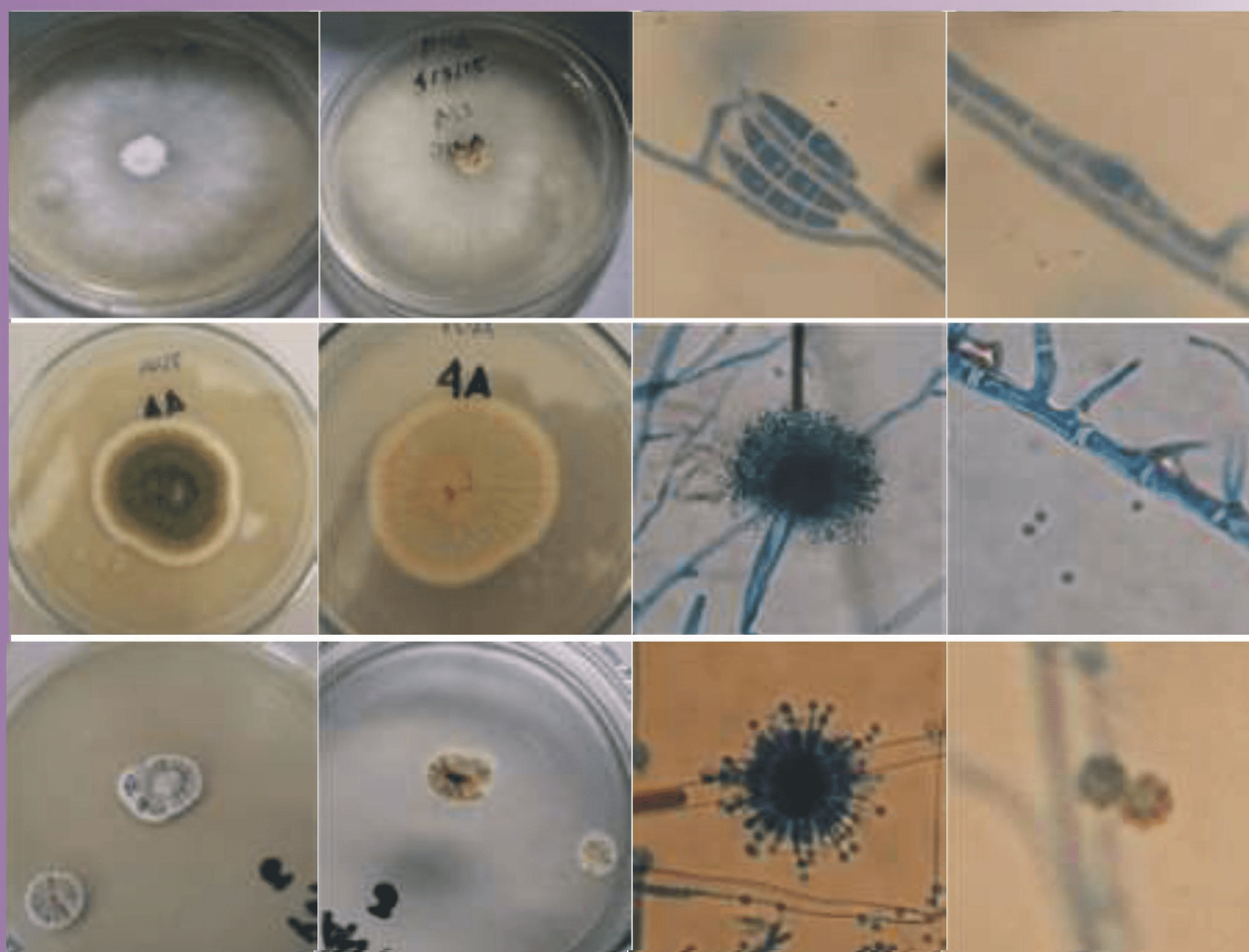


# Jurnal Sain Veteriner



Terakreditasi oleh Dirjen Penguatan Riset dan Pengembangan Kemenristek Dikti  
SK No. : I/E/KPT/2015, tanggal 21 September 2015



FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN, UNIVERSITAS GADJAH MADA  
BEKERJA SAMA DENGAN PERHIMPUNAN DOKTER HEWAN INDONESIA



## DAFTAR ISI

<b>Efektifitas Penambahan Insulin dalam Media Maturasi dan atau Media Kultur pada Tingkat Maturasi Oosit dan Perkembangan Awal Embrio Sapi secara <i>In Vitro</i></b> <i>Syafri Nanda, Ni Wayan Kurniani Karja, Mohamad Agus Setiadi</i>	135-142
<b>Efek Ekstrak Daun <i>Tithonia diversifolia</i> terhadap Penurunan Konsentrasi Adiponektin pada Tikus Diabetik yang Diinduksi oleh <i>Streptozotocin</i></b> <i>Rondius Solfaine, Lailatul Muniroh, Wida Wahidah Mubarakah</i>	143-150
<b>Keragaman dan Intensitas Infeksi Endoparasit Gastrointestinal pada Sapi Bali dengan Sistem Ekstensif di Kabupaten Kupang</b> <i>I Gusti Komang Oka Wirawan, I Ketut Jaya, Melkianus Dedimus Same Randu</i>	151-159
<b>Kajian Kliniko-patologik dan Antimikroba Ekstrak Biji Alpukat (<i>Persea Americana</i> Mill)</b> <i>Christin Marganingsih Santosa, Imron Rosyadi, Dinar Arifianto, Siti Isrina Oktavia Salasia</i>	160-165
<b>Pengaruh <i>In Vitro</i> Infusa Biji Buah Pinang (<i>Areca catechu</i>) terhadap Tingkat Kematian dan Morfometri <i>Ascaridia galli</i> Dewasa</b> <i>Wida Wahidah Mubarakah, Kurniasih, Wisnu Nurcahyo, Joko Prastowo</i>	166-171
<b>Studi <i>In Vivo</i> Ekstrak Daun Teh Hijau (<i>Camellia sinensis</i>) sebagai Alternatif Anti <i>Eschericia coli</i> pada Ayam Broiler</b> <i>Bambang Sutrisno, R. Wasito, Kurniasih, Sitarina Widyarini, Yuli Purwandari Kristianingrum, Sugiyono</i>	172-179
<b>Peluang Imbuhan Pakan Herbal-Probiotik Komersial “Promix®” sebagai Pengganti <i>Antibiotic Growth Promoter</i> (AGP) pada Ayam Pedaging yang Diberi Vaksin ND</b> <i>Agnesia Endang Tri Hastuti Wahyuni, Vinsa Cantya Prakasita, Thomas Emanuel Manggotu Nahak, Agustina Viktoria Tae, Jeffi Chandra Ajiguna, Sruti Listra Adrenalin, Lynda Nugrahaning Imanjati, Ima Fuaziah</i>	180-184
<b>Deteksi Kejadian Residu Tetrasiklin pada Daging Ikan Nila di Kota Yogyakarta dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)</b> <i>Wari Pawestri, Gagak Donny Satria, Nisa Hakimah, Doddi Yudhabuntara</i>	185-192
<b>Melamine, Asam Sianurat dan Melamin-Sianurat: Kaitan dengan Penyakit Saluran Perkencingan Hewan</b> <i>Yanuartono, Alfarisa Nururrozi, Soedarmanto Indarjulianto, Harry Purnamaningsih, Slamet Rahardjo</i>	193-205
<b>Kertas Saring sebagai Media Transpor Darah untuk Pemeriksaan Antibodi Rabies</b> <i>Retno Wijayanti, Retno Damayanti, Sri Murtini</i>	206-212
<b>Validasi Metode Analisis Tetrasiklin pada Ikan Nila (<i>Oreochromis</i> sp.) menggunakan Alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)</b> <i>Nisa Hakimah, R. Gagak Donny Satria, Wari Pawestri, Soedarmanto Indarjulianto</i>	213-218
<b>Performa Produksi dan Analisis Usaha Puyuh (<i>Coturnix coturnix japonica</i>) yang Diberi Substitusi <i>Black Soldier Fly Larvae</i> (BSFL) pada Pakan Komersil</b> <i>Fithria Nisa Hanifah, Koesnoto Soepranianondo, Soeharsono, Anam Al Arif<sup>2</sup>, Widya Paramita Lokapirnasari, Nenny Harijani, Siti Hadijah, Mariana Ruth Theresia Hutabarat</i>	219-226
<b>Identifikasi Serovar Penyebab Leptospirosis pada Anjing di Yogyakarta</b> <i>Guntari Titik Mulyani, Sri Hartati, Hastari Wuryastuti, Ida Tjahajati, Yuriadi, Irkham Widiyono, Yanuartono, Hary Purnamaningsih, S Indarjulianto, Slamet Raharjo, Alfariza Nururozi, Angeline Ganapragasam, Yeo Suan Jiao</i>	227-231
<b>Keanekaragaman Kapang Patogen dan Non Patogen pada Imago, Kokon, dan Larva Instar Keenam Ulat Sutera Liar <i>Attacus atlas</i> (<i>Lepidoptera: Saturniidae</i>)</b> <i>Agustin Indrawati, Damiana Rita Ekastuti, Erdina Pangestika, Reinilda Alwina</i>	232-240
<b>Identifikasi Faktor-Faktor yang Menentukan Status Keberlanjutan Usaha Tempat Penampungan dan Potong Ayam (TPnA) di Wilayah Pondok Rumpuk Kota Bogor</b> <i>Luh Putu Desy Puspaningrat, Eko Sugeng Pribadi, Maya Dewi Dyah Maharani</i>	241-247
<b>Seroprevalensi Penyakit <i>Egg Drop Syndrome</i> pada Itik di Desa Tumbak Bayuh, Kecamatan Mengwi, Badung, Bali</b> <i>Gusti Ayu Yuniati Kencana, I Made Kardena, Ni Wayan Apsari Shantika Pratistha</i>	248-255
<b>INDEK PENULIS</b>	256-257
<b>INDEK SUBYEK</b>	258-259



## Efektifitas Penambahan Insulin dalam Media Maturasi dan atau Media Kultur pada Tingkat Maturasi Oosit dan Perkembangan Awal Embrio Sapi secara *In Vitro*

### *The Effectivity of Insulin Supplement in Maturation and/or Culture Media on Bovine Oocytes Maturation and Early Embryonic Development Rate In Vitro*

Syafri Nanda<sup>1</sup>, Ni Wayan Kurniani Karja<sup>2\*</sup>, Mohamad Agus Setiadi<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Program Studi Biologi Reproduksi, Sekolah Pascasarjana, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Jl. Agatis, Kampus IPB Dramaga, Bogor, 16680

<sup>2</sup> Divisi Reproduksi dan Kebidanan, Departemen Klinik Reproduksi dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Jl. Agatis, Kampus IPB Dramaga, Bogor, 16680

\*E-mail : [karjanwk13@gmail.com](mailto:karjanwk13@gmail.com)

Naskah diterima: 17 Mei 2018, direvisi: 22 Oktober 2018, disetujui: 30 November 2019

#### Abstract

This study was aimed to determine the effect of insulin supplementation in maturation and/or culture medium on nuclear maturation rate and the early bovine embryo development *in vitro*. Oocytes were collected and matured in maturation media without (IVM I-) or with (IVM I+) 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  insulin in incubator of 5% CO<sub>2</sub> and 39°C. The oocytes were divided into 4 groups, without the supplementation of insulin in the maturation medium and culture (IVM I-/IVC I-), insulin supplementation only the maturation medium (IVM I+/IVC I-), insulin supplementation only in the culture medium (IVM I-/IVC I+), and the combination of insulin supplementation in the maturation medium and culture (IVM I+/IVC I+). The result showed that supplementation of insulin in the maturation medium increased the number of nuclear maturation (87.7%) ( $P < 0.05$ ) in comparison to without supplementation of insulin (70.1%). Cleavage rate in treatment IVM was higher IVM I-/IVC I- (55.8%), IVM I+/IVC I- (64.1%), IVM I-/IVC I+ (59.9%) ( $P < 0.05$ ). Result of the other were showed that early bovine embryo on day-4 cultured (IVC) reached 16 cell on treatment IVM I-/IVC I+ (31,9%) and IVM I+/IVC I+ (27,1%) were higher compared to treatment IVM I-/IVC I- (2.9%) and IVM I+/IVC I- (2.5%) ( $P < 0.05$ ). In conclusion, supplementation of insulin to maturation medium and culture medium can increase nuclear maturation rate and improved early embryo cleavage rate.

**Key words:** bovine oocytes; culture; embryo; insulin; maturation

#### Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan insulin dalam media maturasi dan atau media kultur pada tingkat pematangan inti oosit dan tingkat perkembangan awal embrio secara *in vitro*. Oosit sapi dikoleksi dan dimaturasi *in vitro* dalam media maturasi dengan (IVM I+) atau tanpa (IVM I-) penambahan insulin sebanyak 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  insulin selama 24 jam di dalam inkubator 5% CO<sub>2</sub> dengan suhu 39°C, untuk mengetahui tingkat perkembangan embrio awal, oosit dengan perlakuan : tanpa penambahan insulin pada medium maturasi dan kultur (IVM I-/IVC I-), penambahan insulin hanya pada medium maturasi (IVM I+/IVC I-), penambahan insulin hanya pada medium kultur (IVM I-/IVC I+), dan kombinasi penambahan insulin pada medium maturasi dan kultur (IVM I+/IVC I+). Tingkat kematangan inti oosit lebih tinggi (87.7%) pada oosit yang dimaturasi dengan insulin dibandingkan dengan tanpa penambahan insulin (70.1%,  $P < 0,05$ ). Sedangkan tingkat pembelahan oosit setelah fertilisasi ditemukan bahwa tingkat pembelahan yang paling tinggi pada oosit yang dimaturasi dan dikultur dalam media dengan insulin (76.6%) jika dibandingkan dengan kelompok IVM I-/IVC I- (55.8%), IVM I+/IVC I- (64.1%), dan IVM I-/IVC I+ (59.9%,  $P < 0,05$ ). Perkembangan awal embrio sapi pada hari ke-4 kultur mencapai pembelahan 16 sel pada perlakuan IVM I-/IVC I+ (31,9%) dan IVM I+/IVC I+ (27,1%) lebih tinggi ( $P < 0.05$ ) dibandingkan dengan perlakuan IVM I-/IVC I- (2.9%) dan IVM I+/IVC I- (2.5%). Berdasarkan

hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa penambahan insulin pada medium maturasi dan medium kultur dapat meningkatkan jumlah tingkat pematangan inti oosit dan meningkatkan perkembangan awal embrio secara *in vitro*.

**Kata kunci:** embrio; insulin; kultur; maturase; oosit sapi

## Pendahuluan

Tingkat keberhasilan produksi embrio *in vitro* (PEIV) pada sapi saat ini masih sangat rendah karena sebagian besar oosit gagal berkembang hingga ke tahap blastosis (Hara *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2014). Beberapa faktor yang mempengaruhi keberhasilan proses PEIV diantaranya adalah sistem kultur dan komponen dari media yang digunakan. Tahapan produksi embrio secara *in vitro* biasanya menggunakan media yang berbeda untuk mendukung perkembangan oosit dan embrio agar mampu berkembang mencapai tahap blastosis. Media yang biasa digunakan dibedakan menjadi media kompleks dan media sederhana. Medium kompleks merupakan medium yang mengandung asam-asam amino, prekursor asam nukleat, vitamin, serta ion-ion penting lainnya yang diperlukan untuk pertumbuhan oosit dan embrio *in vitro*. Media sederhana adalah media yang memiliki komposisi bahan penyusun yang terdiri dari larutan fisiologis dan mengandung garam-garam anorganik dan natrium bikarbonat sebagai penyangga serta piruvat, laktat, glukosa sebagai sumber energi (Gordon, 2003).

Media maturasi maupun kultur sering mengandung asam amino dan glukosa sebagai sumber energi. Asam amino dapat mempengaruhi frekuensi perkembangan, meningkatkan jumlah sel blastosis dan *hatching* (Steeves & Gardner, 1999), sedangkan glukosa merupakan substrat energi penting untuk pematangan oosit dan perkembangan embrio, melibatkan mekanisme normal yang mengatur pematangan inti dan sitoplasma oosit serta pemeliharaan kompetensi perkembangan embrio (Hashimoto *et al.*, 2000). Media yang digunakan untuk maturasi dan kultur embrio sapi tahap awal biasanya memiliki kadar glukosa yang tinggi, seperti pada medium TCM 199 memiliki kadar glukosa 1 g/L (5.5 mM). Metabolisme glukosa sangat rendah selama proses maturasi *in vitro*, karena oosit tidak dapat menyerap glukosa menjadi energi secara maksimal tanpa bantuan bahan lainnya (Rieger 1996; Augustin *et al.*, 2001; Sutton *et al.*, 2010). Sedangkan untuk perkembangan embrio, kebutuhan akan sumber nutrisi berbeda untuk setiap tahap perkembangannya, dimana

dilaporkan bahwa embrio tahap perkembangan awal belum mampu menggunakan glukosa sebagai sumber energi sehingga apabila media yang digunakan untuk kultur embrio tahap awal perkembangannya sering menyebabkan embrio berhenti berkembang (Barnett & Bavister, 1996; Karja *et al.*, 2006; Wongsrikeao *et al.*, 2006). Oleh karena itu, kondisi kultur *in vitro* dan komponen dalam media maturasi yang digunakan memegang peranan penting dalam mendukung pematangan oosit hingga tahap M-II (Setiadi & Karja, 2013).

Insulin adalah hormon polipeptida yang disekresikan ke dalam darah oleh sel  $\beta$  dari pankreas dan diperlukan untuk pertumbuhan serta metabolisme sebagian besar sel-sel mamalia (Darnell *et al.*, 1986). Insulin berikatan dengan reseptor pada permukaan sel dan merangsang kapasitas sel untuk menggunakan glukosa dan asam amino sebagai bahan bakar metabolik, sehingga insulin dapat meningkatkan penggunaan glukosa dan asam amino sebagai sumber energi (Lehninger, 1991). Menurut Frishney (1988) insulin dapat meningkatkan *intake* glukosa dan asam amino serta dapat menyebabkan pengaruh mitogenik. Insulin dapat merangsang metabolisme dan pertumbuhan embrio pada mencit (Harvey & Kaye 1991). Fungsi hormon insulin digolongkan sebagai protein pengatur metabolisme gula pada aktivitas seluler (Lehninger, 1991) dan sebagai faktor pertumbuhan untuk beberapa sel (Darnell *et al.*, 1986). Insulin merangsang penyerapan nutrisi dalam sel dan juga merangsang sintesis protein dan trigliserida (Sjaastad *et al.*, 2003), serta merangsang sintesis *deoxyribonucleic acid* (DNA) dan *ribonucleic acid* (RNA) (Rao *et al.*, 1990). Oleh karena itu penelitian ini bertujuan mengkaji penambahan insulin ke dalam media maturasi dan atau media kultur terhadap pematangan inti oosit dan tingkat pembelahan awal embrio sapi secara *in vitro*.

## Materi dan Metode

### Evaluasi tingkat pematangan inti oosit

Ovarium dikoleksi dari rumah potong hewan (RPH) Bubulak Kabupaten Bogor dan dibawa

ke laboratorium dalam larutan NaCl 0.9% yang ditambahkan 100 IU/mL *penicillin* (Sigma-Aldrich, Inc, P-4687) dan 0.1 g/mL *Streptomycin* (Sigma-Aldrich, Inc, S-9137). Oosit diperoleh dari folikel berukuran 2-6 mm dengan teknik *aspirasi* menggunakan *syringe* dan jarum ukuran 18G. Oosit yang digunakan dalam penelitian ini adalah oosit dengan sel kumulus yang kompak dan sitoplasma yang homogen (Muttaqin *et al.*, 2015). Oosit hasil seleksi kemudian dimaturasi dalam media dasar tanpa insulin (Sigma, USA. I6634) (IVM I-) atau dengan 10 µg/mL insulin (IVM I+) (Lindgren 2014). Media dasar yang digunakan untuk maturasi terdiri dari *tissue culture medium-199* (TCM-199; Sigma, USA) yang disuplementasi 0.3% BSA, 10 IU/mL *pregnant mare serum gonadotrophin* (PMSG) (Kyoritsu Seiyaku, Japan), 10 IU/mL *human Chorionic Gonadotrophin* (hCG) (Kyoritsu Seiyaku, Japan), dan 50 µg/mL *gentamycin* (Sigma-Aldrich, Inc, P-4687). Oosit hasil seleksi dicuci tiga kali kemudian dimaturasi di dalam *petri dish* (Nunclon, Denmark) selama 24 jam di dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5%, temperatur 38.5 °C, kelembaban 90% dalam bentuk *drop* masing-masing 100 µL untuk 10-15 oosit dan ditutup dengan mineral *oil* (Sigma- Aldrich, Inc, M-8410). Semua media yang digunakan pada penelitian ini diekuilibrasikan minimal selama 2 jam dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% dengan suhu 38.5 °C sebelum digunakan.

Pengamatan tingkat pematangan inti oosit dilakukan setelah melepaskan sel-sel cumulus dari oosit dengan bantuan enzim *hyaluronidase* 0.25% (Sigma, USA) dan dipipet berulang-ulang, kemudian dibuat preparat dan difiksasi dalam larutan *ethanol absolute* dan asam asetat (3:1) selama 48 jam, selanjutnya diwarnai dengan 2% *aceto-orcein* selama 5 menit dan dibilas dengan 25% asam asetat. Pengamatan status inti diamati dengan menggunakan mikroskop fase kontras (Olympus IX, Japan). Evaluasi tingkat pematangan inti dinilai berdasarkan kronologis perubahan status inti oosit dari tahap *germinal vesicle* sampai ke tahap *metaphase II* (MII). Keberhasilan pematangan oosit dinilai berdasarkan persentase oosit yang mampu mencapai tahap MII. Persentase tingkat maturasi inti oosit adalah perbandingan antara jumlah oosit yang mencapai tahap MII dengan jumlah oosit keseluruhan yang dimaturasi.

### Evaluasi Tingkat Perkembangan Awal Embrio Sapi

Koleksi dan maturasi oosit dilakukan seperti pada penelitian tahap sebelumnya. Oosit dimaturasi dalam

media dasar dengan (IVM I+) atau tanpa penambahan 10 µg/mL insulin (IVM I-). Fertilisasi oosit dilakukan menggunakan semen beku sapi dari Balai Besar Inseminasi Buatan (BBIB) Lembang, Bandung. Semen beku di-*thawing* dalam air hangat dengan suhu 30-37 °C selama 30 detik, kemudian semen dimasukkan ke dalam tabung sentrifus steril 15 mL yang berisi 4 mL media fertilisasi (Suzuki *et al.*, 2000) dan disentrifugasi pada kecepatan 700 g selama 8 menit. Setelah sentrifugasi, supernatan dikeluarkan, kemudian spermatozoa diencerkan dengan media fertilisasi sampai diperoleh konsentrasi akhir 2×10<sup>6</sup> spermatozoa/mL. Campuran spermatozoa dan media fertilisasi dibuat dalam bentuk *drop* pada *petri dish* sebanyak 100 µL untuk 10-15 oosit ditutup dengan mineral *oil* (Sigma, USA). Oosit yang sudah dimaturasi dicuci dalam media fertilisasi sebanyak dua kali, kemudian dipindahkan ke dalam *drop* masing-masing sesuai perlakuan dan diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% dengan suhu 38.5 °C selama 14 jam.

Oosit yang telah difertilisasi didenudasi sel-sel kumulusnya dengan cara dipipet. Oosit kemudian dicuci tiga kali pada media kultur *Charles Rosenkrans I amino acid* (CR1aa) yang disuplementasi 1% *minimum essential medium* (MEM) (Sigma, M-7145), 2% *basal medium eagle* (BME) (Sigma, B-6766), 50 µg/mL *gentamicyn*, 0.015 gr/mL L-Glutamine dan 0.3% BSA. Kelompok oosit yang telah dimaturasi tanpa insulin dibagi menjadi 2 (dua) secara acak dan dikultur dalam medium dengan (kelompok IVM I-/IVC I+) atau tanpa penambahan 10 µg/mL insulin (kelompok IVM I-/IVC I). Demikian juga oosit yang dimaturasi dengan 10 µg/mL insulin, dikultur dalam medium dengan (kelompok IVM I+/IVC I+) atau tanpa penambahan 10 µg/mL insulin (kelompok IVM I+/IVC I-). Oosit kemudian diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% dengan suhu 38.5 °C selama 96 jam. Pengamatan perkembangan awal embrio secara morfologi diamati dibawah mikroskop (Olympus IX 70, Japan) pada hari ke-2 (jam ke-48) dan ke-4 (jam ke-96) kultur. Pada hari ke-4 (jam ke-96) kultur, semua embrio kemudian difiksasi dan diwarnai seperti pada penelitian I. Persentase tingkat pembelahan embrio adalah perbandingan antara jumlah oosit yang membelah dengan jumlah keseluruhan oosit yang dikultur.

### Rancangan dan Analisis Data

Penelitian ini dirancang menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan masing-masing 5 kali

ulangan. Data tingkat pematangan inti dan tingkat perkembangan awal embrio *in vitro* disajikan dalam bentuk persentase dan dianalisis dengan *analisis of variance* (ANOVA) dengan taraf nyata 95%. Apabila ada perbedaan diantara kelompok maka akan dilanjutkan dengan uji lanjut *duncan's multiple range test* (DMRT) menurut Steel & Torrie (1993), data diolah menggunakan program SPSS versi 22.0.

### Hasil dan Pembahasan

#### Kemampuan Pematangan Inti Oosit Sapi dengan Penambahan Insulin pada Media Maturasi

Tahapan perkembangan pematangan inti oosit sapi dimulai dari tahap *germinal vesicle* (GV), *germinal vesicle breakdown* (GVBD), *metaphase I* (MI), *anaphase/telophase I* (A/TI), hingga tahap *metaphase II* (MII). Oosit yang matang dan siap untuk difertilisasi oleh spermatozoa adalah oosit yang telah mencapai tahap MII. Berikut pada Gambar 1 tahapan perkembangan maturasi inti oosit sapi.

Tingkat pematangan inti oosit sapi berdasarkan kronologis perubahan status inti oosit disajikan pada Tabel 1.

Oosit yang mencapai tahap *metaphase II* ditandai dengan terbentuknya *polar body I* dengan kromosom homolog (Gordon, 2003). Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan insulin (IVM I+) dengan konsentrasi 10 µg/mL meningkatkan

jumlah oosit mencapai tahap MII (87%,  $P < 0.05$ ) dibandingkan tanpa diberi perlakuan insulin (IVM I-) (70.1%). Walaupun semua oosit pada kedua perlakuan mampu melewati tahap GV, tetapi 20% dari oosit yang dimaturasi tanpa insulin berhenti perkembangannya sampai pada tahap *metaphase I* ( $P < 0.05$ ). Peranan insulin dalam meningkatkan persentase oosit yang mencapai tahap MII diduga karena terjadi peningkatan ambilan glukosa dan asam amino yang terdapat dalam medium maturasi oleh insulin untuk perkembangan oosit (Frishney, 1988). Glukosa merupakan substrat energi penting untuk pematangan oosit, melibatkan mekanisme normal yang mengatur pematangan inti dan sitoplasma oosit (Hashimoto *et al.*, 2000). Sutton *et al.* (2010) melaporkan bahwa glukosa penting dalam setiap aspek dari pematangan oosit akhir yang berefek pada meiosis, sitoplasma dan pematangan sel cumulus dimana glukosa akan dimetabolisme melalui jalur glikolitik oleh kumulus oosit kompleks (COC) untuk dimanfaatkan oleh oosit.

#### Tingkat Perkembangan Awal Embrio Sapi dengan Penambahan Insulin pada Media Maturasi dan atau Media Kultur

Keberhasilan perkembangan embrio sapi secara *in vitro* dilakukan dengan pengamatan dan pewarnaan (*aceto orcein*). Stadium pembelahan embrio mulai dari 2-32 sel disajikan dalam Gambar 2.

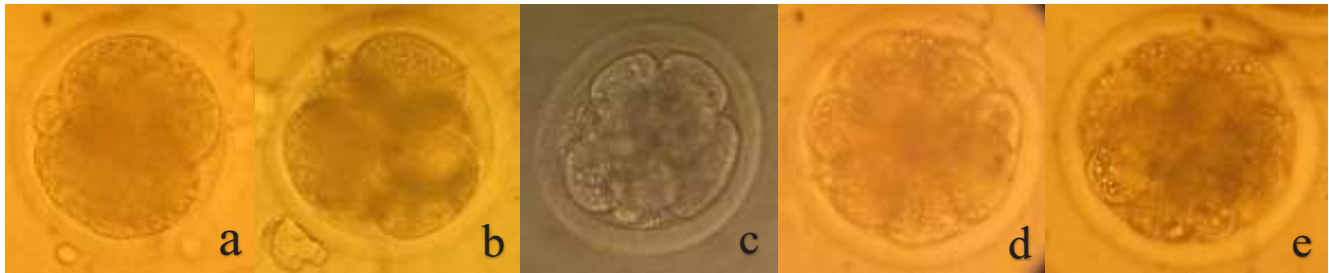


Gambar 1. Perkembangan status inti oosit setelah maturasi *in vitro*. A. *Germinal vesicle* (GV), B. *Germinal vesicle breakdown* (GVBD), C. *Metaphase I* (MI), D. *Metaphase II* (MII), E. Degenerasi, (tanda panah); (perbesaran 200x).

Tabel 1. Tingkat pematangan inti oosit sapi dengan penambahan insulin pada media maturasi

Perlakuan	Total Oosit (n)	Tingkat Pematangan Inti Oosit n (%± SD)					
		GV	GVBD	MI	A/TI	MII	Deg
IVM I-	80	0(0±0)	6(7.0±7.2)	20(22.9±12.2) <sup>b</sup>	0(0±0)	54(70.1±9.4) <sup>a</sup>	0(0±0) <sup>a</sup>
IVM I+	88	0(0±0)	1(0.7±1.6)	6(6.9±7.0) <sup>a</sup>	0(0±0)	77(87.7±4.3) <sup>b</sup>	4(4.6±45) <sup>b</sup>

Keterangan: *Germinal vesicle* (GV), *germinal vesicle breakdown* (GVBD), *metaphase I* (MI), *anaphase-telophase* (AT), *metaphase II* (MII), Degenerasi (Deg). maturasi tanpa insulin (IVM I-) dan maturasi penambahan insulin (IVM I+). <sup>a,b</sup> superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $P < 0.05$ ).



Gambar 2. Tahapan perkembangan awal embrio selama empat hari kultur. (a) Dua sel; (b) Empat sel; (c) Delapan sel; (d) Enam belas sel; (e) Tiga puluh dua sel (Perbesaran 200x, Olympus IX 70).

Tabel 2. Tingkat pembelahan dan perkembangan embrio sapi yang diamati secara morfologi pada hari kedua kultur *in vitro*.

Perlakuan Insulin		n	Tingkat Pembelahan n (rata-rata %±SD)	Perkembangan Awal Embrio n(%±SD)		
IVM	IVC			2 sel	4 sel	8 sel
-	-	87	49(55.8±10.0) <sup>a</sup>	29(61.0±17.3)	18(33.7±14.5)	2(5.3±7.7)
+	-	88	56(64.1±7.1) <sup>a</sup>	25(44.4±4.9)	27(47.4±6.1)	4(8.2±10.2)
-	+	90	55(59.9±6.5) <sup>a</sup>	24(47.8±20.0)	26(43.9±16.5)	5(8.3±18.6)
+	+	91	70(76.6±2.7) <sup>b</sup>	24(35.9±12.0)	36(50.2±13.4)	10(13.9±17.3)

Keterangan: Medium maturasi (IVM), medium kultur (IVC), jumlah oosit atau embrio (n), kontrol (IVM I-/IVC I-), penambahan insulin hanya pada medium maturasi (IVM I+/IVC-), penambahan insulin hanya pada medium kultur (IVM I-/IVC I+), kombinasi penambahan insulin pada medium maturasi dan kultur (IVM I+/IVC I+), <sup>a,b</sup> superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang signifikan (P<0.05).

Tabel 3. Tingkat perkembangan embrio sapi yang diamati secara morfologi dan pewarnaan pada hari keempat kultur *in vitro*.

Perlakuan Insulin		Perkembangan Awal Embrio n(%±SD)				
IVM	IVC	2 sel	4 sel	8 sel	16 sel	32 sel
-	-	12(26.5±35.2)	17(31.3±18.2)	18(36.1±24.3)	1(2.9±6.4) <sup>a</sup>	1(3.3±7.5)
+	-	19(34.0±13.2)	22(38.9±4.7)	14(24.7±17.5)	1(2.5±6.6) <sup>a</sup>	0(0±0)
-	+	14(29.3±17.7)	17(29.3±9.9)	4(6.2±5.9)	18(31.9±13.5) <sup>b</sup>	2(3.3±4.6)
+	+	8(12.7±9.7)	21(29.5±5.2)	15(24.3±14.7)	21(27.1±15.4) <sup>b</sup>	5(6.4±7.7)

Keterangan: Medium maturasi (IVM), medium kultur (IVC), kontrol (IVM I-/IVC I-), penambahan insulin hanya pada medium maturasi (IVM I+/IVC-), penambahan insulin hanya pada medium kultur (IVM I-/IVC I+), kombinasi penambahan insulin pada medium maturasi dan kultur (IVM I+/IVC I+), <sup>a,b</sup> superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang signifikan (P<0.05).

Hasil analisis tingkat perkembangan awal embrio sapi dengan penambahan insulin pada media maturasi dan atau media kultur disajikan pada Tabel 2 dan Tabel 3.

Tingkat perkembangan awal embrio pada hari ke-2 setelah kultur pada kelompok oosit yang dimaturasi dan dikultur dengan insulin (IVM I+/IVC I+) (76.6%) lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok IVM I-/IVC I- (55.8%), IVM I+/IVC I- (64.1%), dan IVM I-/IVC I+ (59.9%) (P<0.05). Sedangkan tidak terdapat perbedaan pada stadium

perkembangan embrio antara 2 sel, 4 sel, dan 8 sel diantara kelompok perlakuan (P>0.05). Pada hari ke-2 setelah kultur, 5-13% embrio sudah berkembang mencapai stadium 8 sel. Sedangkan pengamatan pada hari ke-4 setelah kultur embrio, ditemukan 2-27% embrio berkembang mencapai stadium 16 sel. Embrio yang berkembang mencapai stadium 16 sel ditemukan paling banyak pada kelompok IVM I-/IVC I+ dan IVM I+/IVC I+ (P<0.05). Akan tetapi tidak ada perbedaan tingkat perkembangan embrio yang mencapai stadium 32 sel diantara kelompok perlakuan (P>0.05). Hasil



ini mengindikasikan bahwa penambahan insulin pada medium maturasi dan medium kultur dapat meningkatkan persentase oosit yang membelah dan berkembang sampai stadium 16 sel. Terdapat interaksi yang nyata ( $P < 0.05$ ) terhadap tingkat pembelahan embrio, dimana dengan adanya kombinasi penambahan insulin pada medium maturasi dan medium kultur (IVM I+/IVC I+) menghasilkan tingkat pembelahan embrio yang paling banyak (76.6%) ( $P < 0.05$ ) dibandingkan perlakuan kontrol (IVM I-/IVC I-) sebesar 55.8%, perlakuan penambahan insulin hanya pada medium maturasi (IVMI+/IVCI-) sebesar 64.1%, dan perlakuan penambahan insulin hanya pada medium kultur (IVM I-/IVC I+) sebesar 59.9%, hal ini dikarenakan pada perlakuan (IVM I+/IVC I+) insulin diduga mampu meningkatkan ambilan glukosa menjadi sumber energi secara maksimal untuk pematangan oosit pada saat maturasi dan juga meningkatkan pengangkutan asam amino ke dalam sel untuk perkembangan pembelahan embrio pada tahap kultur, hal ini sesuai dengan pendapat Schultz *et al.*, (1992) insulin dapat meningkatkan penggunaan glukosa sebagai sumber energi. Insulin dapat meningkatkan ambilan glukosa dan asam amino serta dapat menyebabkan pengaruh mitogenik (Frishney, 1988). Glukosa merupakan substrat energi penting untuk pematangan oosit dan perkembangan embrio, melibatkan mekanisme normal yang mengatur pematangan inti dan sitoplasma oosit dan pemeliharaan kompetensi perkembangan embrio (Hashimoto *et al.*, 2000). Insulin juga regulator penting pada proses intraseluler, seperti transportasi asam amino, glukosa, metabolisme lipid, transkripsi gen, dan sintesis protein (Cheatham & Khan, 1995). Asam amino dilaporkan digunakan sebagai sumber energi, penyangga pH intraseluler, antioksidan (Gardner *et al.*, 2000). Asam amino dapat mempengaruhi frekuensi perkembangan, meningkatkan jumlah sel blastosis dan *hatching* (Steeves & Gardner, 1999; Lee *et al.*, 2004). Hasil yang sama pada mencit menurut Sakkas and Trounson (1991) penggunaan 100 ng/mL insulin pada *co-culture* embrio mencit dapat meningkatkan jumlah sel pada tahap morula dan blastosis. Insulin merangsang penyerapan nutrisi dalam sel dan juga merangsang sintesis protein dan trigliserida (Sjaastad *et al.*, 2003), serta merangsang sintesis DNA, RNA dan protein dari tahap morula (Rao *et al.*, 1990). Insulin dapat merangsang metabolisme dan pertumbuhan embrio mencit (Harvey & Kaye, 1991).

Pengamatan hari ke-2 setelah kultur, 13.9% embrio sudah berkembang mencapai stadium 8 sel dengan penambahan insulin pada medium maturasi dan medium kultur (IVM I+/IVC I+). Hasil ini menggambarkan embrio lebih cepat proses pembelahannya karena diduga penambahan insulin pada medium maturasi dan medium kultur dapat memaksimalkan embrio meningkatkan ambilan glukosa dan asam amino menjadi sumber energi sehingga mempercepat pembelahan embrio. Kecepatan pembelahan embrio awal dapat dijadikan indikator untuk menilai kualitas embrio (Lequaere *et al.*, 2003) dan untuk menentukan potensi embrio yang akan berkembang menjadi blastosis (Loneragan *et al.*, 2000). Waktu terjadinya pembelahan (*cleavage timing*) merupakan titik kritis karena embrio yang lebih awal berkembang memiliki potensi lebih besar dibandingkan dengan yang lambat (Meirelles *et al.*, 2004; Nedambale *et al.*, 2006).

### Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa penambahan insulin pada medium maturasi dapat meningkatkan persentase oosit sapi yang mencapai *metaphase II*. Penambahan insulin pada medium maturasi dan kultur dapat meningkatkan jumlah embrio yang membelah.

### Ucapan Terima Kasih

Terima kasih penulis sampaikan kepada Direktorat Jenderal Pendidikan dan Perguruan Tinggi (DIKTI) yang telah memberikan dukungan dana penelitian melalui program Beasiswa Pendidikan Pascasarjana Dalam Negeri (BPP-DN) Calon Dosen periode 2014.

### Daftar Pustaka

- Augustin, R., Pocar, P., Navarrete-Santos, A., Wrenzycki, C., Gandolfi, F., Niemann H. and Fischer B. (2001). Glucose Transporter Expression is Developmentally Regulated in *In Vitro* Derived Bovine Preimplantation Embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 60:370-376.
- Barnett, D.K., and Bavister, B.D. (1996). What is Relationship Between the Metabolism of Preimplantation Embryos and Their Developmental Competence. *Mol. Reprod. Dev.* 43:105-133.

- Cheatham, B. and Kahn, C.R. (1995). Insulin Action and the Insulin Signaling Network. *Endocrinol. Rev.* 16:117-42.
- Darnell, J.E., Losish, H.F. and Baltimore, D. (1986). Molecular Cell Biology Scientific American Books Inc. 667-713.
- Frishney, R.I. (1988). Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique 2<sup>nd</sup>edition. Alan R.Liss. Inc. New York. 57-84.
- Gardner, D.K., Pool, T.B., Lane, M. (2000). Embryo Nutrition and Energy Metabolism and Its Relationship to Embryo Growth, Differentiation, and Viability. *Seminars in Reproductive Medicine.* 18:205-18.
- Gordon, I. (2003). Laboratory of Cattle Production: 2<sup>nd</sup>edition. London (GB): CABI Publishing.
- Hara, H., Yamane, I., Noto, I., Kagawa, N., Kuwayama, M., Hirabayashi, Hochi, S. (2013). Microtubule Assembly and In Vitro Development of Bovine Oocytes with Increased Intracellular Glutathione Level Prior to Vitrification and In Vitro Fertilization. *Zygote.* 22:476-482.
- Harvey, M.B. and Kaye, P.L. (1991). Mouse Blastocyst Responds Metabolically to Short Term Stimulation by Insulin and IGF-1 Through the Insulin Receptor. *Mol. Reprod. Dev.* 29:253-258.
- Hashimoto, S., Minami, N., Takakura, R., Yamada, M., Imai, H. and Kashima, N. (2000). Low Oxygen Tension During *In Vitro* Maturation Is Beneficial For Supporting the Subsequent Development of Bovine Cumulus-Oocyte Complexes. *Mol. Reprod. Dev.* 57:353-360.
- Karja, N.W.K., Kikuchi, K., Fahrudin, M., Ozawa, M., Somfai, T., Ohnuma, K., Noguchi, J., Kaneko, H., and Nagai T. (2006). Development To The Blastocyst Stage, The Oxidative State, And The Quality Of Early Developmental Stage Of Porcine Embryos Cultured In Alteration Of Glucose Concentrations *In Vitro* Under Different Oxygen Tensions. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 4:54 1-12.
- Lee, E.S., Fukui, Y., Lee B.C., Lim J.M. and Hwang, W.S. (2004). Promoting effect of amino acids added to a chemically defined medium on blastocyst formation and blastomere proliferation of bovine embryos cultured *in vitro*. *Anim. Reprod. Sci.* 84: 257-267.
- Lehninger, A.L. (1991). Dasar Dasar Biokimia. Jilid 1 dan 3. Alih Bahasa Thenawidjaja M. IPB. Penerbit Erlangga Jakarta.
- Lequare, S.A., Marchandase, J., Moreau, B., Massip, A. and Donnay, I. (2003). Cell Cycle At The Time Of Maternal Zygotic. *Biol. of Reprod.* 69:1707-1713.
- Loneragan, P., Gutierrez-Adan, A., Pintado, B., Fair, T., Ward, F., Fuente, J.D., and Boland, M. (2000). Relationship Between Time First Cleavage And The Expression Of IGF-I Growth Factor, Its Receptor, And Two Housekeeping Genes In Bovine Two-Cell Embryos And Blastocyst Produced In Vitro. *Reprod. Biol. and Endocrinol.* 7:146-152.
- Meirelles, V.F., Caetano, R.A., Watanabe, F.Y., Ripamonte, P., Carambula, F.S., Merighe, K.G. and Garcia, M.S. (2004). Genome Activation and Developmental Block in Bovine Embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83:13-20.
- Muttaqin, Z., Karja, N.W.K. and Setiadi, M.A. (2015). Kemampuan Maturasi Dan Fertilisasi Oosit Sapi Yang Diseleksi Menggunakan Teknik Pewarnaan *Brilliant Cresyl Blue*. *Jurnal Veteriner.* 16(2):242-248.
- Nedambale, L.T. Du, F., Yang, X. and Tian, C.X. (2006). Higher Survival Rate Of Vitrified And Thawed In Vitro Produced Blastocysts Following Culture In Defined Medium Supplemented With B-Mercaptoethanol. *Anim. Reprod. Sci.* 93: 61-75.
- Park, S.H., Cho, H.S. and Yu, I.J. (2014). Effect of Bovine Follicular Fluid On Reactive Oxygen Species and Glutathione on Oocytes, Apoptosis and Apoptosis-Related Gene Expression of In Vitro-Produced Blastocysts. *Reprod. Dom. Anim.* 1:1-8.
- Rao, L.V., Wikarczuk, M. and Heyner, S. (1990). Functional Roles of Insulin And Insulin-like Growth Factors In Preimplantation Mouse Embryo Development. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 26: 1043-1048.
- Rieger, D. (1996). The Metabolic Activity Of Cattle Oocytes And Early Embryos. *J. Reprod. Dev.* 42 (Suppl):85-89.

- Sakkas, D. and Trounson, A.D. (1991). Formulation of a Complex Serum-Free Medium (CSM) For Use In The Co Culture of Mouse Embryos With Cells of The Female Reproductive Tract. *Reprod. Fert. Dev.* 3:1 99-108.
- Schultz, G.A., Hogan, A., Watso, A.J., Smith, R.M. and Heyner, S. (1992). Insulin, Insulin –Like Growth Factors And Glucose Transporters: Temporal Patterns of Gene Expression In Early Murine and Bovine Embryos. *Reprod. Fert. Dev.* 4: 361-371.
- Setiadi, M.A. and Karja, N.W.K. (2013). Tingkat Perkembangan Awal Embrio Sapi *In Vitro* Menggunakan Media Tunggal Berbahan Dasar *Tissue Culture Medium* (TCM) 199. *J. Kedokteran Hewan.* 7:150-154.
- Sjaastad, O.V., Hove, K. and Sand, O. (2003). *The Physiology of Domestic Animals.* 1. ed. Oslo: Scandinavian Veterinary Press.
- Steel, R.G.D. and Torrie, J.H. (1993). *Prinsip dan Prosedur Statistika: Suatu Pendekatan Biometric.* Sumantri B, penerjemah. Jakarta (ID): Gramedia Pustaka Utama.
- Steeves, T.E. and Gardner, D.K. (1999). Temporal and Differential Effects of Amino Acids on Bovine Embryo Development In Culture. *Biol. Reprod.* 61:731-740.
- Sutton, M.L., Gilchrist, R.B. and Thompson, J.G. (2010). The Pivotal Role of Glucose Metabolism in Determining Oocyte Development Competence. *Reproduction.* 139:685-695.
- Wongsrikeao, P., Otoi, T., Taniguchi, M., Karja, N.W.K., Agung, B., Nii, M. and Nagai T. (2006). Effects of Hexoses on *In Vitro* Oocyte Maturation and Embryo Development In Pigs. *Theriogenology.* 65:332-343.

## Efek Ekstrak Daun *Tithonia diversifolia* terhadap Penurunan Konsentrasi Adiponektin pada Tikus Diabetik yang Diinduksi oleh *Streptozotocin*

### *Effect of Tithonia diversifolia Extract in Lowering Adiponectin Concentration on Streptozotocin-induced Diabetic Rat*

Rondius Solfaine<sup>1\*</sup>, Lailatul Muniroh<sup>2</sup>, Wida Wahidah Mubarakah<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratorium Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Wijaya Kusuma Surabaya, Jl. Dukuh Kupang XXV No. 54, Dukuhpakis, Surabaya, 60225

<sup>2</sup>Departemen Gizi Masyarakat, Fakultas Kesehatan Masyarakat, Universitas Airlangga, Kampus C, Mulyorejo, Kec. Mulyorejo, Surabaya, 60111

<sup>3</sup>Politeknik Pembangunan Pertanian Yogyakarta, Jl. Magelang-Kopeng km 7,

Purwosono, Tegalrejo, Magelang, Jawa Tengah

\*Email: solvaine@yahoo.co.id

Naskah diterima: 20 Juni 2019, direvisi: 23 Juli 2019, disetujui: 30 November 2019

#### Abstract

Diabetes Melitus is a metabolic diseases characterized by hyperglycemia due to lack of insulin secretion or insulin activity resistance. Chronic hyperglycemia in diabetes is associated with long-term damage, dysfunction, and failure of various organs, especially the kidneys, nerves, heart, and blood vessels. The purpose of this study was to analyze the activity of adiponectin, superoxide dismutase, malondialdehyde, and glucose level in Streptozotocin (STZ)-induced diabetic wistar rats. The wistar rats were divided into 4 groups: control rats (D0), STZ-induced diabetic rats + Na-CMC (D1), STZ-induced diabetic rats + thitonia extract dose 100 mg / kg (D2), and STZ-induced diabetic rats + catechin dose 10 mg/kg (D3) for 7 days. Diabetes was induced by injection of streptozotocin (STZ) at the dosage of 60 mg/kg intraperitoneally (IP) for 7 days. On the 8<sup>th</sup> day after the treatment, all groups of rats were sacrificed and blood samples were taken for superoxide dismutase, malondialdehyde, and adiponectine protein analysis using ELISA technique, while glucose level was measured using calorimetry technique. Statistical analysis was done to examine the differences between treatment and control by using One Way Anova test with a 95% confidence level ( $\alpha=0.05$ ). The results showed that there were significant differences in glucose levels ( $p = 0.020$ ) and adiponectin ( $p = 0.001$ ) between the control and treatment groups, but there were no differences in level of MDA ( $p = 0.103$ ) and SOD ( $p = 0.207$ ) between groups. Based on the results of the study, it was concluded that the administration of *Tithonia diversifolia* leaf extract could reduce blood sugar and adiponectin concentrations significantly ( $p \leq 0.05$ ) in streptozotocin-induced diabetic rats.

**Key words:** malondialdehyde; streptozotocin; superoxide dismutase; *Tithonia diversifolia*

#### Abstrak

Diabetes Melitus merupakan penyakit metabolik yang ditandai kondisi hiperglikemia karena kurangnya sekresi insulin atau resistensi aktivitas insulin. Hiperglikemia yang kronis pada diabetes berkaitan dengan kerusakan jangka panjang, disfungsi, dan kegagalan berbagai organ, terutama ginjal, saraf, jantung, dan pembuluh darah. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menganalisis aktivitas adiponektin, superoxide dismutase, malondialdehid, dan kadar glukosa pada diabetes melitus yang diinduksi streptozotocin pada tikus wistar. Penelitian ini menggunakan tikus Wistar jantan yang dibagi menjadi 4 kelompok, kelompok tikus kontrol dengan plasebo (D0), kelompok tikus diabetes yang diinduksi STZ + Na-CMC (D1), kelompok tikus diabetes yang diinduksi STZ + ekstrak Thitonia dosis 100 mg/kg bb (D2), dan kelompok tikus diabetes yang diinduksi STZ + obat pembanding catechin dosis 10 mg / kg bb (D3) selama 7 hari. Pembuatan model diabetes dengan induksi streptozotocin (STZ) dosis 60 mg / kg bb secara intraperitoneal (IP) selama 7 hari. Pada hari ke-8 setelah perlakuan, semua kelompok tikus dikorbankan untuk pengambilan sampel darah dan selanjutnya diukur kadar superoksida dismutase, malondialdehid dan adiponektin dengan ELISA serta pengukuran kadar glukosa dengan teknik kalorimetri. Analisis statistik data untuk menguji perbedaan antara kelompok kontrol dan perlakuan dengan

uji *One Way Anova* dengan tingkat kepercayaan 95% ( $\alpha = 0,05$ ). Hasil penelitian menunjukkan ada perbedaan kadar glukosa ( $p = 0,020$ ) dan adiponektin ( $p = 0,001$ ) antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan, tetapi tidak ada perbedaan dalam kadar MDA ( $p = 0,103$ ) dan kadar SOD ( $p = 0,207$ ) antara kelompok. Pemberian ekstrak daun *Tithonia diversifolia* menurunkan kadar gula darah dan adiponektin secara signifikan ( $p \leq 0,05$ ) pada tikus putih yang diinduksi streptozotocin.

**Kata kunci:** malondialdehid; streptozotocin, superoxide dismutase; *Tithonia diversifolia*

## Pendahuluan

Diabetes Melitus merupakan penyakit metabolik yang ditandai dengan tingginya kadar glukosa darah. Diabetes Melitus diklasifikasikan menjadi Diabetes Melitus tipe I terjadi karena berkurangnya insulin dalam sirkulasi darah akibat hilangnya sel beta penghasil insulin pada pulau-pulau langerhans pankreas, sedangkan Diabetes Melitus tipe 2 terjadi karena insulin yang ada tidak bekerja dengan baik karena reseptor insulin pada sel berkurang atau berubah struktur sehingga hanya sedikit glukosa yang berhasil masuk sel. Secara patologis, diabetes menunjukkan nekrosis dan vakuolisasi pada sel  $\beta$  Langerhans pankreas. Infiltrasi limfosit masuk ke dalam sel pankreas mengindikasikan terjadi proses autoimun pada sel  $\beta$  Langerhans pankreas (Olokoba *et al.*, 2012).

Protein adiponektin, dan resistin dihasilkan oleh jaringan adiposa. Protein ini mengatur nafsu makan dan keseimbangan energi tubuh. Adiponektin bisa menekan perkembangan aterosklerosis dan fibrosis serta mempunyai peran sebagai hormon antiinflamasi. Protein adiponektin dan resistin memiliki peran penting dalam homeostasis energi, glukosa dan lemak. Selain itu mengatur fisiologis reproduksi, kardiovaskular, dan sistem kekebalan (Benomar, *et al.*, 2016., Lekva *et al.*, 2017). Leptin dan adiponektin memiliki efek berlawanan pada peradangan subklinis dan resistensi insulin. Adiponektin memiliki sifat anti inflamasi serta menurunkan ekspresi dan pelepasan sejumlah imun mediator proinflamasi. Adiponektin merupakan mediator penting dari peningkatan risiko Diabetes Melitus dan penyakit kardiovaskular yang terkait dengan diet tinggi lemak (Lopez, *et al.*, 2014).

Malondialdehid (MDA) adalah substrat hasil akhir yang stabil dari peroksidasi lemak yang diproduksi dari interaksi dengan radikal bebas di membran fosfolipid pada penderita Diabetes Melitus tipe 2. Malondialdehid ditemukan di membran sel darah merah. Lipid/lemak adalah target awal yang akan dirusak oleh radikal bebas. SOD memiliki peran dalam melindungi kerusakan sel dan jaringan yang disebabkan oleh *reactive oxygen species* (ROS).

Peningkatan kadar SOD terbukti menurunkan stress oksidatif dan apoptosis neuron pada tikus, sehingga mencegah diabetes (Matough *et al.*, 2012).

Streptozotocin (STZ) adalah produk nitrosourea alami dari *Streptomyces achromogenes*. Biasanya, injeksi intraperitoneal dosis tunggal (60 mg/kg berat badan) mengandung toksisitas langsung pada sel  $\beta$  yang menghasilkan nekrosis dalam 48-72 jam dan menyebabkan hiperglikemia (Akbarzadeh *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2015). Kerja sitotoksik STZ ini diperantarai oleh *reactive oxygen species* (ROS). Streptozotocin dan produk reduksinya memasuki siklus redoks, dan membentuk produk samping radikal superoksida. Radikal ini mengalami dismutasi menjadi  $H_2O_2$ , radikal hidroksil yang sangat reaktif terbentuk melalui reaksi Fenton. Kerja ROS simultan dengan meningkatnya kadar kalsium sitosol yang menyebabkan cepat rusaknya sel  $\beta$  pankreas (Winarsi *et al.*, 2013).

Salah satu tumbuhan yang memiliki potensi obat adalah tanaman kembang bulan (*Tithonia diversifolia*) (Hanum and van der Masen, 2002). *Tithonia Diversifolia* secara tradisional digunakan sebagai obat sakit perut, kembung, diare, dan anti radang atau antiinflamasi (Dalimartha, 2000). Daun *Tithonia Diversifolia* mengandung zat aktif (fitokimia) berupa alkaloid, saponin, saponin glikosida, tannin, balsam, dan *volatile oil* (Elufioye *et al.*, 2009., John-Dewole and Oni, 2013). *Tithonia diversifolia* merupakan tanaman yang digunakan masyarakat China untuk antidiabetes (Zhao *et al.*, 2012).

## Materi dan Metode

Penelitian ini merupakan ekperimental murni dengan menggunakan tikus putih Wistar sebagai hewan coba. Lokasi penelitian dilakukan di Laboratorium Hewan Coba Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Laboratorium Patologi Klinik Rumah Sakit Khusus Infeksi Universitas Airlangga, dan Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Hewan coba yang digunakan adalah tikus putih jantan galur Wistar berumur 2-3 bulan dengan kondisi

fisik tidak ada cacat tubuh dan memenuhi berat badan yang normal (150-200 gram). Kandang tikus putih yang digunakan dalam penelitian ini berupa kotak plastik berukuran 40 cm x 30 cm yang bagian atasnya ditutup dengan kawat anyaman.

Bahan-bahan yang digunakan antara lain : alkohol, aquades, buffer formalin, xylen, aquades, sediaan streptozotocin (STZ), Kit ELISA (adiponektin, SOD, MDA). Peralatan yang dipakai antara lain: gelas obyek, gelas penutup, ELISA Reader, container glass, tissue processing, mikrotome, sentrifuge, pipet mikro eppendorf, spektrofotometer.

Ekstrak diperoleh dari daun tanaman kembang bulan (*Tithonia diversifolia*) segar yang diekstraksi dengan teknik maserasi etanol 96% dan dianalisis secara kualitatif-kuantitatif.

### Perlakuan

Hewan coba yang digunakan adalah 32 ekor tikus putih jantan galur Wistar berumur 2-3 bulan dan berat badan normal (150-200 gram). Tikus diadaptasi selama 1 minggu dan diberi makan berupa pakan pelet khusus dan minum *ad libitum*. Tikus dibagi menjadi 4 kelompok yang terdiri atas 8 ekor tiap kelompok, yaitu : Kelompok kontrol, diberi aquades (D0) ; Kelompok diabetes yang diinduksi STZ + Na-CMC (D1); Kelompok diabetes yang diinduksi STZ + ekstrak daun kembang bulan 100 mg/kg (D2); dan Kelompok diabetes yang diinduksi STZ + obat perbandingan catechin dosis 10 mg/kg (D3). Kelompok tikus D1, D2 dan D3 diinduksi dengan STZ dosis 60 mg/kg BB secara intraperitoneal. Perlakuan dilaksanakan selama 7 hari. Pada hari ke-8 setelah perlakuan, seluruh tikus dikorbankan untuk diambil sampel darah.

### Analisis Kadar Glukosa

Sampel serum darah dikoleksi sesudah perlakuan. Kadar glukosa diukur dengan teknik kalorimetri (*Glucose kit DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Germany*).

### Pengukuran Konsentrasi Adiponektin

Pengukuran konsentrasi adiponektin, radikal bebas MDA, dan aktivitas enzimatis SOD dengan menggunakan sampel serum darah. Serum disentrifus dengan kecepatan 1000 g selama 15 menit kemudian dimasukkan ke tube steril dan disimpan dalam freezer -20°C. Kit ELISA yang digunakan adalah kit ELISA *Parameter Total Adiponectin Assay*. Pengukuran

konsentrasi sitokin secara tidak langsung dengan pasangan reaksi enzimatik yang dapat dibaca nilai *Optical Density* (OD). Prinsip kerja pengukuran dengan cara serum diinkubasikan berturut-turut dengan reagen antibodi spesifik yang diikat dengan *Avidin-Horseradish Peroxidase* (HRP) dan diinkubasikan dengan substrat, kemudian tanpa membuang reaktan hasil inkubasi tersebut dibaca nilai *Optical Density* (OD) pada panjang gelombang 450 nm dengan Photometer 5010 (RIELE GmbH & Co, Germany).

### Analisis Data

Penelitian ini menggunakan rancangan *Randomized Posttest Control Group Design*. Analisis data untuk menguji kadar glukosa, adiponektin, MDA, dan SOD antara kelompok perlakuan dan kontrol, jika data berdistribusi normal dan varians homogen dilakukan menggunakan *One Way Anova* dan dilanjutkan dengan *post hoc test* dan *Duncan test*. Jika varians heterogen maka digunakan uji Kruskal Wallis, untuk mengetahui perlakuan mana yang berbeda maka digunakan uji *Mann-Whitney*.

## Hasil dan Pembahasan

### Glukosa Darah Tikus

Diabetes ditandai dengan peningkatan kadar glukosa dalam darah dan seringkali muncul tanpa gejala. Pada diabetes tipe 2 (DM tipe 2), faktor genetik dan lingkungan memiliki pengaruh yang cukup besar pada terjadinya DM tipe 2, antara lain obesitas, diet tinggi lemak dan rendah serat, serta kurang gerak badan. Induksi STZ dosis 60 mg/kg bb selama 7 hari pada kelompok tikus putih dapat menyebabkan terjadinya diabetes. Hasil pemeriksaan kadar glukosa serum darah dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Rata-rata kadar glukosa (mg/dl) pada kelompok kontrol dan perlakuan

Kelompok	n	Mean±SD	p
D0 (Kontrol)	8	150,375 ± 15,070 <sup>a</sup>	0,020
D1 (Induksi STZ+ Na-CMC)	8	226,625 ± 74,630 <sup>b</sup>	
D2 (Induksi STZ + ekstrak daun kembang bulan)	8	203,750 ± 62,490 <sup>b</sup>	
D3 (Induksi STZ + catechin)	8	234,125 ± 122,804 <sup>b</sup>	

<sup>a,b</sup> Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata ( $p \leq 0.05$ ).

Berdasarkan uji *homogeneity of variances* didapatkan sig. 0,012 sehingga uji Kruskal Wallis, dan didapatkan nilai  $p=0,020$  yang artinya terdapat perbedaan rata-rata kadar glukosa pada kelompok kontrol dan perlakuan. Hasil uji *Mann-Whitney*, dan diperoleh hasil sebagai berikut ada perbedaan kadar glukosa antara kelompok D0 dengan kelompok D1 dan D2 ( $p\leq 0.05$ ) dan tidak ada beda nyata antara kelompok perlakuan D1, D2 dan D3 ( $p\geq 0.05$ ).

Pada penderita Diabetes Melitus tipe 2, kadar glukosa dalam darah meningkat karena ketidakseimbangan produksi dan asupan glukosa yang menstimulasi insulin untuk memasukkan gula ke dalam sel, khususnya sel otot skeletal. Resistensi insulin terjadi, dimana jumlah insulin banyak namun tidak dapat melakukan fungsinya, sehingga glukosa dalam darah tidak dapat masuk ke sel. Sel islet akan terus memproduksi insulin sehingga hiperinsulinemia juga terjadi bersamaan dengan hiperglikemia (Akbarzadeh et al., 2007).

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol daun kembang bulan mempunyai efek menurunkan kadar gula darah (glukosa) pada kelompok tikus perlakuan. Hasil perlakuan secara per oral ekstrak daun kembang bulan dosis 100 mg/kg mampu menurunkan kadar glukosa dari 226,62 mg/dl (kelompok D1) menjadi 203,75 mg/dl (D2). Ekstrak daun kembang bulan (*Tithonia diversifolia*) terbukti menurunkan kadar glukosa pada tikus putih pada penelitian ini mengindikasikan ekstrak *Tithonia diversifolia* menurunkan kadar glukosa dan mencegah diabetes yang diinduksi STZ. Aktivitas hipoglikemik ekstrak daun kembang bulan terjadi setelah proses metabolisme berjalan selama induksi STZ dan perlakuan ekstrak selama 7 hari. Kadar gula darah pada kelompok perlakuan ekstrak

daun kembang bulan (D3) lebih rendah dibandingkan kelompok induksi diabetes (D1) maupun kelompok yang diberikan obat pembanding catechin (D3).

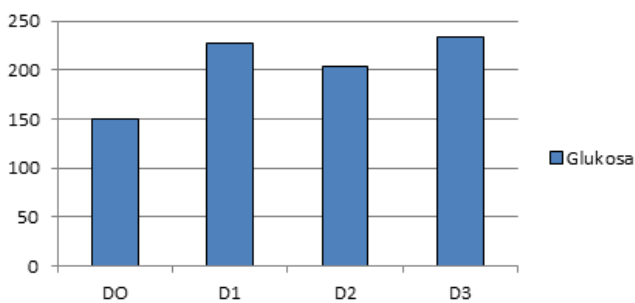
### Kadar Adiponektin Tikus

Adiponektin adalah hormon turunan dari adiposit atau jaringan lemak. Adiponektin terdapat dalam plasma, memiliki fungsi anti-aterogenik, antidiabetik, dan anti-inflamasi (Jaramillo et al, 2014). Fungsi anti-diabetik adiponektin didapatkan melalui berbagai mekanisme diantaranya: meningkatkan oksidasi asam lemak, menurunkan stres retikulum endoplasma, menolong sinyal insulin, meningkatkan jumlah mitokondria dan fungsinya, meningkatkan sekresi insulin, menurunkan produksi glukosa hati, meningkatkan *uptake* glukosa di hati dan otot, serta meningkatkan metabolisme glukosa (Chakraborti, 2015). Rerata kadar adiponektin pada kelompok kontrol dan perlakuan dapat dilihat pada Tabel 2.

Berdasarkan uji normalitas (sig. 0,297) dilanjutkan dengan uji anova ( $p=0,001$ ) menunjukkan perbedaan rata-rata kadar adiponektin antara ke empat kelompok. Berdasarkan uji beda antar kelompok diketahui ada perbedaan yang nyata pada kelompok D0 dengan D1, D2, D3 ( $p\leq 0.05$ ) dan ada beda kelompok D3 dengan D1 dan D2 ( $p\leq 0.05$ ).

Adiponektin mengikat permukaan reseptor sel, mengaktivasi beberapa sinyal intrasel melalui beberapa molekul seperti AMPK dan PPARs yang berperan penting dalam metabolisme lemak dan karbohidrat (Shehzad et al, 2012). Bersama dengan adipokin lainnya, adiponektin mengontrol secara spesifik sintesis dan penyimpanan lemak, glukoneogenesis dan utilisasi glukosa pada jaringan perifer. Efek anti-inflamasi yang dimiliki adiponektin dilakukan dengan mengaktifkan reseptor AdipoR1, AdipoR2,

### Glukosa

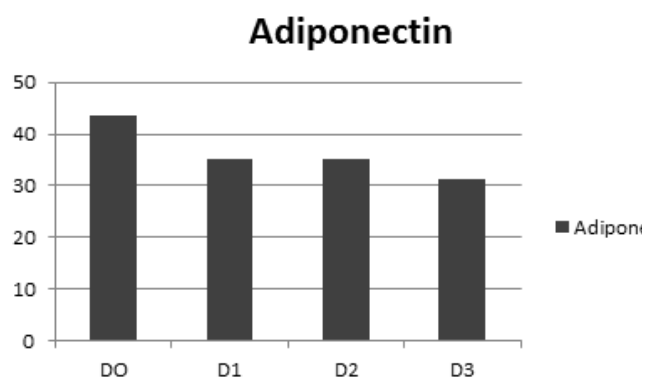


Gambar 1. Grafik kadar glukosa antara kelompok kontrol dan perlakuan

Tabel 2. Rata-rata kadar Adiponektin (mg/dl) pada kelompok kontrol dan perlakuan

Kelompok	n	Mean±SD	p
D0 (Kontrol)	8	39,138 ± 1,791 <sup>a</sup>	0,001
D1 (Induksi STZ+Na-CMC)	8	35,109 ± 3,478 <sup>b</sup>	
D2 (Induksi STZ + ekstrak daun kembang bulan)	8	35,157 ± 3,294 <sup>b</sup>	
D3 (Induksi STZ + catechin)	8	31,376 ± 4,494 <sup>c</sup>	

<sup>a,b,c</sup> Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata ( $p\leq 0.05$ ).



Gambar. 2 Grafik kadar adiponektin antara kelompok kontrol dan perlakuan

dan T-cadherin (Robinson *et al.*, 2011). AdipoR1 dan AdipoR2 yang aktif memiliki peran dalam meningkatkan oksidasi asam lemak, mengurangi glukoneogenesis di hati, meningkatkan *uptake* glukosa di sel, serta menghambat inflamasi dan stress oksidatif. T-cadherin yang teraktivasi adalah melindungi sel dari stress oksidatif yang dapat menyebabkan apoptosis atau kematian sel. Selain itu, adiponektin juga meningkatkan sekresi *nitric oxide* pada sel endotel, sehingga adiponektin memiliki peran dalam pencegahan berbagai gangguan atau penyakit degeneratif seperti sindrom metabolik, Diabetes Melitus, obesitas, dan penyakit kardiovaskuler (Benomar *et al.* 2016)

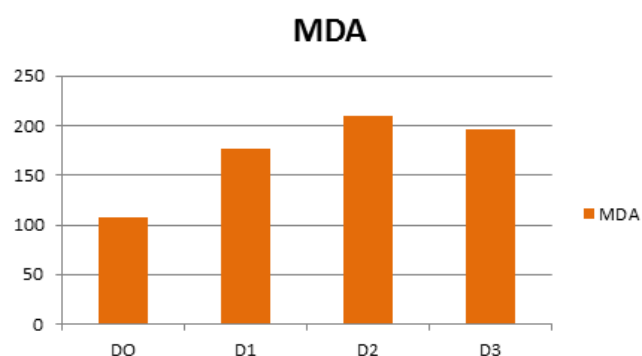
Pada penderita obesitas, kadar adiponektin cenderung rendah (Arita *et al.*, 2012). Penelitian Maahs *et al.* (2009), pada remaja penderita diabetes, memperoleh hasil bahwa kadar adiponektin lebih tinggi pada penderita Diabetes Melitus tipe 1 daripada tipe 2. Penelitian lain menyebutkan rendahnya kadar adiponektin telah terbukti berhubungan signifikan dengan kejadian Diabetes Melitus tipe 2. Chakraborti (2015) dan Majewska *et al.* (2016) menyebutkan bahwa adiponektin meningkatkan sensitivitas insulin dengan mengurangi kadar asam lemak dalam plasma pada penderita obesitas dan Diabetes Melitus tipe 2, dimana ditemukan bahwa konsentrasi adiponektin dalam serumnya rendah.

### Kadar Malondialdehide (MDA) Tikus

Malondialdehid (MDA) adalah substrat hasil akhir yang stabil dari peroksidasi lemak yang diproduksi dari interaksi dengan radikal bebas di membran fosfolipid pada penderita Diabetes Melitus tipe 2. Malondialdehid ditemukan di membran sel darah merah. Seperti yang sudah diketahui sebelumnya, bahwa lipid/lemak adalah target awal yang akan dirusak oleh radikal bebas. Oleh

Tabel 3. Rata-rata kadar MDA (mg/dl) pada kelompok kontrol dan perlakuan

Kelompok	n	Mean±SD	p
D0 (Kontrol)	8	108,171 ± 26,669	0,103
D1 (Induksi STZ+Na-CMC)	8	176,404 ± 60,078	
D2 (Induksi STZ + ekstrak daun kembang bulan)	8	209,237 ± 129,145	
D3 (Induksi STZ + catechin)	8	196,647 ± 87,953	



Gambar 3. Grafik kadar MDA antara kelompok kontrol dan perlakuan

karena itu, MDA juga dapat dijadikan parameter untuk mengetahui radikal bebas yang mencoba merusak jaringan tubuh.

Berdasarkan uji homogenitas (sig. 0,160) dan uji anova (p=0,103) menunjukkan tidak terdapat perbedaan rata-rata kadar MDA antara kelompok kontrol dan perlakuan (p≥0.05).

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa serum MDA ditemukan lebih tinggi pada tikus yang mengalami diabetes meskipun secara statistik tidak beda nyata. Hal ini sejalan dengan penelitian Kaefer *et al.* (2012) bahwa serum MDA ditemukan lebih tinggi pada penderita diabetes melitus yang menggunakan insulin daripada penderita diabetes tanpa terapi insulin. Hal ini juga menandakan bahwa semakin parah tingkat diabetes melitus seseorang, maka semakin banyak radikal bebas yang menyerang sel, sehingga semakin tinggi kandungan serum MDA pada darahnya. Sebaliknya, peningkatan jumlah serum MDA juga berperan dalam perkembangan penyakit diabetes melitus yang berujung pada komplikasi-komplikasi mikrovaskular lainnya (Tiwari, *et al.*, 2013), seperti nefropati, retinopati, dan neuropati.

Serum MDA pada kelompok Diabetes Melitus tipe 2 lebih tinggi daripada kelompok kontrol. Pada



penderita Diabetes Melitus dengan komplikasi infark miokardial, didapati serum MDA lebih tinggi daripada penderita Diabetes Melitus tanpa komplikasi (Mahreen *et al.*, 2010) a stable end product of lipid per oxidation produced by interaction of free radicals with membrane phospholipids, was estimated. MATERIALS AND METHODS 30 type 2 diabetes mellitus cases with myocardial infarction and equal members of Type 2 diabetics without complications are enrolled. Thirty healthy subjects served as controls. Quantitative estimation of serum MDA levels were carried out in all the three groups, along with fasting blood glucose and total serum cholesterol. RESULTS It was found that serum MDA levels were significantly higher in both diabetic groups compare to the controls (P<0.01. Hal ini terjadi karena pada penderita DM tipe 2 dengan komplikasi infark miokardial, terdapat lebih banyak radikal bebas yang menyerang sel jantung ataupun sel pankreas. Sedangkan, pada penderita DM tipe 2 tanpa komplikasi, radikal bebas hanya menyerang sel pankreas.

Peningkatan stress oksidatif terjadi pada seluruh kelompok perlakuan dengan induksi STZ. Pada kelompok perlakuan yang diberi ekstrak daun kembang bulan mempunyai kadar MDA paling tinggi dan tidak ada perbedaan yang nyata dengan level MDA pada kelompok kontrol dan kelompok obat pembanding catechin. Level MDA yang tinggi mengindikasikan adanya radikal bebas yang terjadi oleh proses penyakit metabolik pada penyakit diabetes dengan cara peroksidasi asam lemak. Peningkatan MDA juga berarti peningkatan peroksidasi lipid yang dapat menjadi indikasi penurunan jumlah antioksidan dalam tubuh, baik antioksidan enzimatik maupun antioksidan non-enzimatik (Saddala *et al.*, 2013). Lipid yang teroksidasi dapat memproduksi MDA sebagai produk dekomposisi. Mekanisme pembentukan MDA tersebut melibatkan pembentukan prostaglandin, seperti endoperoksida, dari PUFA (Pandey *and* Risvi, 2011). Peningkatan MDA pada serum, plasma, dan berbagai jaringan terjadi pada penderita diabetes melitus (Bandeira *et al.*, 2012). MDA memiliki korelasi yang signifikan dan positif dengan HbA1C (Tiwari *et al.*, 2013).

**Kadar Superoxide dismutase (SOD) Tikus**

Superoxide dismutase (SOD) adalah antioksidan enzim yang berperan menjadi katalis dalam dismutase anion superoksida yang radikal menjadi hidrogen peroksida dan molekul oksigen. SOD memiliki peran

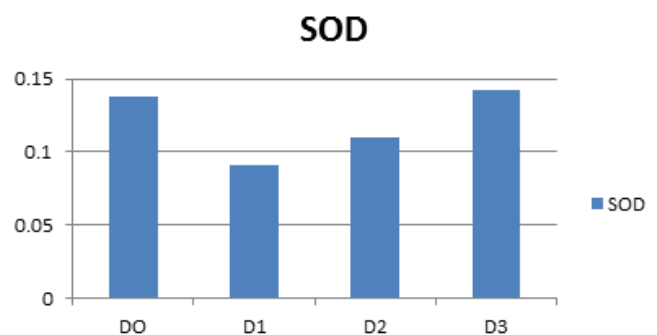
dalam melindungi kerusakan sel dan jaringan yang disebabkan oleh *Reactive Oxygen Species* (ROS). SOD adalah antioksidan yang berperan melawan superoksida, baik di ginjal yang berisiko terhadap terjadinya diabetes nefropati ataupun di jaringan mata yang berisiko terhadap terjadinya diabetes retinopati. Rerata kadar SOD pada kelompok kontrol dan perlakuan dapat dilihat pada Tabel 4.

Berdasarkan uji *homogeneity of variances* didapatkan sig. 0,511 yang artinya varians data homogen, sehingga dapat dilanjutkan dengan uji *Anova* dan didapatkan nilai p=0,207 yang artinya tidak terdapat perbedaan rata-rata kadar SOD antara keempat kelompok.

Dalam jumlah yang berlebih, SOD dan antioksidan lainnya, akan melawan stres oksidatif, menurunkan kadar ROS, dan meningkatkan jumlah antioksidan enzim, sehingga mencegah terjadinya diabetes melitus. Hasil penelitian menunjukkan terjadi penurunan kadar glukosa diikuti peningkatan aktivitas superoxide dismutase (SOD) pada kelompok perlakuan. Pada kelompok tikus diabetes yang diinduksi STZ dan diberi ekstrak daun kembang bulan (D3) terjadi peningkatan kadar SOD jika dibandingkan kelompok tikus diabetes yang diinduksi STZ (D1), tetapi kadar SOD paling tinggi pada kelompok tikus diabetes yang diinduksi STZ dan diberi pembanding flavonoid (D3).

Tabel 4. Rata-rata kadar SOD (mg/dl) pada kelompok kontrol dan perlakuan

Kelompok	N	Mean±SD	p
D0 (Kontrol)	8	0,138 ± 0,059	0,207
D1 (Induksi STZ+Na-CMC)	8	0,091 ± 0,039	
D2 (Induksi STZ + ekstrak daun kembang bulan)	8	0,109 ± 0,044	
D3 (Induksi STZ + catechin)	8	0,142 ± 0,065	



Gambar 4. Grafik kadar SOD antara kelompok kontrol dan perlakuan

Hal tersebut mengindikasikan pemberian ekstrak daun kembang bulan dapat menstimulasi aktivitas anti radikal bebas untuk menghambat stress oksidatif yang dihasilkan induksi diabetes dengan STZ. Peningkatan kadar SOD terbukti menurunkan stress oksidatif dan apoptosis neuron pada tikus, sehingga mencegah diabetes. Penelitian pada tikus yang telah diinduksi diabetes didapati bahwa terdapat penurunan aktivitas SOD dan enzim antioksidan lainnya di jaringan hati (Luchessi *et al*, 2013). Penurunan aktivitas SOD dan enzim antioksidan lainnya terkait dengan peningkatan radikal bebas pada organ lain, khususnya pankreas, sehingga SOD dan enzim lainnya fokus untuk melindungi sel-sel pankreas dari kerusakan. Alasan lain terjadinya penurunan aktivitas ini adalah SOD dan enzim antioksidan lain lebih memproteksi jaringan-jaringan lain yang menjadi dampak dari perkembangan penyakit diabetes melitus, seperti: jaringan ginjal dan retina; sehingga terjadi penurunan aktivitas SOD pada hati

### Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang sudah dilakukan, kesimpulan yang dapat diambil induksi streptozotocin menyebabkan peningkatan kadar glukosa pada kelompok perlakuan. Pemberian ekstrak daun *Tithonia diversifolia* dapat menurunkan konsentrasi glukosa dan konsentrasi protein adiponektin secara signifikan ( $p \leq 0.05$ ) pada kelompok perlakuan, namun tidak terdapat perbedaan nyata terhadap konsentrasi MDA dan SOD pada kontrol dan kelompok perlakuan.

### Ucapan Terima Kasih.

Terima kasih disampaikan kepada Direktorat Riset Dan Pengabdian Masyarakat Kementerian Riset, Teknologi, Dan Pendidikan Tinggi yang telah memberikan dana dalam Hibah Penelitian Dasar Unggulan Perguruan Tinggi Nomor: 122/Sp2h/PTNBH/DRPM/2018.

### Daftar Pustaka

Akbarzadeh, A., Norouzian, D., Mehrabi, MR., Jamshidi, S., Farhangi, A., Verdi, AA., Mofidian, SMA., and Rad, BL. (2007). Induction of Diabetes by Streptozotocin in Rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 22:2;60-64.

- Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, and Matsuzawa Y. (2012). Paradoxical Decrease of an Adipose-specific Protein, Adiponektin, in Obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 425:560-4 .
- Bandeira, Sde.M., Guedes, Gda.S., Fonseca, L.J., Pires, A.S., Gelain, D.P and Moreira, J.C., Rabelo, L.A., Vasconcelos, S.M., and Goulart, M.O. (2012). Characterization of Blood Oxidative Stress in Type 2 Diabetes Melitus Patients: Increase in Lipid Peroxidation and SOD Activity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2012:819310. doi: 10.1155/2012/819310.
- Benomar, Y., Amine, H., Crepin, D., Al Rifai, S., Riffault, L., Gertler, A., and Taouis M. (2016). Central Resistin/TLR4 Impairs Adiponektin Signaling, Contributing to Insulin and FGF21 Resistance. *Diabetes* 2016. 65:913-926.
- Chakraborti, C.K. (2015). Role of Adiponektin and Some Other Factors Linking type 2 Diabetes Melitus and Obesity. *World J Diabetes*. 6(15): 1296-1308.
- Dalimartha, S. (2000). *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia*. Jakarta: Trubus Agriwidya.
- Elufioye, TO., Alatisé, OI., Fakoya, FA., Agbedahunsi, JM., and Houghton, PJ. (2009). Toxicity Studies of *Tithonia Diversifolia* A. Gray (*Asteraceae*) in Rats. *J Ethnopharmacol*, 122:2; pp.410-415.
- Hanum, I.F. and van der Masen, L.I. G. (2002). Auxiliary Plants. *J. Nat.Prod*, 2002 pp.297-298.
- Jaramillo, P.L., Arbeláez, D., G., López, J.L., López, C.L., Ortega, J.M., Rodríguez, A.G., and Cubillos, S.T. (2014). The role of Leptin/Adiponektin Ratio in Metabolic Syndrome and Diabetes. *Horm Mol Biol Clin Invest* 18(1): 37-45. DOI 10.1515/hmbci-2013-0053.
- John-Dewole, O.O. and Oni, S.O., (2013). Phytochemical and Antimicrobial Studies of Extracts from the Leaves of *Tithonia diversifolia* for Pharmaceutical Importance. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences (IOSR-JPBS)* e-ISSN: 2278-3008, p-ISSN:2319-7676. Volume 6, Issue 4 (May. – Jun. 2013), pp.21-25.

- Kaefer, M., De Carvalho, J. A. M., Piva, S. J., da Silva, D. B., Becker, A. M., Sangoi, M. B., and Moresco, R. N. (2012). Plasma Malondialdehyde Levels and Risk Factors for The Development of Chronic Complications in Type 2 Diabetic Patients on Insulin Therapy. *Clinical Laboratory*, 58(9–10), 973–978. Tersedia di <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23163113>.
- Kumar, R., Arora, V., Ram, V., Bhandari, A., and Vyas, P. (2015). Hypoglycemic and Hypolipidemic Effect of Allopolyherbal Formulations in Streptozotocin Induced Diabetes Melitus in Rats. *International Journal of Diabetes Melitus* 3:45-50.
- Lekva, T., Michelsen, AE., Aukrust, P., Henriksen, T., Bollerslev, J., and Ueland, T. (2017). Leptin and Adiponektin as Predictors of Cardiovascular Risk After Gestational Diabetes Melitus. *Cardiovascular Diabetology* 2017, 16:5.
- Lopez, JP., Gomez, AD., Lopez, LJ., Lopez, LC., Martinez, OJ., Gomez, RA., and Triana, CS. (2014). The role of Leptin/Adiponektin Ratio in Metabolic Syndrome and Diabetes. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2014 Apr;18(1):37-45. doi: 10.1515/hmbci-2013-0053.
- Lucchesi, N. T., Freitas, L. L., Cassettari, S. F., Marques, and Spadela C. T. (2013). Diabetes Melitus Triggers Oxidative Stress in The Liver of Alloxan-Treated Rats: a Mechanism For Diabetic Chronic Liver Disease. *Acta Cirurgica Brasileira*, vol. 28, no. 7, pp.502–508.
- Maahs, D. M., Hamman, R. F., D’Agostino, R., Dolan, L. M., Imperatore, G., Lawrence, J. M., and Dabelea, D. 2009. The Association Between Adiponektin/Leptin Ratio and Diabetes Type: the SEARCH for Diabetes in Youth Study. *The Journal of Pediatrics*, 155(1), 133–5, 135.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2008.12.048>.
- Majewska, KA., Majewski, D., Skowronska, B., Stankiewicz, W., and Fichna, P. (2016). Serum Leptin and Adiponektin Levels in Children with Type 1 Diabetes Melitus – Relation to Body Fat Mass and Disease Course. *Advances in medical sciences*, Vol.61, Issue 1, March 2016, pp.117-122.
- Matough, FA., Budin, S., Hamid, ZA., Alwahaibi, N., Mohamed, J. (2012). The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Diabetic Complications. *SQU Med J* 12:1; 5-18.
- Olokoba, A.B., Obateru, O.A., and Olokoba, L.B. (2012). Type 2 Diabetes Melitus: A Review of Current Trends. *Oman Med J.* 27(4): 269-273.
- Pandey, K.B., and Rizvi, S.I. (2011). Biomarkers of Oxidative Stress in Red Blood Cells. *Biomedical Papers*,155(2), pp. 131–136.
- Robinson K, Prins J, and Venkatesh B. (2011). Clinical review: Adiponektin Biology and Its Role in Inflammation and Critical Illness. *Crit Care* 15:221.
- Saddala, R.R., Thopireddy, L., Ganapathi, N and Kesireddy, S.R. (2013). Regulation of Cardiac Oxidative Stress and Lipid Peroxidation in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats Treated with Aqueous Extract of *Pimpinella tirupatiensis* Tuberous Root. *Experimental and Toxicologic Pathology*, vol. 65, no. 1-2, pp.15–19.
- Shehzad A, Iqbal W, Shehzad O, and Lee YS. (2012). Adiponektin: regulation of its production and its role in human diseases. *Hormones (Athens)* 11(1):8-20.
- Tiwari, B. K., Pandey, K. B., Abidi, A. B., and Rizvi, S. I. (2013). Study Of Oxidative Stress Status In Type 2 Diabetic Patients. *Journal of Biomarkers*, 2013:2(1), 1–8. Tersedia di <https://doi.org/10.1155/2013/378790>.
- Winarsi, H., Sasongko, N. D., Purwanto, A. and Nuraeni, I. (2013). Ekstrak Daun Kapulaga Menurunkan Indeks Atherogenik dan Kadar Gula Darah Tikus Diabetes Induksi Alloxan. *AGRITECH*, 33(3) pp.273-280.
- Zhao, G., Li, X., Chen, W., Xi, Z., and Sun, L. (2012). Three New Sesquiterpenes from *Tithonia diversifolia* and Their Antihyperglycemic Activity. *Fitoterapia*, 83 pp.1590–1597.

## Keragaman dan Intensitas Infeksi Endoparasit Gastrointestinal pada Sapi Bali dengan Sistem Ekstensif di Kabupaten Kupang

### *Diversity and Intensity of Gastrointestinal Endoparasite in Bali Cattle with Extensive System in Kupang District*

I Gusti Komang Oka Wirawan<sup>1\*</sup>, I Ketut Jaya<sup>2</sup>, Melkianus Dedimus Same Randu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Kesehatan Hewan (Bagian Parasitologi), <sup>2</sup>Jurusan Peternakan, Politeknik Pertanian Negeri Kupang, Jln. Prof. Dr. Herman Yohanes, Kelurahan Lasiana, Kota Kupang  
PO.BOX 1152 Kupang 85111

\*Email: oka\_sayun@yahoo.com

Naskah diterima: 31 Januari 2019, direvisi: 11 Maret 2019, disetujui: 30 November 2019

#### Abstract

Tanah Putih Village is potential for the development of Bali cattle since it has extensive grazing land and the majority of farmers raise Bali cattle. The aim of the study was to obtain data on the diversity and intensity of gastrointestinal endoparasite infection in Bali cattle with an extensive breeding system in Tanah Putih Village, Kupang Timur District, Kupang Regency, East Nusa Tenggara Province. Gastrointestinal endoparasite diversity was identified using sedimentation and flotation methods while the intensity of endoparasite infection was carried out using McMaster method. The diversity and rates of gastrointestinal endoparasite infection were analyzed descriptively. The results of the study on the diversity of gastrointestinal endoparasite showed that there were five types of nematode worm eggs namely *Haemonchus contortus*, *Oesophagostomum radiatum*, *Strongyloides papillosus*, *Bunostomum phlebotomum*, and *Trichostrongylus axei*. Factors that support the diversity of endoparasite are feed sources, livestock populations, and grazing rotation. The average number of worm eggs was based on the total eggs per gram of faeces for *Haemonchus contortus* as many as 100 eggs and the other four types of worm eggs amounted to 50 eggs. The average number of eggs indicates that endoparasite infections in these animals fall into the mild intensity category, which is influenced by season, feed source, and age of livestock. The five types of gastrointestinal endoparasite found namely *Haemonchus contortus*, *Oesophagostomum radiatum*, *Strongyloides papillosus*, *Bunostomum phlebotomum*, and *Trichostrongylus axei*.

**Key words:** Bali cattle; gastrointestinal endoparasitic infection

#### Abstrak

Desa Tanah Putih berpotensi untuk pengembangan sapi Bali karena memiliki padang penggembalaan yang cukup luas dan peternak sudah familiar dengan ternak tersebut. Tujuan penelitian adalah memperoleh data mengenai keragaman dan intensitas infeksi endoparasit gastrointestinal pada sapi Bali dengan sistem pemeliharaan ekstensif di Desa Tanah Putih, Kecamatan Kupang Timur Kabupaten Kupang Provinsi Nusa Tenggara Timur. Identifikasi keragaman endoparasit gastrointestinal menggunakan metode pengendapan dan pengapungan, sedangkan intensitas infeksi endoparasit menggunakan metode McMaster. Data keragaman dan tingkat infeksi endoparasit gastrointestinal dianalisis secara deskriptif. Hasil penelitian mengenai keragaman endoparasit gastrointestinal ditemukan lima jenis telur cacing kelas nematoda, yaitu *Haemonchus contortus*, *Oesophagostomum radiatum*, *Strongyloides papillosus*, *Bunostomum phlebotomum*, dan *Trichostrongylus axei*. Faktor yang mendukung keragaman endoparasit ini adalah sumber pakan, populasi ternak, dan rotasi penggembalaan. Rata-rata jumlah telur cacing yang ditemukan berdasarkan total telur per gram feses untuk *Haemonchus contortus* sebanyak 100 butir, sedangkan keempat jenis telur cacing yang lainnya berjumlah 50 butir. Rataan jumlah telur ini mengindikasikan bahwa infeksi endoparasit pada ternak sapi Bali termasuk dalam kategori intensitas ringan, hal ini dipengaruhi

oleh musim, sumber pakan, dan umur ternak. Lima jenis endoparasit gastrointestinal yang ditemukan adalah *Haemonchus contortus*, *Oesophagostomum radiatum*, *Strongyloides papillosus*, *Bunostomum phlebotomum*, dan *Trichostrongylus axei*.

**Kata kunci:** infeksi endoparasit gastrointestinal; sapi Bali

## Pendahuluan

Desa Tanah Putih Kecamatan Kupang Timur Kabupaten Kupang Propinsi Nusa Tenggara Timur mempunyai potensi untuk pengembangan ternak sapi Bali sebagai ternak komoditi karena mempunyai padang penggembalaan yang cukup luas dan peternak di daerah ini sudah familiar memelihara sapi Bali. Berdasarkan Badan Pusat Statistik (2008) melaporkan bahwa Kecamatan Kupang Timur memiliki populasi ternak sapi paling tinggi, yaitu 17.596 ekor dibandingkan 23 kecamatan yang lainnya.

Adapun alasan peternak memilih sapi Bali sebagai ternak komoditi adalah mudah beradaptasi dengan lingkungan yang ekstrim dengan sumber pakan yang terbatas, lebih tahan terhadap penyakit, dan rata-rata menghasilkan pedet setiap tahun sekali. Beberapa kelebihan sapi Bali adalah kemampuan beradaptasinya dalam lingkungan dengan ketersediaan pakan berkualitas rendah tetapi fertilitasnya sangat baik, fertilitas dan persentase karkas tinggi, serta mudah beradaptasi dengan lingkungan (Handiwirawan dan Subandriyo, 2004; Matondang dan Talib, 2015).

Sistem pemeliharaan ternak sapi Bali di Desa Tanah Putih umumnya menerapkan pemeliharaan sistem ekstensif dan hanya beberapa peternak yang menerapkan pemeliharaan sistem intensif yang bertujuan untuk penggemukkan dengan waktu pemeliharaan 2 – 3 bulan terhitung dari awal pembelian. Sapi-sapi yang telah mencapai bobot badan minimal 400 kg kemudian dipasarkan secara lokal atau diantarpulauan. Manajemen pemeliharaan sistem ekstensif yang dilakukan oleh peternak yaitu ternak dilepas berminggu-minggu bahkan sampai berbulan-bulan di padang penggembalaan sehingga berpeluang terinfeksi endoparasit. Telur cacing yang dikeluarkan bersamaan dengan feses oleh ternak sapi terinfeksi akan menjadi sumber penularan bagi ternak ruminansia yang sehat atau diantara ternak terinfeksi sehingga pengendalian endoparasit gastrointestinal sulit dilakukan.

Kerugian ekonomi akibat infeksi endoparasit gastrointestinal dampaknya belum dirasakan secara langsung oleh peternak karena tidak menimbulkan

kematian ternak secara langsung tetapi mempengaruhi asupan nutrisi dan gangguan fisiologi. Kedua faktor ini dapat berpengaruh terhadap penurunan antibodi sehingga ternak lebih peka terhadap penyakit yang lain. Jika kejadian ini berlanjut maka secara ekonomi peternak mengalami kerugian karena peternak membutuhkan waktu yang lebih lama untuk mencapai berat badan tertentu sesuai dengan target yang diinginkan dan peternak mengeluarkan biaya tambahan untuk perawatan ternak yang sakit.

Berdasarkan data Badan Pusat Statistik Kabupaten Kupang (2013) prevalensi helminthiasis pada sapi di dataran Timor Propinsi Nusa Tenggara Timur dari tahun 2010 - 2012 secara berurutan adalah 21,9%, 22,3%, 44,7%. Data ini masih menggambarkan prevalensi *helminthiasis* pada sapi secara umum, belum mencerminkan infeksi endoparasit secara spesifik mengenai keragaman endoparasit gastrointestinal pada sapi Bali maupun tingkat infeksi berdasarkan total telur per gram (TTG) feses. Oleh karena itu diperlukan penelitian mengenai jenis-jenis dan tingkat infeksi endoparasit gastrointestinal pada sapi Bali dengan sistem pemeliharaan ekstensif di desa tersebut.

Tujuan penelitian adalah memperoleh data mengenai keragaman dan intensitas infeksi endoparasit gastrointestinal pada sapi Bali dengan sistem pemeliharaan ekstensif di Desa Tanah Putih Kecamatan Kupang Timur. Manfaat teoritis yang diharapkan, dapat digunakan sebagai sumber data acuan dan pemetaan endoparasit gastrointestinal (epidemiologi eksperimental) pada musim kemarau bagi para akademisi di lingkup Politeknik Pertanian Negeri Kupang serta berkontribusi sebagai sumber informasi bagi pengembangan ilmu pengetahuan dan teknologi. Hasil penelitian ini juga diharapkan dapat digunakan sebagai referensi untuk pengembangan penelitian lanjutan terutama pada musim kemarau di Propinsi Nusa Tenggara Timur.

Manfaat praktis dari penelitian ini adalah dapat digunakan sebagai acuan oleh tenaga medis di dalam melakukan tindakan preventif maupun kuratif, sehingga prevalensi *helminthiasis* di Desa Tanah Putih Kecamatan Kupang Timur dapat dikendalikan.

## Materi dan Metode

Materi utama dalam penelitian ini adalah feses segar sebanyak 10 sampel/minggu, pengambilan dilakukan sebanyak 12 minggu pada musim kemarau (April – Juli 2018). Bahan pendukung yang diperlukan adalah formalin 10% untuk mengawetkan sampel, aquades sebagai pelarut sampel yang digunakan dalam metode sedimentasi, larutan garam jenuh digunakan sebagai media pengapung dalam metode pengapungan dan metode McMaster.

Peralatan yang digunakan meliputi : pot plastik sebagai tempat sampel feses, gelas beker sebagai wadah larutan, kertas tisu untuk mengeringkan preparat, gelas obyek dan gelas penutup (cover glass) sebagai media pemeriksaan sampel, tabung reaksi, rak tabung, saringan teh, spatula sebagai prasarana untuk ketiga metode yang digunakan, dan timbangan elektrik ketelitian 0,001 gram untuk menimbang sampel. Mikroskop stereo (Hirox KH-8700, H08754 made in Japan) untuk pengamatan telur cacing. Kamar hitung (E-Counting Chamber By : bravo, 1080 x 1350) untuk menghitung telur cacing pada metode MacMaster. Sentrifus untuk memisahkan kotoran-kotoran yang ada dalam sampel feses, mortir digunakan untuk menggerus sampel feses.

Prosedur penelitian pemeriksaan sampel feses menggunakan tiga metode yaitu sedimentasi, pengapungan, dan McMaster. Metode sedimentasi ini telah dimodifikasi dan mengacu pada prosedur yang dilakukan oleh Zajac dan Conboy (2012), prosedur : feses diambil sebanyak 3 gram kemudian ditaruh di dalam mortir, ditambah aquades  $\pm$  5 mL dan digerus. Hasil gerusan disaring dengan saringan teh dan ditampung pada gelas beker, kemudian hasil saringan ini dimasukkan ke tabung reaksi secara perlahan-lahan sampai volumenya  $\frac{3}{4}$  bagian tabung dan bila volumenya kurang bisa ditambahkan aquades ke dalam tabung sambil diaduk menggunakan *spatula* hingga homogen. Setelah itu masukan ke dalam alat pemusing (sentrifus), alat pengatur sentrifus ditempatkan pada posisi kecepatan 1.500 rpm selama 2 menit, kemudian tabung diambil dan *supernatan* dituangkan sehingga hanya tersisa feses yang homogen. Endapan feses diambil menggunakan *spatula* dari dasar tabung sebesar pentolan korek api dan ditaruh diatas gelas obyek kemudian ditambahkan sedikit aquades untuk memudahkan pembuatan preparat hapus, selanjutnya preparat diperiksa dibawah mikroskop dengan pem-

besaran lensa obyektif 350x, untuk memperjelas pengamatan identifikasi morfologi telur cacing maka pembesarannya bisa dirubah ke pembesaran yang lebih kuat. Prinsip dari metode ini menurut Hendrix (206) yang disitasi oleh Demelash *et al.* (2016) adalah mengendapkan telur cacing di dalam sedimen, terutama digunakan untuk mendeteksi telur cacing yang memiliki berat jenis lebih tinggi dari larutan pengapung. Apabila tidak ditemukan jenis telur cacing dari kelas trematoda maka identifikasi dilanjutkan dengan metode pengapungan.

Metode pengapungan dilakukan dengan cara : setelah dilakukan metode sedimentasi bisa langsung dilanjutkan dengan metode ini dengan cara menambahkan larutan garam jenuh sampai volumenya  $\frac{3}{4}$  tabung. Kemudian diaduk dan dipusingkan kembali dengan kecepatan yang sama seperti metode sedimentasi dalam waktu 2 menit. Setelah dipusingkan tabung diambil dan diletakkan pada rak tabung dengan posisi tegak lurus, selanjutnya ditambah larutan garam jenuh sampai permukaannya cembung. Kemudian cover gelas disentuhkan pada permukaan larutan, selanjutnya diletakkan diatas obyek gelas dan diperiksa di bawah mikroskop dengan pembesaran lensa obyektif 350x, untuk memperjelas pengamatan identifikasi morfologi telur cacing maka pembesarannya bisa dirubah ke pembesaran yang lebih kuat. Metode pengapungan ini telah dimodifikasi dan mengacu pada prosedur yang dilakukan oleh Zajac dan Conboy (2012). Prinsip dari metode pengapungan menurut Christie *et al.* (2011) yang disitasi oleh Demelash *et al.* (2016) adalah pemeriksaan feses, didasarkan pada prinsip bahwa telur parasit yang berat jenis lebih rendah dibandingkan dengan larutan flotasi. Ini adalah metode yang paling optimal karena terjadi pemisahan telur dari kotoran feses dengan mengapungkannya pada berbagai larutan. Identifikasi telur cacing dengan mencocokkan telur yang ditemukan dengan kunci identifikasi yang disusun oleh Zajac dan Conboy (2012).

Metode McMaster dilakukan dengan cara : sampel feses digerus kemudian diambil sebanyak 4 gram dicampur dengan larutan pengapung (NaCl jenuh) sebanyak 56 mL untuk menghasilkan volume total 60 mL. Selanjutnya disaring menggunakan saringan teh, hasil saringan sebanyak 0,5 mL dimasukkan ke dalam setiap kamar hitung (Whitlock) menggunakan spuit 1 mL, jika terdapat gelembung udara di dalam kamar hitung maka larutan tersebut dikeluarkan dan diisi kembali. Larutan sampel yang ada di dalam kamar

hitung dibiarkan minimal selama 5 menit dengan tujuan memberikan kesempatan telur cacing berada dipermukaan larutan pengapung. Penghitungan telur cacing pada masing-masing kamar hitung menggunakan mikroskop dengan pembesaran lensa obyektif 350x. Jumlah telur cacing yang ditemukan pada setiap kamar hitung dikalikan 50. Metode telah dimodifikasi dan mengacu pada prosedur yang dilakukan oleh MAFF, 1986 disitasi oleh Lambertz *et al.* (2018) ; Junaidi *et al.* (2014). Data mengenai keragaman dan intensitas infeksi endoparasit gastrointestinal ditabulasi serta dianalisis secara deskriptif.

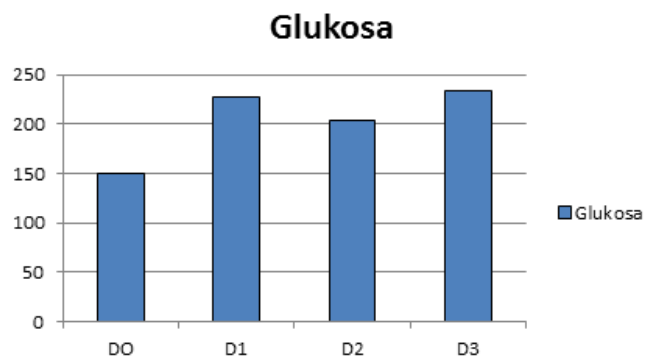
### Hasil dan Pembahasan

Hasil pemeriksaan sampel feses menggunakan metode sedimentasi hanya ditemukan jenis-jenis telur cacing dari kelas nematoda (Tabel 1) oleh karena itu dilanjutkan dengan metode pengapungan. Penyebab tidak ditemukan telur cacing dari kelas cestoda dan trematoda kemungkinan karena kedua kelas dari endoparasit tersebut mempunyai siklus hidup tidak langsung atau memerlukan hospes intermedier sehingga siklus hidupnya lebih kompleks, sedangkan cacing dari kelas nematoda mempunyai siklus hidup langsung. Sesuai pendapat Aryandrie *et al.* (2015) menyatakan bahwa musim hujan dapat memicu infestasi *Fasciola sp.* karena kondisi yang mendukung untuk penyebaran telur cacing melalui siput *Lymnaea rubiginosa* yang menjadi inang perantara cacing *Fasciola sp.* Lebih lanjut, Jabbar *et al.* (2016) menyebutkan bahwa cacing dari kelas cestoda adalah parasit yang memiliki siklus hidup tidak langsung dimana manusia bertindak sebagai inang definitif, sedangkan babi (*Taenia solium*, *Taenia asiatica*) dan ternak sapi (*Taenia saginata*) berfungsi sebagai inang perantara.

Ukuran dan ciri-ciri morfologi telur cacing yang ditemukan dapat dilihat pada Tabel 1. Ciri-ciri morfologi telur cacing yang ditemukan sesuai dengan acuan atlas dari Zajac dan Conboy (2012), yang menyatakan bahwa *Haemonchus contortus* memiliki dinding tipis, terdapat blastomer yang

hampir memenuhi ruangan telur, berbentuk elips; *Oesophagostomum radiatum* memiliki dinding tipis dan terdapat 16 sampai 32 blastomer; *Strongyloides papillosus* berwarna transparan dan berdinding tipis; *Bunostomum phlebotomum* memiliki permukaan dinding halus, terdapat 4 sampai 8 blastomer berwarna gelap; dan *Trichostrongylus axei* berbentuk elips tidak teratur, terdapat 16 sampai 32 blastomer.

Keragaman endoparasit gastrointestinal yang menginfeksi sapi Bali di Desa Tanah Putih didukung oleh tiga faktor, yaitu sumber pakan, populasi ternak, dan rotasi penggembalaan. Interaksi padang penggembalaan yang digunakan secara bersama-sama antara sapi Bali dengan ternak kambing atau ternak ruminansia liar lainnya memberikan peluang yang lebih besar terjadinya kontaminasi sumber pakan (rumput-rumputan) oleh larva infeksiif nematoda tersebut. Hal tersebut dapat mengakibatkan terjadinya infeksi silang secara horizontal diantara ternak-ternak ruminansia di padang penggembalaan (Gambar 1). Sesuai pendapat Candra *et al.* (2016) menyatakan bahwa di pinggiran kawasan Taman Nasional Way Kambas (TNWK), di lokasi yang bersinggungan antara satwa liar dan ternak domestik ditemukan adanya interaksi infeksi serta penularan penyakit cacing dari satu inang dengan inang yang lainnya, endoparasit yang ditemukan, yaitu : telur cacing *Paramphistomum spp*, *Strongylus spp.*, dan *Strongyloides spp.*, baik pada satwa liar maupun pada ternak domestik.



Gambar 1. Interaksi sapi dan kambing di padang penggembalaan

Tabel 1. Keragaman Endoparasit Gastrointestinal

Keragaman endoparasit gastrointestinal	Rataan ukuran telur cacing berdasarkan pengamatan	Acuan ukuran telur cacing (Thienpont <i>et al.</i> (1985)
<i>Haemonchus contortus</i>	88,26 µm x 48,08 µm	62-95 µm x 36-50 µm
<i>Oesophagostomum radiatum</i>	75,36 µm x 50,34 µm	75-98 µm x 46-54 µm
<i>Strongyloides papillosus</i>	47,06 µm x 25,05 µm	47-65 µm x 25-26 µm
<i>Bunostomum phlebotomum</i>	103,75 µm x 48,75 µm	88-104 µm x 47-56 µm
<i>Trichostrongylus axei</i>	86,35 µm x 36,20 µm	70-108 µm x 30-48 µm

Interaksi antara ternak ruminansia ini juga berpengaruh terhadap peningkatan populasi yang sinergis dengan peningkatan *spot-spot* feses di daerah padang penggembalaan. Akumulasi feses terutama di daerah padang penggembalaan yang lembab akan mendukung siklus hidup dari nematoda untuk berkembang menjadi larva infeksi. Bila diantara ternak-ternak ruminansia ini memakan sumber pakan yang mengandung larva infeksi maka ternak yang bersangkutan akan berpeluang terinfeksi. Sesuai pendapat Silvester *et al.*, (2013) mengatakan bahwa kelembaban tinggi dan suhu hangat mendukung perkembangan telur menjadi larva infeksi. Lebih lanjut menurut pendapat Asif *et al.*, (2008), penggunaan padang penggembalaan yang sama antara ternak muda dan dewasa serta didukung oleh kondisi lingkungan yang buruk, merupakan kondisi ideal untuk transmisi endoparasit dari satu hospes definitif ke hospes definitif yang lainnya.

Padang penggembalaan dengan sumber pakan berlimpah di lokasi tertentu membuat ternak sapi atau ternak ruminansia lainnya berkumpul dalam suatu kawasan ini dalam kurun waktu yang relatif lama sehingga kontaminasi sumber pakan oleh keragaman larva infeksi semakin tinggi. Kondisi padang penggembalaan seperti ini menyebabkan infeksi silang diantara ternak ruminansia tersebut sulit untuk dikendalikan karena terjadi keberlangsungan siklus hidup di luar tubuh hospes definitif secara berkelanjutan. Manajemen pengendalian endoparasit menurut pendapat Kumar *et al.* (2013) adalah parasitisme akan menurun jika jumlah lahan bertambah dan lebih sering dilakukan rotasi padang penggembalaan. Prinsip dari metode rotasi yaitu ternak akan digembalakan pada lahan yang sama setelah risiko infeksinya berkurang. Lebih lanjut menurut Carmichael *et al.* (1992) yang disitasi oleh Sani *et al.* (2004), menyatakan bahwa mengurangi waktu yang dihabiskan hewan di padang rumput dengan meningkatkan frekuensi rotasi maka

dapat menekan populasi parasit di padang rumput yang berpengaruh terhadap peningkatan produktivitas hewan.

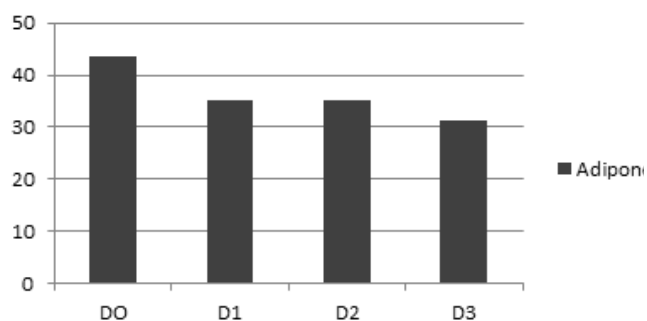
Berdasarkan hasil perhitungan total telur per gram (TTG) feses menggunakan metode McMaster maka infeksi pada sapi Bali di daerah ini termasuk ke dalam kategori intensitas rendah (Tabel 2). Sesuai dengan pendapat Ezenwa (2004) menyatakan bahwa standar tingkat infeksi endoparasit gastrointestinal pada sapi dapat dibagi tiga yaitu infeksi ringan jika jumlah telur 0 – 500 butir per gram feses, infeksi sedang: jumlah telur 550 – 1.500 butir per gram feses, dan infeksi berat: jumlah telur  $\geq$  1.550 butir per gram feses.

Intensitas infeksi endoparasit gastrointestinal pada sapi Bali termasuk dalam kategori rendah keadaan ini dipengaruhi oleh musim, sumber pakan, dan umur ternak. Musim kemarau di Propinsi Nusa Tenggara Timur identik dengan kekeringan karena kondisi geografisnya yang berbukit-bukit kapur sehingga suhu lingkungan menjadi lebih tinggi. Kondisi lingkungan yang seperti ini kurang mendukung perkembangan siklus hidup endoparasit gastrointestinal di luar tubuh hospes definitif yang menyebabkan intensitas infeksinya rendah berpengaruh terhadap penurunan tingkat prevalensi endoparasit di daerah tersebut. Sesuai dengan pendapat Wirawan *et al.* (2015a) dan Wheeler (2011) menyatakan bahwa lingkungan kawasan dengan suhu panas ( $\pm 39^{\circ}\text{C}$ ) dan berbatu kapur sangat berpengaruh terhadap proses perkembangan atau siklus hidup endoparasit gastrointestinal di luar hospes definitif. Lebih lanjut menurut Regassa *et al.* (2006); Al-Shaibani dan Al-Haj (2010), prevalensi dan tingkat infeksi endoparasit yang lebih tinggi secara signifikan pada musim hujan dibandingkan dengan musim kemarau, hal ini berhubungan langsung dengan kelembaban dan suhu.

Tabel 2. Tingkat Infeksi Keragaman Endoparasit Gastrointestinal

Keragaman Endoparasit Gastrointestinal pada Sapi Bali	Rataan Intensitas Infeksi Berdasarkan Total Telur Per Gram (TTG) Feses (Butir)
<i>Haemonchus contortus</i>	100
<i>Oesophagostomum radiatum</i>	50
<i>Strongyloides papillosus</i>	50
<i>Bunostomum phlebotomum</i>	50
<i>Trichostrongylus axei</i>	50

### Adiponectin



Gambar 2. A. Tumbuhan *Leucaena leucocephala*, *Spondias pinnata*. B. *Chromolena odorata*



Musim kemarau berpengaruh terhadap terbatasnya sumber pakan di padang penggembalaan terutama rumput lapang sehingga ternak sapi lebih dominan mengkonsumsi daun-daunan atau biji-bijian yang berasal dari tumbuh-tumbuhan liar (Gambar 2A). Perubahan pola pakan ini juga dapat meminimalisir intensitas infeksi endoparasit gastrointestinal pada sapi Bali di wilayah itu karena larva infeksiif nematoda umumnya berada pada bagian daun dari rerumputan di sekitar sumber pakan. Belum ada laporan penelitian maupun *text book* yang menyatakan bahwa larva infeksiif ditransmisikan melalui daun tumbuh-tumbuhan. Sesuai dengan pendapat Junquera, (2014); Pugh dan Baird, (2012); Wheeler, (2011) menyatakan bahwa siklus hidup ini spesifik untuk sebagian besar nematoda gastrointestinal (misalnya *Teladorsagia*, *Trichostrongylus*, *Haemonchus* dan *Ostertagia*). Larva tahap ketiga bermigrasi keluar dari feses ketika tersedia kelembaban yang cukup (hujan, banjir, embun), kemudian tertelan oleh hospes pada saat merumput.

Sumber pakan dari jenis tumbuh-tumbuhan jumlahnya sangat beragam di sekitar padang penggembalaan sehingga ternak sapi dapat lebih selektif untuk memilih sesuai dengan kebutuhannya dan berpengaruh terhadap peningkatan *palatabilitasnya*. Peningkatan *palatabilitas* umumnya bersinergis dengan peningkatan *score* kondisi tubuh akibat adanya perbaikan metabolisme sehingga ternak lebih tahan terhadap berbagai infeksi mikroorganisme maupun endoparasit gastrointestinal. Menurut pendapat Eisa et al. (2017) menyatakan bahwa infeksi parasit gastrointestinal pada domba jika diberikan pakan dengan kandungan energi rendah menyebabkan kinerjanya menjadi sangat menurun dan meningkatkan angka mortalitas. Lebih lanjut menurut pendapat Sangma et al. (2012), berkaitan dengan status gizi dan populasi kawanan, prevalensi telur cacing pada domba secara signifikan ( $P < 0,01$ ) lebih tinggi pada status gizi yang buruk dan populasi yang lebih banyak.

Selektivitas ternak sapi Bali terhadap tumbuh-tumbuhan yang tidak lazim dikonsumsi sesuai dengan nalurinya secara langsung dapat melindungi atau mengobati dirinya sendiri dari infeksi mikroorganisme maupun endoparasit gastrointestinal. Adapun tumbuh-tumbuhan liar yang tumbuh subur di padang penggembalaan dan tidak lazim dikonsumsi oleh ternak tersebut adalah *Chromolena odorata* (Gambar 2B) dan *Calotropis procera*. Sesuai dengan pendapat Villalba et al. (2014) menyatakan bahwa ruminansia melalui

penginderaannya menunjukkan perilaku anoreksia sehingga mempunyai kecenderungan mengurangi kejadian parasitisme. Selain itu, ruminansia mengobati diri sendiri terhadap parasit gastrointestinal dengan meningkatkan konsumsi senyawa metabolit sekunder dari tumbuh-tumbuhan.

Salah satu kandungan metabolit sekunder dari daun *Chromolena odorata* dan kulit buah *Calotropis procera* yang diekstrak menggunakan pelarut air menurut pendapat Mainasara et al. (2011) dan Prasad et al. (2005) adalah senyawa tanin. Secara farmakodinamik senyawa tanin ini bermanfaat sebagai antelmintik yang bersifat ovisida, larvasida maupun vermisisida. Mekanisme kerja senyawa tanin menurut pendapat Athanasiadou et al. (2001) menyatakan bahwa antelmintik ekstrak tumbuhan yang mengandung senyawa tanin mempunyai mekanisme kerja yaitu dengan mengikat protein pada larva dan cacing nematoda gastrointestinal sehingga menghambat perkembangan larva atau menyebabkan kematian cacing tersebut.

Lebih lanjut menurut pendapat Min et al. (2005), senyawa tanin dapat bereaksi secara langsung dengan cacing dewasa dengan melekat pada kulit cacing yang menyebabkan *distress* pada cacing atau secara tidak langsung dapat meningkatkan nutrisi protein pada kambing dan menaikkan sistem imun. Selanjutnya, senyawa tanin nampaknya mampu menghambat penetasan telur cacing pada feses dan menekan perkembangan larva dengan cara berikatan dengan larva tersebut. Senyawa tanin kondensasi yang terdapat pada ekstrak kulit buah muda *Calotropis procera* konsentrasi 4,5% mempunyai aktivitas daya hambat perkembangan telur cacing *Haemonchus contortus* sebesar 88% (Wirawan et al., 2015b). Menurut Wirawan et al. (2017a) menyatakan bahwa ekstrak metanol kulit pohon *Alstonia scholaris* konsentrasi 2,5% dengan durasi waktu pemaparan lima jam secara *in vitro* menyebabkan persentase mortalitas cacing *H. contortus* sebesar 100%.

Jenis tumbuh-tumbuhan sebagai sumber pakan sekaligus berfungsi sebagai antelmintik digunakan oleh para peternak sebagai pagar hidup untuk memisahkan kepemilikan padang penggembalaan satu dengan yang lainnya adalah kedondong hutan (*Spondias pinnata*) dan lamtoro (*Leucaena leucocephala* (Lam.)). Kedua daun dari tumbuhan tersebut selain berfungsi untuk memperbaiki skor kondisi tubuh ternak, secara langsung juga berpotensi untuk pengendalian

endoparasit gastrointestinal. Sesuai dengan pendapat Wirawan *et al.* (2017b), menyatakan bahwa ekstrak metanol daun muda *Spondias pinnata* secara *in vitro* pada konsentrasi 4,5% mempunyai efektivitas daya larvasida terhadap *Haemonchus contortus* sebesar 100% tidak berbeda nyata dengan kontrol positif yaitu albendazole 0,055% ( $P > 0,05$ ).

Lebih lanjut menurut pendapat Ariani *et al.* (2015), uji aktivitas vermisisidal ekstrak etanol biji lamtoro secara *in vitro* pada konsentrasi 1% b/v; 2% b/v; dan 4% b/v dapat menyebabkan kematian cacing *Ascaris suum* Goeze secara bermakna dibandingkan dengan kontrol negatif ( $P < 0,05$ ). Berdasarkan analisis probit ekstrak etanol biji lamtoro memiliki nilai LC100 sebesar 4,24% b/v dan nilai LT100 sebesar 34,7 jam. Sedangkan uji aktivitas vermisisidal ekstrak etanol daun lamtoro secara *in vitro* menurut Devi *et al.* (2015), konsentrasi 0,5% b/v; 1% b/v; 2% b/v dan 4% b/v mempunyai aktivitas vermisisidal secara bermakna apabila dibandingkan dengan kontrol negatif ( $P < 0,05$ ). Berdasarkan analisis probit ekstrak etanol daun lamtoro memiliki nilai LC100 sebesar 4,14% b/v dan nilai LT100 sebesar 39,24 jam.

Umur ternak sapi pada sistem pemeliharaan ekstensif lebih dominan ternak dewasa atau berumur lebih dari tiga tahun sehingga titer antibodinya lebih tinggi dibandingkan ternak muda (pedet) yang menyebabkan ternak dewasa tersebut lebih tahan terhadap infeksi endoparasit. Sesuai dengan pendapat Nabi *et al.* (2014) menyatakan bahwa epidemiologi nematoda gastrointestinal pada ternak kambing ditemukan lima jenis telur cacing, yaitu *Nematodirus spathiger*, *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Strongyloides papillosus* dan *Trichuris ovis*. Prevalensi tertinggi dan jumlah telur rata-rata per gram (EPG) faeces ditemukan pada hewan muda ( $\leq 1$  tahun) dibandingkan dengan ternak dewasa ( $P < 0,05$ ). Lebih lanjut menurut pendapat Lashari *et al.* (2015), prevalensi *Haemonchus contortus* tertinggi yaitu 31,66% ditemukan pada kelompok umur 3-12 bulan dan kelompok terendah  $> 42$  bulan prevalensinya 15,55%.

### Kesimpulan

Disimpulkan bahwa keragaman endoparasit gastrointestinal yang menginfeksi sapi Bali dapat diidentifikasi sebanyak lima jenis, yaitu *Haemonchus contortus*, *Oesophagostomum radiatum*, *Strongyloides papillosus*, *Bunostomum phlebotomum*,

dan *Trichostrongylus axei*. Infeksi endoparasit gastrointestinal yang menginfeksi sapi Bali dari kelima jenis telur cacing tersebut termasuk dalam kategori intensitas ringan.

### Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktur dan Kepala P2M Politeknik Pertanian Negeri Kupang yang telah memberikan dana penelitian melalui DIPA Politeknik Pertanian Negeri Kupang Sesuai Dengan Surat Perjanjian Kerja (SPK) Penelitian Nomor: 01/P2M/DIPA.042.01.2.401014/Pol/2018 Tanggal 07 Mei 2018 Pusat Penelitian dan Pengabdian Pada Masyarakat Politeknik Pertanian Negeri Kupang.

### Daftar Pustaka

- Al-Shaibani, I.R., dan Al-Haj, A. (2010). Prevalence Of Gastrointestinal Helminthes In Sheep In And Around Thamar City, Yemen. *Yemeni Journal Biol. Science*. 6(2): 99-107.
- Ariani, N.K.M., Astuti, K.W., dan Yadnya-Putra, A.A.G.R. (2015). Uji Aktivitas Vermisisidal Ekstrak Etanol Biji Lamtoro (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit) Pada Cacing Gelang Babi (*Ascaris suum* Goeze) Secara *In Vitro*. *Jurnal Farmasi Udayana*. 4(1): 33-37.
- Aryandrie, D.F., Santosa, P.E., dan Suharyati, S. (2015). Tingkat Infestasi Pada Cacing Hati Pada Sapi Bali Di Kecamatan Sukoharjo Kabupaten Pringsewu Provinsi Lampung. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu*. 3(3): 134 – 139.
- Asif, M., Azeem, S., Asif, S., dan Nazir, S. (2008). Prevalence of Gastrointestinal Parasites of Sheep and Goats in and around Rawalpindi and Islamabad, Pakistan. *Journal Vet Animal Science*. Vol 1: 14-17.
- Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Jackson, F., dan Coop, R.L. (2001). Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: *in vitro* and *in vivo* studies. *Veterinary Parasitology*. 99(3): 205-219.
- Badan Pusat Statistik (BPS) Kabupaten Kupang. Kupang Dalam Angka. (2008). Kerjasama Pemerintah Kabupaten Kupang Dengan BPS Propinsi Nusa Tenggara Timur.

- Badan Pusat Statistik (BPS) Kabupaten Kupang. Kupang Dalam Angka. (2013). Kerjasama Pemerintah Kabupaten Kupang Dengan BPS Propinsi Nusa Tenggara Timur.
- Candra, D., Warganegara, E., Bakri, S., dan Setiawan, A. (2016). Identifikasi Kecacingan pada Satwa Liar dan Ternak Domestik di Taman Nasional Way Kambas, Lampung. *Acta Veterinaria Indonesiana*. 4(2): 57-67.
- Demelash, K., Abebaw, M., Negash, A., Alene, B., Zemene, M., dan Tilahun, M. (2016). A Review on Diagnostic Techniques in Veterinary Helminthology. *Nature and Science*. 14(7): 109 – 118.
- Devi, P.K.S., Astuti, K.W., dan Yadnya-Putra, A.A.G.R. (2015). Uji Aktivitas Vermisidal Ekstrak Etanol Daun Lamtoro (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit) Pada Cacing Gelang Babi (*Ascaris suum* Goeze) Secara *In Vitro*. *Jurnal Farmasi Udayana*. 4(1): 83-86.
- Eisa, N.Z., Babiker, S.A., dan Abdalla, H.S. (2017). Effect of Natural Gastrointestinal Parasitic Infection on Fattening Performance of Sudan Desert Sheep. *Journal of Animal Sciences and Livestock Production*. 1(1): 1-6.
- Ezenwa, V.O. (2003). Interactions among host diet, nutritional status and gastrointestinal parasite infection in wild bovids. *International Journal for Parasitology*. 34(2004): 535–542.
- Handiwirawan, E., dan Subandriyo. (2004). Potensi Dan Keragaman Sumberdaya Genetik Sapi Bali. *Wartazoa*. 14(3): 107-115.
- Jabbar, A., Gauci, C., dan Lightowlers, M.W. (2016). Diagnosis of human taeniasis. Faculty of Veterinary and Agricultural Sciences, The University of Melbourne, Werribee, Vic. 3030, Australia. Page. 43 – 45.
- Junaidi, M., Sambodo, P., dan Nurhayati, D. (2014). Prevalensi Nematoda pada Sapi Bali di Kabupaten Manokwari. *Jurnal Sain Veteriner*. 32(2): 168 – 176.
- Junquera, P. (2014). *Haemonchus spp.*, Parasitic Roundworms of Cattle, Sheep and Goats. Biology, Prevention and Control. *Haemonchus contortus*, *Haemonchus placei*. parasitopedia.net/index.
- Kumar, N., Rao, T.K.S., Varghese, A., dan Rathor, V.S. (2013). Internal parasite management in grazing livestock. *Journal of Parasitic Diseases*. 37(2):151–157.
- Lambertz, C., Pouloupoulou, I., Wuthijaree, K., dan Gauly, M. (2018). Endoparasitic infections and prevention measures in sheep and goats under mountain farming conditions in Northern Italy. *Small Ruminant Research*. 164: 94–101
- Lashari, M.H., Tasawar, Z., Akhtar, M.S., Chaudhary, M.S., dan Sial, N. (2015). Prevalence of *Haemonchus contortus* In Local Goats of D. G. Khan. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 4(5): 190-196.
- Mainasara, M.M., Aliero, B. L., Aliero, A. A., dan Dahiru, S. S. (2011). Phytochemical and Antibacterial Properties of *Calotropis Procera* (Ait) R. Br. (Sodom Apple) Fruit and Bark Extracts. *International Journal of Modern Botany*. 1(1): 8-11.
- Matondang, R.H., dan Talib, C. (2015). Model Pengembangan Sapi Bali dalam Usaha Integrasi di Perkebunan Kelapa Sawit. *WARTAZOA*. 25(3): 147-157.
- Min, B. R., Hart, S.P., Miller, D., Tomita, G.M., Loetz, E., dan Sahlu, T. (2005). The effect of grazing forage containing condensed tannins on gastro-intestinal parasite infection and milk composition in Angora does. *Journal Vet Parasitol*. 130: 105-113.
- Nabi, H., Saeed, K., Shah, S.H., Rashid, M.I., Akbar, H., dan Shehzad, W. (2014). Epidimiological Study of Gastrointestinal Nematodes of Goats In District Swat, Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *Science International (Lahore)*. 26(1): 283-286.
- Prasad, S., Narayana, K., Jayakumar, K., dan Srikanth, K.G. (2005). Phytochemical Analysis of Toxic Plant *Chromolaena odorata* (*Eupatorium odoratum*). *Journal of the Indian Society of Toxicolgy*. 1: 1.
- Pugh, D.G., dan Baird, A.N. (2012). Sheep and Goat Medicine. Second Edition. Saunders, an imprint of Elsevier Inc. ISBN: 9781437723533.
- Regassa, F., Sori, T., Dhuguma, R., dan Kiros, Y. (2006). Epidemiology of Gastrointestinal Parasites of Ruminants in Western Oromia,

- Ethiopia. *Internatinal Journal Applied Research in Veterinary Medicine*. 4(1): 51-57.
- Sangma, A., Begum, N., Roy, B.C., dan Gani, M.O. (2012). Prevalence of helminth parasites in sheep (*Ovis aries*) in Tangail district, Bangladesh. *Journal of Bangladesh Agricultural University*. 10(2): 235–244.
- Sani, R.A., Gray, G.D., dan Baker, R.L. 2004. Worm Control for Small Ruminants in Tropical Asia. © Australian Centre for International Agricultural Research GPO Box 1571, Canberra, Australia 2601.
- Silvestre, R-C., Camalig, Fe.M., dan Juliana, Q. (2013). Prevalence of ectoparasites and endoparasites of carabao in Region I. *E-International Research Journal*. 5(3): 2094-1749.
- Villalba, J.J., Miller, J., Ungar, E.D., Landau, S.Y., dan Glendinning, J. (2014). Ruminant self-medication against gastrointestinal nematodes: evidence, mechanism, and origins. published by EDP Sciences. DOI: 10.1051/parasite/2014032. Page: 1-10.
- Wheeler, K. (2011). Impact of grazing management on cattle and sheep parasites. ADAS UK Ltd. Page: 5.
- Wirawan, I.G.K.O., Kusumaningrum, D., dan Oematan, A.B. (2015). Keragaman Endoparasit Gastrointestinal pada *Macaca fascicularis* di Taman Wisata Goa Monyet Tenau, Kota Kupang. *Jurnal Sain Veteriner*. 33(1): 94 – 102.
- Wirawan, I.G.K.O., Nurcahyo, W., Prastowo, J., dan Kurniasih. (2015). Daya Ovicidal Ekstrak Kulit Buah Muda (*Calotropis procera*) terhadap *Haemonchus contortus* secara *in vitro*. *Jurnal Sain Veteriner*. 33(2): 167 – 173.
- Wirawan, I.G.K.O., Nurcahyo, W., Prastowo, J., dan Kurniasih. (2017). Daya Vermisidal Ekstrak Lima Jenis Etnofarmakologi terhadap Cacing *Haemonchus contortus* secara *In-vitro*. *Jurnal Sain Veteriner*. 35(2): 243 – 253.
- Wirawan, I.G.K.O., Nurcahyo, W., Prastowo, J., dan Kurniasih. (2017). Daya Larvasida Ekstrak Daun Muda Kedondong Hutan terhadap *Haemonchus contortus* secara *in vitro*. *Jurnal Veteriner*. 18(2): 283-288.
- Zajac, A.M., dan Conboy, G.A. (2012). *Veterinary Clinical Parasitology*. 8<sup>th</sup> Edition. American Association of Veterinary Parasitologists. ©Iowa State University Press.

## Kajian Kliniko-patologik dan Antimikroba Ekstrak Biji Alpukat (*Persea Americana Mill*)

### *Clinicopathology and Antimicrobial Study of Avocado Seed Extract (Persea americana Mill)*

Christin Marganingsih Santosa\*, Imron Rosyadi, Dinar Arifianto, Siti Isrina Oktavia Salasia

Departemen Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada,  
Jl. Fauna 2, Karangmalang, Yogyakarta 55281

\*Email: [jchrist@ugm.ac.id](mailto:jchrist@ugm.ac.id)

Naskah diterima: 3 November 2018, direvisi: 9 November 2018, disetujui: 30 November 2019

#### Abstract

The phytochemical components of avocado seeds (*Persea americana Mill*) consist of alkaloids, flavonoids, tannins, and saponins, that have the potential as antibacterials. This study was aimed to determine the ability of *Persea americana Mill* extract to inhibit the growth of *Staphylococcus aureus* through inhibition zone observation and the ability to accelerate wound healing of skin infected by *S. aureus* through observation of wound closure and cytopathology. *Persea americana Mill* was extracted using the maceration method with 70% ethanol. The activities of this extract were tested by the diffusion disc agar method. Biomedical tests were carried out on anesthetic Wistar rats with the skin wounds infected by *S. aureus* and treated with *Persea americana Mill* extract. Based on the results of the antimicrobial test, avocado seed extract has an inhibitory effect on the growth of *S. aureus* at a concentration of 6.25% and best at a concentration of 100% compared to the control. Tests in experimental rats showed the effect of wound healing on the 2<sup>nd</sup> day after giving the extract *Persea americana Mill* ointment, faster than the control, which was need 4 days of wound closure. Cytopathology results showed that leukocyte activity was more prominent in rats treated with avocado seed extract compared to control rats. Avocado seeds as by-products have the potential to be new herbal medicines that can be used as antimicrobials of *S. aureus*, which have been confirmed to be resistant to various antibiotics.

**Key words:** antimicrobial; cytopathology; *Persea americana Mill*; resistant; *Staphylococcus aureus*

#### Abstrak

Komponen fitokimia dari biji buah alpukat (*Persea americana Mill*) terdiri dari golongan alkaloid, flavonoid, tanin, dan saponin, mempunyai potensi sebagai antibakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan ekstrak *Persea americana Mill* dalam menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* melalui pengamatan zona hambat serta kemampuan menyembuhkan luka yang terinfeksi *S. aureus* melalui pengamatan penutupan luka dan sitopatologi. Proses penarikan senyawa fitokimia dalam biji buah alpukat menggunakan metode maserasi dengan etanol 70%. Hasil ekstrak diujikan pada mikrobia uji melalui metode difusi agar. Uji biomedik dilakukan pada tikus Wistar teranastesi yang dibuat luka terinfeksi *S. aureus* dan diobati salep ekstrak *Persea americana Mill*. Berdasar hasil uji antimikroba, ekstrak biji alpukat mempunyai efek hambatan pada pertumbuhan *S. aureus* pada konsentrasi 6,25% dan terbaik pada konsentrasi 100% dibandingkan dengan kontrol. Uji pada tikus percobaan, menunjukkan efek kesembuhan luka pada hari ke-2 setelah pemberian ekstrak, lebih cepat dibanding kontrol yaitu hari ke-4 penutupan luka. Hasil sitopatologi menunjukkan aktivitas leukosit yang lebih meningkat pada tikus yang diobati ekstrak biji alpukat dibandingkan dengan tikus kontrol. Biji buah alpukat sebagai hasil samping/buangan produk buah alpukat berpotensi sebagai obat herbal baru yang dapat dimanfaatkan untuk mengatasi infeksi *S. aureus* yang telah dikonfirmasi resisten terhadap berbagai antibiotika.

**Kata kunci:** *Persea americana Mill*; *Staphylococcus aureus*; resisten; antimikroba; sitopatologi

## Pendahuluan

Buah alpukat (*Persea americana* Mill) sudah sangat dikenal masyarakat Indonesia baik untuk dimakan langsung, dibuat jus buah atau bahkan dipakai campuran masker wajah. Kandungan lemak buah alpukat 20 – 30 kali lebih banyak dibanding buah lainnya dan termasuk lemak tak jenuh sehingga mudah dicerna. Biji buah alpukat pada umumnya tidak dimanfaatkan dan hanya sebagai limbah buangan. Namun dari pemeriksaan kandungan nutrisi dalam satu biji buah *Persea americana* Mill terdapat fosfor (95 mg), kalsium (23 mg), zat besi (1,4 mg), sodium (9 mg), potassium (1,3 mg), niacin (8,6 mg), vitamin A (660 I.U.), dan vitamin C (82 mg). Komponen fitokimia biji buah terdiri dari saponin, alkaloid, tannin, triterpenoid dan flavonoid (Marlinda dkk., 2012; Samsiati, 2016) yang juga berpotensi memiliki aktivitas antibakteri (Chia and Dykes, 2010; Leite *et al.*, 2009) dan antikanker (Widiyastuti, 2017).

*Staphylococcus aureus* merupakan agen utama penyebab mastitis baik subklinis atau kronis pada ternak perah yang menyebabkan kerugian yang cukup signifikan bagi para peternak dan pada industri susu. Infeksi *S. aureus* pada hewan dan manusia terutama *methicillin resistant S. aureus* (MRSA) merupakan penyakit yang sulit untuk diatasi karena mikroba ini diketahui telah resisten terhadap berbagai antibiotika (Azis dkk., 2016; Widianingrum *et al.*, 2016).

Studi mengenai potensi ekstrak biji buah alpukat (*Persea americana* Mill) sebagai antimikroba terutama *S. aureus* resisten antibiotika dan efek kliniko patologisnya merupakan suatu upaya mencari alternatif antimikroba baru. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan ekstrak etanol biji buah *Persea americana* Mill dalam menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus in vitro* serta potensinya dalam mempercepat kesembuhan luka yang terinfeksi *S. aureus* secara *in vivo*. Diharapkan penelitian ini dapat bermanfaat untuk memperkaya wawasan obat herbal Indonesia khususnya mengatasi infeksi akibat *S. aureus* multiresisten antibiotika secara efektif.

## Materi dan Metode

### Pembuatan ekstrak etanol biji buah alpukat

Biji alpukat (*Persea americana* Mill) dipilih yang diperoleh dari Sleman, Yogyakarta adalah buah yang

sudah matang siap dikonsumsi. Biji alpukat dipotong kecil-kecil dengan ukuran sekitar 1 cm<sup>2</sup>, dikeringkan dalam oven selama 1 jam, kemudian dihaluskan. Selanjutnya serbuk kering *Persea americana* Mill diekstraksi menggunakan etanol 70% dengan metode maserasi di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada. Hasil ekstrak dipekatan menjadi bentuk pasta dengan cara mencampurkan ekstrak dengan vaseline 1:10 untuk digunakan uji selanjutnya.

### Isolat

Isolat *Staphylococcus aureus* berasal dari susu sapi mastitis, merupakan koleksi dari Prof. Dr. drh. Siti Isrina Oktavia Salasia, Departemen Patologi Klinik FKH UGM.

### Uji kepekaan antibiotika

Uji ini memerlukan persiapan inokulum yaitu biakan murni dan membuat inokulum standar. Empat sampai enam koloni berusia 16 sampai 24 jam dipilih dari media agar dan dibuat suspensi dengan NaCl 0,85% untuk mendapatkan suspensi, dibandingkan dengan suspensi standar Mc Farland. Standar kekeruhan 0,5 Mc Farland telah tersedia secara komersial, yang memiliki kekeruhan sebanding dengan 1 x 10<sup>8</sup> colony forming unit (CFU)/ml.

Uji sensitifitas antibiotika digunakan metode difusi cakram dalam media agar *Mueller Hinton* (Oxoid™) (MHA) yang mengandung *S. aureus*, dengan menempelkan lempengan diskus antibiotika (Oxoid™). Antibiotika yang digunakan untuk uji resistensi *S. aureus* yaitu: Oxacillin, Cefoxitin, Tetrasiklin, Eritromisin, Penisilin-G, Ampisilin, dan Gentamisin. Media MHA kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Zona inhibisi yang terbentuk dievaluasi sesuai standar zona hambatan Kirby-Bauer.

### Uji antibakterial ekstrak *Persea americana* Mill

Pengujian aktivitas antibakteri secara *in vitro* dilakukan dengan menggunakan metode difusi cakram (Valgas *et al.*, 2007) dengan antibiotika pembanding yaitu ampisilin dan gentamicin. Biakan murni *Staphylococcus aureus* distandarisasi dengan larutan 0,5 Mc Farland sehingga diperoleh biakan bakteri uji dengan kepadatan mikroba sebanyak 1x10<sup>8</sup> CFU/mL. Larutan biakan dipupukkan pada MHA selanjutnya ditempelkan kertas cakram berisi ekstrak *Persea americana* Mill dengan konsentrasi bertingkat (6,25%,

12,5%, 25%, 50% dan 100%) (Hando, 2017 dengan modifikasi), diinkubasi pada suhu 35°C selama 24 jam. Diameter zona hambat pertumbuhan bakteri uji diukur menggunakan jangka sorong dan dievaluasi sesuai standar zona hambatan *Kirby-Bauer*.

### Uji pada hewan percobaan

Dalam uji *in vivo* digunakan tikus Wistar jantan 25 ekor, umur 3 bulan, berat badan rata-rata 130 – 150 gram. Tikus dibagi secara acak menjadi 5 kelompok masing masing terdiri dari 5 ekor tikus. Semua kelompok dibuat *incisi* didaerah punggung sepanjang 1 cm sampai dermis, dibawah pengaruh anestesi Ketamin HCl 75 – 95 mg/kg BB (Carpenter, 2013). Kelompok I adalah tikus kontrol (tidak diberi perlakuan). Kelompok II sampai kelompok V tikus diinfeksi *S. aureus* 1x10<sup>8</sup> CFU/mL intradermal pada lokasi luka. Selanjutnya Kelompok II diberi salep antibiotik komersial yang mengandung ampicillin pada hari ke-1 sampai akhir penelitian (hari ke 7). Kelompok III diberi ekstrak *Persea americana* Mill dosis 1 (berdasar uji *in vitro* yang diukur/25%). Kelompok IV diberi ekstrak *Persea americana* Mill dosis 2 (berdasar uji *in vitro* yang diukur/50%). Kelompok V diberi ekstrak *Persea americana* Mill dosis 3 (berdasar uji *in vitro* yang diukur/100%) hingga akhir penelitian (hari ke-7). Masing-masing tikus ditempatkan dalam kandang individu.

Pengambilan darah dilakukan pada awal (sebelum perlakuan) dan akhir penelitian (hari ke-7) melalui *plexus retroorbitalis* untuk diperiksa hematologi. Pada akhir penelitian dilakukan uji imunitas seluler meliputi pemeriksaan leukosit, diferensial leukosit dan sitopatologi luka infeksi. Tikus kemudian dieutanasi menggunakan Ketamin 300 mg/kg berat badan secara intramuskular. Penggunaan hewan percobaan telah mendapatkan kelaikan etik dengan No. 0023/EC-FKH/Int./2018.

### Pemeriksaan sitopatologi

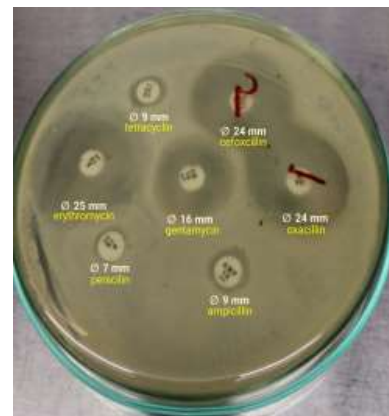
Kaca obyek ditempelkan pada tempat luka infeksi, apus luka selanjutnya diwarnai dengan Giemsa dan diamati di bawah mikroskop. Jenis sel imun seluler diamati sebagai indikator respon terhadap keradangan akibat infeksi *S. aureus*.

### Hasil dan Pembahasan

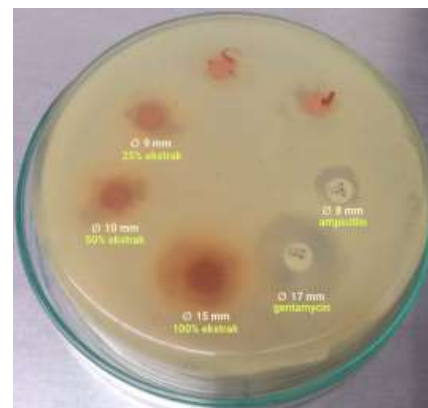
Uji resistensi *Staphylococcus aureus* terhadap berbagai antibiotika dapat dilihat pada Gambar 1. Dari

hasil uji resistensi tampak bahwa *S. aureus* masih peka/sensitif terhadap erythromycin, oxacillin, cefoxitin dan gentamycin, sedangkan terhadap ampicillin, tetracycline dan penicillin-G sudah mengalami resisten. *Staphylococcus aureus* isolat asal Indonesia diketahui telah resisten terhadap berbagai antibiotika (Salasia dan Khusnan, 2011; Azis dkk., 2016; Widianingrum et al., 2016).

Kemampuan ekstrak *Persea americana* Mill dalam menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* diamati melalui zona hambat yang terbentuk dari cakram diskus yang ditempelkan pada pelat agar Mueller Hinton (MHA) (Balouiri et al., 2016). Ekstrak *Persea Americana* Mill dilakukan uji menggunakan



Gambar 1. Uji aktivitas antimikroba berbagai jenis antibiotika sesuai metode *Kirby Bauer*, memperlihatkan *S. aureus* telah resisten terhadap penicillin, tetracyclin dan ampicillin.



Gambar 2. Uji aktivitas antimikroba ekstrak etanol biji buah alpukat (*Persea Americana* Mill.) dengan serial konsentrasi 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, dan 100%, menunjukkan potensi hambatan terhadap pertumbuhan *S. aureus* dengan zona hambat berturut-turut sebesar 9 mm, 9 mm, 9 mm, 10 mm, dan 15 mm. Sebagai kontrol zona hambat ampicillin terhadap *S. aureus* sebesar 8 mm (resisten) dan gentamycin sebesar 17 mm (sensitif).

seri konsentrasi yaitu 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, dan 100% (Hando, 2017 dengan modifikasi). Pengujian dilakukan dengan metode difusi cakram, dengan ampicillin dan gentamicin sebagai pembanding. Hasil penelitian menunjukkan adanya aktivitas antibakteri pada semua konsentrasi ekstrak, yang diketahui melalui zona hambat yang terbentuk.

Hasil pengujian aktivitas antimikroba ekstrak *Persea americana* Mill terhadap *Staphylococcus aureus* memperlihatkan diameter zona hambat untuk konsentrasi 6,25% adalah sebesar 9 mm, konsentrasi 12,5% memiliki diameter daya hambat sebesar 9 mm, konsentrasi 25% sebesar 9 mm, konsentrasi 50% sebesar 10 mm, dan konsentrasi 100% menunjukkan daya hambat 15 mm (Gambar 2). Antibiotika pembanding gentamycin menunjukkan diameter daya hambat 17 mm dan ampicillin 8 mm. Sesuai dengan metode interpretasi Kirby Bauer, hasil ini menunjukkan bahwa antibiotika gentamycin masih sensitif, sedangkan ampicillin telah resisten untuk *S. aureus*. Berdasarkan pembanding ampicillin (resisten dengan diameter hambat 8 mm), maka dapat diinterpretasikan bahwa *S. aureus* sensitif terhadap ekstrak *Persea Americana* Mill pada konsentrasi mulai 6,25% (dengan daya hambat > 8 mm) dan daya hambat tertinggi pada konsentrasi 100% (15 mm), mendekati sensitivitas gentamycin (dengan daya hambat 17 mm).

Berdasar hasil uji antimikrobal ekstrak biji Alpukat ini, dapat disimpulkan bahwa ekstrak biji *Persea Americana* Mill efektif digunakan untuk menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* yang telah resisten terhadap penicillin, tetracyclin dan ampicillin mulai konsentrasi 6,5%. Hasil penelitian ini memberi peluang besar dalam menangani infeksi *S. aureus* yang bersifat patogen dan telah mengalami *multi-drug resistant*. Tanaman herbal *Persea americana* Mill dapat dikembangkan sebagai alternatif obat baru dalam mengatasi *S. aureus* yang telah banyak dilaporkan resisten terhadap berbagai antibiotika. Berdasarkan hasil skrining fitokimia biji buah alpukat yang dilaporkan oleh Samsiati (2016) dan Marlinda dkk. (2012), diketahui bahwa biji alpukat mengandung beberapa senyawa, yaitu alkaloid, triterpenoid, tanin, flavonoid dan saponin. Kandungan biji Alpukat tersebut dilaporkan memiliki aktivitas antibakteri (Chia and Dykes, 2010; Leite et al., 2009).

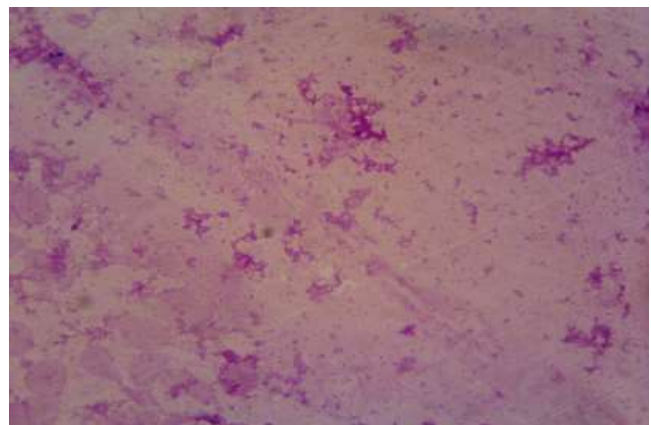
Secara *in vivo*, dilakukan uji biomedik pada tikus Wistar teranastesi yang dibuat luka dengan infeksi *S. aureus* dan diobati dengan salep ekstrak

*Persea americana* Mill. Pengamatan kesembuhan luka diamati melalui kecepatan penutupan luka dan sitopatologi. Uji pada tikus percobaan menunjukkan efek kesembuhan luka (penutupan luka) pada hari ke-2 pengobatan dengan salep ekstrak *Persea americana* Mill 100% (Gambar 3), lebih cepat dibanding dengan kontrol antibiotika dan kelompok yang diberi ekstrak 25% dan 50% yang baru terlihat proses kesembuhan pada hari ke-4.

Hasil sitopatologi apus luka kulit menunjukkan adanya akumulasi sel-sel debris dan sisa radang karena infeksi *S. aureus* (Gambar 4). Aktifitas leukosit lebih meningkat pada luka tikus yang diobati ekstrak biji alpukat dibandingkan dengan tikus control. Pada apus luka infeksi kulit tikus yang diberi salep ekstrak alpukat 100%, tampak sel makrofag aktif memfagosit bakteri (Gambar 5). Banyaknya bakteri yang difagosit oleh sel makrofag memperlihatkan besarnya kemampuan ekstrak *Persea americana* Mill yang mengandung

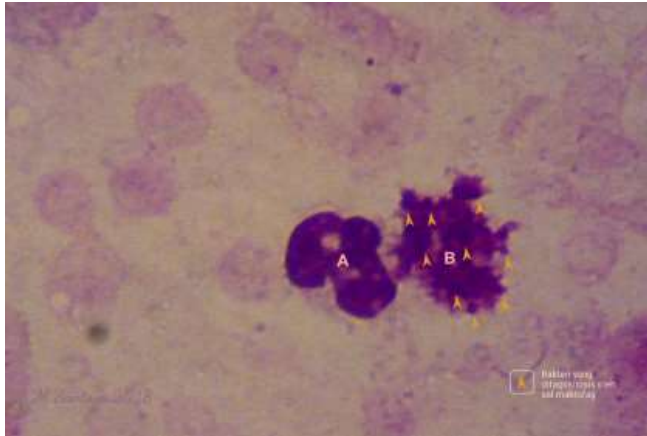


Gambar 3. Pengamatan hari ke-2 proses penutupan luka insisi yang diinfeksi *S. aureus* intradermal kemudian diberi salep ekstrak *Persea Americana* Mill 100% secara topikal.



Gambar 4. Sitopatologi apus luka, banyak terdapat akumulasi debris dan sisa radang karena infeksi *S. aureus* (Pewarnaan Giemsa, perbesaran 10x100).





Gambar 5. Aktifitas leukosit lebih meningkat pada apus luka infeksi tikus yang diobati dengan ekstrak biji alpukat (100%). A: sel neutrofil, B: sel makrofag, Panah kecil: menunjukkan bakteri yang difagosit oleh sel makrofag (Pewarnaan Giemsa, perbesaran 10x100).

berbagai senyawa yang berperan sebagai antibacterial (Chia dan Dykes, 2010; Leite *et al.*, 2009) dalam membantu kesembuhan luka infeksi *S. aureus*.

Munculnya sel imun seluler yang tampak pada apus luka kulit memperlihatkan bahwa ekstrak *Persea americana* Mill mampu menyembuhkan luka tersebut melalui peningkatan aktivitas fagositosis bakteri oleh makrofag. Kandungan nutrisi dalam biji buah *Persea americana* Mill terdapat fosfor, kalsium, zat besi, sodium, potassium, niacin, vitamin A, dan vitamin C, dan berbagai senyawa antioksidan (Samsiati, 2016) kemungkinan berperan dalam proses penyembuhan luka. Chia dan Dykes (2010), melaporkan bahwa ekstrak etanol biji alpukat mampu menghambat pertumbuhan *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. Aktivitas antimicrobial kemungkinan melalui penghancuran mikroba oleh substansi aktif yang terkandung dalam alpukat (Karni *et al.*, 1988).

### Kesimpulan

Berdasarkan hasil pengujian *in vitro* ekstrak biji alpukat (*Persea Americana* Mill.) mampu menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* yang telah multi resisten terhadap penicillin, tetracyclin dan ampicillin mulai konsentrasi 6,5%, dan hambatan tertinggi pada konsentrasi 100%. Secara *in vivo* pada tikus percobaan menunjukkan ekstrak biji alpukat (*Persea Americana* Mill.) mampu menyembuhkan luka infeksi *S. aureus*. Biji buah alpukat yang merupakan hasil samping/ buangan dari buah alpukat berpotensi sebagai obat herbal dalam mengatasi infeksi *S. aureus* yang telah dikonfirmasi resisten terhadap berbagai antibiotika.

### Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini merupakan sebagian penelitian yang didanai melalui Pengembangan Departemen FKH UGM Tahun 2018 berdasarkan Surat Perjanjian Pelaksanaan Kegiatan Nomor: 1029/J01.1.22/HK4/2018.

### Daftar Pustaka

- Aziz, F., Lestari, F.B., Nuraidah, S., Purwati, E., dan Salasia, S.I.O. (2016). Deteksi Gen Penyandi Sifat Resistensi Metisilin, Penisilin dan Tetrasiklin pada Isolat *Staphylococcus aureus* asal Susu Mastitis Subklinis Sapi Perah. *Jurnal Sain Veteriner*. 34(1): 60 – 69.
- Balouiri, M., Sadiki, M., dan Ibn Souda, S.K. (2017). Methods for in Vitro Evaluating Antimicrobial Activity: A Review. *J of Pharmaceutical Analysis*. 6: 71 – 79.
- Carpenter, J.W. (2013). *Exotic Animal Formulary*. 4<sup>th</sup> edition. Elsevier Inc. Missouri.
- Chia, T.W.R., and Dykes, G.A., (2010). Antimicrobial Activity of Crude Epicarp and Seed Extracts from Mature Avocado Fruit (*Persea americana*) of Three Cultivars. *Pharmaceutical Biology*, 48(7): 753-756.
- Hando, E.K. (2017). Efek Rebusan Daun Alpukat (*Persea americana* Mill.) Terhadap Kemampuan Adhesi Bakteri *Streptococcus sanguinis* ATCC<sub>10556</sub> in-Vitro. Skripsi. Fakultas Kedokteran Gigi. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Indonesia.
- Karni, L., Prusky, D., Kobilier, I., Barshira, E., Kobilier, D., and Jacoby, B. (1988). Involvement of epicatechin in the regulation of the antifungal diene during reactivation of latent *Colletotrichum gloeosporioides* infection of avocado fruit. *Phytoparasitica*. 16: 92–92.
- Leite, J.J.G., Brito, E.H.S., Cordeiro, R.A., Brillhante, R.S.N., Sidrim, J.J.C., Bertini, L.M., Morais, S.M.D., and Rocha, M.F.G. (2009). Chemical Composition, Toxicity and Larvacidal and Antifungal Activities of *Persea americana* (Avocado) Seed Extract. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2 (42):110-113.

- Marlinda, M., Sangia, M.S., and Wuntua, A.D. 2012. Analisis Senyawa Metabolit Sekunder dan Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Biji Buah Alpukat (*Persea americana* Mill.); <http://ejournal.unsrat.ac.id/index.php/jmuo>.
- Salasia, S. I. O. and Khusnan (2011). Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates in Indonesia. The International Conference on Natural Sciences (ICONS), Humboldt College. Malang, July 9-11.
- Samsiati, E.H. (2016). Penentuan Aktivitas dan Identifikasi Senyawa Aktif Antioksidan Dalam Biji Buah Alpukat. Tesis *Postgraduate*. Fakultas Farmasi. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Indonesia.
- Valgas, C., Souza, S.M.d., Smânia, E.F., and Smânia Jr, A. (2007). Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology*. 38(2), 369-380.
- Widiyastuti, Y. (2017). Kajian Senyawa Berpotensi Antikanker Biji Alpukat (*Persea Americana* Mill.): Isolasi Senyawa Sitotoksik dan Mekanisme Kerja Terhadap Sel Kanker MCF-7. Disertasi. Fakultas Farmasi. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Indonesia.
- Widianingrum, D. C., Windria, S. and Salasia, S.I.O. (2016). Antibiotic Resistance and Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine, Crossbred Etawa Goat and Human. *Asian J. Anim. Vet. Adv.* 11 (2): 122-129.

## Pengaruh *In Vitro* Infusa Biji Buah Pinang (*Areca catechu*) terhadap Tingkat Kematian dan Morfometri *Ascaridia galli* Dewasa

### *In Vitro* Effect of *Areca catechu* Infusion on Mortality Rate and Morphometry of Adult *Ascaridia galli*

Wida Wahidah Mubarakah<sup>1\*</sup>, Kurniasih<sup>2</sup>, Wisnu Nurcahyo<sup>3</sup>, Joko Prastowo<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Politeknik Pembangunan Pertanian Yogyakarta Magelang, Jalan Magelang-Kopeng Km 7 Purwosari, Tegalrejo, Magelang, Jawa Tengah

<sup>2</sup>Departemen Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Jl. Fauna 2 Karangmalang, Sleman, Yogyakarta.

<sup>3</sup>Departemen Parasitologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Jl. Fauna 2 Karangmalang, Sleman, Yogyakarta.

\*Email: [wida\\_wahidah02@yahoo.co.id](mailto:wida_wahidah02@yahoo.co.id)

Naskah diterima: 22 Februari 2019, direvisi: 1 April 2019, disetujui: 30 November 2019

#### Abstract

The study evaluates *in vitro* effects of *Areca catechu* infusion as anthelmintics on mortality rate and morphometry of adult *Ascaridia galli*. Naturally infected chickens were collected from local chicken slaughterhouse in Yogyakarta. The intestine of chickens was carefully examined and transported to the Parasitological Laboratory, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. *Ascaridia galli* collected from intestines (including duodenum, jejunum, and ileum) was placed in a petri dish containing 0.62% saline water. Sixty *A. galli* were placed into each concentration of *Areca catechu* infusion. Investigation on mortality rate of adult worms at various concentration and observation as well as differences in *A. galli* morphometry and mortality rate were analyzed using analysis Anova. The figures or the parts of the parasites were captured using Lucida camera and then measured using both micrometer and curvimeter. The morphology of the parasites was identified to determine the morphometric characteristics. The results of morphometric observation of the *A. galli* showed that there was a significant difference ( $P < 0.05$ ) in the body width and the vulva length of the females and in the body width, the esophageal length and width of the males. This research disclosed that *Areca catechu* crude aqueous extract significantly affected the mortality rate of adult *A. galli* at various concentration. This research observed the best concentration to kill adult worms is 25% of *Areca catechu* infusion.

**Key words:** Adulticidal; *Areca catechu*; *Ascaridia galli*; chicken; infusion; morphometry

#### Abstrak

Penelitian ini mengevaluasi pengaruh *in vitro* infusa biji buah pinang (IBP) sebagai anthelmintik terhadap tingkat kematian dan morfometri *Ascaridia galli* dewasa. Ayam yang terinfeksi secara alami dikumpulkan dan disembelih di rumah potong ayam lokal di Yogyakarta. Usus ayam diperiksa dan dibawa ke Laboratorium Parasitologi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. *A. galli* dikumpulkan dari usus (termasuk duodenum, jejunum, dan ileum) dan ditempatkan pada cawan petri yang berisi NaCl 0,62%. Terdapat 60 *A. galli* pada setiap konsentrasi IBP. Pengamatan tingkat kematian cacing dewasa pada berbagai konsentrasi dan perbedaan morfometri *A. galli* dianalisis menggunakan Anova. Bagian tubuh cacing digambar menggunakan kamera *Lucida*, kemudian diukur menggunakan mikrometer dan curvimeter. Morfologi cacing diidentifikasi untuk menemukan karakteristik morfometri. Hasil pengamatan morfometri *A. galli* menunjukkan bahwa ada perbedaan signifikan pada lebar tubuh dan panjang vulva cacing betina dan lebar tubuh, panjang serta lebar esofagus cacing jantan. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa IBP secara signifikan mempengaruhi tingkat kematian *A. galli* dewasa pada berbagai konsentrasi. Pada penelitian ini konsentrasi terbaik untuk membunuh cacing dewasa adalah IBP konsentrasi 25%.

**Kata kunci:** adulticidal; *Areca catechu*; *Ascaridia galli*; ayam; infusa; morfometri

## Pendahuluan

Cacing *Ascaridia galli* merupakan nematode parasitik yang sering ditemukan pada unggas. Parasit tersebut menyebabkan kerugian kepada peternak berupa penurunan bobot badan dan hambatan pertumbuhan (Zalizar dan Rahayu, 2001; Zalizar *et al.*, 2006) serta penurunan kualitas telur (Zalizar *et al.*, 2007). Cacing selain menyerap zat-zat makanan juga menyebabkan kerusakan sel-sel epitel villi serta berkurangnya luas permukaan villi usus yang berperan dalam proses pencernaan dan penyerapan makanan (Zalizar, *et al.* 2006). Pemberian anthelmintik sintetik spektrum luas yang intensif dapat menimbulkan resistensi. Meningkatnya kejadian resistensi dan kesadaran konsumen yang semakin tinggi terhadap produk hewani yang bebas residu obat (Waller, 1999), menjadikan penelitian tentang anthelmintik baru merupakan pendekatan terbaik dalam mengendalikan *helminthiasis*. Tumbuh-tumbuhan dengan khasiat anthelmintik telah dikenal dan digunakan di beberapa negara di dunia sejak lama, akan tetapi penelitian detail untuk memvalidasi penggunaannya masih sedikit dilakukan, terutama pada kedokteran hewan (Max *et al.*, 2002). Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa tanin terkondensasi merupakan salah satu metabolit sekunder dari tumbuhan yang memiliki potensi sebagai anthelmintik. Penelitian, secara *in vitro* maupun *in vivo* telah dilakukan untuk mengetahui efek dari beberapa tumbuhan sumber tanin terhadap nematoda (Bahuaud *et al.*, 2006).

Tumbuhan pinang di Indonesia tersebar di Pulau Sumatera, Jawa, Bali, Nusa Tenggara, Maluku dan Sulawesi. Buah pinang digunakan juga dalam dunia pengobatan yaitu mengobati penyakit seperti cacingan, perut kembung, luka, batuk berdarah, diare, kudis, koreng, terlambat haid, keputihan, beri-beri, malaria, difteri, tidak nafsu makan, sembelit, sakit pinggang, gigi dan gusi (Arisandi, 2008).

Tanin terkondensasi yang termasuk dalam golongan flavonoid pada biji pinang diduga memiliki kemampuan daya anthelmintik yang mampu menghambat enzim dan merusak membran (Shahidi dan Nacz, 1995). Terhambatnya kerja enzim dapat menyebabkan proses metabolisme pencernaan terganggu sehingga cacing akan kekurangan nutrisi pada akhirnya cacing akan mati karena kekurangan tenaga. Membran cacing yang rusak karena tanin menyebabkan cacing paralisis yang akhirnya mati.

Senyawa saponin yang terkandung dalam buah pinang akan mengiritasi membran mukosa saluran pencernaan cacing sehingga penyerapan zat-zat makanan terganggu, sedangkan senyawa tanin terkondensasi pada buah pinang dapat melemaskan cacing dengan cara merusak protein kutikula tubuh cacing (Dalimartha, 2009). Alkaloid akan menghambat kerja enzim kolinesterase dalam transmisi impuls syaraf yang mempengaruhi aktifitas otot cacing *Ascaridia galli* sehingga terjadi depolarisasi dan kontraksi terus menerus (Sandika *et al.*, 2012).

Berdasarkan uraian di atas diduga kuat bahwa infusa biji buah pinang (*Areca catechu*) memiliki kemampuan anthelmintik terhadap cacing dewasa *Ascaridia galli* secara *in vitro*. Oleh karena itu penelitian mengenai kemampuan anthelmintik tanaman herbal penting untuk dilakukan guna mengatasi resistensi dan residu terhadap obat anthelmintik kimia.

## Materi dan Metode

Penelitian dilakukan di Departemen Parasitologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada.

### Ethical Clearance

Penelitian disetujui oleh Komisi *Ethical Clearance* Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gadjah Mada, nomor surat 00126/04/LPPT/XI/2018.

### Uji *in vitro* infusa biji buah pinang (IBP) terhadap *Ascaridia galli*

*Ascaridia galli* diperoleh dari lumen usus ayam yang terinfeksi secara alami. *A. galli* dikumpulkan dari usus dan ditempatkan pada cawan petri yang berisi NaCl 0,62%. Pada setiap konsentrasi (10%, 12,5%, 15%, 17,5%, 20%, 22,5% dan 25%) IBP digunakan 30 ekor cacing betina dan 30 ekor cacing jantan *A. galli*. Bagian-bagian tubuh *A. galli* digambar menggunakan kamera *Lucida* kemudian diukur setiap bagian cacing menggunakan mikrometer dan curvimeter untuk mengetahui karakteristik morfometri *A. galli*.

### Pembuatan infusa biji buah pinang (IBP)

Infusa biji buah pinang dipersiapkan dengan mengiris *A. catechu* menjadi irisan-irisan kecil dan kemudian dikeringkan dibawah sinar matahari. *A. catechu* kering kemudian ditimbang sebanyak 10 g dan

25 g lalu masing-masing ditempatkan ke dalam tabung gelas. Sebanyak 100 ml aquadestilata ditambahkan ke dalam tabung gelas kemudian campuran dimasukkan ke dalam oven dengan temperatur 90°C selama 15 menit (Widiarso et al., 2018). Cairan yang tersisa disaring untuk digunakan.

**Analisa Data**

Tingkat kematian cacing dewasa pada berbagai konsentrasi dianalisa menggunakan analisis varians *two way Anova*, sementara perbedaan morfometri *A. galli* dianalisis menggunakan sidik ragam satu arah (*one way Anova*).

**Hasil dan Pembahasan**

Berdasarkan hasil analisis sidik ragam diketahui bahwa pemberian IBP secara keseluruhan mempunyai pengaruh yang signifikan terhadap tingkat kematian cacing dewasa *A. galli* ( $P < 0,05$ ) (Tabel 1).

Konsentrasi terbaik untuk kematian cacing dewasa terdapat pada konsentrasi 25 %. Konsentrasi 25 % IBP mampu menyamai kemampuan membunuh cacing bila dibandingkan dengan anthelmintik kimia Pyrantel pamoat 5% (Tabel 1).

**Pengaruh IBP terhadap Morfometri cacing dewasa *A. galli* betina dan jantan**

Hasil penelitian menunjukkan bahwa IBP memiliki pengaruh signifikan terhadap morfometri cacing *A. galli* dewasa betina dan jantan seperti ditunjukkan oleh panjang tubuh, lebar tubuh, panjang esofagus, lebar esofagus, panjang vulva, panjang *preanal sucker*, dan panjang spikula (Tabel 2 dan 3).

Berdasarkan Tabel 2, terdapat perbedaan signifikan pada lebar tubuh dan panjang vulva cacing

*A. galli* betina pada konsentrasi 25%, 10% dan 0% ( $P < 0,05$ ). Tidak ada perbedaan lebar tubuh yang signifikan di antara konsentrasi 10% dan 0% (kontrol), tetapi ada perbedaan signifikan di antara konsentrasi 25% dan 0% ( $P < 0,05$ ). Tidak ada perbedaan signifikan pada panjang vulva di konsentrasi 10% dan 0%, tetapi ada perbedaan signifikan antara konsentrasi 25% dan 0% ( $P < 0,05$ ). Tidak ada perbedaan signifikan pada panjang tubuh, panjang dan lebar esophagus di IBP konsentrasi 10% dan 25%. Kerusakan kutikula yang disebabkan oleh tanin yang terkandung di dalam IBP dapat menurunkan lebar tubuh dan panjang vulva *A. galli* betina.

Cacing *A. galli* dewasa jantan memiliki perbedaan signifikan pada panjang tubuh, lebar tubuh, panjang esofagus dan lebar esofagus ( $P < 0,05$ ). IBP pada konsentrasi 10% dan 25% mampu menurunkan lebar tubuh dan lebar esofagus pada cacing jantan (Tabel 3). Hasil pengamatan mikroskopik morfometri *A. galli* menunjukkan bahwa ada perbedaan signifikan ( $P < 0,05$ ) pada panjang tubuh, lebar tubuh, panjang esofagus, dan lebar esofagus cacing jantan (Tabel 3). IBP pada konsentrasi 25% dapat menurunkan panjang tubuh cacing dewasa jantan. Namun demikian, tidak ada perbedaan signifikan di dalam panjang tubuh di antara IBP konsentrasi 10% dan 0%. IBP pada konsentrasi 10% dan 25% menyebabkan penurunan lebar tubuh cacing. Ada perbedaan signifikan di antara konsentrasi-konsentrasi IBP, baik 10%, 25%, dan 0%. Perbedaan signifikan ( $P < 0,05$ ) terlihat pada panjang esofagus, antara konsentrasi IBP 25% ( $3,37 \pm 0,26$ ) dan 0% ( $3,66 \pm 0,41$ ), tetapi tidak ada perbedaan signifikan pada panjang esofagus di antara konsentrasi 25% ( $3,37 \pm 0,26$ ) dan 10% ( $3,51 \pm 0,32$ ). Tidak ada perbedaan signifikan pada panjang spikula cacing yang terpapar

Tabel 1. Efikasi IBP terhadap tingkat kematian *A. galli* dewasa

Konsentrasi (%)	6 jam
Kontrol negatif (NaCl 0,62%)	0,00±0,00 <sup>a</sup>
10	0,00±0,00 <sup>a</sup>
12,5	10,00±0,00 <sup>b</sup>
15	11,70±1,65 <sup>b</sup>
17,5	11,70±0,00 <sup>b</sup>
20	33,00±7,85 <sup>c</sup>
22,5	50,00±9,30 <sup>d</sup>
25	100,00±0,00 <sup>e</sup>
Pyrantel pamoat 5%	100,00±0,00 <sup>e</sup>

<sup>a,b,c,d,e</sup> Superskrip yang berbeda dalam satu kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan signifikan ( $P < 0,05$ )

Tabel 2. Morfometri cacing *A. galli* dewasa betina yang dipapar IBP secara *in vitro*.

Morfometri <i>A.galli</i>	Kontrol (0%)	IBP 10% (mm)	IBP 25% (mm)
Panjang tubuh	8,59±0,88 <sup>a</sup>	8,47±0,90 <sup>a</sup>	8,17±0,59 <sup>a</sup>
Lebar tubuh	0,98±0,07 <sup>a</sup>	0,97±0,06 <sup>a</sup>	0,93±0,06 <sup>b</sup>
Panjang Esofagus	3,30±0,31 <sup>a</sup>	3,24±0,30 <sup>a</sup>	3,16±0,29 <sup>a</sup>
Lebar esofagus	0,43±0,04 <sup>a</sup>	0,41±0,05 <sup>a</sup>	0,39±0,05 <sup>a</sup>
Panjang vulva	4,67±0,31 <sup>a</sup>	4,12±0,22 <sup>a</sup>	3,87±0,67 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Superskrip yang berbeda dalam baris yang sama menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $P < 0,05$ ). Jumlah cacing yang diukur untuk setiap konsentrasi adalah 60 (30 jantan dan 30 betina), *A. galli* = *Ascaridia galli*, *A.catechu* = *Areca catechu*, IBP = Infusa Biji Buah Pinang (*Areca catechu*)

pada konsentrasi 10% dan 0%. Sementara itu, terdapat perbedaan signifikan ( $P < 0,05$ ) di dalam lebar esofagus *A. galli* jantan pada konsentrasi 25% ( $0,42 \pm 0,07$ ) dan 10% ( $0,46 \pm 0,08$ ), juga pada konsentrasi 25% dan 0% ( $0,48 \pm 0,08$ ). *A. galli* yang direndam di dalam IBP pada konsentrasi 10% menunjukkan tidak semua cacing mati namun semua cacing mati pada konsentrasi 25%. Perbedaan morfometri di antara beberapa konsentrasi dan kontrol mungkin berhubungan dengan pengaruh kandungan fitokimia IBP yang bisa merusak kutikula cacing dewasa.

Pada penelitian ini menunjukkan IBP dengan konsentrasi 25% mempunyai efek daya anthelmintik terbesar terhadap cacing *A. galli* (Tabel 2 dan 3), hal tersebut sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Tiwow *et al.* (2013) yang menyatakan bahwa pada konsentrasi 20% ekstrak etanol biji pinang secara *in vitro* mampu membuat cacing *A. galli* menjadi lisis atau mati, sedangkan konsentrasi 30% memiliki daya anthelmintik lebih efektif terhadap cacing *A. galli*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa *A. galli* pada kelompok kontrol memiliki karakteristik morfologis sama seperti yang ditemukan oleh Ramadhan dan Znada (1992), termasuk warna, panjang tubuh, lebar tubuh, panjang esofagus, lebar esofagus, panjang vulva, panjang *preanal sucker*, dan panjang spikula.

Pemeriksaan fitokimiawi awal terhadap *A. catechu* menunjukkan bahwa *A. catechu* mengandung flavonoid, tanin, saponin, monoterpen, sesquiterpen, phenol, quinone dan alkaloid (arecoline dan arecaine) (Amudhan *et al.*, 2012). Tanin bisa mempengaruhi cacing-cacing dewasa baik secara langsung maupun secara tidak langsung. Reaksi langsung terjadi ketika tanin melekat pada kutikula cacing (Zhong *et*

*al.*, 2014). Kutikula nematoda diketahui memiliki banyak peran penting dalam menjalankan fungsi penyerapan, perlindungan dan selektif. Lebih jauh, kutikula nematoda menjadi tempat yang menjadi sasaran utama obat-obat anthelmintik (Alvarez *et al.*, 2007). Lalchhandama *et al.*, (2009) menyatakan bahwa cacing *A. galli* dewasa yang diberi perlakuan dengan albendazole mengalami penghancuran kutikula. Anthelmintik juga menyebabkan goresan-goresan melintang sepanjang badan kutikula *W. Bancrofti* (Oliveira *et al.*, 2007). Sebelumnya, Robinson *et al.*, (2004) menjelaskan bahwa albendazole memiliki pengaruh penghentian polimerisasi  $\beta$ -tubulin mikrotubula dan ini menyebabkan kerusakan struktural dan fungsional pada parasit. Hal ini sama dengan temuan Roy *et al.*, (2012). Jadi, tampak jelas bahwa pengaruh ekstrak *A. oxyphylla* menyebabkan kerusakan epikutikula dan juga kutikula cacing *A. galli* dewasa. Penelitian lain melaporkan bahwa pengaruh ekstrak *Calendula micrantha* menyebabkan permukaan mengkerut dengan hilangnya goresan-goresan sepanjang tubuh kutikula cacing *A. galli* (Hassain *et al.*, 2009). Pengaruh senyawa aktif yang diisolasi dari *A. oxyphylla* terhadap nematoda menyebabkan kerusakan pada permukaan tubuh *A. galli* (Roy *et al.*, 2012).

Hasil yang sama juga menunjukkan bahwa tanin dapat merusak kutikula *Haemonchus contortus*. Perubahan pada kutikula *H. contortus* dengan kerutan-kerutan membujur dan melintang setelah pemaparan *in vitro* terhadap *Biophytum persianum* yang kaya akan tanin dievaluasi oleh Sambodo *et al.*, (2018). Kerutan-kerutan pada kutikula *H. contortus* juga diamati oleh Martinez *et al.*, (2013). Pada cacing dewasa kutikula berperan pada motilitas dan pertukaran dengan lingkungan parasit, termasuk pertukaran metabolik dengan lingkungan lokal di dalam saluran pencernaan hospes (Martinez *et al.*, 2013). Penurunan panjang dan lebar tubuh yang disebabkan oleh tanin terjadi pada *Haemonchus contortus* (Kuchai *et al.*, 2012).

Mekanisme unsur-unsur pokok fitokimia yang bekerja membasmi parasit bisa menunjukkan cara-cara yang berbeda. Lorent *et al.*, (2014) menjelaskan bahwa aktivitas sitotoksik saponin yang membentuk pori-pori pada membran sel bisa mengganggu keseimbangan ion sel itu yang berakibat pada lisis dan kematian sel. Mekanisme alkaloid yang diekstraksi dari *Combretum zeyheri* menurut Nyambuya *et al.*, (2017), mungkin berhubungan dengan penghambatan membran-membran sel. Secara umum, mekanisme aktivitas

Tabel 3. Morfometri cacing *A. galli* dewasa jantan yang dipapar IBP secara *in vitro*.

Morfometri <i>A.galli</i>	kontrol (0%)	IBP 10% (mm)	IBP 25% (mm)
Panjang tubuh	6,29±0,67 <sup>a</sup>	6,20±0,54 <sup>a</sup>	5,76±0,57 <sup>b</sup>
Lebar tubuh	0,80±0,57 <sup>a</sup>	0,79±0,45 <sup>b</sup>	0,76±0,07 <sup>c</sup>
Panjang esofagus	3,66±0,41 <sup>a</sup>	3,51±0,32 <sup>a</sup>	3,37±0,26 <sup>b</sup>
Lebar esofagus	0,48±0,08 <sup>a</sup>	0,46±0,08 <sup>b</sup>	0,42±0,07 <sup>c</sup>
Panjang <i>preanal sucker</i>	0,20±0,00 <sup>a</sup>	0,21±0,03 <sup>a</sup>	0,20±0,04 <sup>a</sup>
Panjang spikula	2,07±0,45 <sup>a</sup>	2,00±0,42 <sup>a</sup>	1,91±0,36 <sup>a</sup>

<sup>a,b,c</sup> Superskrip yang berbeda dalam baris yang sama menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $P < 0,05$ ). Jumlah cacing yang diukur untuk setiap konsentrasi adalah 60 (30 jantan dan 30 betina), *A.galli* = *Ascaridia galli*, *A.catechu* = *Areca catechu*, IBP = Infusa Biji Buah Pinang (*Areca catechu*).

anthelmintik ekstrak berbasis tanaman bisa bekerja ketika ekstrak ini mempengaruhi dan menggabungkan membran-membran sel untuk memunculkan perubahan pada komposisi sel. Akibatnya, perubahan komposisi sel ini memunculkan destabilisasi membran, perubahan kekuatan membran, dan kehilangan potensi membran yang menyebabkan lisis sel, yang selanjutnya merusak kutikula dan menyebabkan penurunan secara morfometri.

### Kesimpulan

Infusa biji buah pinang secara signifikan mempengaruhi tingkat kematian *A. galli* dewasa pada berbagai dosis dan waktu pengamatan. Konsentrasi terbaik untuk membunuh cacing dewasa adalah IBP konsentrasi 25%. Pengamatan secara morfometri *A. galli* menunjukkan bahwa ada perbedaan signifikan pada lebar tubuh dan panjang vulva cacing betina dan lebar tubuh, panjang esofagus serta lebar esofagus cacing jantan.

### Daftar Pustaka

- Alvarez, L.I., Mottier, M.L. and Lanusse, C.E. (2007). Drug Transfer into Target Helminths Parasites. *Trends Parasitol.*, 23: 97-104.
- Amudhan, M.S., Begum, V.H. and Hebbar, K.B. (2012). A Review on Phytochemical and Pharmacological Potential of *Areca catechu* L. seed. *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, 3: 4151-4157.
- Arisandi, Y. (2008). *Khasiat Tanaman Obat*. Jakarta: Pustaka Buku Merah
- Bahuaud, D., Martinez-Ortiz de Montellano, C., Chauveau, S., Prevot, F., Torres-Acosta, F., Fouraste, I., and Hoste, H. (2006). Effects of Four Tanniferous Plant Extracts on the in Vitro Exsheathment of Third-Stage Larvae of Parasitic Nematodes. *Parasitology*. 132:545-54.
- Dalimartha, S. (2009). *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia*. Jakarta. Penebar Swadaya.
- Hassanain, M.A., Rahman, E.H.A. and Khalil, F.A.M. (2009). New Scanning Electron Microscopy Look of *Ascaridia galli* (Schrank 1788) Adult Worm and Its Biological Control. *Res. J. Parasitol.*, 4: 1-11.
- Kuchai, J.A., Ahmad, F., Chishti, M.Z., Tak, H., Ahmad, J.A.S. and Razool, M. (2012). A Study on Morphology and Morphometry of *Haemonchus contortus*. *Pak. J. Zool.*, 44(6): 1737-1741.
- Lalchandama, K., Roy, B. and Dutta, B.K. (2009). Anthelmintic Activity of *Acacia oxyphylla* Stem Bark Against *Ascaridia galli*. *Pharm. Biol.*, 47(7): 578-583.
- Lorent, J.H., Quetin-Leclercq, J. and Mingot-Leclercq, M.P. (2014). The Amphiphilic Nature of Saponins and Their Effects on Artificial and Biological Membranes and Potential Consequences for Red Blood and Cancer Cells. *Org. Biomol. Chem.*, 12: 8803-8822.
- Martinez-Ortiz-de-Montellano, C., Arroyo-Lopez, C., Fourquaux, I., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A. and Hoste, H. (2013). Scanning Electron Microscopy of *Haemonchus contortus* Exposed to Tannin-Rich Plants Under *In Vivo* And *In Vitro* Conditions. *Exp. Parasitol.*, 133(3): 281-286.
- Max, R.A., Dawson, J.M., Wakelin, D., Buttery, P.J., Kimambo, A.E., Kassuku, A.A. and Mtenga, L.A. (2002). Effect of Condensed Tannin Extracts on Gastrointestinal Nematodes of Small Ruminants. In: Proceedings of the Second DFID Livestock Production Programme Link Project (R7798) Workshop for Smallstock Holders. Sokoine University of Agriculture, Morogoro, Tanzania
- Nyambuya, T., Mautsa, R. and Mukanganyama, S. (2017). Alkaloid Extracts from *Combretum zeyheri* Inhibit the Growth of *Mycobacterium smegmatis*. *BMC Compl. Altern. Med.*, 17(124): 1-11.
- Oliveira-Menezes, A., Lins, R., Norões, J., Dreyer, G. and Lanfredi, R.M. (2007). Comparative Analysis of a Chemotherapy Effect on The Cuticular Surface of *Wuchereria bancrofti* Adult Worms *In Vivo*. *Parasitol. Res.*, 101: 1311-1317.
- Ramadan, H. H. and Znada, N. Y. A. (1992). Morphologi and Life History of *Ascaridia galli* in the Domestic Fowl That are Raised in Jeddah. *J.K.A.U.Sci.*, 4: 87- 99.
- Robinson, M.W., McFerran, N., Trudgent, A., Hoey, L. and Fairweather, I. (2004). A Possible Model of Benzimidazole Binding to  $\beta$ -Tubulin Disclosed

- by Invoking an Inter-Domain Movement. *J. Mol. Graph. Model.*, 23: 275-284.
- Roy, B., Dasgupta, S., Manivel, V., Parameswaran, P.S. and Giri, B.R. (2012). Surface Topographical and Ultrastructural Alterations of *Raillietina Echinobothrida* and *Ascaridia Galli* Induced by a Compound Isolated from *Acacia oxyphylla*. *Vet. Parasitol.*, 185: 322-326.
- Sambodo, P., Prastowo, J., Kurniasih, K. and Indarjulianto, S. (2018). *In vitro* Potential Anthelmintic Activity of *Biophytum petersianum* on *Haemonchus contortus*. *Vet. World.*, 11(1): 1-4.
- Sandika, B., Raharjo, and Duchu, N. (2012). Pengaruh Pemberian Air Rebusan Akar Delima (*Punica granatum L*) Terhadap Mortalitas *Ascaris suum*. Goesze. Secara *In Vitro*. *Lentera Bio*, 1:81-86.
- Shahidi, F and M. Nacz. (1995). *Food Phenolics*. Technomic Inc, Basel. p.481-482
- Tiwow, D., Bodhi W. and Kojong, N.S. (2013). Uji Efek Anthelmintik Ekstrak Etanol Biji Pinang (*Areca catechu*) Terhadap *Ascaris lumbricoides* dan *Ascaridia galli* Secara *In Vitro*. *Pharmacon*, 76-80.
- Waller, P.J. (1999). International Approaches to the Concept of Integrated Control of Nematode Parasites of Livestock. *Int. J. Parasitol.* 29,155–164.
- Widiarso, B.P., Kurniasih, K., Prastowo, J., and Nurcahyo, W. (2018). Morphology and Morphometry of *Haemonchus contortus* Exposed to *Gigantochloa apus* Crude Aqueous Extract. *Vet. World.*, 11(7): 921-925.
- Zalizar L, and Rahayu I.D. (2001). Pengaruh Penggunaan Larutan Bawang Putih Terhadap Penampilan Produksi Ayam Lurik Penderita Parasit Cacing. *Jurnal Agritek*, 9:2.
- Zalizar L, Satrija F, Tiuria R, and Astuti DA. (2006). Dampak Infeksi *Ascaridia galli* Terhadap Gambaran Histopatologi dan Luas Permukaan Vili Usus Serta Penurunan Bobot Hidup Starter. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 11(3): 215-222.
- Zalizar L, Fadjar. S, Risa. T, and Dewi AA. (2007). Respon Ayam yang Mempunyai Pengalaman Infeksi *Ascaridia Galli* Terhadap Infeksi Ulang Dan Implikasinya Terhadap Produktivitas dan Kualitas Telur. *Animal Production. Jurnal Produksi Ternak* 9(2): 92-98.
- Zhong, R.Z., Sun, H.X., Liu, H.W. and Zhou, D.W. (2014). Effects of Tannin Acid on *Haemonchus contortus* Larvae Viability and Immune Responses of Sheep White Blood Cells *In Vitro*. *Parasite Immunol.*, 36: 100-106.



**Studi *InVivo* Ekstrak Daun Teh Hijau (*Camellia sinensis*) sebagai Alternatif Anti *Eschericia coli* pada Ayam Broiler**

***In-Vivo Study of Green Tea Leaf Extract (Camellia sinensis) as an Alternative Anti-Eschericia coli in Broiler Chickens***

**Bambang Sutrisno\*, R. Wasito, Kurniasih, Sitarina Widyarini, Yuli Purwandari Kristianingrum, Sugiyono**

Departemen Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada,  
Jl. Fauna 2 Karangmalang, Sleman, Yogyakarta 55281  
\*Email: bambangsutrisno@ugm.ac.id

Naskah diterima: 11 April 2019, direvisi: 26 Agustus 2019, disetujui: 30 November 2019

**Abstract**

The prevalence of colibacillosis in poultry farm in Indonesia is very high, while bacteria have a natural ability to develop antibiotic resistance, and the resistance has eventually been occurred to nearly all antibiotics that have been developed up to the present so that it is necessary to look for the alternatives to replace antibiotics as antibacterial prevention and treatment. The study was aimed to determine the antibacterial effect of green tea leaf extract on broiler chickens infected with *Eschericia coli* by determining the score of macroscopic and histopathological lesions, and heterophils, plasma protein, and blood fibrinogen level as well. In the present study, 20 broiler chickens were used and randomly allotted into 4 groups (Groups A, B, C and D) of 5 each. All broiler chickens were given ND and Gumboro vaccines on schedule as usual for maintaining broiler chickens' health on a daily basis. Starting at the age of 21 days, all broilers chickens in each group: Groups Control (A), B, C and D that were not infected with *E. coli* and were not given water extract of green tea leaf (*Camillia sinensis*), infected intra-tracheally with local strains of *E.coli* 10<sup>8</sup> cells / ml according to 0,5 Mc Farland standard, and were not given water extract of green tea leaf (*Camillia sinensis*), infected intratracheally with local strains of *E. coli* 10<sup>8</sup> cells / ml by 0,5 Mc Farland standard, and given to drink water extract of green tea leaf (*Camillia sinensis*) 0,1 g/ml and were given to drink water extract of green tea leaf (*Camillia sinensis*) 0,1g/ml, respectively. During the treatment all of chickens were given food and drink *ad libitum*. Fourteen days after infection of *E.coli*, 5 chickens in each group were collected to withdrawal the blood from wing vein for examination of heterophils, TPP (total protein plasma) and fibrinogen. After that, the chickens were euthanasied with Mg SO<sub>4</sub> saturated solution intravenously and then necropsied for gross and histopathological examinations. Analysis of the results of the blood examination were applied one way of anova (SPSS version 22 program), whereas the gross and histopathological examination were analyzed descriptively. Results of the present study showed that the gross and histopathological examinations of the broiler chickens' organ infected with *E. coli* without being given a green tea extract had airsacculitis, pericarditis, perihepatitis, and peritonitis, whereas broiler chickens infected with *E. coli* and given green tea extract does not indicate the inflammation in any organs. Examination of heterophils counts and blood fibrinogen levels had shown a difference (P <0.05). Broilers chickens infected with *E. coli* and given green tea extracts had lower amounts of heterophils and fibrinogen levels than that of without given a water extract of the green tea. While blood TPP levels were not significantly different (P > 0.05) among the groups. It is concluded the study *in vivo* of the green tea extract (*Camelia sinensis*) 0,1g/ml has the potential to inhibit the infection of *E. coli* in infected broiler chickens.

**Key words:** antibacterial; broiler chickens; *Eschericia coli*; extract of green tea leaves

**Abstrak**

Prevalensi kolibasilosis pada peternakan ayam di Indonesia sangat tinggi, pengobatan menggunakan antibiotik mengalami kendala adanya resistensi, maka perlu dicari alternatif pengganti antibiotik. Penelitian ini ditujukan untuk mengetahui efek anti bakteri ekstrak daun teh hijau terhadap ayam broiler yang diinfeksi *Eschericia coli*. dengan melihat score lesi makroskopik yang di perkuat dengan pemeriksaan histopatologis,

pemeriksaan heterofil, protein plasma dan fibrinogen. Penelitian digunakan 20 ekor *broiler* yang dibagi secara acak ke dalam 4 kelompok yaitu kelompok A, B, C dan D yang masing-masing terdiri 5 ekor *broiler*. Vaksinasi ND dan Gumboro dilakukan sesuai jadwal seperti pemeliharaan pada umumnya. Pada umur 21 hari seluruh *broiler* pada masing-masing kelompok mulai diperlakukan sebagai kontrol (Kelompok A) tanpa infeksi *E. coli* dan tidak diberi minum ekstrak air daun teh hijau (*Camillia sinensis*). Kelompok B, *broiler* diinfeksi secara intratracheal dengan bakteri *E.coli* strain lokal  $10^8$  sel/ml menurut standar *Mc Farland* 0,5, dan tidak diberi minum ekstrak daun teh. Kelompok C, *broiler* diinfeksi secara intratracheal dengan bakteri *E. coli* strain lokal  $10^8$  sel/ml menurut standar *Mc Farland* 0,5, dan diberi minum ekstrak daun teh hijau (*Camillia sinensis*) 0,1g/ml. Kelompok D, *broiler* diberi minum ekstrak daun teh hijau (*Camillia sinensis*) 0,1g/ml. Selama perlakuan ayam masing-masing kelompok diberi pakan dan minum secara *ad libitum*. Empat belas hari setelah infeksi *E. coli*, ayam pada masing-masing kelompok diambil 5 ekor untuk dikoleksi darah untuk pemeriksaan heterofil, total protein plasma (TPP) dan fibrinogen. Selanjutnya ayam dietanasi dengan injeksi larutan Mg SO<sub>4</sub> jenuh secara intravena dan dinekropsi guna pemeriksaan patologi makroskopik untuk skoring lesi, kemudian dilakukan pengambilan jaringan untuk pemeriksaan histopatoplogik. Analisis hasil penelitian untuk pemeriksanan darah menggunakan *one way of Anova* (program SPSS versi 22), sedangkan pemeriksanan makroskopik dan mikroskopik dianalisis dengan diskriptif kualitatif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemeriksanan makroskopik dan mikroskopik organ *brolier* yang hanya dinfeksi *E.coli* tanpa diberi ekstrak teh hijau mengalami *airsacculitis*, *pericarditis*, *perihepatitis* dan *peritonitis*, sedangkan *broiler* yang diinfeksi *E.coli* dan diberi ekstrak teh hijau tidak menunjukkan adanya peradangan. Hasil pemeriksanan jumlah heterofil dan kadar fibrinogen darah lebih rendah secara signifikan ( $P < 0,05$ ) dibanding dengan *broiler* yang diinfeksi *E.coli* tanpa diberi ekstrak teh hijau, sedangkan kadar TPP darah tidak berbeda nyata ( $P > 0,05$ ). Kesimpulan, ekstrak teh hijau (*Camellia sinensis*) 0,1g/ml memiliki potensi menghambat infeksi bakteri *Escherichia coli* pada ayam *broiler*.

**Kata kunci:** antibakteri; *broiler*; ekstrak daun teh hijau; *Escherichia coli*

## Pendahuluan

*Avian pathogenic Escherichia coli* (APEC) sebagai penyebab utama kolibasillosis pada unggas. Penyakit ini umum terjadi pada peternakan unggas khususnya pada peternakan unggas intensif di seluruh dunia dan mengenai semua umur. Penyakit ini memiliki dampak ekonomi di peternakan unggas secara luas (Ronco *et al.*, 2017). Kolibasillosis unggas dapat menular ke manusia, meskipun kebanyakan strain *E.coli* tidak dianggap sebagai patogen, beberapa dapat juga bertindak sebagai patogen oportunistik yang menyebabkan infeksi pada hospes yang immunokompromis. Beberapa strain patogenik dapat menyebabkan gangguan gastrointestinal pada manusia sehat dan hewan (Matin *et al.*, 2017).

Prevalensi kejadian kolibasillosis cukup tinggi di industri peternakan ayam, di Mesir kejadian kolibasillosis mencapai 44 % pada peternakan ayam *broiler ex import*, sedangkan 75 % pada peternakan ayam *broiler lokal* (El-Tawab *et al.*, 2015). Demikian juga kejadian kolibasillosis di Mymensingh, Banglades 1 % pada ayam *broiler* umur antara 25 – 30 hari, dan 0,5 % pada *broiler* umur antara 31 – 35 hari (Matin *et al.*, 2017), di Indonesia kejadian kolibasillosis 22,2 % dibanding penyakit lain pada ayam (Wiedosari dan Wahyuardani, 2015).

Penggunaan antibiotik sebagai terapi antimikrobia merupakan obat untuk menurunkan kejadian dan mortalitas terkait dengan kolibasillosis pada unggas. Walaupun keberadaan *E. coli* resisten terhadap antibiotik berkembang secara luas di dunia, terlebih terkait dengan *E. coli* penyebab penyakit pada unggas. Di China, bakteri *Escherichia coli* asal hewan termasuk ayam sudah mulai resisten terhadap *tetracycline*, *nalidic acid*, *sulfamethoxazole*, *trimetoprim /sulfamethoxazole* dan *ampicilin*, bahkan mulai meningkat resistensinya terhadap *amikacin*, *aztreonam*, *ceftazidime*, *cefotaxime*, *chloramphenicol*, *ciprofloxacin* dan *amoxicillin/clavulanic acid* (Yassin *et al.*, 2017). Serupa juga di Mesir *E. coli* yang diisolasi dari ayam telah terbukti resisten terhadap antibiotik  $\beta$ -lactam, *erythromycin*, *florfenicol*, *gentamycin*, dan *ciprofloxacin* (El Tawab *et al.*, 2015). Di Indonesia, isolat *E.coli* dari air sungai dan air rumah tangga sepanjang Sungai Code juga telah terbukti ada resistensi terhadap antibiotik amoksisilin, kloramfenikol, sulfametoxazol dan streptomycin (Sasongko, 2014), sedangkan di Aceh *E. coli* yang terisolasi dari ayam *broiler* di pasar Rukoh juga telah terbukti sudah resisten terhadap beberapa antibiotik seperti streptomisin, eritromisin, ampisilin, tetrasiklin, gentamisin, ciprofloxacin dan sulfametoksazol (Mukti, *et al.*, 2017).

Penggunaan ekstrak tanaman yang secara tradisional telah mampu digunakan sebagai antimikrobia merupakan alternatif sebagai pengganti antibiotik. Teh hijau (*Camellia sinensis*) merupakan tanaman daerah tropis dan sub tropis termasuk famili *Theaceae*. Minuman teh dapat di buat dari akar, batang, dan daun (Segneanu *et al.*, 2012). Teh hijau umumnya aman, tidak toksik dan tidak ada *side effect* untuk di konsumsi (Padmini *et al.*, 2011). Daun teh kering memiliki senyawa aktif seperti saponin, glikosida, steroid, terpenoid, carotenoid, flavonoid, alkaloid, dan tanin yang mana sebagai penyedia substansi obat (Akowuah *et al.*, 2005). Kebanyakan aksi biologiknya seperti obat penurun lemak darah, anti radang, antimikrobia, anticancer, dan antioksidan yang terkait dengan fraksi polifenol seperti catechin teh (Bohm, 1998; Jankun *et al.*, 1997 dan Kumar *et al.*, 2012) serta sebagai antiprotozoa (Paveto *et al.*, 2004). Pada konsentrasi rendah *epigallocatechin gallate* dan *epicatechin gallate* dapat menekan faktor virulensi bakteri dan dapat membunuh *Staphylococcus aureus* patogen oportunistis yang resisten terhadap antibiotik  $\beta$ -lactam (Peter *et al.*, 2005). Kemampuan aktivitas senyawa tersebut terbukti juga terhadap berbagai mikrobia patogen lain seperti virus hepatitis (Rivero-Buceta *et al.* 2015) dan HIV (Yamaguchiet *al.*, 2002), clamydia dan mycoplasma (Chosa *et al.*, 1992), rotavirus, enterovirus dan influenza (Song *et al.*, 2005), fungi filamentous (Okubo *et al.*, 1991) dan yeast (Herasawa dan Takada, 2004). Berbagai suvei epidemiologis telah menunjukkan bahwa konsumsi teh hijau terkait dengan rendahnya kejadian berbagai kondisi patologis termasuk penyakit kardiovaskuler seperti *stroke*, obesitas dan *cancer* (Hertog *et al.*, 1993 dan Keli *et al.*, 1995). Pengujian ekstrak daun teh hijau dengan air dingin secara *in-vitro* menggunakan metode difusi telah terbukti mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* (Majid *et al.*, 2013), bahkan dengan penambahan 10  $\mu$ l, 20 $\mu$ l dan 30 $\mu$ l ekstrak teh hijau pada media difusi memiliki aktivitas anti bakteri sangat signifikan (Kumar *et al.*, 2012).

Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui efek anti bakteri ekstrak daun teh hijau terhadap ayam *broiler* yang diinfeksi *Escherichia coli* dengan melihat skor lesi makroskopik, di perkuat dengan pemeriksaan histopatologis organ terlibat, pemeriksaan heterofil dan total protein plasma serta fibrinogen.

## Materi dan Metode

### Bahan

Penelitian ini menggunakan 20 ekor ayam *broiler* (Janu Putra, Yogyakarta) dengan umur 1 hari, bakteri *E. coli* isolat lokal (koleksi Lab. Mikrobiologi FKH UGM), bahan lain yang digunakan adalah spuit 1 cc dan spuit 2,5 cc (Terumo) masing-masing 30 buah, tabung endorf 60 buah, serta kontainer yang berisi buffer formalin 10 % (Merck, Germany) sebanyak 20 buah, dalam penelitian ini juga menggunakan enam kandang yang terbuat dari bambu.

### Alat

Peralatan yang dipakai adalah dua set alat nekropsi, timbangan berat badan ayam (Sartorius, Germany), prosesing jaringan (Leica, Germany), *rotary mikrotome* (Yamato, Japan), *staining jar* dan mikroskop (Olympus, Japan).

### Cara Penelitian

Penelitian menggunakan 20 ekor *broiler* yang dibagi secara acak ke dalam 4 kelompok yaitu kelompok A, kelompok B, kelompok C, dan kelompok D yang masing-masing terdiri 5 ekor *broiler*. Semua ayam yang digunakan dilakukan vaksinasi ND dan Gumboro sesuai jadwal seperti pemeliharaan pada umumnya. Pada umur 21 hari seluruh *broiler* pada masing-masing kelompok mulai diperlakukan. Kelompok kontrol (Kelompok A) tanpa infeksi *E. coli* dan tidak diberi minum ekstrak air daun teh hijau (*Camillia sinensis*) 0,1g/ml. Kelompok B, *broiler* diinfeksi secara intratracheal dengan bakteri *E. coli* strain lokal  $10^8$  sel/ml menurut standar *Mc Farland* 0,5, dan tidak diberi minum ekstrak daun teh hijau hingga perlakuan berakhir. Kelompok C, *broiler* diinfeksi secara intratracheal dengan bakteri *E.coli* strain lokal  $10^8$  sel/ml menurut standar *Mc Farland* 0,5, dan diberi minum ekstrak daun teh hijau (*Camillia sinensis*) 0,1g/ml, dan Kelompok D, *broiler* diberi minum ekstrak daun teh hijau (*Camillia sinensis*) 0,1g/ml. Selama perlakuan ayam masing-masing kelompok diberi pakan dan minum secara *ad libitum*. Empat belas hari setelah infeksi *E. coli*, ayam pada masing-masing kelompok diambil 5 ekor untuk dikoleksi darah untuk pemeriksaan heterofil, TPP, dan fibrinogen. Selanjutnya ayam dietanasi dan dinekropsi guna pemeriksaan patologi makroskopik untuk skoring

lesi serta selanjutnya dilakukan pengambilan jaringan untuk pemeriksaan histopatoplogik dengan mikroskop.

**Analisis Hasil**

Hasil pemeriksaan darah dan skor lesi makroskopik terhadap masing-masing kelompok ayam dianalisis statistik menggunakan rancangan percobaan *One-Way Anova* menggunakan program statistik SPSS versi 22. Perubahan histopatologi dianalisis dengan diskriptif kualitatif.

**Hasil dan Pembahasan**

Uji *in-vivo* pemberian ekstrak air teh hijau 0,1g/ml pada ayam *broiler* yang diinfeksi *E. coli* 10<sup>8</sup> sel/ml standar *Mc. Farland* 0,5 telah menunjukkan kemampuan hambatan terhadap infeksi *E.coli* pada *broiler*; sedangkan kelompok ayam yang hanya diinfeksi *E. coli* tanpa pemberian ekstrak air teh hijau semua menunjukkan adanya *air sacculitis*, *pericarditis*, *perihepatitis* dan *peritonitis*, sementara ayam kelompok lain yakni kontrol dan kelompok pemberian teh hijau saja tidak menunjukkan adanya lesi spesifik kolibasilosis (Tabel 1.). Perubahan lesi makroskopik ayam positif terinfeksi *E. coli*, berupa kekeruhan *air sacc* (kantong udara), terdapat eksudat berfibrin atau bahkan terdapat eksudat kaseosa (Gambar.1 B), bagian tepi lobus hepar dan perikardium jantung mengalami peradangan dengan eksudat berfibrin, organ limfoid termasuk lien, timus dan Bursa Fabricius terlihat

sedikit mengalami pembesaran ukuran terutama pada broiler yang diinfeksi *E. coli* saja. Perubahan tersebut merupakan lesi akibat kolibasilosis pada ayam sesuai pendapat Barnes and Gross (1997) bahwa infeksi lokal ataupun sistemik *Escherechia coli* pada ayam termasuk *coliseptisemia*, *coligranuloma* (*Hjarre's disease*), *airsacculitis* (*Chronic Respiratory Disease*), *avian cellulitis*, *swollen head syndrome*, *peritonitis*, *salpingitis*, *osteomyelitis/synovitis*, *panophthalmitis* dan *omphalitis*.

Hasil pemeriksaan histopatologis hepar dan jantung broiler (kelompok B) setelah 14 hari diinfeksi *E. coli* menunjukkan infiltrasi heterofil di daerah trigonum kiernan (Gambar 2. A), tetapi kelompok C, ayam yang diinfeksi *E. coli* dan diberi ekstrak air teh hijau 0,1g/ml tidak menunjukkan peradangan dan nekrosis hepar, *air sacc*, dan peritoneum (Tabel 2. dan Gambar 2. B). Sedangkan pemeriksaan organ lain kelompok B, yaitu jantung dan organ limfoid *broiler* yang diinfeksi *E*

Tabel 1. Score lesi pada organ broiler 14 hari setelah infeksi *Escherichia coli* 10<sup>8</sup> sel/ml standar *Mc. Farland* 0,5 dan diberi ekstrak daun teh hijau 10 g/100 ml

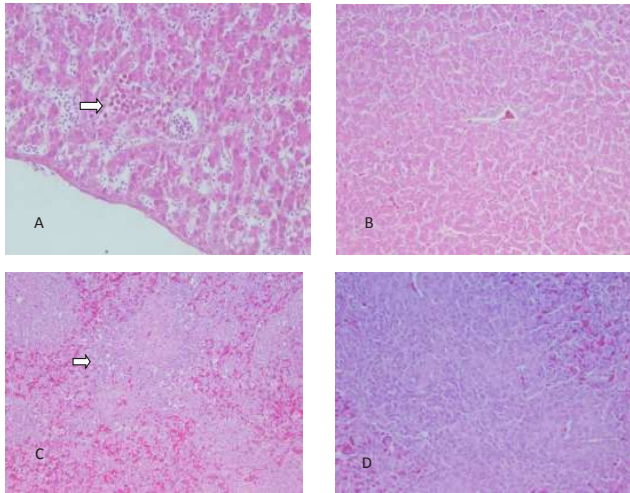
Kode	<i>Airsacculitis</i>	perihepatitis	Perikarditis	Peritonitis
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3 (A)	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	-	-	-	-
1	+	-	-	+
2	+++	++	++	+++
3 (B)	++	+	++	++
4	+	-	-	+
5	+	-	-	+
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3 (C)	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	-	-	-	-
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3 (D)	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	-	-	-	-

Keterangan :

- : tidak ditemukan adanya peradangan
- + : ada peradangan ringan berupa kekeruhan
- ++ : ada peradangan yang ditandai eksudat berfibrin
- +++ : ada peradangan yang ditandai eksudat kaseosa atau granulomatosa



Gambar 1. Lesi Makroskopik ayam broiler 14 hari setelah infeksi *Escherichia coli* 10<sup>8</sup> sel/ml standar *Mc. Farland* 0,5 dan diberi ekstrak daun the hijau 0,1g/ ml A: Kontrol (Negatif), B: Kelompok ayam hanya di infeksi *E.coli* (positif), terdapat eksudat kaseosa pada *air sacc* ( ), C : (Negatif) dan D: (Negatif)



Gambar 2. Histopatologis organ broiler 14 hari setelah infeksi *Escherichia coli* 10<sup>8</sup> sel/ml standar *Mc. Farland* 0,5 dan diberi ekstrak daun teh hijau 0,1g/ml, A : organ hepar positif terinfeksi *E.coli* ada infiltrasi heterofil di sekitar trigonum kiernan (⇨), B : organ hepar negatif kolibasilosis (normal), C : organ lien positif terinfeksi *E. coli*, limfosit mengalami deplesi (⇨) dan D : organ lien negatif kolibasilosis

*.coli* menyebabkan *pericarditis* jantung serta nekrosis dan deplesi limfosit organ limfoid seperti lien (Gambar 2. C), bursa Fabricius, dan timus (Tabel 2).

Lesi tersebut juga dikemukakan oleh Abalaka *et al.* (2017) bahwa infeksi *E. coli* ayam menyebabkan kongesti, nekrosis multifokal dan infiltrasi selular pada hepar, deplesi limfosit lien, infiltrasi selular dan nekrosis otot jantung. Adanya perbedaan ini menunjukkan bahwa efek ekstrak daun teh hijau 0,1 g/ ml mampu mencegah terjadinya peradangan akibat infeksi *E. coli* seperti pada kelompok B.

Hasil pemeriksaan histopatologis organ ayam broiler kelompok C (Tabel 2) menunjukkan hasil yang sama dengan pemeriksaan makroskopik organ broiler, bahwa pemberian ekstrak teh hijau mampu menghambat infeksi, sehingga tidak terjadi peradangan pada organ-organ target.

Hasil analisis statistik jumlah heterofil darah perifer broiler pada berbagai kelompok telah menunjukkan perbedaan nyata ( $P < 0,05$ ), kelompok C adalah kelompok broiler yang diinfeksi *E. coli* dan diberi ekstrak teh hijau 0,1 g/ml menunjukkan hasil sebesar  $3,7 \times 10^3$  sel/mm<sup>3</sup>, jumlah tersebut lebih kecil dari jumlah heterofil broiler kelompok B, kelompok infeksi *E.coli* menunjukkan jumlah paling tinggi yaitu  $16,9 \times 10^3$  sel/mm<sup>3</sup> jauh di atas normal yakni  $3 - 6 \times 10^3$  sel/mm<sup>3</sup> (Weis dan Wardrop, 2010). Hal ini membuktikan, bahwa pemberian ekstrak teh hijau 0,1

Tabel 2. Pemeriksaan histopatologi organ broiler 14 hari setelah infeksi *Escherichia coli* 10<sup>8</sup> sel/ml standar *Mc. Farland* 0,5 dan diberi ekstrak daun teh hijau 0,1g/ml

Kode	Hepar	Jantung	Lien	Timus	Bursa Fabricius
1	-	-	-	-	-
2 (A)	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-
1	+	+	+	+	+
2 (B)	++	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+
1	-	-	-	-	-
2 (C)	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-
2 (D)	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-

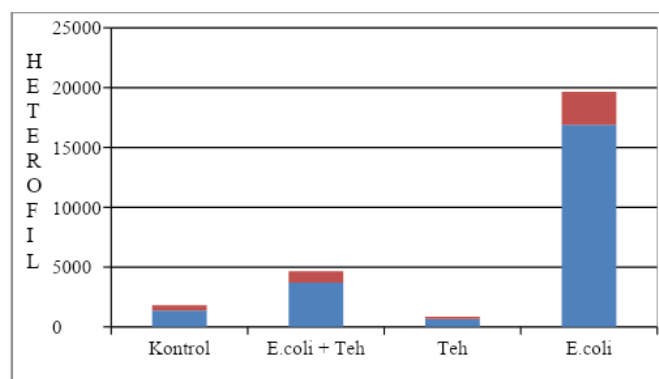
Keterangan :

- : tidak ditemukan adanya peradangan

+ : ada peradangan ringan berupa infiltrasi heterofil di organ hepar dan jantung, dan terjadi deplesi limfosit pada organ limfoid

++: ada peradangan kronis yang disertai nekrosis jaringan

g/ml mampu menekan heterofilia pada broiler yang diinfeksi *E. coli*, seperti terlihat pada Gambar 3. Broiler kelompok kontrol (A) dan kelompok (D) yang diberi teh saja, tampak jumlah heterofil paling rendah  $1,4 \times 10^3$  sel/mm<sup>3</sup> dan  $0,7 \times 10^3$  sel/mm<sup>3</sup>. Infeksi bakterial akan menyebabkan jumlah heterofil darah perifer meningkat sesuai kebutuhan jaringan yang mengalami peradangan.



Gambar 3. Jumlah heterofil broiler 14 hari setelah infeksi *Escherichia coli* 10<sup>8</sup> sel/ml standar *Mc. Farland* 0,5 dan diberi ekstrak daun teh hijau 0,1 g/ml

Penurunan jumlah heterofil pada ayam yang diberi ekstrak teh hijau 0,1 g/ml setelah diinfeksi *E. coli*, menunjukkan peran ekstrak teh hijau yang berfungsi menghambat infeksi, sehingga tidak terjadi peradangan sebagai akibat aksi biologik teh hijau yang berperan dalam penurunan lemak darah, anti radang, antimikrobia, anticancer, dan antioksidan, terkait dengan fraksi polifenol seperti catechin teh (Bohm, 1998; Jankun *et al.*, 1997 dan Kumar *et al.*, 2012) serta sebagai antiprotozoa (Paveto *et al.*, 2004). Pada konsentrasi rendah *epigallocatechin gallate* dan *epicatechin gallate* dapat menekan faktor virulensi bakteri *Staphylococcus aureus* patogen oportunistik yang resisten terhadap antibiotik  $\beta$ -lactam (Peter *et al.*, 2005).

Monitoring peradangan secara umum pada hewan dan manusia masih menggunakan level total protein plasma (TPP) dan fibrinogen. Fibrinogen merupakan faktor koagulasi yang selalu dipertimbangkan saat fase akut dari proses infeksi, peradangan dan mekanisme lain seperti trauma (Davalos and Akassoglou, 2012). Konsentrasi TPP dan fibrinogen normal pada ayam masing-masing adalah 4,5 – 5,5 g/dL dan 0,1 – 0,4 g/dL (Feldman *et al.*, 2000). Hasil pemeriksaan ayam perlakuan terhadap TPP tidak menunjukkan perbedaan nyata ( $P > 0,05$ ) diantara kelompok perlakuan, sedangkan hasil pemeriksaan kadar fibrinogen telah menunjukkan perbedaan yang signifikan diantara kelompok perlakuan ( $P < 0,05$ ), terutama ayam kelompok infeksi *E. coli* tanpa pemberian ekstrak teh hijau (Tabel 3).

Semua kelompok perlakuan memiliki kadar TPP darah lebih rendah dari normal, meskipun kadar TPP ayam kelompok B ada kecenderungan memiliki kadar TPP lebih tinggi dibanding ayam kelompok C. Berbeda dengan kadar TPP, kadar fibrinogen secara keseluruhan cenderung meningkat dari normal. Peningkatan

konsentrasi fibrinogen terutama terjadi pada kelompok ayam B, yang hanya diinfeksi *E. coli* tanpa pemberian ekstrak teh hijau. Hal ini disebabkan karena respon fase akut dari peradangan akibat infeksi oleh bakteri (Roy *et al.*, 2014), akan tetapi pemberian ekstrak teh hijau pada ayam yang diinfeksi *E. coli* menunjukkan konsentrasi TPP maupun fibrinogen darah lebih rendah dari ayam yang hanya diinfeksi *E. coli* saja.

### Kesimpulan

Ekstrak teh hijau (*Camelia sinensis*) 0,1 g/ml memiliki potensi menghambat infeksi bakteri *Eschericia coli* pada ayam broiler.

### Ucapan Terima Kasih

Ucapan terimakasih disampaikan kepada Fakultas Kedokteran Hewan UGM atas pendanaan penelitian melalui BPPTN-BH FKH UGM 2018 dari Fakultas Kedokteran Hewan UGM dengan Nomor kontrak 1038./J01.1.22/HK4/2018.

### Daftar Pustaka

- Abalaka, S.E., sani, N.A., Idoko, I.S., Tenuche, O.Z., Oyelowo, F.O., Ejeh, S.A. and Enem, S.I. (2017). Pathological Changes Associated with An Outbreak of Colibacillosis in a Comercial Broiler flock. *Sokoto Journal Of Veterinary Sciences* 15 (3): 95 -102
- Aggad, H., Ammar, Y.H., Hammoudi, A. and Kihal, M. (2010). Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* Isolated from Chickens with Colibacillosis. *Global Veterinaria* 4(3): 303-306
- Akashi, N., Hitotsubashi, s., Yamanaka, H., Fujii, Y.,Tsuji,T., Miyama, A.,Juya, J.E. and Okamoto, K. (1993). Production of Heat Stabil Enterotoxin H by Chicken Clinical Isolates of *Escherichia coli*. *Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Letters* 109: 311-316
- Akowuah, G.A., Ismail, Z., Norhayati, I., and Sadikun, A. (2005). The Effects of Different Extraction Solvents of Varying Polarities on Polyphenols of *Orthosiphon Stamineus* and Evaluation of the Free Radical-scavenging Activity. *Journal of Food Chemistry*, 93, 311–317.
- Barnes, H.J. and Gross, W.B. (1997). Colibacillosis. In *Disease of Poultry* 10<sup>th</sup> Ed. Iowa State University Press. Iowa.

Tabel 3. Rerata TPP dan fibrinogen broiler 14 hari setelah infeksi *Escherichia coli* 10<sup>8</sup> sel/ml standar *McFarland* 0,5 dan diberi ekstrak daun teh hijau 0,1 g/ml

Perlakuan/Kelompok	TPP (g/dL) X ± sd	Fibrinogen ( g/dL) X ± sd
Kontrol (A)	2,80 ± 0,61	0,47 ± 0,37 <sup>a</sup>
<i>E. coli</i> (B)	4,40 ± 0,61	1,93 ± 0,47 <sup>b</sup>
<i>E. coli</i> + Teh hijau (C )	3,67 ± 0,13	0,83 ± 0,09 <sup>a</sup>
Teh hijau (D)	3,33 ± 0,24	0,73 ± 0,07 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> Huruf yang berbeda dalam kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang signifikan  $P < 0,05$

- Bohm, B.A. (1998). Extraction, Purification and Identification of Flavonoids. In *B. Ravindranath Ed. Introduction to Flavonoids*. Harwood Academic Publishers, Vancouver, British Columbia, Canada. 175 – 241.
- Chosa, H. Toda, M., Okubo, S., and Hara, Y. (1992). Anti Microbial and Microbicidal Activities of Tea and Catechins Against Mycoplasma. *Journal of The Japanese Association for Infectious Diseases* 66: 606 - 611
- Cook, J.K.A., Huggins, M.B., and Ellis, M.M. (1991). Use of an Infectious Bronchitis Virus and *Escherichia coli* Model Infection to Assess the Ability to Vaccinate Successfully Against Infectious Bronchitis Virus in the Presence of Maternal Derived Immunity. *Avian Pathology* 20: 619-626
- Davalos, D and Akassoglou, K. (2012). Fibrinogen as Key Regulator of Inflammation in Disease. *Seminars in Immunopathology* 34 : 43 – 62
- Dho-Moulin, M. and Fairbrother, J.M. (1999). Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC), *Veterinary Research*. 30: 299-316
- El-Tawab, A.A.A., Ammar, A.M., Nasef, S.A. and Reda, R.M. (2015). Prevalence of *E.coli* in Diseased Chickens with its Antibioqram Pattern. *Benha Veterinary Medical Journal* 28(2): 224 – 230
- Feldman, B.F., Zinkl, J.G., Jain, N.B. (2000). *Schalm's Veterinary Hematology*. Fifth Ed. Lippincott William and Wilkins. A Wolter Kluwer Company. Pp 38 – 43, 163 – 167, 1147 – 1153
- Gibbs, P.S., Petermann, S.R., and Wooley, R.E. (2004). Comparison of Several Challenge Models for Studies in Avian Colibacillosis. *Avian Disease* 48: 751 – 758
- Goren, E. (1991). Observation on Experimental Infection of Chicks with *Escherichia coli*. *Avian Pathology* 7 : 213-224
- Hertog, M., Feskens, E., Hollman, P., and Katan, M. (1993). Dietary Antioxidant Flavonoids and Risk of Coronary Heart Disease. The Zutphen Elderly Study. *The Lancet* 342: 1007 – 1011.
- Hirasawa, M. and Takada, K. (2004). Multiple Effects of Green Tea Catechin on the Antifungal Activity of Antimycotics Against *Candida Albicans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 53: 225 -229.
- Jankun, J., Selamn, S.H., and Swiercz, R. (1997). Why Drinking Green Tea Could Prevent Cancer. *Nature* 387: 833 – 838
- Keli, S., Hertog, M., Feskens, E. and Kromhout, D. (1995). Flavonoids, Antioxidant Vitamins and Risk of Stroke. *Archives of Internal Medicine* 154: 637 - 642
- Kumar, A., Kumar, A., Thakur, P., Patil, S., Payal, C., Kumar, A. and Sharma, P. (2012). Antibacterial Activity of Green Tea (*Camellia sinensis*) Extracts Against Various Bacteria Isolated from Environmental Sources. *Recent Research in Science and Technology* 4(1): 19 – 23
- Majid, A., Ur Rahman, M.M., Shah, J.A., Khan, K., Ali, M.A., Zamin, I., Ulah, Z., Ibrar, M. and Zaman, Q. (2013). In Vitro Antibacterial Activity of *Camellia sinensis* Leaf Extracts to some Selective Pathogenic Bacterial Strains. *International Journal of Biosciences* 3(9): 69 -75
- Matin, M.A., Islam, M.A. and Khatun, M.M. (2017). Prevalence of Colibacillosis in Chickens in Greater Mymensingh District of Bangladesh. *Veterinary World* 10 (1): 29 – 33
- Mukti, A., Rastina, Haris, A., Ismail, Darniati, Masyitha, D. (2017). Resistensi *Escherichia coli* Terhadap Antibiotik dari Daging Ayam Broiler di Pasar Rukoh. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Veteriner* 01(3): 492- 498
- Nakamura, K., Maeda, M., Imada, Y., Imada, T. and Sato, K. (1985). Pathology of Spontaneous Colibacillosis in Broiler Flock. *Veterinary Pathology* 22: 592-597
- Okubo, S., Toda, M., Hara, Y., and Shimamura, T. (1991). Antifungal and Antifungicidal Activities of Tea Extract and Catechin Against Tricophyton. *Japanese Journal of Bacteriology* 46: 509 - 514
- Ozaki, H. and Murase, T. (2009). Multiple Route of Entry for *Escherichia coli* Causing Colibacillosis in Commercial Layer Chicken. *Journal of Veterinary Medicine Science* 71(12) 1685-1689

- Padmini, E., Valarmathi, A., and Usha R. (2011). Comparative analysis of Chemical Composition and Antibacterial Activities of *Mentha spicata* and *Camellia sinensis*. *Asian Journal of Experimental Biology Science* 4: 772-778
- Paveto, C., Guida, M.C., Esteva, M.I., Martino, V., Coussio, J., Flawia, M.M. and Torres, H.N. (2004). Anti *Trypanosoma cruzi* Activity of Green Tea (*Camellia sinensis*) Catechins. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy* 48(1): 69 – 74
- Peter, W.T., Jeremy, M.T., And Poul, D.S. (2005). Antimicrobial Properties of Green Tea Cathecins. *Food Science and Technology Bulletin* 2: 71 – 81
- Rivero-Buceta E, Carrero P, and Doyaguez EG. (2015). Linear and Branched Alkyl-Esters and Amides of Gallic Acid and other (mono-, di- and tri-) Hydroxy Benzoyl Derivatives as Promising Anti-HCV Inhibitors. *European Journal of Medical Chemistry* 92:656–671.
- Ronco, T., Stegger, M., Olsen, R.H., Sekse, C., Nordstoga, A.B., Pohjanvirta, T., Lilje, B., Andersen, P.S. and Pedersen, K. (2017). Spread of Avian Pathogenic *Eschericia coli* ST 117 O78:H4 in Nordic Broiler Production. *BMC Genomic* 18(3): 2 – 8
- Roy, K., Bertelsen, M.F., Pors, S.E., Johansen, K.W., Kristensen, A.T., Kjelgaaed-Hansen, M., Andreasen, E.B., Christensen, J.P., Biswas, P.K. and Bojesen, A.M. (2014). Inflammation-induced Haemostatic Response In Layer Chickens Infected with *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidermicus* as Evaluated by Fibrinogen, Protrombin Time and Thromboelastography. *Avian Pathology* 43(4): 364 – 370.
- Sasongko, H. (2014). Uji Resistensi Bakteri *Eschericia coli* dari Sungai Boyong Kabupaten Sleman terhadap Antibiotik Amoksisilin, Kloramfenikol Sulfametoxazol, dan Streptomisin. <http://www.researchgate.net/publication/319107630>:2 - 17
- Saif, Y.M., Barnes, J.R., Glisson, A.M., Fadly, L.R., McDougald and Swayne, D.E. (2003). *Disease of Poultry* 11<sup>th</sup> ed., Iowa State University Press, Iowa.
- Segneanu, A.,E., Vlatanescu, N., Vaszilesin, C. And Macarrie, C.A. (2012). Antioxidant Capacity of *Camellia sinensis* extracts. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* 2: 729 -736
- Weiss, D.J. and Wardrop, K.J. (2010). *Schalm's Veterinary Hematology*. Singapore. Blackwell
- Whiteman, C.E., Bickford, A.A. and Barnes, H.J. (1989). *Avian disease Manual*, 3<sup>rd</sup> ed. Dubuque, 1 A : Kendall/Hunt
- Yamaguchi K, Honda M, Ikigai H, Hara Y, and Shimamura T. (2002). Inhibitory Effects of (-)-Epigallocatechin Gallate on the Life Cycle of Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1). *Antiviral Research*. 53:19–34
- Yassin, A. K., Gong, J., Kelly, P., Lu, G., Guardabassi, L., Wei, L., Han, X., Qiu, H., Price, S., Cheng, D. and Wang, C. (2017). Antimicrobial Resistance in Clinical *Eschericia coli* Isolates from Poultry and Livestock, China. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371:1-5>
- Zhao, S., Maurer, J.J., Hubert, S., DeVillena, J.F., McDermott, P.F., Meng, J., Ayers, S., English, I., and White, D.G. (2005). Antimicrobial Susceptibility and Molecular Characterization of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Isolates. *Veterinary Microbiology* 107: 218 -224



## **Peluang Imbuhan Pakan Herbal-Probiotik Komersial “Promix®” sebagai Pengganti Antibiotic Growth Promoter (AGP) pada Ayam Pedaging yang Diberi Vaksin ND**

### ***The Opportunities of Feed Additif of Commercial Herbal-Probiotic "Promix®" Feed as a Substitute for Antibiotic Growth Promoter (AGP) in Broilers Given ND Vaccines***

Agnesia Endang Tri Hastuti Wahyuni<sup>1\*</sup>, Vinsa Cantya Prakasita<sup>2</sup>, Thomas Emanuel Manggotu Nahak<sup>2</sup>, Agustina Viktoria Tae<sup>2</sup>, Jeffi Chandra Ajiguna<sup>2</sup>, Sruti Listra Adrenalin<sup>2</sup>, Lynda Nugrahaning Imanjati<sup>2</sup>, Ima Fuaziah<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada,  
Jl. Fauna 2 Karangmalang, Depok, Sleman, Yogyakarta 55281

<sup>2</sup>Magister Sains Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada,  
Jl. Fauna 2 Karangmalang, Depok, Sleman, Yogyakarta 55281  
Yogyakarta

\*Email: [wahyuni\\_aeth@mail.ugm.ac.id](mailto:wahyuni_aeth@mail.ugm.ac.id); [wahyuni\\_aeth@yahoo.com](mailto:wahyuni_aeth@yahoo.com)

Naskah diterima: 8 Agustus 2019, direvisi: 12 November 2019, disetujui: 30 November 2019

#### **Abstract**

With the prohibition of the use of Antibiotic growth promoters (AGP) used in animal feed, especially in broilers, the use of feed additives such as herbs, probiotics, prebiotics, synbiotics or mixtures of some of these ingredients is currently widely used as feed replacements for AGP substitutes. One of the commercial feed additives that contain combinations herbal and probiotics is Promix®. In broiler maintenance, one vaccine that must be given is Newcastle Disease (ND) vaccine. The purpose of this study was to determine the role of supplementation of commercial feed combination of herbs and probiotics in broilers given ND vaccines. A total of 42 broilers were divided into two, group A (vaccinated with ND) and B (not vaccinated ND), each with 21 heads. Group A is divided into groups A1, A2 and A3 each with 7 heads. The A1 group is given only basal feed; A2 basal feed and AGP; A3 basal feed and Promix®. Group B is divided by B1, B2 and B3 same as group A before. Broilers are maintained for 5 weeks and weighing each week. All data obtained were statistically analyzed using One Way ANOVA and continued with Duncan's post hoc test. The results of this study were that the group of chickens given the ND vaccine and given supplements of Promix® had greater weight gain ( $P < 0.05$ ) compared to the AGP and basal groups in the fifth week while in the group of chickens that were not given the ND vaccine but given supplement Promix® feed had greater weight gain ( $P < 0.05$ ) compared to the AGP and basal groups in the fourth week. In the fifth week there was no significant difference ( $P < 0.05$ ) between all feed groups in the group not given the ND vaccine. The conclusion of this study that feed additives contain combinations herbal and probiotics can replace AGP as feed additive in broiler. By giving ND vaccine the weight gain of the feed group plus Promix® showed a significant increase in weight gain.

**Key words:** AGP; herbal; ND vaccines; probiotic; weight gain

#### **Abstrak**

Dengan adanya pelarangan penggunaan *Antibiotic growth promoters* (AGP) yang digunakan dalam pakan ternak terutama pada broiler, maka penggunaan imbuhan pakan seperti herbal, probiotik, prebiotik, sinbiotik ataupun campuran antara beberapa bahan tersebut dewasa ini banyak digunakan sebagai imbuhan pakan pengganti AGP. Salah satu imbuhan pakan komersial yang mengandung kombinasi herbal dan probiotik adalah Promix®. Dalam pemeliharaan broiler, salah satu vaksin yang harus diberikan adalah vaksin *Newcastle Disease* (ND). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui peran imbuhan pakan komersial kombinasi herbal dan probiotik pada broiler yang diberikan vaksin ND. Sebanyak 42 ekor broiler dibagi menjadi dua yaitu kelompok A (dilakukan vaksinasi ND) dan B (tidak dilakukan vaksinasi ND) masing-masing 21 ekor. Kelompok A dibagi kelompok A1, A2 dan A3 masing-masing 7 ekor. Kelompok A1 diberi pakan basal saja; A2 pakan basal dan

AGP; A3 pakan basal dan Promix®. Kelompok B dibagi B1, B2 dan B3 sama dengan kelompok A sebelumnya. Broiler dipelihara selama 5 minggu dan dilakukan penimbangan berat-badan setiap minggunya. Semua data yang diperoleh dianalisis secara statistik menggunakan *One Way ANOVA* dan dilanjutkan dengan uji *post hoc Duncan*. Hasil dari penelitian ini adalah bahwa kelompok ayam yang diberi vaksin ND dan diberi imbuhan pakan Promix® memiliki pertambahan berat badan yang lebih besar ( $P<0.05$ ) dibandingkan dengan kelompok AGP maupun basal pada minggu kelima sedangkan pada kelompok ayam yang tidak diberi vaksin ND namun diberi imbuhan pakan Promix® memiliki pertambahan berat badan yang lebih besar ( $P<0.05$ ) dibandingkan dengan kelompok AGP maupun basal pada minggu keempat. Pada minggu kelima tidak ada perbedaan signifikan ( $P<0.05$ ) antara semua kelompok pakan pada kelompok yang tidak diberi vaksin ND. Kesimpulan dari penelitian ini adalah bahwa imbuhan pakan kombinasi herbal dan probiotik dapat menggantikan AGP sebagai imbuhan pakan pada broiler. Dengan pemberian vaksin ND pertambahan berat badan kelompok pakan yang ditambah Promix® menunjukkan peningkatan pertambahan berat badan yang signifikan.

**Kata kunci :** AGP; herbal; pertambahan berat badan; probiotik; vaksin ND

### Pendahuluan

Imbuhan pakan adalah bahan yang dicampur dalam pakan ternak yang dapat memengaruhi kesehatan, produktivitas, dan kondisi gizi hewan ternak. Imbuhan pakan sudah umum digunakan dalam industri perunggasan yaitu antibiotik dimana paling luas penggunaannya di seluruh dunia. Penggunaan antibiotik sebagai pemacu pertumbuhan atau yang biasa disebut dengan istilah *antibiotic growth promotor* (AGP) memiliki dampak negatif seperti residu dalam jaringan, resistensi antimikroba dan resistensi silang dalam terapi antimikroba (Mehdi *et al.*, 2018). Oleh karena itu, di Indonesia melalui Peraturan Menteri Pertanian Republik Indonesia Nomor 14/PERMENTAN/PK.350/5/2017 secara resmi telah melarang penggunaan AGP untuk imbuhan pakan ternak yang produknya dikonsumsi manusia.

Adanya pelarangan penggunaan AGP sebagai imbuhan pakan pada ternak menyebabkan peralihan penggunaan imbuhan pakan lain selain antibiotik seperti probiotik, prebiotik, sinbiotik, herbal dan beberapa jenis enzim baik dalam bentuk tunggal maupun gabungan antara beberapa jenis imbuhan pakan tersebut. Promix® merupakan salah satu jenis imbuhan pakan komersial yang merupakan campuran antara probiotik dan herbal. Probiotik merupakan mikroorganisme hidup yang bila diberikan dalam jumlah yang cukup memberikan manfaat kesehatan pada host (Mousavi *et al.* 2018). Pemberian probiotik pada broiler dapat meningkatkan pertambahan berat badan, memperbaiki FCR dan meningkatkan pencernaan makanan (Bai *et al.*, 2012; Nikpiran *et al.*, 2013). Penggunaan herbal seperti jahe (*Zingiber officinale*) pada broiler dapat memberikan efek positif pada performa broiler (Mohamed *et al.*, 2012).

Penelitian secara *in vitro* menggunakan kombinasi probiotik dan herbal yang dilakukan oleh Prakasita *et al.* (2019) menunjukkan bahwa beberapa jenis herbal dapat mendukung pertumbuhan dari probiotik.

*Newcastle Disease* (ND) merupakan suatu penyakit pernapasan dan sistemik, yang bersifat akut dan mudah sekali menular, yang disebabkan oleh virus dan menyerang berbagai jenis unggas terutama ayam. Di Indonesia, ND dapat ditemukan pada peternakan broiler dan layer maupun ayam kampung (buras) di berbagai daerah di seluruh penjuru tanah air, terutama daerah yang padat peternakan ayam (Tabbu, 2000). Oleh karena itu, dalam pemeliharaan broiler tindakan pencegahan seperti program vaksinasi menggunakan vaksin ND sangatlah penting terutama untuk menghasilkan titer antibodi yang bersifat protektif agar bisa mencegah infeksi virus ND.

Penelitian mengenai pemanfaatan imbuhan pakan komersial Promix® sebagai alternatif pengganti AGP pada broiler yang kemudian diberikan vaksin ND belum pernah dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui peran Promix® sebagai alternatif pengganti AGP pada broiler yang diberi vaksin ND.

### Materi dan Metode

Hewan percobaan yang dipakai dalam penelitian ini adalah broiler strain *cobb* sebanyak 42 ekor. Kandang ayam dengan semua fasilitas pemeliharaan disiapkan dan didesinfeksi. *Day old chicken* (DOC) broiler tersebut dibagi menjadi dua yaitu kelompok A (dilakukan vaksinasi ND) dan B (tidak dilakukan vaksinasi ND) masing-masing 21 ekor. Kelompok A dibagi kelompok A1, A2 dan A3 masing-masing 7 ekor. Kelompok A1 diberi pakan basal saja; A2 pakan basal dan AGP; A3 pakan basal dan Promix®. Kelompok

B dibagi B1, B2 dan B3 sama dengan kelompok A sebelumnya.

Pemeliharaan dilakukan selama 5 minggu. Pemberian imbuhan pakan pada broiler dilakukan dari awal pemeliharaan sampai akhir pemeliharaan. Pencampuran pakan basal dengan AGP dan Promix® dilakukan secara manual sesuai dengan dosis anjuran yang tertera pada bungkus produk. Air minum yang digunakan adalah air mineral RO (air mineral yang dibuat menggunakan teknologi Reverse Osmosis). Selama penelitian pemberian pakan dan air minum dilakukan secara *ad libitum*.

Komposisi detail dari pakan basal seperti formulasi dasar yang direkomendasikan oleh *Cobb Broiler Management Guide*. Imbuhan pakan komersial Promix® mengandung probiotik (*Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces cerevisiae*) dan herbal (*Zingiber officinale*, *Curcuma xanthorrhiza*, *Curcuma aeruginosa*, *Curcuma domestica*, *Kaempferia galanga*). Antibiotic growth promotor (AGP) yang digunakan adalah enramicyn.

Pemberian vaksinasi ND dilakukan sebanyak 2 kali yaitu vaksinasi dengan vaksin gabungan *Newcastle disease-infectious bronchitis (ND-IB) live* tetes mata pada hari ke-7 dan pemberian vaksin ulangan (*booster*) diberikan pada umur ke-18 hari menggunakan vaksin ND *killed* melalui injeksi subkutan. Penimbangan berat badan dilakukan setiap minggu selama pemeliharaan dan kemudian dilakukan perhitungan

pertambahan berat badan. Data pertambahan berat badan masing-masing ayam pada setiap kelompok kemudian dirata-ratakan sehingga diperoleh rata-rata pertambahan berat badan setiap kelompok.

Hasil perhitungan pertambahan berat badan setiap minggu dari masing-masing kelompok kemudian dilakukan uji normalitas dan homogenitas yang selanjutnya dilanjutkan dengan uji *One Way ANOVA* pada program SPSS 24. Hasil uji *One Way ANOVA* yang menunjukkan ada perbedaan yang signifikan kemudian dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Duncan*.

### Hasil dan Pembahasan

Peran kombinasi herbal-probiotik pada imbuhan pakan komersial Promix® terhadap pertambahan berat badan broiler selama 5 minggu pemeliharaan baik dari kelompok yang diberi vaksin ND maupun kelompok yang tidak diberi vaksin ND dapat dilihat pada Tabel 1 dan Tabel 2.

Berdasarkan data pada Tabel 1. pada kelompok yang diberi vaksin ND dapat dilihat bahwa pertambahan berat badan dari minggu pertama sampai minggu ketiga dari masing-masing kelompok pakan tidak terdapat perbedaan yang signifikan ( $P < 0.05$ ). Sedangkan pada minggu keempat dan kelima pertambahan berat badan dari masing-masing kelompok pakan terlihat adanya perbedaan yang signifikan. Pada minggu keempat kelompok yang diberi imbuhan pakan Promix® memiliki pertambahan berat badan yang terendah jika dibandingkan dengan kelompok yang

Tabel 1. Pertambahan berat badan broiler kelompok yang divaksin ND selama 5 minggu pemeliharaan

Kelompok Pakan	Pertambahan Berat Badan (g)				
	Minggu 1	Minggu 2	Minggu 3	Minggu 4	Minggu 5
Basal	87.66 <sup>a</sup>	285.66 <sup>a</sup>	445.4 <sup>a</sup>	485.6 <sup>a</sup>	509 <sup>a</sup>
Basal+AGP	90.5 <sup>a</sup>	297.16 <sup>a</sup>	446.16 <sup>a</sup>	488.16 <sup>a</sup>	548.16 <sup>a</sup>
Basal+Promix®	93.33 <sup>a</sup>	327.33 <sup>a</sup>	452.66 <sup>a</sup>	275.16 <sup>b</sup>	829.8 <sup>b</sup>

<sup>ab</sup> Superskrip yang berbeda pada setiap baris menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $P < 0.05$ )

Tabel 2. Pertambahan berat badan broiler kelompok yang tidak diberi divaksin ND selama 5 minggu pemeliharaan

Kelompok Pakan	Pertambahan Berat Badan (g)				
	Minggu 1	Minggu 2	Minggu 3	Minggu 4	Minggu 5
Basal	97.2 <sup>a</sup>	310.8 <sup>a</sup>	460.6 <sup>a</sup>	335.8 <sup>a</sup>	585.4 <sup>a</sup>
Basal+AGP	114.5 <sup>a</sup>	350.83 <sup>a</sup>	458.3 <sup>a</sup>	430.6 <sup>ab</sup>	549.6 <sup>a</sup>
Basal+Promix®	94.66 <sup>a</sup>	307.6 <sup>a</sup>	466.6 <sup>a</sup>	484.6 <sup>b</sup>	500.8 <sup>a</sup>

<sup>ab</sup> Superskrip yang berbeda pada setiap baris menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $P < 0.05$ )

diberi pakan basal maupun imbuhan AGP, namun pada minggu kelima terjadi peningkatan secara signifikan pada kelompok yang diberi pakan Promix® dimana memiliki penambahan berat badan yang terbesar jika dibandingkan dengan kelompok pakan basal atau imbuhan AGP.

Pada Tabel 2. kelompok yang tidak diberi vaksin ND dari minggu pertama sampai minggu ketiga dan pada minggu kelima tidak terdapat perbedaan yang signifikan ( $P < 0.05$ ) antara masing-masing kelompok pakan, namun pada minggu keempat terdapat perbedaan yang signifikan dimana penambahan berat badan kelompok yang diberi imbuhan Promix® memiliki penambahan berat badan lebih besar dibandingkan dengan kelompok pakan yang diberi pakan basal dan dan imbuhan AGP.

Hasil studi ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Yadav *et al.* (2018) dimana pemberian probiotik *Bacillus subtilis* dapat meningkatkan berat badan secara signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Penelitian yang dilakukan oleh Peric *et al.* (2010) juga mengungkapkan bahwa pemberian probiotik (*Lactobacillus reuteri*, *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium animalis*, *Pediococcus acidilactici* dan *Lactobacillus salivarius*) secara signifikan dapat meningkatkan berat badan. Lebih lanjut penelitian yang dilakukan oleh Silva *et al.* (2011) juga menyatakan bahwa pemberian probiotik (*Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus faecium*, *Bifidobacterium bifidum*) memiliki penambahan berat badan yang lebih besar dibandingkan dengan pemberian antibiotik (flavomycin, halquinol). Penelitian menggunakan herbal (*Zingiber officinale*) pada pakan broiler juga dapat meningkatkan palatabilitas dan pencernaan sehingga dapat meningkatkan berat badan (Zang *et al.*, 2009; Herawati, 2010; Mohamed *et al.*, 2012; Kafi *et al.*, 2017)

Kombinasi probiotik dan herbal yang terkandung di dalam imbuhan pakan Promix® memiliki efek sinergistik. Efek sinergistik ini digambarkan dari hasil penelitian yang diperoleh dimana pemberian Promix® dapat meningkatkan penambahan berat badan. Hal ini didukung oleh penelitian secara *in vitro* yang dilakukan oleh Prakasita *et al.* (2019) yang membuktikan bahwa bakteri probiotik *Lactobacillus acidophilus* dan *L. brevis* didukung pertumbuhannya pada media yang mengandung ekstrak temulawak, jahe merah dan kunyit.

Pemberian vaksin ND merupakan program rutin yang dilakukan pada tingkat peternakan. Probiotik dan herbal memiliki efek imunomodulator sehingga dapat meningkatkan titer antibodi terhadap ND. Beberapa penelitian sebelumnya yang menggunakan herbal (*Curcuma longa*) (Zaki *et al.*, 2016) dan probiotik (*Lactobacillus*, *Streptococcus* dan *Bifidobacterium*) (Talazadeh *et al.*, 2016) dapat meningkatkan titer antibodi HI terhadap ND. Efek imunomodulator yang dimiliki oleh probiotik dan herbal ini kemungkinan menyebabkan kelompok yang diberi imbuhan pakan Promix® memiliki status imun yang baik sehingga dapat mendukung tercapainya performa yang maksimal.

### Kesimpulan

Imbuhan pakan komersial Promix® dapat menggantikan AGP sebagai imbuhan pakan pada broiler dimana Promix® dapat meningkatkan penambahan berat badan yang lebih besar dibandingkan dengan kelompok pakan basal dan AGP. Dengan pemberian vaksin ND penambahan berat badan meningkat secara signifikan sampai minggu kelima pemeliharaan.

### Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada yang telah memberikan Dana Hibah Penelitian Kompetitif Fakultas tahun 2018, sehingga penelitian ini dapat terlaksana dengan baik.

### Daftar Pustaka

- Bai, S.P., Wu, A.M., Ding, X.M., Lei, Y., Bai, J., Zhang, K.Y. and Chio, J.S. (2012). Effects of probiotic-supplemented diets on growth performance and intestinal immune characteristics of broiler chickens. *Poult. Sci.* 92: 663-670.
- Herawati. (2010). The Effect of feeding red ginger as phytobiotic on body weight gain, feed conversion and internal organs condition or broiler. *Int. J. Poult. Sci.* 9: 963-967.
- Kafi, A., Uddin, M.N., Uddin, M.J., Khan, M.M.H. and Haque, M.E. (2017). Effect of Dietary Supplementation of Turmeric (*Curcuma longa*), Ginger (*Zingiber officinale*) and their Combination as Feed Additives on Feed Intake, Growth Performance and Economics of Broiler. *Int. J. Poult. Sci.* 16(7): 257-265.

- Mehdi, Y., Letourneau-Montminy, M.P., Gaucher, M.L., Chorfi, Y., Suresh, G., Rouissi, T., Brar, S.K., Cote, C., Ramirez, A.A. and Godbout, S. (2018). Use of antibiotics in broiler production: Global impacts and alternatives. *Anim. Nutr.* 4: 170-178.
- Mohamed, A.B., Mohammed, A.M., Al-Rubaei and Jalil, A.Q. (2012). Effect of Ginger (*Zingiber officinale*) on Performance and Blood Serum Parameters of Broiler. *Int. J. Poult. Sci.* 11(2): 143-146.
- Mousavi, S.M.A.A., Hosseini, H.M. and Mirhosseini, S.A. (2018). A Review of Dietary Probiotics in Poultry. *J. Appl. Biotechnol. Rep.* 5(2): 48-54.
- Nikpiran, H., Taghavi, M., Khodadadi, A. and Athari, S.S. (2013). Influence of Probiotic and Prebiotic on broiler chickens performance and immune status. *Journal of Novel Applied Sciences.* 2(8):256-259.
- Perić, L., Milošević, N., Žikić, D., Bjedov, S., Cvetković, D., Markov, S., Mohnl, M. and Steiner, T. (2010). Effects of probiotic and phytogenic products on performance, gut morphology and cecal microflora of broiler chickens. *Archiv Tierzucht.* 53(3): 350-359.
- Prakasita, V.C., Asmara, W., Widyarini, S and Wahyuni, A.E.T.H. (2019). Combination of herbs and probiotics as an alternative growth promoter: An in vitro study. *Vet. World.* 12(4): 614-620.
- Silva, W.T.M., Nunes, R.V. and Pozza, P.C. (2011). Evaluation of inulin and probiotic for broiler chickens. *Acta Scientiarum Animal Sciences.* 33(1): 19-24.
- Tabbu, C.R. (2000). Penyakit Ayam dan Penanggulangannya Volume 1. Kanisius. Yogyakarta: 164-186.
- Talazadeh, F., Mayahi, M. and Zeinali, S. 2016. The effect of Aquablend Avian probiotic ® including *Lactobacillus*, *Streptococcus* and *Bifidobacterium* on systemic antibody response against Newcastle and Influenza disease vaccine in broiler chickens. *Int. J. Enteric. Pathog.* 4(2):e35689.
- Yadav, M., Dubey, M., Yadav, M. and Shankar, K.S. 2018. Effect of Supplementation of Probiotic (*Bacillus subtilis*) on Growth Performance and Carcass Traits of Broiler Chickens. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 7: 4840-4849.
- Zaki, M.M., El-Ghany, W.A.A., Hady, M.M. and Korany, R.M.S. (2016). Effect of Certain Phytobiotics on the Immune Response of Newcastle Disease Vaccinated Broiler Chickens. *Asian J. Poult. Sci.* 10: 134-140.
- Zang, G.F., Yang, Z.B., Wang, Y., Yang, W.R., Jiang, S.Z. and Gai, G.S. (2009). Effect of ginger root (*Zingiber officinale*) processed to different particle size on growth performance, antioxidant status and serum metabolites of broiler chickens. *Poult. Sci.* 88: 2159-2166.

## Deteksi Kejadian Residu Tetrasiklin pada Daging Ikan Nila di Kota Yogyakarta dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

### *Detection of Tetracycline Residue on Tilapia Meat in Kota Yogyakarta using High Performance Liquid Chromatography (HPLC)*

Wari Pawestri<sup>1</sup>, Gagak Donny Satria<sup>†2</sup>, Nisa Hakimah<sup>3</sup>, Doddi Yudhabuntara<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret, Jl. Ir Sutami No.36 A, Pucangsawit, Jebres, Surakarta, Jawa Tengah 57126

<sup>2</sup>Departemen Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Jl. Fauna 2 Karangmalang, Depok, Sleman, Yogyakarta

<sup>3</sup>Program Studi Teknik Penanganan Patologi Perikanan, Politeknik Kelautan dan Perikanan Sidoarjo, Jl. Raya Buncitan, Gedangan, Dusun Kp. Baru, Buncitan, Sidoarjo, Jawa Timur 61254

<sup>4</sup>Departemen Kesehatan Masyarakat Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Jl. Fauna 2 Karangmalang, Depok, Sleman, Yogyakarta

<sup>†</sup>Email: wari.pawestri@staff.uns.ac.id

Naskah diterima: 31 Maret 2018, direvisi: 21 Januari 2019, disetujui: 30 November 2019

#### Abstract

Food products of animal origin which are free from biological and chemical contamination are an absolute requirement of food safety. Antibiotics residues in the food of animal origin is one of the chemical contaminants in food are harmful/hazardous to human health. Tetracycline is an antibiotic that is often used in the fishing industry. The study aims to detect the occurrence of tetracycline residues in tilapia sold in traditional markets in Kota Yogyakarta. The research was conducted with detection test (detect disease). The study used 61 samples of tilapia fish from 16 traditional markets in Kota Yogyakarta. Tilapia meat samples are prepared according to the *Association of Official Analytical Chemistry* (AOAC). The existence of tetracycline residues in meat can be detected by high performance liquid chromatography (HPLC). Residue analysis in fish meat was conducted at the Department of Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine of Gadjah Mada University using HPLC Shimadzu version 6.1. The results showed that 24 samples of tilapia meat marketed in Kota Yogyakarta was positively contained tetracycline antibiotic residues. A total of 19 samples contained residues above maximum residue limits (MRL). The conclusion of the study is 31% of tilapia marketed in Kota Yogyakarta contains tetracycline residues above MRL. Surveillance of residues in food of animal origin and further research in terms of reducing antibiotic residue in tilapia meat is highly recommended to improve the quality and safety of food of animal origin.

**Key words:** HPLC; meat; residue; tetracycline; tilapia

#### Abstrak

Produk pangan asal hewan yang bebas dari cemaran biologi dan kimia merupakan syarat mutlak keamanan pangan asal hewan. Keberadaan residu antibiotik dalam pangan asal hewan merupakan salah satu cemaran kimia yang membahayakan kesehatan manusia. Tetrasiklin adalah antibiotik yang sering digunakan pada industri perikanan. Penelitian bertujuan untuk mendeteksi kejadian residu tetrasiklin pada ikan nila yang dipasarkan di pasar tradisional Kota Yogyakarta. Penelitian menggunakan 61 sampel ikan nila dari 16 pasar tradisional di Kota Yogyakarta. Sampel daging ikan nila dipreparasi berdasarkan standar *Association of Official Analytical Chemistry* (AOAC). Keberadaan residu tetrasiklin dalam daging ikan nila dapat diperiksa dengan alat kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Analisis residu pada daging ikan dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada dengan menggunakan KCKT Shimadzu versi 6.1. Hasil analisis menunjukkan bahwa 24 sampel daging ikan nila yang dipasarkan di Kota Yogyakarta terdeteksi mengandung

residu antibiotik tetrasiklin. Sebanyak 19 sampel mengandung residu di atas batas maksimum residu (BMR). Kesimpulan dari penelitian bahwa 31% ikan nila yang dipasarkan di Kota Yogyakarta positif mengandung residu antibiotik tetrasiklin di atas BMR. Pengawasan residu dalam pangan asal hewan dan penelitian lanjutan terkait upaya pengurangan residu pada daging ikan nila sangat disarankan untuk meningkatkan mutu dan keamanan pangan asal hewan.

**Kata kunci:** daging; KCKT; nila; residu; tetrasiklin

## Pendahuluan

Indonesia sebagai negara maritim dengan dua pertiga bagian perairan memegang peranan penting dalam penyedia produk pangan asal hewan terutama ikan. Ikan nila merupakan salah satu komoditas ikan air tawar yang banyak dibudidayakan di Indonesia. Ikan nila menjadi primadona karena mudah dipelihara, tahan terhadap lingkungan buruk, laju pertumbuhan cepat, daging tebal dan padat, kandungan gizi tinggi (protein 52,46%), serta harga terjangkau (Ardita dkk., 2015). Tingkat konsumsi ikan di Indonesia terus meningkat seiring dengan peningkatan kesadaran masyarakat terhadap manfaat mengonsumsi ikan (Kementerian Kelautan dan Perikanan, 2016).

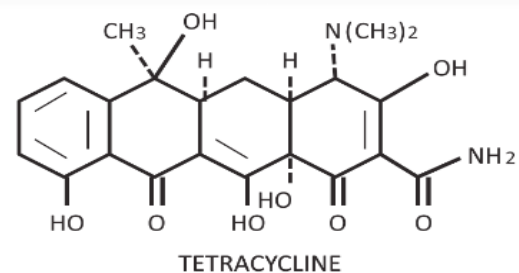
Angka konsumsi ikan di Daerah Istimewa Yogyakarta tahun 2017 sebesar 23,75 kg per kapita. Angka tersebut mengalami peningkatan dari tahun sebelumnya yaitu sebesar 23,10 kg per kapita pada tahun 2016 dan sebesar 23,07 kg per kapita tahun 2015 (Kementerian Kelautan dan Perikanan, 2018). Ikan lele, ikan nila, dan ikan gurami merupakan ikan budi daya yang dominan dikonsumsi masyarakat Kota Yogyakarta. Produksi ikan nila di Yogyakarta mencapai 21.000 ton dari total produksi sebesar 36.280 ton (Nurwigati, 2017).

Peningkatan konsumsi ikan harus diimbangi dengan peningkatan mutu dan keamanan pangan. Menurut Peraturan Pemerintah Nomor 28 tahun 2004, pangan yang aman, bermutu, dan bergizi sangat penting peranannya bagi pertumbuhan, pemeliharaan, peningkatan derajat kesehatan, serta peningkatan kecerdasan masyarakat. Persyaratan keamanan pangan harus dipenuhi untuk melindungi masyarakat dari pangan yang merugikan dan membahayakan kesehatan, baik karena cemaran biologis, kimia, maupun benda lain yang dapat mengganggu, merugikan, dan membahayakan kesehatan manusia (Republik Indonesia, 2004).

Residu antibiotik merupakan salah satu cemaran kimia dalam pangan yang mengancam kesehatan

manusia (Dewi dkk., 2014). Ancaman tersebut meliputi efek toksik, keracunan, gangguan pencernaan, gagalnya pengobatan akibat resistensi, dan gangguan mikroflora dalam saluran pencernaan (Yuningsih, 2004; Anastasia, 2011; dan Dasenaki dan Thomaidis, 2015). Masalah residu antibiotik erat kaitannya dengan penggunaan antibiotik tanpa pengawasan dan tidak terkontrol yang mengakibatkan akumulasi antibiotik pada jaringan/organ hewan (Lukistyowati dan Syawal, 2013). Tetrasiklin merupakan antibiotik yang banyak digunakan (60% dari keseluruhan pemakaian antibiotik) pada budi daya perikanan (Sekkin dan Cavit, 2011) sebagai pencegahan, terapi, dan peningkatan laju pertumbuhan (Yuningsih, 2004; Canada dkk., 2009; Evaggelopoulou dan Samanidou, 2013). Tetrasiklin banyak digunakan karena memiliki spektrum luas yang berperan melawan bakteri Gram positif dan Gram negatif serta memiliki harga terjangkau (Orlando dan Samionato, 2013).

Tetrasiklin merupakan basa yang sukar larut dalam air, tetapi bentuk garam natrium atau garam HCl-nya mudah larut. Tetrasiklin memiliki rumus molekul  $C_{22}H_{24}N_2O_8$  dengan berat molekul 444,44 g/mol (Wang dkk., 2012). Struktur kimia tetrasiklin ditunjukkan pada Gambar 1. Potensi tetrasiklin berkurang dalam larutan dengan pH kurang dari/sama dengan dua ( $\leq 2$ ) dan mudah rusak dalam larutan alkali hidroksida. Kelarutan tetrasiklin dalam air sebesar 1,7 mg/ml dan kelarutan dalam metanol lebih dari 2 mg/ml pada suhu 28°C (Wang dkk., 2012).



Gambar 1. Struktur kimia tetrasiklin (Griffin dkk., 2010)

Batas maksimum residu tetrasiklin yang ditetapkan oleh Badan Standardisasi Nasional (2000) untuk daging adalah 0,1 mg/kg. Menurut Orlando dan Samionato (2013) batas maksimum residu (BMR) tetrasiklin pada daging ikan adalah 2 mg/kg. *Codex Alimentarius Commission* (2017) menentukan BMR untuk golongan tetrasiklin sebesar 200 µg/kg pada daging ikan.

Keberadaan residu obat hewan terutama antibiotik pada produk pangan asal hewan telah banyak dilaporkan. Penelitian yang dilakukan oleh Nurhasnawati dkk. (2016) menyatakan bahwa sampel ikan air tawar di Pasar Segiri, Samarinda, Kalimantan Timur mengandung residu tetrasiklin. Barani dan Fallah (2015) melakukan penelitian terhadap ikan trout di Iran dan terdeteksi 86 dari 138 sampel mengandung residu tetrasiklin.

Berkaitan dengan hal tersebut, pengawasan residu terhadap pangan asal hewan sangat penting sebagai upaya menghasilkan pangan yang aman dikonsumsi masyarakat. Salah satu cara yang dapat dilakukan adalah dengan mendeteksi kejadian residu dalam produk perikanan, terutama dari kegiatan budi daya (akuakultur). Keberadaan residu antibiotik golongan tetrasiklin dalam bahan pangan perlu dideteksi secara akurat, efektif, dan efisien. Kromatografi cair kinerja tinggi merupakan teknologi pemisahan senyawa yang memiliki kecepatan, kepekaan, dan ketelitian tinggi (Rohman, 2009).

Penelitian bertujuan untuk mendeteksi kejadian residu tetrasiklin pada ikan nila yang dipasarkan di Kota Yogyakarta. Hasil penelitian yang diperoleh diharapkan dapat meningkatkan kesadaran dan kepedulian masyarakat terhadap masalah-masalah keamanan pangan serta meningkatkan mutu dan status keamanan pangan asal hewan.

### Materi dan Metode

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada pada bulan Januari sampai dengan bulan Februari 2018. Penelitian lapangan dilakukan dengan mendeteksi kejadian residu tetrasiklin pada ikan nila yang diedarkan di pasar tradisional Kota Yogyakarta.

Sampel ikan nila sebanyak 61 ekor dengan berat antara 350-450 g dari 16 pasar tradisional di Kota Yogyakarta digunakan dalam penelitian ini. Bahan lain yang digunakan dalam penelitian adalah *methanol* (*methyl alcohol*, *HPLC grade*, J.T. Baker),

*acetonitrile* (*HPLC grade*, *Macron*), *Oxalic acid, crystal* ( $\text{HOCOCOOH} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (J.T. Baker), *di-Sodium hydrogen phosphate* ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (Merck, Germany), *Citric acid monohydrate* (Merck, Germany), *Titriplex III* ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) (*ethylenedinitrilo-tetraacetic acid*, Merck, Germany), dan *aquabidestilata sterile proinjection* (PT. Ikapharmindo Putramas, Jakarta, Indonesia).

Alat yang digunakan untuk menganalisis residu antibiotik tetrasiklin adalah seperangkat alat kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) di Laboratorium Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada merek Shimadzu 6.1 dengan *system control* SCL-10A VP, *detector* UV-Vis SPD 10-AV VP, pompa LC-10AD VP, *degasser* DGU-14A, oven CTO-10AC VP dan kolom  $\text{C}_{18}$  Clipseus, *syringe* 25F-LC, sumber energi (*power supply*), wadah fase gerak, dan komputer. Alat penunjang yang digunakan adalah *ultrasonic bath* (Elma), labu ukur (Pyrex), timbangan digital (Ohaus), spatula, gelas ukur, gelas beaker, labu erlenmeyer (Pyrex), *vortex mixer* (Maxi Mix II), *sentrifuse* (PLC series), pisau, talenan, kertas perkamen, kertas saring, rak tabung, batang pengaduk, sendok tanduk, tabung konikal atau tabung sentrifus, *timer*, dan plastik silk. Pengambilan sampel lapangan menggunakan kantong plastik, label, alat tulis, selotip, dan lembar kuesioner.

Besar sampel minimal ikan nila dalam penelitian dihitung dengan menggunakan rumus *detect disease*  $n = [1 - (1-a)^{1/D}] [N - (D-1)/2]$  dengan asumsi prevalensi residu tetrasiklin sebesar 30% (Olatoye dan Afisu, 2013) dan tingkat kepercayaan 95%. Jumlah sampel ikan nila yang diambil (*n*) minimal delapan (8) ekor. Unit terkecil dalam penelitian adalah penjual ikan dan sampel ikan sejumlah satu (1) ekor dari setiap penjual dipilih secara random. Penelitian menggunakan 61 sampel ikan nila dari 61 penjual di 16 pasar tradisional di Kota Yogyakarta.

Sampel daging ikan nila dipreparasi sebelum dianalisis dengan alat kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Preparasi jaringan yang dilakukan berdasarkan standar *Association of Official Analytical Chemistry* (AOAC) internasional untuk golongan tetrasiklin.

Sampel jaringan ikan nila seberat 1 g dihaluskan dan dimasukkan ke dalam tabung konikal I. Tabung konikal I ditambah dengan 5 ml bufer McIlvaine dan dihomogenkan dengan menggunakan *vortex mixer* selama 30 detik. Tabung konikal I ditambah dengan 4 ml bufer McIlvaine selanjutnya dihomogenkan dengan



*vortex mixer* selama 30 detik dan disentrifus 10 menit 2500 g. Supernatan dari tabung konikal I disaring ke dalam tabung konikal II. Homogenat tabung konikal I ditambah dengan 4 ml bufer McIlvaine selanjutnya dihomogenkan dengan *vortex mixer* selama 30 detik dan disentrifus 10 menit 2500 g. Supernatan dari tabung konikal I disaring kembali ke dalam tabung konikal II. Tabung konikal I ditambahkan dengan 2 ml bufer McIlvaine, dihomogenkan, dan disentrifus (*vortex mixer* selama 30 detik, sentrifus 10 menit 2500 g). Supernatan ditambahkan kembali ke tabung konikal II. Tabung konikal II disentrifus selama 20 menit 2500 g. Supernatan kolektif tabung konikal II disaring ke tabung konikal I yang telah dicuci dan disterilkan.

Larutan bufer McIlvaine merupakan larutan yang digunakan dalam preparasi sampel jaringan ikan nila. Larutan bufer McIlvaine dibuat dengan melarutkan 28,41 g *di-Sodium hydrogen phosphate* ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) dalam 1 l *aquabidestilata* sebagai larutan pertama. *Citric acid* sebanyak 21,01 g dilarutkan dalam 1 l *aquabidestilata* sebagai larutan kedua. Larutan pertama sebanyak 625 ml dicampurkan dengan 1 l larutan kedua sampai tercampur merata sebagai larutan ketiga. Langkah terakhir dengan mencampurkan 60,49 g  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  dalam larutan ketiga sampai larut sempurna (Badan Standardisasi Nasional, 2009). Bufer McIlvaine dimasukkan dalam *ultrasonic bath* selama 15 menit dengan suhu 30°C.

Daging ikan nila hasil preparasi diuji dengan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Prosedur pengoperasian alat KCKT untuk menganalisis kadar residu tetrasiklin dalam daging ikan dilakukan dengan menggunakan kolom *Clupeus* suhu 30°C, laju alir 1 ml/menit, detektor UV-Vis dengan panjang gelombang 355 nm, dan fase gerak campuran dari *methanol:acetonitril:larutan oxalic acid* 0,126% dengan perbandingan 5:15:80. Injeksi sampel ke KCKT sebanyak 20 µl dari masing-masing sampel.

Analisis sampel dengan KCKT menunjukkan hasil positif apabila kromatogram dengan profil spesifik tetrasiklin muncul pada waktu retensi antara menit ke-5 hingga menit ke-6. Data hasil penelitian mengenai kejadian residu antibiotik tetrasiklin pada daging ikan nila di pasar tradisional Kota Yogyakarta dianalisis secara deskriptif.

### Hasil dan Pembahasan

Penelitian deteksi kejadian residu antibiotik tetrasiklin pada daging ikan nila dilakukan pada 16

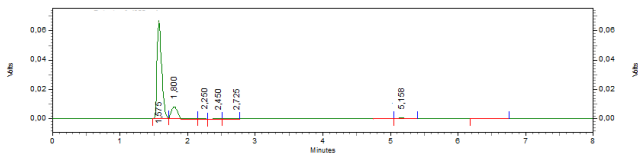
pasar tradisional di Kota Yogyakarta. Jumlah sampel ikan nila yang digunakan dalam penelitian berjumlah 61 ekor (minimal jumlah sampel untuk keperluan *detect disease* adalah 8). Pengisian kuesioner dan wawancara kepada penjual ikan dilakukan untuk melengkapi informasi. Data terkait sampel ikan nila pada 16 pasar tradisional disajikan dalam Tabel 1.

Ikan nila yang diperjualbelikan di pasar tradisional Kota Yogyakarta merupakan produk budi daya perikanan yang berasal dari 13 kota di Jawa Tengah, Jawa Timur, dan Daerah Istimewa Yogyakarta (DIY). Sebanyak 31% ikan nila berasal dari Klaten, 20% dari Semarang, masing-masing 6% dari Sleman dan Yogyakarta, 5% dari Boyolali dan Wonogiri, serta 13% campuran dari Tulungagung, Solo, Sragen, Bantul, Purwodadi, Ambarawa, dan Kuningan.

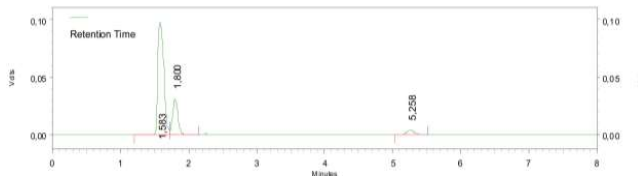
Gambar 2 menunjukkan kromatogram sampel daging ikan nila yang positif mengandung residu antibiotik tetrasiklin. Area puncak spesifik tetrasiklin muncul pada waktu retensi antara menit ke-5 sampai dengan menit ke-6. Hasil analisis *peak* standar tetrasiklin ditunjukkan pada Gambar 3. Gambar 4 menunjukkan kromatogram sampel daging ikan nila yang tidak mengandung residu antibiotik tetrasiklin.

Tabel 1. Data sampel ikan nila

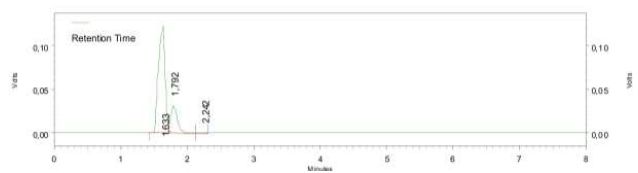
Pasar	Jumlah Sampel	Asal Ikan
Demangan	11	Boyolali, Wonogiri, Kota Yogyakarta, Klaten, Semarang
Kranggan	11	Sleman, Semarang, Solo, Wonogiri, Boyolali, Tulungagung
Bringharjo	7	Semarang, Klaten
Lempuyangan	2	Bantul, Sragen
Ngasem	2	Kota Yogyakarta, Klaten
Gedongkuning	1	Klaten, Boyolali
Legi	3	Kota Yogyakarta, Purwodadi, Semarang
Prawirotaman	4	Klaten, Semarang, Ambarawa
Serangan	1	Klaten
Sentul	5	Klaten, Kuningan, Wonogiri, Solo
Ngadikusuman	2	Semarang, Klaten
Giwangan	3	Klaten, Wonogiri
Kotagede	4	Boyolali, Semarang, Boyolali
Gondomanan	1	Kota Yogyakarta
Karangwaru	2	Klaten
Talok	2	Klaten, Sleman
Total Sampel	61	



Gambar 2. Kromatogram sampel daging ikan nila positif residu antibiotik tetrasiklin



Gambar 3. Kromatogram tetrasiklin murni konsentrasi 0,175 µg/ml



Gambar 4. Kromatogram sampel daging ikan tidak mengandung residu antibiotik tetrasiklin

Area puncak tidak muncul pada retensi waktu antara menit ke-5 sampai dengan menit ke-6.

Hasil analisis dengan KCKT menunjukkan bahwa ikan nila yang dipasarkan di Kota Yogyakarta mengandung residu antibiotik tetrasiklin. Sebanyak 24 sampel daging ikan nila positif mengandung residu antibiotik tetrasiklin dan 19 sampel dari 24 sampel yang positif mengandung residu antibiotik memiliki kadar residu tetrasiklin di atas batas maksimum residu (BMR) yang diizinkan (31%). Sampel tersebut berasal dari Ambarawa, Boyolali, Klaten, Semarang, Sleman, Tulungagung, dan Wonogiri. Batas maksimum residu adalah batas konsentrasi maksimum analit yang diperbolehkan berada pada ikan konsumsi hasil pembudidayaan (Daghrir dan Drogul, 2013). Badan Standardisasi Nasional (2000) menetapkan BMR untuk tetrasiklin pada daging 0,1 mg/kg.

Konsumsi pangan asal hewan yang mengandung antibiotik diperbolehkan asalkan berada di bawah batas maksimum residu yang ditetapkan (Nurhasnawati dkk., 2016). Residu antibiotik merupakan salah satu cemaran kimia dalam pangan asal hewan yang mengancam kesehatan manusia (Dewi dkk., 2014). Daging dengan residu melewati BMR tidak aman dikonsumsi karena menyebabkan reaksi alergi, keracunan, gagalnya pengobatan akibat resistensi, gangguan jumlah mikroflora, dan gangguan fisiologis pada manusia. Penggunaan antibiotik pada hewan berhubungan

dengan munculnya kejadian resistensi pada manusia dan hewan. Okocha (2018) mengungkapkan bahwa peningkatan kejadian resistensi antibiotik pada manusia dan hewan sebagai akibat meluasnya penggunaan antibiotik dalam budi daya perikanan di Cina.

Ikan nila yang diperjualbelikan di Kota Yogyakarta belum bebas dari residu antibiotik tetrasiklin. Keberadaan residu antibiotik berkaitan dengan penggunaan antibiotik dalam budi daya perikanan (Nurhasnawati dkk., 2016). Pembudidaya beranggapan bahwa antibiotik merupakan solusi utama dalam pengobatan penyakit ikan dan peningkatan hasil produksi perikanan. Antibiotik bisa diberikan secara terpisah atau melalui pakan. Penggunaan antibiotik tidak sesuai aturan, tanpa pengawasan, dan tidak terkontrol mengakibatkan akumulasi antibiotik pada jaringan dan organ hewan (Lukistyowati dan Syawal, 2013). Perhatian peternak yang kurang terkait waktu henti obat, sebagai contoh pemanenan ikan sebelum waktu henti obat terpenuhi juga berkorelasi dengan kejadian residu antibiotik dalam produk pangan asal hewan.

Keberadaan residu antibiotik pada daging ikan nila yang dipasarkan di Kota Yogyakarta dapat disebabkan oleh beberapa dugaan. Dugaan pertama penggunaan antibiotik sebagai bahan tambahan pakan. Reda dkk. (2013) menjelaskan bahwa penggunaan antibiotik pada pakan di industri perikanan sebagai *growth promotor* lebih sering daripada pengobatan. Ikan nila yang dipasarkan di Kota Yogyakarta belum tentu mengalami masalah kesehatan. Dugaan kedua adalah adanya kontaminasi antibiotik pada air yang digunakan sebagai pemeliharaan ikan. Antibiotik yang sudah dicerna di dalam tubuh ikan akan dikeluarkan sebagai produk sisa. Zhao dkk. (2015) menjelaskan bahwa sisa antibiotik yang sudah dimetabolisme dapat terakumulasi di air maupun tanah sebagai endapan. Limbah antibiotik yang tidak diolah di pengolahan limbah air dengan tepat dapat mencemari perairan lain seperti sungai dan kolam-kolam budi daya ikan yang lain. Antibiotik golongan tetrasiklin umumnya termasuk antibiotik yang tetap stabil ketika larut dalam air (Noga, 2010). Dugaan ketiga adalah adanya endapan sisa antibiotik yang mencemari tanah di kolam. Antibiotik hasil metabolisme maupun sisa pakan yang masih aktif dapat mengendap di tanah maupun dasar kolam yang berstruktur tanah (Koleva, 2014). Noga (2010) menjelaskan bahwa antibiotik golongan tetrasiklin dapat mengikat komponen

organik (feses) maupun tanah dan mengendap di dasar kolam. Akumulasi endapan secara terus-menerus dapat meningkatkan konsentrasi antibiotik di dalamnya.

Antibiotik tetrasiklin dapat masuk ke dalam tubuh melalui penyerapan dari air, secara injeksi, maupun per oral (Noga, 2010). Kadar residu tetrasiklin pada ikan nila yang diinjeksi lebih tinggi dibandingkan dengan ikan nila yang diberi antibiotik secara per oral. Farmakokinetik antibiotik injeksi lebih cepat dibandingkan dengan antibiotik yang diberikan secara per oral. Antibiotik yang diberikan secara per oral masuk ke saluran pencernaan, lambung, dan usus. Absorpsi tetrasiklin secara per oral terutama di usus halus bagian atas. Tetrasiklin dapat diabsorpsi 60-80% melalui saluran gastrointestinal (Kee dan Hayes, 1994). Makanan yang mengandung protein, lemak, karbohidrat, susu, atau kation (kalsium, magnesium, ferum, dan aluminium) menyebabkan terbentuknya kompleks pengkelat dan menurunkan tingkat absorpsi tetrasiklin hingga 50%. Tetrasiklin yang terabsorpsi akan terikat pada plasma protein dengan persentase 28-41% (Wang dkk., 2012).

Hepatopankreas merupakan organ utama detoksifikasi obat pada ikan seperti halnya mamalia. Metabolisme ikan terdiri dari dua fase, yakni fase I (oksidasi, reduksi, dan hidrolisis) serta fase II (konjugasi). Reaksi tersebut yang menyebabkan ikan mampu mendetoksifikasi maupun mengaktifkan obat (Noga, 2010). Tetrasiklin dieliminasi melalui filtrasi glomeruli, empedu, dan insang (Noga, 2010). Sebanyak 50-80% tetrasiklin (Plumb, 1999) diekskresikan dalam bentuk aktif ke lingkungan melalui urin dan feses, sebagian kecil tetrasiklin dimetabolisme menjadi senyawa tidak aktif (*inactive*), dan 10-20% diekskresikan melalui cairan empedu (Deck dan Winston, 2012).

Tetrasiklin mudah larut dalam lemak serta terdistribusi dengan baik ke jaringan tubuh. Akumulasi obat dalam jaringan tergantung pada jumlah aliran darah dan tingkat afinitas obat dalam jaringan. Obat yang memiliki afinitas tinggi pada jaringan cenderung mudah terakumulasi. Obat dengan tingkat koefisien partisi lemak tinggi cenderung terakumulasi dalam lemak atau jaringan lemak. Tetrasiklin merupakan obat dengan kelarutan lemak yang tinggi sehingga memiliki waktu eliminasi yang cukup lama dalam jaringan. Hal tersebut mengakibatkan tingginya kadar residu obat dalam jaringan (Wijayanti, 2010).

## Kesimpulan

Ikan nila yang diedarkan di pasar tradisional Kota Yogyakarta terdeteksi mengandung residu tetrasiklin. Sebanyak 31% sampel daging ikan nila mengandung residu tetrasiklin di atas batas maksimum residu. Berdasarkan hasil penelitian tersebut pengawasan terhadap kejadian residu antibiotik pada daging ikan konsumsi sangat diperlukan. Penelitian lanjutan terkait upaya pengurangan residu pada daging ikan nila sangat disarankan untuk meningkatkan mutu dan keamanan pangan asal hewan.

## Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Dinas Penanaman Modal dan Perizinan Pemerintah Kota Yogyakarta yang telah memberikan izin dalam pengambilan sampel ikan di pasar tradisional Kota Yogyakarta dan Departemen Farmakologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada yang telah menyediakan fasilitas selama penelitian.

## Daftar Pustaka

- Anastasia, Y. (2011) Teknik Analisis Residu Golongan Tetrasiklin dalam Daging Ayam secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. *Buletin Teknik Pertanian*. 16: 68-71.
- Ardita, N., Budiharjo, A. dan Sari, S.L.A. (2015) Pertumbuhan dan Rasio Konversi Pakan Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) dengan Penambahan Prebiotic. *Bioteknologi*, 12 (1): 16-21.
- Association Of Official Analytical Chemists (AOAC) (2002) AOAC International Methods Comite Guidelines for Validation of Qualitative and Quantitative Food Microbiological Official Methods of Analysis. *J. AOAC Int*. 85: 1-5.
- Badan Standardisasi Nasional (2000) *Batas Maksimum Cemar Mikroba dan Batas Maksimum Residu dalam Bahan Makanan Asal Hewan*. SNI 01-6366-2000.
- Badan Standardisasi Nasional (2009) *Penentuan Residu Tertrasiklin dan Derivatnya dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) pada Produk Perikanan*. SNI 2354.11.
- Barani, A. dan Fallah, A.A. (2015) Occurance of Tetracyclines, Sulfonamides, Fluoroquinolones,

- and Florfenicol in Farmed Rainbow Trout in Iran. *Food and Agricultural Immunology*. 26 (3): 423-424.
- Canada, F.C., La Pena, A. M. and Espinosa-Mansilla, A. (2009) Analysis of Antibiotik in Fish Sample. *Anal Bimal Chem*. 395: 987-1008.
- Codex Alimentarius Commision (2017): Maximum Residue Limits for Residues of Veterinary Drugs in Foods. Update as at the 40<sup>th</sup> Session of the Codex Alimentarius Commision.
- Daghrir, R. and Drogul, P. (2013) Tetracycline Antibiotics in the Environment: a Review. *Environ Chem Lett*. 11: 209-227.
- Dasenaki, M.E. and Thomaidis, N.S. (2015) Multi Residu Determination of 115 Veterinary Drugs and Pharmaceutical Residu in Milk Powder, Butter, Fish Tissue, and Eggs Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Analitca Chimica Acta*. 880: 103-121.
- Deck, D.H. and Winston, L.G. 2012. Tetracyclines, Macrolids, Clindamycin, Chloramphenicol, Streptogramins, and Oxazolidinones. Dalam: Katzung, B.G. (eds). *Basic and Clinical Pharmacology* Edisi ke 12. Lange, New York, 809-811.
- Dewi, A.A.S., Whiddhiasmoro, N.P., Nurlatifah, I., Riti, N., dan Purnawati, D. (2014) Residu Antibiotika pada Pangan Asal Hewan, Dampak dan Upaya Penanggulangannya. *Buletin Veteriner Denpasar*. 26 (85).
- Evaggelopoulou, E. and Samanidou, V. (2013) Development and Validation of an HPLC Method for the Determination of Six Penicillin and Three Amphenicol Antibiotics in Gilthead Seabream (*Sparus Aurata*) Tissue According to the European Union Decision 2002/657/EC. *Food Chemistry*. 136: 1322-1329.
- Griffin, M.O., Fricovsky, E., Ceballos, G. and Villareal, F. (2010) Tetracycline: a Pleitropic Family of Compound with Promising Theurapetic Properties. Review of the Literature. *Am Jurnal Physiol Cell Physiol*. 299: 59, 548.
- Kee, J.L. and Hayes, E.R. (1994) *Farmakologi Pendekatan Proses Keperawatan Editor Yasmin Asih, Skp*. ECG. Jakarta: 1058.
- Kementrian Kelautan dan Perikanan (2016) *Laporan Kinerja Kementrian Kelautan dan Perikanan Tahun 2015*. Jakarta.
- Kementerian Kelautan dan Perikanan (2018) *Badan Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan*. Jakarta.
- Koleva, Y. 2014. Hepatotoxic Action and Influence on the Environment of some Antibiotics. *Journal of Chemical Technology and Metallurgy*. 49 (2): 157-162.
- Lukistyowati, I. dan Syawal, H. (2013) Potensi Pakan yang Mengandung Sambiloto (*Andrographis paniculata*) dan Daun Jambu Biji (*Psidium guajava*) untuk Menanggulangi Bakteri Aeromonas hydrophila pada Ikan Baung (*Mystus nemurus*). *Jurnal Akuakultur Rawa Indonesia*. 1 (2):135-147.
- Nurwigati, H.K. (2017) Berapa Banyak Konsumsi Ikan di Jogja. *Jogja Politan*. Diakses dari <https://jogjapolitan.harianjogja.com/read/2017/10/19/510/861262/berapa-banyak-konsumsi-ikan-lele-di-jogja>.
- Noga, E. (2010) *Fish Disease Diagnosis and Treatment, Second Edition*. Wiley-Blackwell. USA: 347-383.
- Nurhasnawati, H., Jubaidah, S. dan Elfia, N. (2016) Penentuan Kadar Residu Tetrasiklin HCl pada Ikan Air Tawar yang Beredar di Pasar Segiri Menggunakan Metode Spektrofotometri Ultra Violet. *Jurnal Ilmiah Manuntung*. 2 (2): 6
- Okocha, R.C., Isaac, O.O. and Olufemi, B.A. (2018) Food Safety Impacts of Antimicrobial Use and Their Residues in Aquaculture. *Public Health Reviews*. 39 (21): 1-22.
- Olatoye, I. and Afisu B. (2013) Antibiotic Usage and Oxytetracycline Residue in African Catfish (*Clarias gariepinus* in Ibadan, Nigeria). *World Journal of Fish and Marine Sciences*. 5 (3): 302-309.
- Orlando, E.A. and Samionato, A.V.C. (2013) Extraction of Tetracycline Antibiotic Residu from Fish Fillet: Comparison and Optimization of Different Procedure Using Liquid Chromatography with Flouroscent Detection. *Journal of Chromatography A*. 1307 (2013) 111-118.

- Plumb, D.C. (1999) *Veterinary Drug Handbook* Edisi ke-3. South State Avenue, Iowa State University Press, 125-130.
- Reda, R. M., Ibrahim, R. E., Ahmed, E. G. and El-Bouhy, Z. M. 2013. Effect of Oxytetracycline and Florfenicol as Growth Promoters on the Health Status of Cultured *Oreochromis niloticus*. *Egyptian Journal of Aquatic Research*. 39: 241–248.
- Republik Indonesia (2004) Peraturan Pemerintah Nomor 28 Tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu, dan Gizi Pangan. Sekretariat Negara, Jakarta.
- Rohman, A. (2009) *Kromatografi untuk Analisis Obat*. Graha Ilmu. Yogyakarta: 217-235.
- Sekkin, S. and Cavit, K. (2011) *Antibacterial Drug in Fish Farm: Application and Its Effect*. Adnan Manderes Ubiversity Press. Turkey: 12.
- Wang, J., MacNeil, J. D. and Kay, J. F. (2012) *Chemical Analysis of Antibiotic Residues in Food*. A John Wiley & Sons. Inc. Publication. United States of America: 48-52, 75-79.
- Wijayanti, A. D., Hakim, L., Widiyono, I. dan Irianti, T. (2010) Penentuan Efektifitas Oksitetrasiklin Melalui Parameter Farmakokinetik / farmakodinamik pada Plasma dan Jaringan Ayam Broiler. *Jurnal Sain Vet*. 11 (2): 119-125.
- Yuningsih (2004) Keberadaan Residu Antibiotika dalam Produk Peternakan (Susu dan Daging). *Lokakarya Nasional Keamanan Pangan Produk Peternakan*. Balai Penelitian Veteriner. 48-55.
- Zhao, J., Liu, Y., Liu, W., Jiang, Y., Su, H., Zhang, Q., Chen, X., Yang, Y., Chen, J., Liu, S., Pan, C., Huang, G. and Ying, G. 2015. Tissue-specific Bioaccumulation of Human and Veterinary Antibiotics in Bile, Plasma, Liver and Muscle Tissues of Wild Fish from a Highly Urbanized Region. *Environmental Pollution*. 198: 15-24.

*Review*

## **Melamine, Asam Sianurat dan Melamin-Sianurat: Kaitan dengan Penyakit Saluran Perkencingan Hewan**

### ***Melamine, Cyanuric Acid and Melamine-Cyanurate: the Link to the Diseases of Urinary Tract in Animal***

**Yanuartono\*, Alfarisa Nururrozi, Soedarmanto Indarjulianto, Harry Purnamaningsih, Slamet Rahardjo**

Departemen Ilmu Penyakit Dalam, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada  
Jl. Fauna 2, Karangmalang, Yogyakarta 55281 Indonesia  
\*Email: yanuartono@ugm.ac.id

Naskah diterima: 7 Agustus 2019, direvisi: 3 September 2019, disetujui: 23 Oktober 2019

#### **Abstract**

High incidence of acute renal failure in dogs and cats from 2004-2007 were associated with the ingestion of dog and cat food products and the suspected contaminant was identified as melamine and its derivatives such as cyanuric acid and melamine cyanurate. Melamine is a chemical compound used primarily in the plastics manufacture, coatings, commercial filters, adhesives also main component of dinnerware and kitchen appliances industry. However, melamine has been misused to elevate the content of nitrogen compounds in human and animal food. Increasing the content of nitrogen compound by using melamine aim to increase the value of protein in food. Melamine has broad safety limit thus relatively non-toxic if consumed by human and animal. However, many studies and case reports showed that melamine can cause damage to the kidneys, especially if present together with cyanuric acid in the body. This paper aims to provide an overview and discussion of urinary tract obstruction in dogs and cats that is likely caused by toxicity of melamine and its derivatives which possibly occurring in Indonesia.

**Key words:** cyanuric acid; food products; melamine cyanurate acute renal failure; toxicity

#### **Abstrak**

Sejumlah kasus gagal ginjal akut pada anjing dan kucing sejak 2004-2007 dikaitkan dengan konsumsi produk pakan anjing dan kucing yang dicurigai telah terkontaminasi oleh melamin dan senyawa turunannya seperti asam sianurat dan melamin sianurat. Melamin adalah bahan kimia yang digunakan terutama untuk pembuatan plastik, pelapis, filter komersial, perekat dan senyawa dalam industri pembuatan piring serta alat dapur. Namun kemudian senyawa ini telah disalahgunakan untuk meningkatkan kandungan senyawa nitrogen dalam produk makanan pada manusia dan pakan pada hewan. Peningkatan kandungan senyawa nitrogen dari melamin tersebut bertujuan untuk meningkatkan nilai protein bahan pangan maupun pakan. Melamin pada dasarnya memiliki batas keamanan yang lebar sehingga relatif tidak beracun jika dikonsumsi manusia dan hewan. Namun demikian, banyak penelitian dan laporan kasus yang menunjukkan bahwa melamin dapat mengakibatkan kerusakan pada ginjal terutama jika bereaksi dengan asam sianurat di dalam tubuh. Makalah ini bertujuan untuk memberikan gambaran dan diskusi mengenai kasus kerusakan saluran kemih pada anjing dan kucing disebabkan oleh keracunan melamin dan turunannya yang kemungkinan sudah terjadi di Indonesia.

**Kata kunci:** asam sianurat; gagal ginjal akut; melamin; melamin sianurat; produk pakan

## Pendahuluan

Melamin dan turunannya seperti asam sianurat dan melamin sianurat adalah komponen yang diduga kuat mengakibatkan wabah besar gagal ginjal pada anjing dan kucing yang terjadi pada tahun 2007 di Amerika Utara (Puschner *et al.*, 2007). Laporan di Asia menyebutkan bahwa pada tahun 2004 telah terjadi wabah gagal ginjal pada anjing, yang menunjukkan gejala klinis, histologis, dan toksikologi yang identik dengan kejadian di Amerika Utara pada tahun 2007. Kejadian gagal ginjal akut pada hewan piaraan di Asia selama bulan Maret 2004 menunjukkan adanya kemungkinan disebabkan karena produk pakan yang diproduksi di salah satu pabrik di Thailand (Brown *et al.*, 2007). Kejadian tersebut diatas mengakibatkan ditariknnya secara besar besaran produk produk pakan hewan kesayangan seperti anjing dan kucing dari pasaran (FDA, 2008).

Kerusakan pada ginjal juga telah dilaporkan pada tahun 2008 di China dimana banyak anak yang menderita dan bahkan meninggal karena kerusakan ginjal setelah mengonsumsi susu yang terkontaminasi melamin (Reimschuessel *et al.*, 2010; Ji *et al.*, 2014). Selain makanan bayi, melamin pun ditemukan susu, produk asal susu serta produk makanan dan pakan lainnya, yang juga diekspor ke banyak negara di seluruh dunia (Gossner *et al.*, 2009). Kejadian kontaminasi makanan oleh melamin juga telah dilaporkan di Selandia Baru, Taiwan, Korea Selatan, Kongo. Kontaminasi makanan oleh melamin di Eropa dilaporkan terjadi di Austria, Finlandia, Jerman, Slowakia, dan Hungaria (Suchý *et al.*, 2009). Penyebab masalah tersebut akhirnya diketahui berasal dari komponen bahan pakan mengandung melamin yang ditemukan dalam gluten gandum, jagung, dan protein beras diimpor dari China, dengan tujuan meningkatkan nilai protein (Liu *et al.*, 2011). Latar belakang penambahan secara illegal tersebut disebabkan karena mahalnnya bahan pangan maupun pakan yang mengandung protein tinggi yang sayangnya berdampak negatif pada manusia maupun hewan yang mengkonsumsinya. Kecurangan tersebut didukung lemahnya uji kandungan protein yang terdapat dalam bahan pangan maupun bahan pakan. Sampai saat ini uji kadar protein nonspesifik ditentukan melalui pengukuran nitrogen dengan metode uji standar seperti Kjeldahl (Montesano *et al.*, 2013). Menurut Cheng *et al.*, (2010), meskipun toksisitas oral melamin dinyatakan rendah namun dapat mengakibatkan

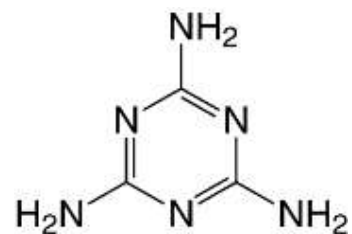
kerusakan pada ginjal jika bereaksi dengan asam sianurat di dalam tubuh. Toksisitas rendah melamin kemungkinan menjadi penyebab tidak banyak data di lapangan yang diperoleh pada kucing (Puschner *et al.*, 2007). Tulisan ini bertujuan untuk memberikan gambaran dan bahasan secara sederhana pada kasus kerusakan saluran perkencingan pada anjing dan kucing yang kemungkinan disebabkan oleh toksisitas melamin, asam sianurat, dan melamin sianurat yang kemungkinan terjadi di Indonesia. Dugaan tersebut didasarkan atas banyaknya kasus kasus gangguan saluran perkencingan pada kucing yang ditemukan di Klinik Hewan Kuningan, FKH-UGM (Nururrozi *et al.*, 2018). Selain tujuan tersebut diatas, penulis juga berharap bahwa nantinya akan muncul penelitian pada komponen bahan-bahan yang terdapat dalam produk pakan anjing dan kucing yang kemungkinan terkait dengan kejadian gangguan saluran perkencingan.

## Struktur dan Sifat Kimia

### Melamin

Melamin dengan rumus formula kimia  $C_3H_3N_3$  dan nama IUPAC *1,3,5-triazine-2,4,6-triamine* (Gambar 1) adalah triazina heterosiklik kaya nitrogen (Liu *et al.*, 2012). Melamin memiliki nama lain sianuramida, sianurotriamida, sianurotriamina, isomelamin, triaminotriazin, 2,4,6-triaminotriazin, triamino-s-triazin, 2,4,6-triamino-1,3,5-triazine, 2,4,6-s-triazine-triamin, dan 1,3,5-triazina-2,4,6 (1H,3H,5H)-triamina (International Agency for Research on Cancer, 2010). Senyawa kimia ini berbentuk kristal putih padat, mempunyai sifat sedikit larut dalam air (3,1 g/l pada suhu 20 °C), sedikit larut dalam etanol, dan tidak larut dalam dietil eter (Anonim, 2009).

Melamin bisa diproduksi dari tiga bahan yang berbeda seperti urea, *dicyandiamide* atau hidrogen sianida (Maxwell, 2007). Pada awal 1940 Mackay menemukan bahwa melamin juga bisa disintesa dari urea pada suhu 400°C dengan atau tanpa katalis. Sejak saat itu melamin mulai diproduksi dari bahan

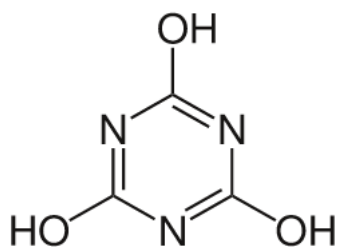


Gambar 1. Struktur kimia melamin (Bizzari and Yokose, 2008)

baku urea dan penggunaan *cyanamid* sebagai bahan baku dihentikan pada akhir 1960 (Ingelfinger, 2008). Melamin digunakan dalam sintesis melamin- resin formaldehid (MFR) untuk pembuatan plastik (Sugita *et al.*, 1990), pelapis (Park and Jeong, 2010), filter komersial, perekat (Kumar and Katiyar, 1990), dan senyawa dalam industri pembuatan piring serta alat dapur (Liu *et al.*, 2012).

### Asam sianurat

Asam sianurat dengan rumus formula kimia  $C_3H_3N_3O_3$  atau  $C_3N_3(OH)_3$  (gambar 2) dan nama IUPAC *1,3,5-triazinane-2,4,6-trione* adalah oksitriazin analog melamin sebagai produk sampingan dalam sintesis melamin dan berbentuk kristal putih. Asam sianurat dapat digunakan untuk sintesis disinfektan, klorinasi air kolam renang (Downes *et al.*, 1984), antioksidan (She *et al.*, 2010), pelapis cat (Whitten and Lin, 1999), herbisida (Huthmacher and Most, 2005), plastik, polyester dan kosmetik (Chuenarrom *et al.*, 2014) serta *feed additive* ruminansia (Barboza and Barrionuevo, 2007).

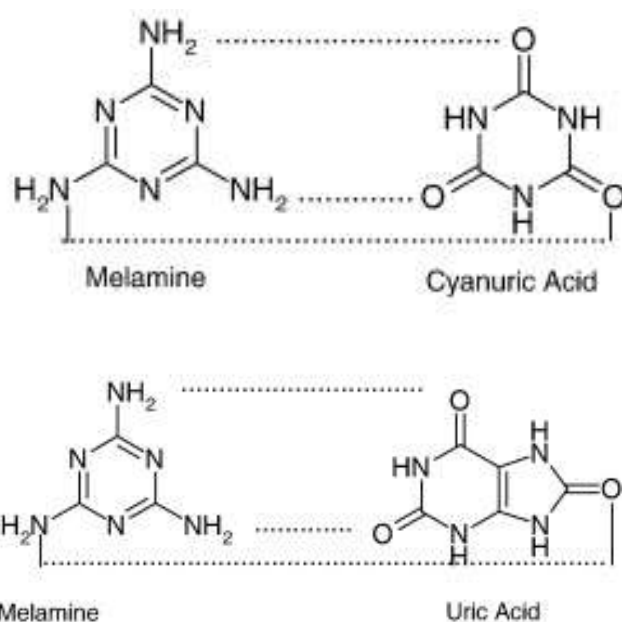


Gambar 2. Struktur kimia asam sianurat (Bizzari and Yokose, 2008)

Asam sianurat pertama kali disintesis oleh Friedrich Wöhler pada tahun 1829 melalui dekomposisi panas dari urea dan asam urat. Asam sianurat juga dapat diperoleh dengan cara hidrolisis bahan mentah atau limbah melamin yang diikuti dengan proses kristalisasi (Schaber *et al.*, 1999). Berbagai hasil penelitian menunjukkan bahwa melamin maupun asam sianurat jika diberikan terpisah dengan dosis yang rendah relatif tidak bersifat toksik, namun demikian, berdasarkan penelitian terhadap hewan uji diketahui bahwa kombinasi melamin dan asam sianurat dapat menyebabkan gangguan ginjal (WHO, 2008).

### Melamin sianurat

Melamin sianurat atau disebut juga kompleks asam melamin-sianurat dengan rumus formula kimia  $C_6H_9N_9O_3$  dan nama IUPAC *1,3,5-triazinane-2,4,6-*



Gambar 3. Struktur kimia melamin sianurat (Bizzari and Yokose, 2008)

*trione;1,3,5-triazine-2,4,6-triamine* adalah kompleks kristal yang terbentuk dari campuran melamin dan sianurat dengan perbandingan 1:1 (He *et al.*, 2008).

Kompleks melamin sianurat sangatlah baik digunakan sebagai material penahan panas karena stabil terhadap perubahan temperatur (Qiu and Gao, 2005). Puschner and Reimschuessel (2011) menyatakan bahwa kombinasi melamin dan asam sianurat (melamin sianurat) jauh lebih toksik dibandingkan dengan melamin atau asam sianurat. Selanjutnya, melamin sianurat membentuk kristal tidak larut yang sangat berbahaya karena dapat merusak tubulus ginjal (Suchý *et al.*, 2009) dan saat ini telah ditemukan juga sebagai pencemar dalam pakan ruminansia yang berbasis urea (EFSA, 2010).

### Penyalahgunaan Melamin

Melamin pada sekitar tahun 1958 telah dimanfaatkan sebagai tambahan pada pakan ternak karena mengandung N dalam jumlah yang besar (66%). Namun penggunaan tersebut dihentikan pada tahun 1978 karena melamin tidak dapat dihidrolisa secara sempurna dalam rumen (Newton and Utley, 1978). Selanjutnya telah dilaporkan kejadian pencemaran melamin yang terdapat pada bahan makanan dan pakan asal produk nabati atau hewani di sejumlah negara seperti Taiwan, Singapura, dan Vietnam (Ingelfinger, 2008). Hasil penelusuran kejadian menunjukkan bahwa sedikitnya 6 anak meninggal di China karena



gagal ginjal parah yang diduga akibat melamin serta turunannya seperti asam sianurat yang ditambahkan ke dalam susu bubuk dan lebih dari 200.000 bayi serta anak kecil mengalami gangguan ginjal dengan lebih dari 50.000 bayi dan anak kecil dirawat di rumah sakit (Ingelfinger, 2008). Lebih parah lagi, bahan-bahan atau produk susu formula yang terkontaminasi tersebut oleh China juga diekspor ke negara-negara seperti Hong Kong, Macau, Taiwan, Singapura, Jepang, Korea Selatan, dan Australia sehingga menimbulkan masalah yang sama (Lam *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009). Tahun 2007, produk pakan hewan ditarik dari peredaran di Amerika Utara oleh beberapa produsen pakan hewan kesayangan setelah ditemukan sejumlah kasus kucing dan anjing yang sakit dan mati akibat mengonsumsi pakan terkontaminasi melamin dan turunannya seperti asam sianurat (Puschner *et al.*, 2007). *Food and Drug Administration* (FDA) melaporkan melamin dan turunannya seperti asam sianurat telah terdeteksi dalam bahan pakan untuk kucing dan anjing dalam pakan hewan dan sampel gluten gandum yang diimpor dari China (Brown *et al.*, 2007). Selain ditemukan pada produk susu formula bayi dan bahan pakan anjing serta kucing, melamin dan turunannya juga ditemukan pada pakan anak babi (Gonzalez *et al.*, 2009), konsentrat sapi perah (Cruywagen, *et al.*, 2009), pakan ikan (Yan *et al.*, 2009) dan pakan unggas (Straková *et al.*, 2014).

Menurut Hau *et al.* (2009), ditemukannya asam sianurat dalam bahan pakan kemungkinan merupakan unsur kesengajaan atau merupakan produk samping dari melamin dalam bahan pakan tersebut. Senyawa tersebut terdeteksi dalam gluten gandum, jagung dan protein beras dengan konsentrasi 0.8% sampai 26% (Brown *et al.*, 2007). Dipandang dari sisi ekonomi, strategi untuk melakukan kecurangan dengan cara menambah melamin yang memiliki kandungan nitrogen tinggi (66,6%) pada bahan pakan untuk meningkatkan keuntungan menjadi sebuah pilihan yang cukup menarik bagi kalangan industri. Hal tersebut dapat terjadi karena sampai saat ini untuk mengukur konsentrasi protein yang terdapat dalam bahan pakan tersebut adalah dengan menggunakan metode Kjeldahl (Krotz *et al.*, 2008). Meskipun pada akhirnya pilihan strategi tersebut menimbulkan dampak negatif yang luas dan berkepanjangan.

Guna meminimalisir kejadian tersebut maka diperlukan suatu metode kuantitatif yang terpercaya untuk menentukan kandungan total protein sejati yang terdapat dalam bahan pakan sehingga ada

jaminan kepastian kualitas dan keamanannya (Moore *et al.*, 2010). Abbas *et al.* (2013) dalam penelitiannya menggunakan metode spektroskopi *near infrared* (NIR) untuk deteksi melamin dan turunannya seperti asam sianurat dalam sampel pakan seperti bungkil kedelai, gluten jagung dan gluten gandum. Metode analisis modern lain yang dapat digunakan untuk menentukan kandungan melamin, asam sianurat dan melamin sianurat adalah dengan menggunakan metode *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), *Liquid Chromatography-Ultraviolet* (LC-UV), *Liquid Chromatography Mass Spectrophotometry* (LC-MS), *High Performance Liquid Chromatography diode array detection* (HPLC-DAD), *liquid chromatograph coupled with mass detector* (LC/MS/MS), *liquid chromatography with triple quadrupole tandem mass spectrometry* (UPLC/MS/MS) dan *Matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry* (MALDI-MS), *molecular imprinting and solid-phase extraction* (MI-SPE) (Yokley *et al.*, 2000; Vail *et al.*, 2007; Fremlin and Pelzing, 2009; Yang *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2010; Filazi *et al.*, 2012). Metode yang dapat digunakan untuk menentukan kandungan melamin, asam sianurat dan melamin sianurat dalam bahan pakan terangkum pada Tabel 1.

Namun demikian metode tersebut tampaknya masih sulit dilakukan di laboratorium sederhana karena terkendala mahalannya harga alat dan kemampuan

Tabel 1. Metode penentuan kandungan melamin, asam sianurat dan melamin sianurat dalam bahan pakan

Sampel uji	Metode	Referensi
Tanah	LC-UV	Yokley <i>et al.</i> , 2000
Trout, tilapia, salmon, dan udang	LC-MS/MS	Andersen <i>et al.</i> , 2008
Gluten, pakan ayam komersial	Raman spectroscopy dan HPLC	Lin <i>et al.</i> , 2008
<i>Dog food</i> kering	ELISA	Garber, 2008
Protein nabati	LC/MS/MS	Ding <i>et al.</i> , 2008
Daging babi dan sereal gandum	HPLC	Wei <i>et al.</i> , 2009
Susu dan produk asal susu	GC-MS/MS	Miao <i>et al.</i> , 2009
Susu bubuk	MI-SPE	Yang <i>et al.</i> , 2009
Beras dan konsentrat kacang	LC/MS/MS	Suchý <i>et al.</i> , 2009
Suplemen protein	HPLC-DAD	Montesano <i>et al.</i> , 2013
Susu formula bayi	UPLC/MS/MS	Meng <i>et al.</i> , 2015

sumber daya manusia yang masih terbatas dalam pengoperasian alat-alat tersebut. Mahalnya metode canggih yang dapat digunakan untuk deteksi tersebut secara langsung maupun tidak langsung akan memicu pemalsuan protein dengan penambahan melamin dalam bahan pakan maupun makanan untuk memperoleh keuntungan yang lebih besar.

### Absorpsi, Distribusi, Metabolisme dan Ekskresi

Melamin dan asam sianurat pada hewan secara cepat diabsorpsi dan diekskresikan serta hampir seluruhnya tidak berubah dalam urin. Waktu paruh eliminasi untuk senyawa melamin dan asam sianurat sekitar 2,7 – 4,04 jam (Mast *et al.*, 1983). Lebih dari 90% melamin yang dikonsumsi diekskresikan dalam waktu 24 jam (Hau *et al.*, 2009). Liu *et al.* (2010) menunjukkan bahwa melamin dosis tunggal 1,4 mg/kgBB pada monyet *rhesus* secara oral akan diabsorpsi dengan cepat dan diekskresikan terutama melalui urin. Penelitian pada babi menunjukkan bahwa pemberian melamin secara IV dengan dosis 6,13 mg/kg memiliki waktu paruh  $4,04 \pm 0,37$  jam, klirens  $0,11 \pm 0,01$  l/jam/kg dan volume distribusi  $0,61 \pm 0,04$  l/kg (Baynes *et al.*, 2008). Penelitian oleh Mast *et al.*, (1983) menggunakan tikus jantan galur *Fischer 344* menunjukkan bahwa melamin dengan cepat diserap setelah pemberian oral serta tidak mengalami perubahan setelah diekskresikan ke dalam urin. Penelitian tersebut juga menunjukkan bahwa kadar melamin ditemukan dalam jumlah yang sama pada darah, hepar dan plasma. Hau *et al.* (2009) menyatakan bahwa melamin tidak dimetabolisme pada hewan dan 90% diantaranya diekskresikan melalui ginjal selama 24 jam setelah dikonsumsi. Sejalan dengan hasil penelitian tersebut, Thompson *et al.* (2008) juga menyatakan bahwa melamin dan senyawa turunannya tidak terakumulasi dalam tubuh tetapi dengan cepat akan dieliminasi oleh ginjal. Namun sebaliknya, Straková *et al.* (2014) menyatakan bahwa melamin dan/atau turunannya dapat tersimpan dalam tubuh manusia atau hewan, sehingga jika mengonsumsi makanan atau pakan yang mengandung komponen tersebut akan berdampak pada kesehatan. Lebih lanjut, Zheng *et al.* (2013) menunjukkan bahwa biotransformasi melamin pada tikus diperantarai oleh mikroorganisme *Klebsiella terrigena* yang terdapat dalam saluran pencernaan. Bakteri tersebut mampu merubah melamin menjadi asam sianurat yang kemudian diduga dapat menjadi komponen utama kalkuli ginjal. Hasil penelitian yang sangat beragam

tersebut diatas menunjukkan bahwa masih diperlukan penelitian yang lebih mendalam terhadap absorpsi, distribusi, metabolisme dan ekskresi melamin dan senyawa turunannya pada bermacam spesies hewan (Dorne *et al.*, 2013). Hasil penelitian pada anjing yang menarik ditunjukkan oleh Barbee *et al.* (1984) dan Hammond *et al.* (1985) dimana dosis 5 mg/kgBB asam sianurat yang diberikan baik per oral maupun intravena seluruhnya akan terabsorpsi, sedangkan sediaan bolus dengan dosis 500 mg/kg BB hanya sebagian yang terserap. Penelitian tersebut juga menunjukkan bahwa volume yang terdistribusi sangatlah sedikit jika dibandingkan dengan volume cairan tubuh, yaitu 0,7 l/kg, sedangkan waktu paruh menunjukkan 1,5-2 jam dan dengan mudah asam sianurat dapat dieliminasi melalui ginjal. Hasil penelitian tersebut tidak menunjukkan adanya bioakumulasi dalam jaringan dan tidak ada metabolit selain asam sianurat yang terdeteksi dalam hasil ekskresi.

Shen *et al.* (2010) menyatakan bahwa melamin dapat diekskresikan oleh sapi perah ke dalam susu, terutama pada sapi perah dengan produksi tinggi, meskipun tidak berpengaruh pada komposisinya. Lebih lanjut, Lutter *et al.*, (2011) dalam laporannya menyebutkan bahwa pada pakan ternak yang mengandung melamin 15 ppm (15000 ppb), setelah 5 jam diabsorpsi ternak, ternyata susunya mengandung melamin dengan konsentrasi 2% dari total melamin pada pakan (300 ppb). Cruywagen *et al.* (2009) menambahkan bahwa susu akan mengandung melamin jika sapi digembalakan di padang rumput yang dipupuk dengan melamin. Dalam waktu 8 jam, melamin akan ditransfer ke susu dan jaringan tubuh dengan efisiensi 2,1% - 3%. Laporan kasus oleh Reyers (2008) menyatakan bahwa melamin diekskresikan ke dalam susu sapi yang mengonsumsi konsentrat protein tinggi. Lebih lanjut dinyatakan dalam laporan tersebut bahwa konsentrat protein tinggi tersebut terkontaminasi oleh melamin.

Hasil penelitian penelitian tersebut menunjukkan masih diperlukannya penelitian yang mendalam terhadap berbagai spesies hewan yang mengonsumsi pakan dengan bahan-bahan pakan berbasis impor. Lembaga-lembaga yang berkompeten diharapkan dapat melengkapi laboratorium yang dimilikinya untuk dapat mendeteksi adanya melamin dalam produk pakan komersial maupun bahan pakan yang diimpor. Laboratorium yang ada sebaiknya dilengkapi dengan salah satu atau beberapa alat metode deteksi seperti *High*

*Performance Liquid Chromatography (HPLC), Liquid Chromatography-Ultraviolet (LC-UV), Liquid Chromatography Mass Spectrophotometry (LC-MS), High Performance Liquid Chromatography diode array detection (HPLC-DAD), liquid chromatograph coupled with mass detector (LC/MS/MS), liquid chromatography with triple quadrupole tandem mass spectrometry (UPLC/MS/MS), dan Matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry (MALDI-MS), molecular imprinting and solid-phase extraction (MI-SPE).* Penggunaan metode tersebut diharapkan dapat mencegah munculnya kejadian penyakit saluran perkencingan pada hewan kesayangan seperti kucing dan anjing yang diakibatkan oleh pakan.

### Toksisitas

Melamin pada dasarnya memiliki batas keamanan yang lebar sehingga relatif tidak beracun jika dikonsumsi manusia dan hewan (Cocchi *et al.*, 2010). Namun sebaliknya, menurut Weise (2007) melamin berbahaya jika tertelan, terhirup, atau terserap kulit. Paparan secara kronik dapat memicu terjadinya kanker dan kerusakan sistem reproduksi dan dosis toksik dari melamin cukup tinggi dengan LD50 3,161 mg per kg berat badan (WHO, 2008; Hau *et al.*, 2009).

Data toksisitas melamin masih terbatas, namun hasil pengujian pada hewan menunjukkan bahwa melamin dapat menyebabkan terbentuknya batu pada vesika urinaria. Data toksisitas melamin, asam sianurat dan melamin sianurat yang berasal dari penelitian penelitian yang lain tersaji dalam Tabel 2. Efek toksik utama pada tikus dan mencit yang terpapar melamin melalui pakannya antara lain terbentuknya batu, reaksi peradangan, dan hiperplasia pada kandung kemih (El-Rabey *et al.*, 2013). Pengujian pada anjing diperoleh

hasil terbentuknya kristaluria melamin, sedangkan pada tikus ditemukan terjadinya hematuria. Penelitian oleh Puschner *et al.* (2007) menunjukkan toksisitas melamin dan asam sianurat pada paparan oral tunggal dengan konsentrasi 32 mg/kg dari masing-masing senyawa dapat mengakibatkan gagal ginjal akut pada kucing. Kasus gagal ginjal pada 2 ekor anjing akibat pakan yang terkontaminasi melamin telah dilaporkan oleh Cocchi *et al.* (2010). Laporan tersebut menyatakan bahwa melamin dengan kadar 766,8 ppm dan 158,5 ppm telah terdeteksi pada pakan yang diberikan. Beberapa uji paparan oral subkronik asam sianurat menunjukkan bahwa senyawa tersebut dapat menyebabkan kerusakan jaringan ginjal terhadap hewan uji, termasuk dilatasi tubulus renalis (Xie *et al.*, 2010), nekrosis atau hiperplasia epitelium tubular (El-Rabey, *et al.*, 2013) peningkatan tubulus basofilik, infiltrasi neutrofilik, mineralisasi dan fibrosis (Nilubol *et al.*, 2009). Kondisi tersebut di atas kemungkinan disebabkan oleh adanya kristal sianurat dalam tubulus renalis (Thompson *et al.*, 2008; Skinner *et al.*, 2010). Melamin dan asam sianurat memiliki toksisitas rendah bila diberikan secara terpisah, namun demikian mereka mampu menginduksi terbentuknya kristal pada ginjal saat diberikan secara bersamaan. Selanjutnya jika terjadi gagal ginjal maka kemungkinan akan serupa dengan nefropati asam urat akut pada manusia, di mana kristal sferulit akan mengakibatkan obstruksi pada tubulus ginjal (Reimschuessel *et al.*, 2008).

### Gejala Klinis

Gejala klinis yang muncul dapat bervariasi sehingga sulit menentukan secara pasti tanpa bantuan pemeriksaan laboratorium atau bahkan histopatologi. Gejala klinis paparan oral dosis tunggal melamin dan

Tabel 2. Toksisitas melamin, asam sianurat, melamin-sianurat.

Hewan	Kandungan	Dosis	Dampak	Referensi
Anjing	Melamin	125 mg/kg BB	Diuresis	Lipschitz and Stokey, 1945
Domba	Melamin	2500 mg/kg BB	BUN meningkat, stress, anoreksia dan anuria	Clark, 1966
Tikus jantan	Melamin	150mg/kgBB (90 hari)	Batu di vesika urinaria	Melnick <i>et al.</i> , 1984
Kucing	Melamin sianurat	32 mg/kg	Gagal ginjal akut	Puschner <i>et al.</i> , 2007
Ikan	Melamin sianurat	400 mg melamin + 400 asam sianurat mg/kg pakan	Ginjal tampak sedikit bengkak pada beberapa ikan	Reimschuessel <i>et al.</i> , 2008
Wistar	Melamin	100 mg/kg	Kerusakan ginjal	Xie <i>et al.</i> , 2010
Broiler	Melamin sianurat	melamin 100mg/kg pakan dan asam sianurat 100 mg/kg pakan	Hipoproteinemia, hipoglikemia, hipokalemia, hiponatremia, kerusakan hati	Straková <i>et al.</i> , 2014

asam sianurat 32 mg/kg dari masing masing senyawa berupa anoreksia, muntah dan depresi (Puschner *et al.*, 2007). Laporan gejala klinis akibat keracunan melamin sianurat yang teramati oleh pemilik kucing meliputi penurunan nafsu makan, muntah, poliuria, polidipsia, lesu dan azotemia (Cianciolo *et al.*, 2008). Gejala klinis yang muncul pada anjing 12 jam setelah terpapar melamin sianurat berupa kelesuan disertai muntah ataupun tanpa muntah. Keracunan melamin sianurat akan terlihat jelas setelah muncul gejala disfungsi ginjal, polidipsia, poliuria, kelemahan, kelesuan, dan dehidrasi (Puschner *et al.*, 2007; Puschner and Reimschuessel, 2011). Hasil pengamatan gejala klinis keracunan melamin dan asam sianurat pada anak babi menunjukkan terjadinya anoreksi, depresi, lesu dan polidipsi. Gejala klinis tersebut muncul beberapa hari setelah disapih, dengan angka morbiditas 40-60% (Gonzalez *et al.*, 2009). Keracunan melamin dan asam sianurat pada babi juga telah dilaporkan, meskipun kematian terjadi tanpa gejala klinis yang menciri. Namun demikian, gejala klinis yang dapat teramati

adalah kulit menjadi pucat, penurunan berat badan dan meningkatnya angka kematian. Pemeriksaan bedah bangkai pada babi tersebut menunjukkan terjadinya gagal ginjal (Nilubol *et al.*, 2009).

Dari hasil hasil penelitian diatas serta rangkuman pada tabel 3 dapat diketahui bahwa gejala klinis yang muncul akibat keracunan melamin, asam sianurat atau melamin sianurat sangatlah umum sehingga sulit untuk menentukan diagnosa secara pasti. Selain gejala klinis, diagnosa secara pasti ditentukan dengan riwayat lengkap, pemeriksaan kimia darah, analisa urin, nekropsi, pemeriksaan organ dan pembuatan preparat histologi (Thompson *et al.*, 2008; Cocchi *et al.*, 2010).

### Melamin dan Gangguan Saluran Perkencingan

Patogenesis toksisitas ginjal yang terkait dengan konsumsi melamin mungkin belum sepenuhnya dapat dijelaskan secara pasti, namun kristal tubular yang mengandung melamin telah terbukti melalui pemeriksaan rutin dengan metode *formalin-fixed, paraffin-embedded* dari ginjal hewan domestik (Lewin-

Tabel 3. Gejala klinis akibat melamin, asam sianurat, melamin-sianurat.

Hewan	Bahan	Gejala klinis	Referensi
Domba	Melamin dalam suplemen pakan	Penurunan berat badan	MacKenzie, 1966
Mencit B6C3F1	Melamin	Penurunan berat badan	NTP (National Toxicology Programme), 1983
Kucing	Melamin dan asam sianurat	Muntah, kelemahan umum dan anoreksi	Puschner <i>et al.</i> , 2007
Anjing	Melamin dalam <i>dog food</i>	Rasa sakit pada abdomen, kelemahan umum, anoreksi, muntah dan depresi.	Cocchi <i>et al.</i> , 2010
Babi	Melamin dalam yeast	Anoreksia, kurus, rambut kusam, dan depresi	Lee <i>et al.</i> , 2011
Wistar jantan	Melamin	Penurunan berat badan, hematuria	An et al., 2011

Tabel 4. Dampak melamin, asam sianurat atau melamin sianurat dan pada saluran perkencingan

Hewan	Bahan	Perubahan	Referensi
Domba	Melamin	Terbentuk kristaluria	Clark, 1966
Kucing	Melamin dan asam sianurat dalam pakan komersial	Terbentuk batu ginjal	Puschner <i>et al.</i> , 2007
Ikan Salmon	Asam sianurat	Kompleks kristal melamin-sianurat dalam ginjal	Reimschuessel <i>et al.</i> , 2008
Babi	Melamin sianurat	Kristal pada ginjal	Reimschuessel <i>et al.</i> , 2008
Kucing	Melamin dalam pakan komersial	Kristal mengandung melamin sianurat dalam ginjal	Dobson <i>et al.</i> , 2008
Anjing	Melamin dalam pakan komersial	Deposisi kristal yang mengandung Melamin dalam tubulus ginjal dan pelvis renalis. Deposit urolith dalam medulla ginjal	Cocchi <i>et al.</i> , 2010
Mencit	Melamin	Terbentuk batu ginjal	Peng <i>et al.</i> , 2012
Tikus F344	Melamin sianurat	Gagal ginjal akut	Kobayashi <i>et al.</i> , 2016

Smith *et al.*, 2009). Selain menyebabkan kristaluria, melamin juga dapat menyebabkan diuresis pada tikus percobaan dan anjing (Melnick *et al.*, 1984; Brown *et al.*, 2007). Hasil penelitian kandungan pakan komersial yang ditarik dari peredaran juga mengandung melamin dan asam sianurat yang kemungkinan mengakibatkan terbentuknya kristal di urin dan ginjal kucing (Burns *et al.*, 2007).

Laporan di Klinik Hewan Departemen Ilmu Penyakit Dalam, FKH-UGM juga menunjukkan banyaknya kasus kristal yang ditemukan dalam urin pada kucing. Dari anamnesa yang diperoleh, hampir semua pasien kucing tersebut diberi pakan kering komersial dengan berbagai nama dagang (Nururrozi *et al.*, 2018). Meskipun demikian, dalam kasus kasus tersebut diatas masih diperlukan analisa lebih lanjut untuk mendeteksi adanya melamin dan/atau turunannya, baik dalam pakan maupun kristal yang terbentuk dalam urin.

Tabel 4 menunjukkan berbagai penelitian maupun laporan kasus yang melibatkan melamin, asam sianurat atau melamin sianurat dalam pembentukan batu ataupun kristal di saluran perkencingan. Dari Tabel 4 tersebut dapat terlihat bahwa melamin dan/atau turunannya yang diberikan pada hewan percobaan ataupun yang terkandung dalam pakan komersial dapat mengakibatkan berbagai bentuk gangguan pada saluran perkencingan. Menurut Dobson *et al.* (2008) Melamin sianurat memiliki kelarutan yang sangat rendah dan dihipotesiskan bahwa hal tersebut akan mengarah pada pembentukan kristal melamin sianurat di dalam ginjal. Diasumsikan bahwa melamin sianurat diserap dalam saluran pencernaan, didistribusikan secara sistemik dan meskipun belum jelas, melamin sianurat akan membentuk endapan dalam tubulus ginjal selanjutnya akan menyebabkan penyumbatan tubular yang bersifat progresif serta degenerasi. Penyumbatan tersebut pada akhirnya akan mengakibatkan gagal ginjal.

### Kesimpulan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa melamin, asam sianurat dan melamin sianurat merupakan senyawa yang berbahaya karena kemampuannya mengakibatkan penyakit pada saluran perkencingan hewan kesayangan, terutama anjing dan kucing. Meskipun diperlukan peralatan yang canggih dan biaya mahal, saat ini deteksi melamin dalam bahan pakan maupun produk jadi harus dilakukan untuk menghindari terjadinya kasus penyakit saluran perken-

cingan yang diakibatkannya. Penanganan kasus kasus di klinik maupun rumah sakit hewan yang terkait dengan gangguan saluran perkencingan saat ini harus mulai diarahkan salah satunya terhadap kemungkinan akibat mengonsumsi melamin yang mungkin terdapat dalam produk pakan jadi untuk anjing maupun kucing.

### Daftar Pustaka

- Abbas, O., Lecler, B., Dardenne, P. and Baeten, V. (2013). Detection of Melamine and Cyanuric Acid in Feed Ingredients by near Infrared Spectroscopy and Chemometrics *J. Near Infrared Spectrosc.* 21(3): 183-194. doi: 10.1255/jnirs.1047.
- An, L., Li, Z., Yang, Z. and Zhang, T. (2011). Cognitive Deficits Induced by Melamine in Rats. *Toxicol. Lett.* 206 (3): 276–280. doi:10.1016/j.toxlet.2011.08.009.
- Andersen, W.C., Turnipseed, S.B., Karbiwnyk, C.M., Clark, S.B., Madson, M.R. and Gieseker, C.M. (2008). Determination and Confirmation of Melamine Residues In Catfish, Trout, Tilapia, Salmon, and Shrimp by Liquid Chromatography With Tandem Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 56(12):4340-4347. doi:10.1021/jf800295z.
- Anonim. (2009). MELAMINE CAS N°:108-78-1. UNEP Publications. [www.inchem.org/documents/sids/sids/108781.pdf](http://www.inchem.org/documents/sids/sids/108781.pdf).
- Barbee, S.J., Cascieri, T., Hammond, B.G., Inoue, T., Ishida, N., Wheeler, A.G., Chadwick, M., Hayes, D., MacCauley, M., and McComish, A. (1984). Metabolism and Disposition of Sodium Cyanurate. *Toxicologist.* 4: 92.
- Barboza, D. and Barrionuevo A. (2007). Filler in animal feed is open secret in China. *New York Times*, 30 April 2007 (<http://www.nytimes.com/2007/04/30/business/worldbusiness/30food.html>).
- Baynes, R.E., Smith, G., Mason, S.E., Barrett, E., Barlow, B.M. and Riviere, J.E. (2008). Pharmacokinetics of Melamine In Pigs Following Intravenous Administration. *Food Chem. Toxicol.* 46(3): 1196 – 1200. DOI:10.1016/j.fct.2007.11.013.

- Bizzari, S. and Yokose, K. (2008). Melamine. In: *Chemical economics handbook*. Menlo Park, CA, SRI Consulting, Inc. (<http://www.sriconsulting.com/CEH/Public/Reports/673.3000/>; diakses 16 Januari 2018).
- Brown, C.A., Jeong, K.S., Poppenga, R.H., Puschner, B., Miller, D.M., Ellis, A.E., Kang, K.I., Sum, S., Cistola, A.M. and Brown S.A. (2007). Outbreaks of Renal Failure Associated With Melamine and Cyanuric Acid In Dogs and Cats in 2004 and 2007. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19 (5): 525–531. DOI:10.1177/104063870701900510.
- Burns, K., Nolen, S., Kahler, S., Rezendes, A. (2007). Recall of Pet Food Leaves Veterinarians Seeking Solutions. *J Am Vet Med Assoc.* 230 (8):1128–1129, 1136–1138. 10.2460/javma.230.8.1126.
- Cheng, Y., Dong, Y., Wu, J., Yang, X., Bai, H., Zheng, H., Ren, D., Zou, Y. and Li, M. (2010). Screening Melamine Adulterant in Milk Powder with Laser Raman spectrometry. *J. Food Compos. Anal.* 23 (2): 199-202. doi.org/10.1016/j.jfca.2009.08.006.
- Chuenarrom, C., Daosodsai, P. and Charoenphol, P. (2014). Effect of Excessive Trichloroisocyanuric Acid in Swimming Pool Water on Tooth Erosion. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 36 (4): 445-450.
- Cianciolo, R.E., Bischoff, K., Ebel, J.G., Van Winkle, T.J., Goldstein, R.E. and Serfilippi, L. M. (2008). Clinicopathologic, Histologic, And Toxicologic Findings in 70 Cats Inadvertently Exposed to Pet Food Contaminated with Melamine and Cyanuric Acid. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 233(5): 729–737. doi: 10.2460/javma.233.5.729.
- Clark, R. (1966). Melamine Crystalluria in Sheep. *JSAVA.* 37 (3): 349–351.
- Cocchi, M., Vascellari, M., Gallina, A., Agnoletti, F., Angeletti, R. and Mutinelli, F. (2010). Canine Nephrotoxicosis Induced by Melamine-Contaminated Pet Food in Italy. *J. Vet. Med. Sci.* 72(1): 103–107. <https://doi.org/10.1292/jvms.09-0278>.
- Cruywagen, C.W., Stander, M.A., Adonis, M. and Calitz, T. (2009) Hot topic: Pathway confirmed for the transmission of melamine from feed to cow's milk. *J. Dairy Sci.* 92 (5):2046–2050 doi:10.3168/jds.2009-2081.
- Ding, T., Xu, J., Li, J., Shen, C., Wu, B., Chen, H. and Li, S. (2008). Determination of Melamine Residue in Plant Origin Protein Powders Using High Performance Liquid Chromatography-diode Array Detection and High Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Chin. J. Chrom.* 26 (1):6-9.
- Dobson, R.L., Motlagh, S., Quijano, M., Cambron, R.T, Baker, T.R., Pullen, A.M., Regg, B.T., Bigalow-Kern, A.S., Vennard, T., Fix, A., Reimschuessel, R., Overmann, G., Shan, Y. and Daston, G.P. (2008). Identification and Characterization of Toxicity Of Contaminants in Pet Food Leading to an Outbreak of Renal Toxicity in Cats and Dogs. *Toxicol. Sci.* 106(1):251-262. doi: 10.1093/toxsci/kfn160.
- Dorne, J.L., Doerge, D.R., Vandenbroeck, M., Fink-Gremmels, J., Mennes, W., K., Knutsen, H.K., Vernazza, F., Castle, L., Edler, L. and Benford, D. (2013). Recent Advances in The Risk Assessment of Melamine and Cyanuric Acid in Animal Feed. *Toxicology and Applied Pharmacology* 270 (3): 218-229. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.01.012>.
- Downes, C.J., Mitchell, J.W., Viotto, E.S. and Eggers, N.J. (1984). Determination of Cyanuric Acid Levels In Swimming Pool Waters By U.V. Absorbance, HPLC And Melamine Cyanurate Precipitation. *Water Research* 18 (3): 277-280. doi.org/10.1016/0043-1354(84)90100-3.
- EFSA. (2010). Scientific Opinion on Melamine in Food and Feed EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM) and EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids (CEF) European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy. *EFSA Journal* 2010; 8(4):1573.
- El-Rabey, H.A., Al-Sieni, A.I. and Majami, A.A. (2013). The Toxic Effect of Melamine on the Kidney of Male Rats as Revealed by Biochemical and Histopathological Investigations. *Life Sci J.* 10(1):2119-2130.
- FDA. (2008). Melamine Pet Food Recall of 2007. <https://www.fda.gov/AnimalVeterinary/.../RecallsWithdrawals/ucm129575.htm>.

- Filazi, A., Sireli, U.T., Ekici, H., Can, H.Y. and Karagoz, A. (2012). Determination of Melamine in Milk and Dairy Products by High Performance Liquid Chromatography. *J. Dairy Sci.* 95(2):602-608. doi:10.3168/jds.2011-4926.
- Fremelin, L.J. and Pelzing, M. (2009). Melamine and cyanuric acid detection in 5 minutes using LCMS. Australia: Bruker Daltonics Division, Application note.
- Garber, E.A.E. (2008). Detection of Melamine Using Commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Technology. *Journal of Food Protection.* 71(3): 590–594. DOI10.4315/0362-028X-71.3.590.
- Gonzalez, J., Puschner, B., Perez, V., Ferreras, M.C., Delgado, L., Munoz, M., Perez, C., Reyes, L.E., Velasco, J., Fernandez, V. and Garcia-Marin, J.F. (2009). Nephrotoxicosis in Iberian piglets subsequent to exposure to melamine and derivatives in Spain between 2003 and 2006. *J Vet Diagn Invest* 21 (4):558–563 <https://doi.org/10.1177/104063870902100425>.
- Gossner, C.M.E., Schlundt, J., Embarek, P.B., Hird, S., Wong, D.L.F., Beltran, J.J.O., Keng Teoh, N. and Tritscher, A. (2009). The Melamine Incident: Implications for International Food and Feed Safety. *Environ. Health Perspect.* 117(12): 1803-1808. doi: 10.1289/ehp.0900949.
- Hammond, B.G., Barbee, S.J., Wheeler, A.G., and Cascieri, T. (1985). *Fundamental and Applied Toxicology.* 5(4): 655–664. [https://doi.org/10.1016/0272-0590\(85\)90189-7](https://doi.org/10.1016/0272-0590(85)90189-7).
- Hau, A.K., Kwan, T.H., and Li, P.K. (2009). Melamine toxicity and the kidney. *Journal of American Society of Nephrology.* 20 (2): 245–250. doi:10.1681/ASN.2008101065.
- He, L., Liu, Y., Lin, M., Awika, J., Ledoux, D.R., Li, H. And Mustapha, A. (2008). A new approach to measure melamine, cyanuric acid, and melamine cyanurate using surface enhanced Raman spectroscopy coupled with gold nano-substrates. *Sens. & Instrumen. Food Qual.* 2: 66–71. doi:10.1007/s11694-008-9038-0.
- Huthmacher, K., and Most, D. (2005). Cyanuric Acid and Cyanuric Chloride. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry.* Wiley-VCH, Weinheim. doi 10.1002/14356007.a08 191.
- Ingelfinger, J.R. (2008). Melamine and the Global Implications of Food Contamination. *N Engl. J. Med.* 359:2745-2748. DOI: 10.1056/NEJMp0808410.
- International Agency for Research on Cancer [IARC]. (2010). Monograph on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Man. Geneva. WHO. IARC. Monographs Vol.73. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol73/mono73-17.pdf>.
- Ji, A.L., Wong, Y.L., Cai, T.J. and Liu, J. (2014). Infant formula safety concerns and consequences in China. *World J Pediatr.* 10 (1): 7-9. doi: 10.1007/s12519-014-0447-3.
- Kobayashi, T., Okada, A., Ando, R., Tozawa, K., Kohri, K. and Yasui, T. (2016). MP58-13 The Mechanism Of Renal Stone Formation And Renal Failure Induced By Melamine And Cyanuric Acid; Longterm Experiment Results. *The Journal Of Urology.* 195 (4): Supplement, e781. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.juro.2016.02.811>.
- Krotz, L., Cicerci, E. and Giazzi, G. (2008). Protein Determination in Cereals and Seeds. *Food Quality* 15(4):37–39.
- Kumar, A., and Katiyar, V. (1990). Modelling and Experimental Investigation of Melamine Formaldehyde Polymerization. *Macromolecules* 23 (16): 3729–3736. DOI: 10.1021/ma00218a003.
- Lam, H.S., Ng, P.C., Chu, W.C., Wong, W., Chan, D.F., Ho, S.S., Wong, K.T., Ahuja, A.T. and Li, C.K. (2008). Renal Screening In Children After Exposure To Low Dose Melamine In Hong Kong: Cross Sectional Study. *BMJ.*; 337:a2991. doi.org/10.1136/bmj.a2991.
- Lee, C.H., Ooi, P.T., Sheikh Omar, A.R. and Lim, B.K. (2011). Melamine Toxicity in Pigs. *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.* 34 (1): 175-179.
- Lewin-Smith, M.R., Kalasinsky, V.F., Mullick, F.G., Thompson, M.E. (2009). Letters to the Editor : Melamine-Containing Crystals in the Urinary Tracts of Domestic Animals: Sentinel Event?. *Arch Pathol Lab Med.* 133 (3): 341-342. DOI:10.1043/1543-2165-133.3.341.
- Lin, M., He, L., Awika, J., Yang, L., Ledoux, D. R., Li, H. and Mustapha, A. (2008). Detection of

- Melamine In Gluten, Chicken Feed And Processed Foods Using Surface Enhanced Raman Spectroscopy and HPLC. *Journal of Food Science*. 73(8): T129–T134. DOI:10.1111/j.1750-3841.2008.00901.x.
- Lipschitz, W.L. and Stokey, E. (1945). The Mode of Action Of Three New Diuretics: Melamine, Adenine And Formoguanamine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 83 (4) 235-249.
- Liu, Y., Deng, J., An, L., Liang, J., Chen, F. and Wang, H. (2011). Spectrophotometric Determination Of Melamine In Milk By Rank Annihilation Factor Analysis Based On Ph Gradual Change-UV Spectral Data. *Food Chemistry*. 126 (2): 745-750. doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.057.
- Liu, G., Li, S., Jia, J., Yu, C., He, J., Yu, C. and Zhu, J. (2010). Pharmacokinetic Study of Melamine In Rhesus Monkey After a Single Oral Administration of A Tolerable Daily Intake Dose. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 56 (2):193–196. doi:10.1016/j.yrtph.2009.09.014.
- Liu, Y., Todd, E.D., Zhang, Q., Shi, J.R. and Liu, X.J. (2012). Recent Developments In The Detection Of Melamine. *J Zhejiang Univ Sci B* 13(7): 525-532. *J Zhejiang Univ Sci B*. 13(7): 525–532. doi: 10.1631/jzus.B1100389.
- Lutter, P., Perroud, M.C.S., Gimenez, E.C., Meyer, L., Goldmann, T., Bertholet, M.C., Mottier, P., Desmarchelier, A., Florence, M., Perrin, C., Robert, F. and Delatour, T. (2011). Screening and Confirmatory Methods For The Determination of Melamine In Cow's Milk And Milk-Based Powdered Infant Formula: Validation And Proficiency-Test of ELISA, HPLC-UV, GC-MS and LC-MS/MS. *Food Control*. 22(6) :903-913. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.11.022.
- MacKenzie, H.I. (1966). Melamine for sheep. *J. S. Afr. Vet. Med. Ass.* 37(2): 153-157.
- Mast, R.W., Jeffcoat, A.R., Sadler, B.M., Kraska, R.C. and Friedman, M.A. (1983). Metabolism, disposition and excretion of [14C]melamine in male Fischer 344 rats. *Food Chem Toxicol* 21(6): 807–810. DOI10.1016/0278-6915(83)90216-8.
- Maxwell, G.R. (2007). Synthetic Nitrogen Products. In: *Kent and Riegel's handbook of industrial chemistry and biotechnology*, 11th ed. New York, NY, Springer, pp. 996–1085.
- Melnick, R.L., Boorman, G.A., Haseman, J.K., Montali, R.J. and Huff, J. (1984). Urolithiasis and Bladder Carcinogenicity Of Melamine In Rodents. *Toxicol Appl Pharmacol*. 72 (2): 292–303. https://doi.org/10.1016/0041-008X(84)90314-4.
- Meng, Z., Shi, Z.H., Liang, S.X., Dong, X.F., Lu, Y.K. and Sun, H.W. (2015). Rapid Screening and Quantification of Cyromazine, Melamine, Ammelide, Ammeline, Cyanuric Acid, And Dicyandiamide In Infant Formula By Ultra-Performance Liquid Chromatography Coupled With Quadrupole Time-Of-Flight Mass Spectrometry And Triple Quadrupole Mass Spectrometry. *Food Control*. 55:158-65. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.02.034.
- Miao, H., Fan, S., Wu, Y.N., Zhang, L., Zhou, P.P., Li, J.G., Chen, H.J. and Zhao, Y.F. (2009). Simultaneous Determination Of Melamine, Ammelide, Ammeline, And Cyanuric Acid In Milk And Milk Products By Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Biomed Environ Sci*. 22(2):87-94. doi: 10.1016/S0895-3988(09)60027-1.
- Montesano, D., Gennari, O., Festa, C., Zollo, F., Seccia, S. and Albrizio, S. (2013). A Simple HPLC-DAD Method for the Analysis of Melamine in Protein Supplements: Validation Using the Accuracy Profiles. *Journal of Chemistry*. 2013: 1-7. doi.org/10.1155/2013/239342.
- Moore, J.C., DeVries, J.W., Lipp, M., Griffiths, J.C. and Abernethy, D.R. (2010). Total Protein Methods and Their Potential Utility to Reduce the Risk of Food Protein Adulteration. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 9 (4): 330-357. doi 10.1111/j.1541-4337.2010.00114.x.
- Newton, G. L. and Utley, P.R. (1978). Melamine As A Dietary Nitrogen Source For Ruminants. *J. Anim. Sci.* 47 (6): 1338-1344. https://doi.org/10.2527/jas1978.4761338x.
- Nilubol, D., Pattanaseth, T., Boonsri, K., Pirarat, N. and Leepipatpiboon, N. (2009). Melamine- and Cyanuric Acid-Associated Renal Failure in Pigs in Thailand. *Vet Pathol* 46 (6):1156–1159 (2009) DOI: 10.1354/vp.08-VP-0233-N-FL.



- NTP (National Toxicology Programme). (1983). Carcinogenesis bioassay of melamine (CAS No. 108- 78-1) in F344/N rats and B6C3F1 mice (feed study). Research Triangle Park, NC, and Bethesda, MD, United States Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, National Toxicology Program (NTP Technical Report Series No. 245; NTP- 81-86; NIH Publication No. 83-2501; Available from [http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/LT\\_rpts/tr245.pdf](http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/LT_rpts/tr245.pdf)). National Toxicology Program technical Report Series. 245, 1-171.
- Nururrozi, A., Indarjulianto, S., Yanuartono, and Widayarni, S. (2018). Potensi Urine Acidifier untuk Mencegah Struvite Activity Product (SAP) pada Kasus Feline Lower Urinary Tract Disease (A case report). *Journal Veteriner* (submitted).
- Park, B.D. and Jeong, H.W. (2010). Cure kinetics of melamine-formaldehyde resin/clay/cellulose nanocomposites. *J. Ind. Eng. Chem.* 16 (3): 375–379. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2010.01.035>.
- Peng, J. , Li, D., Chan, Y.K., Chen, Y., Lamb, J.R., Tam, P.K. and El-Nezami, H. (2012). Effects of water uptake on melamine renal stone formation in mice. *Nephrol Dial Transplant.* 27 (6): 2225–2231 doi: 10.1093/ndt/gfr577.
- Puschner, B., Poppenga, R.H., Lowenstine, L.J., Filignezi, M.S. and Pesavento, P.A. (2007). Assessment of melamine and cyanuric acid toxicity in cats. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* 19(6): 616-624. DOI:10.1177/104063870701900602.
- Puschner, B. and Reimschuessel, R. (2011). Toxicosis Caused by Melamine and Cyanuric Acid In Dogs and Cats: Uncovering The Mystery and Subsequent Global Implications. *Clin Lab Med.* 31(1): 181-199. doi: 10.1016/j.cll.2010.10.003.
- Qiu, Y. and Gao, L. (2005). Blue-emitting cyanuric acid-melamine complexes from urea thermolysis. *Materials Research Bulletin.* 40 (5): 794-799. <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2005.02.003>.
- Reimschuessel, R., Evans, E.R., Stine, C.B., Hasbrouck, N., Mayer, T.D., Nochetto, C. and Giesecker, C.M. (2010). Renal crystal formation after combined or sequential oral administration of melamine and cyanuric acid. *Food Chem. Toxicol.* 48 (10): 2898–2906. doi: 10.1016/j.fct.2010.07.024 .
- Reimschuessel, R., Giesecker, C.M., Miller, R.A., Ward, J., Boehmer, J., Rummel, N., Heller, D.N., Nochetto, C., Turnipseed, S.B., Karbiwnyk, C.M., Satzger, R.D., Crowe, J.B., Wilber, N.R., Reinhard, M.K., Roberts, J.F. and Witkowski, M.R. (2008). Evaluation of the Renal Effects of Experimental Feeding of Melamine and Cyanuric Acid to Fish and Pigs. *Am J Vet Res.* 69 (9):1217–1228. <https://doi.org/10.2460/ajvr.69.9.1217>
- Reyers, F. (2008). Melamine is back. In milk and in South Africa. A veterinary perspective. *Veterinary News*, December issue.
- Schaber, P.M., Colson, J., Higgins, S., Dietz, E., Thielen, D., Anspach, B. and Brauer, J. (1999). Study of the Thermal Decomposition of Urea (Pyrolysis) Reaction and Importance to Cyanuric Acid Production. *American Laboratory.* 31(16): 13-21.
- She, D.M., Yu, H.L., Huang, Q.L., Li, F.M. and Li, C.J. (2010). Liquid-Phase Synthesis of Cyanuric Acid from Urea. *Molecules,* 15 (3): 1898-1902; doi:10.3390/molecules15031898.
- Shen, J.S., Wang, J.Q., Wei, H.Y., Bu, D.P., Sun, P. And Zhou, L.Y. (2010). Transfer Efficiency of Melamine From Feed to Milk In Lactating Dairy Cows Fed With Different Doses Of Melamine. *J Dairy Sci.* 93 (5) :2060–2066. DOI:10.3168/jds.2009-2590.
- Skinner, C.G., Thomas, J.D. and Osterloh, J.D. (2010). Melamine Toxicity. *J. Med. Toxicol.* 6(1):50–55 DOI 10.1007/s13181-010-0038-1.
- Straková, E., Karásková, K., Zapletal, D. and Suchý, P. (2014). Effect of Melamine And Cyanurid Acid Contaminated Diets On Blood Indicators In Broiler Chickens. *Czech J. Anim. Sci.* 59 (12): 564–570.
- Suchý, P., Straková, E., Herzig, I., Staňa, J., Kalusová, R. and Pospíchalová, M. (2009). Toxicological Risk Of Melamine And Cyanuric Acid In Food And Feed. *Interdiscip Toxicol.* 2(2): 55–59. doi: 10.2478/v10102-009-0010-6.

- Sugita, T., Ishiwata, H. and Yoshihira, K. (1990). Release of Formaldehyde and Melamine From Tableware Made of Melamine-Formaldehyde Resin. *Food Addit. Contam.* 7(1):21-27. DOI:10.1080/02652039009373815.
- Thompson, M. E., Lewin-Smith, M. R., kalasinsky, V. F. Pizzolato, K. M., Fleetwood, M. L., Mcelhaney, M. R. and Johnson, T. O. (2008). Characterization of Melamine-containing and Calcium Oxalate Crystals in Three Dogs with Suspected Pet Food-induced Nephrotoxicosis. *Vet Pathol.* 45(3):417-426. DOI:10.1354/vp.45-3-417.
- Vail, T., Jones, P.R. and Sparkman, O.D. (2007). Rapid and Unambiguous Identification of Melamine in Contaminated Pet Food Based on Mass Spectrometry with Four Degrees Of Confirmation. *J Anal Toxicol.* 31(6): 304–312. DOI:10.1093/jat/31.6.304.
- Wang, I.J., Wu, Y.N., Wu, W.C., Leonardi, G., Sung, Y.J., Lin, T.J., Wang, C.L., Kuo, C.F., Wu, K.Y., Cheng, W.C., Chan, C.C., Chen, P.C. and Lin, S.L. (2009). The Association of Clinical Findings and Exposure Profiles with Melamine Associated Nephrolithiasis. *Arch Dis Child.* 94(11):883–887. DOI:10.1136/adc.2009.163477.
- Wei, R., Wang, R., Zeng, Q., Chen, M. and Liu, T. (2009). High-Performance Liquid Chromatographic Method for the Determination of Cyromazine and Melamine Residues in Milk and Pork. *Journal of Chromatographic Science.* 47 (7) :581-584. DOI:10.1093/chromsci/47.7.581.
- Weise, E. (2007). Poison Pet Food Woes Seem To Hit Cats Harder. USA Today. [http://www.usatoday.com/tech/science/2007-05-07-poison-petfood-science\\_N.htm](http://www.usatoday.com/tech/science/2007-05-07-poison-petfood-science_N.htm). Retrieved 2008-10-01.
- Whitten, M.C. and Lin, C.T. (1999). Coating Performance of Polyester–Melamine Enamels Catalyzed by an in Situ Phosphatizing Reagent on Aluminum. *Ind. Eng. Chem. Res.* 38 (10): 3903–3910. DOI: 10.1021/ie990231i.
- WHO. (2008). Melamine and Cyanuric acid: Toxicity, Preliminary Risk Assessment and Guidance on Levels in Food 25 September 2008. - Updated 30 October 2008. [www.who.int/foodsafety/fs\\_management/Melamine.pdf](http://www.who.int/foodsafety/fs_management/Melamine.pdf).
- Xie, G., Zheng, X., Qi, X., Cao, Y., Chi, Y., Su, M., Ni, Y., Qiu, Y., Liu, Y., Li, H., Zhao, A. and Jia, W. (2010). Metabonomic Evaluation of Melamine-Induced Acute Renal Toxicity in Rats. *J. Proteome Res.* 9 (1):125–133 DOI: 10.1021/pr900333h.
- Yan, N., Zhou, L., Zhu, Z. and Chen, X. (2009). Determination of Melamine in Dairy Products, Fish Feed, and Fish by Capillary Zone Electrophoresis with Diode Array Detection. *J. Agric. Food Chem.* 57 (3): 807–811. DOI: 10.1021/jf803429e.
- Yang, H.H., Zhou, W.H., Guo, X.C., Chen, F.R., Zhao, H.Q., Lin, L.M. and Wang, X.R. (2009). Molecularly Imprinted Polymer as SPE Sorbent for Selective Extraction of Melamine in Dairy Products. *Talanta.* 80(2):821–825. doi: 10.1016/j.talanta.2009.07.067.
- Yokley, R.A., Mayer, L.C., Rezaaiyan, R., Manuli, M.E. and Cheung, M.W. (2000). Analytical Method for The Determination of Cyromazine and Melamine Residues In Soil Using LC-UV and GC-MSD. *J Agric Food Chem.* 48(8):3352-8. DOI: 10.1021/jf991231w.
- Yu, H., Tao, Y., Chen, D., Wang, Y., Liu, Z., Pan, Y., Huang, L., Peng, D., Dai, M., Liu, Z. and Yuan, Z. (2010). Development of High Performance Liquid Chromatography Method and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method With Pressurized Liquid Extraction for Simultaneous Quantification and Confirmation of Cyromazine, Melamine and Its Metabolites In Foods of Animal Origin. *Anal Chim Acta.* 682 (1-2): 48-58. DOI:10.1016/j.aca.2010.09.032.
- Zheng, X., Zhao, A., Xie, G., Chi, Y., Zhao, L., Li, H., Wang, C., Bao, Y., Jia, W., Luther, M., Su, M., Nicholson, J.K. and Jia, W. (2013). Melamine-Induced Renal Toxicity is Mediated by The Gut Microbiota. *Sci Transl Med.* 5(172):1-5 doi: 10.1126/scitranslmed.3005114.

## Kertas Saring sebagai Media Transpor Darah untuk Pemeriksaan Antibodi Rabies

### *Filter Paper as Blood Media Transpor for Detection of Antibodies to Rabies*

Retno Wijayanti<sup>1\*</sup>, Retno Damayanti<sup>2</sup>, Sri Murtini<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Badan Karantina Pertanian, Kementerian Pertanian, Jl. Harsono RM. No.3 Ragunan, Jakarta Selatan

<sup>2</sup>Departemen Ilmu Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Jl. Raya Dramaga, Babakan, Dramaga, Bogor.

\*Email : [retnovet@gmail.com](mailto:retnovet@gmail.com)

Naskah diterima: 25 Juli 2017, direvisi: 13 Oktober 2019, disetujui: 30 November 2019

#### Abstract

Rabies is a zoonotic disease. Rabies protection level detection was performed using antibody titration. Blood sampling activities in the field require special handling to avoid blood lysis, the sample delivery requires a cold chain with a stable temperature. Alternative method for whole blood sample delivery using filter paper were carried out on 48 samples from susceptible animals (dogs and cats) transported through the Soekarno Hatta Agricultural Quarantine Center. This study was designed to investigate the feasibility of filter paper sampling of blood at temperature of 26 °C to detect of rabies antibodies using indirect method of ELISA. The results of statistical analysis of Randomized Block Design and Tukey's test showed that the antibody titres of whole blood extracted from filter paper diluted in the PBS T 100 µl were equivalent to antibody titres of serum. Assessment of filter paper capability has sensitivity and specificity as much as 96% and 76%, positive predictive value of 67%, negative predictive value of 94% and reliability level of filter paper were 0.5 is moderate category. This indicates that the filter paper can be used as an alternative method of blood transport medium for rabies ELISA test.

**Key words:** ELISA; Filter paper; Rabies

#### Abstrak

Rabies merupakan penyakit infeksius pada hewan berdarah panas dan dapat menular ke manusia (zoonosis). Pemeriksaan kekebalan terhadap penyakit rabies dilakukan dengan mengukur titer antibodinya.. Kegiatan pengambilan sampel serum darah di lapangan memerlukan penanganan khusus agar tidak terjadi kerusakan dan mengalami lisis, sehingga dalam pengiriman sampel diperlukan rantai dingin yang harus tetap terjaga kestabilannya. Metoda alternatif pengiriman sampel darah utuh di lapangan menggunakan kertas saring dilakukan pada 48 sampel dari hewan penular rabies (anjing dan kucing) yang masuk melalui Balai Besar Karantina Pertanian Soekarno Hatta. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kelayakan pengambilan sampel darah yang diserap menggunakan kertas saring pada suhu 26° C dalam rangka mendeteksi antibodi rabies yang diuji dengan metode *indirect* ELISA.

Hasil analisa statistik Rancangan Acak Kelompok dan uji lanjut Tukey ekstraksi kertas saring darah utuh pada pengenceran pelarut PBS T 100 µl memiliki hasil titer antibodi sebanding dengan titer antibodi asal serum. Penilaian kemampuan kertas saring memiliki sensitifitas sebesar 96%, spesifitas 76%, nilai prediktif positif 67%, nilai prediktif negatif 94% dan tingkat keandalan kertas saring 0.5 dengan kategori cukup baik. Hal ini menunjukkan bahwa kertas saring cukup baik sebagai media transpor alternatif darah utuh untuk pengambilan sampel pada kondisi lapangan dengan uji ELISA rabies.

**Kata kunci:** ELISA; Kertas Saring; Rabies

## Pendahuluan

Rabies merupakan penyakit infeksius pada hewan berdarah panas dan dapat menular ke manusia (zoonosis). Hewan rentan antara lain anjing, kucing, dan kerbau, bahkan rabies bisa menyerang pada hewan-hewan liar seperti rakun, sikung, mangos, dan kelelawar sebagai resevoirnya (Soejodono 2004). Infeksi rabies mengakibatkan kerusakan pada sistem syaraf pusat sehingga menimbulkan kematian yang tinggi. Berdasarkan informasi data Office International des Epizooties (OIE) pada tahun 2016 hampir 70000 orang per tahun meninggal akibat kasus gigitan hewan penular rabies (HPR).

Menurut OIE (2016) dua per tiga negara-negara di belahan dunia terutama Afrika dan Asia termasuk Indonesia merupakan wilayah endemis rabies, dan umumnya merupakan negara berkembang. Penyebaran rabies mampu melewati batas negara dan benua didukung oleh perkembangan teknologi informasi dan transportasi. Peran mobilitas hewan penular rabies antar negara maupun antar area sebagai komoditas perdagangan hewan kesayangan semakin meningkat mengakibatkan semakin meningkatnya resiko penularan penyakit rabies. Dampak yang muncul akibat hal tersebut, rabies semakin sulit untuk dikendalikan. Peta sebaran penularan rabies telah menyebar hampir seluruhnya di wilayah Indonesia. Daerah yang masih bebas antara lain Nusa Tenggara Barat, Irian Jaya Barat, Papua, Kepulauan Riau, Bangka Belitung dan beberapa pulau kecil di Sumatra. Sebagian pulau Jawa telah bebas melalui pengendalian yang dilakukan dengan cara vaksinasi (Ditjennak 2010). Kejadian kasus gigitan anjing di Indonesia hingga saat ini masih tinggi. Berdasarkan data Dinas Peternakan dan Kesehatan Hewan Provinsi Kalimantan Barat dari tahun 2014 hingga 2016 tercatat 1068 kasus gigitan dan wilayah provinsi Kalimantan Barat telah ditetapkan sebagai Kejadian Luar Biasa (KLB) (Susilo 2016).

Sejak ditemukan pertama kali penyakit rabies di Indonesia pada kuda tahun 1884 oleh Schoorl, pada kerbau tahun 1889 oleh Esser dan anjing pada tahun 1890 oleh Penning (Soedijar dan Dharma 2005), hingga saat ini Indonesia masih terus berusaha untuk membebaskan penyakit tersebut dari wilayah negara Republik Indonesia. Berbagai negara telah menerapkan kebijakan program pemberantasan dan pengendalian rabies termasuk Indonesia melalui program vaksinasi, eliminasi HPR, mengendalikan transportasi dan lalu

lintas HPR, pengujian laboratorium serta *surveillance*. Sesuai Keputusan Kepala Badan Karantina Pertanian Nomor: 87/Kpts/Kr.120/L/1/2016 tentang Petunjuk Teknis Tindakan Karantina Hewan Terhadap Hewan Penular Rabies maka salah satu upaya pencegahan masuk dan menyebarnya penyakit rabies dilakukan screening test antibodi terhadap rabies. Menurut rekomendasi OIE (2008) salah satu uji serologi yang dapat dilakukan yaitu dengan metode indirect *Enzymelinked Immunosorbent Assay* (ELISA). ELISA merupakan salah satu uji untuk mendeteksi antibodi yang sangat berguna terkait dengan survey epidemiologi dalam populasi besar (Xu *et al.*, 2007). Sejauh ini tidak semua Unit Pelaksana Teknis (UPT) di lingkup Badan Karantina Pertanian memiliki sarana uji ELISA rabies. Apabila sampel berasal dari UPT yang tidak memiliki alat tersebut maka harus dikirim ke laboratorium UPT yang melakukan uji ELISA.

Kegiatan pengambilan sampel darah di lapangan sebagai bahan pemeriksaan laboratorium memerlukan penanganan khusus agar tidak terjadi kerusakan dan mengalami lisis. Pengiriman sampel diperlukan rantai dingin yang harus tetap terjaga kestabilannya. Rantai dingin untuk pengambilan sampel di lapangan tidak selalu dapat dilakukan terutama di daerah terpencil yang prasarana dan sarananya masih kurang. Salah satu upaya mendapatkan sampel dalam kondisi baik sampai di laboratorium adalah dengan menggunakan kertas saring sebagai alternatif media transpor darah. Prior (1990) telah melakukan koleksi dan metoda penyimpanan sampel darah secara sederhana menggunakan kertas saring untuk studi epidemiologi di daerah tropis terpencil. Koleksi darah dengan menggunakan kertas saring memiliki kelebihan dapat disimpan pada suhu kamar, mudah dibawa ke laboratorium dengan resiko biohazard yang rendah dan dapat diaplikasikan pada daerah yang tidak memiliki infrastruktur memadai (Hollegaard *et al.*, 2011). Petrini (2012) menyebutkan penggunaan kertas saring pertama kali telah dilakukan lebih dari 50 tahun yang lalu. Wasniewski *et al.* (2014) telah menggunakan kertas saring sebagai media transpor darah untuk menilai efektifitas vaksin rabies secara oral dengan mendeteksi titer antibodi pada hewan liar rubah dan rakun. Peneliti lain Choi *et al.* (2014) juga mengembangkan penggunaan kertas saring sebagai biobanking.

Uji serologi merupakan salah satu tindakan dalam membantu diagnosa laboratorium yang dipengaruhi

oleh kualitas sampel. Sampel diharapkan tidak mudah mengalami kerusakan selama perjalanan agar diperoleh hasil pemeriksaan yang valid. Penelitian ini bertujuan menguji kemampuan kertas saring dalam mengabsorpsi darah pada suhu 26 °C sebagai salah satu alternatif media transpor untuk pemeriksaan antibodi rabies.

### Materi dan Metode

Penelitian dilaksanakan pada bulan Desember 2016 sampai dengan April 2017 di Balai Besar Karantina Pertanian Soekarno Hatta dan Laboratorium Penelitian Terpadu Departemen Ilmu Penyakit dan Kesehatan Masyarakat Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan IPB.

### Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini *biosafety cabinet class II*, *ELISA reader* panjang gelombang 405nm, kit ELISA rabies PUSVETMA, inkubator, vortek, *stop watch*, mikropelat dasar U, *Micropipette volume* ≤ 10 µl, 50 µl, 300 µl dan 1000 µl, *multichannel micropipette* 20-100 µl, tabung 25 ml, 100 ml, dan 1000 ml, *disposal tube*, kertas saring Whatman nomor 1, plastik, larutan *phosphate buffered saline* Tween (PBS T) 0.05% , spuit 23G.

### Desain Penelitian dan Besaran Sampel

Pengambilan sampel dengan teknik *consecutive sampling* berdasarkan sampel hewan penular rabies (anjing dan kucing) yang masuk melalui Balai Besar Karantina Pertanian Soekarno Hatta. Besaran sampel yang diambil berdasarkan rumus  $n = 1.96^2 PQ/d^2$  dengan keterangan  $n$  = besaran sampel,  $P$  = asumsi prevalensi,  $Q = 1 - P$  dan  $d$  = derajat presisi (Pfeiffer 2002). Berdasarkan perhitungan tersebut diperoleh besaran sampel sebanyak 48 sampel. Hewan uji dengan status divaksin dilengkapi data dokumen buku vaksinasi rabies. Pengambilan darah melalui vena *cephalica antibrachii anterior*. Sampel merupakan darah utuh yang diambil menggunakan spuit dan diserap kertas saring. Volume darah utuh 0.2 ml diserap kertas saring sampai terserap jenuh pada luasan kertas saring 3 cm x 1.5 cm. Kertas saring yang digunakan adalah kertas saring Whatman nomor 1. Kertas saring dikeringkan pada suhu 26 °C selama 2 jam dan 3 hari selanjutnya dapat disimpan dalam kantong plastik. Pengujian ELISA dilakukan pada hari pertama dan tiga hari setelah masa pengambilan.

### Ekstraksi Kertas Saring

Kertas saring dipotong menggunakan pelubang kertas (perforator) berdiameter 6 mm. Satu cakram kertas saring dilarutkan dalam PBS Tween 0.05% pada volume 100 µl, 200 µl, dan 300 µl. Campuran ini divortex selama 5 menit. Kemudian ekstrak kertas saring digunakan untuk uji ELISA.

### Pengujian Antibodi Rabies

Pemeriksaan antibodi terhadap virus rabies pada penelitian ini menggunakan metode ELISA sesuai dengan rekomendasi OIE tahun 2008 dalam *Manual of Standards for Diagnostisic Test and Vaccines*. Metode ELISA mempunyai spesifisitas yang baik dan sesuai penggunaannya sebagai metode uji cepat titer antibodi yang memerlukan waktu sekitar 4 jam. Titer serum ditentukan berdasarkan *optical density* (OD) dalam bentuk ekuivalen unit (EU) terhadap serum standar OIE. Hasil titer yang protektif ditunjukkan dengan nilai  $\geq 0.6$  EU/ml yang nilainya ekuivalen dengan  $\geq 0.5$  IU/ml sebagai standar protektif titer antibodi. Sampel serum diencerkan 1/100 dalam PBST sesuai petunjuk kit ELISA. Pengujian ELISA dilakukan pada sampel hasil ekstraksi kertas saring dan sampel serum. Selanjutnya nilai titer antibodi rabies pengenceran kertas saring yang mendekati nilai titer pengenceran serum dapat digunakan sebagai standar pengenceran.

### Prosedur Analisis Data

Hasil penelitian dianalisis statistik menggunakan Rancangan Acak Kelompok dilanjutkan Uji Tukey. Kemampuan kertas saring sebagai media transpor diuji dengan menentukan sensitivitas, spesifisitas, nilai prediktif positif (NPP), nilai prediktif negatif (NPN) dan analisis kesepakatan *Kappa Cohen* ( $k$ ). Klasifikasi rentang nilai kappa dari 0 sampai dengan 1. Interpretasi nilai kappa 0.4 sampai dengan 0.6 adalah sedang, diatas 0.6 adalah baik (Pfeiffer 2002)

### Hasil dan Pembahasan

Penyerapan sampel darah utuh mengalir melalui pori-pori kertas saring sebagai media transpor. Metode penyerapan darah menggunakan kertas saring mampu dilakukan karena kertas saring mengandung 90% sampai dengan 99% serat selulosa sebagai komponen terpenting. Jaringan kertas saring tersusun atas selulosa secara acak dan terdapat bagian yang tidak berserat sebagai kapiler sehingga memudahkan penyerapan

cairan (Sahin dan Arslan 2008). Kertas saring dengan luas 4.5 cm<sup>2</sup> mampu menyerap darah sejumlah 0.2 ml, sehingga dapat diperoleh konsentrasi darah pada satu keping cakram berdiameter 6 mm sejumlah 12.6 µl. Semua komponen darah yang diserap pada kertas saring akan mengalami proses penggumpalan dan tetap berada di jaringan selulosa kertas saring. Konsentrasi antibodi dalam darah yang dapat diserap kertas saring menurut Jarujamrus *et al.* (2012) mencapai 34% sampai dengan 42% pada permukaan serat selulosa kertas saring. Artinya kemungkinan konsentrasi antibodi yang terdapat pada satu keping cakram kertas saring sekitar 4.2 µl sampai dengan 5.3 µl.

Darah utuh yang diserap kertas saring diekstraksi menggunakan pelarut PBS T untuk melarutkan kembali semua komponen materi yang telah diserap. PBS T selain sebagai pelarut juga berfungsi sebagai larutan pencuci sesuai petunjuk pada kit ELISA. Menurut katalog Whatman kertas saring tersusun atas selulosa murni asetat yang dapat digunakan untuk analisis biologis, klinis, dan uji sterilitas. Membran selulosa asetat memiliki ikatan protein yang rendah dan bersifat hidrofilik sehingga komponen darah yang telah diserap dengan mudah dilarutkan kembali pada pelarut PBS T. Menurut Wang J (2014) hidrofobitas pada permukaan kertas merupakan faktor penting lainnya terutama untuk *microfluidic* berbasis kertas sehingga aliran cairan pada kertas dapat berpola menuju saluran aliran hidrofilik.

Standarisasi pengenceran satu cakram kertas saring menggunakan pelarut PBS T dengan mem-

bandingkan hasil titer antibodi asal serum tersaji pada Tabel 1. Pada tabel tersebut dapat dilihat bahwa proses ekstraksi pada satu cakram kertas saring dengan volume pelarut yang semakin meningkat diperoleh nilai titer antibodi yang semakin menurun. Ekstraksi dengan volume pelarut yang lebih tinggi berakibat pada penurunan konsentrasi IgG sehingga tingkat densitas optikal menurun (Natalia dan Priadi 1998).

Hasil analisa statistik menggunakan Rancangan Acak Kelompok dilanjutkan uji Tukey terlihat titer antibodi pengenceran kertas saring pada volume pelarut 100 µl tidak berbeda nyata dengan titer antibodi asal serum. Sementara pengenceran kertas saring pada volume pelarut 200 µl tidak berbeda nyata terhadap titer antibodi serum dan titer antibodi hasil ekstraksi pengenceran 300 µl. Hasil titer antibodi nampak berbeda nyata pada pengenceran 300 µl terhadap titer antibodi asal serum. Hasil uji ini menunjukkan bahwa titer antibodi pada kertas saring yang dilarutkan dengan pelarut PBS T 100 µl sebanding dengan titer antibodi asal serum. Hal ini menunjukkan bahwa kertas saring dapat menyerap darah dan mengikat Ig G serta melepaskan kembali pada pelarut PBS T dengan nilai titer setara serum pada volume pengenceran pelarut 100 µl. Penyerapan darah yang merata dan jenuh sangat berpengaruh pada kesetaraan sampel kertas saring dan serum (Natalia dan Priadi 1998).

Kelompok variabel lain sebagai pembanding kemampuan kertas saring adalah lama penyimpanan kertas saring. Hasil analisa diperoleh perbedaan yang nyata antara pengujian ELISA hari pertama dan

Tabel 1. Rata rata titer antibodi sampel serum dan ekstraksi kertas saring

Kelompok	Rata rata Titer Antibodi Serum (EU)	Rata rata Titer Antibodi dari Ekstraksi Kertas Saring dalam pelarut PBS Tween dengan volume berbeda		
		100 (µl)	200 (µl)	300 (µl)
1 Hari	5.94 ± 0.5 <sup>ap</sup>	6.05 ± 0.6 <sup>ap</sup>	5.41 ± 0.5 <sup>abp</sup>	4.35 ± 0.6 <sup>bp</sup>
3 Hari	2.61 ± 0.4 <sup>aq</sup>	2.78 ± 0.4 <sup>aq</sup>	2.13 ± 0.6 <sup>abq</sup>	1.76 ± 0.5 <sup>bq</sup>

<sup>ab</sup> Angka pada baris yang sama diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada selang kepercayaan 95%;

<sup>pa</sup> Angka pada kolom yang sama diikuti oleh huruf yang tidak sama berbeda nyata pada selang kepercayaan 95%; ELISA EU ± SE

Tabel 2. Sensitivitas dan spesifisitas kertas saring dalam pelarut PBS Tween 100µl terhadap serum pada hari pertama

Kelompok	n	(+)	(-) Palsu	(-)	(+) Palsu	Sv	Sp	NPP	NPN	k
Serum	48	27		21		100%	100%	100%	100%	
Kertas Saring	48	26	1	16	5	96%	76%	67%	94%	0.5

(+) = positif; (-) = negatif; Sv = Sensitivitas; Spesifisitas; NPP = nilai prediktif positif; NPN = nilai prediktif negatif; k = kappa

hari ketiga. Smit *et al.* (2014) menyatakan bahwa penggunaan kertas saring sebagai media sampel uji diagnostik dipengaruhi oleh suhu tinggi dan kelembaban dalam waktu yang panjang sehingga dapat mengurangi sensitivitas uji terutama di daerah tropis. Perubahan secara kimiawi seperti oksidasi dan degradasi proteolitik protein terjadi pada suhu sedang dan reaksi akan semakin besar pada suhu tinggi. Penyimpanan pada suhu kamar sering mengakibatkan degradasi antibodi sehingga antibodi menjadi tidak aktif, hal ini terjadi akibat adanya pertumbuhan mikroba (Johnson 2012)

Perbandingan sensitivitas dan spesifisitas serum dan kertas saring sebagai media transpor darah yang diekstraksi menggunakan pelarut PBS T 100 µl pada hari pertama ditampilkan pada tabel 2. Berdasarkan hasil di atas kertas saring memiliki sensitivitas sebesar 96% dan spesifisitas yang lebih rendah yaitu sebesar 76%. Nilai sensitivitas yang tinggi pada kertas saring menggambarkan bahwa koleksi darah menggunakan kertas saring mampu digunakan untuk mendeteksi antibodi rabies dengan uji ELISA. Spesifisitas yang lebih rendah akibat masih terdapatnya sampel positif palsu. Rendahnya spesifisitas pada kertas saring terkait dengan proses ekstraksi kertas saring, karena semua materi darah ikut terlarut sehingga terbawa antibodi lain yang memiliki paratop sama dengan epitop antigen rabies. Antibodi dapat mengenali daerah antigen yang relatif kecil, kadang-kadang dapat berikatan dengan epitop serupa pada molekul lain (Harlow dan Lane 1988). Nilai spesifisitas kertas saring yang rendah untuk uji ELISA rabies diharapkan dapat meminimalkan positif palsu antibodi rabies pada hewan yang benar-benar tidak memiliki antibodi terhadap rabies. Hal ini akan berbahaya apabila digunakan untuk mendeteksi antibodi rabies pada hewan yang belum divaksinasi. Menurut Blenden *et al.* (1985) pengujian serologis digunakan untuk mengevaluasi status kekebalan pada hewan ter vaksinasi rabies. Hewan yang telah divaksinasi diharapkan memiliki titer antibodi protektif terhadap rabies sehingga antibodi dapat merespon secara aktif bila terjadi infeksi rabies. Demikian juga menurut Cliquet *et al.* (2004) mengharapakan persentase positif palsu yang rendah untuk mendeteksi antibodi pada hewan dengan status telah divaksinasi rabies agar dapat menganalisa hewan yang memiliki antibodi spesifik terhadap rabies.

Nilai kemungkinan keberhasilan kertas saring dapat digunakan untuk mendeteksi positif dan negatif

antibodi berdasarkan nilai prediktif positif dan nilai prediktif negatif. Probabilitas hasil antibodi prediktif positif pada kertas saring sebesar 67% lebih rendah bila dibandingkan dengan nilai prediktif negatif antibodi menggunakan kertas saring yaitu 94%. Menurut Masson *et al* (2017) konsentrasi antibodi pada sampel yang diserap menggunakan kertas saring berpengaruh terhadap keberhasilan uji deteksi antibodi. Tingkat reliabilitas atau keandalan kertas saring sebagai media transpor sebesar 0.5 dan dikategorikan sedang atau cukup baik. Hal ini menunjukkan bahwa kertas saring cukup baik sebagai media transpor alternatif pada kondisi lapang untuk uji ELISA rabies.

### Kesimpulan

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa titer antibodi dari sampel kertas saring secara optimal dapat dilakukan pengenceran pada volume pelarut PBS T 100 µl dengan titer antibodi mendekati sampel asal serum. Titer antibodi pada penyimpanan kertas saring di hari pertama dengan suhu 26 °C berbeda nyata dengan titer antibodi pada kertas saring dengan penyimpanan hari ketiga. Kertas saring cukup baik digunakan sebagai alternatif media transport darah untuk pemeriksaan titer antibodi rabies.

### Ucapan Terima Kasih

Terima kasih penulis ucapkan kepada Badan Karantina Pertanian atas beasiswa S2 yang telah diberikan. Di samping itu, penghargaan penulis sampaikan kepada ibu Dr. Ir. Eliza Suryati Roesli, M.Si selaku Kepala Balai Besar Karantina Pertanian Soekarno Hatta yang telah memberikan ijin kepada penulis dalam pengambilan sampel untuk penelitian ini. Semoga karya ilmiah ini bermanfaat.

### Daftar Pustaka

- Badan Karantina Pertanian. Keputusan Kepala Badan Karantina Pertanian Nomor: 87/Kpts/Kr.120/L/1/2016 Tentang Petunjuk Teknis Tindakan Karantina Hewan Terhadap Hewan Penular Rabies. Jakarta (ID): Badan Karantina Pertanian.
- Blenden, DC., Torres-Anjel, M.J and Satalowich, F.T. (1985). *Application of laboratory technology in the evaluation of the risk of rabies transmissions by biting dogs and cats*. Di dalam *Advances in*

- animal welfare science. hlm 221-246. Fox, M.W dan Mickley, L.D, editor. Washington DC(US): The Humane Society of the United States. [http://animalstudiesrepository.org/acwp\\_vsm](http://animalstudiesrepository.org/acwp_vsm).
- Direktorat Jendral Peternakan Departemen Pertanian RI. (2010). Data penyebaran rabies di Indonesia. Jakarta (ID): Direktorat Jenderal Peternakan. Kementerian Pertanian.
- Choi, E.H., Lee, S.K., Ihm, C., and Sohn, H.K. (2014). Rapid DNA extraction from dried blood spots on filter paper: potential applications in biobanking. *Public Health Res Perspect.* 5(6): 351-357.
- Cliquet, F., McElhinney, L.M., Servat ,A., Boucher, J.M., Lowings, J.P., Goddard, T., Mansfield, K.L., and Fooks, A.R. (2004). Development of a qualitative indirect ELISA for the measurement of rabies virus specific antibodies from vaccinated dogs and cats. *J.Virol. Methods.* 117: 1-8.
- Harlow, E. and Lane, D. (1988). *Antibodies a Laboratory Manual.* New York. USA: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Hollegaard, M.V., Grove, J., Grauholm, J., Kreiner-Møller, E., Bønnelykke, K., Nørgaard, M., Benfield, T.L., Nørgaard-Pedersen, B., Mortensen, P.B., Mors, O., *et al.* (2011). Robustness of genome-wide scanning using archived dried blood spot samples as a DNA source. *BMC Genetics.* 12:58.
- Jarujamrus, P., Tian, J., Xu Li, Siripinyanond, A., Shiowatana, J., and Shen, W. (2012). Mechanisms of red blood cells agglutination in antibody treated paper. *The Royal Society of chemistry.* 137. 2205-2210.
- Johson, M. (2012). Antibody shelf life/how to store antibodies. *Mater Methods.* 2:120
- Katalog Whatman. (2010). *Filter Papers and Membranes.* [http://www.laboplus.pl/images/stories/katalogi/2010\\_whatman\\_catalog\\_full\\_fnl.pdf](http://www.laboplus.pl/images/stories/katalogi/2010_whatman_catalog_full_fnl.pdf).
- Masson, J., Douglass, J., Roineau, M., Aye, K.S., Htwe, K.M., Warner, J., Graves, M. (2017). Concordance between plasma and filter paper sampling techniques for the lymphatic filariasis bm14 antibody ELISA. *Tropical Medicine and Infectious Disease.* 2(2): 6.
- Natalia, L dan Priadi, A. (1998). Penggunaan kertas saring sebagai alat transpor sampel darah untuk uji serologi *Pasteurella Multocida* : Analisis dan perbandingan komposisi protein antara ekstrak kertas saring dan serum. *JITV.*3(3):182-187.
- Office International des Epizooties. (2008). Rabies disease. Manual of standard for diagnostic techniques. France (FR). Chapter 2.1.13. Terrestrial Manual. P.304-323.
- Office International des Epizooties. (2016). World Organization for Animal Health. Rabies Portal. France (FR). <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/rabies-portal/>.
- Petrini, C., Olivieri, A., Corbetta, C., Olivieri, A., Cerone, R., D'Agnolo, G., and Bompiani, A. (2012). Common criteria among States for storage and use of dried blood spot specimens after newborn screening. *Ann Ist Super Sanita.* 48(2):119-121.
- Pfeiffer, D.U. (2002). *Veterinary Epidemiology an Introduction.* Epidemiology Division Department of Veterinary Clinical Sciences. The Royal Veterinary College. London. UK: University of London.
- Prior, T.W., Highsmith Jr, W.E., and Friedman, K.J. (1990). A model for molecular screening of newborns: simultaneous detection of Duchenne/Becker muscular dystrophies and cystic fibrosis. *Clin Chem.* 36(10):1756-9.
- Sahin, T.H and Arslan, M.B. (2008). A study on physical and chemical properties of cellulose paper immersed in various solvent mixtures. *J.Mol.Sci.* 9: 78-88.
- Smit, P.W., Elliott, I., Peeling, W.R., Mabey, D., and Newton, P.N. (2014). An overview of the clinical use of filter paper in the diagnosis of tropical diseases. *J.Trop.Med.Hyg.* 90(2):195-210.
- Soedijar, I.L dan Dharma, D.M.N. (2005). Review rabies. *Prosiding Lokakarya Nasional Penyakit Zoonosis.* Jakarta. ID: Puslitbang Peternakan. Hlm 119-128. <http://digilib.litbang.pertanian.go.id/v2/katalog/buku/P/prosiding-lokakarya-nasional-penyakit-zoonosis/0/0/2005/review-rabies>.



- Soejodono. (2004). *Zoonoses*. Laboratorium KES-MAVET Departemen Penyakit Hewan dan Kesmavet. Fakultas Kedokteran Hewan. Bogor. ID. Institut Pertanian Bogor: 129-136.
- Susilo. (2016). Kasus gigitan rabies di Kalimantan Barat. <http://www.antarakalbar.com>.
- Wang, J. (2014). Printing and characterization of inks for paper-based biosensor. Tesis. Ontario. CA: Mc Master University. <https://macsphere.mcmaster.ca/bitstream/11375/.../fulltext.pdf>.
- Wasniewski, M., Barrat, J., Combes, B., Guiot, A.L., and Cliquet, F. (2014). Use filter paper blood samples for rabies antibody detection in foxes and raccoon dogs. *J.Virol Methods*. 204:11-16.
- Xu, G., Weber, P., Hu, Q., Xue, H., Audry, L., Li, C., Wu, J., and Bourhy, H. (2007). A simple sandwich ELISA (WELYSSA) for the detection of lyssavirus nucleocapsid in rabies suspected specimens using mouse monoclonal antibodies. *Biologicals*. 35. 297-302.

## Validasi Metode Analisis Tetrasiklin pada Ikan Nila (*Oreochromis sp.*) menggunakan Alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

### *Validation of Tetracycline Analysis Method on Tilapia Fish (Oreochromis Sp.) using High Performance Liquid Chromatography (HPLC)*

Nisa Hakimah<sup>1\*</sup>, R. Gagak Donny Satria<sup>1,2</sup>, Wari Pawestri<sup>3</sup>,  
Soedarmanto Indarjulianto<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Program Studi Teknik Penanganan Patologi Perikanan, Politeknik Kelautan dan Perikanan Sidoarjo, Jl. Raya Buncitan, Gedangan, Dusun Kp. Baru, Buncitan, Sidoarjo, Jawa Timur 61254

<sup>2</sup> Departemen Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Jl. Fauna 2 Karangmalang, Depok, Sleman, Yogyakarta 55281

<sup>3</sup> Program Studi Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret, Jl. Ir Sutami No.36 A, Pucangsawit, Jebres, Surakarta, Jawa Tengah 57126

<sup>4</sup> Departemen Ilmu Penyakit Dalam, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Jl. Fauna 2 Karangmalang, Depok, Sleman, Yogyakarta 55281

\*Email: [nisahakimah9293@gmail.com](mailto:nisahakimah9293@gmail.com)

Naskah diterima: 31 Maret 2018, direvisi: 06 Mei 2019, disetujui: 30 November 2019

#### Abstract

Antibiotics are substances that capable of inhibiting the growth of or killing microorganisms. The presence of residues in the tissues are associated with continuous use of antibiotics for long periods of time. The antibiotic residue that is often detected in freshwater fishery products is tetracycline. One method of analysis of tetracycline residues in fish meat is widely developed using high performance liquid chromatography (HPLC). This research was aimed to validate the method of analysis of tetracycline content in tilapia meat by using HPLC Shimadzu 6.1. The mobile phase consisting of methanol: acetonitrile: oxalic acid (5:15:80) with 1 ml / min flow rate, detector UV Vis with wavelength 355 nm, and C<sub>18</sub> Shim-pack column size 150 L x 4,6 mm at temperature of 30°C. The result of this research showed values corresponding to validation criteria based on parameters of specificity, precision, accuracy, linearity, limit of detection, and limit of quantification. Tetracycline analysis using HPLC tool has good and accurate validity as the first step in detecting the tetracycline level in tilapia meat.

**Key words:** HPLC; tetracycline; tilapia fish; validation

#### Abstrak

Antibiotik merupakan zat yang mampu menghambat pertumbuhan atau membunuh suatu mikroorganisme. Keberadaan residu di jaringan berhubungan dengan penggunaan antibiotik secara terus-menerus dalam jangka waktu lama. Residu antibiotik yang sering terdeteksi pada produk perikanan air tawar adalah tetrasiklin. Salah satu metode analisis terhadap kadar residu tetrasiklin pada daging ikan yang banyak dikembangkan secara luas yaitu menggunakan alat kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Penelitian ini bertujuan untuk melakukan validasi metode analisis kadar tetrasiklin pada daging ikan nila dengan menggunakan alat KCKT merek Shimadzu 6.1. Fase gerak yang terdiri dari campuran metanol:asetonitril:asam oksalat (5:15:80) dengan laju alir 1 ml/menit, detektor UV Vis dengan panjang gelombang 355 nm, dan kolom C<sub>18</sub> Shim-pack ukuran 150 L x 4,6 mm pada suhu 30°C. Hasil penelitian menunjukkan nilai yang sesuai dengan kriteria validasi berdasarkan parameter spesifisitas, presisi, akurasi, linearitas, batas deteksi, dan batas kuantifikasi. Analisis tetrasiklin menggunakan alat KCKT menghasilkan validitas yang baik dan akurat sebagai langkah awal dalam mendeteksi kadar tetrasiklin pada daging ikan nila.

**Kata kunci:** ikan nila; KCKT; tetrasiklin; validasi

## Pendahuluan

Indonesia merupakan negara terbesar kedua di dunia sebagai produsen budi daya perikanan. Persentase peningkatan usaha budi daya perikanan dari tahun 2000 sebesar 21% setiap tahun (Saputri, 2017). Ikan nila merupakan salah satu komoditas penting dalam budi daya perikanan air tawar di Indonesia karena mudah dipelihara, bersifat *eurihaline*, laju pertumbuhan dan perkembangbiakannya cepat, serta tahan terhadap gangguan hama dan penyakit (Ardita dkk., 2015 dan Djunaedi dkk., 2016). Ikan nila sangat diminati oleh pasar dalam negeri dan pasar luar negeri. Ekspor *fillet* nila dalam bentuk beku dari Indonesia ke Amerika pada tahun 2004 mencapai 4.250 ton dan menduduki peringkat kedua setelah Cina. Permintaan yang cenderung meningkat menyebabkan budi daya ikan nila di Indonesia semakin meningkat dari tahun ke tahun. Permintaan pasar dunia terhadap ekspor *fillet* nila dari Indonesia hanya mampu melayani tidak lebih dari 0,1% (Wijaya dkk., 2015).

Jumlah ekspor produk perikanan dari Indonesia yang tidak mampu mencukupi permintaan pasar dunia diakibatkan oleh beberapa kasus penolakan. Salah satu kasus penolakan ekspor produk perikanan yang menjadi perhatian dunia adalah keberadaan residu kimia dalam jaringan. Keberadaan residu di jaringan dalam budi daya perikanan yang sering terjadi berhubungan dengan penggunaan antibiotik secara terus-menerus dalam jangka waktu lama (Lukistyowati dan Syawal, 2013 dan Nurhasnawati dkk., 2016). *United States Center for Disease Control and Prevention* dalam penelitian yang dilakukan oleh Lekshmi dkk. (2017) menyatakan bahwa antibiotik telah digunakan dalam dunia perikanan untuk *growth promotor*, efisiensi pakan, serta pencegahan dan pengobatan infeksi penyakit. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Mahmoudi dkk. (2014), Nurhasnawati dkk. (2016), serta Turk dan Halis (2016) menyatakan bahwa residu antibiotik yang sering terdeteksi pada ikan adalah tetrasiklin. Residu adalah sisa dari bahan kimia atau metabolitnya dalam jaringan atau organ hewan (Rahayu, 2009). Kadar residu antibiotik tetrasiklin dalam daging ikan yang direkomendasikan oleh Badan Standardisasi Nasional (2000) dan Vishnuraj dkk. (2016) adalah 0,1 ppm.

Salah satu metode analisis terhadap kadar residu antibiotik yang banyak dikembangkan secara luas adalah alat kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) (Anastasia, 2011). Metode analisis dengan alat KCKT memiliki beberapa kelebihan yaitu waktu

analisis cepat, jumlah sampel yang diperlukan sedikit, kepekaan tinggi, dapat digunakan pada sampel organik atau anorganik, memiliki daya pisah molekul yang baik, dapat menggunakan berbagai macam detektor, dan kolom yang telah digunakan dapat digunakan kembali (Sabrina dkk., 2012).

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan validasi metode analisis kadar tetrasiklin dengan menggunakan alat KCKT sebagai langkah awal dalam mendeteksi kadar tetrasiklin pada daging ikan nila. Validasi metode analisis merupakan suatu penilaian terhadap parameter tertentu berdasarkan percobaan laboratorium untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya (Harmita, 2004). Parameter dalam melakukan validasi metode analisis adalah linearitas, spesifisitas, presisi, akurasi, batas deteksi, dan batas kuantifikasi (Sugihartini dkk., 2014). Penelitian ini diharapkan memberikan informasi yang akurat mengenai metode analisis tetrasiklin pada daging ikan nila menggunakan KCKT dan dapat dijadikan sebagai pedoman penelitian yang akan datang.

## Materi dan Metode

Antibiotik yang digunakan dalam penelitian ini adalah *tetracycline hydrochloride* 95% (Sigma-Aldrich) dengan dosis bertingkat mulai 2,5 µg/ml; 5 µg/ml; 7,5 µg/ml; 10 µg/ml; 12,5 µg/ml; dan 15 µg/ml. Daging ikan nila (*Oreochromis* sp.), metanol 99,9%, asetonitril 99,9%, asam oksalat dihidrat 0,126%, *di-sodium hydrogen phosphate* (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), *citric acid monohydrate* (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>-H<sub>2</sub>O), *ethylene dinitrilo tetraacetic acid* (Na<sub>2</sub>EDTA), *aqua bidestilata*, dan *aquades* juga digunakan dalam penelitian ini.

Alat yang digunakan berupa alat KCKT Shimadzu 6.1 dengan sistem kontrol SCL-10A VP, detektor SPD-10AV VP, *degasser* DGU-14A, pompa LC-10AD VP, oven CTO-10AC VP, dan kolom C<sub>18</sub> Shim-pack (150 L x 4,6 mm). Alat lain yang digunakan adalah *syringe* KCKT, *ultrasonic bath*, mikropipet, tip mikropipet, *microtube* 2 ml, *vortex mixer*, *centrifuge*, timbangan digital, spatula, gelas ukur, gelas beker, batang pengaduk, kertas perkamen, kertas saring, tabung konikel, labu erlenmeyer, labu ukur, pisau, dan telenan.

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada. Metode yang digunakan merupakan pengembangan metode berdasarkan Badan Standardisasi Nasional (2009), Balta dan Hasmets (2010), Olatoye dan Afisu (2013), Mahmoudi dkk. (2014),

Nurhasnawati dkk. (2016), Turk dan Halis (2016), serta Wijayanti dkk. (2010). Tahapan dalam penelitian ini adalah pembuatan Bufer McIlvaine, pembuatan larutan standar, preparasi sampel, injeksi sampel, dan analisis hasil.

Bufer McIlvaine digunakan sebagai pelarut larutan standar dan preparasi jaringan ikan nila. Bufer McIlvaine merupakan campuran dari  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , dan  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  dalam *aquabidestilata*. Sebanyak 23,41 gram  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  dan 21,01 gram  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$  masing-masing dilarutkan dalam 1 liter *aqua bidestilata*. Larutan  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  sebanyak 625 ml dicampurkan dengan 1 liter larutan  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$  ke dalam labu ukur yang selanjutnya ditambah dengan  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  sebanyak 60,49 gram. Larutan yang sudah tercampur secara homogen dimasukkan ke dalam tabung erlenmeyer yang kemudian dimasukkan ke dalam *ultrasonic bath* yang telah terisi *aquades* dengan suhu 30 °C selama 15 menit.

Larutan standar dibuat dengan melarutkan 10 mg tetrasiklin murni dengan metanol sebanyak 10 ml. Pengenceran larutan standar dilakukan dengan menggunakan pelarut Bufer McIlvaine. Dosis bertingkat yang digunakan adalah 2,5 µg/ml; 5 µg/ml; 7,5 µg/ml; 10 µg/ml; 12,5 µg/ml; dan 15 µg/ml yang selanjutnya akan ditambahkan pada daging ikan nila.

Sebanyak 1 gram daging ikan nila yang telah dihaluskan, dimasukkan ke dalam tabung konikel pertama dan ditambahkan Bufer McIlvaine sebanyak 5 ml yang kemudian dihomogenkan dengan menggunakan *vortex mixer* selama 30 detik. Bufer McIlvaine sebanyak 4 ml ditambahkan lagi ke dalam konikel pertama yang kemudian dihomogenkan dengan langkah yang sama dan disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 2500 g. Supernatan diambil, disaring, dan ditampung pada tabung konikel kedua. Tabung konikel pertama ditambahkan 4 ml Bufer McIlvaine, dihomogenkan, dan disentrifugasi dengan langkah yang sama. Supernatan diambil dan ditambahkan pada tabung kedua. Sisa homogenat tabung pertama dibilas kembali dengan menggunakan 2 ml Bufer McIlvaine, dihomogenkan, dan disentrifugasi dengan langkah yang sama. Supernatan ditambahkan kembali pada tabung kedua yang selanjutnya supernatan kolektif pada tabung kedua disentrifugasi selama 20 menit dengan kecepatan 2500 g dan disaring ke tabung ketiga serta diberi label.

Analisis tetrasiklin menggunakan alat KCKT tipe isokratik (Shimadzu versi 6.1). Fase gerak yang

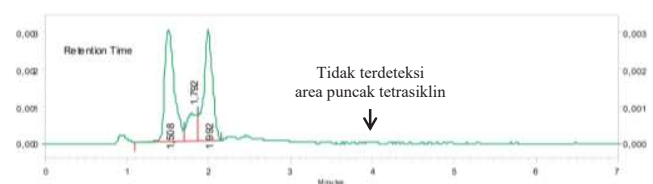
digunakan merupakan campuran dari metanol, asetonitril, dan asam oksalat dalam akuabides (5 : 15 : 80) yang dialirkan pada laju alir 1 ml/menit. Kolom yang digunakan yaitu  $\text{C}_{18}$  Shim-pack dengan ukuran 150 L x 4,6 mm dan detektor UV-Vis yang dioperasikan pada panjang gelombang 355 nm dalam suhu 30 °C. Optimasi alat KCKT dioperasikan pada *running time* 7 menit. Sampel diinjeksikan menggunakan *syringe* khusus KCKT dengan ukuran 20 µl. Detektor mampu mendeteksi kandungan tetrasiklin dalam sampel dan menghasilkan kromatogram. Parameter validasi yang dianalisis dari hasil penelitian meliputi spesifisitas, presisi, tingkat akurasi, linearitas, batas kuantifikasi, dan batas deteksi.

## Hasil dan Pembahasan

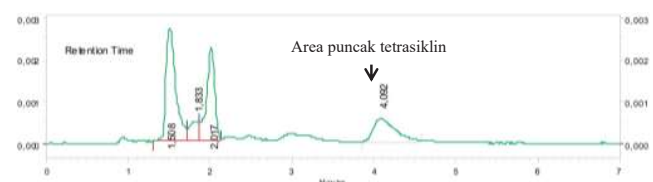
Sampel daging ikan nila yang telah ditambahkan tetrasiklin pada berbagai konsentrasi yang telah ditentukan dianalisis dengan menggunakan alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Validasi metode dilakukan dengan beberapa parameter yaitu spesifisitas, presisi, tingkat akurasi, linearitas, batas kuantifikasi, dan batas deteksi (Rohman, 2009).

### Spesifisitas

Spesifisitas merupakan kemampuan suatu metode analisis dalam mengukur analit yang dituju secara tepat dan spesifik dengan adanya komponen-komponen lain yang terdapat dalam matriks sampel. Spesifisitas diukur dengan membandingkan hasil analisis sampel yang mengandung bahan tambahan atau cemaran dengan hasil analisis sampel tanpa bahan tambahan (Rohman, 2009). Hasil kromatogram sampel blangko dan kromatogram sampel yang telah ditambahkan tetrasiklin ditunjukkan pada gambar 1 dan gambar 2.



Gambar 1. Hasil kromatogram sampel blangko



Gambar 2. Hasil kromatogram *spiking* tetrasiklin pada daging ikan nila dengan dosis 1,5 µg/g

Tabel 1. Data perhitungan hasil kromatogram sampel yang ditambahkan tetrasiklin dengan enam konsentrasi bertingkat.

Konsentrasi (µg/g)	Rata-rata luas area puncak	RSD (%)	Akurasi (%)
1,5	10543,3	0,03	101
1,25	8624	0,02	100
1	6201,33	0,03	91
0,75	5377	0,06	107
0,5	3615,33	0,08	110
0,25	1189,33	0,08	85

Berdasarkan hasil kromatogram, gambar 1 dan gambar 2 menunjukkan perbedaan analisis hasil kromatogram antara sampel blangko dengan sampel *spiking* tetrasiklin pada daging ikan nila. Berdasarkan hasil kromatogram gambar 1, tidak menunjukkan area puncak dengan waktu retensi antara menit ke-4,0 sampai menit ke-4,2 sedangkan gambar 2 menunjukkan kemunculan area puncak pada menit ke-4,092. Kemunculan area puncak pada gambar 2 menunjukkan bahwa metode analisis kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dapat mendeteksi keberadaan tetrasiklin.

Rata – rata luas area yang terbentuk pada Tabel 1 menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi tetrasiklin yang ditambahkan maka semakin besar luas area puncak yang terbentuk. Luas area puncak yang terbentuk pada setiap konsentrasi tetrasiklin yang ditambahkan pada sampel juga dapat diamati sebagai penentuan parameter spesifisitas. Berdasarkan hasil kromatogram yang terbentuk menunjukkan bahwa metode analisis dengan alat KCKT dapat membedakan senyawa tetrasiklin secara cermat dan tepat pada waktu retensi tertentu dengan tidak terdeteksi kemunculan senyawa pengganggu pada area puncak tersebut sehingga parameter spesifisitas dapat dikategorikan baik.

### Presisi

Presisi merupakan suatu ukuran kedekatan pada serangkaian hasil analisis dengan beberapa kali pengukuran pada sampel homogen (Rohman, 2009). Presisi dibagi menjadi tiga parameter yaitu keterulangan (*repeatability*), presisi antara (*intermediate precision*), dan ketertiruan (*reproducibility*) (Chan, 2008). Keterulangan merupakan ketepatan pada kondisi percobaan yang sama baik orang, peralatan, tempat, maupun waktu. Keterulangan dapat diukur dengan pengulangan minimal enam kali dengan

konsentrasi analit 100% atau dapat pula dilakukan dengan pengulangan minimal sembilan kali yaitu tiga konsentrasi dengan tiga kali pengulangan (Rohman, 2009). Berdasarkan Tabel 1 menunjukkan data perhitungan hasil kromatogram sampel yang ditambahkan tetrasiklin dengan konsentrasi bertingkat. Tingkat keterulangan dalam penelitian ini ditunjukkan oleh enam sampel dengan pengulangan masing-masing sebanyak tiga kali.

Kriteria presisi yang baik diberikan jika metode menunjukkan nilai *relative standart deviation* (RSD) atau koefisien variasi sebesar 2% atau kurang (Harmita, 2004). Nilai RSD yang disajikan Tabel 1 yaitu antara nilai 0,02–0,08%. Nilai RSD yang dihasilkan memiliki nilai kurang dari 2%. Hal tersebut menunjukkan bahwa metode analisis memiliki nilai presisi yang baik karena dapat mendeteksi tetrasiklin dengan nilai luas area yang tetap pada konsentrasi tertentu.

### Tingkat akurasi

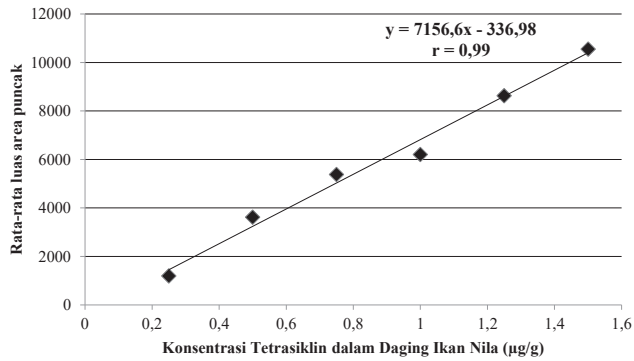
Akurasi merupakan parameter ukuran yang ditunjukkan dengan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya dan dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan (Harmita, 2004). Penentuan akurasi dilakukan dengan metode analisis terhadap senyawa tersebut dan menganalisisnya secara kuantitatif dengan membandingkan hasil analisis antara senyawa standar dengan kemurnian yang sudah diketahui (Rohman, 2009).

Hasil perhitungan nilai *recovery* yang disajikan pada Tabel 1 diketahui bahwa nilai *recovery* antara 85-110%. Hal tersebut menunjukkan bahwa nilai *recovery* pada penelitian ini sesuai dengan parameter dari FDA (2001) yaitu 80-120%. Metode analisis dalam penelitian ini dapat dikatakan akurat karena memiliki tingkat kedekatan yang tinggi antara hasil analisis dengan kadar analit yang ditambahkan.

### Linearitas

Linearitas merupakan kemampuan suatu metode uji dalam menghasilkan suatu hasil uji yang proporsional terhadap kepekatan analit sampel dalam jangkauan kepekatan yang ada (Harmita, 2004). Linearitas ditentukan dengan metode regresi kuadrat kecil sebanyak tiga kali pengulangan untuk setiap konsentrasi (Anastasia, 2011).

Pengukuran linearitas dilakukan dengan membuat pengenceran bertingkat sebanyak enam titik dosis.



Gambar 3. Grafik linearitas sampel daging ikan nila yang ditambahkan tetrasiklin

Linearitas yang baik akan menunjukkan nilai  $r \geq 0,99$  (AOAC, 2002). Berdasarkan hasil pengujian linearitas pada Gambar 3 diperoleh suatu persamaan linear  $y = 7156,6x - 336,98$  dengan nilai  $r = 0,99$ . Nilai  $r$  yang dihasilkan sesuai dengan yang direkomendasikan oleh AOAC (2002). Hal ini menunjukkan bahwa metode analisis yang digunakan memenuhi kriteria linearitas yang baik.

#### Batas kuantifikasi

Batas kuantifikasi adalah konsentrasi terendah suatu analit yang dapat dianalisis secara kuantitatif dan memenuhi persyaratan presisi yang diterima pada kondisi operasional metode analisis (Kazusaki dkk., 2012). Batas kuantifikasi sampel daging ikan nila yang telah ditambahkan tetrasiklin berdasarkan perhitungan rumus batas kuantifikasi adalah  $0,68 \mu\text{g/g}$ .

#### Batas deteksi

Batas deteksi dilakukan untuk mengetahui suatu analit dengan konsentrasi terendah dalam sampel yang dapat dideteksi dan memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blangko (Harmita, 2004). Batas deteksi sampel daging ikan nila yang telah ditambahkan tetrasiklin berdasarkan perhitungan rumus batas deteksi adalah  $0,2 \mu\text{g/g}$ .

#### Kesimpulan

Metode analisis tetrasiklin pada daging ikan nila menggunakan alat KCKT memiliki validitas yang baik dan tepat pada waktu retensi tertentu. Metode analisis ini dapat digunakan sebagai langkah awal dalam mendeteksi kadar tetrasiklin pada daging ikan nila.

#### Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini merupakan bagian dari rangkaian penelitian dan masih terus dikembangkan. Ucapan

terima kasih kepada pihak Departemen Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan UGM yang telah memberikan fasilitas dalam penelitian ini.

#### Daftar Pustaka

- Anastasia, Y. (2011). Teknik Analisis Residu Tetrasiklin Golongan Tetrasiklin dalam Daging Ayam Secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. *Buletin Teknik Pertanian*. 16 (2): 68-73.
- Ardita, N., Agung B., dan Siti L. (2015). Pertumbuhan dan Rasio Konversi Pakan Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) dengan Penambahan Prebiotik. *Jurnal Bioteknologi*. 12 (1): 16-21.
- Association of Official Analytical Chemists. (2002). AOAC International Methods Committee Guidelines for Validation of Qualitative and Quantitative Food Microbiological Official Methods of Analysis. *The Journal of AOAC International*. 85: 1-5.
- Badan Standardisasi Nasional. (2000). *Batas Maksimum Cemaran Mikroba dan Batas Maksimum Residu dalam Bahan Makanan Asal Hewan*. SNI 01.6366.2000, Jakarta: 1-12.
- Badan Standardisasi Nasional. (2009). *Cara Uji Kimia – Bagian II: Penentuan Residu Tetrasiklin dan Derivatnya dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) Pada Produk Perikanan*. SNI 2354, 11: 2009. Badan Standardisasi Nasional, Jakarta.
- Balta, F. dan Hasmet C. (2010). Oxytetracycline Residues in Cultured Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata L. 1758*) Tissues. *Africa Journal Biotechnology*. 9 (42): 7192-7196.
- Chan, C. (2008). *Analytical Method Validation Principles and Practices, Pharmaceutical Manufacturing Handbook: Regulation and Quality*. Azopharma Contract Pharmaceutical Services: Florida: 16-22.
- Djunaedi, A., Retno H., Rudhi P., Sri R., Retno W., dan Bintang S. 2016. Pertumbuhan Ikan Nila Larasati (*Oreochromis niloticus*) di Tambak dengan Pemberian Ransum Pakan dan Padat Penebaran yang Berbeda. *Jurnal Kelautan Tropis*. 19 (2): 131-142.
- Food and Drug Administration. (2001). *Guidance for industry: Bioanalytical method validation*.

- Center for Drug Evaluation and Research, Rockville. USA: 6.
- Harmita. (2004). Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. 1 (3): 117-135.
- Kazusaki, M., Ueda, S., Takeuchi, N., Ohgami, Y. (2012). Validation of Analytical Procedures by High-Performance Liquid Chromatography for Pharmaceutical Analysis. *Journal of Chromatography*. 33 (2): 65-73.
- Lekshmi, M., Parvathi A., Sanath K., dan Mannuel F. (2017). The Food Production Environment and the Development of Antimicrobial Resistance in Human Pathogens of Animal Origin. *Journal of Microorganisms*. 5 (11): 1-15.
- Lukistyowati, I., dan Syawal, H. (2013). Potensi Pakan yang Mengandung Sambiloto (*Andrographis paniculata*) dan Daun Jambu Biji (*Psidium guajava*) untuk Menanggulangi Bakteri *Aeromonas hydrophila* pada Ikan Baung (*Mystus nemurus*). *Jurnal Akuakultur Rawa Indonesia*. 1 (2): 135-147.
- Mahmoudi, R., P. Gasarbeygi, R. Norian, dan K. Farhoodi. (2014). Chloramphenicol, Sulfonamide, and Tetracycline Residues in Cultured Rainbow Trout Meat (*Oncorhynchus mykiss*). *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*. 17 (2): 147-152.
- Nurhasnawati, H., Siti J., dan Novita E. (2016). Penentuan Kadar Residu Tetrasiklin HCl pada Ikan Air Tawar yang Beredar di Pasar Segiri Menggunakan Metode Spektrofotometri Ultra Violet. *Jurnal Ilmiah Manuntung*. 2 (2): 173-178.
- Olatoye, I. O. dan Basiru, A. (2013). Antibiotic Usage and Oxytetracycline Residu in African Catfish (*Clarias gariepinus* in Ibadan, Nigeria). *World Journal of Fish and Marine Sciences*. 5 (3): 302-309.
- Rahayu, W. S., Dwi H., dan Agus M. (2009). Analisis Residu Pestisida Organoklorin pada Rimpang Kunyit (*Curcuma domestica*) secara M Spektrofotometri Ultraviolet Visibel. *Journal of Pharmacy*. 6 (1): 69-75.
- Rohman, A. (2009). *Kromatografi untuk Analisis Obat*. Graha Ilmu. Yogyakarta: 110-119, 217-240.
- Sabrina, A., Wonorahardjo, S., Zakia, N. (2012). Perbandingan Metode Spektrofotometri UV-Vis dan KCKT (Kromatografi Cair Kinerja Tinggi) pada analisis Kadar Asam Benzoate dan Kafein Teh Kemasan. *Jurnal Universitas Negeri Malang* . 1 (1).
- Saputri, K. (2017). Peluang dan Kendala Ekspor Udang Indonesia ke Pasar Jepang. *Jurnal Ilmu Hubungan International*. 5 (4): 1179-1194.
- Sugihartini, N., Fudholi, A., Pramono, S., dan Sismindari. (2014). Validasi Metode Analisa Penetapan Kadar Epigalokatekin Galat dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. *Jurnal Pharmacia*. 4 (2): 111-115.
- Turk, E. dan Halis O. (2016). Investigation of Tetracycline Residues in Fish Caught from Surrounding Fish Farm in Mugla District. *Eurasian Journal of Veterinary Sciences*. 32 (2): 74-79.
- Vishnuraj, M., G. Kandeepan, K. H. Rao, S. Chand, dan V. Kumbhar. (2016). Occurrence, Public Health Hazards and Detection Methods of Antibiotic Residues in Food of Animal Origin: A Comprehensive Review. *Journal of Cogent Food and Agriculture*. 2: 1-8.
- Wijayanti, A. D., Hakim, L., Widiyono, I., Irianti, T. (2010). Penentuan Efektifitas Oksitetrasiklin Melalui Parameter Farmakokinetiko/ Farmakodinamik pada Plasma dan Jaringan Ayam Broiler. *Jurnal Veteriner*. 11 (2): 119-125.
- Wijaya, O. A., Titi S., dan Sumardianto. (2015). Pengaruh lama Perendaman NaOH Removal Proses Penghilangan Lemak Terhadap Kualitas Gelatin Tulang Ikan Tulang Nila. *Jurnal Pengolahan dan Bioteknologi Hasil Perikanan*. 4 (2): 25-32

## **Performa Produksi dan Analisis Usaha Puyuh (*Coturnix coturnix japonica*) yang Diberi Substitusi *Black Soldier Fly Larvae* (BSFL) pada Pakan Komersil**

### ***Production Performance and Economic Analysis of Quail (*Coturnix coturnix japonica*) Given *Black Soldier Fly Larvae* (BSFL) as Commercial Feed Substitution***

**Fithria Nisa Hanifah<sup>1\*</sup>, Koesnoto Soepranionondo<sup>2</sup>, Soeharsono<sup>3</sup>, Anam Al Arif<sup>2</sup>, Widya Paramita Lokapirnasari<sup>2</sup>, Nenny Harijani<sup>4</sup>, Siti Hadijah<sup>1</sup>, Mariana Ruth Theresia Hutabarat<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Program Magister, Agribisnis Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

<sup>2</sup>Departemen Peternakan, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

<sup>3</sup>Departemen Anatomi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

<sup>4</sup>Departemen Kesehatan Masyarakat Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

<sup>1,2,3,4</sup>Kampus C, Jl. Mulyorejo, Kota Surabaya, Jawa Timur, Indonesia

\*Email: [fnh.vet@gmail.com](mailto:fnh.vet@gmail.com)

Naskah diterima: 27 Agustus 2019, direvisi: 11 September 2019, disetujui: 15 Oktober 2019

#### **Abstract**

Black Soldier Fly Larvae (BSFL) is an alternative protein source for livestock. This research aimed to know the effectiveness of BSFL for commercial feed substitution, related to production, productivity, and profitability in quail farm. This study used 80 quails which divided into 4 groups and each group consist of 20 quails. The treatments contained BSFL substitution with different composition, control group (P0) was given 100% commercial feed, (P1) was given a 5% BSFL substitution, (P2) was given a 10% BSFL substitution and (P3) was given a 20% BSFL substitution. Contribution margin (CM) analysis was used to determine the yields of the groups in this study. Results showed that the highest feed consumption rate is in P3, production (egg in total and weight), productivity and yields in P3 is the highest, although there's no difference between P0, P2 and P3 based on the analysis MANOVA. BSFL substitution at 20% is recommended to the farmers to increase profits.

**Key words:** BSFL; Egg mass; Egg production; Feed consumption; Quail Productivity

#### **Abstract**

*Black Soldier Fly Larvae* (BSFL) adalah sumber protein alternatif untuk ternak. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektivitas BSFL sebagai substitusi pakan komersial, terkait dengan produksi, produktivitas, dan profitabilitas di peternakan puyuh. Penelitian ini menggunakan 80 burung puyuh yang dibagi menjadi 4 perlakuan yang terdiri dari 20 ekor. Perlakuan mengandung substitusi BSFL dengan komposisi berbeda, perlakuan kontrol (P0) diberi pakan komersial 100%, (P1) diberi substitusi BSFL 5%, (P2) diberi substitusi BSFL 10% dan (P3) diberi 20 % Substitusi BSFL. Analisis margin kontribusi (CM) digunakan untuk menentukan keuntungan pada perlakuan dalam penelitian ini. Hasil menunjukkan bahwa tingkat konsumsi pakan lebih tinggi di P3, produksi (jumlah dan berat telur), produktivitas dan pendapatan di P3 adalah yang tertinggi, meskipun tidak ada perbedaan antara P0, P2 dan P3 berdasarkan analisis MANOVA. Substitusi BSFL sebanyak 20% direkomendasikan kepada petani untuk meningkatkan keuntungan.

**Kata Kunci:** berat telur; BSFL; konsumsi pakan; produksi telur; produktivitas puyuh



## Pendahuluan

Meningkatnya minat masyarakat terhadap telur puyuh merupakan peluang tersendiri bagi peternak puyuh untuk mengembangkan bisnisnya dan mengoptimalkan produksi ternaknya. Untuk mengembangkan bisnisnya dan mengoptimalkan produksi ternaknya, pakan yang berkualitas merupakan salah satu faktor yang menentukan keberhasilan suatu peternakan dan sekaligus menjadi komponen pengeluaran terbesar dalam suatu kegiatan usaha ternak unggas, yaitu sebesar 50 -70% dari biaya total (Veldkamp and Bosch, 2015), dan protein merupakan komponen penting dalam suatu formulasi pakan. Protein dibutuhkan oleh tubuh ternak dalam metabolisme vital, yang berkaitan dengan enzim, hormon, dan antibodi (Beski et al., 2015).

Protein asal insekta dinilai lebih ekonomis serta ramah lingkungan. Menurut penelitian yang telah dilakukan oleh Wardhana (2016) mengenai penggunaan insekta sebagai sumber protein pakan, insekta memiliki efisiensi konversi pakan yang tinggi, memungkinkan untuk diproduksi secara massal. Insekta juga memiliki nilai positif lain bagi lingkungan, mengurangi limbah organik yang berpotensi mencemari lingkungan (Li et al., 2011).

*Black Soldier Fly* (BSF) atau yang biasa disebut dengan lalat tentara hitam ini berasal dari Amerika, namun saat ini sudah tersebar di wilayah tropis dan sub tropis (Čičková et al., 2015) termasuk Indonesia. Penelitian mengenai penggunaan larva dari BSF (BSFL) dalam pakan unggas sebelumnya sudah pernah dilakukan pada ayam broiler (Okah dan Onjuwuri, 2012; Hopeley, 2015;), burung puyuh pedaging (Cullere, 2016) dan burung puyuh petelur (Widjiastuti, dkk. 2014) sebagai pengganti sumber protein dalam pakan. Tingginya protein dan kandungan asam amino yang tidak jauh berbeda dengan sumber protein lainnya membuat BSFL memiliki potensi sebagai pengganti sumber protein (Wardhana, 2016). Serangga dapat digunakan sebagai bahan pakan sumber protein bagi ternak, sebagai opsi alternatif dari tepung ikan dan kacang kedelai (Vrabec et al., 2015). Hopeley (2015) menyebutkan bahwa serangga merupakan bagian pakan alami untuk unggas khususnya. Selain protein, serangga juga mengandung lemak, mineral dan vitamin yang tinggi. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Hopeley (2015) penggunaan BSFL dalam pakan memberikan efek positif terhadap kualitas dan produktivitas telur.

Berbagai variasi penggunaan BSFL sebagai bahan substitusi parsial (terhadap komponen protein) telah banyak dilakukan pada berbagai unggas dan memberikan respon positif, namun penggunaan BSFL sebagai bahan substitusi dari pakan komersil masih belum dilaporkan. Penelitian ini bertujuan untuk melihat respon konsumsi pakan, produksi, produktivitas serta bobot telur yang dihasilkan dari burung puyuh (*Coturnix coturnix japonica*) yang diberi pakan dengan substitusi pakan komersil dengan BSFL sebanyak 5%, 10% dan 20%.

## Materi dan Metode

### Kelayakan Etik

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan keterangan kelayakan etik (*ethical clearance*) dari Komisi Etik Penelitian, Universitas Brawijaya No.1163-KEP-UB.

### Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama 6 minggu, pada 15 Mei - 26 Juni 2019. Analisis proksimat dan persiapan ransum dilaksanakan di Laboratorium Pakan Ternak, Departemen Peternakan, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Pemeliharaan hewan coba dilaksanakan di peternakan A farm, di Mijen, Semarang, Jawa Tengah.

### Bahan dan Instrumen Penelitian

Bahan – bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah pakan komersil Evisalis R5 Premium (PT. Welgro Feedmill Indonesia, dibawah lisensi Neovia, Perancis), BSFL, desinfektan menggunakan Rodalon®, air gula dengan perbandingan 20 gram gula dalam 1 liter air minum. Hewan coba yang digunakan sebanyak 80 ekor burung puyuh betina petelur umur 11 minggu asal kota Semarang.

Alat – alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah ember, saringan besar, pengaduk, timbangan digital, termometer ruangan, *hygrometer*, alat – alat pembersih kandang, *hand sprayer*, masker, *gloves*, lampu penerangan 40 watt, tempat pakan dan minum dari bahan plastik dan 40 unit kandang baterai dibuat dari kayu, bambu dan kawat ram. Tiap unit berukuran panjang 30cm x lebar 30 cm x tinggi 30 cm tiap unit berisi dua ekor burung puyuh.

**Pelaksanaan Penelitian**

Kandang terlebih dahulu didesinfeksi deng... Rodalon® dengan dosis 15 ml/ 10 liter air sebelum digunakan. Burung puyuh diberi minum air gula dengan perbandingan 20 gram gula dalam 1 liter air minum pada hari pertama kedatangan. Sebanyak 80 ekor burung puyuh diacak secara *random* menjadi 4 perlakuan yang terdiri dari 20 ekor.

Perlakuan berupa substitusi BSFL dalam pakan dengan beberapa konsentrasi, perlakuan kontrol (P0) diberi 100% pakan komersial, perlakuan (P1) diberi substitusi BSFL 5%, perlakuan (P2) diberi substitusi BSFL 10% dan perlakuan (P3) diberi substitusi 20% BSFL. Burung puyuh mulai dipelihara pada umur 11 minggu, adaptasi dua minggu kemudian mulai diberi perlakuan pada umur 13 minggu dan dipelihara sampai berumur 17 minggu.

Penetapan biosekuriti diberlakukan dengan mengharuskan setiap orang yang masuk harus menggunakan pakaian dan alas kaki khusus dan sudah disemprot desinfektan. Pengecekan kesehatan puyuh, pembersihan kotoran, pengukuran suhu dan kelembaban kandang dilakukan setiap hari. Pembersihan tempat makan dan minum juga dilakukan setiap hari. Desinfeksi kandang dilakukan dua kali seminggu.

Perhitungan data berupa konsumsi pakan, *egg mass* (EM) dan persentase *Quail Day Production* (QDP) dilaksanakan setiap minggu. Koleksi data jumlah konsumsi pakan, berat telur dan produksi telur dilakukan setiap hari. Perhitungan data berupa konsumsi pakan, *egg mass* (EM) dan persentase *Quail Day Production* (QDP) dilaksanakan setiap minggu. Penghitungan jumlah konsumsi pakan dilakukan dengan formula:

$$\text{Konsumsi Pakan} = \frac{\text{Pakan yang diberikan} - \text{Pakan sisa}}{\text{Lama pemeliharaan}}$$

Persentase QDP dihitung dalam periode minggu pada setiap ulangan, berikut adalah formula yang digunakan untuk menghitung QDP :

$$\text{Konsumsi Pakan} = \frac{\text{Pakan yang diberikan} - \text{Pakan sisa}}{\text{Lama pemeliharaan}}$$

Penghitungan EM dilakukan dalam periode mingguan, berikut formula yang digunakan dalam menghitung EM :

$$\text{EM} = \frac{\text{Bobot telur}}{\text{Jumlah telur}}$$

Analisa usaha dilakukan dengan cara menghitung *contribution margin* (CM). Perhitungan CM dilakukan pada akhir penelitian, formula yang digunakan dalam perhitungan CM dituliskan sebagai berikut:

**Analisis Data Statistik**

Data hasil eksperimen yang diperoleh kemudian dianalisa menggunakan analisis ragam peubah ganda (MANOVA) untuk membuktikan adanya perbedaan yang nyata dari perlakuan yang diberikan. Apabila diperoleh hasil yang berbeda atau berbeda sangat nyata maka dilanjutkan dengan uji jarak berganda *Duncan* (Kusriningrum, 2008). Analisis statistik menggunakan program SPSS for Windows 23.0. Data analisis finansial dan usaha dijabarkan secara deskriptif.

**Hasil dan Pembahasan**

**Analisis Proximat Perlakuan**

Analisis proximat dilakukan untuk mendapatkan nilai dari kandungan nutrisi pada tiap perlakuan. Berikut adalah hasil mengenai hasil analisis proximat :

**Konsumsi Pakan**

Penghitungan konsumsi pakan didapatkan dari pengurangan jumlah pakan yang diberikan dengan jumlah pakan yang tidak dikonsumsi selama penelitian kemudian dibagi dengan jumlah hari lama pemeliharaan (28 hari). Hasil olah data statistik mengenai konsumsi pakan selama periode penelitian per individu perlakuan terdapat pada tabel 2.

Tabel 1. Analisis Proximat BSFL dan Pakan Perlakuan yang Digunakan Selama Periode Penelitian

Bahan	Bahan Kering (%)	Abu (%)	Protein Kasar (%)	Serat Kasar (%)	Ca (%)	BETN (%)	Energi Metabolisme (Kcal/Kg)	Lemak Kasar (%)
BSFL	29,58	3,19	10,46	10,56	0,859	1,75	698,15	3,60
P0	91,87	12,94	20,11	3,58	4,93	45,10	3066,35	10,11
P1	88,75	12,45	19,62	3,93	4,72	42,93	2947,65	9,78
P2	85,64	11,96	19,14	4,27	4,52	40,76	2829,21	9,45
P3	79,41	10,99	18,18	4,97	4,11	36,43	2592,43	8,80

Tabel 2. Nilai Rata-rata dan Simpangan Baku Konsumsi Pakan Tiap Individu Perlakuan Selama Periode Penelitian

Perlakuan	Konsumsi Pakan (g/ekor/periode)
P0	653,90 ± 23,47 <sup>bc</sup>
P1	646,30 ± 23,58 <sup>b</sup>
P2	629,56 ± 8,56 <sup>a</sup>
P3	668,52 ± 6,87 <sup>c</sup>

Keterangan: Notasi (*superscript*) yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata ( $p < 0,05$ )

Hasil pada tabel 2 menunjukkan bahwa adanya perbedaan yang signifikan antara P1, P2 dan P3, sedangkan P0 tidak menunjukkan perbedaan nyata terhadap P1 dan P3. Terdapat beberapa faktor yang sangat mempengaruhi tingkat konsumsi pakan, diantaranya kualitas pakan, kuantitas pakan, palatabilitas pakan, serta kondisi individu puyuh yang meliputi umur dan ukuran badan (Dewi dan Setiohadi, 2010). Perbedaan konsumsi pakan dalam penelitian ini disebabkan oleh adanya perbedaan kualitas pakan (nutrisi yang terdapat dalam masing-masing pakan). Merujuk pada tabel 1 mengenai nutrisi dalam pakan setiap perlakuan, terlihat adanya perbedaan kandungan protein dan energi metabolisme pada tiap perlakuan. Kandungan protein dan energi metabolisme yang terdapat dalam pakan sangat berpengaruh terhadap tingkat konsumsinya (Suroso, 2016) karena unggas akan berhenti makan apabila energi metabolismenya sudah terpenuhi.

Faktor lain yang menyebabkan terjadinya perbedaan tingkat konsumsi pakan adalah kandungan kitin dalam BSFL. Kitin adalah polimer linier, tidak beracun, dan merupakan unsur utama eksoskeleton pada serangga. Kandungan kitin menyebabkan kurangnya efisiensi pakan, sehingga konsumsi pakan meningkat (Amao *et al.* 2010). Hal serupa juga dituliskan oleh Belluco *et al.*, (2013), kitin menyebabkan penurunan pencernaan terhadap bahan pakan yang berasal dari serangga. Konsumsi pakan tertinggi dalam penelitian ini ditunjukkan pada P3 yang mengandung BSFL sebanyak 20% dari total pakan.

### Produksi, Produktivitas dan Bobot Telur

Hasil produksi telur selama penelitian dihitung dari jumlah (butir) dan berat telur (kg) yang dihasilkan. Untuk perhitungan jumlah pembulatan dilakukan dengan cara apabila hasil  $> 0,5$  akan dibulatkan menjadi 1 telur. Tabel 3 menyajikan rerata hasil produksi per ekor puyuh selama periode penelitian:

Tabel 3. Rerata dan Simpangan Baku Hasil Produksi per Ekor Selama Periode Penelitian

Perlakuan	Jumlah (butir/ekor)	Pembulatan jumlah (butir)	Berat total telur (kg/ekor)
P0	46,70 ± 4,59 <sup>b</sup>	47 ± 5	0,47 ± 0,04 <sup>b</sup>
P1	37,10 ± 4,81 <sup>a</sup>	37 ± 5	0,38 ± 0,05 <sup>a</sup>
P2	44,30 ± 4,42 <sup>b</sup>	44 ± 4	0,46 ± 0,04 <sup>b</sup>
P3	46,80 ± 3,15 <sup>b</sup>	47 ± 3	0,49 ± 0,03 <sup>b</sup>

Keterangan: <sup>a,b</sup> Notasi (*superscript*) yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata ( $p < 0,05$ ).

Tabel 4. Rerata dan Simpangan Baku Hasil Produktivitas (QDP) Tiap Perlakuan Selama Periode Penelitian.

Perlakuan	Produktivitas (%)
P0	83,39 ± 0,81 <sup>b</sup>
P1	66,24 ± 0,85 <sup>a</sup>
P2	79,10 ± 0,79 <sup>b</sup>
P3	83,57 ± 0,56 <sup>b</sup>

Keterangan: <sup>a,b</sup> Notasi (*superscript*) yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata ( $p < 0,05$ ).

Produktivitas burung puyuh dapat dilihat melalui persentase QDP. Tabel 4 menyajikan hasil persentase QDP pada tiap perlakuan selama periode penelitian :

Pada tabel 3 dan 4 tidak terlihat adanya perbedaan yang signifikan antara P0, P2 dan P3. Perbedaan produksi dan produktivitas burung puyuh diyakini disebabkan oleh faktor pakan (nutrisi dalam pakan) sehingga manajemen pakan sangat berpengaruh terhadap tingkat produksi burung puyuh. Manajemen pakan terdiri atas beberapa komponen yaitu ketersediaan pakan, kualitas serta kuantitas pakan (Rahmasari *et al.* 2014). Merujuk pada tabel 1 mengenai nutrisi dalam pakan setiap perlakuan, serta tabel 2 mengenai tingkat konsumsi pakan, perbedaan nutrisi yang terkandung dalam pakan dan tingkat konsumsi pakan berpengaruh terhadap jumlah komponen nutrisi yang diperoleh ternak.

Brand *et al.*, (2003) menyebutkan bahwa faktor utama yang mempengaruhi produksi telur adalah jumlah dari konsumsi pakan dan nutrisi yang terdapat didalam pakan tersebut. Protein merupakan salah satu komponen terpenting dalam pakan yang berimbas langsung pada pertumbuhan badan dan reproduksi ternak (Permatahati dkk, 2018). Kandungan protein, terutama bagian asam amino (AA) yang terdapat didalamnya mampu mempengaruhi komponen sistem imun yang berhubungan dengan kesehatan burung puyuh (Abbasi *et al.*, 2014). Ketersediaan AA dalam

pakan juga mempengaruhi produksi telur, AA akan membentuk protein yang ada dalam telur (Santos *et.al.*, 2016).

Protein terdiri dari AA yang dibutuhkan untuk mempertahankan fungsi tubuh, pertumbuhan dan reproduksi. Asam amino terbagi menjadi dua golongan yaitu asam amino esensial (EAA) dan asam amino non-esensial (NEAA). Komponen NEAA diantaranya adalah glutamin, glutamat, prolin, glisin dan arginin (Wu, 2013) dapat ditransmisikan dari AA lain oleh tubuh hewan, oleh sebab itu, suplementasi NEAA tidak diperlukan. Berbeda dengan NEAA, seperti cysteine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, phenylalanine, threonine, tryptophan, tyrosine, and valine tidak disintesis dalam tubuh, sehingga diperlukan asupan AAE dari luar tubuh (Wu, 2014). Kandungan protein dalam pakan asal serangga dinilai mampu untuk memenuhi kebutuhan komposisi AA pada ternak (Józefiak & Engberg, 2015). Tabel 5 menyajikan rerata bobot telur yang dihasilkan perlakuan selama periode penelitian.

Pada tabel 5 tidak terlihat adanya perbedaan yang signifikan antara P0, P2 dan P3. Bobot telur dalam penelitian ini lebih besar apabila dibandingkan dengan hasil penelitian Tugiyanti, dkk (2017) yaitu  $9,36 \pm 0,40 - 9,73 \pm 0,19$  g/butir. Perbedaan bobot telur dalam penelitian ini diyakini disebabkan oleh perbedaan kadar protein yang terkandung dalam pakan pada masing-masing perlakuan (Permatahati dkk, 2018) serta tingkat konsumsi pakan (Brand *et al.*, 2003).

Protein dalam pakan mempengaruhi sintesis protein pada albumin dan kuning telur, dua komponen yang merupakan komponen terbesar penentuan bobot telur (Tugiyanti dkk, 2017). Protein yang cukup dalam pakan (minimal 17% berdasarkan SNI 01-3905-2006) dapat memenuhi kebutuhan organ reproduksi burung puyuh, sehingga dapat bersiklus lebih baik dan tepat waktu sehingga mampu meningkatkan keuntungan bagi peternak. Protein akan digunakan untuk

Tabel 5. Rerata dan Simpangan Baku Bobot Telur Tiap Perlakuan Selama Periode Penelitian

Perlakuan	Bobot Telur (g)
P0	$10,20 \pm 0,26^a$
P1	$10,34 \pm 0,15^a$
P2	$10,57 \pm 0,58^b$
P3	$10,65 \pm 0,10^b$

Keterangan: <sup>a,b</sup> Notasi (*superscript*) yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata ( $p < 0,05$ ).

menyediaan hormon – hormon dalam tubuh burung puyuh untuk produksi telur (Achmad, 2011). Protein juga mengandung komponen AA juga berpengaruh terhadap bobot telur. Alagawany dan Mahrose (2014) menyebutkan bahwa AA, terutama *lysine* dan *methionine* merupakan faktor utama dalam penentuan bobot telur. *Lysine* dan *methionine* dapat menstimulasi sekresi insulin dari pankreas dengan cara agregrasi dalam plasma yang akan melepaskan AA dari tempat penyimpanannya, kemudian memicu sintesa protein.

### Analisis Finansial

Komponen analisis finansial usaha yang diperhitungkan dalam penelitian ini adalah biaya variabel dan pendapatan, dalam penelitian ini biaya total tidak dihitung karena dianggap sama pada tiap perlakuan.

### Biaya Variabel

Biaya variabel yang terdapat dalam penelitian ini terdiri dari biaya pakan komersil dan BSFL. Biaya variabel dalam penelitian ini selama periode penelitian dirangkum dalam tabel 6.

Tabel 6. Harga Pakan Per Kg tiap Perlakuan Selama Periode Penelitian

Deskripsi	P0 (Rp)	P1 (Rp)	P2(Rp)	P3 (Rp)
Pakan komersil	6.000,00	5.700,00	5.400,00	4.800,00
BSFL	0	250,00	500,00	1.000,00
Total	6.000,00	5.950,00	5.900,00	5.800,00

Biaya konsumsi didapatkan dari rerata konsumsi pakan dikalikan dengan harga pakan pada tiap perlakuan. Tabel 7 menyajikan rerata biaya konsumsi pakan yang diberikan selama periode penelitian pada unit perlakuan.

Tabel 7. Rerata dan Simpangan Baku Biaya Konsumsi Pakan tiap Perlakuan Selama Periode Penelitian

Perlakuan	Biaya Konsumsi (Rp)
P0	$3920,30 \pm 145,59^b$
P1	$3845,51 \pm 140,35^b$
P2	$3714,41 \pm 50,52^a$
P3	$3839,42 \pm 39,89^b$

Keterangan: <sup>a,b</sup> Notasi (*superscript*) yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata ( $p < 0,05$ ).

Pada tabel 7 tidak terlihat adanya perbedaan yang signifikan antara P0, P2 dan P3. Merujuk pada tabel 6 mengenai harga pakan tiap perlakuan dan tabel

Tabel 8. Rerata dan Simpangan Baku Pendapatan tiap Perlakuan Berdasarkan Harga Per Butir

Perlakuan	Pendapatan (Rp)
P0	16.345,00± 1.608,56 <sup>b</sup>
P1	12.985,00± 1.686,22 <sup>a</sup>
P2	15.505,00± 1.548,19 <sup>b</sup>
P3	16.380,00± 1.104,33 <sup>b</sup>

Keterangan: <sup>a,b</sup>. Notasi (*superscript*) yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata (p<0,05).

Tabel 9. Rerata dan Simpangan Baku Pendapatan tiap Perlakuan Berdasarkan Harga Per Kg

Perlakuan	Pendapatan (Rp)
P0	12.858,00 ± 1.243,00 <sup>b</sup>
P1	10.362,78 ± <b>1.359,31<sup>a</sup></b>
P2	12.644,76 ± 1.208,99 <sup>b</sup>
P3	13.465,57 ± 897,92 <sup>b</sup>

Keterangan: <sup>a,b</sup>. Notasi (*superscript*) yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata (p<0,05).

2 mengenai tingkat konsumsi pakan tiap individu selama periode penelitian, terlihat bahwa P3 memiliki konsumsi pakan tertinggi, namun biaya pakan per-Kg terendah, sehingga biaya konsumsi tertinggi adalah P0.

### Pendapatan

Pendapatan dalam penelitian ini berasal dari penjualan telur puyuh. Pendapatan dipengaruhi oleh produksi, semakin tinggi produksi yang dihasilkan, maka pendapatan akan semakin bertambah. Terdapat dua harga jual produk yang diaplikasikan dalam penelitian ini, yaitu harga per butir dan harga per Kg. Harga per butir telur adalah Rp.350,00 dan harga per Kg adalah Rp.27.000,00. Harga per butir diberikan pada kostumer eceran (*direct marketing*) dan harga per Kg diberikan pada kostumer yang membeli dalam jumlah banyak (*wholeselling*). Berikut adalah tabel mengenai pendapatan berdasarkan harga jual per butir dan per Kg selama periode penelitian:

Pendapatan atas harga jual per Kg didapatkan dari mengalikan total produksi telur (Kg) dengan harga telur per Kg. Berdasarkan dari kedua tabel tersebut, pendapatan terbesar didapatkan dari penjualan per butir pada P3, baik dalam harga per butir maupun per Kg. Merujuk pada tabel 3 menyajikan hasil produksi selama periode penelitian, produksi telur tertinggi terdapat pada P3, sehingga pendapatan harga per butir tertinggi berada pada P3. Berdasarkan tabel 8 dan 9 tidak ada perbedaan yang signifikan antara P0, P2 dan

P3.

### Contribution Margin (CM)

*Contribution Margin* (CM) merupakan alat bantu yang dapat digunakan untuk menganalisis tingkat keuntungan dalam suatu produksi (Dewi dkk, 2017). *Contribution Margin* didapatkan dengan cara mengurangi jumlah pendapatan total dengan biaya variabel (biaya konsumsi). Hasil perhitungan tersebut adalah proyeksi kontribusi keuntungan dalam suatu unit usaha. Unit usaha merupakan gambaran mengenai mengenai total pengeluaran yang dihubungkan dengan kondisi keuntungan yang diperoleh dalam suatu usaha. *Contribution Margin* dalam penelitian ini dihitung dalam dua harga, yaitu harga perbutir dan harga per Kg. Berikut adalah tabel mengenai CM berdasarkan harga jual per Kg dan per butir selama periode penelitian (tabel 10) :

Perhitungan CM atas harga per butir didapatkan dari mengurangi pendapatan atas harga per butir dengan biaya variabel total dalam penelitian ini. Merujuk pada tabel 7 tabel mengenai rerata biaya konsumsi pakan bulanan pada unit perlakuan dan tabel 8 mengenai pendapatan atas harga per butir, terlihat bahwa pendapatan tertinggi dan biaya terendah berada pada P3. Hasil pada tabel 7 dan tabel 8 berpengaruh terhadap tabel 10. Keuntungan tinggi ditunjukkan pada P3, namun, tidak ada perbedaan nyata antara P0, P2 dan P3. Berikut adalah tabel mengenai Rerata dan

Tabel 10. Rerata dan Simpangan Baku CM Berdasarkan Harga Per Butir Tiap Perlakuan

Perlakuan	<i>Contribution Margin</i> (Rp)
P0	12.434,70± 1.651,35 <sup>b</sup>
P1	9.139,49 ± 1.702,30 <sup>a</sup>
P2	11.790,58± 1.532,04 <sup>b</sup>
P3	12.440,39 ± 1.147,91 <sup>b</sup>

Keterangan: <sup>a,b</sup>. Notasi (*superscript*) yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata (p<0,05).

Tabel 11. Rerata dan Simpangan Baku CM Berdasarkan Harga per Kg Tiap Perlakuan

Perlakuan	<i>Contribution Margin</i> (Rp)
P0	8.938,28 ± 1.283,37 <sup>b</sup>
P1	6.517,27 ± 1.373,82 <sup>a</sup>
P2	8.930,35 ± 1.193,05 <sup>b</sup>
P3	9.525,97 ± 944,96 <sup>b</sup>

Keterangan: <sup>a,b</sup>. Notasi (*superscript*) yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata (p<0,05).

simpangan baku CM berdasarkan harga per Kg Tiap Perlakuan Selama Periode Penelitian:

Perhitungan CM atas harga per Kg didapatkan dari mengurangi pendapatan atas harga per Kg dengan biaya variabel total. Merujuk pada tabel 7 tabel mengenai rataan biaya konsumsi pakan bulanan pada unit perlakuan dan tabel 9 mengenai pendapatan atas harga per Kg, terlihat bahwa pedapatan tertinggi dan biaya terendah berada pada P3. Hasil pada tabel 7 dan tabel 9 berpengaruh terhadap tabel 11. Keuntungan tinggi ditunjukkan pada P3, namun, tidak ada perbedaan nyata antara P0, P2 dan P3.

Berdasarkan hasil pada tabel 10 dan 11, dapat dikatakan bahwa seluruh perlakuan dalam penelitian ini tidak ada yang mengalami kerugian. *Contribution margin* tertinggi diperoleh pada P3 dengan cara penjualan telur per butir, sedangkan CM terendah terjadi pada P1 dengan cara penjualan telur per Kg. Perlakuan yang mendapat CM tertinggi, disebabkan oleh tingginya harga jual dan produksi, sehingga penerimaan lebih besar dan mampu menutup biaya produksi yang dibutuhkan dibandingkan dari perlakuan lainnya.

### Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan bahwa substitusi pakan komersial dengan BSFL hingga 20% mampu meningkatkan konsumsi pakan, dan mampu menyamai hasil produksi, produktivitas serta bobot telur dari pakan komersil.

### Ucapan Terima Kasih

Terimakasih kepada dosen pembimbing dan pihak peternakan yang telah bersedia mendukung pelaksanaan penelitian ini.

### Daftar Pustaka

Abbasi, M. A., A. H. Mahdavi, A. H. Samie, and R. Jahanian. (2014). Effects of different levels of dietary crude protein and threonine on performance, humoral immune responses and intestinal morphology of broiler chicks. *R. Braz. Ci. Solo* 16:35-44. <https://doi.org/10.1590/S1516-635X2014000100005>.

Achmad, D. H. (2011). Performa produksi burung puyuh (*coturnix-coturnix japonica*) yang diberi

pakan dengan suplementasi omega-3. Skripsi. Intitut Pertanian Bogor

- Amao, O., Oladunjoye, I., Togun, V., Olubajo, K. and Oyaniyi, O. (2010). Effect of Westwood (*Cirina forda*) larva meal on the laying performance and egg characteristics of laying hen in a tropical environment. *International Journal of Poultry Science*. 9:450-454.
- Belluco, S., Losasso, C., Maggioletti, M., Alonzi, C.C., Paoletti, M.G. and Ricci, A. (2013). Edible insects in a food safety and nutritional perspective: a critical review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 12: 296–313.
- Beski, S. S. M., Swick R. A. and Iji P. A. 2015. Specialised Protein Products in Broiler Chicken Nutrition: A Review. *J. Animal Nutrition*. 1:47-53.
- Beski, S. S. M., Swick R. A. and Iji P. A. (2015). Specialised Protein Products in Broiler Chicken Nutrition: A Review. *J. Animal Nutrition*. 1:47-53.
- Brand, Z., Brand, T. S. and Brown, C. R.. (2003). The effect of dietary and protein levels on production in breeding female ostrich. *Br. Poult. Sci.* 44:589-606. <https://doi.org/10.1080/0071660310001618343>.
- Čičková H., Newton G. L., Lacy R. C., and Kozánek M. (2015). The use of fly larvae for organic waste treatment. *Waste Manag.* 35:68-80.
- Cullere. M., Tasoniero, G., Giaccone, V., Miotti-Scapin, R., Claeys, E., De Smet. S., and Dalle Zotte, A. (2016). Black soldier fly as dietary protein source for broiler quails : apparent digestibility, excreta microbial load, feed choice, performance, carcass and meat traits. *Animal* 10: (12) : 1923 - 1930.
- Dewi, S.H.C dan Setiohadi, J. (2010). Manfaat Tepung Pupa Ulat Sutra (*Bombyx mori*) untuk Pakan Puyuh (*Coturnix coturnix japonica*) Jantan. *Jurnal AgriSains*. I (1).
- Dewi, D.R.R., Wibowo, S.B. dan Sulistyowati, N.W.. (2017). Analisis Hubungan Margin Kontribusi sebagai Alat Bantu Perencanaan Laba pada Industri Gamelan Margo Laras Kauman Magetan Periode 2014 – 2016. The 9th FIPA : Forum Ilmiah Pendidikan Akuntansi. Universtas PGRI. Madiun.

- Hopley, D. (2015). The evaluation of the potential of *Tenebrio molitor*, *Zophobas morio*, *Naophoeta cinerea*, *Blaptica dubia*, *Gromphardhina portentosa*, *Periplaneta americana*, *Blatta lateralis*, *Oxyhalao duesta* and *Hermetia illucens* for use in poultry feeds. MSc Diss. University of Stellenbosch, Stellenbosch. <https://pdfs.semanticscholar.org/d791/dadd1ea5de686956e8c2493d1801f7b86a57.pdf>
- Józefiak, D., and R. M. Engberg. (2015). Insects As Poultry Feed. European symposium on Poultry Nutrition, 24-27 August, Prague, Czech Republic.
- Kusriningrum, R. S. (2008). Perancangan Percobaan. Airlangga University Press. Surabaya. 15.
- Li Q., Zheng L., Qiu N., Cai H., Tomberlin J. K., and Yu Z. (2011). Bioconversion of dairy manure by Black Soldier Fly (Diptera: *Stratiomyidae*) for biodiesel and sugar production. *Waste Manag.* 31:1316-1320.
- Okah, U. and Onwujiariri, E. B. (2012). Performance of finisher broiler chickens fed maggot meal as a replacement for fish meal. *J. Agri. Technol.*, 8(2): 471-477.
- Permatahati, D., Mutiara R. dan Astuti, D.A. (2018). Effect of Cricket Meal (*Gryllus bimaculatus*) on Production and Physical Quality of Japanese Quail Egg. *Tropical Animal Science Journal*, April 2019, 42(1):53-58
- Rahmasari, R., Sumiati, and Astuti, D.A.. (2014). The effect of silkworm pupae (*Bombyx mori*) meal to substitute fish meal on production and physical quality of quail eggs (*Coturnix coturnix japonica*). *J. Indonesian Trop. Anim. Agric.* 39: 180- 187.
- Santos, G.C, E. A. Gracia, J. A. V. Filho, A. B. Molino. K. Pelica. and D. A. Berto. (2016). Performance of Japanese Quails Fed with Low-Proteine and Isoleucine. *Acta Scientiarum. A.Sci* 38(2): 219 – 225.
- Suroso, U. Kalsum dan M.F Wadidi. (2016). Pengaruh Penambahan Probiotik Enkapsulasi terhadap Konsumsi Pakan, Produksi Telur dan Efisiensi Pakan pada Burung Puyuh. *J.Peternakan* 1(2):13-17.
- Tugiyanti, E., Rosidi., dan Anam. A. K. (2017). Pengaruh Tepung Daun Sukun (*Artocarpus altilis*) terhadap Produksi dan Kualitas Telur Puyuh (*Coturnix-coturnic japonica*. *Agripet* 17(2): 121-131.
- Veldkamp, T. and Bosch, G. (2015). Insects: a protein-rich feed ingredient in pig and poultry diets. *Anim. Front.* 5(2): 45–50.
- Vrabec, V., Kulma.M., and Cocan. D. 2015. Insects as an Alternative Protein Source for Animal Feeding : A Short Review about Chemical Composition. *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies* 72(2) : 116 – 126.
- Wardhana, A.H. 2016. *Black Soldier Fly (Hermetia illucens)* sebagai Sumber Protein Alternatif untuk Pakan Ternak. *WARTAZOA.* 26(2);69 – 78.
- Widjiastuti, T. R., Wiradimaja. R., and Rusmana. D. 2014. The effect of substitution of fish meal by black soldier fly (*Hermetia illucens*) maggot meal in the diet on production performance of quail. *D. Anim. Sci.* 57:125 – 129.
- Wu, G., Wu, Z., Dai, Z., Yang, Y., Wang, W., Liu, C., Wang, B., Wang, J. and Yin, Y. (2013). Dietary requirements of “nutritionally non-essential amino acids” by animals and humans. *Amino Acids.* 44(4): 1107–1113.
- Wu, G., 2014. Dietary requirements of synthesizable amino acids by animals: a paradigm shift in protein nutrition. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 5(1): 1–34.

## Identifikasi Serovar Penyebab Leptospirosis pada Anjing di Yogyakarta

### *Identification of Serovar that Caused Canine Leptospirosis in Yogyakarta*

Guntari Titik Mulyani<sup>1\*</sup>, Sri Hartati<sup>1</sup>, Hastari Wuryastuti<sup>1</sup>, Ida Tjahajati<sup>1</sup>, Yuriadi<sup>1</sup>, Irkham Widiyono<sup>1</sup>, Yanuartono<sup>1</sup>, Hary Purnamaningsih<sup>1</sup>, S Indarjulianto<sup>1</sup>, Slamet Raharjo<sup>1</sup>, Alfariza Nururozi<sup>1</sup>, Angeline Ganapragasam<sup>2</sup>, Yeo Suan Jiao<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departemen Ilmu Penyakit Dalam, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada

<sup>2</sup>Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada

Jl. Fauna 2, Karangmalang, Yogyakarta 55281

\*Email: [guntari@ugm.ac.id](mailto:guntari@ugm.ac.id)

Naskah diterima: 28 September 2018, direvisi: 26 Juli 2019, disetujui: 30 November 2019

#### Abstract

Leptospirosis is a zoonotic disease of global concern, and is caused by pathogenic serovar *Leptospira interrogans*. Canine Leptospirosis is widespread worldwide, dogs can act as incidental hosts or maintenance hosts for various serovars. The purpose of this-research was to identify leptospire serovars that infect healthy and suspected leptospirosis dogs in Yogyakarta. A total of 56 dogs (36 healthy dogs and 20 suspect leptospirosis dogs) sera were taken from cephalic vein as much as 3 ml. Sera were examined for leptospirosis with Microscopic Agglutination Test (MAT) which conducted at the Research Center for Veterinary Science, Bogor. Microscopic Agglutination Test carried out on various Leptospire serovar, namely: Ichterohaemorrhagiae, Javanica, Celledoni, Ballum, Pyogenes, Cynopteri, Rachmati, Australis, Pomona, Canicola, Grippytyphosa, Bataviae, Hardjo, and Tarrasovi. The results showed that Celledoni serovars infected 25% of healthy dogs and 5% of suspect leptospirosis dogs, Javanica serovar infected 19% of healthy dogs, Bataviae serovars infected 15% of suspect leptospirosis dogs, Grippytyphosa serovar infected 11% of healthy dogs, Tarrasovi serovar infected 10% of suspect leptospirosis dogs, serovars Cynopteri infects 5% of healthy dogs and 5% of suspect leptospirosis dogs, serovar Pyogenes infects 5% of healthy dogs and 5% of suspect leptospirosis dogs, and serovar Rachmati infects 5% of suspect leptospirosis dogs. Seven healthy dogs (19%) and 2 suspect leptospirosis dogs (10%) were infected with more than 2 leptospire serovars. From the results of this study it can be concluded that Celledoni serovar of *Leptospira interrogans* infection causes subclinical leptospirosis, while Bataviae serovar infection causes clinical leptospirosis in dogs in Yogyakarta.

**Key words:** Bataviae; Celledoni; leptospira; leptospirosis; MAT, serovar

#### Abstrak

Leptospirosis adalah penyakit zoonosis yang menjadi perhatian global, dan disebabkan oleh serovar patogen *Leptospira interrogans*. Leptospirosis pada anjing tersebar luas di seluruh dunia, anjing dapat berperan sebagai *incidental host* ataupun *maintenance hosts* untuk berbagai serovar. Tujuan penelitian ini untuk mengidentifikasi serovar leptospira yang menginfeksi anjing sehat maupun anjing terduga leptospirosis di Yogyakarta. Penelitian ini menggunakan serum yang diambil dari 56 ekor anjing di Yogyakarta, yang terdiri dari 36 anjing tanpa gejala leptospirosis (sehat) dan 20 anjing dengan gejala leptospirosis (sakit). Serum dikoleksi untuk pemeriksaan *Microscopic Agglutination Test* (MAT) yang dilaksanakan di Balai Besar Penelitian Veteriner (BBLitvet), Bogor. Uji dilakukan terhadap 14 serovar leptospira, yaitu: Ichterohaemorrhagiae, Javanica, Celledoni, Ballum, Pyogenes, Cynopteri, Rachmati, Australis, Pomona, Canicola, Grippytyphosa, Bataviae, Hardjo, dan Tarrasovi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa serovar Celledoni menginfeksi 25% anjing sehat dan 5% anjing sakit, serovar Javanica meninfeksi 19% anjing sehat, serovar Bataviae menginfeksi 15% anjing sakit, serovar Grippytyphosa menginfeksi 11% anjing sehat, serovar Tarrasovi menginfeksi 10% anjing sakit, serovar Cynopteri menginfeksi 5% anjing sehat dan 5% anjing sakit, serovar Pyogenes menginfeksi 5% anjing sehat dan 5% anjing sakit, dan serovar Rachmati menginfeksi 5% anjing sakit. Tujuh ekor anjing sehat (19%) dan dua ekor



anjing sakit (10%) terinfeksi lebih dari dua serovar leptospira. Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa infeksi *Leptospira interrogans* serovar Celledoni menyebabkan terjadinya leptospirosis subklinis, sedangkan infeksi serovar Bataviae menyebabkan leptospirosis klinis pada anjing-anjing di Yogyakarta.

**Kata Kunci:** Bataviae; celledoni; leptospira; leptospirosis; MAT; serovar

## Pendahuluan

Leptospirosis adalah zoonosis yang menginfeksi manusia, hewan piaraan dan satwa liar dan disebabkan oleh berbagai serovar *Leptospira interrogans* (Lizer *et al.*, 2017). Spesies *L. interrogans* terdiri dari 23 serogroup dan 240 serovar (Bharti *et al.* 2003). Serovar leptospira memiliki spesies hewan tertentu sebagai hospes alami, tetapi hewan dan manusia dapat terinfeksi dengan berbagai jenis serovar. Setiap serovar beradaptasi kepada satu atau lebih hospes sebagai hospes primer, yang disebut sebagai hospes definitif, atau hospes reservoir. Hospes reservoir teradaptasi dapat mengalami infeksi persisten, tanpa gejala klinis yang berat, dan dapat mengeluarkan leptospira dalam urin dari beberapa bulan hingga beberapa tahun setelah infeksi. Hospes insidental dapat terinfeksi oleh serovar dan belum beradaptasi dengan hospes tersebut, sehingga cenderung mengalami gejala klinis dan jarang menjadi *carrier* kronik (Markey *et al.*, 2013). Anjing adalah hospes reservoir untuk *L. interrogans* serovar Canicola (Goldstein, 2010). Mulyani *et al.* (2017) melaporkan bahwa serovar Bataviae adalah serovar dominan yang menyebabkan leptospirosis klinis pada anjing-anjing di Daerah Istimewa Yogyakarta.

Leptospira memasuki hospes yang rentan secara langsung dari urin atau secara tidak langsung dari air, tanah, atau lumpur yang terkontaminasi. Penularan leptospira pada anjing selain lewat kelamin dan plasenta, juga melalui luka gigitan (Dziejyc, 2000). Leptospira dapat menembus kulit yang luka dan mukosa yang utuh seperti konjungtiva. Leptospira dengan cepat masuk ke dalam tubuh sehingga dapat ditemukan dalam aliran darah beberapa menit setelah inokulasi subkutan, intraperitoneal atau intramuskular. Motilitas leptospira memfasilitasi penyebarannya melalui jaringan (Adler, 2014).

Infeksi leptospira patogenik dapat menyebabkan berbagai manifestasi klinis dari subklinis hingga berat, dan penyakit yang berpotensi letal (Saleem *et al.*, 2013). Major *et al.* (2014) memberikan gambaran

manifestasi klinis leptospirosis akut pada organ utama: 99,7% menunjukkan keterlibatan ginjal, 35,4% keterlibatan hati (seperti yang ditunjukkan oleh hiperbiliruemia hepatik), 68,8% keterlibatan pulmo dan 18,4% menunjukkan tanda-tanda yang konsisten dengan koagulasi intravaskular diseminata. *Leptospira* melokalisasi di tubulus ginjal proksimal dan dibuang lewat urin setelah periode leptospirosemia. Durasi dan intensitas *shedding* dalam urin bervariasi dari anjing ke anjing dan dengan serovar yang menginfeksi. Infeksi dengan serovar Canicola biasanya menghasilkan *shedding* jangka panjang, yang dapat berlangsung hingga dua tahun. Anjing yang terinfeksi dengan serovar lainnya biasanya membuang organisme tersebut lewat urin mereka untuk waktu yang lebih singkat (Greene, 2012).

Serovar Icterohaemorrhagiae, Copenhageni dan Pomona menginduksi penyakit hati yang paling parah. Serovar Canicola dan Grippotyphosa menyebabkan beberapa tanda klinis yang terkait dengan hati (Langston and Heuter, 2003). Hubungan antara serovar yang menginfeksi dan penyakit klinis tidak didefinisikan dengan baik. Contohnya, infeksi dengan serovar Bratislava dapat bersifat subklinis, dapat menyebabkan gagal ginjal akut, atau dapat mengakibatkan gagal ginjal dan juga hati (Goldstein *et al.*, 2010). Mulyani *et al.* (2017) melaporkan adanya ikterik dan gangguan ginjal pada anjing yang terinfeksi serovar Bataviae.

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi tingkat kejadian dan jenis serovar *Leptospira interrogans* yang sering menginfeksi pada anjing-anjing di Yogyakarta, serta mempelajari efek klinis yang ditimbulkan oleh serovar penyebab leptospirosis pada anjing-anjing di Yogyakarta. Hasil penelitian ini akan sangat bermanfaat bagi para praktisi hewan kecil dalam menetapkan diagnosis leptospirosis pada anjing. Serovar dominan penyebab leptospirosis klinis dapat dipertimbangkan dalam program vaksinasi leptospirosis pada anjing.

## Materi dan Metode

Penelitian ini menggunakan serum yang diambil dari 56 anjing yang terdiri dari 36 anjing sehat dan 20 anjing yang memiliki gejala klinis leptospirosis (anoreksia, demam, muntah disertai/tidak gangguan fungsi hati dan ginjal). Darah diambil sebanyak 3 ml dan serum dipisahkan untuk uji laboratorium. Sejarah vaksinasi dicatat sebagai bahan pertimbangan dalam menginterpretasikan hasil.

Sebelum MAT dilakukan, kultur dari leptospira dimasukkan dalam tabung tes yang bersumbat dan ditambahkan 5-6 ml cairan medium *Ellinghausen, McCullough, Johnson and Harris* (EMJH) cair pada suhu 28-30°C. Kultur yang segar dapat dibuat dengan menginokulasikan 0,5 ml dari masing-masing serovar ke dalam tabung. Pada saat yang sama pemeriksaan dengan mikroskop lapang gelap terhadap kultur harus dilakukan untuk memastikan adanya leptospira dan memastikan tidak adanya kontaminasi. Kultur diinkubasikan pada suhu 30°C dan dicek pertumbuhannya setelah 5-7 hari. Setelah 10 hari, kultur disimpan pada suhu 15°C. Kultur yang digunakan sebagai antigen harus dicek dengan antisera homolog MAT secara berulang untuk kualitas kontrol. Kultur yang baik dengan kepadatan 1-2 x 10<sup>8</sup> per ml dapat digunakan sebagai antigen (Bbalitvet, 2012).

Pemeriksaan MAT dilakukan dengan mengisi 96 sumuran pada *microtiter plate* dengan 50 µl enceran serum sampel dengan PBS sehingga terjadi perbandingan 1:25, dan sumuran selanjutnya diisi dengan volume yang sama hingga memiliki perbandingan serum dan PBS sebesar 1:50, 1:100, 1:400 dan 1:1600. Antigen leptospira hidup (serovar : *Ichterohaemorrhagiae*, *Javanica*, *Celledoni*, *Ballum*, *Pyogenes*, *Cynopteri*, *Rachmati*, *Australis*, *Pomona*, *Canicola*, *Grippotyphosa*, *Bataviae*, *Hardjo*, *Tarrasovi*) sebanyak 0.05 ml ditambahkan, lalu diinkubasi pada suhu 28-30°C selama 2 jam. Pembacaan hasil dilakukan di bawah mikroskop medan gelap/fase kontras. Titik akhir pembacaan adalah 50% aglutinasi atau 50% *Leptospira* yang tidak teraglutinasi. Enceran akhir tertinggi serum dalam campuran serum-antigen yang menunjukkan 50% aglutinasi disebut titer. Pada uji ini digunakan kontrol positif dan kontrol negatif. Kontrol positif untuk masing-masing antigen yang digunakan direaksikan dengan antisera homolog. Untuk kontrol negatif, antigen diencerkan dengan PBS pH 7.5 menjadi 1:2, dan kontrol pembacaan 50% aglutinasi

(+2) dibuat dengan mengencerkan antigen menjadi 1:4. Serum dengan titer 1:100 atau lebih terhadap salah satu serovar atau lebih dinyatakan positif (Bbalitvet, 2012).

## Hasil Dan Pembahasan

*Microscopic Agglutination Test* digunakan untuk mendeteksi antibodi spesifik serovar leptospira. Serovar yang bereaksi dengan serum pasien dikatakan serovar infeksi (Chirathaworn *et al.*, 2014). Dari MAT dengan 14 jenis serovar leptospira memberikan hasil hasil positif pada 16 (44%) anjing sehat, dan 3 (15%) anjing sakit. Pada kelompok anjing sehat terdapat 9 anjing positif terhadap 1 serovar (56%), 6 anjing positif terhadap 2 serovar (38%), dan 1 anjing positif terhadap 3 serovar (6%). Pada kelompok anjing sakit terdapat 1 anjing positif terhadap 1 serovar, 1 anjing positif terhadap 2 serovar dan 1 anjing positif terhadap 6 serovar. Seropositif terhadap beberapa serovar mungkin merupakan konsekuensi dari tes tunggal, tetapi tidak dapat membedakan antara reaksi silang dan koinfeksi. Dalam kasus koinfeksi *sensu stricto*, hewan mungkin telah terinfeksi oleh serogrup yang berbeda selama periode yang sama dan dalam kasus koinfeksi *sensu lato*, hewan mungkin telah terpapar dengan serogrup sebelumnya dan kemudian terpapar serogrup lain yang menghasilkan sampel positif terhadap serogrup yang banyak (Chadsuthi *et al.*, 2017). Hasil MAT serum anjing dan serovar yang memberikan hasil positif disajikan pada Tabel 1.

Anjing dalam penelitian ini seluruhnya telah divaksin dengan vaksin leptospira yang berisi serovar *Canicola* dan *Ichterohaemorrhagiae*. Hasil titer antibodi dari serovar *Canicola* dan *Ichterohaemorrhagiae* tidak dianalisis dalam penelitian ini karena uji MAT tidak mampu membedakan antibodi yang diperoleh dari vaksin atau infeksi. Serovar *Celledoni*, *Javanica* dan

Tabel 1. Serovar leptospira yang memberikan hasil positif dengan MAT

No	Serovar positif	Anjing sehat	Anjing sakit	Jumlah
1	Celledoni	9	1	10
2	Javanica	7	0	7
3	Grippotyphosa	4	0	4
4	Bataviae	0	3	3
5	Cynopteri	2	1	3
6	Pyogenes	2	1	3
7	Tarrasovi	0	2	2
8	Rachmati	0	1	1

Grippytyphosa adalah serovar leptospira dominan yang menginfeksi anjing-anjing sehat di Yogyakarta. Serovar yang menyebabkan penyakit pada hewan bervariasi antar negara dan terkadang antar wilayah di negara yang sama. Biasanya sebagian besar infeksi pada hewan domestik, di wilayah tertentu, disebabkan oleh hanya beberapa serovar (Markey *et al.*, 2013). Di Bali serovar Celledoni adalah serovar yang dominan pada anjing Kintamani, namun tidak menimbulkan gejala klinis (Mutawadiah *et al.*, 2015). Serovar Celledoni menginfeksi dan menimbulkan gejala klinis pada tikus dan keledai (Samir *et al.*, 2015). Serovar Javanica menimbulkan penyakit pada tikus (Ramadhani *et al.*, 2015). Serovar Grippytyphosa menimbulkan penyakit pada rodensia, sapi, babi, domba, kambing, kelinci dan beberapa satwa liar seperti tupai, landak dan musang (Greene, 2012). Pada sapi, kerbau, domba, kambing dan babi, serovar Pyrogenes dapat menyebabkan Leptospirosis (Himani *et al.*, 2013). Kelelawar dan rodensia biasanya terinfeksi oleh serovar Cynopteri (Ramadhani *et al.*, 2015 ; Conover dan Vail, 2015).

Pada kelompok anjing sakit terdapat satu sampel positif terhadap serovar Bataviae, satu sampel positif terhadap serovar Bataviae dan Tarrasovi, dan satu sampel lagi positif terhadap serovar Bataviae, Tarrasovi, Celledoni, Cynopteri, Pyrogenes, dan Rachmati. Serovar Bataviae merupakan serovar dominan yang terdeteksi pada kelompok anjing sakit. Efek yang ditimbulkan karena infeksi leptospira bervariasi dan tergantung kepada virulensi, serovar, serta jumlah bakteri yang menginfeksi hospes (Greene, 2012). Anjing yang pernah terinfeksi oleh serovar yang sama akan memiliki kekebalan (Klaasen *et al.*, 2003). Menurut Azocar-Aedo *et al.* (2014) anjing menjadi hospes reservoir utama bagi serovar Canicola dan Bataviae dan menjadi hospes intermediate bagi serovar Hardjo, Pomona, Canicola, Icterohaemorrhagiae, Autumnalis, Bratislava, dan Bataviae.

Kelompok anjing sakit dengan MAT positif memperlihatkan gejala klinis berupa kelemahan, anoreksia, muntah dan demam. Dua anjing yang positif terhadap lebih dari satu serovar menunjukkan gejala ikterik dan gangguan fungsi ginjal. Kedua anjing ini tidak tertolong dan berakhir dengan kematian, sedangkan anjing yang positif terhadap serovar Bataviae saja dapat diselamatkan. Menurut Van de Maele *et al.* (2008) dan Saleem *et al.* (2013) gejala klinis infeksi leptospira pada anjing sangat bervariasi. Beberapa anjing menampilkan gejala ringan atau

tidak ada tanda-tanda penyakit, sedangkan yang lain berkembang menjadi penyakit yang parah sampai kematian. Leptospirosis menyebabkan hipertrofi dan hiperplasia sel Kupffer disertai dengan kolestasis intrahepatik dalam organ hati (Greene, 2012). Derajat ikterus biasanya berhubungan dengan keparahan nekrosis hati. Anjing berusia kurang dari enam bulan sangat rentan terhadap insufisiensi hati berat (Langston and Heuter 2003, Greene, 2012). Kelainan pada ginjal terjadi akibat kompleks imun serta efek toksik langsung dari leptospira yang merusak tubulus, vaskulitis, kerusakan endotel, terjadi hipoksemia, nefritis interstisial, nekrosis tubuler akut. Nefritis dan nekrosis tubuler akut, keduanya diakibatkan akibat migrasi leptospira ke dalam ginjal serta deposisi antigen leptospira pada glomerulus dan tubulus yang mengakibatkan terjadinya gagal ginjal dan kematian (Nasronudin *et al.*, 2007).

### Kesimpulan

*Leptospira interrogans* serovar Celledoni merupakan serovar dominan penyebab leptospirosis subklinis, *Leptospira interrogans* serovar Bataviae merupakan serovar dominan penyebab leptospirosis klinis pada anjing-anjing di Yogyakarta. Pada kasus leptospirosis klinis, semakin banyak serovar yang menginfeksi anjing, semakin meningkatkan risiko kematian.

### Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini terselenggara berkat bantuan beberapa pihak, untuk itu diucapkan terima kasih kepada: Dekan Fakultas Kedokteran Hewan UGM atas persetujuan dana BPPTN FKH UGM yang membiayai penelitian ini; tim Ilmu Penyakit Dalam atas kerjasamanya, dokter hewan praktisi di wilayah Yogyakarta atas bantuan sampel penelitian; serta pimpinan dan staff BBalitvet Bogor atas analisis laboratorium yang dilakukan.

### Daftar Pustaka

- Adler, B. 2014. Pathogenesis of Leptospirosis: Cellular and Molecular Aspects. *Journal of Veterinary Microbiology*. 172: 353-358.
- Anonim. 2012. Pemeriksaan Leptospirosis secara Laboratoris. *Laboratorium Leptospira Balai Penelitian Veteriner*, Bogor.

- Azocarr-Aedo, L., Smits, H.L. & Monti, G. 2014. Leptospirosis in dogs and cats: epidemiology, clinical disease, zoonotic implications and prevention. *Arch Med Vet.* 46: 337-348.
- Chadsuthi, S., Bicout, D.J., Wiratsudakui, A., Suwancharoen, D., Petkanchanapong, W., Modchang, C., Triampo, W., Ratanakorn, P. and Chalvet-Monfray, K. 2017. Investigation on Predominant *Leptospira* Serovars and its Distribution in Humans and Livestock in Thailand, 2010-2015. *PLOS Neglected Tropical Diseases.* 11(2): 1-18.
- Chirathaworn, C., Inwattana, R., Poovorawan, Y., and Suwancharoen, D. 2014. Interpretation of Microscopic Agglutination Test for Leptospirosis Diagnosis and Seroprevalence. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.* 4: 162-164.
- Conover, M.R. and Vail, R.M. 2015. *Human Diseases from Wildlife.* CRC Press. Florida. 180.
- Dziezyc, J. 2000. Canine Systemic Bacterial Infections. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice.* 30: 1103-1117.
- Goldstein, R.E. 2010. Canine Leptospirosis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice.* 40 (6): 1091-1101.
- Greene, C.E. 2012. *Infectious Diseases of the Dog and Cat.* 4<sup>th</sup> ed. Saunders Elsevier. St. Louis, Missouri. USA: 433-462.
- Himani, D., Suman, M.K. and Mane, B.G. 2013. Epidemiology of Leptospirosis: An Indian Perspective. *Journal of Foodborne and Zoonotic Diseases.* 1 (1): 6-13.
- Klaasen, H.L., Molkenboer, M.J., Vrijenhoek, M.P., and Kaashoek, M.J. 2003. Duration of immunity in dogs vaccinated against Leptospirosis with a bivalent inactivated vaccine, *Vet Microbiol.* 95(1-2), 121-132
- Langston, C.E. and Heuter, K.J. 2003. Leptospirosis: A Re-emerging Zoonotic Disease. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice.* 33: 791-807.
- Lizer, J., Grahlmann, M., Hapke, H., Velineni, S., Lin, D., and Kohn, B. 2017. Evaluation of Rapid IgM Detection Test for Diagnosis of Acute Leptospirosis in Dogs. *Veterinary Record.* 1-5.
- Major, A., Schweighauser, A. and Francey, T. 2014. Increasing Incidence of Canine Leptospirosis in Switzerland. *International Journal of Environmental Research and Public Health.* 11: 7242-7260.
- Markey, B., Leonard, F., Archambault., M., Cullinane, A. and Maguire, D. 2013. *Clinical Veterinary Microbiology.* 2<sup>nd</sup> ed. Mosby Elsevier. Missouri, USA.
- Mulyani, G.T., Hartati, S., Santoso, Y., Kurnia, Pramono, A.B. and Wirapratwi, D.K. 2017. Kejadian Leptospirosis pada Anjing di Daerah Istimewa Yogyakarta. *Jurnal Veteriner.* 18 (3): 403-408.
- Mutawadiah, Puja, IKP. dan Dharmawan, NS. 2015. Seroprevalensi Leptospirosis pada Anjing Kintamani di Bali. *Jurnal Ilmu dan Kesehatan Hewan.* 3 (2): 41-44.
- Nasronudin, Usman, H., Vitanata, Erwin, AT., Bramantono, Suharto, dan Eddy, S. 2007. *Penyakit Infeksi di Indonesia, Solusi Kini dan Mendatang.* Airlangga University Press, Surabaya.
- Ramadhani, T., Widyastuti, D. dan Priyanto, D. 2015. Determinasi Serovar Bakteri *Leptospira* pada Reservoir di Kabupaten Banyumas. *Jurnal Ekologi Kesehatan.* 14 (1) : 8-16.
- Saleem, M.H., Khan, M.S. Khan, M.A., Khan, M.A., Ijaz, M., Hassan, A., and Mehmood, K. 2013. Serosurveillance of canine leptospirosis under-different climatic conditions in and around Lahore, Pakistan. *PakVet J.* 33: 241-243.
- Samir, A., Soliman, R., El-Hariri, M., Abdel-Moein, K. and Hatem, ME. 2015. Leptospirosis in Animals and Human Contacts in Egypt: Broad Range Surveillance. *Rev Soc Bras Med Trop.* 48 (3): 272-277.
- Van de Maele, I., Claus, A. Haesebrouck, F., and , Daminet, S. 2008. Leptospirosis in dogs: a review with emphasis on clinical aspects. *Vet Rec.* 163: 409-413.

## Keanekaragaman Kapang Patogen dan Non Patogen pada Imago, Kokon, dan Larva Instar Keenam Ulat Sutera Liar *Attacus atlas* (Lepidoptera: Saturniidae)

### *Biodiversity of Pathogenic and Non Pathogenic Mould in Imago, Cocoon, and Sixth Instar Larvae From Wild Silkworm Attacus Atlas (Lepidoptera: Saturniidae)*

Agustin Indrawati<sup>1\*</sup>, Damiana Rita Ekastuti<sup>2</sup>, Erdina Pangestika<sup>3</sup>, Reinilda Alwina<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Divisi Mikrobiologi Medik, Departemen Ilmu Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

<sup>2</sup>Divisi Fisiologi Departemen Anatomi, Fisiologi, dan Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor

<sup>3</sup>Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor  
Jl. Agatis Dramaga Bogor

\* Email: [titin.seta@gmail.com](mailto:titin.seta@gmail.com)

Naskah diterima: 23 Juli 2019, direvisi: 20 Agustus 2019, disetujui: 30 November 2019

#### Abstract

*Attacus atlas* is one of several mould species in Indonesia known as kupu-kupu gajah. Information about variety of mould is rarely known. The purpose of this research was to obtain data about variety of pathogenic or non pathogenic mould at imago, cocoon, and sixth larvae phase of wild silkworm *Attacus atlas*. Mould was isolated from cocoon, integument, alimentary duct and reproduction duct of imago, trachea, midgut and hindgut, also haemolymph of larvae. Isolated mould was cultured on potato dextrose agar. Isolated mould from cocoon and imago was identified by macroscopic and microscopic observation. The results showed that there were two kind of moulds from cocoon which were *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus flavus*. There were four kind of moulds from imago *Attacus atlas* which were *Aspergillus flavus*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium dimerum*, and *Aspergillus sp.* There were three kind of moulds from sixth larvae which were *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, and *Fusarium dimerum*. The mould which has opportunistic pathogenic for *Attacus atlas* were *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* and *Fusarium dimerum*.

**Key words :** *Attacus atlas*; imago; cocoon; larvae; mould

#### Abstrak

*Attacus atlas* adalah salah satu jenis ngengat di Indonesia yang dikenal dengan nama kupu-kupu gajah. Informasi mengenai keanekaragaman kapang yang terdapat dalam ngengat ini belum banyak diketahui. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk memperoleh data keanekaragaman kapang patogen dan non patogen pada fase hidup imago, kokon, dan larva instar keenam ulat sutera liar *Attacus atlas*. Kapang diisolasi dari kokon bagian dalam, dari imago pada bagian integumen dan saluran reproduksi, sedangkan dari larva pada bagian trakea, saluran pencernaan tengah dan belakang, serta hemolimfe. Kapang hasil isolasi dikultur pada media *potato dextrose agar*. Identifikasi kapang hasil isolasi dilakukan dengan pengamatan makroskopis dan mikroskopis. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat dua jenis kapang dari kokon *Attacus atlas* yaitu *Fusariumoxy sporum* dan *Aspergillus flavus*. Terdapat empat jenis kapang dari imago *Attacus atlas* yaitu *Aspergillus flavus*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium dimerum*, dan *Aspergillus sp.* Terdapat tiga jenis kapang dari larva instar keenam yaitu, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, dan *Fusarium dimerum*. Kapang yang bersifat patogen oportunistik bagi *Attacus atlas* adalah *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* dan *Fusarium dimerum*.

**Kata kunci :** *Attacus atlas*; imago; kapang; kokon; larva

## Pendahuluan

Keanekaragaman hayati menjadi salah satu keuntungan yang dimiliki Indonesia karena memiliki iklim tropis dengan sinar matahari dan hujan yang cukup sepanjang tahun. Berbagai jenis flora dan fauna mampu tumbuh dan berkembang di seluruh kepulauan Indonesia dengan jenis yang beragam. Serangga merupakan salah satu fauna yang paling banyak tingkat keanekaragamannya dan salah satu serangga asli Indonesia adalah ulat sutera liar *Attacus atlas* (*A. atlas*).

*A. atlas* juga dikenal sebagai ulat sutera karena kemampuannya dalam menghasilkan benang sutera yang menjadi bahan utama pembuatan kain sutera. Benang sutera dari kokon *A. atlas* memiliki karakteristik dan kualitas yang lebih bagus dari benang sutera pada umumnya yang berasal dari kokon *Bombyx mori* sehingga hasil olahan pakaian atau kerajinan memiliki nilai jual yang lebih tinggi. Selain itu kokon dari *A. atlas* juga berpotensi sebagai antimikroba, dan dimanfaatkan sebagai pengawet (Faatih, 2005). Menurut Istiqomah (2014) bahwa kandungan protein dari imago yang berkisar 75% dapat dimanfaatkan sebagai sumber protein pakan bagi ternak.

Kondisi Indonesia yang memiliki kelembaban cukup tinggi juga menjadi keuntungan bagi mikroorganisme untuk berkembang biak dan bertahan hidup. Keberadaan mikroorganisme tersebut dapat menimbulkan keuntungan maupun kerugian seperti menimbulkan penyakit pada serangga (entomopatogen), bahkan dapat bersifat zoonosis. Telah ditemukan bakteri pada jaringan lemak, saluran reproduksi, dan kloaka imago betina dewasa *A. atlas* (Esnawan, 2014; Arsy, 2014; Fajar, 2014), sehingga ada kemungkinan mikroorganisme lain seperti kapang dan khamir juga terdapat dalam tubuh serangga tersebut.

Keberadaan kapang pada ulat sutera liar dapat bersifat menguntungkan maupun merugikan sehingga menimbulkan terjadinya penyakit. Menurut Guntoro (1994) bahwa kapang juga dapat menyerang pada seluruh fase hidup ulat sutera seperti *Aspergillus sp.* Penyakit yang banyak menyerang ulat sutera antara lain disebabkan oleh virus, bakteri, jamur ataupun protozoa diantaranya *nuclear polyhedrosis virus* (NPV), *cytoplasmic polyhedrosis virus* (CPV), protozoa *Nozema bombycis*, kapang *Beauveria bassiana*, dan *Aspergillus spp.* (Guntoro, 1994). Menurut Hee (2008), lebih dari 60% ulat sutera *Bombyx mori* terserang oleh

kapang *Aspergillus* di Sulawesi Selatan, sedangkan di India kegagalan panen kokon akibat penyakit mencapai 30–40%. Menurut Novitasari (2013), kapang patogen jenis *Scopulariosis sp.* dari filum *Ascomycota* dapat menyerang kokon ulat sutera *Cricula trifenestrata* yang menunjukkan perubahan warna dari warna normal keemasan menjadi kehitaman. Hal ini menunjukkan bahwa kapang dapat menurunkan kualitas sutera. Informasi mengenai keberadaan keanekaragaman kapang pada ulat sutera liar *A. atlas* belum banyak diketahui. Oleh sebab itu diperlukan upaya identifikasi keanekaragaman kapang yang terdapat pada berbagai fase hidup ulat sutera liar *A. atlas*.

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh data keanekaragaman kapang patogen dan non patogen pada fase hidup imago, larva instar keenam, dan kokon ulat sutera liar *A. atlas*.

## Materi dan Metode

Bahan yang digunakan untuk diidentifikasi dalam penelitian ini adalah 10 ekor imago, 10 kokon, dan 5 ekor larva instar keenam ulat sutera liar *A. atlas*. Pengambilan bahan dilakukan di perkebunan teh PTPN VIII di Desa Cipto Gumati, Kecamatan Cikalong Wetan, Kabupaten Bandung Barat, Jawa Barat. Larva sehat dan imago yang diperoleh kemudian dipreservasi pada suhu 4 °C selama 3–4 hari.

Isolasi kapang diawali dengan melakukan sayatan imago secara vertikal menggunakan *scalpel* kemudian diisolasi bagian integumen, saluran pencernaan, dan saluran telur dengan memotong menjadi ukuran yang kecil. Isolasi pada kokon dilakukan dengan memotong kokon bagian dalam dengan ukuran 0.5 cm × 0.5 cm. Isolasi pada bagian larva dilakukan dengan menyayat larva dan menguak kemudian diisolasi bagian trakea, saluran pencernaan tengah (*midgut*) dan belakang (*hindgut*) serta hemolimfe larva. Setiap bagian tersebut direndam dalam larutan NaCl fisiologis kemudian dilakukan pemeriksaan cepat menggunakan KOH 10 % selama 15–20 menit. Bagian-bagian dari kokon dan imago yang sudah direndam ke dalam NaCl fisiologis diinokulasi di atas media *potato dextrose agar* (PDA) lalu diinkubasi selama lima hari pada suhu kamar 25 °C. Kapang yang tumbuh dipindahkan pada media PDA yang baru sehingga didapatkan kapang yang murni (Novitasari, 2013).

Kapang diidentifikasi secara makroskopis dan mikroskopis. Identifikasi secara makroskopis dila-

kukan dengan pengamatan terhadap pigmen, tekstur, dan topografi serta kecepatan pertumbuhan koloni pada media (Fisher dan Cook, 1989). Jenis tekstur yang diamati antara lain *glabrous*, *velvet*, *yeastlike*, *cottony*, atau *granular*, sedangkan jenis topografi yang diamati antara lain *flat*, *rugose*, *folded*, *crateriform*, *verruucose*, atau *cerebriform*. Pengamatan terhadap kecepatan pertumbuhan koloni kapang dibagi menjadi 3 kelompok, yaitu pertumbuhan cepat bila kapang tumbuh kurang dari 5 hari, pertumbuhan sedang bila kapang tumbuh 6 sampai dengan 10 hari dan pertumbuhan lambat bila kapang tumbuh lebih dari 11 hari pada media

Kapang diidentifikasi secara mikroskopis dengan pemeriksaan natif menggunakan pewarna *lactophenol cotton blue* (lpcb) dan metode selopan, selanjutnya dilakukan peneguhan identifikasi mikroskopis menggunakan metode *slide culture* menurut Riddle (Li 2013; Heritage et al., 1996).

### Hasil dan Pembahasan

Isolasi dan identifikasi kapang berdasar pada pemeriksaan makroskopik dan mikroskopik dari koloni yang tumbuh pada media biakan. Pada penelitian ini ditemukan adanya dua koloni kapang yang terisolasi dari sampel kokon, lima koloni kapang dari imago, dan tiga koloni kapang dari larva instar keenam *A. atlas* yang masing-masing berasal dari Perkebunan Teh PTPN VIII Desa Cipto Gumati, Kecamatan Cicalong Wetan, Bandung Barat. Pemeriksaan makroskopis koloni berdasar pada warna koloni, tekstur, dan topografi serta kecepatan pertumbuhan koloni. Dengan melihat secara makroskopik dapat dilihat bagaimana pertumbuhan kapang tersebut apakah bersifat cepat atau lambat yang dikaitkan dengan waktu hari dalam pertumbuhannya. Dalam penelitian ini semua koloni tumbuh dengan waktu cepat.

Isolasi kapang pada *A. atlas* dilakukan pada bagian kokon dan imago karena bagian ini merupakan bagian penting pada serangga ini. Kokon memiliki fungsi sebagai pelindung pada stadium pupa dari agen yang dapat mengganggu siklus hidup serangga ini. Menurut Awan (2007), stadium pupa merupakan stadium yang paling penting dalam perkembangan larva menjadi imago di mana terjadi organogenesis organ-organ imago. Larva instar keenam merupakan fase larva terakhir yang sangat penting, karena menghasilkan serat sutera sebagai bahan utama kokon pembungkus

pupa. Mulyani (2008) menyatakan bahwa konsumsi pakan terbanyak adalah saat larva instar keenam, sehingga larva memiliki ukuran tubuh terpanjang dan bobot terberat diantara instar lainnya. Berdasar jumlah hemosit yang dihasilkan dapat menentukan sifat kekebalan dari fase pertumbuhan, dan stadium instar akhir memiliki hematosit yang tinggi (Chapman, 1998) sehingga berpengaruh terhadap kemampuan menyeleksi kapang yang mampu bertahan dalam tubuh larva.

Terdapat dua koloni kapang yang diisolasi dari kokon *A. atlas*. Koloni kapang pertama tumbuh dengan cepat selama 5 hari. Permukaan koloni berwarna putih dengan bagian belakang putih kekuningan pada media PDA (Gambar 1A). Tekstur dari kapang ini *velvety* yaitu koloni tampak halus dan seperti beludru. Bentuk topografi atau permukaan koloni kapang mempunyai alur yang berlipat dan memanjang. Secara mikroskopis, kapang ini memiliki makrokonidia dan hifa yang berseptata. Makrokonidia yang ditemukan yaitu memiliki 3 sampai 4 septa, sedangkan mikrokonidia memiliki 2 septa (Gambar 1A). Bentuk makrokonidia sedikit membengkok dengan ujung yang meruncing. Pada hifa kapang ini ditemukan klamidiospora yang sedang terbentuk (Gambar 1A).

Klamidiospora merupakan spora aseksual bersel satu yang terbentuk dari hifa somatik. Berdasarkan pengamatan secara makroskopis dan mikroskopis, kapang yang diidentifikasi dari kokon ini yaitu *Fusarium oxysporum*. Hal ini sesuai dengan Gandjar et al. (1999) koloni *F. oxysporum* memiliki miselium aerial seperti kapas kemudian menjadi seperti beludru berwarna putih. Makrokonidia terbentuk pada fialid yang terdapat pada konidiofor, berbentuk fusiform, sedikit membengkok, meruncing pada kedua ujungnya. Mikrokonidia berseptata 0 hingga 2, terbentuk lateral pada fialid yang sederhana, atau terbentuk pada fialid yang terdapat pada konidiofor bercabang pendek, umumnya terdapat dalam jumlah yang banyak. Klamidiospora terdapat dalam hifa atau dalam konidia, berwarna hialin berbentuk semi-bulat secara berpasangan atau tunggal.

Keberadaan *F. oxysporum* yang diidentifikasi dari *A. atlas* pada penelitian ini diduga berasal dari lingkungan sekitar dan tidak menyebabkan gangguan pada keberlangsungan hidup *A. atlas*. Hal ini dapat didukung dengan pupa yang berasal dari kokon tersebut tidak mengalami gangguan perubahan fase menjadi imago. Pada hewan lain *F. oxysporum* dapat

menyebabkan infeksi. Menurut Sun dan Liu (2008) *F. oxysporum* dapat menginfeksi serangga *Galleria mellonella* dengan mortalitas yang tinggi. Selain itu, *F. oxysporum* juga dapat menginfeksi mencit dan menimbulkan kerusakan paru-paru. Pada kasus ini ditemukan konidia yang menyebabkan obstruksi di interstisial kapiler mencit tersebut (Nucci dan Anaissie, 2007). Adanya beberapa kasus infeksi pada hewan lain terutama serangga, tidak menutup kemungkinan bahwa *A. atlas* dapat terinfeksi ketika sistem pertahanannya menurun. Hal ini dapat terjadi karena *F. oxysporum* merupakan kapang oportunistik. Spesies *Fusarium* lain yang dapat menyerang serangga yaitu *F. solani* (Sun dan Liu, 2008) dan *F. verticillioides* (Pelizza *et al.*, 2011).

Secara makroskopis, koloni kedua bertekstur *cottony* yaitu seperti kapas dengan topografi *flat*. Pigmen pada permukaan berwarna putih (Gambar 1B) sedangkan pada belakang berwarna jingga pucat. Koloni mengalami pertumbuhan yang cepat di media karena mulai terlihat pertumbuhan pada hari ketiga. Struktur yang ditemukan melalui pengamatan secara mikroskopis, antara lain makrokonidia dengan 1 sampai 2 septa mikrokonidia (hifa berseptata, dan klamidiospora (Gambar 1B). Kapang ini merupakan isolat yang diambil dari sampel organ *hindgut* larva dan imago *A. Atlas*. Berdasarkan gambaran secara makroskopis dan mikroskopis, maka koloni kapang diidentifikasi sebagai *Fusarium dimerum*. Menurut Campbell *et al.*, (1996), koloni *F. Dimerum* memiliki miselium aerial putih sehingga tampak *floccose*, bagian belakang berwarna jingga pucat, dalam waktu 1 minggu berukuran 30 mm, memiliki klamidiospora serta makrokonidia berbentuk sabit. Selain itu, dominasi makrokonidia berseptata satu di bagian tengah dan keberadaan klamidiospora yang tidak berkelompok menjadi pembeda *F. dimerum* dengan spesies *Fusarium* yang lain (Schoers *et al.*, 2009).

Kapang *F. dimerum* dikenal sebagai kapang yang bersifat saprotrof dan kosmopolitan di tanah dan tumbuhan (Schoers *et al.*, 2009). Kapang ini bersimbiosis parasitisme maupun mutualisme terhadap beberapa serangga, salah satunya dengan ordo *Lepidoptera*. *F. dimerum* merupakan salah satu spesies yang tidak menghasilkan fumonisin yaitu mikotoksin yang umum dihasilkan oleh kapang genus *Fusarium* (Rheeder *et al.*, 2002). Meski menurut O'Donnell *et al.*, (2012) tidak ada *F. dimerum* yang ditemukan pada serangga, namun kapang ini mampu berasosiasi

dengan inang yang mengalami *immunocompromised* (Schoers *et al.*, 2009). Hal ini menunjukkan bahwa *F. dimerum* berpotensi sebagai patogen oportunistik pada serangga, seperti *A. flavus* dan *A. fumigatus*. Selain itu, *F. dimerum* juga telah dilaporkan dapat menyebabkan infeksi kornea mata pada manusia (Vismer *et al.*, 2002). Kapang ini hanya ditemukan pada saluran *hindgut*. Keberadaan kapang ini diduga dapat mencegah terjadinya infeksi mikroorganisme lain karena *F. dimerum* mampu menghasilkan komponen enniatin. Menurut Firáková *et al.*, (2008) enniatin efektif dalam mencegah pertumbuhan beberapa mikroorganisme seperti *Bacillus subtilis*, *Candidaalbicans*, *Trychosporum cutaneum*, dan *Cryptococcus neoformans*.

Keberadaan *F. dimerum* dalam penelitian ini diduga berasal dari lingkungan sekitar, khususnya tanah. Hal ini dapat menjadi faktor predisposisi infeksi pada imago yang dapat bergerak bebas dan terjadi kontak langsung dengan tanah maupun tanaman. Menurut Domsch *et al.*, (2007), *F. dimerum* dianggap sebagai kapang saprotropik kosmopolit di tanah maupun tanaman. Keberadaan kapang ini dapat berpotensi menimbulkan infeksi berupa keratomikosis pada kutikula imago *A. atlas*. Hal ini juga berpotensi menjadi zoonosis pada manusia, khususnya peternak ulat sutera liar *A. atlas*.

Secara makroskopis koloni kapang yang berasal dari trakea, *midgut*, *hindgut*, dan hemolimfe memiliki warna hijau kebiruan pada bagian permukaan atas sedangkan tidak berwarna pada bagian permukaan bawah (Gambar 1C). Bentuk topografinya datar, dan tidak memiliki garis radial pada koloninya. Pertumbuhan kapang ini cepat yaitu 3–4 hari pada media PDA. Secara mikroskopis terdapat struktur vesikel, fialid, hifa, konidiofor dan konidia. Hifa yang terbentuk memiliki septa dan konidiofor, serta memiliki vesikel berbentuk vesikel bulat. Fialid yang terbentuk sedikit lonjong dan terdiri dari satu jenis fialid (primer). Konidia yang terbentuk dari fialid berbentuk bulat memanjang dengan konidia berbentuk bulat membentuk rantai yang kompak. Berdasarkan gambaran secara makroskopis dan mikroskopis, maka koloni kapang diidentifikasi sebagai *Aspergillus fumigatus*. Selain itu juga ditemukan pada sampel larva instar keenam *A. atlas* serta saluran reproduksi dan integumen sampel imago *A. atlas*.

Koloni *A.fumigatus* berwarna hijau kebiruan hingga abu-abu, memiliki vesikel *flaskshaped*, fialid



yang tersusun secara uniseriat, konidia dengan diameter 2,5–3 µm diproduksi secara berantai dengan pada fialid, serta memiliki *foot cell* (Fisher dan Cook, 1998, Latgé, 1999). Keberadaan *A. fumigatus* pada imago *A. atlas* pada penelitian ini sebagai patogen oportunistik karena tidak menimbulkan kematian. Menurut Latgé (1999) dan Leger *et al.*, (2000), *A. fumigatus* melakukan respon pertahanan berupa melanisasi pada integumen inang yang ditandai dengan munculnya bintik kehitaman pada tubuh larva agar tidak difagosit oleh sistem pertahanan inang. Keberadaan *A. fumigatus* pada trakea dapat menimbulkan gangguan seperti pada paru-paru karena enzim protease yang dihasilkan kapang tersebut mampu mendegradasi kolagen dan elastin pada matrik paru-paru (Abad *et al.*, 2010). Namun, keberadaan konidia *A. fumigatus* dalam hemolimfe tidak menimbulkan kematian pada larva (Leger *et al.*, 2000). Konidia yang berada dalam hemolimfe berhasil difagositosis oleh hemosit sebagai respon pertahanan seluler oleh serangga, sehingga tidak ditemukan pertumbuhan hifa pada hemolimfe. Selain itu, keberadaan enzim protease inhibitor di hemolimfe (Chapman, 1998) mampu menekan perkembangan konidia *A. fumigatus* yang mampu menghasilkan enzim protease. Enzim protease dihasilkan oleh *A. fumigatus* untuk memperoleh nutrisi dengan cara mendegradasi jaringan. Keberadaan kapang di *midgut* dan *hindgut* menunjukkan bahwa konidia kapang berhasil menembus epitel saluran pencernaan. Keberadaan kapang ini juga berpotensi membantu proses pencernaan dalam *midgut* karena enzim protease yang dihasilkan *A. fumigatus*. Pada *hindgut* terdapat muara saluran malphigi yang berperan dalam sistem ekskresi. Amonia dan asam urat yang diekskresikan menjadi salah satu sumber nutrisi nitrogen bagi *A. fumigatus* (Abad *et al.*, 2010), sehingga perlu diwaspadai terjadinya pertumbuhan dari kapang yang dapat menimbulkan gangguan bagi larva.

Kapang lain yang ditemukan pada kokon dan larva instar keenam (pada trakea, *midgut*, *hindgut*, hemolimfe) *A. atlas* memiliki warna hijau kekuningan (Gambar 1D). Warna koloni pada bagian permukaan bawah yaitu putih kekuningan. Koloni kapang yang ditemukan pada penelitian ini memiliki pertumbuhan cepat pada media PDA yaitu sekitar 5 hari. Menurut Fisher dan Cook (1998), pertumbuhan koloni dikatakan cepat jika koloni matang (miselium dan spora sudah terbentuk) kurang dari 5 hari. Pertumbuhan sedang jika koloni tumbuh antara 6 sampai dengan 10 hari.

Pertumbuhan lambat jika koloni tumbuh lebih dari 11 hari. Tekstur koloni kapang granular yang memiliki banyak konidia. Topografi dari kapang ini *rugose* yaitu memiliki alur radial yang berpusat di tengah dan alurnya menyerupai jeruji pada ban sepeda. Secara mikroskopis, pada kapang ini ditemukan konidia berbentuk bulat dengan konidiofor yang berbentuk memanjang dan vesikelnya berbentuk bulat. Hifa yang terbentuk memiliki septa dan sel kaki (Gambar 1D). Berdasarkan pengamatan secara makroskopis dan mikroskopis, kapang yang diidentifikasi adalah *Aspergillus flavus*. Gandjar *et al.*, (1999) menyatakan bahwa *A. flavus* memiliki koloni berwarna hijau kekuningan. Kepala konidia khas berbentuk bulat berwarna hijau kekuningan hingga hijau tua kekuningan. Vesikel berbentuk bulat hingga semi-bulat

Keberadaan *A. flavus* pada kokon *A. atlas* diduga berasal dari lingkungan. Sifat dari *A. flavus* pada kokon *A. atlas* adalah sebagai patogen oportunistik, yang berarti kapang ini dapat menjadi patogen ketika sistem pertahanan serangga ini menurun. Hal ini dapat didukung oleh Gupta dan Gopal (2002) yang menyatakan bahwa *A. flavus* adalah patogen oportunistik dari ulat sutera, belalang, lalat rumah, dan kumbang, namun dalam keadaan normal *A. flavus* dapat bertahan tanpa menginfeksi. Sifat *A. flavus* sebagai patogen oportunistik yang dapat tumbuh subur secara saprofit pada inang yang beraneka ragam, termasuk manusia, serangga dan mamalia, meski memiliki virulensi yang rendah (Scully dan Bidochka, 2006). Hal ini ditunjukkan dengan imago dapat keluar dari kokon tanpa terinfeksi oleh kapang tersebut. Keberadaan *A. flavus* di trakea diduga berasal dari udara habitat *A. atlas*. Hal ini dapat terjadi karena *A. Flavus* juga dapat masuk ke dalam tubuh inang melalui proses inhalasi dan ingesti (Markey *et al.*, 2013). Keberadaan *A. flavus* yang mampu menghasilkan enzim proteinase dan protease (Legeret *et al.*, 2000) diduga dapat menyebabkan kerusakan pada trakea. Kapang *A. flavus* yang ditemukan di *midgut* dan *hindgut* berpotensi sebagai flora normal dari larva *A. atlas*, karena enzim ekstraseluler lain yang dihasilkan adalah enzim selulase (Pandit *et al.*, 2014) dan lipase (Azlina *et al.*, 2004). Konidia *A. flavus* yang terfagositosis hemosit mampu berkembang dan menginvasi hemolimfe sehingga dalam waktu 24–34 jam larva dapat mati dengan seluruh tubuh tertutup lapisan hifa *A. flavus* yang berwarna putih (Legeret *et al.*, 2000).

Konidia akan cepat berkolonisasi pada daun, biji dan serangga yang terluka, namun hal tersebut tidak terjadi pada tumbuhan atau serangga yang tidak terluka (Legeret *et al.*, 2000). Serangga yang terluka akan menyebabkan mudahnya *A. flavus* untuk berkolonisasi dan mempermudah untuk melakukan invasi sehingga menyebabkan terjadinya aspergilosis selain akibat dari *A. fumigatus*.

Hasil penelitian dari 5 ekor larva instar keenam *A. atlas*, 3 ekor diantaranya ditemukan *A. flavus* pada trakea, *midgut* dan *hindgut*, serta hemolimfe. Keberadaan *A. flavus* di trakea diduga berasal dari udara habitat *A. atlas*. Hal ini dapat terjadi karena *A. Flavus* juga dapat masuk ke dalam tubuh inang melalui proses inhalasi dan ingesti (Markey *et al.*, 2013). Keberadaan *A. flavus* yang mampu menghasilkan enzim proteinase dan protease (Legeret *et al.*, 2000) diduga dapat menyebabkan kerusakan pada trakea. Kapang *A. flavus* yang ditemukan di *midgut* dan *hindgut* berpotensi sebagai flora normal dari larva *A. atlas*, karena enzim ekstraseluler lain yang dihasilkan adalah enzim selulase (Pandit *et al.*, 2014) dan lipase (Azlina *et al.*, 2004). Keberadaan *A. flavus* di hemolimfe pada larva perlu diwaspadai karena kemampuan kapang menghasilkan aflatoxin berpotensi menurunkan respon pertahanan (imunopresor) tubuh larva. Konidia *A. flavus* yang terfagositosis hemosit mampu berkembang dan menginvasi hemolimfe sehingga dalam waktu 24–34 jam larva dapat mati dengan seluruh tubuh tertutup lapisan hifa *A. flavus* yang berwarna putih (Legeret *et al.*, 2000).

*Aspergillus versicolor* merupakan kapang lain yang juga ditemukan pada imago *A. atlas*, secara makroskopis koloni berwarna hijau kebiruan dan krem dengan warna tepi koloni putih. Warna permukaan bawah koloni kapang ini kuning kecoklatan. Kapang ini memiliki tekstur halus seperti beludru, sedangkan permukaan atas terlihat koloni mempunyai alur radial di tengah seperti jeruji ban sepeda. Koloni tumbuh cepat pada media PDA pada suhu ruang (Gambar 1E). Secara mikroskopis kapang ini memiliki hifa yang bersepta, konidiofor yang *monoverticillate* dan *biverticillate*. Terdapat metula dan fialid yang diikuti dengan konidia yang membentuk rantai (Gambar 1E). Pada koloni yang muda terdapat struktur kapang dengan konidiofor, metula, fialid, dan konidia. Pada koloni tua yaitu lebih dari 7 hari terdapat fialid dan metula yang tumbuh dari vesikel yang berukuran kecil. Adanya struktur metula dan fialid pada gambaran

mikroskopis ini hampir memiliki kesamaan dengan kapang *Penicillium*, namun konidia kapang ini kasar dan bergerigi (Gambar 1E). Struktur konidia yang khas ini menunjukkan bahwa kapang yang diidentifikasi ini adalah *Aspergillus versicolor*. Struktur gerigi dari konidia terlihat pada gambaran mikroskopis, namun kurang begitu jelas. Hal ini sesuai dengan Hong *et al.*, (2007) dan Huh *et al.*, (2013), bahwa koloni *A. versicolor* tumbuh dengan cepat dan memiliki diameter 21–23 mm dalam seminggu. Menurut Hong *et al.*, (2007) diperlukan *scanning electron microscope* (SEM) untuk melihat struktur dan morfologi dari konidia yang bergerigi dari *A. versicolor* dengan lebih jelas.

Kapang *A. versicolor* pada penelitian ini berasal dari integumen imago *A. atlas*. Keberadaan kapang ini pada imago kemungkinan berasal dari lingkungan sekitar imago ketika serangga ini terbang maupun hinggap. Menurut Engelhart *et al.*, (2002), *A. versicolor* dapat ditemukan dalam ruangan yang lembab dan dapat memproduksi *sterigmatocystin*. *Sterigmatocystin* merupakan prekursor biosintesis aflatoxin dan memiliki toksisitas rendah. Belum ada kasus pada manusia, namun pada mencit, tikus, dan monyet dapat bersifat karsinogen. *Sterigmatocystin* diklasifikasikan pada kelas 2B yaitu dapat bersifat karsinogen pada manusia (IARC, 2015). Keberadaan kapang ini dapat berpotensi patogen pada *A. atlas* maupun peternak *A. atlas* karena adanya toksin tersebut.

Kapang lain yang ditemukan pada imago *A. atlas* menyerupai kapang genus *Aspergillus*. Kapang ini memiliki gambaran makroskopis dengan warna koloni ungu kecoklatan dan hijau dengan tepi berwarna putih (Gambar 1F). Bentuk topografinya datar dan memiliki koloni dengan tekstur yang radial dan granular. Warna permukaan bagian bawah kuning pucat hingga coklat muda. Berdasarkan gambaran makroskopis kapang ini memiliki kemiripan dengan *Aspergillus minisclerotium*. Gambaran mikroskopis dari kapang ini yaitu konidiofor berbentuk memanjang. Vesikel dari kapang ini berbentuk bulat, tidak memiliki metula maupun fialid. Konidia yang terbentuk tumbuh langsung dari vesikel

## Kesimpulan

Kapang yang teridentifikasi dari larva instar keenam, kokon dan imago *A. atlas* adalah *A. flavus*, *A. fumigatus*, *Aspergillus* sp (*unknown*), *A. versicolor*,

*F.dimerum*, dan *F. oxysporum*. Kapang yang bersifat patogen oportunistik adalah *F. oxysporum*, *A. flavus*, *A. fumigatus* dan *F.dimerum*, sehinggaberpotensi menginvasi dan menimbulkan penyakit pada imago dan larva *A. atlas* bila kondisi tubuh melemah, serta menurunkan kualitas dari kokon.

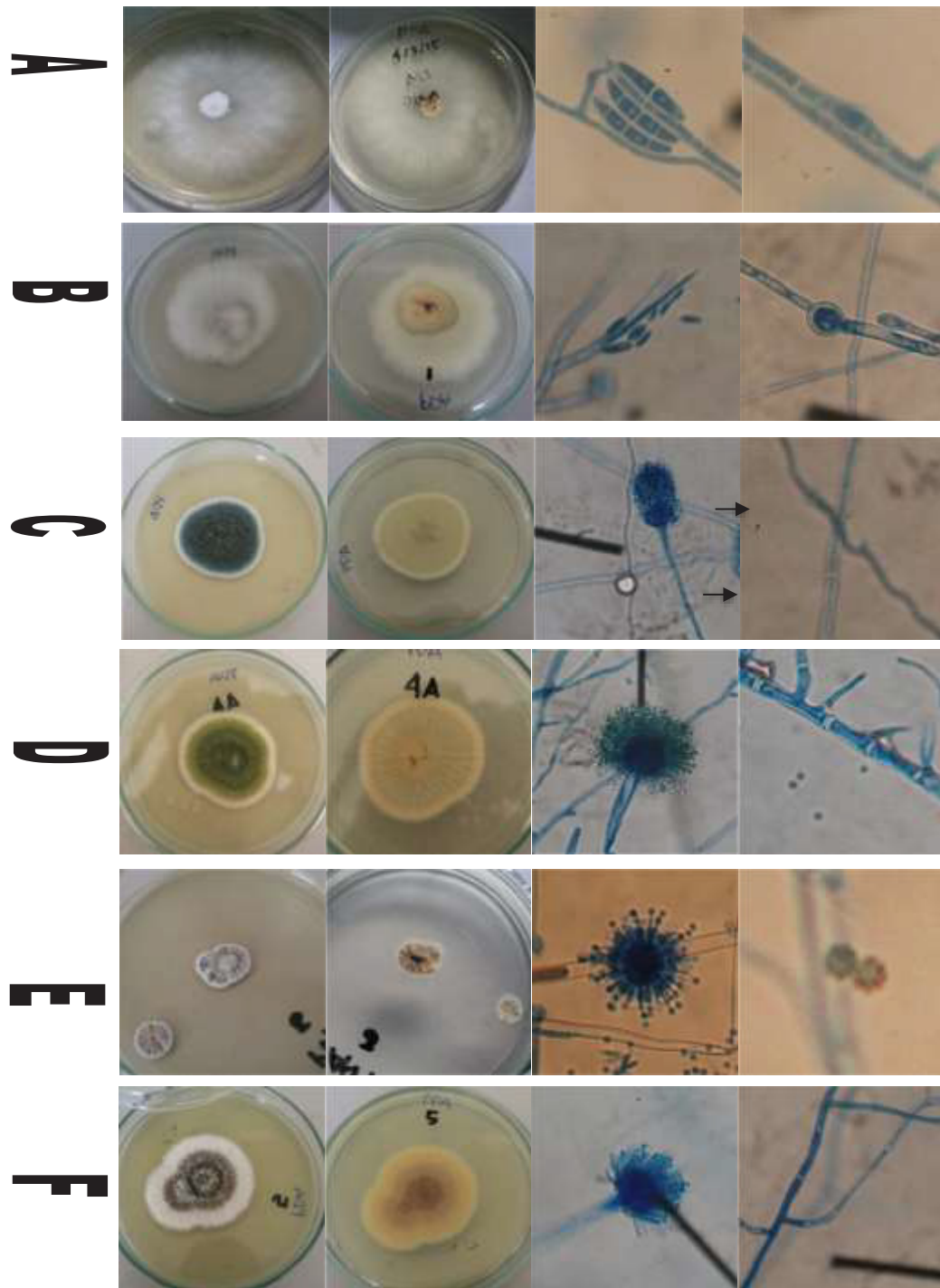
### Ucapan Terima Kasih

Terima kasih diucapkan kepada Perkebunan Teh PTPN VIII Desa Cipto Gumati, Kecamatan Cikalong Wetan, Bandung Barat yang telah memperbolehkan untuk pengambilan sampel penelitian ini

### Daftar Pustaka

- Abad, A., Fernández-Molina, J.V., Bikandi, J., Ramírez, A., Margareto, J., Sendino, J., Hernando, F.L., Pontón, J., Garaizar, J., and Rementeria, A. (2010). What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen: Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. *Rev Iberoam Micol.* 27(4):155-182.
- Arsy, R. (2014). Isolasi dan identifikasi bakteri pada jaringan lemak imago betina ulat sutera liar *Attacus atlas* L. (Lepidoptera: Saturniidae) [skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Awan, A. (2007). Domestikasi Ulat Sutera Liar *Attacus atlas* (Lepidoptera : Saturniidae) dalam usaha meningkatkan persuteraan nasional [disertasi]. Bogor (ID): Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Azlina, M.D., Long, K., and Ghazali, H.M. (2004). Improvement of the specific activity of the extracted mycelium-bound lipase of *Aspergillus flavus*. *J Trop Agric Fd Sc.*32(2):187–195.
- Campbell, C.K., Johnson, E.M., Philpot, C.M., and Warnock, D.W. (1996). *Identification of pathogenic fungi*. London (GB): Public Health Lab Service.
- Chapman, R.F. (1998). *The Insects: Structure and Function*. 4<sup>th</sup> ed. Cambridge (GB): Cambridge Univ Pr.
- Domsch, K.H., Gams, W., and Anderson, T. (2007). *Compendium of soil fungi*. 2<sup>nd</sup> ed. Eching (DE): IHW-Verlag.
- Engelhart, S., Loock, A., Skutlarek, D., Sagueski, H., Lommel, A., Farber, H., and Exner, M. (2002). Occurrence of toxigenic *Aspergillus versicolor* isolates and Sterigmatocystin in carpet dust from damp indoor environments. *App Environ Microbiol.*68(8):3886-3890
- Esnawan, A.A. (2015). Isolasi dan identifikasi bakteri saluran reproduksi imago betina ulat sutera liar *Attacus atlas* L. (Lepidoptera: Saturniidae) [skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Faatih, M. (2005). Aktivitas antimikroba *Attacus atlas* L. *J penelitian sain dan teknologi*6(1):35–48.
- Fajar, M. (2015). Isolasi dan identifikasi bakteri kloaka imago betina ulat sutera liar *Attacus atlas* L. (Lepidoptera: Saturniidae) [skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Firáková, S., Šturdíková, M., Liptaj, T., Prónayová, N., Bezáková, L., and Proksa, B. (2008). Enniatins produced by *Fusarium dimerum*, an endophytic fungal strain. *Pharmazie.* 63:539–541.
- Fisher, F., and Cook, N.B. (1998). *Fundamentals of Diagnostic Mycology*. Pennsylvania (US): WB Saunders.
- Gandjar, I., Samson, R.A., Vermerulen, K.V.D.T., Oetari, A., dan Santoso, I. (1999). *Pengenalan Kapang Tropik Umum*. Jakarta (ID): Yayasan Obor Indonesia.
- Guntoro, S. (1994). *Budidaya Ulat Sutera*. Yogyakarta (ID): Kanisius
- Gupta, A., and Gopal, M. (2002). Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* isolates pathogenic to coconut insect pests. *J Microbial Biotechnol.* 18:325-331.
- Hee, R.C. 1998. *Panduan Teknis Persuteraan Alam Indonesia*. Surabaya (ID): PT Indojado Sutera Pratama, Silk Industri.
- Heritage, J., Evans, G.V., and Killington, R.A. (1996). *Introductory Microbiology*. Cambridge (GB): Cambridge Univ. Pr.
- Hong, G., Li, Y., Jun, G., Ma, X., Wang, H., and You, S. (2007). Morphological and molecular identification of *Aspergillus versicolor* D-1 with selective reduction ability. *J. Tradi Med.* 2(1):39-44.
- Huh, H.J., Lee, J.H., Park, K.S., Jun, T.G., Kang, I., Kim, Y., Ki, C., and Lee, N.Y. (2013). A Case of Misidentification of *Aspergillus versicolor* Complex as a Scopulariopsis

- Species Isolated from a Homograft. *Ann Clin Microbiol.* 16(2):105-109.
- [IARC] International Agent Research Cancer. (2015). *Agents Classified by the IARC Monographs Volume 1-112*.
- Istiqomah H. (2014). Eksplorasi potensi limbah imago ulat sutera liar *Attacus atlas* (Lepidoptera: Saturniidae) [skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Latgé, J.P. (1999). *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 12(2):310–350.
- Leger, R.J., Screen, S.E., and Shams-pirzadeh, B. (2000). Lack of host specialization in *Aspergillus flavus*. *Appl Environ Microbiol.* 66(1):320-324.
- Li, D.W. (2013). *Laboratory Protocols in Fungal*. Gupta VK, Tuohy MG, Ayyachamy M, Turner KM, O'Donovan A, editor. New York (US): Springer-Verlag.
- Markey, B., Leonard, F., Archambault, C.A., Maguire, D. (2013). *Clinical Veterinary Microbiology*. 2nd ed. Britania (GB): Mosby Elsevier.
- Mulyani, N. (2008). Biologi *Attacus atlas* L. (Lepidoptera: Saturniidae) dengan pakan daun kaliki (*Ricinus communis* L.) dan jarak pagar (*Jatropha curcas* L.) di laboratorium [tesis]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor
- Novitasari, P. (2013). Isolasi dan identifikasi bakteri kinolitik penghambat pertumbuhan kapang patogen asal kokon *Cricula trifenestrata* [skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Nucci, M., and Anaissie, E. (2007). *Fusarium Infections in Immunocompromised Patients*. *Clin Microbiol Rev.* 20(4):695-704.
- O'Donnel, K., Humber, R.A., Geiser, D.M., Kang, S.C., Park, B.S., Robert, V.A.R.G., Crous, P.W., Johnston, P.R., Aoki, T., and Rooney, A.P. (2012). Phylogenetic diversity of insecticolous fusaria inferred from multilocus DNA sequence data and their molecular identification via FUSARIUM-ID and *Fusarium* MLST. *Mycologia.* 104(2):427–445.
- Pandit, S., Lawrence, K., Singh, A., and Singh, S. (2014). Saccharification of Baggase, Paper, waste by cellulase produced from *Aspergillus flavus*. *Int J Pure App Biosci.* 2(3):16-22.
- Pelizza, S.A., Stenglein, S.A., Cabello, M.N., Dinolfo, M.I., and Lange, C.E. (2011). First Record of *Fusarium verticillioides* as an entomopathogenic fungus on Grasshoppers. *J Insect Sci.* 11(70):1-8.
- Rheeder, J.P., Marasas, W.F.O., and Vismer, H.F. (2002). Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. *Appl Environ Microbiol.* 68(5):2101–2105.
- Schroers, H.J., O'Donnell, K., Lamprecht, S.C., Kammeyer, P.L., Johnson, S., Sutton, D.A., Rinaldi, M.G., Geiser, D.M., and Summerbell, R.C. 2009. Taxonomy and phylogeny of the *Fusarium dimerum* species group. *Mycologistia.* 101(1):44-70..
- Scully, L.R., and Bidochka, M.J. (2006). A cysteine/ methionine auxotroph of the opportunistic fungus *Aspergillus flavus* is associated with host-range restriction: a model for emerging diseases. *Microbiol.* 152:223-232
- Sun, B., and Liu, X. (2008). Occurrence and diversity of insect-associated fungi in natural soils in China. *App Soil Ecology.* 39:100-108.
- Vismer, H.F., Marasas, W.F., Rheeder, J.P., and Joubert, J.J. (2002). *Fusarium dimerum* as a cause of human eye infections. *Med Mycol.* 40:399–406.



Gambar 1. Koloni kapang secara makroskopis pada media PDA yang diinkubasi 25 °C berumur 5 hari dan secara mikroskopis menggunakan pewarnaan LPCB lalu diamati dengan mikroskop perbesaran 40 ×: *F. oxysporum* (A), *F. dimerum* (B), *A. fumigatus* (C), *A. flavus* (D), *A. versicolor* (E), *Aspergillus*

## Identifikasi Faktor-Faktor yang Menentukan Status Keberlanjutan Usaha Tempat Penampungan dan Potong Ayam (TPnA) di Wilayah Pondok Rumput Kota Bogor

### *Identification of Factors Determining the Sustainability of Chicken Collecting Facilities and Slaughterhouse in Pondok Rumput Area, Bogor*

Luh Putu Desy Puspaningrat<sup>1</sup>, Eko Sugeng Pribadi<sup>1\*</sup>, Maya Dewi Dyah Maharani<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Divisi Mikrobiologi Medik, Departemen Ilmu Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Jl. Raya Dramaga, Babakan, Dramaga

<sup>2</sup>Bagian Perencanaan dan Pelaporan, Dinas Pertanian Kota Bogor, Jl. Raya Dramaga, Babakan, Dramaga

\*Email: [eko.spribadi@yahoo.co.id](mailto:eko.spribadi@yahoo.co.id)

Naskah diterima: 12 Oktober 2017, direvisi: 10 September 2019, disetujui: 30 November 2019

#### Abstract

Increased broiler production in Bogor Regency leads to the continuous development of traditional chicken collecting facilities and slaughterhouse (CCFS), especially in Bogor City. Pondok Rumput area, located in Kebon Pedes Village, as one of CCFS centers. Pondok Rumput CCFS was first established in 1971. There are currently 25 CCFS in Pondok Rumput. The CCFS in this area are located in densely populated residential area. The CCFS, are located in the middle of the residential area leads to various problems, one of which is environmental pollution. The Study aimed to identify the factors determining the sustainability status of CCFS in Pondok Rumput area, in Tanah Sareal Subdistric, Bogor City. The types of data collected included primary and secondary data. The data analysis used by Multi Dimensional Scalling (MDS) analysis (by using *Rapfish* software) and prospective analysis. Partial analysis of each dimension concerning the sustainability status of chicken collecting facilities and slaughterhouse in Pondok Rumput showed that ecological dimension were not unsustainable with a value of 24.66. The key attributes were having business license, conformity to slaughtering regulations, entrepreneurs' attitudes towards relocation, and business feasibility.

**Key words** : prospective; *Rapfish*; slaughterhouse; sustainability

#### Abstrak

Produksi ayam ras pedaging yang meningkat di Kabupaten Bogor, menyebabkan terus berkembangnya TPnA tradisional, khususnya di Kota Bogor. Kawasan Pondok Rumput yang berada di Kelurahan Kebon Pedes merupakan salah satu sentra usaha TPnA. TPnA Pondok Rumput pertama kali didirikan pada tahun 1971. Jumlah TPnA di Pondok Rumput saat ini sebanyak 25 TPnA. TPnA di Kawasan Pondok Rumput berada dipermukiman padat penduduk. Pendirian TPnA di tengah permukiman menimbulkan berbagai masalah salah satunya pencemaran lingkungan. TPnA sebaiknya tidak berada di bagian kota yang padat penduduknya serta letaknya lebih rendah dari permukiman penduduk. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi faktor-faktor yang menentukan status keberlanjutan TPnA di wilayah Pondok Rumput Sareal Kota Bogor. Jenis data yang dikumpulkan meliputi: data primer dan data sekunder. Metode analisis data meliputi: analisis MDS dengan penggunaan *software RapFish* dan analisis prospektif. Analisis secara parsial masing-masing dimensi tentang status keberlanjutan TPnA Pondok Rumput, dimensi ekologi adalah dimensi yang tidak berkelanjutan dengan nilai RMS yaitu 24,66. Atribut kunci (*driving variables*) status keberlanjutan pengelolaan TPnA Pondok Rumput yakni; memiliki izin usaha, kesesuaian peraturan pemotongan, sikap pengusaha terhadap relokasi, dan kelayakan usaha.

**Kata kunci** : keberlanjutan; prospektif; *Rapfish*; TPnA

## Pendahuluan

Produk peternakan merupakan barang dagang yang bernilai tinggi. Permintaan terhadap produk peternakan semakin meningkat seiring dengan meningkatnya pendapatan masyarakat, dan juga disebabkan oleh adanya perubahan pola penggunaan dan selera masyarakat (Kusnadi 2008). Hal tersebut akan mempengaruhi tingkat konsumsi dan selera masyarakat terhadap daging yang berperan sebagai pemenuhan kebutuhan protein hewani (Kuttappan *et al.* 2016). Konsumsi protein hewani dari daging pada Tahun 2014 sebesar 2,68 g/kapita/hari yang meningkat sebesar 7,84% dibandingkan Tahun 2013 yang sebesar 2,47 g (Ditjennak 2015). Tingkat memakan daging unggas sebesar 4,56 g/kapita/hari.

Salah satu sumber protein hewani adalah daging ayam ras pedaging. Daging ayam ras pedaging merupakan produk kelompok ternak unggas dengan tingkat konsumsi tertinggi dibandingkan jenis daging segar lainnya, yakni sebesar 3.963 kg/kapita/tahun pada tahun 2014 dengan tingkat pertumbuhan sebesar 7,9% dibandingkan Tahun 2013 (Ditjennak 2015). Ayam ras pedaging memiliki jumlah populasi yang lebih tinggi dibandingkan ternak penghasil daging lainnya. Pada Tahun 2014, populasi ayam ras pedaging di Indonesia mencapai 1.443.349.118 ekor. Provinsi Jawa Barat menempati urutan pertama untuk jumlah populasi tertinggi di Indonesia dengan peningkatan pertumbuhan 5,44%. Salah satu wilayah Jawa Barat yang memiliki potensi peternakan ayam ras pedaging yang relatif besar adalah Kabupaten Bogor (Ditjennak 2015). Daging ayam ras pedaging yang dihasilkan dari Kabupaten Bogor terus meningkat setiap tahunnya dengan pertumbuhan sebesar 4,44% di Tahun 2014. Salah satu usaha yang dapat mendukung ketersediaan daging ayam di pasar adalah usaha tempat penampungan dan potong ayam (TPnA).

Usaha TPnA tradisional saat ini terus mengalami peningkatan, TPnA tradisional yang berkembang dipicu oleh peningkatan populasi ayam ras pedaging di Kabupaten Bogor yang memasok ayam-ayam hidup ke usaha TPnA di Kota Bogor. Kawasan Pondok Rumput yang berada di Kelurahan Kebon Pedes merupakan salah satu sentra TPnA di Kota Bogor. Usaha TPnA Pondok Rumput pertama kali didirikan pada Tahun 1971. Jumlah TPnA di Pondok Rumput saat ini sudah mencapai 25 TPnA dengan skala pemotongan masing-masing yang berbeda.

Usaha TPnA yang skala besar memiliki kemampuan potong di atas 1.000 ekor/hari, skala sedang berkisar antara 500-1.000 ekor/hari, dan skala kecil di bawah 500 ekor/hari. Usaha TPnA di Pondok Rumput berada di permukiman padat penduduk. Pendirian TPnA di tengah permukiman menimbulkan berbagai masalah, salah satunya pencemaran lingkungan. Usaha TPnA sebaiknya tidak berada di bagian kota yang padat penduduknya dan letaknya harus lebih rendah dari permukiman penduduk. Keberadaan dan kondisi TPnA di Pondok Rumput saat ini telah memunculkan kekhawatiran pada masyarakat berupa adanya kemungkinan terjadinya penyebaran virus dan pencemaran lingkungan.

Keberadaan TPnA yang tidak sesuai persyaratan kesehatan lingkungan sering menimbulkan beberapa permasalahan, yaitu: hasil pemotongan cacat (kesegaran kurang) sehingga perlu memperketat rentang kendali pada ruang pendingin (Maisana *et al.* 2012), sebagai sumber pencemaran bakteri (Paba *et al.* 2014), residu obat hewan yang melampaui ambang batas yang ditetapkan SNI-01-6366-2000 (Yogaswara dan Setia 2004). Kesehatan lingkungan rumah potong yang kurang baik memungkinkan ditemukannya cemaran bakteri *Salmonella* pada karkas yang dihasilkan (Rasschaert *et al.* 2007; Jianghui *et al.* 2011). Selain itu, TPnA yang tidak memenuhi acuan kesehatan dapat menjadi tempat siklus berbagai bakteri (Rusinol *et al.* 2013) dan menjadi ancaman penyebaran virus H2N5 yang berbahaya bagi manusia (Johnson *et al.* 2016). Studi ini mencari dan mengenali faktor-faktor yang menentukan status keberlanjutan usaha TPnA di Pondok Rumput Kecamatan Tanah Sareal Kota Bogor.

## Materi dan Metode

### Metode Pengumpulan Data

Penelitian ini dilakukan dengan metode *desk study* dan pengamatan langsung terhadap TPnA yang terdapat di Pondok Rumput Kecamatan Tanah Sareal Bogor. Proses pengumpulan data, baik data primer maupun sekunder, dilakukan selama dua bulan, yaitu dari April hingga Mei 2016.

Data primer berupa data yang diperoleh secara langsung di lapangan, berupa hasil wawancara dari pihak pemilik TPA dan dinas terkait. Data sekunder berupa data yang diperoleh dari sumber bacaan atau dokumen terkait dengan TPA Pondok Rumput.

## Metode Analisis Data

Data dianalisis dengan *Multi Dimensional Scalling* (MDS) menggunakan *software RapFish* dan analisis prospektif.

## Analisis Keberlanjutan (MDS)

Skor penilaian setiap dimensi dinyatakan dengan skala terburuk (*bad*) 0% hingga terbaik (*good*) 100%. Nilai indeks >50% dapat dinyatakan bahwa dimensi yang dikaji telah berkelanjutan. Sebaliknya, nilai indeks <50% menyatakan bahwa dimensi tersebut belum, atau tidak berkelanjutan (Pitcher 1999). Kategori indeks keberlanjutan lebih rinci disajikan pada Tabel 1.

## Analisis Prospektif

Hasil analisis prospektif berbentuk skema empat kwadran yang merupakan kedudukan atribut-atribut pengungkit seperti yang disajikan dalam Gambar 1 dengan penjelasan masing-masing kwadran seperti berikut.

- Kwadran-I adalah kwadran penentu yang merupakan kwadran faktor penentu (*driving variables*). Kwadran ini memuat atribut-atribut yang memiliki pengaruh kuat dan ketergantungan antar atribut rendah
- Kwadran-II adalah kwadran penghubung yang merupakan kwadran faktor penghubung (*leverage variables*). Kwadran ini memuat atribut-atribut yang memiliki pengaruh kuat dan ketergantungan antar atribut juga kuat
- Kwadran-III adalah kwadran hasil yang merupakan kwadran faktor terikat (*output variables*). Kwadran ini memuat atribut-atribut yang memiliki pengaruh rendah dan ketergantungan antar atribut kuat
- Kwadran-IV adalah kwadran terikat yang merupakan kwadran peubah bebas (*marginal variables*). Kwadran ini memuat atribut-atribut yang memiliki pengaruh rendah dan ketergantungan antar atribut juga rendah.

## Hasil dan Pembahasan

### Tingkat Keberlanjutan TPnA Pondok Rumput

Kajian tingkat keberlanjutan TPnA Pondok Rumput dilakukan dengan mengevaluasi empat dimensi keberlanjutan yakni ekologi, ekonomi, sosial dan kelembagaan. Setiap dimensi dikaji berdasarkan atribut-atribut yang merupakan indikator keberlanjutan.

Hasil analisis *Rapfish* disajikan pada Gambar 2, Tabel 2 dan Gambar 3.

Analisis *Rapfish* memperlihatkan nilai status keberlanjutan adalah 45,85% yang dikategorikan sebagai nilai kurang berkelanjutan. Kondisi tersebut menunjukkan bahwa TPnA Pondok Rumput mengalami tekanan dalam pengelolaannya. Hasil tersebut tervalidasi dengan nilai Monte Carlo 46,64% yang menunjukkan selisih perbedaan yang sangat kecil yakni 0,79 atau kurang dari 1%. Nilai tersebut menunjukkan bahwa pengaruh galat (*error*), atau dampak dari kesalahan pemberian skor relatif kecil. Nilai keberlanjutan TPnA Pondok Rumput yang rendah dipengaruhi oleh empat dimensi yaitu dimensi ekologi, ekonomi, sosial dan kelembagaan.

Jika ditinjau dari dimensi ekologi, TPnA Pondok Rumput belum menerapkan hygiene dan sanitasi yang baik. Pengelolaan TPnA Pondok Rumput masih bersifat tradisional yang memiliki peralatan, teknik pemotongan dan cara penanganan karkas yang belum memenuhi aspek hygiene dan sanitasi. Destriyana *et al* (2013) menyatakan bahwa sumber cemaran dapat berasal dari alat-alat yang tidak bersih, petugas yang tidak menjaga kebersihan diri, dan penggunaan air yang tidak bersih. Pencemaran bakteri usus dan feses dapat saat pengeluaran jeroan dan pencemar berpindah ke karkas melalui peralatan dan tangan pekerja. Selain itu, bakteri pencemar dapat mencemari lokasi TPnA dan kemudian akan mencemari lingkungan sekitar lokasi TPnA (Sibarani 2011). Abudarda (2015) menyatakan bahwa cemaran *Enterobacteriaceae* dalam karkas ayam di TPnA Pondok Rumput Kota Bogor terlacak sebanyak 93,3% dari contoh karkas ayam yang diperiksa. Tingginya jumlah *Enterobacteriaceae* pada contoh yang diuji dapat disebabkan oleh cara pengolahan karkas ayam yang buruk di tempat potong karena tidak ada pemisahan ruang bersih dan ruang kotor dalam pelaksanaan pemotongan.

Jika ditinjau dari dimensi ekonomi, TPnA Pondok Rumput tidak memiliki izin sehingga tidak layak untuk melakukan proses pemotongan. Izin tidak dikeluarkan oleh Pemerintah Kota Bogor karena TPnA Pondok Rumput terletak di tengah permukiman padat penduduk yang berpotensi menurunkan indeks kesehatan masyarakat akibat terjadinya pencemaran lingkungan dari proses pemotongan. Selain itu, TPnA Pondok Rumput tidak dilengkapi sarana dan prasarana yang memadai untuk menghasilkan karkas yang aman, sehat, utuh dan halak (ASUH) (Suriastini 2014). Izin yang tidak dimi-



liki oleh TPnA Pondok Rumput menyebabkan TPnA tersebut tidak membayar retribusi sehingga tidak ada perannya terhadap pendapatan Kota Bogor.

Jika ditilik dari dimensi sosial, aspek sosial mengalami tekanan karena sikap pengusaha kurang setuju terhadap proses pemindahan TPnA Pondok Rumput ke rumah Potong Hewan (RPH) Terpadu Bubulak. Jarak dan kenyamanan tempat pemotongan merupakan salah satu penghambat pemindahan TPnA. Jarak yang jauh membuat para pengusaha mengeluarkan biaya angkut yang lebih mahal. Selain itu, pengusaha merasa kurang nyaman untuk melakukan proses pemotongan karena tempat pemotongan yang disediakan di RPH Terpadu Bubulak kurang memadai atau tidak sesuai dengan skala pemotongan masing-masing unit TPnA Pondok Rumput.

Jika ditilik dari dimensi kelembagaan, TPnA Pondok Rumput tidak memiliki izin usaha karena untuk membangun TPnA diperlukan persyaratan lokasi dan ketersediaan sarana yang cukup memadai. TPnA Pondok Rumput bertentangan dengan Peraturan Daerah Kota Bogor Nomor 8 Tahun 2011 tentang Rencana Tata Ruang dan Wilayah (RTRW). Hal ini dikarenakan TPnA Pondok Rumput berada dalam wilayah permukiman yang padat dan bukan di dalam wilayah yang peruntukan untuk industri. Peraturan pemotongan kurang terpenuhi, seperti tidak dilakukan proses pemingsanan, pemeriksaan pasca mati (*postmortem*) kurang dilakukan dengan baik dan karkas tidak ditinginkan atau dibekukan.

Nilai keberlanjutan dari keempat dimensi menunjukkan status kurang berkelanjutan, yakni <50%, dengan rata-rata nilai tekanan (*stress*) sebesar 14,46% dan  $R^2=0,942$ . Nilai tersebut menunjukkan pengelolaan TPnA Pondok Rumput saat ini mengalami tekanan yang cukup tinggi dari empat dimensi pembangunan berkelanjutan. *Trade-off* dimensi pengelolaan TPnA Pondok Rumput disajikan dalam bentuk diagram layang (*kite-diagram*) pada Gambar 2.

Diagram layang menunjukkan *trade-off* keempat dimensi pengelolaan TPnA Pondok Rumput dan dari diagram tersebut terdapat dua dimensi yang sangat menonjol, yakni dimensi ekologi dengan nilai 24,66% dan dimensi kelembagaan dengan nilai 32,79%.

### **Atribut Pengungkit dalam Pengelolaan TPnA Pondok Rumput**

Hasil analisis *Rapfish* yang diperoleh terdapat sembilan atribut utama yang merupakan atribut

pengungkit, atau atribut yang memberikan pengaruh/peranan paling tinggi terhadap keberlanjutan pengelolaan TPnA Pondok Rumput. Sembilan atribut tersebut meliputi dimensi ekologi dengan dua atribut, dimensi ekonomi dengan tiga atribut, dimensi sosial dengan dua atribut dan dimensi kelembagaan dengan dua atribut. Sembilan atribut pengungkit dijelaskan lebih rinci dalam Tabel 1.

Penilaian tingkat pengaruh antar atribut dilakukan terhadap sembilan atribut pengungkit tersebut, baik secara langsung maupun tidak langsung. Hal ini perlu dilakukan karena terdapat hubungan antara setiap atribut dalam pengelolaan TPnA Pondok Rumput. Hubungan antara atribut tersebut dapat berupa pengaruh, ataupun ketergantungan antar atribut. Hasil analisis prospektif disajikan pada Gambar 2. Berdasarkan hasil analisis prospektif, diperoleh hasil bahwa tipe sebaran cenderung mengumpul di Kwadran I dan III. Tipe ini menunjukkan bahwa tata laksana yang dibangun bersifat tetap (stabil) karena memperlihatkan hubungan yang kuat karena peubah penggerak/penentu mengatur peubah terikat dengan kuat (Bourgeois dan Jesus 2004). Faktor yang termasuk ke dalam Kwadran I merupakan atribut yang memiliki pengaruh kuat terhadap keberlanjutan TPnA Pondok Rumput. Faktor izin usaha sangat perlu dimiliki oleh usaha TPnA Pondok Rumput. Karena tidak memiliki izin, maka usaha TPnA Pondok Rumput tidak bisa membayar retribusi sehingga tidak ada peran serta TPnA Pondok Rumput terhadap pendapatan Kota Bogor.

Atribut kesesuaian peraturan pemotongan dan kelayakan usaha mempengaruhi hygiene dan sanitasi dari TPnA Pondok Rumput untuk menghasilkan karkas ASUH. Tahapan pemingsanan dalam proses pemotongan tidak dilakukan oleh TPnA Pondok Rumput. Padahal tahapan ini bertujuan mengurangi rasa sakit, memudahkan proses penyembelihan dan mempercepat proses pengeluaran darah. Ayam tidak tercekam ketika disembelih sehingga proses pengeluaran darah menjadi lancar dan mutu karkas yang dihasilkan lebih baik (Sibarani 2011). Hal lain yang mempengaruhi mutu karkas yang dihasilkan adalah tidak tersedianya sarana dan prasarana yang mendukung, dan tidak adanya ruang kotor dan bersih sehingga sulit untuk menghasilkan karkas yang ASUH. Pemerintah juga akan serba salah dalam memberikan bimbingan terhadap pelaksanaan pemotongan karena mereka tidak memiliki izin.

### Kesimpulan

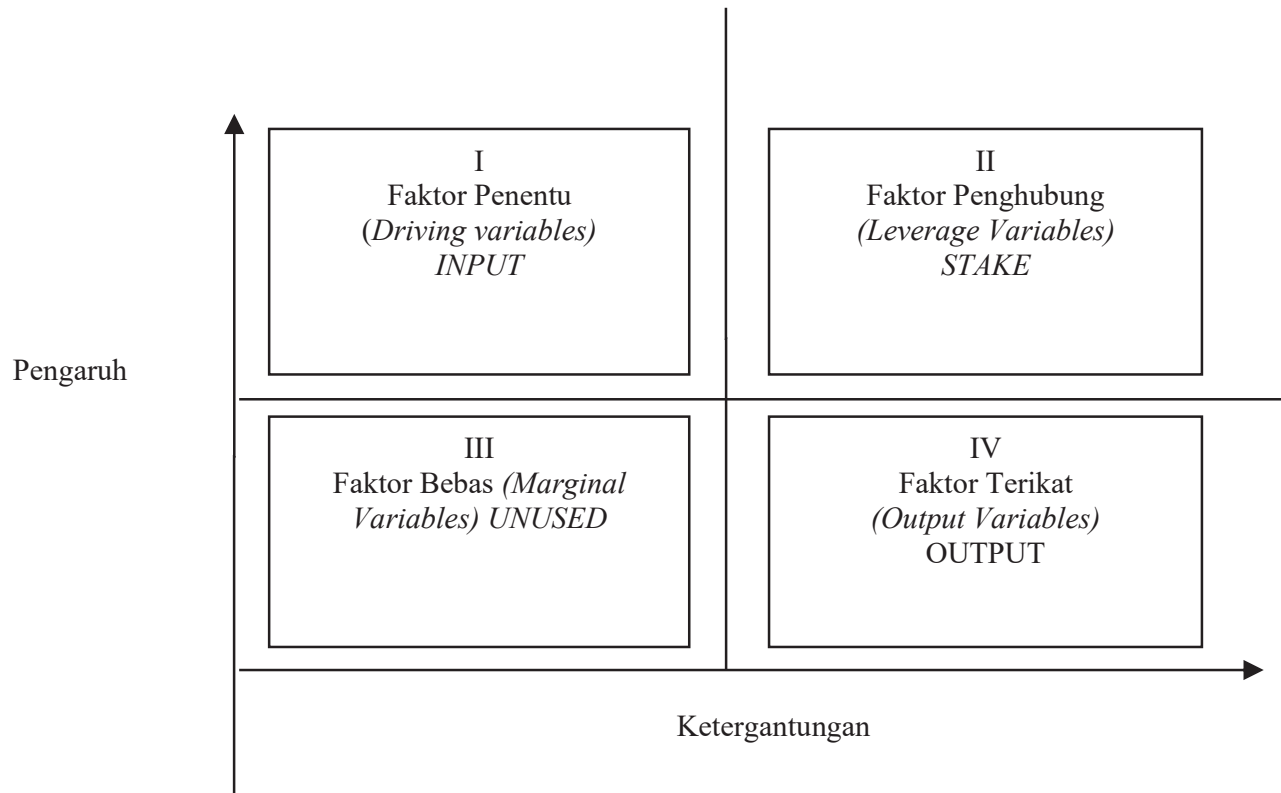
Hasil Studi menunjukkan bahwa keberadaan TPnA Pondok Rumput tidak berkelanjutan jika memperhatikan dimensi ekologi, dimensi ekonomi dan dimensi kelembagaan. Faktor kunci status keberlanjutan adalah izin usaha, kesesuaian peraturan pemotongan, sikap pengusaha terhadap upaya pemindahan, dan kelayakan usaha. Pemerintah Kota Bogor harus memiliki skenario strategik untuk memindahkan TPnA Pondok Rumput ke RPH Terpadu Bubulak dengan memperhatikan peningkatan pada aspek ekonomi dan sosial yang memiliki nilai lebih tinggi dari nilai yang ditunjukkan oleh TpnA Pondok Rumput.

### Daftar Pustaka

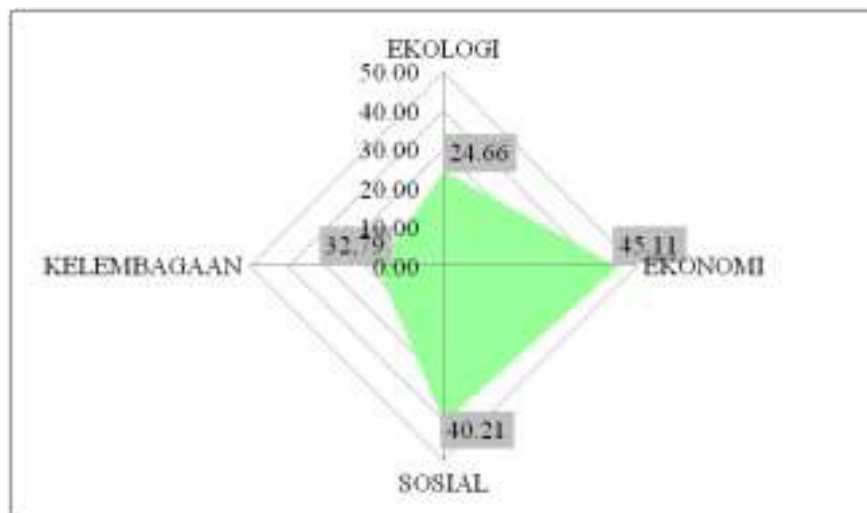
- Abudarda, A.M.R. (2015). Cemaran Enterobacteriaceae pada daging ayam dari tempat potong unggas Kota Bogor. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Bourgeois, R., and Jesus, F. (2004). Participatory prospective analysis, exploring and anticipating challenges with pemangku kepentingan. Center for alleviation of poverty through secondary crops development in Asia and The Pacific and French agricultural research center for international development. *Monograph* 46: 1 – 29.
- Destriyana, L.M., Sawacita, I.B.N., and Besung, I.N.K. (2013) Pemberian perasan bahan antibakteri alami dan lama penyimpanan pada suhu kulkas (5 °C) terhadap jumlah bakteri coliform pada daging babi. *Bul. Vet. Udayana* 5(2): 5-9.
- [Ditjennak] Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan. (2015). Statistik Peternakan dan Kesehatan Hewan 2015. Jakarta (ID): Kementerian Pertanian RI.
- Fauzi, A., and Anna, S. (2002). Evaluasi status keberlanjutan pembangunan perikanan: aplikasi pendekatan rapfish (studi kasus perairan pesisir DKI Jakarta). *JPLT* 4(2): 36-49.
- Jianghui, Z., Yeru, W., Xiaoyu, S., Shenghui, C., Haibin, X., Baowei, Y., Jinlin, H., Guihui, L., Qian, C., Gang, Z., Qiuxia, C., and Fenggin, L. (2014). Prevalence and quantification of *Salmonella* contamination in raw chicken carcasses at the retail in China. *Food Cont.* 44:198-202.
- Johnson, K.K., Seeger, R.M., and Marsh, T.L. (2016). Local economies and highly pathogenic avian influenza. *JEL* 31(2):1–9.
- Kusnadi, U. (2008) Inovasi teknologi peternakan dalam sistem integrasi tanaman ternak untuk menunjang swasembada daging sapi. *PIP* 1(3):189–205.
- Kuttappan, V.A., Hargis, B.M., and Owens, C.M. (2016). White striping and woody breast myopathies in the modern poultry industry: a review. *Poult Sci.* 95(11):2724-2733. doi:10.3382/ps/pew216.
- Maisana, Z., Hartoyo, S., Fahmi, I., dan Wijaya, H. (2012). Pendekatan total quality management produk broiler tolakan. *JMA* 9(3):163-172.
- Paba, E., Chiominto, A., Marcelloni, A.M., Proietto, A.R., and Sisto, R. (2014). Exposure to airborne culturable microorganisms and endotoxin in two Italian poultry slaughterhouses. *JOEH* 11: 469-478. doi: 10.1080/15459624.2013.877141.
- Pitcher, T.J. (1999) Rapfish: A rapid appraisal technique for fisheries, and its application to the code of conduct for responsible fisheries. *FCRR* 12(2): 213-220.
- Rasschaert, G., Houf, K., and De Zutter, L. (2007). Impact of the slaughter line contamination on the presence of *Salmonella* on broiler carcasses. *JAM* 103(2):333-341. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03248.x.
- Rusinol, M., Carratala, A., Hundesa, A., Bact, A., Kern, A., Vantarakis, A., Girones, R., and Bofill, S. (2013). Description of a novel viral tool to identify and quantify ovine faecal pollution in the environment. *Sci. Total Environ.* 458-460: 355-360. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.04.028.
- Sibarani, F. (2011) Evaluasi penerapan teknik pemotongan ayam ditinjau dari keamanan pangan dan kehalalan di tempat pemotongan ayam (TPnA) di empat Kecamatan, Kabupaten Bogor. Tesis. Institut Pertanian Bogor.
- Suriastini, P.C. (2014) Kajian analisis risiko keberadaan tempat pemotongan ayam di pondok rumput bogor terhadap penyebaran penyakit avian influenza. Skripsi. Program Studi Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor.

Yogaswara, Y., dan Setia, L. (2004) Kajian hasil monitoring dan surveilans cemaran mikroba dan residu obat hewan pada produk pangan asal hewan di Indonesia. *Lokarkarya Nasional*

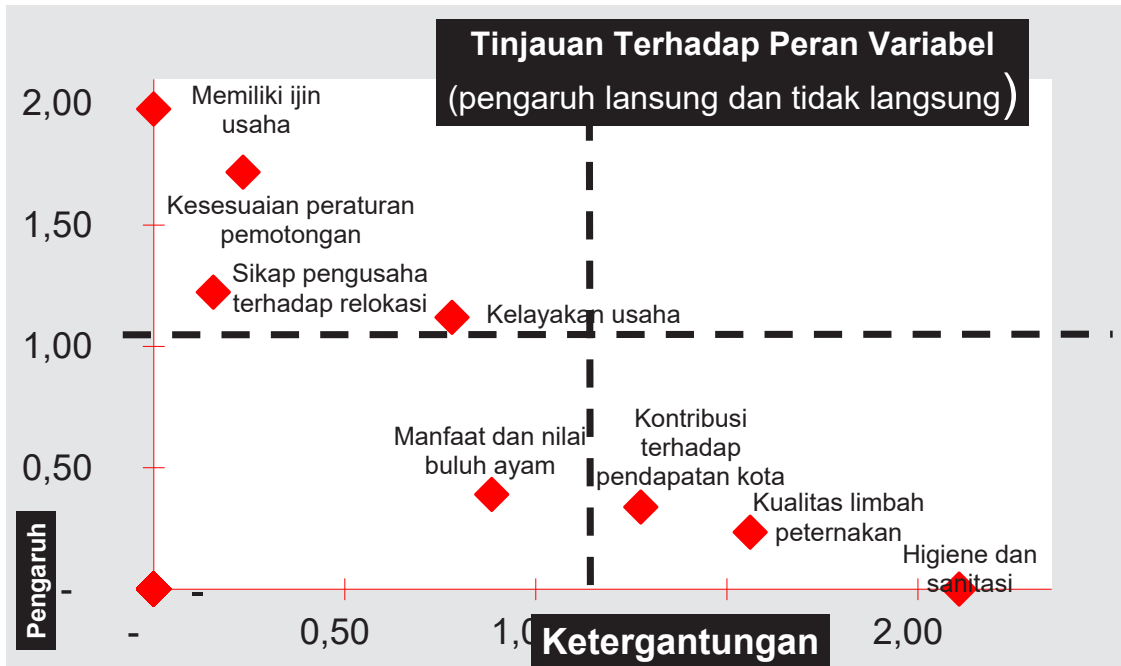
*Keamanan Pangan Produk Peternakan*. <http://peternakan.litbang.pertanian.go.id/fullteks/lokakarya.lkpangan05-28.pdf>. Diakses pada 15 Maret 2017.



Gambar 1. Pengaruh dan ketergantungan faktor penelitian



Gambar 2. Diagram layang keberlanjutan pengelolaan TPnA Pondok Rumpu



Gambar 3. Atribut pengungkit dalam pengelolaan TPnA Pondok Rumput

Tabel 1. Kategori indeks keberlanjutan (Pitcher 1999)

Nilai Indeks	Kategori keberlanjutan
0-25	Buruk; tidak berkelanjutan
26-50	Kurang; kurang berkelanjutan
51-75	Cukup; cukup berkelanjutan
76-100	Baik; sangat berkelanjutan

Tabel 2. Nilai *Root Mean Square* (RMS) dari atribut pengungkit

Atribut Pengungkit	Dimensi	Nilai RMS
Mutu limbah TPnA	Ekologi	4,95
Higieni dan sanitasi	Ekologi	5,74
Manfaat dan nilai ekonomi bulu ayam	Ekonomi	7,28
Peran serta terhadap pendapatan Kota Bogor	Ekonomi	6,12
Kelayakan usaha	Ekonomi	5,56
Sikap pengusaha terhadap pemindahan ke RPH Terpadu Bubulak	Sosial	4,46
K-3	Sosial	1,95
Peraturan proses pemotongan	Kelembagaan	14,14
Izin usaha	Kelembagaan	10,43

## **Seroprevalensi Penyakit *Egg Drop Syndrome* pada Itik di Desa Tumbak Bayuh, Kecamatan Mengwi, Badung, Bali**

### ***Seroprevalence of Egg Drop Syndrome in Ducks in Tumbak Bayuh Village, Mengwi Subdistrict, Badung, Bali***

**Gusti Ayu Yuniati Kencana<sup>1\*</sup>, I Made Kardena<sup>2</sup>, Ni Wayan Apsari Shantika Pratistha<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Laboratorium Virologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana, Denpasar

<sup>2</sup>Laboratorium Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana, Denpasar

<sup>3</sup>Program Pendidikan Dokter Hewan, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana, Denpasar  
Jln. P.B Sudirman, Denpasar  
Email: [yuniati\\_kencana@unud.ac.id](mailto:yuniati_kencana@unud.ac.id)

Naskah diterima: 24 Januari 2019, direvisi: 16 Juli 2019, diterima: 30 November 2019

#### **Abstract**

*Egg Drop Syndrome* (EDS) can cause detrimental impacts on breeders due to reducing production and quality of the affected eggs. This study aim was to determine the seroprevalence of antibody against *Egg Drop Syndrome* virus in ducks. Antibody titers examination was done from 75 blood samples of ducks that have not been vaccinated against EDS virus. The duck samples were collected from Tumbak Bayuh Village, Mengwi, Badung. Serological examination was held at the Virology Laboratory, Faculty of Veterinary Medicine, Udayana University by using Haemagglutination Inhibition (HI) test. HI test results showed that 24 samples were positive contained antibody of the EDS, while 51 samples were negative. Range of EDS antibody titer observed was from  $2^4$  to  $2^7$  HI units. This results indicated that the ducks have protective antibody titer against EDS virus. The positive serum samples were also tested using HI test against *Newcastle Disease* (ND) virus with negative result. It can be concluded that the ducks in Tumbak Bayuh Village, Mengwi, Badung have 32% of antibody titer against EDS virus which might result from being exposed by EDS virus naturally.

**Key words:** Badung; Bali; ducks; EDS, seroprevalence;

#### **Abstrak**

*Egg drop syndrome* (EDS) merupakan penyakit virus yang dapat menyebabkan penurunan produksi dan kualitas telur. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui seroprevalensi penyakit *Egg Drop Syndrome* pada itik. Sebanyak 75 ekor itik yang belum pernah divaksinasi EDS dijadikan sampel penelitian. Penelitian ini dilakukan pada peternakan itik yang berlokasi di Desa Tumbak Bayuh, Mengwi, Badung, Bali. Pemeriksaan serologi dilakukan di Laboratorium Virologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana menggunakan uji *Haemagglutination Inhibition* (HI). Hasil uji HI menunjukkan sebanyak 24 sampel serum itik positif mengandung antibodi terhadap virus EDS sedangkan 51 sampel negatif. Titer antibodi EDS yang diperoleh berkisar antara  $2^4$  sampai  $2^7$  HI unit. Sampel serum yang positif EDS juga diuji HI terhadap *Newcastle Disease* (ND), namun hasilnya negatif. Disimpulkan bahwa seroprevalensi EDS pada itik di Desa Tumbak Bayuh, Mengwi, Badung sebesar 32% yang kemungkinan itik pernah terpapar oleh virus penyakit EDS secara alami.

**Kata kunci:** Badung; Bali; itik; penyakit EDS; seroprevalensi

## Pendahuluan

Itik merupakan sumber keanekaragaman hayati sebagai hewan ternak yang mempunyai peluang untuk dikembangkan di Indonesia. Usaha peternakan itik semakin diminati sebagai alternatif sumber pendapatan bagi masyarakat di pedesaan maupun di sekitar perkotaan. Hal ini disebabkan oleh beberapa kondisi lingkungan strategis yang lebih memihak pada usaha peternakan itik. Kondisi tersebut antara lain semakin terpuruknya usaha peternakan ayam ras skala kecil dan munculnya wabah penyakit ayam yang sangat merugikan peternakan ayam ras maupun ayam kampung. Di samping itu, semakin terbukanya pasar produk asal itik ikut mendorong berkembangnya peternakan itik di Indonesia (Prasetyo *et al.*, 2010).

Salah satu jenis itik yang dternakkan oleh masyarakat di Indonesia adalah itik Bali (*Anas platyrhynchos domestica*). Itik Bali sebagai salah satu jenis unggas yang lebih banyak dimanfaatkan telurnya dibandingkan dengan dagingnya. Di Bali, telur itik selain dikonsumsi juga dimanfaatkan sebagai sarana upacara agama Hindu, juga dijadikan telur asin. Selain itu, telur itik juga merupakan salah satu sumber makanan yang mengandung komponen utama terdiri atas air, protein, lemak, karbohidrat, vitamin dan mineral (Gumay, 2009). Itik mulai memproduksi telur pada umur 6 bulan dengan lama bertelur 8 - 9 bulan. Selanjutnya, itik mengalami masa istirahat (luruh bulu atau *molting phase*) sekitar 3 sampai 3,5 bulan dan setelah itu bertelur kembali (Budiasa dan Bebas, 2008).

Sistem pemeliharaan itik yang umum digunakan di Indonesia adalah secara intensif (dikandangan), semi-intensif, dan ekstensif (tidak dikandangan). Sistem pemeliharaan itik secara ekstensif berpeluang mudah terinfeksi penyakit yang dapat mempengaruhi produktivitasnya. Salah satu penyakit yang menyebabkan penurunan produktivitas telur adalah *Egg Drop Syndrome* (EDS) (Sari *et al.*, 2012).

*Egg Drop Syndrome* merupakan penyakit unggas yang disebabkan oleh virus dari genus *Atadenovirus* yang menyerang organ reproduksi unggas betina. Penyakit EDS pertama sekali dilaporkan oleh Van Eck dkk., tahun 1976 yang ditemukan pada kasus penurunan produksi telur di peternakan ayam yang terjadi di Belanda. Sejak saat itulah mulai banyak dilaporkan kasus penurunan produksi telur yang disebabkan oleh virus EDS tersebut, yang dilaporkan meluas ke seluruh dunia, terutama pada tahun 1980

dan 1990-an. Kasus EDS juga pernah dilaporkan terjadi di beberapa peternakan ayam ras petelur di Bali, sedangkan di Kupang pernah terjadi dan bersifat mewabah (Ditjennak, 2014). Virus EDS juga pernah dilaporkan dan diisolasi dari peternakan ayam petelur komersial dari Medan, Surabaya dan Bogor (Kencana *et al.*, 2017), sedangkan khusus isolate dari Medan telah dikarakterisasi dan diuji coba sebagai kandidat vaksin EDS dengan tujuan untuk mengatasi kasus EDS di Indonesia (Kencana *et al.*, 2018).

Itik yang terinfeksi EDS tidak menunjukkan gejala klinis yang menciri, seringkali sifatnya subklinis. Oleh sebab itu, penyakit EDS sering dikelirukan dengan *molting phase* pada itik dan juga merupakan kondisi abnormal kerabang telur akibat kurangnya kandungan mineral dalam pakan sehingga menyebabkan bentuk telur menjadi abnormal (Budiasa dan Bebas, 2008). Penyakit *Newcastle Disease* (ND) juga merupakan diagnosa banding penyakit EDS karena dapat mengakibatkan penurunan produksi telur (Ditjennak, 2014). Disamping itu kedua penyakit tersebut juga ditemukan di Indonesia khususnya di wilayah Bali. Kedua penyakit tersebut dapat diuji secara serologi dengan uji hemaglutinasi (HA/HI) (Kencana, 2012).

Pencegahan penyakit EDS dapat dilakukan dengan vaksinasi, baik menggunakan vaksin inaktif tunggal maupun vaksin yang dikombinasi dengan vaksin virus lainnya. Vaksinasi dengan vaksin EDS tunggal dapat meningkatkan titer antibodi sebesar  $2^{5,04}$  HI unit periode dua minggu pasca divaksinasi, dan sebayak titer  $2^{6,4}$  HI unit periode tiga minggu pasca vaksinasi (Kencana *et al.*, 2017). Vaksinasi dengan vaksin kombinasi ND-AI-EDS juga dapat dilakukan (Kencana *et al.*, 2017). Vaksin kombinasi dapat menanggulangi beberapa penyakit virus sekaligus sesuai dengan kandungan virus vaksin yang diberikan. 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 memiliki risiko stres yang minimal pada ayam akibat vaksinasi yang berulang (Kencana *et al.*, 2017). Penggunaan vaksin kombinasi kadangkala juga dapat mempengaruhi efektivitas vaksin dalam menginduksi pembentukan antibodi yang protektif (Cardoso *et al.*, 2005).

Desa Tumbak Bayuh, Kecamatan Mengwi, Badung merupakan daerah penghasil telur itik terbesar di Kabupaten Badung dengan populasi peternakan itik sebesar 90.971 ekor di seluruh Kabupaten Badung (BPS Badung, 2015). Para peternak itik di Desa Tumbak Bayuh mengembangkan sektor peternakannya dengan sistem pemeliharaan ekstensif (dilepaskan di sawah). Selain peternakan itik, di wilayah Desa Tumbak Bayuh juga ada dua peternakan ayam broiler skala industri. Wilayah Desa Tumbak Bayuh berbatasan langsung dengan Desa Cepaka yang memiliki peternakan ayam petelur komersial sehingga dapat berpotensi terlarut penyakit EDS jika itik yang dilepaskan itu terinfeksi EDS. Di Tumbak Bayuh populasi dan jenis ternak unggas yang ditanamkan cukup bervariasi sehingga potensi penularan penyakit EDS antar unggas lebih tinggi. Oleh karena itu, perlu dilakukan studi lapangan mengenai tingkat kekebalan terhadap penyakit EDS pada itik. Pemeriksaan serologi yang dipilih adalah uji Hambatan hemaglutinasi (*Hemagglutination Inhibition* atau HI) Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui seroprevalensi penyakit *Egg Drop Syndrome* (EDS) pada itik yang dipelihara di Desa Tumbak Bayuh, Kecamatan Mengwi, di Kabupaten Badung, provinsi Bali

### Materi dan Metode

Sampel penelitian ini adalah serum itik yang tidak divaksin EDS (data hasil wawancara dengan pemilik ternak) yang dipelihara secara ekstensif. Itik yang *disampling* berumur > 25 minggu, berasal dari tiga peternakan itik berbeda skala besar (Peternakan dengan kode A, B dan C dari pemilik yang namanya diacak tidak sesuai dengan urutan kode peternakan, yaitu: Bapak Mangku Sarwa, Bapak Tude Darma dan Bapak Nyoman Arca . Ketiga peternakan berlokasi di Desa Tumbak Bayuh, Kecamatan Mengwi, Kabupaten Badung. Masing-masing peternakan dipilih secara acak sebanyak 25 ekor itik untuk dikoleksi sampel serumnya sehingga total sampel serum itik adalah 75.

Pengambilan sampel darah dilakukan satu kali. Darah diambil melalui vena sayap (*vena axylaris*) menggunakan spuit 3 mL. Sebelum diambil darahnya, terlebih dahulu pada area lokasi pengambilan darah didesinfeksi dengan kapas beralkohol 70% untuk mencegah kontaminasi bakteri. Darah diambil dengan spuit 3 mL, disisakan ruang kosong pada spuit kemudian spuit ditempatkan pada posisi datar dan didiamkan pada

suhu ruangan selama 30 menit sampai satu jam hingga serum darah terpisah. Serum selanjutnya dipisahkan dari bekuan darah lalu ditampung dengan tabung mikro (*microtube*). Selanjutnya, serum disimpan dalam *freezer* pada suhu 18°C sampai siap digunakan untuk uji HI.

### Pembuatan suspensi eritrosit 1 %

Sesuai dengan prosedur OIE (2016), pembuatan suspensi eritrosit ayam 1% dimulai dengan pengambilan darah ayam sebanyak 2,5 ml melalui vena *brachialis* lalu ditampung dengan tabung yang berisi antikoagulan. Suspensi darah selanjutnya dicuci dengan cara ditambahkan 5 ml *Phosphat Buffered Saline* (PBS) pH 7,2 lalu dihomogenkan perlahan-lahan agar tidak rusak, selanjutnya disentrifugasi selama 15 menit. *Buffy coat* dan supernatan dipisahkan dari endapan eritrosit. Pencucian eritrosit dilakukan sebanyak tiga kali. Setelah proses pencucian selesai, endapan eritrosit hasil pencucian dipisahkan lalu diencerkan hingga 1% dalam larutan PBS (Mahardika et al., 2015).

### Hemaglutinasi (HA) untuk menyiapkan antigen 4 HA unit.

Sebanyak 0,025 mL PBS diisi pada masing-masing lubang plat mikro dengan menggunakan pipet mikro atau *microdropper*. Selanjutnya suspensi antigen yang diuji ditambahkan pada lubang pertama dan kedua plat mikro. Pengenceran berseri kelipatan dua dimulai dari lubang kedua sampai lubang kesebelas dengan menggunakan pengencer mikro. Proses selanjutnya ditambahkan 0,025 mL PBS ke dalam tiap-tiap lubang mulai lubang nomor satu sampai dengan nomor 12 dan diaduk dengan pengocok mikro. Suspensi sel darah merah ayam 1% ditambahkan ke dalam setiap lubang plat mikro masing-masing 0,05 mL dan diayak kembali menggunakan *microshaker* selama 15 detik. Plat mikro selanjutnya didiamkan pada suhu kamar selama satu jam dan diamati timbulnya reaksi hemaglutinasi setiap 30 menit. Reaksi hemaglutinasi positif ditandai dengan adanya bentukan seperti kristal berpasir pada dasar sumuran plat mikro akibat reaksi hemaglutinasi. Pembacaan titer HA dilakukan dengan memiringkan plat mikro  $\geq 45^\circ$ . Titer HA virus EDS dinyatakan sebagai kebalikan dari pengenceran tertinggi virus yang masih mampu menimbulkan reaksi aglutinasi secara sempurna. Titer antigen yang digunakan pada uji HI adalah 4 unit HA (OIE, 2016).

### Uji Hambatan Hemaglutinasi (HI)

Uji hambatan hemaglutinasi (*Haemagglutination Inhibition/ HI*) sesuai dengan prosedur OIE (2016) yang telah dimodifikasi, menggunakan 4 unit HA antigen EDS. Sebanyak 0,025 mL PBS dimasukkan pada setiap lubang plat mikro. Lubang pertama dan kedua diisi dengan 0,025 mL serum kemudian diencerkan secara berseri kelipatan dua dimulai dari lubang kedua sampai lubang kesepuluh dengan pengencer mikro. Pada lubang kesepuluh, suspensi dibuang sebanyak 0,025 mL. Proses dilanjutkan dengan menambahkan 0,025 mL suspensi virus standar (4 HAU) pada lubang pertama sampai dengan kesebelas. Sedangkan pada lubang duabelas hanya diisi 0,025 mL PBS. Plat mikro selanjutnya diayak selama 30 detik dengan *microshaker* kemudian dibiarkan selama 30 menit pada suhu kamar. Proses selanjutnya, ditambahkan suspensi eritrosit 1% sebanyak 0,025 mL ke dalam lubang pertama sampai ke duabelas, lalu diayak selama 30 detik. Plat mikro kemudian dibiarkan selama satu jam pada suhu kamar dan diamati setiap 15 menit. Pembacaan hasil uji HI dilakukan apabila pada lubang kesebelas sudah tampak adanya aglutinasi eritrosit dan pada lubang duabelas terlihat endapan eritrosit. Titer HI dibaca dengan memiringkan plat mikro dan melihat ada atau tidaknya sel darah merah yang turun (*tear-shaped*). Titer HI ditentukan berdasarkan pengenceran serum tertinggi yang masih mampu menghambat aglutinasi eritrosit 1%.

### Analisis Hasil

Seluruh sampel serum yang telah diuji HI terhadap virus EDS dianalisis untuk menentukan tingkat seroprevalensi dengan rumus yang diadaptasi dari Budiharta(2002):

$$\text{Seroprevalensi \%} = \frac{\text{Jumlah sampel serum hasil uji positif}}{\text{Jumlah sampel keseluruhan}} \times 100\%$$

Selanjutnya proses analisis seropositif diuji dengan uji *One way Anova* dan uji *Post Hoc* menggunakan perangkat lunak SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*).

### Hasil dan Pembahasan

Hasil uji serologi 75 sampel serum itik terhadap penyakit EDS di Desa Tumbak Bayuh, Badung menunjukkan sebanyak 24 sampel serum positif (32%), sementara 51 sampel serum negatif (68%).

Data seropositif dan rerata titer antibodi EDS dari masing-masing peternakan disajikan pada Tabel 1, Tabel 2, dan Gambar 1.

Tabel 1. Prosentase (%) hasil Uji HI terhadap EDS dari serum itik asal peternakan di Desa Tumbak Bayuh, Badung

No	Peternakan	Hasil uji HI		Jumlah sampel	Prevalensi (%)
		seropositif	seronegatif		
1	Kode A	5	20	25	20%
2	Kode B	15	10	25	60%
3	Kode C	4	21	25	16%

Peternakan dengan kode A merupakan peternakan itik dengan populasi sebanyak 700 ekor, terdiri atas 400 ekor itik sedang masa produktif bertelur dan 300 ekor itik dara. Hasil uji HI dari sampel serum asal peternakan A, seropositif sebanyak 5 sampel dari total 25 sampel, sehingga prevalensi penyakit EDS pada peternakan A sebesar 20%. Rataan titer antibodi EDS dari sampel yang seropositif di peternakan A sebesar  $2^{5,8}$  HI unit (Tabel 2 dan Gambar 1)

Peternakan dengan kode B merupakan peternakan itik dengan jumlah populasi sebanyak 175 ekor itik masa produktif bertelur. Hasil uji serologi sampel dari peternakan B, sebanyak 15 sampel positif dari 25 sampel yang diperiksa, sehingga prevalensi penyakit EDS pada peternakan B sebesar 60%. Rataan titer antibodi EDS sampel yang seropositif di peternakan B sebesar  $2^{5,3}$  HI unit (Tabel 2, Gambar 1).

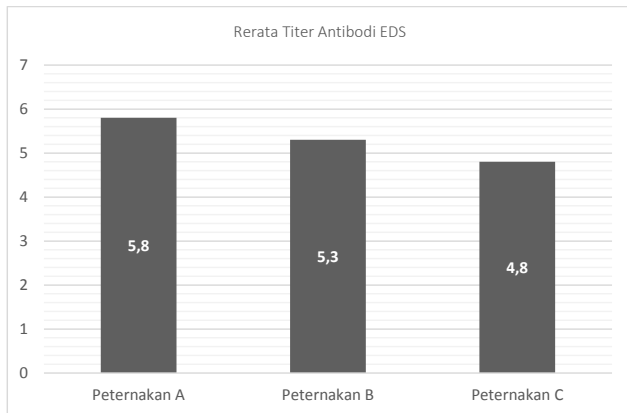
Peternakan dengan kode C merupakan peternakan itik dengan jumlah populasi sebanyak 600 ekor itik, semuanya dalam masa produktif bertelur. Hasil uji serologi sampel serum asal peternakan C, didapatkan hasil seropositif sebanyak 4 dari 25 sampel sehingga prevalensi EDS pada peternakan C sebesar 16%. Rataan titer antibodi seropositif di peternakan C sebesar  $2^{4,8}$  HI unit (Tabel 2, Gambar 1).

Tabel 2. Rataan seropositif titer antibodi EDS itik dari tiga peternakan di Tumbak Bayuh, Badung

No	Peternakan	Rataan titer antibodi EDS (HI unit)
1	Kode A	$2^{5,8}$
2	Kode B	$2^{5,3}$
3	Kode C	$2^{4,8}$

Hasil penelitian menunjukkan bahwa itik yang dipelihara dengan sistem ekstensif di Desa Tumbak Bayuh, Mengwi, Badung memiliki rerata titer antibodi sebesar  $2^{4,8}$  sampai  $2^{5,3}$  HI Unit terhadap penyakit





Gambar 1. Rerata titer antibodi EDS (HI unit log 2) dari itik di peternakan itik Tumbak Bayuh

EDS. Kemungkinan keberadaan titer antibodi tersebut dipicu oleh infeksi secara alami karena berdasarkan atas anamnesa dari pemilik bahwa itik peliharaannya tidak pernah divaksinasi EDS. Virus EDS dapat disebarkan oleh itik yang terinfeksi melalui feses, kemudian akan menyebar di alam melalui aliran air di sawah. Hal inilah kemungkinan salah satu yang dapat menyebabkan infeksi terhadap itik sehingga hasil uji seropositif dari sampel serum peternakan itik dengan sistem pemeliharaan semi-intensif.

Hasil uji serologi HI menunjukkan seroprevalensi EDS di Tumbak Bayuh, Badung sebesar 32% (24 sampel dari total 75 ekor itik) dengan titer antibodi sebesar  $2^4$  HI unit sampai  $2^7$  HI unit. Tingginya seroprevalensi EDS ini menggambarkan bahwa paparan virus EDS pada itik di Desa Tumbak Bayuh, Mengwi, Badung relatif tinggi, padahal sampel yang diuji pada penelitian ini berasal dari itik yang tidak pernah divaksinasi. Dengan demikian, antibodi itik sampel kemungkinan diproduksi itik akibat interaksi antara virus EDS dengan lingkungan sekitar yang mencemari tempat pemeliharaan/umbaran itik tersebut.

Area untuk mengembalaan itik tidak hanya berada pada satu area persawahan saja, namun berpindah-pindah sesuai dengan musim panen padi tiba. Proses perpindahan pengembalaan itik memerlukan alat transportasi untuk mengangkut itik dari satu areal sawah ke sawah lainnya. Sistem pemeliharaan itik di Tumbak Bayuh adalah sebagai berikut: awalnya itik dipelihara semiintensif selama kurang lebih 2 bulan di lahan sawah yang telah dipanen. Dengan menggunakan alat transportasi (mobil *pick up*) selanjutnya itik dipindahkan menuju ke lahan sawah lain yang baru habis dipanen dengan periode yang sama. Proses tersebut merupakan alur padat lalu lintas ternak itik

yang dipelihara di Desa Tumbak Bayuh dan menjadi salah satu faktor pendukung cepatnya penyebaran penyakit EDS.

Alexander (2004) mengatakan bahwa sistem pemeliharaan itik secara ekstensif menjadi penyebab itik terpapar virus. Peredaran agen penyakit unggas yang infeksius di lingkungan tempat pemeliharaan itik secara ekstensif telah dilaporkan menjadi salah satu faktor pendukung timbulnya wabah sporadik penyakit unggas. Salah satu penyakit yang penyebarannya juga dapat dipengaruhi oleh sistem pemeliharaan ekstensif adalah *Newcastle Disease* (ND), gejalanya mirip yakni ditandai dengan penurunan produksi telur. *Newcastle Disease* adalah penyakit virus akut yang sangat menular dan menyerang unggas segala umur, termasuk juga dapat menyerang itik. Penyakit ND disebabkan oleh *Avian Paramyxovirus* tipe 1 (APMV-1) familia *Paramyxoviridae*. Penyakit ini sangat bervariasi dalam jenis dan tingkat keparahan. Terdeteksinya titer antibodi ND pada itik merupakan indikasi terjadinya paparan penyakit tertentu. Itik yang terinfeksi ND strain lentogenik, tidak menunjukkan tanda klinis namun dapat menyebarkan penyakit. Strain ND yang tidak ganas dapat bertahan pada populasi itik yang dipelihara secara ekstensif dan beberapa di antaranya dapat menular ke unggas lainnya melalui kontak langsung maupun tidak langsung (Saidu *et al.*, 2006).

Virus ND maupun virus penyakit EDS mempunyai sifat spesifik yakni dapat mengaglutinasi eritrosit ayam pada uji serologi HI, hal ini terjadi akibat adanya protein hemaglutinin yang terdapat pada amplop virus ND. Proses terjadinya hemaglutinasi karena adanya ikatan antara hemaglutinin virus ND maupun virus EDS dengan reseptor sel, yaitu mukoprotein yang terdapat pada permukaan eritrosit. Uji diagnostik HI dilakukan untuk mendeteksi respons antibodi terhadap glikoprotein virus ND maupun virus penyebab penyakit EDS (OIE, 2012; WHO, 2009). Oleh karena itu, serum itik sampel selain diuji terhadap penyakit EDS, juga diuji terhadap ND.

Itik dan kalkun dapat pula terinfeksi ND meskipun jarang menunjukkan gejala klinis dan berpotensi sebagai sumber penyebar dan penular virus pada unggas disekitarnya yang rentan sehingga itik dan kalkun disebut reservoir alami dari virus penyakit ND (Kencana, 2012). Penyakit ND telah mewabah hampir di seluruh Indonesia termasuk juga Provinsi Bali. Penyebaran penyakit ND dapat terjadi secara kontak langsung dari itik yang terinfeksi ke unggas sehat

lainnya dan melalui feses yang dieksresikan oleh itik yang terinfeksi (Kencana, 2012; Kencana *et al.*, 2012).

Tempat yang paling rentan untuk terjadinya infeksi ND adalah di peternakan dan pasar unggas. Kedua tempat tersebut memiliki potensi yang cukup tinggi untuk ternak unggas tertular dan merupakan wilayah berisiko tinggi menyebarkan virus ND. Cara pemeliharaan itik di Bali kebanyakan dengan sistem ekstensif atau semi-intensif. Sistem pemeliharaan semi-intensif ini yakni dengan cara mengembalakan itik secara berpindah-pindah di satu areal sawah ke sawah pascapanen lainnya. Adanya unggas peliharaan atau unggas liar di sekitar sawah penggembalaan berpotensi juga untuk tertular virus EDS (Yuliana *et al.*, 2015).

Itik yang dipelihara secara ekstensif dapat menjadi sumber penularan penyakit virus yang berpotensi menular ke itik dan unggas lainnya yang berada di sekitar peternakan (Sigh *et al.*, 2005). Oleh sebab itu, sampel seropositif terhadap penyakit EDS juga diuji secara serologis terhadap ND untuk membuktikan bahwa sistem pemeliharaan ekstensif dapat menularkan penyakit EDS maupun ND secara bersamaan. Hasilnya, dari 24 sampel seropositif EDS, hanya 5 sampel positif ND pada uji rapid HA, namun setelah di uji dengan titrasi HI hasilnya negatif.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa itik yang dipelihara dengan sistem ekstensif di Desa Tumbak Bayuh memiliki titer antibodi  $> 2^4$  HI unit. Keberadaan titer antibodi tersebut diduga akibat itik terinfeksi secara alami. Itik yang dipelihara secara ekstensif atau digembalakan di area terbuka jika memiliki titer antibodi EDS, padahal itik belum pernah divaksinasi, hal ini menandakan bahwa telah terjadi infeksi EDS secara alami (Jibril, 2014).

Hasil wawancara dengan peternak itik di Tumbak Bayuh didapatkan informasi bahwa mereka tidak paham tentang penyakit EDS. Rendahnya pengetahuan peternak itik tentang penyakit EDS menjadi salah satu faktor pendukung dalam infeksi dan penyebaran penyakit EDS. Gejala klinis EDS pada itik yang sulit dideteksi menyebabkan peternak tidak peka terhadap munculnya penyakit tersebut pada itik peliharaannya.

Sampai bulan Juni 2018, laporan kejadian penyakit EDS pada itik di Kabupaten Badung belum pernah dilaporkan. Studi seroprevalensi terhadap kejadian penyakit EDS pada itik perlu dilakukan guna memprediksi frekuensi infeksi penyakit sehingga kedepannya dapat dilakukan upaya pencegahan

terhadap penyebaran penyakit tersebut. Penularan penyakit EDS dapat terjadi secara vertikal maupun horizontal. Penularan secara vertikal terjadi akibat penularan telur tetas yang terinfeksi virus penyakit EDS. Sedangkan penularan penyakit secara horizontal terjadi akibat kontak langsung maupun melalui cecaran (Kencana, 2012). Sistem pemeliharaan itik dengan cara dilepaskan di areal persawahan juga berpotensi dalam penyebaran penyakit EDS (Sari, *et al.*, 2012).

## Kesimpulan

Penelitian ini disimpulkan bahwa seroprevalensi EDS pada itik di Desa Tumbak Bayuh, Kecamatan Mengwi, Kabupaten Badung sebesar 32% dengan titer antibodi berkisar antara  $2^4$  sampai  $2^7$  HI unit.

## Saran

Perlu dilakukan penyuluhan dan vaksinasi EDS pada peternakan itik di Tumbak Bayuh guna mencegah timbulnya penyakit EDS di Desa tersebut dan sekitarnya.

## Ucapan Terima Kasih

Terimakasih disampaikan kepada Dinas Pertanian dan Ketahanan Pangan Sub. Bagian Kesehatan Hewan Kabupaten Badung dan ketiga pemilik peternakan itik di Desa Tumbak Bayuh, Kecamatan Mengwi, Kabupaten Badung atas fasilitas dan kerjasamanya dalam penyelesaian penelitian ini.

## Daftar Pustaka

- Alexander, DJ. (2001). Newcastle disease: The Gordon Memorial Lecture. *Br Poult Sci* 42: 5-22.
- Badan Pusat Statistik Badung. (2016). *Statistik Daerah Kecamatan Mengwi 2016*. CV. Bhineka Karya. Badung, Bali. Indonesia. ISSN 2089-5976.
- Budiasa, MK, Bebas, W. (2008). *Pregnant Mare Serum Gonadotrophin* Meningkatkan dan Mempercepat Produksi Telur Itik Bali yang Lambat Bertelur. *J Vet* 9 (1): 20-24.
- Budiharta, S. (2002). *Kapita Selekta Epidemiologi Veteriner*. Bagian Kesehatan Masyarakat Veteriner. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Gajah Mada. Yogyakarta.

- Cardoso, WM, Aguiar, FJLC, Romão, JM, Oliveira, WF, Salles, RPR, Teixeira, RSC, and Sobral, MHR. (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.
- Data Jumlah Itik di Kabupaten Badung Tahun 2015. <https://badungkab.bps.go.id/linkTabelStatistik/view/id/64>. Tanggal Akses 21 Februari 2017.
- Ditjennak. (2014). Manual Penyakit Unggas. Direktorat Kesehatan Hewan Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan Kementerian Pertanian. Hal 36.
- Indonesia, P. (2016). Penyakit Egg Drop Syndrome yang Terlupakan. Artikel. <https://www.poultry-indonesia.com/penyakit-egg-drop-syndrome-yang-terlupakan/>. Diakses 2 Juli 2018.
- Jibril, AH. (2014). *Participatory Epidemiology Complemented by Seroprevalence of Newcastle Disease in Local Chickens in Zamfara State, Nigeria*. Thesis. Department of Veterinary Public Health and Preventive Medicine, Ahmadu Bello University, Zaria Nigeria.
- Kementerian Pertanian, Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan, Direktorat Kesehatan Hewan. (2014). *Manual Penyakit Unggas*. Subdit Pengamatan Penyakit Hewan. Cetakan ke-2. Pasar Minggu, Jakarta.
- Kencana, GAY. (2012). *Penyakit Virus Unggas*. Udayana University Press, Bali. ISBN 978-602-7776-01-2.
- Kencana, GAY, Suartha, IN, Nurhandayani, A, dan Syamsidar. (2017). Isolasi, Karakterisasi, dan Analisis Filogenik Virus EDS Isolat Lokal Untuk Kandidat Seed Vaksin. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Science*, Vol 1 (1): 15-19.
- Kencana, GAY, Suartha, N, Simbolon, MP, Handayani, AN, Ong, S, Syamsidar, dan Kusumastuti, A. (2015). Respons Antibodi terhadap Penyakit Tetelo pada Ayam yang Divaksin Tetelo dan Tetelo-Flu Burung. *J.Vet.* 16 (2): 283-290.
- Kencana, GAY, Suartha, IN, Nainggolan, DRN, dan Tobing, ASL. (2017). Respons Imun Ayam Petelur Pascavaksinasi Newcastle Disease dan Egg Drop Syndrome. *Jurnal Sain Veteriner*. 35 (1): 81-90.
- Kencana, GAY, Suartha, IN, dan Wibawa, IPWA. (2017). Respons Imun Primer Ayam Petelur Pasca Vaksinasi Egg Drop Syndrome. *Bulletin Veteriner* 9 (2): 164-170.
- Kencana GAY, Suartha IN., Kardena IM., Kristina Dewi GAY., Nurhandayani A., Syamsidar., and Agustina. (2018). Potential And Safety Tests Of Egg Drop Syndrome Candidate Vaccine From Medan Isolate, Indonesia. *Veterinary World*, EISSN: 2231-0916 Available at [www.veterinaryworld.org](http://www.veterinaryworld.org)/Vol.11: *Veterinary World*, 11(11): 1637-1640.
- Mahardika, IG NK, Astawa, INM, Kencana, GAY, Suardana, IBK, dan Sari, TK. (2015). *Teknik Lab Virus*. Udayana University Press. Denpasar, Bali. Indonesia. ISBN 978-602-294-044-9.
- Nurana, R, St, Kasim, dan Kasmiyati. (2014). Analisis Pendapatan Peternak Itik Petelur Sistem Pemeliharaan Nomaden di Desa Kaliang, Kecamatan Duampanua, Kabupaten Pinrang. *Jurnal Ilmu Ilmu Peternakan* 1 (3): 263-271.
- OIE. (2012). *Newcastle disease. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 2.3.14*. <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrialmanual/access-online>. Diakses pada Maret 2018.
- OIE. (2016). *Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animal. Chapter 2.3.4. Avian Influenza (Infection with Avian Influenza Viruses)*. Diakses pada April 2017.
- Saidu, L, Abdu, PA, Tekdek, LB, Umoh, JU, Usman, M, and Oladele, SB. (2006). Newcastle disease in Nigeria. *Nigeria Vet. J.*(2): 23-32.
- Sari, O, Priyono, B, dan Utami, NR. (2012). Suhu, Kelembapan, serta Produksi Telur Itik pada Kandang Tipe Litter dan Slat. *Unnes I Life Sci* 1 (2) ISSN 2252-6277.
- Sigh, K, Jildal, N, Gupta, SL, Gupta, AK, and Mittal, D. (2005). Detection of Newcastle disease virus genome from field outbreaks in poultry by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Int J Poult Sci* 4: 472-475.
- Tabbu, CR. (2016). *Penyakit Ayam dan Penanggulangannya. Penyakit Bakterial, Mikal, dan Viral*. Cetakan ke-6. Volume 1. PT. Kanisius 2000. Yogyakarta. ISBN 978-979-672-798-8.

- World Organization for Animal Health. (2009). Newcastle Disease: Aetiology, Diagnosis, Prevention, and Control References, *OIE Technical Disease Cards*. OIE Scientific and Technical Department, Thailand. Diakses pada April 2017.
- Yuliana, IKW, Kencana, GAY, dan Suartha, IN. (2015). Seroprevalensi Penyakit Tetelo pada Peternakan Itik dan Pasar Galiran di Kabupaten Klungkung, Bali (Newcastle Disease Seroprevalence In Livestock Duck and Markets Galiran Of Klungkung Residence, Bali). *Jurnal Veteriner* 16 (3): 383-388.

## INDEK PENULIS

### A

Abdul Samik 126  
Agnesia Endang Tri Hastuti Wahyuni 27, 180  
Agung Janika Sitasiwi 89  
Agus Setiyono 17  
Agustin Indrawati 241  
Agustina Dwi Wijayanti 34, 103  
Agustina Viktoria Tae 180  
Alfarisa Nururrozi 49, 193, 227  
Alnita Baaka 11  
Amung Logam Saputro 126  
Anam Al Arif 219  
Angeline Ganapragasam 227  
Ariana 96  
Arvendi Rahma Jadi 96

### B

Bambang Sutrisno 72  
Budi Indarsih 61

### C

Charles Rangga Tabbu 27  
Christin Marganingsih Santosa, 160  
Claude Mona Airin 11

### D

Damiana Rita Ekastuti, 241  
Doddi Yudhabuntara 185

### E

Eko Sugeng Pribadi, 241  
Elisabet Tangkondab 27  
Erdina Pangestika, 241

### F

Felisitas Kristiyani 103  
Fithria Nisa Hanifah 219

### G

Gagak Donny Satria 185, 213  
Guntari Titik Mulyani 227  
Gusti Ayu Yuniati Kencana, 248

### H

Hary Purnamaningsih 49, 193, 227  
Hastari Wuryastuti 1, 227

### I

I Gusti Komang Oka Wirawan 151  
I Ketut Jaya 151  
I Made Kardena 248  
I Nyoman Sukartha Jaya 61  
Ida Tjahajati 111  
Ida Tjahajati 227  
Ima Fuaziah 180  
Imron Rosyadi 69, 160  
Dinar Arifianto 160  
Irkham Widiyono 111, 227  
Irma Padeta 96  
Jeffi Chandra Ajiguna, 180

### J

Joko Prastowo, 166  
Julita Dewitri Merthayasa 34

### K

Khusnan 69  
Koesnoto Soepranianondo 219  
Kurnia Rahmawati 79  
Kurniasih, 166, 172

### L

Lailatul Muniroh, 143  
Luh Putu Desy Puspaningrat 241  
Lynda Nugrahaning Imanjati 180

### M

Mariana Ruth Theresia Hutabarat 219  
Maya Dewi Dyah Maharani 241  
Melkianus Dedimus Same Randu 151  
Mitra Slipranata 69  
Mohamad Agus Setiadi 135  
Muhamad Atabika Farma Nanda 79  
Muhammad Nuriy Nuha Naufal 79

### N

Nadia Liswardani Destinanda 34  
Nenny Harijani 219  
Ni Ketut Dewi Haryani 61  
Ni Wayan Apsari Shantika Pratistha 248  
Ni Wayan Kurniani Karja 135  
Nisa Hakimah 185, 213  
Nurul Aini 103

## P

Priyo Sambodo 11  
 Purwaningsih 11  
 Putu Devi Jayanti 34

## R

R. Wasito 1, 172  
 Ragil Angga Prastiya 126  
 Rahmad Dwi Ardiansyah 79  
 Reinilda Alwina, 241  
 Restu Librani 17  
 Retno Damayanti 206  
 Retno Wijayanti 206  
 Riefky Pradipta Baihaqie 79  
 Rina Isnawati 1  
 Rini Widayanti 120  
 Risa Nursanty 41  
 Rondius Solfaine 143  
 Ryan Hadi Permana 34

## S

Safranita 41  
 Sitarina Widyarini 172  
 Siti Hadijah 219  
 Siti Isrina Oktavia Salasia 160  
 Siti Muflichatun Mardiaty 89  
 Slamet Rahardjo 193  
 Slamet Raharjo 49, 120, 227  
 Soedarmanto Indarjulianto 34, 49, 111, 120, 193,  
 213, 227  
 Soeharsono, 219

Sri Hartati 120, 227  
 Sri Isdadiyanto 89  
 Sri Murtini, 206  
 Sruti Listra Adrenalin 180  
 Sugiyono 172  
 Syafri Nanda 135

## T

Tri Wahyu Pangestiningih 96  
 Trini Susmiati 11

## V

Vinsa Cantya Prakasita 180  
 Thomas Emanuel Manggotu Nahak 180

## W

Wahyu Prihtiyantoro 69  
 Wari Pawestri 185, 213  
 Wida Wahidah Mubarakah 143, 166  
 Widya Paramita Lokapirnasari 219  
 Widya Sari 41  
 Wisnu Nurcahyo 166  
 Wiwin Winarsih 17

## Y

Yanuartono 49, 193, 227  
 Yeo Suan Jiao 227  
 Yuda Heru Fibrianto 79  
 Yuli Purwandari Kristianingrum 172  
 Yuriadi 111,227

## INDEK SUBYEK

- A
- Acute toxicity test* 11
  - Adulticidal* 166, 167
  - AGP 180, 181
  - AIV 1
  - Albendazol 103
  - Albendazole* 103
  - Albumin 34
  - Anaemia* 49
  - Anemia 49
  - Anjing 34, 49
  - Antibacterial* 172
  - Antibakteri 173
  - Anti-fertilitas 89
  - Anti-fertility* 89
  - Antimicrobial* 160
  - Antimikroba 160
  - APEC 69
  - Areca catechu* 166, 167
  - Asam sianurat 192
  - Ascaridia galli* 166, 167
  - Attacus atlas* 232
  - Avibacterium paragallinarum* 27
  - Ayam 17
  - Ayam Petelur 1
  - Ayam 167
- B
- Bacteria Culture
  - Bali cattle 151
  - Bataviae 227, 228
  - Bawang Putih Segar 61
  - Berat telur 219
  - Blood profile* 120
  - Bovine oocytes* 135
  - Broiler chickens 172
  - Broiler* 173
  - BSFL 219
- C
- Cat* 49
  - Cattle* 103
  - Celledoni 227, 228
  - Chicken 166
  - Chickens* 17
  - Cholesterol* 61
  - Chronic renal failure* 49
  - Cocoon 232
  - Colibacillosis* 69
  - Comparison* 120
  - Cow blood waste* 79
  - culture 135, 136
  - cyanuric acid 191
  - cytopathology 160
- D
- Daging 186
  - Decreasing egg production* 1
  - Diabetes mellitus wound* 79
  - Dog* 34, 49
  - Duck Eggs* 61
  - Duramectin* 111
- E
- Efektivitas 103
  - Effectiveness* 103
  - Egg mass* 219
  - Egg production* 219
  - Ekstrak daun teh hijau 173
  - ELISA 206
  - Embryo, 135, 136
  - Enterobacteriaceae* 41
  - Enterobacteriaceae 41
  - Eschericia coli* 172, 173
  - Eskpresi protein 89
  - Extract of green tea leaves* 172
- F
- Fasciola sp.* 103
  - Feed consumption* 219
  - Filter paper* 206
  - Food products* 191
  - Gagal ginjal akut 192
  - Gagal ginjal kronis 49
  - Gambaran darah 120
  - Garlic* 61
  - Gastrointestinal endoparasitic infection* 151
  - Gastrointestinal worms* 111
  - Grass Kebar* 11
- H
- Hemoragis 1
  - Hemorrhages* 1

Herbal 180, 181  
 Hiperkolesterolemia 11  
*Hipoalbuminemia* 34  
 Hipokampal serotonergik neuron 96  
 Hipokampus 96  
*Hippocampal serotonergic neurons* 96  
*Hippocampus* 96  
*Horses* 111  
 HPLC 185, 213  
*Human serum albumin 20%* 34  
*Hypercholesterolemi* 11

## I

IBD 17  
*Identification* 27  
 Identifikasi 27  
 Ikan nila, 213  
 Imago 232  
*Immunohistochemistry* 17  
 Imunohistokimia 17  
*Infectious coryza* 27  
 Infeksi endoparasit gastrointestinal, 151, 152  
 Infus 34  
 Infusa, 167  
*Infusion* 34  
 Infusion, 166  
 Insulin, 135, 136  
 Isolasi 27, 41  
*Isolate* 41  
*Isolation* 27

## J

Java 120  
 Jawa 120

## K

Kalimantan 120  
 Kapang 232  
 KCKT, 186, 213  
 Keberlanjutan 241  
 Kokon 232  
 Kolesterol 61  
*Kolibasilosis* 69  
 Konsumsi pakan 219  
*Korpus Luteum* 126  
 Kucing 49  
 Kuda 111  
 Kultur Bakteri  
 kultur, 135, 136

## L

Larva, 232  
*Larvae* 232  
 Lasiwen 96  
*Layer chicken* 1  
*Lepidochelys olivacea shells* 41  
 Leptospira 227, 228  
 Lesptospirosis 227, 228  
 Lhok Pante Tibang 41  
 Limbah darah sapi 79  
 Luka diabetes melitus 79

## M

*M. Reticulatus* 120  
*Malondialdehyde (MDA)* 126  
 malondialdehyde 143, 144  
 MAT 227, 228  
 Maturase 136  
 Maturation, 135  
 Meat, 185  
 Melamin sianurat 192  
 Melamin 192  
 Melamine cyanurate acute renal failure 191  
 Mimba 89  
 Morfometri 167  
 Morphometry 166  
 Mould 232  
*Mycotoxin binders* 126  
*Myotis sp* 96  
*Myotis sp.* 96

## N

ND vaccines, 180, 181  
*Neem* 89  
 Nila 186

## O

Obat cacing 111  
 Oosit sapi 136  
*Oxfendazole* 111

## P

*Paramphistomum sp.* 103  
 Penurunan produksi telur 1  
*Persea americana Mill* 160  
*Piperazine* 111  
*Pyrantel pamoate* 111  
*Platelet Rich Plasma* 79  
*Probiotic* 180, 181



Indek Subyek

Produk pakan 192  
Produksi telur 219  
Produktivitas puyuh 219  
Prospective 241  
Prospektif, 241  
*Protein expression* 89  
Puyuh 69  
*Pyrantel pamoate* 111

Q

qRT-PCR 1  
Quail 69  
*Quail Productivity* 219

R

Rabies 206  
*Rapfish* 241  
*Receptor* 17  
*Recombinant human erythropoietin* 49  
Reseptor 17  
Residue 185, 186  
Resistant, 160  
Resisten, 160  
Rumput kebar 11

S

Sapi 104  
Sapi Bali 152  
Serotipe 27  
*Serotype* 27  
Serovar 227, 228  
Serum albumin manusia 20% 34

Sitopatologi 160  
*Slaughterhouse* 241  
*Staphylococcus aureus* 160  
*Streptozotocin* 143, 144  
*Superoxide dismutase* 143, 144  
*Sustainability* 241

T

Telur Itik 61  
Telur *Lepidochelys olivacea* 41  
*Tetracycline* 185, 186, 213, 214  
Tikus 11  
*Tilapia fish* 213  
*Tilapia* 185  
*Tithonia diversifolia* 143, 144  
*Toxicity* 191  
TPnA 241

V

*Vaccination* 17  
VAI 1  
Vaksinasi 17  
*Validation* 213, 214  
*Vt1* 69  
*Vt2* 69

W

*Weight gain* 180

Z

*Zearalenon* 126

# JURNAL SAIN VETERINER (JSV)

## TUJUAN DAN RUANG LINGKUP

Jurnal Sain Veteriner (JSV) adalah jurnal yang terbit dua kali setahun yang berfungsi sebagai wahana komunikasi antar peneliti, pakar dan lembaga di bidang (ilmu-ilmu kehewan) Sain Veteriner. Naskah JSV dapat berupa seluruh atau sebagian hasil penelitian, komunikasi singkat (short communication), laporan studi kasus (lapangan/klinis) dan artikel review. Naskah artikel harus asli (belum pernah diterbitkan) dan ditulis dalam Bahasa Indonesia atau Inggris.

## BERLANGGANAN

Biaya berlangganan JSV sebesar Rp. 400.000,00/tahun atau Rp. 250.000,00/eksemplar. Pembayaran dapat dalam bentuk IDR atau US\$ dan ditransfer ke rekening JURNAL SAIN VETERINER di Fakultas Kedokteran Hewan (FKH) Universitas Gadjah Mada (UGM). Nomor Rekening: 2745608610 pada Bank BNI, Kantor Cabang UGM, Yogyakarta 55281, Indonesia. Untuk transfer dari luar Indonesia: KODE SWIFT BNI: BNINIDJAXXX

## BIAYA PUBLIKASI

Untuk publikasi (pemuatan) artikel di JSV, penulis dikenakan biaya publikasi artikel sebesar Rp. 750.000,00 per artikel. Apabila ada gambar berwarna dikenakan biaya sebesar Rp. 200.000,00 per halaman gambar berwarna.

## PENGIRIMAN NASKAH

Penulis mengirimkan soft copy draft naskah artikel ke redaksi JSV dapat melalui email, atau melalui pengiriman pos berupa compact disc beserta satu eksemplar draft naskah artikel. Draft naskah artikel diketik dengan program Microsoft Word dan gambar dalam format JPEG minimal berukuran 300 dpi. Gambar disusun pada lembar terpisah dan diberi nomor urut dan keterangan gambar. Tabel diketik juga pada lembar terpisah, dan diberi nomor urut beserta judul tabel.

## PETUNJUK PENULISAN

Naskah diketik 2 spasi (kecuali abstrak: 1 spasi) dengan jenis huruf Times New Roman ukuran font 11. Setiap naskah maksimal terdiri dari 6-20 halaman ukuran kuarto.

Naskah disusun sesuai format JSV dengan urutan sebagai berikut:

### A. Naskah hasil penelitian

1. Judul: Harus ringkas dan informatif, ditulis dalam Bahasa Indonesia dan Bahasa Inggris. Judul tidak lebih dari 20 kata (10-20 kata)
2. Identitas penulis: Berisi nama lengkap penulis utama dan anggota penulis (tidak boleh disingkat) dan dibubuhi angka Arab secara berurutan untuk keterangan tentang penulis utama dan anggota. Alamat institusi penulis utama dan anggota penulis ditulis lengkap dan disertai alamat e-mail semua penulis dan atau nomor telepon dan fax (bila ada).
3. Abstrak: Ditulis dalam Bahasa Indonesia dan Bahasa Inggris yang terdiri dari maksimal 250 kata dengan maksimal 5 kata kunci. Abstrak diketik 1 spasi dan hanya terdiri dari satu paragraf.
4. Pendahuluan: Berisi latar belakang yang memuat arti penting dan tujuan penelitian, dan manfaat penelitian yang telah dilakukan.
5. Materi dan Metode: Ditulis tanpa subjudul materi dan subjudul metode. Bahan dan peralatan dijelaskan tentang nama pabrik pembuat, nama kimia dan nama dagang. Cara penelitian ditulis secara singkat dan disertai cara analisis.
6. Hasil dan Pembahasan: Hasil penelitian dijabarkan secara urut, rinci dan jelas. Pembahasan hasil penelitian diuraikan secara ilmiah dan rasional dengan didukung oleh pustaka dan referensi ilmiah yang relevan.
7. Kesimpulan. Kesimpulan hasil penelitian dinyatakan secara singkat, padat dan jelas.
8. Ucapan Terimakasih: Hanya dicantumkan untuk perseorangan dan institusi atau lembaga yang benar-benar membantu pelaksanaan penelitian.
9. Cara sitasi: Sitasi pustaka atau referensi dilakukan dengan menuliskan nama penulis utama dan tahun terbit. Penggunaan kata penghubung untuk 2 penulis dengan kata dan atau and, dan untuk 3 penulis atau lebih dengan dkk. atau et al. tergantung dari bahasa artikel asli yang digunakan.

10. Daftar Pustaka: Disusun menurut abjad tanpa menggunakan nomor urut, nama jurnal disingkat sesuai dengan aturan internasional yang berlaku. Tahun pustaka atau referensi sebaiknya sekitar 5-10 tahun terakhir. Pustaka acuan berupa buku dibatasi maksimal 20% dari total jumlah daftar pustaka.

### Jurnal:

Ning, Z.Y., Wu, X.T., Cheng, Y.F, Qi, W.B., An, Y.F., Wang, H., Zhang, G.H. and Li, S.J. (2012). Tissue distribution of sialic acid-linked influenza virus receptors in beagle dogs. *J. Vet. Sci.* 13: 219-222.

Haryanto, A., Ernawati, R., Wati, V., Irianingsih, S.H. and Wijayanti, N. (2015). Analysis of viral protein-2 encoding gene of avian encephalomyelitis virus from field specimens in Central Java region, Indonesia. *Vet. World.* 9(1): 25-31.

### Buku:

Thrusfield, M. (2007). *Veterinary Epidemiology* 3rd ed. Blackwell Science. Ames. Iowa. USA: 101- 103.

Alisson, E. A. (2011). *Fundamental Molecular Biology* 2nd revised ed. John Wiley and Son Inc. (Verlag). Germany: 189-202.

### Bab dalam buku:

Gavin, R., Merino, S. and Tomas, J.M. (2004) Molecular Mechanism of Interaction Between *Aeromonas hydrophila* and Hosts. In: *Current Trends in the Study of Bacterial and Viral Fish and Shrimp Diseases*. Vol.3. Yin, L.K. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. Singapore. 117-144

### Tesis/Disertasi:

Purwaningrum, M. (2014). Penentuan patotipe virus Newcastle Disease isolat lokal pada unggas dengan metode RT-PCR dan REA. Tesis. Program Studi Sain Veteriner. Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

Sitaswi, A.J. (2015). Kloning dan ekspresi gen Wingless-type MMTV integration site family member-4 mencit sebagai kandidat antigen untuk imuno krontrasepsi satwa liar. Disertasi. Program Studi Sain Veteriner. Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

### Website:

Gorman, C., (1997). The New Hongkong Flu. <http://www.time.com/time/magazine/article/0,9171,987603,00.html>. Diakses pada tanggal 28 Juli 2008.

### B. Komunikasi Singkat (short communication) dan Studi Kasus lapangan/klinis

1. Naskah ditulis minimal 3 dan maksimal 7 halaman sudah termasuk Gambar dan Tabel
2. Tata penyusunan naskah untuk: Judul dan Identitas penulis sama seperti persyaratan pada butir A (Naskah hasil penelitian).
3. Abstrak: Terdiri dari minimal 100 kata dan maksimal 250 kata
4. Susunan naskah meliputi: Abstrak, Pendahuluan, Materi dan Metode, Hasil dan Pembahasan, Kesimpulan, Ucapan terimakasih dan Daftar Pustaka.
5. Tata penyusunan Daftar Pustaka: Sama seperti pada butir A (Naskah hasil penelitian).

### C. Isi naskah:

sempuhnya menjadi tanggung jawab penulis.

**D. Errata:** Bila ada, merupakan bagian untuk mengoreksi kesalahan yang mungkin terjadi dalam penulisan artikel.

### E. Alamat:

Redaksi Jurnal Sain Veteriner (JSV)  
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Jl. Fauna No.2, Karangmalang, Yogyakarta 55281  
E-mail: [jsv\\_fkh@ugm.ac.id](mailto:jsv_fkh@ugm.ac.id)  
Telp.: 0274-560861  
HP. Surohmiatun : 085868693569  
Endah Choiriah : 08112505487  
Website: <https://jurnal.ugm.ac.id/jsv>

