 tetes (100µl) *biotinylated secondary antibody* dan diinkubasi 10 menit, dicuci

dengan larutan PBS pH 7,2 3 kali masing-masing 2 menit, c. Preparat diberi 2 tetes (100µl) *enzyme conjugate (streptavidin-horseradish peroxidase)* dan diinkubasi 10 menit, dicuci dengan larutan PBS pH 7,2 3 kali masing-masing 2 menit, d. Preparat diberi 2 tetes (100µl) kromogen *diaminobenzidine (DAB)* dan diinkubasi 3 menit, kemudian dicuci dengan H₂O steril. Larutan kromogen DAB dibuat dari campuran masing-masing 1 tetes bufer substrat DAB, reagensia larutan kromogen DAB, reagensia larutan substrat dan 1 ml H₂O, e. Preparat diberi 2 tetes (100µl) hematoksilin sebagai pewarna dasar dan diinkubasi 1 menit, lalu dicuci H₂O steril, kemudian dimasukkan ke dalam larutan PBS pH 7,2 30 detik, dicuci kembali dengan H₂O steril. Selanjutnya, dilakukan dehidrasi pada preparat dengan cara preparat dimasukkan secara berturut-turut ke dalam larutan etanol 50%, 95%, 100%, dan xilen masing-masing 1 menit dan f. Preparat diberi 2 tetes (100µl) *mounting solution* dan ditutup gelas penutup, kemudian diamati dengan *microscope digital camera system*.

Analisis Data

Sediaan jaringan yang telah diuji imunopatologis imunohistokimia *streptavidin-biotin* diperiksa di bawah mikroskop *camera digital system* dan dianalisis secara deskriptif.

Hasil dan Pembahasan

Penyakit AI dan ND adalah keprihatinan utama pada peternakan unggas, karena kerugian ekonomis yang tinggi bagi industri perunggasan dan infeksi parah pada unggas dengan angka kematian yang tinggi (Capua and Alexander, 2009). Beberapa tahun terakhir, diketahui bahwa unggas tidak hanya dapat terinfeksi oleh satu jenis virus, tetapi dapat

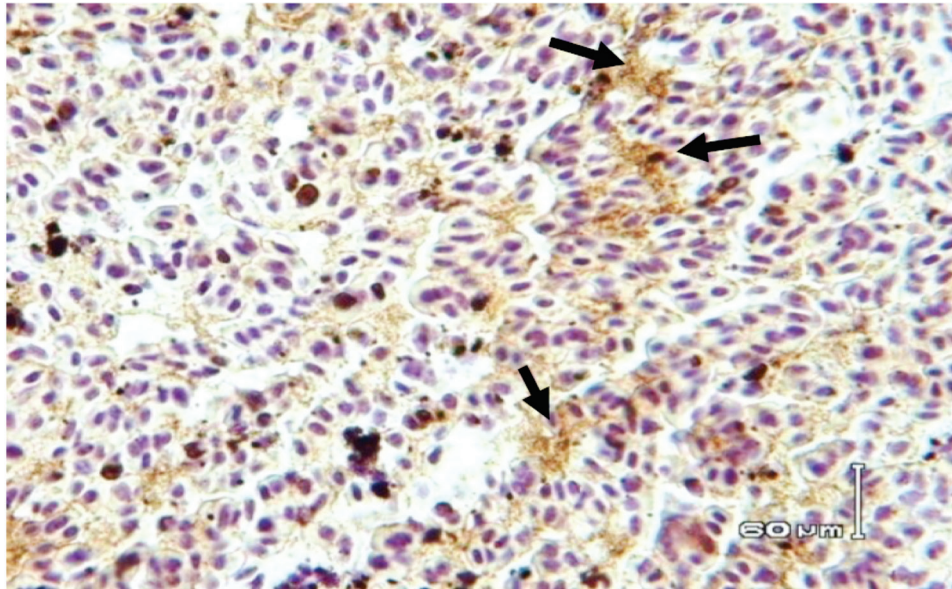
juga terinfeksi oleh lebih dari satu jenis virus (Gelb *et al.*, 2007). Virus AI dan ND adalah dua patogen unggas yang seringkali menimbulkan gejala klinis yang serupa dan dapat ditularkan antara unggas liar dan peliharaan (Alexander, 2000; Achenbach and Bowen, 2011). Hal tersebut menyebabkan kesulitan dalam eradikasi secara cepat dan tepat AIV dan NDV sehingga menyebabkan kerugian yang sangat signifikan pada peternakan ayam petelur komersial. Dengan demikian, diperlukan aplikasi metode diagnostik yang cepat, tepat dan akurat dalam rangka peneguhan diagnosis sehingga upaya pencegahan dan pengendalian, bahkan eradikasi penyakit AIV dan NDV pada ayam petelur komersial dapat dilakukan secara optimal. Sampel berasal dari ayam petelur komersial yang diduga terinfeksi AIV dan NDV berdasarkan gejala klinis yang muncul di lapangan berupa tortikolis dan paralisis kaki, serta lesi patologis anatomis berupa perdarahan berbintik pada saluran pencernaan.

Pada penelitian ini, berdasarkan hasil pewarnaan IHK SB untuk deteksi AIV maupun NDV pada ayam petelur komersial menunjukkan, bahwa antigen AIV dapat dideteksi pada paru-paru (Gambar 1), tetapi tidak pada saluran pencernaan. Sedangkan, NDV dapat dideteksi pada saluran pencernaan (proventrikulus) (Gambar 2), tetapi tidak pada paru-paru (Gambar 3). Pada pengamatan dengan mikroskop cahaya, antigen tersebut terlihat berupa bintik-bintik coklat kemerahan yang mengelompok di suatu area atau menyebar pada seluruh lokasi jaringan. Adanya *horseradish peroksidase (HRP)* sebagai enzim pada ikatan antigen-antibodi kompleks menyebabkan terjadinya perubahan warna saat diberikan substrat. Kromogen yang digunakan dalam metode ini adalah *diaminobenzidine (DAB)* sehingga sel-sel yang positif terinfeksi virus akan terlihat berwarna coklat

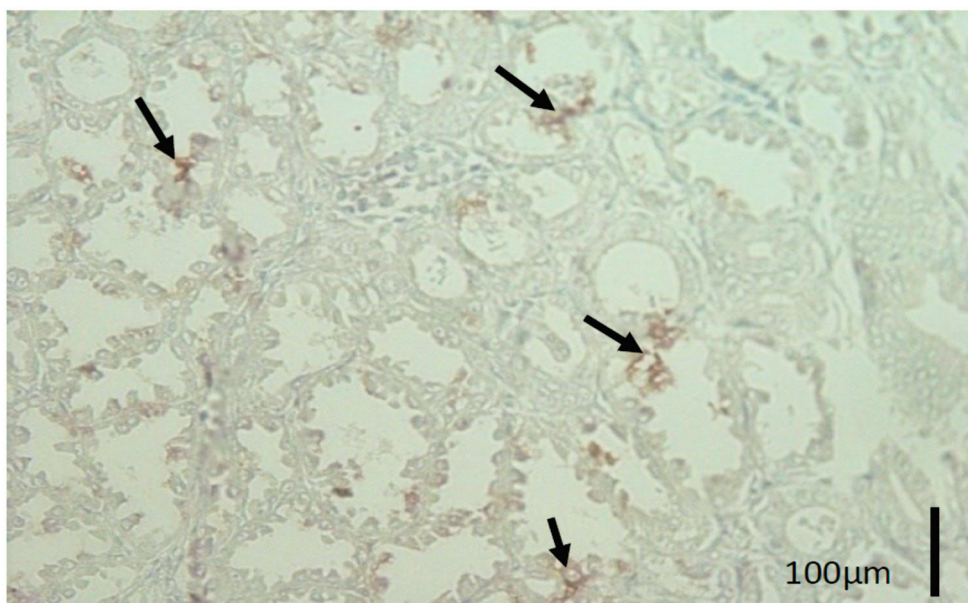
pada sitoplasmanya, sedangkan pada hasil negatif tidak ditemukan adanya warna coklat (Adi dkk, 2012).

Pewarnaan IHK SB membuktikan, bahwa aktifitas antibodi primer bersifat spesifik untuk

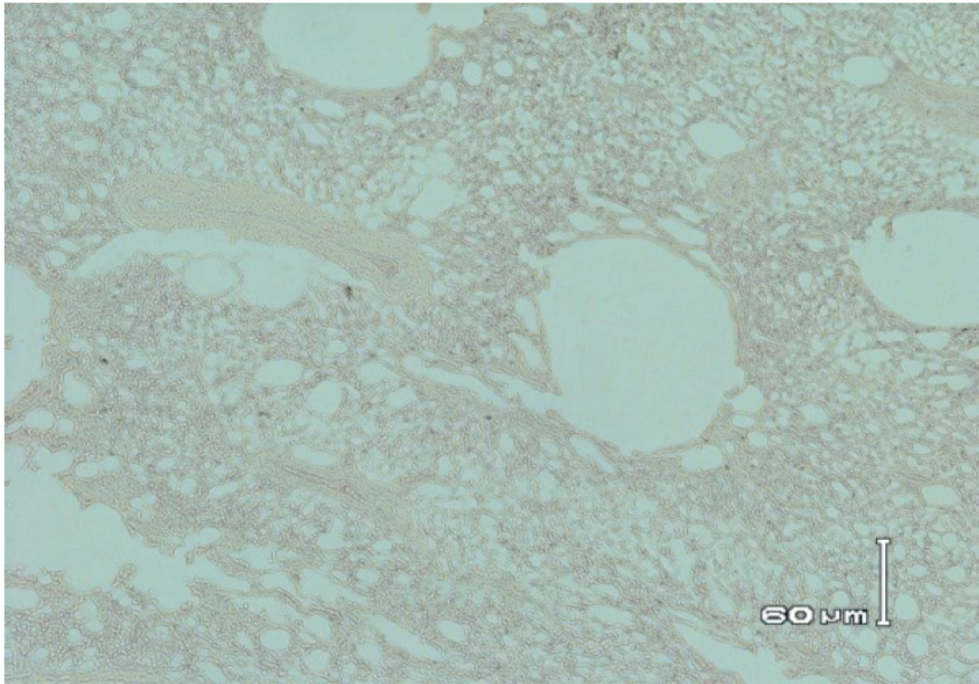
deteksi adanya antigen NDV dan AIV. Pada penelitian ini, digunakan metode *streptavidin-biotin* karena *streptavidin* mempunyai kemampuan mengikat *biotin* lebih banyak dan lebih kuat (Warnke and Levy, 1980; Wasito, 1991).



Gambar 1. Gambaran imunopatologis imunohistokimia *streptavidin biotin* dengan antibodi poliklonal anti-nukleoprotein *avian influenza virus* (AIV) pada ayam petelur komersial dengan gejala klinis tortikolis, paralisis kaki dan hemoragis proventrikulus. Paru-paru terlihat positif terinfeksi AIV terlihat berwarna coklat kemerahan (panah) (*Streptavidin biotin*).



Gambar 2. Gambaran imunopatologis imunohistokimia *streptavidin biotin* dengan antibodi poliklonal anti-nukleoprotein *Newcastle disease virus* (NDV) pada ayam petelur komersial dengan gejala klinis tortikolis, paralisis kaki dan hemoragis proventrikulus. Proventrikulus terlihat positif terinfeksi NDV terlihat berwarna coklat kemerahan (panah) (*Streptavidin biotin*).



Gambar 3. Gambaran imunopatologis imunohistokimia *streptavidin biotin* pada paru-paru ayam petelur komersial dengan gejala klinis tortikolis, paralisis kaki dan hemoragis pada proventrikulus sebagai kontrol negatif. Tidak terlihat adanya warna coklat (negatif) (*Streptavidin biotin*).

Berbagai penelitian yang telah dilakukan membuktikan, bahwa infeksi campuran virus pada hewan maupun tumbuhan merupakan fenomena yang biasa terjadi (Gelb *et al.*, 2007). Koinfeksi AIV dan NDV yang telah dipelajari *in vitro* menunjukkan, bahwa kedua virus tersebut dapat saling menghambat pertumbuhan satu sama lain. Virus AI dapat mengganggu pertumbuhan NDV jika kedua virus tersebut diinokulasi pada saat bersamaan, namun tingkat gangguan tersebut tergantung pada kuantitas dan virulensi kedua galur virus yang digunakan. Jika NDV diinokulasi terlebih dulu, maka NDV dapat mengganggu pertumbuhan AIV (Ge *et al.*, 2012). Efek replikasi virus juga berbeda, tergantung pada spesies unggas dan waktu infeksi. Hal tersebut menunjukkan, bahwa infeksi dengan virus heterolog dapat mengakibatkan persaingan sementara untuk reseptor sel atau sel yang kompeten untuk replikasi virus-virus tersebut (Costa-Hurtado *et al.*, 2014).

Pada penelitian ini, digunakan antibodi poliklonal anti-nukleoprotein AIV dan antibodi poliklonal anti-nukleoprotein NDV untuk dapat mengenali banyak epitop AIV dan NDV sehingga memberikan deteksi yang kuat dan lebih toleran terhadap sedikit perubahan antigen di alam (Anonim, 2007). Berdasarkan pemeriksaan lesi patologis anatomis, pada penelitian ini, AIV yang terdeteksi termasuk *low pathogenic avian influenza* (LPAI) karena lesi patologis hanya ditemukan pada paru-paru dan saluran pencernaan. Pada *highly pathogenic avian influenza* (HPAI), lesi patologis anatomis tidak hanya terdapat pada paru-paru dan saluran pencernaan, tetapi menyebar pada organ-organ lain (Capua and Alexander, 2009).

Walaupun secara alami AIV dan NDV virulen mampu menginfeksi dan berkembang biak pada semua sel, jaringan atau organ pada ayam (Wakamatsu *et al.*, 2006), namun pada penelitian ini tidak semua sampel

organ ayam yang diamati menunjukkan adanya antigen (AIV dan NDV). Tidak terdeteksinya antigen AIV pada saluran pencernaan ayam petelur dengan lesi patologis hemoragis kemungkinan karena sangat ekstensifnya lesi pada jaringan tersebut (Vascellari *et al.*, 2007), dan kemungkinan terjadinya degradasi materi genetik akibat proses parafin *embedding* (Farmilo and Stead, 2009). Terdeteksinya AIV pada paru-paru menunjukkan, tersedianya protease yang diperlukan untuk replikasi AIV. Terdapat hubungan antara kadar RNA virus dalam paru-paru yang terinfeksi primer dengan kemungkinan distribusi sistemik melalui sirkulasi darah (Post *et al.*, 2013). Tidak adanya NDV yang dapat terdeteksi pada paru-paru merupakan gambaran, bahwa paparan infeksi secara alami menyebabkan virus hanya berada dalam sirkulasi darah (Damayanti dkk., 2004). Ada kemungkinan juga, bahwa ayam mengalami viremia sehingga virus ada dalam sirkulasi darah, dan belum sampai pada organ sasaran (organ predileksi) (Quinn *et al.*, 2002). Selain itu, keberadaan sisi reseptor yang sama untuk AIV dan NDV memungkinkan terjadinya kompetisi antara kedua virus tersebut untuk pengikatan pada reseptor asam sialat di permukaan sel hospes. Hasil penelitian ini membuktikan, bahwa ada infeksi campuran AIV dan NDV pada ayam petelur komersial di lapangan dengan gejala klinis tortikolis dan paralisis kaki, serta lesi patologis berupa perdarahan berbintik pada saluran pencernaan.

Uji imunopatologis imunohistokimia *streptavidin biotin* perlu diaplikasikan sebagai uji rutin program di Laboratorium veteriner untuk peneguhan diagnosis AIV dan/ atau NDV pada kasus-kasus ayam petelur komersial di lapangan yang menunjukkan gejala klinis, antara lain: tortikolis, paralisis kaki dan hemoragis saluran pencernaan. Perlu diteliti lebih lanjut galur NDV (kemungkinan

NDV genotipe VII) yang dapat menyebabkan infeksi campuran dengan AIV pada ayam petelur komersial di peternakan unggas di Indonesia.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Prof. drh.R.Wasito, M.Sc., Ph.D. dan Prof. drh. Hastari Wuryastuty, M.Sc., Ph.D., Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, atas bantuan dana penelitian, bimbingan, nasihat, dan arahan dalam penelitian dan penyusunan naskah ini.

Daftar Pustaka

- Anonimus, 2007, Introduction to Antibodies, (Diakses tanggal 3 februari 2015).
- Achenbach, J.E. and Bowen, R.A., 2011, Transmission of Avian Influenza A Viruses Among Species in an Artificial Barnyard, *PLoS One*, 6 (3): e17643.
- Adi, A.A.A.M., Kardena, I.M, Astawa, N.M. and Matsumoto, Y., 2012, Pelacakan Secara Imunohistokimiawi Antigen Virus pada Ayam yang Diinfeksi dengan Virus Penyakit Tetelo, *J.Vet.*, 13. (3): 278-283.
- Alexander, D.J. and Stuart, J.C., 1982, Isolation of An Influenza A Virus from Domestic Fowl in Great Britain, *Vet. Rec.*, 111:416.
- Alexander, D. J., 2000, Newcastle Disease and Other Avian Paramyxoviruses, *Rev. Sci. Off.Int. Epiz.*, 19, 443-462.
- Alexander, D.J. and Senne, D.A., 2008, Newcastle Disease, Other Avian Paramyxovirus and Pneumovirus Infection In: Alexander and Senne, Y.M. (ed.), Disease of Poultry. Blackwell Publishing. Iowa. 75-92.
- Capua, I. and Alexander, D.J., 2009, Ecology, Epidemiology and Human Health, Implications of Avian Influenza Virus Infections, Avian

Influenza and Newcastle Disease, @Springer-Verlag Italia.

Transcription-Polymerase Chain Reaction, *Avian Dis.*, 51:924–934.

- Cattoli, G., Susta, L., Terregino, C. and Brown, C., 2011, Newcastle Disease : A Review of Field Recognition and Current Methods of Laboratory Detection, *J.Vet. Diagn. Invest.*, 23: 637-658.
- Chamnanpood, C., Sanguansermisri, D., Pongcharoen, S. and Sanguansermisri, P., 2011, Detection of Distribution of Avian Influenza H5N1 Virus By Immunohistochemistry, Chromogenic *In Situ* Hybridization and Real-Time PCR Techniques In Experimentally Infected Chickens, *Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Health*, 42.(2): 303-310.
- Costa-Hurtado, M., Afonso, C.L., Patti J Miller, Spackman, E., Kapczynski, D.R., Swayne, D.E., Shepherd, E., Smith, D., Zsak, A. and Pantin-Jackwood, M., 2014, Virus Interference between H7N2 Low Pathogenic Avian Influenza Virus and Lentogenic Newcastle Disease Virus in Experimental Co-Infections in Chickens and Turkeys, *Vet. Res.*, 45: 1.
- Damayanti, R., Dharmayanti, N.L.P.I, Indriani, R., Wiyono, A., Darminto, 2004, Gambaran Klinis dan Patologis pada Ayam yang Terserang Flu Burung Sangat Patogenik (HPAI) di Peternakan di Jawa Timur dan Jawa Barat, *JITV*, 9. (2): 128-135.
- Farmilo, A.J. and Stead, R.H., 2009, Fixation and Proccesing. In Educational Guide Immunohistochemistry Staining Methods, 5th edition, Dako North America, Carpinteria, California.
- Ge, J., Deng, G., Wen, Z., Tian, G., Wang, Y., Shi, J., Wang, X., Li, y., Hu, S., 2007, Newcastle Disease Virus Based Live Attenuated Vaccine Completely Protecns Chickens and Mice From Lethal Challenge of Homologous and Heterologous H5N1 Avian Influenza Viruses, *J. Virol.*, 150-158.
- Gelb, J., Ladman, B.S., Licata, M.J., Shapiro, M.H., Campion, L.R., 2007, Evaluating Viral Interference Between Infectious Bronchitis Virus and Newcastle Disease Virus Vaccine Strains Using Quantitative Reverse
- Gelb, J., Ladman, B.S., Licata, M.J., Shapiro, M.H., Campion, L.R., 2007, Evaluating Viral Interference Between Infectious Bronchitis Virus and Newcastle Disease Virus Vaccine Strains Using Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, *Avian Dis.*, 51:924–934.
- Gu, J., Xie, Z., Gao, Z., 2007, H5N1 Infection of The Respiratory Tract and Beyond: A Molecular Pathology Study, *Lancet*, 370: 1137–1145.
- Kalthoff, D., Breithaupt, A., Teifke, J.P., 2008, Highly Pathogenic Avian Influenza Virus (H5N1) in Experimentally Infected Adult Mute Swans, *Emerg. Infect. Dis.*, 14: 1267-70.
- Kapczynski, D.R., Afonso, C.L. and Miller, P.J., 2013, Immune Responses of Poultry to Newcastle Disease Virus, *Develop. Comp. Immuno.*, 41:447–453.
- Oldoni, I., Brown, C.C., King, D.J., and other authors, 2005, The Use of In Situ Hybridization and Immunohistochemistry to Study The Pathogenesis of Various Newcastle Disease Virus Strains and Recombinants in Embryonated Chicken Eggs, *Micro. Pathog.*, 39: 69-75.
- Perkins, L.E.L. and Swayne, D.E., 2001, Pathobiology of A/Chicken/Hong Kong/220/97 (H5N1) Avian Influenza Virus in Seven Gallinaceous Species, *Vet. Pathol.*, 38:149-164.
- Pattison, M., McMullin, P.F., Bradbury, J.M. and Alexander, D.J., 2008, Poultry Diseases, 6th Edition, Saunders Elsevier, China, pp: 298-301.
- Post, J., de Geus, D.G., Vervelde, L., Cornelissen, J.B.W.J. and Rebel, J.M.J., 2013, Systemic Distribution of Different Low Pathogenic Avian Influenza (LPAI) Viruses in Chicken, *J. Virol.*, 10:23.
- Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E., Donnelly, W.J.C. and Leonard, F.C., 2002, Veterinary Microbiology and Microbial Disease, Blackwell Science. Iowa. 283-289, 308, 381-387.

- Rimmelzwaan, G.F., Kuiken, T., Amerongen, G.V., Bestebroer, T.M., Fouchier, R.A.M., Osterhaus, A.D.M.E., 2001, Pathogenesis of Influenza A (H5N1) Virus Infection in A Primate Model, *J. Virol*, 75: 6687-91.
- Ronohardjo, P., Hardjosworo, S., Partoatmojo, S. and Partadireja, M., 1985, The Identification and Distribution of Influenza A Virus in Indonesia, *Penyakit Hewan XVII, Semester I*: 249-257.
- Spackman, E., 2008, A Brief Introduction to The Avian Influenza Virus, *Methods Mol. Biol.*, 436, 1-6.
- Swayne, D.E. and Pantin-Jackwood, M., 2008, Pathobiology of Avian Influenza Virus Infections in Birds and Mamals, Blackwell Publishing Professional 2121 State Avenue, Ames Iowa 50014, USA: 87-122.
- Vascellari, M., Granato, A., Trevisan, L., Basilicata, L., Toffan, A., Milani, A. and Mutinelli, F., 2007, Pathologic Findings of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus A/Duck/Vietnam/12/05 (H5N1) on Experimentally Infected Pekin Ducks, Based on Immunohistochemistry and In Situ Hybridization, *Vet. Pathol.*, 44: 635-642.
- Wakamatsu, N., King, D.J., Kapczynski, D.R., Seal, B.S., Brown, C.C., 2006, Experimental Pathogenesis For Chickens, Turkeys, And Pigeons of Exotic Newcastle Disease Virus from An Outbreak in California During 2002-2003, *Vet. Pathol.*, 43:925-933.
- Wakamatsu, N., King, D.J., Seal, B.S., Brown, C.C., 2007, Detection of Newcastle Disease Virus RNA by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Using Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue and Comparison with Immunohistochemistry and In Situ Hybridization, *J. Vet. Diagn. Invest.*, 19:396-400.
- Warnke, and Levy, R., 1980, Detection of T and B Cell Antigens with Hybridoma Monoclonal Antibodies: Biotin Avidin Horseradish Peroxidase Method, *J. Histochem. Cytochem.*, 28: 771.
- Wasito, R., 1991, Penggunaan Imunositokimia untuk Diagnosis Penyakit Infeksi, Kursus Singkat Imunositokimia di PAU Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Wasito, R., Wuryastuty, H., Tjahjowati, G., Irianingsih, S. H., Tyasasmaya, T. and Maes, R. K., 2014, Detection and Differentiation of Pathogenic H5 and H7 Influenza A Virus Subtypes in Indonesian Poultry by Multiplex Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, *Biochem. and Biotech. Res.*, 2(2): 27-31.

Newcastle Disease Virus Detection from Chicken Organ Samples Using Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

Deteksi Virus *Newcastle Disease* dari Sampel Organ Ayam dengan *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*

Lehgarubini Shanmuganathan¹, Dito Anggoro², Michael Haryadi Wibowo²

¹Faculty of Veterinary Medicine, Gadjah Mada University, Yogyakarta

²Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Gadjah Mada University, Yogyakarta

Email: lehgarubinshan@gmail.com¹, and mhwibowo@ugm.ac.id²

Abstract

Newcastle disease (ND) is a systemic, viral respiratory disease that is acute and easily transmitted which affects various types of poultry, especially chickens. Diagnosis of ND which generally involves virus isolation and subsequent identification with serological assays has limitations that needs more time. This research was aimed to detect Newcastle Disease virus (NDV) in chickens suspected with ND using the Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) technique. Nine chicken organ samples such as liver, trachea, and lungs were collected from chicken farms diagnosed with ND. The organ samples were processed and the targeted viral RNA was extracted using the RNA extraction kit. Genome amplification was performed with RT-PCR using specific primers to target the F gene. Amplification results produced an amplicon product of 565 base pairs (bp). PCR product samples were then visualised using agar gel electrophoresis and viewed using the unified gel documentation system. Amplification results show nine samples positive for the DNA bands corresponding to the targeted band of the NDV F gene fragment. The results of this research confirm that the RT-PCR method is applicable for NDV detection from chicken organ samples.

Keywords: Newcastle Disease virus, organ sample, amplification.

Abstrak

Newcastle Disease (ND) adalah suatu penyakit pernafasan dan sistemik, yang bersifat akut dan mudah menular, yang disebabkan oleh virus dan menyerang berbagai jenis unggas, terutama ayam. Diagnosis penyakit ND yang pada umumnya dilakukan dengan isolasi virus dan identifikasi serologis memiliki keterbatasan, antara lain diperlukan waktu yang lebih lama. Penelitian ini bertujuan mendeteksi virus *Newcastle Disease* (NDV) pada ayam yang dicurigai dengan penyakit ND dengan menggunakan teknik *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR). Sembilan sampel organ ayam yaitu: liver, trakea, dan paru dikoleksi dari peternakan ayam yang didiagnosis penyakit ND. Sampel organ tersebut diproses dan diekstraksi RNA virus target dengan kit ekstraksi RNA. Amplifikasi genom virus dilakukan dengan RT-PCR menggunakan primer spesifik pada target gen F. Hasil amplifikasi menghasilkan produk amplicon sebesar 565 *base pairs* (bp). Sampel produk PCR kemudian divisualisasikan menggunakan gel elektroforesis dan diamati menggunakan *unified gel documentation system*. Hasil amplifikasi menunjukkan sembilan sampel positif teramati pita DNA sesuai target fragmen gen F virus ND. Hasil penelitian ini mengkonfirmasi bahwa metode RT-PCR dapat digunakan untuk mendeteksi virus ND dari sampel organ ayam.

Kata Kunci: virus *Newcastle Disease*, sampel organ, amplifikasi.

Introduction

Newcastle disease (ND) is a systemic, respiratory disease that is acute and easily transmitted which is caused by a virus and affects various types of poultry, especially chickens (Tabbu, 2000). ND was first recognized in Indonesia in 1926 and classified as a viral disease (Alexander *et al.*, 2004). The virus is endemic in most regions of the country as it has been isolated frequently in outbreaks (Dharmayanti *et al.*, 2014; Wibowo *et al.*, 2012). Wibowo *et al.* (2012) reports three types of Newcastle Disease virus (NDV) virulence found in the field, which are low, moderate, and virulent strains. According to Alexander (2003), the most virulent NDV strain is the Asiatic type which causes a 100% mortality rate in susceptible poultry, causing significant loss in Indonesia's poultry industry.

According to FAO (2010), poultry farming facilities throughout Indonesia range from backyard productions (sector 4) to high or low biosecurity commercial poultry production (sectors 2 and 3) to integrated, industrial productions (sector 1); with sector 2 commercial poultry productions dominating the national market. Regardless the level of biosecurity applied, all four sectors are in threat of *Tetelo* disease – local name for ND (Wibowo & Amanu, 2010). This poses major problem to the nation as the disease is a sporadic epizootics despite implementation of routine vaccination programmes (Kryger *et al.*, 2010). The consequences of the disease are low growth rate and production, high expense on prevention and treatment, and high mortality rate (Amanu & Rohi, 2005).

The Office of Internationale des Epizooties (OIE) classified ND as list A disease (Alexander, 2000). According to OIE (1996), list A diseases

are defined as “transmissible diseases that have the potential for very serious and rapid spread, irrespective of national borders, that are of serious socio-economic or public health consequence and that are of major importance in the international trade of animals and animal products.” The virus belongs to the genus of Avulavirus and Paramyxoviridae family. It has an enveloped, non-segmented, negative-sense, single stranded RNA genome that encodes six proteins (Rabalski *et al.*, 2014; Shirvan & Mardani, 2014). Avian paramyxovirus type 1 (APMV-1) or ND is a virus that occurs in filamentous or spherical forms (pleomorphic) and consists of a single molecule of negative sense, single-stranded RNA enclosed in an envelope with prominent glycoprotein spikes (MacLachlan & Dubovi, 2010).

The RNA genome is about 15-18 kb in size and can consist up to at least three genome lengths; 15,186, 15,192 and 15,198 nucleotides (Miller *et al.*, 2010). These nucleotides make up six genes which encode the following six structural proteins: nucleocapsid protein (NP/N), phosphoprotein (P), matrix protein (M), fusion protein (F), haemagglutinin-neuraminidase (HN) and large protein (L) in the order of 3'leader-N-P-M-F-HN-L-5'trailer (Kho *et al.*, 2003). Two additional non-structural proteins (V and W) may be present in some strains; they are encoded by RNA editing of the P protein. Each protein functions differently to aid the infectivity and virulence of NDV. The F and HN proteins are anchored in the virion envelop and form the envelope spikes.

These proteins work together in the attachment and fusion of the virion to the host cell (MacLachlan & Dubovi, 2010). Both F and HN proteins contribute to the virulence characteristic of

NDV, but the primary determinant is the cleavability of the F protein (Cattoli *et al.*, 2011). The F protein is synthesized as an inactive precursor (F0) and is only fusogenic after cleavage into two biologically active F1 and F2 polypeptide subunits, by host cell proteases (de Leeuw *et al.*, 2005). The cleavage site of the F protein differs in arrangement of multiple basic amino acids depending on the degree of virulence.

Miller *et al.* (2010) distinguish lentogenic, mesogenic and velogenic strains as the three major pathotypic manifestations of NDV. The viscerotropic-velogenic NDV results in acute lethal infections, the neurotropic-velogenic NDV causes respiratory and neurological disease, while the mesogenic NDV is characterized by respiratory and neurological signs, but causes low mortality. NDV is highly contagious, with reports stating that even low pathogenic viral strains (lentogens) that cause mild infections of the respiratory tract can greatly increase its pathogenicity even during a single passage (Rabalski *et al.*, 2014).

A definitive diagnosis of ND requires virus isolation and subsequent laboratoric characterization. Virus isolation is carried out by injecting and incubation antibiotic suspensions of samples retrieved from live birds into the allantoic cavity of embryonated chicken eggs. After the incubation period, the allantoic fluid is then harvested and tested (Alexander *et al.*, 2004). Clinical signs and lesions may be highly suggestive; however this method proved impracticable as a routine tool (Haque *et al.*, 2010). Instead conventional techniques such as agar gel precipitation test (AGPT), haemagglutination (HA) and haemagglutination inhibition (HI) tests were employed to assess antibody levels in birds. The AGPT has been found to be simple, inexpensive and

faster in assessing ND infection in birds, nevertheless at present the HI test is most widely used technique (Alexander *et al.*, 2004).

Common use of vaccines in domestic poultry limits the value of these assays; hence molecular techniques such as reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) were applied to detect NDV in clinical specimens (OIE, 1996). The RT-PCR method is superior to other NDV confirmatory diagnostic methods (Singh *et al.*, 2005). This method uses a gene-specific primer to generate single-stranded cDNA copies of NDV RNA gene, with the help of reverse transcriptase (RT) enzyme. The cDNA copies are used as PCR templates to produce exponential amplification of the viral nucleic acids, even if it is present in small amounts (Rio *et al.*, 2011).

The analysis study on NDV isolates by Angeliya *et al.* (2014) was able to detect NDV in samples successfully by using primers targeting the F gene. The research by Haque *et al.* (2010) used specific primers which amplified a 356 bp long F gene sequence encoding the fusion protein cleavage site. Likewise, Singh *et al.* (2005) used primers targeting the internal sequences of the NDV F gene cleavage activation. The results showed that RT-PCR targeting could be effectively used for NDV detection.

The RT-PCR was carried out in the Laboratorium of Microbiology, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada. The aim of this study is to detect NDV in organ samples such as liver, trachea, and lungs collected from vaccinated chickens that NDV-suspected using RT-PCR. Research benefits are to learn whether RT-PCR is applicable for ND detection from NDV-suspected chicken organ samples.

Table 1. Data of organ samples of chicken suspected to NDV infection which be used in this research.

No.	Sample ID code and collection area	Chicken age	Farming system	Clinical signs	Sample type
1.	GK-1 SR Farm/2013 (Semanu, Gunungkidul, Yogyakarta)	48 weeks	Layer farm, vaccination: Week 16: Triple vaccine ND-IB-EDS Revaccination every 1.5 months	Drop in production and greenish diarrhea	Pulmo
2.	KP-1 PR Farm/2013 (Kulonprogo, Yogyakarta)	7 weeks	Layer farm, vaccination: Day 5: ND-IB live and ND killed Day 18: ND live Day 35: ND live	High mortality and torticollis	Pulmo
3.	BYL-1 RH Farm/2014 (Boyolali, Central Java)	10 weeks	Layer farm, vaccination: Day 1: ND-IB live Day 5: ND-IB killed Day 49: ND live	High mortality, torticollis, and greenish diarrhea	Pulmo
4.	SEM-1 GK Farm/2015 (Semin, Gunungkidul, Yogyakarta)	3 weeks	Broiler farm, vaccination: Day 4: ND-IB live and ND killed	High mortality	Pulmo
5.	SEM-2 GK Farm/2015 (Semin, Gunungkidul, Yogyakarta)	3 weeks	Broiler farm, vaccination: Day 4: ND-IB live and ND killed	High mortality	Pulmo
6.	SEM-3 GK Farm/2015 (Semin, Gunungkidul, Yogyakarta)	3 weeks	Broiler farm, vaccination: Day 4: ND-IB live and ND killed	High mortality	Lien
7.	WNgiri-1 SCI Farm/2015 (Wonogiri, Central Java)	4 weeks	Broiler farm, vaccination: Day 4: ND-IB live and killed Day 21: ND live vaccine	High mortality	Pulmo
8.	BRAH-2 JH Farm/2014 (Brahlang, North Sumatera)	10 weeks	Layer farm, vaccination: Day 1: ND-IB live Day 14: ND-IB killed Day 20: ND live	High mortality and torticollis	Trachea
9.	BRAH-1 JH Farm/2014 (Brahlang, North Sumatera)	6 weeks	Layer farm, vaccination: Day 1: ND-IB Day 14: ND-IB killed Day 20: ND-IB live	High mortality and torticollis	Pulmo

Materials and Method

A total of nine organ samples (trachea, lien and pulmo) used in this research were provided by Dr. drh. Michael Haryadi Wibowo, M.P.. The

samples were collected from vaccinated broiler or layer chickens showing clinical signs from farms in Brahlang, Gunung Kidul, Kulon Progo, Boyolali, and Wonogiri. All farms were applying intermediate

biosecurity programs and have no record of ND outbreaks. Data on the chicken organ samples is described in Table 1.

1ml of Virus Transport Medium (VTM) was transferred into the mortar and a small portion of the organ sample was placed in the mortar, then homogenized and labelled. The samples were treated with the QIAamp® RNA kit for viral RNA extraction and purification, followed by elution. The final RNA extraction samples were immediately sequenced with RT-PCR, with the use of a mastermix solution and the T100™ Thermal Cycler PCR machine. The PCR program as shown in Table 2 was keyed into the machine to process the samples.

The final step involves visualisation of the RT-PCR product samples in agarose gel electrophoresis. The GeneRuler 100bp DNA Ladder and a positive control with the same size fragment as potential positive samples was used to measure and detect sample bands produced. The results were viewed and documented with the Unified Gel Documentation System.

Table 2. RT-PCR Program

Process	Temperature (°C)	Time
RT reaction	50	30 minutes
Pre-denaturation	95	5 minutes
Denaturation	95	15 seconds
Annealing	55	45 seconds
Elongation	72	60 seconds

Results and Discussion

This research applied RT-PCR technique to detect the presence of NDV genome in chickens organ samples suspected with NDV. RT-PCR results are summarised in Table 3 and Figure 1.

In Table 3, the RT-PCR results were recorded as positive with a '+' sign, and negative with a '-' sign, and both positive and negative controls serve as reference. The La Sota live ND vaccine used as the positive control contains the targeted 565 bp NDV genome and GeneRuler 100bp DNA Ladder helps estimate the size of the nucleotides separated and detect whether the desired gene sequence was amplified.

Band formations along lanes 2 to 10 in Figure 1 indicate all nine samples are NDV positive. Formation of sharp bands indicates optimal RT-PCR program and materials were applied in this research to produce good quality amplification products. Results show that samples bands formed within the 500 bp to 600 bp range which suggests the presence of the targeted 565 bp NDV F gene fragment in all nine samples. Pelt-Verkuil *et al.* (2008) states that comparing band intensities of sample bands to a control of known quantity, such as the DNA ladder, helps yield a measure of the amount of transcript in the samples. Hence, difference in band intensities corresponds to the amount of virus present in samples. Difference in sample band thickness may be used to estimate the amount of product relative to the DNA ladder.

Samples 1 and 2 (lane 2 and 3 respectively) have bands similar in width to the positive control but thinner compared to other samples. Meanwhile, samples 3 to 6 (lanes 4 to 7) and samples 8 and 9 (lanes 9 and 10 respectively) have a bands that are thicker in size. Hence, results suggest that samples 3 to 9 have higher amounts of F gene fragments compared to samples 1 and 2. Sample band7 with the thickest band formation (along lane 8)

Table 3: RT-PCR Results

No	Sample Code	Organ Sample	Lane	Results
1.	BRAH-2/2014	Trachea	2	+
2.	SEM-1/2015	Pulmo	3	+
3.	SEM-2/2015	Pulmo	4	+
4.	SEM-3/2015	Lien	5	+
5.	KP-1/2013	Pulmo	6	+
6.	GK-1/2013	Pulmo	7	+
7.	BYL-1/2014	Pulmo	8	+
8.	BRAH-1/2014	Pulmo	9	+
9.	WNgiri-1/2015	Pulmo	10	+
10.	Live ND Vaccine (La Sota)	Positive control	K+	+
11.	Nuclease Free Water	Negative control	K-	-

Positive result: '+', Negative result: '-'.

has the highest amount of F gene fragments.

Molecular identification in this study was based on the amplification of NDV F gene fragment at position 71 to 635 with a product size of 565 bp with the use of primers designed by the Lampung Disease Investigation Centre (Angeliya *et al.*, 2014). Both those primers, namely: forward primer (5' GCT-GTA-TCT-GTC-TGA-CAA-GCT-CTC 3') and

reverse primer (5' AGG-TTG-AGT-TCT-ACA-CCA-ACC-TGT 3') have motives specific to the target site. NDV detection with RT-PCR primarily targets the F gene because NDV virulence is principally dependent on the amino acid sequence at the F0 cleavage site (Alexander, 2000). In comparison, Dharmayanti *et al.* (2014) applied another set of primers to target different portion of the F gene with a 535 bp product

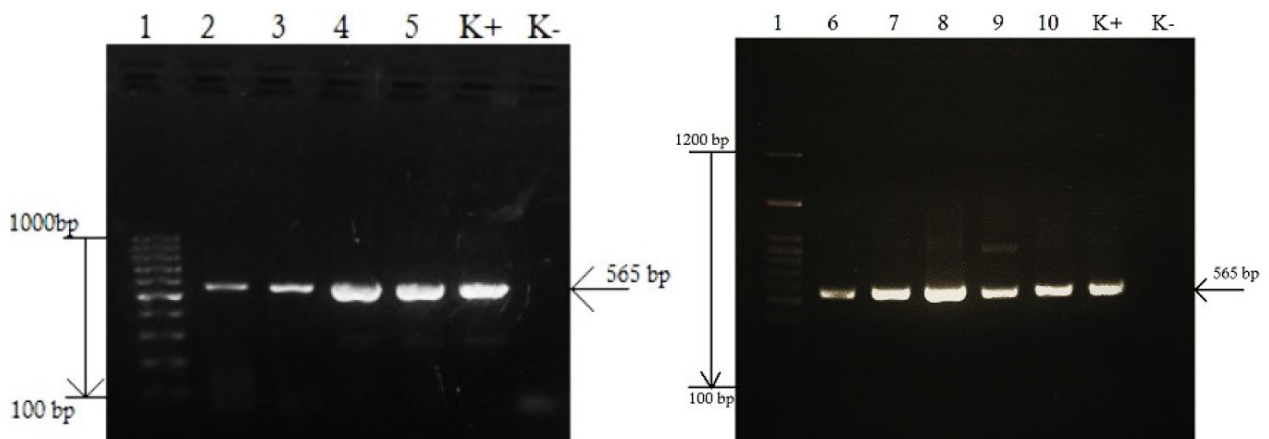


Figure 1: Amplification results of the targeted 565 bp long NDV genome. Lane 1 contains the 100bp DNA Ladder. Lanes 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, and 10 containing the samples showed positive amplification results. Lane K+ is the positive control and lane K- is the negative control.

size. The research by Haque *et al.* (2010) used specific primers which amplified a 356 bp long F gene sequence encoding the fusion protein cleavage site. Likewise, Singh *et al.* (2005) used the same primers for the 356 bp amplicon, along with another pair of primers targeting the 216 bp internal sequences of the NDV F gene cleavage activation. Results from these studies show that RT-PCR amplification applying F gene as the target sequence to be effective for NDV detection. NDV sequencing using RT-PCR has been established as an effective method, especially after prior isolation and serology tests as prescribed by the OIE Standards Commission (Oberdorfer & Werner, 1998). A research by Kencana *et al.* (2012) used this technique for confirmatory diagnosis of ND in native Bali chickens. Kencana (2012) carried out propagation of samples in embryonated chicken eggs and subsequent confirmatory serology tests prior to RT-PCR amplification. The same method was reported by Dharmayanti *et al.* (2014).

However, in this research RT-PCR was performed to detect NDV directly from chicken organ samples. According to Kant *et al.* (1997) found direct RT-PCR detection from organ samples containing virulent NDV to be possible, but failed to detect NDV in some tissue samples containing non-virulent NDV due to the assay sensitivity. Another report by Gohm *et al.* (2000) states that rapid NDV detection is achieved by employing RT-PCR directly on samples from affected birds without prior virus isolation. These findings are in close agreement with the present study.

Conclusion

All nine samples were confirmed positive as NDV by RT-PCR using specific primers of targeted

F gene fragment and produced of 565 base pairs amplicon product. The result showed that this method could be used for NDV detection from chicken organ samples without prior isolation and propagation in embryonated eggs. Hence, the RT-PCR method is applicable for detection of NDV in chicken organ samples.

Acknowledgement

Part of this data is supported by USDA-ARS, USA, No.999x-14-60072-1.

References

- Alexander, D.J. 2000. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. *Revue Scientifique et Technique de L'Office International Des Epizooties* 19(2): 443-462.
- Alexander, D. Newcastle disease, other avian paramyxoviruses, and pneumovirus infections. In: Diseases of Poultry. Saif, Y.M., Barnes, H.J., Glisson, J.R., Fadly, A.M., McDougald, L.R., Swayne, D., (eds)., Iowa State University Press, Ames. 63-99.
- Alexander, D.J., Bell, J.G. and Alders, R.G. 2004. A Technology Review: Newcastle Disease. *FAO Animal Health and Production Paper*, 161: 1-15.
- Amanu, S. and Rohi, O.K. 2005. Studi Serologis dengan Uji Hambatan Hemaglutinasi terhadap Angsa yang dapat bertindak sebagai pembawa Newcastle Disease di D.I.Yogyakarta. *Jurnal Sain Veteriner*, 1: 8-12.
- Angeliya, L. 2014. Analisis Phylogenic Tree Dan Konsensus Sequence Virus Newcastle Disease Isolat Asal Wilayah Kerja Balai Veteriner Lampung Tahun 2010-2013. In: *Prosiding Seminar Nasional Sains dan Inovasi Teknologi Pertanian*, Balai Pengkajian Teknologi Pertanian (BPTP), Lampung. 474-481.
- Cattoli, G., Susta, L., Terregino, C., and Brown, C. 2011. Newcastle disease: a review of field recognition and current methods of laboratory

- detection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23(4): 637–656.
- de Leeuw, O.S., Koch, G., Hartog, L., Ravenshorst, N. and Peeters, B.P. H. 2005. Virulence of Newcastle disease virus is determined by the cleavage site of the fusion protein and by both the stem region and globular head of the haemagglutinin–neuraminidase protein. *Journal of General Virology*, 86: 1759–1769.
- Dharmayanti, N.L.P.I., Hartawan, R., Hewajuli, D.A. and Indriani, R. 2014. Phylogenetic Analysis of Genotype VII of Newcastle Disease Virus in Indonesia. *African Journal of Microbiology Research*, 8(13): 1368-1374
- Gohm, D.S., Thür, B. and Hofmann, M. A. 2000. Detection of Newcastle disease virus in organs and faeces of experimentally infected chickens using RT-PCR. *Journal of Avian Pathology*, 29(2): 143-152
- Haque, M.H., Hossain, M. T., Islam, M. T., Zinnah, M. A., Khan, M. S. R. and Islam, M.A. 2010. Isolation and Detection of Newcastle Disease Virus From Field Outbreaks In Broiler And Layer Chickens By Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine*, 8(2): 87–92.
- Kant, A., Koch, G., Van Roozelaar, D.J., Balk, F. and Ter Huurne, A. 1997. Differentiation of virulent and non-virulent strains of Newcastle disease virus within 24 hours by polymerase chain reaction. *Avian Pathology Journal*, 26(4): 837-849
- Kencana, G.A.Y., Kardena, I.M., and Mahardika, I.G.N.K. 2012. Diagnosis Confirmation of Newcastle Disease on Native Chicken in Bali Using RT-PCR Method. *Jurnal Kedokteran Hewan*, 6(1): 28-31
- Kho, C.L., Tan, W.S., Tey, B.T. and Yusoff, K. 2003. Newcastle Disease Virus Nucleocapsid Protein. *Journal of General Virology*, 84: 2163–2168.
- Kryger, K.N., Thomsen, K.A., Whyte, M.A. and Dissing, M. 2010. Smallholder Poultry Production. *FAO Smallholder Poultry Production Paper*. 4: 7-25.
- MacLachlan, N.J. and Dubovi, E.J. (eds). 2010. *Fenner's Veterinary Virology*. 4th Edition., Academic Press Elsevier, London. 300, 304-305, 311-314.
- Miller, P.J., Decanini, E.L. and Afonso, C.L. 2010. Newcastle disease. *Infection, Genetics and Evolution*, 10(1): 26–35.
- Oberdorfer, A. and Werner, O. 1998. Newcastle disease virus: Detection and characterization by PCR of recent German isolates differing in pathogenicity. *Journal of Avian Pathology*, 27(3): 237-243.
- Office International des Epizooties (OIE). 1996. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. 3rd Edition., *OIE Manual*, 161-165.
- Office International des Epizooties (OIE). 2008. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 6th Edition., *OIE Terrestrial Manual*, 1: 576-582.
- Pelt-Verkuil, E.V., Belkum, A.V., and Hays, J.P. 2008. *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*. Springer Science & Business Media. 20.
- Rabalski, L., Smietanka, K., Minta, Z., and Szewczyk, B. 2014. Detection of Newcastle Disease Virus Minor Genetic Variants by Modified Single-Stranded Conformational Polymorphism Analysis. *BioMed Research International*, 2014(632347): 1-8.
- Rio, D. C., Ares, M., Hannon, G.J. and Nilsen, T.W. 2011. *RNA: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press. New York. 17.
- Saif, Y.M. 2011. *Diseases of Poultry*. 12th Edition., Iowa, John-Wiley and Sons Publishing Inc. 87-93.
- Shirvan, A.S. and Mardani, K. 2014. Molecular Detection of Infectious Bronchitis and Newcastle Disease Viruses in Broiler Chickens with Respiratory Signs using Duplex RT-PCR. *Veterinary Research Forum*, 5(4): 319 – 323
- Singh, K., Jindal, N., Gupta, S.L., Gupta, A.K. and Mittal D. 2005. Detection of Newcastle Disease Virus Genome from the Field

Outbreaks in Poultry by Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction. *International Journal of Poultry Science*, 4(7): 472-475.

Tabbu, C.R. 2000. Penyakit Ayam dan Penanggulangannya: Volume 1. Penerbit PT Kanisius, Yogyakarta, 49-51.

Wibowo, M.H. and Amanu, S. 2010. Perbandingan

beberapa Program Vaksinasi Penyakit Newcastle pada Ayam Buras. *Jurnal Sain Veteriner*, 28(1): 27-35.

Wibowo, M.H., Untari, T. and Wahyuni, A.E.T.H. 2012. Isolation, Identification, Physical, And Biological Character Of Newcastle Disease Virus Isolated From Field Cases. *Jurnal Sain Veteriner*, 13(4): 425-433.

Optimalisasi Waktu Pengomposan dan Kualitas Pupuk Kandang dari Kotoran Kambing dan Debu Sabut Kelapa dengan Bioaktivator PROMI dan Orgadec

Time Optimization of the Composting and Quality of Organic Fertilizer Based on Goat Manure and Coconut Coir Dust using PROMI and Orgadec Bio-Activator

Linda Trivana, Adhitya Yudha Pradhana

Balai Penelitian Tanaman Palma
Jalan Raya Mapanget, Kotak Pos 1004 Manado 95001
Email: lindatrivana@gmail.com

Abstract

Animal manures can be used as organic fertilizer because the high nutrient content such as nitrogen (N), phosphorus (P), and potassium (K). The nutrients are needed by plants and soil for fertility. One of the animal manures that can be used for organic fertilizer is goat manure. Goat manure is used as organic fertilizer it contains relatively more balanced nutrients than other natural fertilizer. In addition, the goat manure is mixed with the goat urine that also contains high nutrients. Coconut coir dust contains high potassium so that the addition of coconut coir dust in organic fertilizer will increase the potassium content (K) in organic fertilizer. The purpose of this research was to find out the influence of effective Orgadec and PROMI bioactivators on the optimal time of composting and the quality of the organic fertilizer. The organic fertilizer was analyzed to determine the content of N, P, K, organic-C, C/N ratio, water content, and pH. The result of analysis is compared with SNI 19-7030-2004. Organic fertilizer analysis was conducted on day 0, 10, 20, 30, 40, and 50. The result of the organic fertilizer analysis with Orgadec bio-activator more effective and faster on the decomposition organic matter in the compost compared PROMI (<20 days). The quality of organic fertilizer with Orgadec bioactivator on day 10 and 20, while organic fertilizer with PROMI on day 20, 30, 40, and 50 days was in accordance with the quality stated in SNI 19-7030-2004 (C/N ratio, levels of N, P, K, water, and organic-C).

Keywords : goat manure, coconut coir dust, Orgadec, PROMI

Abstrak

Kotoran ternak dapat dimanfaatkan sebagai pupuk kandang karena kandungan unsur hara seperti nitrogen (N), fosfor (P), dan kalium (K) yang dibutuhkan oleh tanaman dan kesuburan tanah. Salah satu kotoran ternak yang dapat digunakan untuk pupuk kandang adalah kotoran kambing. Kotoran kambing digunakan sebagai pupuk kandang didasari oleh alasan bahwa kotoran kambing memiliki kandungan unsur hara relatif lebih seimbang dibanding pupuk alam lainnya dan kotoran kambing bercampur dengan air seninya (urine) yang juga mengandung unsur hara. Penambahan debu sabut kelapa ke dalam pupuk kandang karena kandungan kalium yang tinggi pada debu sabut dapat meningkatkan kandungan unsur hara K pada pupuk kandang. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian bioaktivator yang berbeda (PROMI dan Orgadec) terhadap waktu optimal pengomposan dan kualitas pupuk kandang sesuai dengan SNI 19-7030-2004. Pupuk kandang yang diperoleh dianalisis kadar N, P, K, C-organik, rasio C/N, dan kadar airnya. Hasil analisis dibandingkan dengan SNI 19-7030-2004. Analisis pupuk kandang dilakukan pada hari ke 0, 10, 20, 30, 40, dan 50. Hasil analisis pupuk kandang dengan bioaktivator Orgadec lebih efektif dan memerlukan waktu yang lebih cepat untuk mendekomposisi bahan organik dalam kompos daripada dengan bioaktivator PROMI, yaitu <20 hari. Kualitas pupuk kandang yang memenuhi SNI 19-7030-2004 (rasio C/N, kadar N, P, K, air, dan C-organik), yaitu pupuk kandang dengan bioaktivator Orgadec pada pengomposan selama 10 dan 20 hari, sedangkan pupuk kandang dengan bioaktivator PROMI pada pengomposan selama 20, 30, 40, dan 50 hari.

Kata Kunci: kotoran kambing, debu sabut kelapa, Orgadec, PROMI

Pendahuluan

Limbah peternakan seperti feces, urine, dan sisa pakan yang dibiarkan tanpa penanganan lebih lanjut dapat menyebabkan pencemaran lingkungan dan gangguan kesehatan pada masyarakat di sekitar peternakan. Pengolahan kotoran ternak perlu dilakukan untuk mengurangi pencemaran lingkungan. Pengolahan kotoran ternak dapat dilakukan dengan cara menggunakan kotoran ternak sebagai pupuk kandang. Kotoran ternak dimanfaatkan sebagai pupuk kandang karena kandungan unsur haranya seperti nitrogen (N), fosfor (P), dan kalium (K) serta unsur hara mikro diantaranya kalsium, magnesium, belerang, natrium, besi, dan tembaga yang dibutuhkan tanaman dan kesuburan tanah (Hapsari, 2013). Kotoran kambing dapat digunakan sebagai bahan organik pada pembuatan pupuk kandang karena kandungan unsur haranya relatif tinggi dimana kotoran kambing bercampur dengan air seninya (urine) yang juga mengandung unsur hara (Surya, 2013).

Limbah pertanian seperti limbah dari pengolahan kelapa juga dapat dimanfaatkan untuk pupuk organik. Debu sabut merupakan limbah dari penyeratan sabut kelapa. Debu sabut saat ini masih terbatas pemanfaatannya, yaitu sebagai media tanam (Mulyawan *et al.*, 2015). Debu sabut mengandung unsur hara seperti N, P, K, Ca, Fe, Mg, Na, Mn, Cu, Zn, dan Al. Unsur hara yang terdapat di debu sabut kelapa sesuai untuk digunakan sebagai pupuk organik (Lay dan Nur, 2014; Mulyawan *et al.*, 2015). Hermawati (2007) dalam Waryanti (2010), melaporkan bahwa K_2O yang terkandung di dalam debu sabut kelapa sebesar 10,25%. Debu sabut dapat ditambahkan ke dalam pupuk kandang karena kandungan kalium yang tinggi sehingga

meningkatkan kandungan unsur hara K pada pupuk kandang. Secara umum, kandungan hara dalam kotoran hewan lebih rendah daripada pupuk kimia.

Nilai rasio C/N kotoran kambing umumnya diatas 30, oleh karena itu kotoran kambing harus dikomposkan terlebih dahulu sebelum digunakan ke tanaman. Prinsip pengomposan adalah untuk menurunkan rasio C/N bahan organik hingga sama dengan C/N tanah (<20) (Siboro *et al.*, 2013). Pengomposan adalah proses penguraian bahan-bahan organik secara biologis oleh mikroba-mikroba yang memanfaatkan bahan organik sebagai sumber energi (Dewi dan Treesnowati, 2012). Proses pengomposan yang terjadi secara alami berlangsung lama dan lambat. Untuk mempercepat proses pengomposan telah dikembangkan teknologi-teknologi pengomposan, antara lain dengan menggunakan aktivator sehingga pengomposan berjalan dengan lebih cepat dan efisien (Arisha *et al.*, 2003). Bioaktivator yang digunakan dalam penelitian ini adalah PROMI dan Orgadec. Mikroba dalam bioaktivator Orgadec yang digunakan dalam pengomposan adalah *Trichoderma Pseudokoningii* dan *Cytophaga Sp.* Kedua mikroba ini memiliki kemampuan yang tinggi dalam menghasilkan enzim penghancur lignin dan selulosa secara bersamaan (Didik dan Yufnal, 2008). Mikroba yang terdapat dalam PROMI, yaitu *Trichoderma Harzianium* Dt 38, *Pseudokoningii* Dt 39, *Aspergillus sp.* dan fungi. Penggunaan PROMI dan Orgadec pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian bioaktivator yang berbeda terhadap waktu optimal pengomposan dan kualitas pupuk kandang sesuai dengan SNI 19-7030-2004 (Badan Standardisasi Nasional, 2004).

Materi dan Metode

Penelitian ini dilakukan di Kebun Percobaan Kima Atas Balai Penelitian Tanaman Palma, selama bulan September-Desember 2015. Bahan penelitian yang digunakan antara lain, kotoran kambing yang berasal dari peternakan Kebun Percobaan Kima Atas, debu sabut kelapa, air, dan bioaktivator PROMI dan Orgadec. Alat yang digunakan, yaitu tempat pengomposan, sekop, plastik terpal, ember, gelas ukur, dan karung.

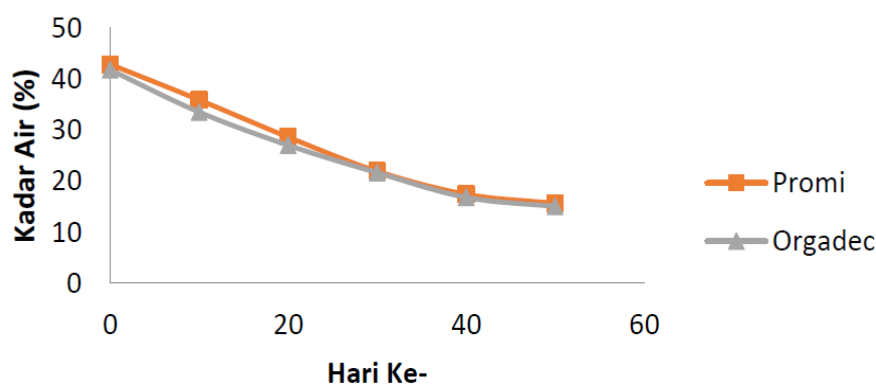
Pembuatan kompos dilakukan dengan sistem anaerob. Kotoran kambing yang sudah matang dihancurkan terlebih dahulu dengan alat penghancur. Kotoran kambing yang sudah hancur dicampur dengan debu sabut dengan perbandingan 1:1 (total bahan organik 10 kg), kemudian tumpukan bahan-bahan organik tersebut diberi perlakuan bioaktivator yang berbeda Promi (1 kg dilarutkan dalam 200 l air), dan Orgadec (1 kg dilarutkan dalam 200 l air) secara merata. Tumpukan bahan-bahan organik ditutup dengan plastik terpal. Proses pembalikan dilakukan setiap 3 hari sekali sampai proses pengomposan selesai. Pengujian kualitas pupuk terdiri atas kadar air, nitrogen total, P_2O_5 , C-organik, K, dan rasio C/N yang dilakukan pada hari ke 0, 10, 20, 30, 40, dan 50. Nilai kadar air ditentukan dengan metode gravimetri, kadar nitrogen

dengan metode kjeldahl, P_2O_5 dianalisis dengan metode spektrofotometri, kadar K diukur dengan AAS (*Atomic Absorption Spectroscopy*), dan kadar C-organik diukur dengan metode titrimetri.

Hasil dan Pembahasan

Parameter kualitas pupuk kandang yang dianalisis antara lain C-organik, N, P, K, rasio C/N, dan kadar air. Pengaruh lamanya waktu pengomposan terhadap kadar air pupuk kandang ditunjukkan pada Gambar 1.

Kadar air sangat berpengaruh terhadap lamanya pengomposan/penguraian bahan-bahan organik dalam kompos (Widarti *et al.*, 2015). Kadar air berkaitan dengan ketersediaan oksigen untuk aktivitas mikroorganisme aerobik, bila kadar air bahan berada pada kisaran 40-60,5% maka mikroorganisme pengurai akan bekerja optimal (Sriharti dan Salim, 2002). Kadar air dari bahan kompos berkisar 40% maka mikroorganisme pengurai dapat bekerja optimal menguraikan bahan-bahan organik dalam kompos. Kadar air mengalami penurunan karena proses penguapan selama pengomposan bahan organik oleh mikroorganisme dan proses pembalikan kompos. Proses pembalikan dilakukan agar kompos

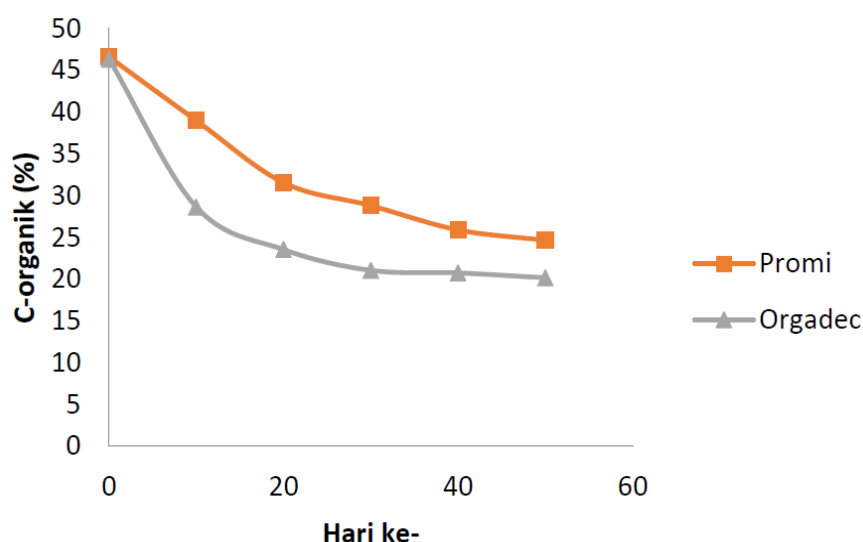


Gambar 1. Pengaruh waktu pengomposan terhadap kadar air

tidak terlalu lembab/ mengurangi kadar air pada bahan organik. Kelembaban memiliki peranan yang sangat penting dalam proses metabolisme mikroba dan suplai oksigen. Jika kompos terlalu lembab maka akan menyebabkan proses pengomposan berlangsung lebih lama dan jika kelembaban terlalu rendah maka efisiensi degradasi akan menurun karena kurangnya air untuk melarutkan bahan organik yang akan didekomposisi oleh mikroorganisme sebagai sumber energi (Pandebesie dan Rayuanti, 2012).

Karbon (C) dibutuhkan mikroorganisme selama pengomposan. Pengaruh waktu pengomposan terhadap kadar C-organik pupuk kandang ditunjukkan pada Gambar 2.

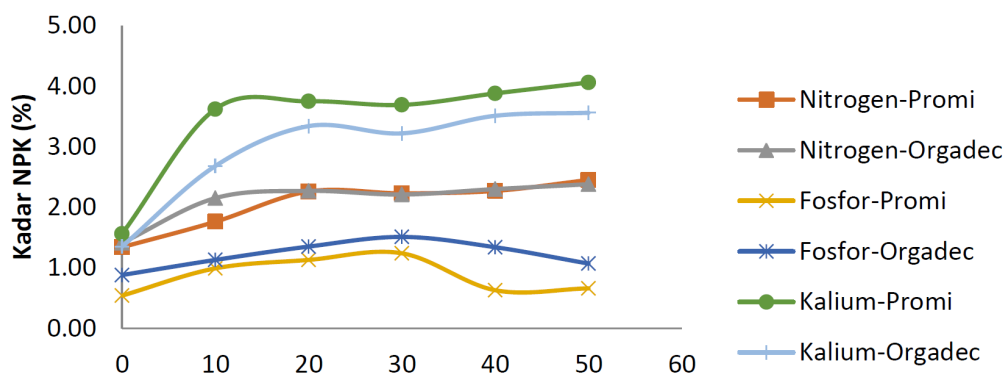
Semakin lama waktu pengomposan maka kadar karbon dalam pupuk kandang semakin menurun. Hal ini disebabkan oleh mikroba yang menggunakan karbon untuk berkembangbiak (Murtalaningsih, 2001). Mikroba mengambil energi untuk penguraian bahan organik dari kalori yang dihasilkan dalam reaksi biokimia, seperti perubahan zat karbohidrat menjadi gas CO_2 dan H_2O yang terus menerus sehingga kandungan zat karbon dalam pupuk kandang turun semakin rendah (Subali dan Ellianawati, 2010). Kadar C-organik di dalam kompos menunjukkan kemampuannya untuk memperbaiki sifat tanah (Sriharti dan Salim, 2010).



Gambar 2. Pengaruh waktu pengomposan terhadap kadar C-organik

Unsur hara makro yang dibutuhkan oleh tanaman antara lain N, P, dan K. Unsur nitrogen (N) untuk pertumbuhan tunas, batang, dan daun. Fosfor (P) untuk merangsang pertumbuhan akar buah dan biji. Kalium (K) untuk meningkatkan ketahanan tanaman terhadap serangan hama dan penyakit (Santi, 2008). Pengaruh lamanya waktu pengomposan terhadap kadar N, P, dan K pupuk kandang ditunjukkan pada Gambar 3.

Kadar N, P, dan K awal pengomposan (hari ke-0) pupuk kandang meningkat setelah dilakukan pengomposan. Kadar nitrogen dibutuhkan mikroorganisme untuk pemeliharaan dan pembentukan sel tubuh. Makin banyak kandungan nitrogen, makin cepat bahan organik terurai karena mikroorganisme yang menguraikan bahan kompos memerlukan nitrogen untuk perkembangannya (Sriharti dan Salim, 2010). Nilai nitrogen mengalami



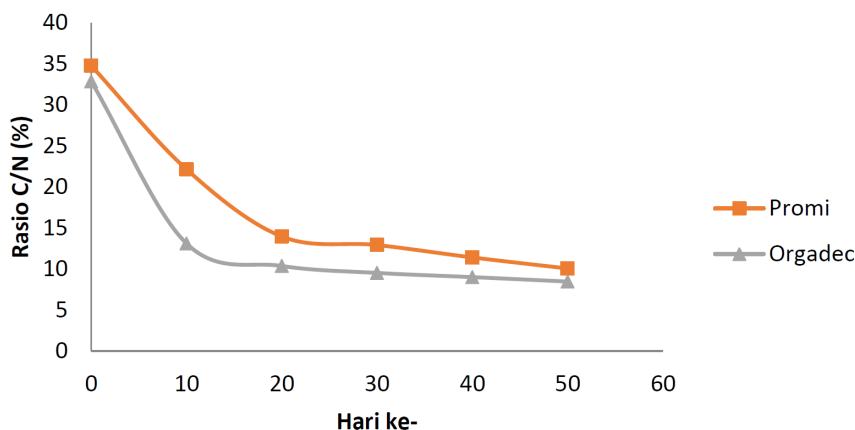
Gambar 3. Pengaruh waktu pengomposan terhadap kadar N, P, dan K

peningkatan dan penurunan selama proses pengomposan. Peningkatan kadar nitrogen pupuk kandang terjadi karena proses dekomposisi yang dilakukan mikroorganisme yang menghasilkan ammonia dan nitrogen. Penurunan kadar nitrogen disebabkan oleh nitrogen yang bereaksi dengan air membentuk NO_3^- dan H^+ . Senyawa NO_3^- bersifat sangat *mobile*, sangat larut air, dan tidak dapat dipegang oleh koloid tanah serta akan terjadi kehilangan N dalam bentuk gas, dimana reaksi NO_3^- menjadi N_2 dan N_2O . Kehilangan N ini diatasi dengan pembalikan tumpukan pupuk kandang sehingga kadar air berkurang, suplai oksigen yang cukup untuk mikroorganisme mengurai protein menjadi ammonia (NH_4^+), dan proses aerasi yang baik (Cesaria *et al.*, 2010).

Kandungan fosfor juga dipengaruhi oleh tingginya kandungan nitrogen, semakin tinggi nitrogen yang terkandung maka multiplikasi mikroorganisme yang merombak fosfor akan meningkat sehingga terjadi kenaikan kandungan fosfor pada pupuk kandang (Hidayati *et al.*, 2011). Unsur fosfor (P) sebagai bahan organik memiliki peranan yang sangat penting dalam kesuburan tanah, proses fotosintesis, dan fisiologi kimiawi tanaman. Fosfor juga dibutuhkan di dalam pembelahan sel, pengembangan jaringan dan titik tumbuh tanaman (Widarti *et al.*, 2015).

Bakteri pelarut fosfat umumnya juga dapat melarutkan unsur kalium dalam bahan organik. Menurut Hidayati *et al.*, (2011), kalium digunakan oleh mikroorganisme dalam bahan substrat sebagai katalisator, dengan kehadiran bakteri dan aktivitasnya akan sangat berpengaruh terhadap peningkatan kandungan kalium. Kalium dapat diikat dan disimpan dalam sel oleh bakteri dan jamur (Mirwan dan Rosariawari, 2012). Pengikatan unsur kalium berasal dari hasil dekomposisi bahan organik oleh mikroorganisme dalam tumpukan bahan kompos. Bahan kompos yang merupakan bahan organik segar mengandung kalium dalam bentuk organik kompleks yang tidak dapat dimanfaatkan langsung oleh tanaman untuk pertumbuhannya. Aktivitas dekomposisi oleh mikroorganisme mengubah organik kompleks tersebut menjadi organik sederhana yang menghasilkan unsur kalium yang dapat diserap tanaman (Widarti *et al.*, 2015)

Nilai rasio C/N bahan organik merupakan faktor penting dalam pengomposan. Karbon digunakan sebagai sumber energi dan nitrogen sebagai sumber nutrisi untuk pembentukan sel-sel tubuh mikroorganisme selama proses pengomposan. Pengaruh waktu pengomposan terhadap rasio C/N ditunjukkan pada Gambar 4.



Gambar 4. Pengaruh waktu pengomposan terhadap rasio C/N

Pembuatan pupuk kandang dari kotoran kambing dengan cara fermentasi menggunakan PROMI dan Orgadec akan menyebabkan penurunan rasio C/N. Penurunan nilai rasio C/N pada masing-masing bioaktivator disebabkan karena terjadinya penurunan jumlah karbon yang digunakan oleh mikroba sebagai sumber energi untuk menguraikan bahan organik dalam kompos. Selama proses pengomposan terjadi reaksi C menjadi CO₂ dan CH₄ yang berupa gas dan menguap sehingga menyebabkan penurunan kadar karbon (C). Sedangkan, nilai N total dalam bahan organik mengalami peningkatan karena proses dekomposisi bahan kompos oleh mikroorganisme yang menghasilkan ammonia dan nitrogen, sehingga kadar N total kompos meningkat. Dengan menurunnya kandungan C-organik dan

meningkatnya kandungan N total maka rasio C/N mengalami penurunan. Bahan organik sudah menjadi kompos/pupuk dan dapat digunakan untuk tanaman apabila rasio C/N < 20 (Yuniwati *et al.*, 2012).

Pupuk yang telah matang memiliki ciri-ciri, yaitu berwarna coklat tua hingga hitam, remah, memiliki suhu ruang, dan tidak berbau. Hasil analisis kualitas pupuk kandang dibandingkan dengan SNI 19-7030-2004 untuk mengetahui apakah pupuk kandang hasil pengomposan memenuhi kriteria Standar Nasional Indonesia (SNI) dan layak digunakan pada tanaman. Hasil analisis pupuk kandang dengan bioaktivator PROMI ditunjukkan pada Tabel 1 dan pupuk kandang dengan bioaktivator Orgadec ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 1. Hasil analisis pupuk kandang dengan bioaktivator PROMI dan SNI 19-7030-2004

Parameter	Standar SNI 19-7030-2004			Kotoran Kambing	Hari ke-					
	Satuan	Min	Maks		0	10	20	30	40	50
C-Organik	%	9,80	32	47,34	46,58*	38,96*	31,53	28,78	25,87	24,63
Nitrogen	%	0,40		1,45	1,34	1,76	2,26	2,23	2,27	2,45
Fosfor	%	0,10		0,35	0,54	0,99	1,13	1,24	0,63	0,66
Kalium	%	0,20		1,03	1,56	3,62	3,75	3,69	3,88	4,06
Rasio C/N		10	20	32,65	34,76*	22,14*	13,95	12,91	11,40	10,05
Kadar Air	%		50	35,91	42,88	35,91	28,63	21,95	17,44	15,66

Tabel 2 Hasil analisis pupuk kandang dengan bioaktivator Orgadec dan SNI 19-7030-200

Parameter	Standar SNI 19-7030-2004			Kotoran Kambing	Hari ke-					
	Satuan	Min	Maks		0	10	20	30	40	50
C-Organik	%	9,80	32	47,34	46,32*	28,61	23,52	21,03	20,72	20,14
Nitrogen	%	0,40		1,45	1,41	2,15	2,27	2,21	2,30	2,38
Fosfor	%	0,10		0,35	0,88	1,13	1,35	1,51	1,34	1,07
Kalium	%	0,20		1,03	1,35	2,68	3,34	3,22	3,51	3,56
Rasio C/N		10	20	32,65	32,85*	13,10	10,36	9,51*	9,00*	8,46*
Kadar Air	%		50	35,91	41,79	33,53	27,04	21,66	16,83	15,05

Keterangan: *tidak memenuhi SNI 19-7030-2004

Nilai rasio C/N kotoran kambing >30, yaitu 47,34 yang berarti kotoran kambing harus dikomposkan terlebih dahulu sebelum digunakan sebagai pupuk pada tanaman. Kondisi awal (hari ke-0) pengomposan bahan organik memiliki nilai rasio C/N awal yang memenuhi kriteria nilai C/N awal untuk bahan kompos, yaitu berkisar antara 30-50 (Salim dan Sriharti, 2008). Kandungan C-organik yang tinggi menunjukkan bahwa bahan organik tersebut cukup untuk mikroorganisme mendapatkan energi selama proses dekomposisi. Hasil analisis pupuk kandang dengan bioaktivator PROMI yang memenuhi parameter-parameter SNI 19-7030-2004 adalah pengomposan selama 20, 30, 40, dan 50 hari, sedangkan pupuk kandang dengan bioaktivator Orgadec adalah 10 dan 20 hari pengomposan. Orgadec lebih efektif dan memerlukan waktu pengomposan yang lebih cepat (<20 hari) daripada bioaktivator PROMI (>20 hari) untuk mendekomposisi kotoran kambing dan debu sabut kelapa. Debu sabut kelapa mengandung komponen yang sulit terdekomposisi seperti lignin, resin, dan lilin (Susanto, 2002; Ruskandi, 2006). Orgadec mengandung mikroba (*Trichoderma Pseudokoningii* dan *Cytophaga Sp*) yang memiliki kemampuan tinggi dalam

menghasilkan enzim penghancur lignin dan selulosa secara bersamaan. Dengan hancurnya lignin dan selulosa maka kadar karbon akan turun dan kadar nitrogen akan meningkat sehingga rasio C/N menjadi kecil (Mey, 2013). Bioaktivator Orgadec lebih efektif mendekomposisi bahan organik yang mengandung lignin dan selulosa seperti debu sabut kelapa.

Waktu pengomposan pupuk kandang dengan bioaktivator Orgadec yang tidak memenuhi SNI 19-7030-2004 (rasio C/N 10-20), yaitu pengomposan selama 0, 30, 40, dan 50 hari. Semakin lama proses pengomposan dilakukan maka rasio C/N semakin kecil (Surtinah, 2013). Hal ini disebabkan oleh kadar C dalam bahan kompos sudah banyak berkurang karena digunakan oleh mikroorganisme sebagai sumber makanan/energi, sedangkan kandungan nitrogen mengalami peningkatan karena proses dekomposisi bahan kompos oleh mikroorganisme yang menghasilkan ammonia dan nitrogen sehingga rasio C/N menurun. Waktu pengomposan pupuk kandang dengan bioaktivator PROMI yang tidak memenuhi SNI 19-7030-2004 (rasio C/N 10-20), pengomposan pada 0 dan 10 hari. Hal ini disebabkan oleh belum cukup waktu mikroba untuk mendekomposisi bahan organik dalam kompos.

Kesimpulan

Pengomposan pupuk kandang dari kotoran kambing dan debu sabut kelapa dengan bioaktivator Orgadec lebih efektif dibandingkan dengan bioaktivator PROMI, yaitu <20 hari. Bioaktivator Orgadec memerlukan waktu pengomposan yang lebih cepat daripada bioaktivator PROMI dalam mendekomposisi bahan organik dalam kotoran kambing dan debu sabut. Kualitas pupuk kandang dengan bioaktivator Orgadec memenuhi SNI 19-7030-2004 (rasio C/N, kadar N, P, K, air, dan C-organik), yaitu pada pengomposan selama 10 dan 20 hari, sedangkan pupuk kandang dengan bioaktivator PROMI pada pengomposan selama 20, 30, 40 dan 50 hari

Daftar Pustaka

- Arisha, H.M.E., Gad, A.A., dan Younes, S.E. 2003. Response of some pepper cultivar to organic and mineral nitrogen fertilizer under sandy soil conditions. *Zagazig J. Agric. Res.* 30: 1875-99.
- Badan Standardisasi Nasional. 2004. Spesifikasi Kompos dari Sampah Organik Domestik. SNI 19-7030-2004. Jakarta.
- Cesaria, R.Y., Wirosedarmo, R., Suharto, B. 2010. Pengaruh penggunaan *starter* terhadap kualitas fermentasi limbah cair tapioka sebagai alternatif pupuk cair. *Jurnal Sumberdaya Alam dan Lingkungan* 12(2):8-14.
- Dewi, Y.S., Treesnowati. 2012. Pengolahan sampah skala rumah tangga menggunakan metode composting. *Jurnal Ilmiah Fakultas Teknik LIMIT'S*. 8(2): 35-48.
- Didik, H.G., dan Yufnal. A. 2008. *OrgaDec*. Balai Penelitian Biotek Perkebunan Indonesia.
- Hapsari, A.Y. 2013. Kualitas dan kuantitas kandungan pupuk organik limbah serasah dengan inokulum kotoran sapi secara semianaerob. *skripsi*. Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan. Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Hermawati, T. 2007. Tanaman semangka (*Citrullus vulgaris Schars*) terhadap pemberian berbagai dosis abu sabut kelapa. *Jurnal Agronomi* 11(2): 77-80.
- Hidayati, Y.A., Kurnani, A., Marlina, E.T., Harlia, E. 2011. Kualitas pupuk cair hasil pengolahan fases sapi potong menggunakan *Saccharomyces cereviceae*. *Jurnal Ilmu Ternak* 11(2): 104-107.
- Lay, A., Nur., M. 2014. Aplikasi model *renewable cycle sistem* (RCS) pada usaha tani kelapa. Prosiding Konferensi Nasional Kelapa VIII, Jambi, 21-22 Mei 2014. p. 113-120.
- Mey, D. 2013. Uji efektivitas mikroorganisme terhadap laju dekomposisi limbah jambu mete sebagai pupuk organik di Sulawesi Tenggara. *AGRIPLUS* 23(2): 85-91.
- Mirwan, M., Rosariawari, F. 2012. Optimasi pematangan kompos dengan penambahan campuran lindi dan bioaktivator stardec. *Jurnal Ilmiah Teknik Lingkungan* 4(2): 150-154.
- Mulyawan, M., Setyowati, E., Widjaja, A. 2015. Surfaktan sodium ligno sulfonat (SLS) dari debu sabut kelapa. *Jurnal Teknik ITS* 4(1): 1-3.
- Murtalaningsih. 2001. Studi pengaruh penambahan bakteri dan cacing tanah terhadap laju reduksi dan kualitas kompos. *Laporan Tugas Akhir*. FTSP-ITS. Surabaya.
- Pandebesie, E.S., Rayuanti, D. 2013. Pengaruh penambahan sekam pada proses pengomposan sampah domestik. *Jurnal Lingkungan Tropis* 6(1): 31-40.
- Ruskandi. 2006. Teknik pembuatan kompos limbah kebun pertanaman kelapa polikultur. *Buletin Teknik Pertanian* 11(1): 33-36.
- Salim, T., Sriharti. 2008. Pemanfaatan limbah industri pengolahan dodol nenas sebagai kompos dan aplikasinya pada tanaman tomat. Prosiding Seminar Nasional Teknoin 2008 Bidang Teknik Kimia dan Tekstil, Yogyakarta, 22 November 2008. p. 72-77.

- Santi, S.S. 2008. Kajian pemanfaatan limbah nilam untuk pupuk cair organik dengan proses fermentasi. *Jurnal Teknik Kimia* 2(2): 170-175.
- Siboro, E.S., Surya, E., Herlina, N. 2013. Pembuatan pupuk cair dan biogas dari campuran limbah sayuran. *Jurnal Teknik Kimia USU* 2(3): 40-43.
- Sriharti., Salim, T. 2010. Pemanfaatan sampah tanam (rumput-rumputan) untuk pembuatan kompos. Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia “Kejuangan” *Pengembangan Teknologi Kimia untuk Pengolahan Sumber Daya Alam Indonesia*, Yogyakarta, 26 Januari 2010. p. 1-8.
- Subali, B., Ellianawati. 2010. Pengaruh waktu pengomposan terhadap rasio unsur C/N dan jumlah kadar air dalam kompos. Prosiding Pertemuan Ilmiah XXIV HFI Jateng & DIY, Semarang, 10 April 2010. p. 49-53.
- Surtinah. 2013. Pengujian kandungan unsur hara dalam kompos yang berasal dari serasah tanaman jagung manis (*Zea mays saccharata*). *Jurnal Ilmiah Pertanian* 11(1): 16-25.
- Surya, R.E., Suryono. 2013. Pengaruh pengomposan terhadap rasio C/N kotoran ayam dan kadar hara NPK tersedia serta kapasitas tukar kation tanah. *UNESA Journal of Chemistry* 2(1): 137-144.
- Sutanto, R. 2002. *Pupuk Organik: potensi biomassa dan proses pengomposan*. Yogyakarta: Kanisius. hlm. 35-56.
- Waryanti, A., Sudarno., Sutrisno, E. 2010. Studi pengaruh penambahan sabut kelapa pada pembuatan pupuk cair dari limbah cucian ikan terhadap kualitas unsur hara makro (C/NPK). *Jurnal Agronomi* 11(2): 1-7.
- Widarti, B.N., Wardhini, W.K., Sarwono, E. 2015. Pengaruh rasio C/N bahan baku pada pembuatan kompos dari kubis dan kulit pisang. *Jurnal Integrasi Proses* 5(2): 75-80.
- Yuniwati, M., Iskarima, F., Padulemba, A. 2012. Optimasi kondisi proses pembuatan kompos dari sampah organik dengan cara fermentasi menggunakan EM4. *Jurnal Teknologi* 5(2):172-181.