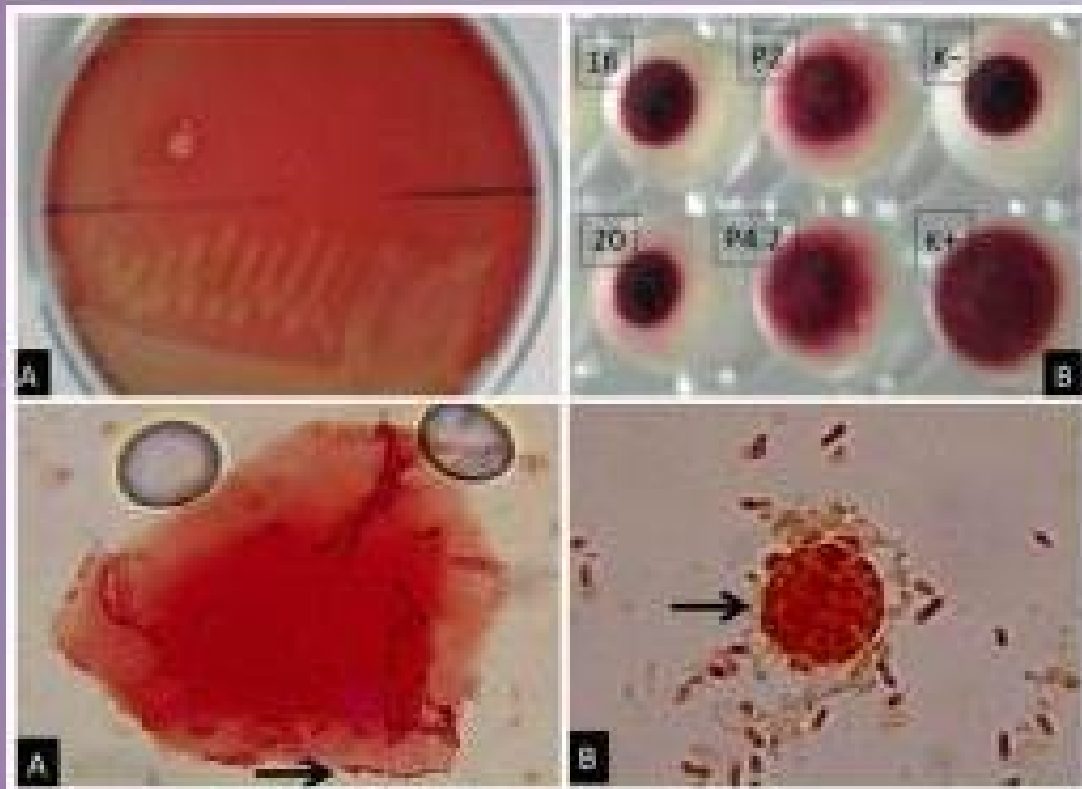


**Online**  
www.ojs.ugm.ac.id

JSV 39 (3), Desember 2021

ISSN : 0126 - 0425 (cetak)  
ISSN : 2461 - 0733 (online)

# Jurnal Sain Veteriner



Terakreditasi Peringkat 2 oleh Kementerian Riset dan Teknologi/  
Kepala Badan Riset Inovasi Nasional SK No: 85/M/KPT, tanggal 1 April 2020



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



## PENGANTAR REDAKSI

Para pembaca JSV yang budiman dimanapun berada,

Tidak terasa tahun 2021 akan segera berakhir dalam beberapa hari lagi dan pandemi COVID-19 sudah hampir 2 tahun melanda tanah air Indonesia. Kami berharap bahwa Pandemi COVID-19 ini dapat segera berakhir dan kita segera memasuki fase kehidupan normal yang baru. Pada JSV vol. 39 no. 3 edisi Desember 2021 ini terbit dengan 13 artikel ilmiah di bidang Veteriner, sehingga secara total sampai akhir tahun 2021 ini, JSV telah mempublikasi sebanyak 39 artikel ilmiah dalam kurun waktu satu tahun. Pada kesempatan ini perkenankanlah kami mengucapkan terimakasih yang sebesar besar kepada seluruh Mitra Penulis, kontributor, Pengurus dan sivitas akademika di FKH UGM dan seluruh Stakeholder dimanapun berada atas kontribusi dan kerjasamanya selama ini, semoga ke depan JSV semakin maju, berjaya dan terus berkembang menjadi jurnal ilmiah Nasional yang baik di bidang Veteriner.

Pada JSV Vol 39, no. 3 edisi Desember 2021 ini, memuat sebanyak 13 artikel ilmiah dari berbagai bidang ilmu veteriner, yaitu bidang Mikrobiologi, Kesmavet, Kesehatan Unggas, Parasitologi, Patologi, Ilmu Penyakit Dalam, Virologi dan Reproduksi. Kami dengan senang hati mengundang bapak/ibu/saudara penulis dan kontributor artikel ilmiah untuk mengirimkan manuskript atau draft artikel ilmiah agar dapat dipublikasikan di JSV pada edisi yang akan datang. Proses submisi artikel harus dilakukan secara *online* melalui *Open Journal System (OJS)* pada situs JSV. Pada situs tersebut, sudah tersedia *Template* untuk artikel ilmiah yang akan disubmisikan, sehingga prosesnya menjadi lebih mudah, fleksibel dan dapat menyeragamkan format penulisan artikel ilmiah pada JSV. Kami juga dengan senang hati menerima kritik, saran dan masukan yang bersifat membangun untuk perbaikan JSV pada masa yang akan. Kami berharap bahwa JSV semakin berkembang dalam mempublikasi artikel artikel ilmiah yang berkualitas di bidang veteriner.

Terimakasih atas perhatian dan kerjasamanya.

Ketua Dewan Penyunting JSV

Aris Haryanto



## DAFTAR ISI

<b>Serotype Specific Sequences for Multi Test Line Nucleic Acid Lateral Flow Development</b> <i>Narendra Yoga Hendarta, Asmarani Kusumawati, Tri Wibawa, Abu Tholib Aman</i> .....	207-215
<b>Pemodelan Epidemiologi Kejadian <i>Multidrug Resistance</i> Bakteri <i>Escherichia coli</i> pada Peternakan Ayam Komersial di Kabupaten Blitar</b> <i>Freshinta Jellia Wibisono, Bambang Sumiarto, Tri Untari, Mustofa Helmi Effendi, Dian Ayu Permatasari Adiana Mutamsari Witaningrum</i> .....	216-223
<b>Analisis Kualitas Daging Ayam Broiler Asal Pasar Swalayan Dan Pasar Tradisional Di Kota Medan Sumatera Utara</b> <i>Angelina Susanty, Dhirgo Adji, Ma'ruf Tafsin</i> .....	224-232
<b>Faktor Risiko Potensial terhadap <i>Canine Leptospirosis</i> di Rangunan Animal Hospital Jakarta, Indonesia</b> <i>Ambar Retnowati, Agustin Indrawati, Upik Kesumawati Hadi, Safika, Pratitis S. Wibowo, Susan M. Noor</i> .....	233-240
<b>Gangguan Pertumbuhan Organ Limfoid Ayam Broiler yang Menderita Omfalitis</b> <i>Bambang Sutrisno, R. Wasito, Kurniasih, Sitarina Widyarini, Yuli Purwandari Kristianingrum, Sugiyono</i> .....	241-249
<b>Daya Antelmintik Serbuk Kulit Nanas (<i>Ananas Comosus</i>) terhadap Cacing <i>Haemonchus Contortus</i> pada Domba.</b> <i>Dewi Pranatasari, Rido Florensius Manik, Budi Purwo Widiarso, Wida Wahidah Mubarakah</i> .....	250-255
<b>Studi Histopatologi Ren Tikus Putih (<i>Rattus Norvegicus L.</i>) Diabetes setelah Pemberian Cuka dari Kulit Nanas (<i>Ananas Comosus (L.) Mer.</i>)</b> <i>Tazkia Annisa, Agung Janika Sitaswi, Sri Isdadiyanto, Siti Nur Jannah</i> .....	256-260
<b>Peran Hemaglutinin dan Hemolisin pada <i>Escherichia coli</i> Sorbitol-negatif Isolat Burung Puyuh pada Proses Infeksi Secara in Vitro</b> <i>Khusnan, Wahyu Prihtiyantoro, Dwi Kusmanto</i> .....	261-271
<b>Identifikasi Tipe Dehidrasi dan Profil Elektrolit Mayor pada Pasien Kucing di Rumah Sakit Hewan Prof. Soeparwi dan Beberapa Klinik Hewan di Wilayah Yogyakarta</b> <i>Guntari Titik Mulyani, Setyo Budhi, Kurnia</i> .....	272-276
<b>Respons Imun Seluler Ayam Petelur Pascavaksinasi <i>Avian Influenza</i> Subtipe H5N1 Isolat dari Bali</b> <i>Gusti Ayu Yuniati Kencana, Tri Komala Sari, I Nyoman Suartha, I Ketut Tomy Caesar Ramanda, Anak Agung Sagung Kendran,</i> .....	277-288
<b>Deteksi Kebuntingan Ternak Sapi: Aplikasi Test Strip <i>Dairy Cow Pregnancy Colloidal Gold Test Strip</i></b> <i>Sartika Juwita, Mihrani, Agusriady, Aris Handono</i> .....	287-292
<b>Efektivitas <i>Low Density Lipoprotein (LDL)</i> dari Kuning Telur Ayam terhadap Kualitas Semen Cair Domba</b> <i>Dwitya Citraesti, Wahono Esthi Prasetyaningtyas, Ni Wayan Kurniani Karja</i> .....	293-301
<b>Identifikasi Mikroba dari Lendir Estrus dan Deteksi Kebuntingan Sapi Kawin Berulang di Sleman, Yogyakarta</b> <i>Surya Agus Prihatno, Abdul Samik, Dea Indriani Astuti, Muhammad Agil, Usamah Afiff, Anriansyah Renggaman, Dedi Rahmat Setiadi, Yosua Kristian Adi</i> .....	302-309
<b>INDEK PENULIS</b> .....	310-311
<b>INDEK SUBYEK</b> .....	312-314

Gambar Depan: Peran Hemaglutinin dan Hemolisin pada *Escherichia coli* Sorbitol-negatif Isolat Burung Puyuh pada Proses Infeksi Secara in Vitro.  
Khusnan, Wahyu Prihtiyantoro, Dwi Kusmanto. Halaman: 261-271



## Serotype Specific Sequences for Multi Test Line Nucleic Acid Lateral Flow Development

### *Sekuen Spesifik Serotipe Untuk Pengembangan Multi Test Line Nucleic Acid Lateral Flow*

Narendra Yoga Hendarta<sup>1\*</sup>, Asmarani Kusumawati<sup>2</sup>, Tri Wibawa<sup>3</sup>, Abu Tholib Aman<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical Laboratory Technology, Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Yogyakarta, Yogyakarta

<sup>2</sup>Department of Reproduction & Obstetrics, Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

<sup>3</sup>Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Public Health and Nursing, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

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

Naskah diterima: 2 April 2019, direvisi: 6 November 2020, disetujui: 31 Agustus 2021

#### Abstrak

Virus dengue (DENV) merupakan penyebab demam berdarah dan dengue shock syndrome. Virus ini memiliki 4 serotipe yang berbeda yaitu DENV1-4. Serotyping diperlukan untuk deteksi dan aktivitas surveillance penyebar penyakit. Akhir-akhir ini dikembangkan metode *Nucleic Acid Lateral Flow* (NALF) untuk konfirmasi hasil amplifikasi yang mudah tanpa peralatan rumit. Metode ini menggunakan *capture probe* diimmobilisasi pada *test pad*. Studi yang telah dilakukan sebelumnya mendapatkan empat sekuen spesifik serotipe Virus Dengue yang akan dibuat *dipstick* NALF. Sekuen tersebut dianalisis %GC content, homologi target, panjang 100% homologi non target, suhu hibridisasi, dan struktur sekunder untuk memperkirakan kemampuan *capture probe* tersebut pada reaksi hibridisasi. Sekuen *capture probe* diaplikasikan pada NALF dan diuji menggunakan ssDNA sebagai sampel untuk melihat kemampuannya. Hasil ke-empat *capture probe* untuk DENV1,2,3,4 berturut-turut adalah CACCAGGGGAAGCTGTACCCTGGTGGT, GTGAGATGAAGCTGTAGTCTCACTGG, GCACTGAGGGGAAGCTGTACCTCCTTGCA, AGCCAGGAGGAAGCTGTACTTCTGGTGG. Aplikasi pada NALF yang dibuat secara fabrikasi menunjukkan tidak terjadi hibridisasi silang menggunakan larutan dapar *stringency* tinggi.

**Kata kunci:** *capture probe*; hibridisasi; *nucleic acid lateral flow*; penentuan serotipe; virus dengue

#### Abstract

Dengue virus that agent of dengue fever and dengue shock syndrome has 4 different serotypes. Serotyping is needed for diagnosing and surveillance activities of disease spreads. Recently, the Nucleic Acid Lateral Flow (NALF) technique has been extended to confirm the results of easy amplification without complicated equipment. The aim of this study was designing capture probe for serotyping dengue virus (DENV) using NALF method. This study have conducted an analytical study to obtain four specific sequences of Dengue Virus serotypes to develop serotype specific NALF. Several parameters were used to analyzed Dengue genome sequences i.e. % GC content, target homology, length of 100% homology continue of non-specific bases, hybridization temperature, and secondary structure to estimate the probe's capture capability in the hybridization reaction. The capture probes were applied to NALF and assayed using single strand DNA sample to check its performance. The result of four specific sequence capture probes, DENV1, 2, 3, 4 were CACCAGGGGAAGCTGTACCCTGGTGGT, GTGAGATGAAGCTGTAGTCTCACTGG, GCACTGAGGGGAAGCTGTACCTCCTTGCA, AGCCAGGAGGAAGCTGTACTTCTGGTGG. Application to fabricated NALF gave no cross hybridization with high stringency buffer assay.

**Keywords:** capture probe; dengue virus; hybridization; nucleic acid lateral flow; serotyping

## Introduction

Dengue virus has 4 different serotypes that can cause fatal disease. Surveillance activities to detect the cause of the disease uses serotyping by ELISA and RT-PCR method. Complicated equipment can be avoided by using Nucleic Acid Lateral Flow (NALF) to confirm the results of amplification reaction (Doyle and Uthicke, 2020; Antiochia, 2021). This method uses immobilized capture probe on the test pad (Yrad *et.al.*, 2019). We have conducted an analytical study to obtain four specific sequences of Dengue Virus serotypes that NALF dipstick will be made. The sequence is analyzed according to its % GC content, homology target, 100% continue length of homology to non-target, hybridization temperature, and secondary structure to estimate the capture probe capability in the hybridization reaction.

Detection of DENV infection is generally based on clinics manifestation such as a sudden high fever and simple blood tests (platelets and hematocrit concentrations) (Muller *et.al* 2017; Triana *et.al.*, 2020; Ngim *et.al.*, 2021). ELISA examination based on the presence of antibodies can be done (IgM and IgG) (Lee *et.al.*, 2019; Yow *et.al.*, 2021; Prommool *et.al.*, 2021). The virus isolation method takes at least 7 days to find out the results (Azhar *et. al.*, 2010; Kuczera *et. al.*, 2016). ELISA examination based on antigen virus such as NS1 is performed at the beginning of infection before viremia ends but does not distinguish serotypes (Duong *et al.*, 2011, Mardekian and Robert, 2015). Examination method based on nucleic acid is rarely performed due to the high-cost. Although it is good for detecting the presence of viruses at the beginning of infection and able to distinguish serotypes (Kao *et al.*, 2005; Mardekian and Robert, 2015).

Recently, amplicon product detection method has been developed using Lateral Flow Dipstick (LFD) based on Nucleic Acid Lateral Flow Immuno Assay (NALFIA) or Nucleic Acid Lateral Flow (NALF). The use of LFD fabrication NALFIA method takes less time to confirm the results of the amplification reaction based on whether there is an appearance of lines on the LFD test line or not (Nimitphak

*et al.*, 2010; Yrad *et.al.*, 2019; Kabir *et. al.*, 2021). Research on the use of LFD for NALFIA / NALF has been carried out for detecting pathogenic diseases in both animals and humans (Ding *et al.*, 2010; Nimitphak *et al.*, 2010; Kusumawati *et al.*, 2015, Kusumawati and Fatimah, 2018; Ajie *et. al.*, 2021). Detection of DENV infection and determination of DENV serotypes have been developed using NALFIA-based LFD with isothermal amplification such as RT-LAMP and NASBA (Yrad *et.al.*, 2019; Griffioen *et. al.*, 2020). Universal NALFIA format with the introduction through DNA sequences or specific probes which is labeled as introduction molecules (antigen-antibodies) so that the hybridization process is needed with amplification (amplicon) products (Antiochia, 2021).

To develop the NALF method based on the introduction of DNA hybridization reactions, capture probe is needed as target recognition which is immobilized in the test pad. This study is for analyzing the DENV genome to obtain the fourth specific serotypes sequence. In this analysis, the ability of the hybridization probes with specific serotypes was calculated.

## Materials and Methods

### Specific DENV Serotype Sequence Identification

Specific DENV serotype sequence identified by performing multiple alignment of DENV serotypes 1-4 obtained from gene bank. MEGA ver. 5.05 were employed to align all DENV sequences. After Specific DENV serotype sequence candidates were obtained, the prediction of its potential as hybridization probes candidates were analyzed based on several parameters, such as: % GC content, bases length, homology, secondary structure, hybridization temperature, secondary structure, and melting temperatures. To estimate the secondary structure, Clone Manager 9 bioinformatics software from Scientific & Educational Software (USA) was used. Melting temperature ( $T_m$ ) is calculated using the formula from Sambrook and Russel (2001).

$$T_m = 81.5 + 16.6(\log_{10}[Na^+]) + 0.41(\%G+C) - 675/n - 1.0m - 0.72$$

Na<sup>+</sup>: Na<sup>+</sup> concentration (M), n: sequence length, m: mismatch percentage, f: methanamide percentage.

**Serotype Specific NALF Preparation**

Four capture probe, DENV1, DENV2, DENV3, and DENV4, were supplied by Integrated DNA Technology (USA). A Capture probes (100µM) were immobilized on nitrocellulose membrane using Isoflow dispenser (Imagine Technology, USA) at dispense rate of 0,06 µL/mm. Gold nano particle which conjugated with streptavidin (GNP-SA) (15 nm, OD 20) was spread surface on nylon membrane at dispense rate of 2x0,25 µL/mm. Both capture probe and GNP-SA were dehydrated an hour using dehumidifiers. Capture probes were cross linked on membrane with expose to Ultra Violet lamp, 256 nm and 30 W, (G30T8 Phillip, USA) during 120 second. Nitrocellulose membrane, absorbent paper and nylon membrane that all of them were sticked on plastic backing sheet then sliced to 3,8 mm wide using cutting machine (Matrix 2360 Kinematic Automation, USA).

**NALF Detection of Synthetic DNA Correspond to DENV Genome**

To analyze the performance of NALF, synthetic DNA correspond to DENV 1 -4 genome sequence were employed. The synthetic DNA sequences were consisted of 73 (DENV2,3,4) and 98 (DEN1) bases of single stranded DNA labeled with biotin supplied by Integrated DNA Technology (USA).

Table 1. Synthetic DNA sequences to a analyze the performance of NALF

Serotype	Sequences
DENV1	Biotin-GGTCTCCTCTAACCTCTAGTCCTTACC ACCAGGGTACAGCTTCCCCTGGTGTG
DENV2	Biotin-GGTCTCCTCTAACCTCTAGTCCTTTCA GTGAGACTACAGCTTCATCTCACCTTG GGCCCCAATTGTGCTGCG
DENV3	Biotin-GGTCTCCTCTAACCTCTAGTCCTTTGC AAGGAGGTACAGCTTCCCTCAGTGCTC GGGCCCCGCTGCTGCGTTG
DENV4	Biotin-GGTCTCCTCTAACCTCTAGTCCTTCCA CCAGAAGTACAGCTTCCCTCTGGCTTC GGGCCCCCTTTTTGCTGC

Assay was done using sample amplicon (100 pmol) and 100 µL buffer assay (0,125% Tween-20, 0,5% BSA, 15% methanamide, and 5% sucrose in 0.5x PBS). Glycerol was added to give 15% concentration into buffer assay (Hendarta *et al.*, 2020). All reagents were dropped into nylon membrane. The successful hybridization reaction was showed with signaling of color which raise on test line of nitrocellulose membrane after 90 minutes dropping.

**Results and Discussion**

This study performed alignment analysis of complete DENV 1-4 genomes (around 10,000 bases). DENV isolates came from various regions in Indonesia and the surrounding regions or countries such as Singapore, Malaysia, Philippines and Thailand. The complete DENV 1-4 genome were taken from the Gen Bank database. The details are in Table 2.

Table 2. The DENV genome sequences used for alignment analysis

No	Origin	Serotype of DENV				Total
		1	2	3	4	
1	Indonesia	2	14	16	-	32
2	Malaysia	3	-	-	-	3
3	Singapore	3	3	-	3	9
4	Thailand	12	51	22	-	85
5	Philippines	1	-	-	1	2
Amount		21	68	38	4	131

The alignment results (Figure 1) showed conserved bases sequence regions (> 70%) for all four serotypes (white background) and a conserved bases sequence (> 70%) which is specific to each of the serotypes (colored background). The bases sequence is spread throughout the regions in the DENV genome with a length of about 5-20 bases. The translation regions (400-10,000 position) were conserved regions (5-20 bases) for the four least serotypes and there are several regions of the sequence of conserved bases that are specific to each serotype. The 5 ‘end regions (0-400 position) and 3’ end (10,000-10,500 position) which are untranslated region (UTR) areas have many conserved regions for the four serotypes



and there several sequences of conserved bases that are specific to each serotype. The region is suitable for amplification targets and serotype determination especially by hemi, nested and probing amplification. Researchers who use that region, are Lanciotti *et al.* (1992), Harris *et al.* (1998), Wu *et al.* (2001), Yong *et al.* (2007), Gurukumar *et al.* (2009), Sahni *et al.* (2013) and Anggraini (2016).

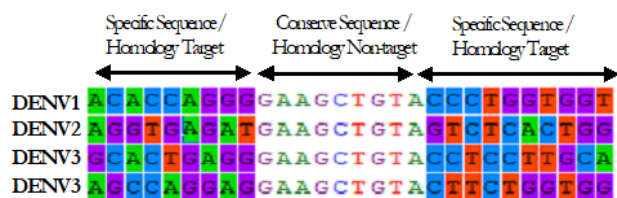


Figure 1. Specific and conserve sequence location on DENV genome

Lanciotti *et al.* (1992), Harris *et al.* (1998), Yong *et al.* (2007) used the 5'UTR region as conventional amplification target for RT-PCR

with serotyping based on the difference in target length of amplicon target produced. Wu *et al.* (2001) and Anggraini (2016) used 5'UTR region as amplification target of isothermal NASBA which aimed to perform serotyping based on probing. At 5' UTR region, there were specific sequences of DENV 1-4 serotype which flanked by bases conserve sequences (>90%) with 100-200 bases in length (Figure 1). Those regions had 2 long bases sequences which located near to 7-10 bases of specific conserve region (70-100% in homology) for each DENV1-4 serotype. DENV1 genome has specific regions bases sequence with 8 bases in length (CACCAGGG) with 100% homology and 10 bases (CCCTGGTGGT) with 100% homology. DENV 2 genome has a specific regions bases sequence with 8 bases in length (GG-T/C-GA-G/A-AT) with 75% homology and 10 bases (G/A-TCTC-A/G-CTG-G/A) with 70% homology. DENV 3 genome has a bases sequence with 9

Table 3. Oligonucleotide sequence of designed probe

Probe	Sequence	Genome position
DENV 1	<b>CACCAGGGGAAGCTGTACCCTGGTGGT</b>	10.562–10.588 <sup>a</sup>
DENV 2	<b>GGTGAGATGAAGCTGTAGTCTCACTGG</b>	10.551–10.577 <sup>b</sup>
DENV 3	<b>GCACTGAGGGGAAGCTGTACCTCCTTGCA</b>	10.535–10.562 <sup>c</sup>
DENV 4	<b>AGCCAGGAGGAAGCTGTACTTCTGGTGG</b>	10.481–10.508 <sup>d</sup>

Note: Specific bases to serotype printed in bold; <sup>a</sup> based on DENV 1 *IND genomic RNA complete genome strain: 98901530 DF DV-1*; <sup>b</sup> based on DENV 2 *IND strain DENV-2/ID/1016DN/1975 complete genome*; <sup>c</sup> based on DENV 3 *IND genomic RNA complete genome strain: 98901403 DSS DV-3*; <sup>d</sup> based on DENV 4 *SIN isolate EHI310A129CY10 complete genome*.

Table 4. Capture probe analysis

Probe	% Homology to genome				Length of 100% homology continue of non-specific bases			
	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4
DENV 1	>96,3	51,9	67,7	55,6	9	9	13	11
DENV 2	51,9	>88,9	37	59,3	9	9	9	9
DENV 3	64,3	35,7	100	53,6	13	9	9	11
DENV 4	57,1	60,7	53,6	>96,3	11	9	11	9

Table 5. Distribution analysis of specific bases, homology, and a series of non-specific bases for probe design

Probe	n	%G+C	T <sub>m</sub> (°C)	Hybridization temperature (T <sub>m</sub> -20°C)	Secondary structure ΔG. 28°C (Kcal)
DENV 1	28	61,7	48,53	28,6	-8,4
DENV 2	27	51,8	43,88	23,9	-3,3
DENV 3	28	57,1	47,07	27,1	-0,9
DENV 4	28	57,1	47,07	27,1	-

Notes: n: nucleotide length; %G+C: GC content percentage; T<sub>m</sub>: melting temperature calculating using Sambrook and Russel (2001) with mismatch 1 base, Na<sup>+</sup> 0,068 mM in PBS 0,5x, and methanamide 15%; Secondary structure was calculated using Clone Manager 9

bases in length (GCACTGAGG) with 100% homology and 10 bases (CCTCCTTGCA) with 100% homology. DENV 4 genome has a specific regions bases sequence with 9 bases in length (AGCCAGGAG) with 100% homology and 10 bases (CT-T / C-CTGGTGG) with 90% homology. Those two bases sequences are separated by conserved bases sequences (89%) with 9 bases in length (G / A-AAGCTGTA). These specific base sequences are used for capture probe on the DEN-NALF test line.

The probes position in Dengue Virus genome (Table 3) were chosen in the same or adjacent region (10481-10588). The adjacent position is very beneficial because it will require a short length of amplicon as target which short nucleic acid amplification provides high amplification efficiency. This position was the only region in the Dengue Virus genome where had serotype specific sequence in the adjacent position in four serotypes. The amplification method that is developed by Lanciotti *et al.* (1992), Harris *et al.* (1998), and Yong *et al.* (2007) uses the RT-PCR amplicon around 250-700 bp in length. Serotyping based on amplicon length uses visual appearance by using electrophoresis so that it requires a different length of amplicon to be able to distinguish amplicon positions based on different bases lengths. Whereas Wu *et al.* (2001) and Anggraini (2016) used a short amplicon (120 bp) since they used a specific capture probe of each serotype which adjacent bases position/region.

The shorter probe, the faster hybridization takes place. Shorter probes are better in discriminating towards the target genes (Farrell-Jr, 2010). The length of the probe bases is directly related to the hybridization temperature. As an oligonucleotide probe, hybridization takes place at 5-12 degrees Celsius below  $T_m$  (Sambrook and Russel, 2001). According to Rule *et al.* (1996), the maximum speed of DNA hybridization probes is generally 25°C below melting temperature ( $T_m$ ). Working very close to the  $T_m$  temperature will result in a decreasing number of mismatched bases but also reduce the number (rate) of a perfect hybrid formation.

The capture probe worked at around 28°C of when working at this temperature, it will have the expected mismatch of 1 base. Low hybridization

temperatures will decrease stringency which can result in increasing mismatch bases or decreasing specificity even though the speed of hybridization increases (Sambrook and Russel, 2001). To increase hybridization stringency, methanamide can be used as it has been done by Rule *et al.* (1996). Methanamide can be added up to 50% in hybridization buffer to increase stringency. Methanamide concentrations of 20% and 25% in hybridization buffers or can eliminate mismatches as much as 10% and 20% bases on the optimum hybridization temperature ( $T_m - 25^\circ\text{C}$ ) which can be seen visually on nitrocellulose membrane paper (Rule *et al.*, 1996). The decreasing of  $T_m$  by the addition of Methanamide can be calculated at 0.72°C for 1% of each Methanamide concentrations (Sambrook and Russel, 2001).

Hybridization was designed to be performed at room temperature (27-30°C). This was a low temperature so it needs high stringency condition to keep specificity to serotype. Low monovalent mineral concentration such as  $\text{Na}^+$  was chosen to keep high stringency. The estimation resulted for the probes (Table 4.2) with  $\text{Na}^+$  concentration was 0.068 M (PBS 0.5X) and hybridization temperature works at 20°C below  $T_m$  which still at room temperature. The calculation used Sambrook and Russel (2001) formula. There were also calculations to estimate whether there was a secondary structure to estimate the efficiency of hybridization (Table 5) and the analysis of target and non-target homologies to estimate the condition of hybridization (Table 4).

Our capture probes were designed to have non-target homology below 70%. These designs were able to prevent from cross hybridization signals. According to Kucho *et al.* (2004), low homology towards the target (specific area) causes a high cross hybridization. Probe oligonucleotides should have a minimum homology of 30% with target (specific regions) or a maximum of 70% homology with a non-target (conserved regions) to ensure high specificity.

The percentage of capture probe's GC content is above 55% (DENV1 60.7%, DENV 3 and DENV4 57.1%) (Table 4). It could potentially cause the cross hybridization to

happen if stringency hybridization condition is low. Preferably % GC content is designed around 35-55% . The high % GC content will increase cross hybridization and reduce discriminant (Kucho *et. al.*, 2004; Whiteford *et al.*, 2005; Koehler and Peyret, 2005; Haslam *et al.*, 2008).

Preferably, the probe is designed to have no possibility of forming a secondary structure which has  $\Delta G$  value more than -10 kcal / mol (Farrell-Jr, 2010) The existence of a secondary structure will reduce the efficiency of hybridization. Table 3 shows the capture probe and amplicon have a secondary structure, but still below the stable extreme ( $< -10$  kcal / mol). However, the DENV1 capture probe has  $\Delta G$  value -8.3 kcal / mol gives lower hybridization efficiency than other capture probe.

Kane *et al.* (2000) showed a continuous sequence of 100% non-homology for less than 14 nt with non-target homology conditions less than 75%, % GC content 51% and 50 mer of probe length, does not provide signal hybridization. While studies from Kucho *et.al.* (2004), the length of a continuous sequence of 18-23 nt with non-target homology conditions is 40-51%, 45 mers of probe length, with% GC content 35-55% does not indicate a cross hybridization signal. The percentage GC content above 55% gives a signal of cross hybridization. Table. 3 shows the capture probe and amplicon of our design have a non-target continuous homology sequences with 11 and 13 bases in length for DENV 1 capture probe towards DENV3 and DENV4 amplicons. Other than that, looking at % GC content for high capture probe (60.7%), there is a possibility of cross hybridization between DENV3 amplicon and DENV4 amplicon with DENV1 capture probe if the hybridization stringency conditions are not high.

Assay test using ssDNA DENV1-4 as targets worked well and showed no cross hybridization which the only color signal raised on target test line (Figure 2). Cross hybridization did not occur between DENV1 sample with DENV3 and DENV4 capture probe as based of calculating previously. Using buffer assay component with low  $\text{Na}^+$  and methanamide in this study gave high stringency to more specific hybridization (Sambrook and Russel, 2001).

Also, addition to glycerol showed no cross hybridization (Hendarta *et al.*, 2020)

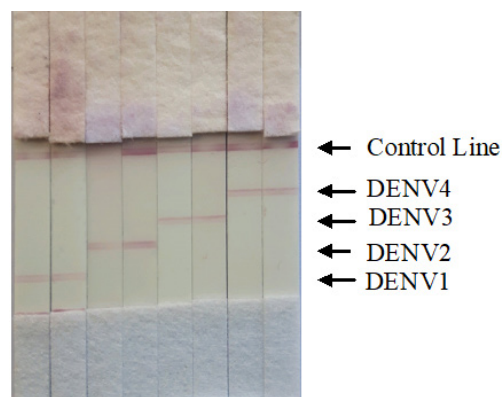


Figure 2. Color signal on multi test line NALF

## Conclusions

Through genome analysis, the capture probe design was obtained for NALF serotyping. Capture probe has 2 specific serotypes sequences that separated by a conserve sequence. Capture probe has a high % GC content ( $> 55\%$ ) and the length of % homology on a quite long non-target (11-13 nt) so that high stringency condition is needed to avoid cross hybridization. Application of designed capture probe to fabricated NALF gave no-cross hybridization on test line using high stringency buffer assay. It has prospect to future development. .

## Acknowledgment

This research was funded by National Innovation Research System Incentive Research from Indonesian Ministry of Research, Technology and Higher Education. We thank to Prof. Ir. Sulaiman N. Depamede, M.Biotech, Ph.D and Prof. Dr. dr. Mulyanto from Hepatika Mataram, West Nusa Tenggara Province for designing and producing assistance fabricated-NALF. Also, we are intensely grateful to Warisatul Ilmi and M. Nashrurrokhman for their laboratory supporting.

## References

Ajie, M., Pascapurnama, D.N., Prodjosowoyo, S., Kusumawardani, S., Djauhari, H., Handali, S., Alisjahbana, B., Chaidir, L. (2021) Development of nucleic-acid lateral flow immunoassay for rapid and

- accurate detection of Chikungunya virus in Indonesia. *J Microbiol Biotechnol.* 31(12). doi: 10.4014/jmb.2108.08025.
- Anggraini, Y.M. (2016). Development of lateral flow immunoassay as detection tool of isothermal amplification of dengue virus. Thesis. S2 Biotechnology Program, Graduate School, Gadjah Mada University.
- Antiochia R. (2021) Paper-Based Biosensors: Frontiers in Point-of-Care Detection of COVID-19 Disease. *Biosensors.* 11(4):110. doi:10.3390/bios11040110
- Azhar, E., Kao, M., Niedrig, M., Masri, B., Godus, A., Badierah, R., Khan, N., Almazrooa, A., Ashshi, A., Jamjoom, G., (2010). Virological diagnosis of dengue fever in Jeddah, Saudi Arabia: Comparison between RT-PCR and virus isolation in cell culture. *Journal of Infectious Diseases and Immunity.* Vol. 2(2), pp. 24-29, doi:10.5897/JIDI.9000048
- Ding, W.C., Chen, J., Shi, Y.H., Lu, X.J. and Li, M.Y. (2010). Rapid and sensitive detection of infectious spleen and kidney necrosis virus by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *Arch Virol.* ,155:385-389.
- Doyle, J, Uthicke, S., (2021). Sensitive environmental DNA detection via lateral flow assay (dipstick)—A case study on corallivorous crown-of-thorns sea star (*Acanthaster cf. solaris*) detection. *Environmental DNA.* 3: 323– 342. doi:10.1002/edn3.123
- Duong, V., Ly, S., Lorn-Try, P., Tuiskunen, A., Ong, S., Chroeung, N., Lundkvist, A., Leparc-Goffart, I., Deubel, V.,<sup>Vong</sup>, S. and Buchy, P. (2011). Clinical and virological factors influencing the performance of a ns1 antigen-capture assay and potential use as a marker of dengue disease severity. *PLoS Negl Trop Dis.*, 5:e1244.
- Farrell-Jr, R.E. (2010). A Laboratory Guide for Isolation and Characterization. In *Practical Nucleic Acid Hybridization in RNA Methodologies.* Farrell-Jr, R.E. (Ed). 4<sup>th</sup> ed, Academic Press, New York. p. 287
- Griffioen, K., Cornelissen, J., Heuvelink, A., Adusei, D., Mevius, D., van der Wal, F.J., Health4Food–Dutch Mastitis Diagnostics Consortium. (2020). Development and evaluation of 4 loop-mediated isothermal amplification assays to detect mastitis-causing bacteria in bovine milk samples. *J. Dairy Sci.* 103:8407–8420 . doi:10.3168/jds.2019-18035
- Gurukumar, K.R., Priyadarshini, D., Patil, J.A., Bhagat, A., Singh, A., Shah, P.S., and Cecilia, D., (2009). Development of real time PCR for detection and quantitation of dengue viruses. *Virol J.*, 6(10).
- Harris, E., Roberts, T.G., Smith, L., Selle, J., Kramer, L.D., Valle, S., Sandoval, E. and Balmaseda, A. (1998). Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR. *J Clin Microbiol.*, 36(9):2634-2639.
- Haslam, N.J., Whiteford, N.E., Weber, G., Prugel-Bennett, A, Essex, J.W., and Neylon, C. (2008). Optimal probe length varies for targets with high sequence variation: implications for probe library design for resequencing highly variable genes. *PLoS One.* 3(6):e2500.
- Hendarta, N.Y., Aman, A.T., Asmarani, K., and Wibawa, T. (2020). Glycerol Reduces Cross Hybridization on Nitrocellulose Membrane. *Jurnal Sain Veteriner*, 38(3). 199-205
- Kabir, M.A.; Zilouchian, H.; Younas, M.A.; Asghar, W. (2021). Dengue Detection: Advances in Diagnostic Tools from Conventional Technology to Point of Care. *Biosensors*, 11, 206. doi: 10.3390/bios11070206
- Kane, M.D., Jatkoe, T.A., Stumpf, C.R., Lu, J., Thomas, J.D., Madore, S.J. (2000). Assessment of the sensitivity and specificity of oligonucleotide (50mer) microarrays. *Nucleic Acids Res.*, 28:4552–4557.

- Koehler, R. and Peyret, N. (2005). Thermodynamic properties of DNA sequences: characteristic values for the human genome. *Bioinformatics*, 21(16):3333–3339.
- Kucho, K., Yoneda, H., Harada, M. and Ishiura, M. (2004). Determinants of sensitivity and specificity in spotted DNA microarrays with unmodified oligonucleotides. *Genes Genet Syst.*, 79:189-197.
- Kuczera, D., Bavia, L., Mosimann, A.L.P. Koishi, A.C., Mazzarotto, G.A.C.A., Aoki, M.N., Mansano, A.M.F., Tomeleri, E.I., Junior, W.L.C., Miranda, M.M., Sarzi, M.L., Pavanelli, W.R., Conchon-Costa, I., dos Santos, C.N.D., Bordignon, J., (2016) Isolation of dengue virus serotype 4 genotype II from a patient with high viral load and a mixed Th1/Th17 inflammatory cytokine profile in South Brazil. *Virol J.* 13, 93. doi:10.1186/s12985-016-0548-9
- Kusumawati, A., Tampubolon, I.D., Hendarta, N.Y., Salasia, S.I., Wanahari, T.A., Mappakaya, B.A. and Hartati, S. (2015). Use of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with lateral flow dipstick for an easy and rapid detection of Jembrana disease virus. *Virusdisease.*, 26(3):189-95. doi: 10.1007/s13337-015-0277-5
- Kusumawati, A. and Fatimah. (2018). Combination of One-Step Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and NALF (Nucleic Acid Lateral Flow) Method to Detect *env-tm* Gene of Jembrana Virus Tabanan 1987 strain. *Jurnal Sain Veteriner*, 36(2): 137-143
- Lanciotti, R.S., Calisher, C.H., Gubler, D.J., Chang, G.J. and Vorndam, V. (1992). Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.*, 30:545-551.
- Lee, H., Ryu, J.H., Park, H.S., Park, K.H., Bae, H., Yun, S., Choi, A.R., Cho, S.Y., Park, C., Lee, D.G., Lim, J., Lee, J., Lee, S., Shin, S., Park, H., Oh, F.J., (2019). Comparison of Six Commercial Diagnostic Tests for the Detection of Dengue Virus Non-Structural-1 Antigen and IgM/IgG Antibodies. *Ann Lab Med.* 39(6):566-571. doi: 10.3343/alm.2019.39.6.566.
- Mardekian, S.K. and Robert, A.M. (2015). Review article: Diagnostic options and challenges for dengue and chikungunya viruses. *Biomed Res Int.*, doi:10.1155/2015/834371.
- Ngim, C. F., Husain, S., Hassan, S. S., Dhanoa, A., Ahmad, S., Mariapun, J., Wan Ismail, W. F., Botross Henien, N. P., Jahan, N. K., Pong, L. Y., Elshahawi, H., Hontz, R. D., Warkentein, T., & Yunos, N. M. (2021). Rapid testing requires clinical evaluation for accurate diagnosis of dengue disease: A passive surveillance study in Southern Malaysia. *PLoS neglected tropical diseases*, 15(5), e0009445. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009445>
- Nimitphak, T., Meemetta, W., Arunrut, N., Senapin, S., Kiatpathomchai, W. (2010). Rapid and sensitive detection of *Penaeus monodon* Nucleopolyhedrovirus (PemoNPV) by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *Mol Cell Probes.* , 241:1-5.
- Muller, D. A., Depelsenaire, A.C.I, Young, P.R., (2017). Clinical and Laboratory Diagnosis of Dengue Virus Infection *The Journal of Infectious Diseases*. Volume 215. Issue suppl\_2. S89–S95, doi:10.1093/infdis/jiw649
- Prommool T, Sethanant P, Phaenthaisong N, Tangthawornchaikul N, Songjaeng A, Avirutnan P, Mairiang, D., Luangaram, P., Srisawat, C., Kasinrer, W., Vasanawathana, S., Sriruksa, K., Limpitikul, W., Malasit, P., Puttikhunt, C. (2021) High performance dengue virus antigen-based serotyping-NS1-ELISA (plus): A simple alternative approach to identify dengue virus serotypes in acute dengue specimens. *PLoS Negl Trop Dis* 15(2): e0009065. doi: 10.1371/journal.pntd.0009065

- Rule, G.S., Montagna, R.A., Durst, R.A. (1996). Rapid method for visual identification of specific DNA sequences based on DNA-tagged liposomes, *Clinical Chemistry*, 42:8, 1206-1209
- Sahni, A.K., Grover, N., Sharma, A., Khan, I.D., Kishore, J. (2013). Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for diagnosis of dengue. *Med J Armed Forces India*, 69(3):246-253.
- Sambrook, J. and Russel, D.W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual vol.1*. 3<sup>rd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, p. 10.2
- Triana, D., Kurniati, A., Wirastari, G.G., (2020). Relationship Between Platelet, Hematocrit and Leukocyte with Dengue Severity in Bengkulu City, Indonesia. *European Journal of Molecular & Clinical Medicine*. Volume 07, Issue 10. pp. 2305-2311
- Whiteford, N., Haslam N., Weber, G., Prugel-Bennett, A., Essex, J.W. (2005). An analysis of the feasibility of short read sequencing. *Nucl Acids Res*. 33(19): e171.
- Wu, S.J., Lee, E.M., Putvatana, R., Shurtliff, R.N., Porter, K.R., Suharyono, W., Watts, D.M., King, C.C., Murphy, G.S., Hayes, C.G., Romano, J.W. (2001). Detection of dengue viral RNA using a nucleic acid sequence-based amplification assay. *J Clin Microbiol.*, 39(8):2794-2798.
- Yong, Y.K., Thayan. R., Chong, H.T., Tan, C.T., Sekaran, S.D. (2007). A simple one-step real-time rt-pcr for diagnosis of dengue virus infection. *Singapore Med J.*, 48(7):662-668.
- Yow, K-S., Aik, J., Tan, E. Y-M., Ng, L-C., Lai, Y-L., (2021). Rapid diagnostic tests for the detection of recent dengue infections: An evaluation of six kits on clinical specimens. *PLoS ONE* 16(4): e0249602. doi: 10.1371/journal.pone.0249602
- Yrad, F.M., Castañares, J.M., Alocilja, E.C., (2019). Visual Detection of Dengue-1 RNA Using Gold Nanoparticle-Based Lateral Flow Biosensor. *Diagnostics*, 9, 74; doi:10.3390/diagnostics9030074

## Pemodelan Epidemiologi Kejadian *Multidrug Resistance* Bakteri *Escherichia coli* pada Peternakan Ayam Komersial di Kabupaten Blitar

### *Modeling Epidemiology of Escherichia coli Multidrug Resistance in Commercial Chicken Farms, Blitar District*

Freshinta Jellia Wibisono<sup>1</sup>, Bambang Sumiarto<sup>2\*</sup>, Tri Untari<sup>3</sup>, Mustofa Helmi Effendi<sup>4,5</sup>, Dian Ayu Permatasari<sup>5</sup>,  
Adiana Mutamsari Witaningrum<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Program Doktor Sains Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

<sup>2</sup>Departemen Kesehatan Masyarakat Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

<sup>3</sup>Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

<sup>4</sup>Halal Research Center, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

<sup>5</sup> Departemen Kesehatan Masyarakat Veteriner, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

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

Naskah diterima: 2 Desember 2019, direvisi: 28 Februari 2020, disetujui: 4 Maret 2021

#### Abstract

The nature of *Escherichia coli*'s resistance to antibiotics results in limited treatment options. Further development of bacterial resistance can lead to the emergence of multidrug resistance, there by increasing morbidity and mortality. The interaction of the spread of multidrug resistance *Escherichia coli* that occur in populations is very complex, so it is difficult to understand the dynamics of large-scale spread. The modeling approach becomes very important for decision making for disease control programs. This research is a descriptive analytic epidemiological study with a cross-sectional design. Sampling was conducted by stratified random sampling with a total sample of 73 farms. Data analysis uses linear regression analysis. The results of the distribution cases of multidrug resistance *Escherichia coli* in commercial chicken farms, Blitar District showed a prevalence of 95.9%. Risk factor correlations showed that chicken species, breeders education, breed types, feed types, veterinary support, chlorine in water, antibiotic programs, and antibiotic references were significant risk factors correlated with the incidence of *Escherichia coli* multidrug resistance. Linear regression modeling shows  $Y=0.52+0.15\text{NonPddkPT}+0.19\text{JUMitra}-0.15\text{SaniKan}+0.15\text{ProgAb}$ , with wilk saphiro  $W=0.9701$ . The equation model can be a reference in efforts to prevent and control the prevalence of *Escherichia coli* multidrug resistance in commercial chicken farms. Animal husbandry management and antibiotic use programs as disease prevention need to be aware, because it is a risk factor that can increase the prevalence of *Escherichia coli* multidrug resistance in commercial chicken farms, while sanitary cage hygiene needs to be improved because it can reduce or prevent the prevalence of *Escherichia coli* multidrug resistance in commercial chicken farms.

**Keywords:** Commercial Chicken farms; *Escherichia coli*; Modeling; Multidrug resistance

#### Abstrak

Sifat resistensi *Escherichia coli* terhadap antibiotik mengakibatkan terbatasnya pilihan pengobatan. Perkembangan lebih lanjut dari resistensi bakteri dapat menyebabkan munculnya *multidrug resistance*, sehingga meningkatkan morbiditas dan mortalitas penyakit. Interaksi penyebaran

kejadian *multidrug resistance Escherichia coli* yang terjadi pada populasi sangat kompleks, sehingga sulit memahami dinamika penyebaran berskala besar. Pendekatan pemodelan menjadi sangat penting untuk pengambilan keputusan program pengendalian penyakit. Penelitian ini merupakan penelitian epidemiologi deskriptif analitik dengan desain kajian potong lintang. Pengambilan sampel dilakukan secara *stratified random sampling* dengan jumlah sampel sebesar 73 peternakan. Analisis data menggunakan analisis linier regresi. Hasil distribusi kasus kejadian *multidrug resistance Escherichia coli* pada peternakan ayam komersial di Kabupaten Blitar menunjukkan prevalensi sebesar 95.9%. Korelasi faktor risiko menunjukkan bahwa spesies ayam, pendidikan, jenis peternakan, jenis pakan, dukungan dokter hewan, klorin pada air, program antibiotik, dan referensi pemberian antibiotik merupakan faktor risiko yang signifikan berkorelasi terhadap kejadian *multidrug resistance Escherichia coli*. Pemodelan regresi linier menunjukkan  $Y=0.52+0.15\text{NonPddkPT}+0.19\text{JUMitra}-0.15\text{SaniKan}+0.15\text{ProgAb}$ , dengan *wilk saphiro*  $W=0,9701$ . Model persamaan dapat menjadi acuan dalam upaya pencegahan dan pengendalian kejadian *multidrug resistance Escherichia coli* pada peternakan ayam komersial. Manajemen pemeliharaan ternak dan program penggunaan antibiotik sebagai pencegahan penyakit perlu diwaspadai, karena menjadi faktor risiko yang mampu meningkatkan kejadian *multidrug resistance Escherichia coli* pada peternakan ayam komersial, sedangkan sanitasi kebersihan kandang perlu ditingkatkan karena mampu menurunkan atau mencegah kejadian *multidrug resistance* bakteri *Escherichia coli* pada peternakan ayam komersial.

**Kata kunci:** *Escherichia coli*; Modeling; *Multidrug resistance*; Peternakan ayam komersial

## Pendahuluan

Ayam komersial merupakan salah satu reservoir penting dari agen bakterial (Suardana *et al.*, 2014). Mikroorganisme patogen dapat menyebabkan berbagai macam penyakit infeksi. Kejadian penyakit infeksi yang tinggi menyebabkan penggunaan antibiotik masih paling dominan (Noor and Poeloenga, 2014), dengan penggunaan antibiotik di sektor hewan mencapai 80% (WHO, 2017). Sifat resistensi pada bakteri *Escherichia coli* terhadap antibiotik mengakibatkan terbatasnya pilihan pengobatan pada penyakit infeksi (Sudarwanto *et al.*, 2016). Resistensi bakteri terhadap antibiotik menyebabkan penurunan kemampuan antibiotik dalam fungsinya sebagai terapi pengobatan penyakit infeksi. Perkembangan lebih lanjut dari resistensi bakteri dapat menyebabkan munculnya *multidrug resistance* pada bakteri, sehingga menyebabkan kenaikan biaya pengobatan, meningkatkan fatalitas, morbiditas dan mortalitas penyakit (Kurniawati *et al.*, 2015).

Interaksi penyebaran atau hubungan timbal balik antara faktor risiko dengan kejadian *multidrug resistance* pada *Escherichia coli* yang terjadi pada populasi sangat kompleks, sehingga sulit memahami dinamika penyebaran berskala besar. Pemodelan matematika merupakan proses

untuk membangun suatu model matematika dalam menggambarkan dinamika perubahan dari suatu sistem. Model matematika ini dapat diaplikasikan ke dalam berbagai bidang, salah satunya dalam bidang epidemiologi. Pemodelan matematika dapat memberikan informasi mengenai suatu kejadian. Informasi dapat berupa laju penyebaran, sehingga memiliki informasi yang cukup mengenai perkiraan kejadian dapat menyebar dalam suatu populasi (Syah *et al.*, 2011). Pemodelan matematika pada penyebaran kejadian dapat menjadi bagian dari pengambilan keputusan kebijakan epidemiologi, sebagai upaya untuk pencegahan penyebaran yang lebih luas lagi. Pencegahan meluasnya bakteri resisten di peternakan ayam komersial, penting dilakukan dalam upaya untuk mewaspadai peningkatan resistensi antibiotik di peternakan ayam komersial yang berpotensi menyebar ke kesehatan manusia maupun lingkungan sekitar. Pendekatan pemodelan menjadi sangat penting untuk pengambilan keputusan tentang program pengendalian penyakit infeksi (Djafri, 2015). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pemodelan pada penyebaran kejadian *multidrug resistance* bakteri *Escherichia coli* di peternakan ayam komersial, Kabupaten Blitar, sehingga dapat dilakukan tindakan pencegahan dan pengendalian pada faktor risiko



yang berpengaruh pada munculnya kejadian *multidrug resistance* bakteri *Escherichia coli* di peternakan ayam komersial.

### Materi dan Metode

Penelitian ini merupakan penelitian epidemiologi deskriptif analitik dengan desain kajian potong lintang (*cross-sectional study*). Kajian Potong lintang adalah kajian epidemiologi yang mempelajari prevalensi, distribusi, maupun hubungan penyakit dan paparan dengan mengamati status paparan, penyakit atau outcome lain secara serentak pada ternak dari suatu populasi pada suatu saat (Sumiarto and Budiharta, 2018). Pengambilan sampel secara *stratified random sampling* dengan besaran sampel menggunakan rumus  $n = 4PQ / L^2$ . keterangan : n merupakan besaran sampel yang digunakan, P merupakan prevalensi, Q merupakan (1-P) dan L adalah galat yang diinginkan (Martin et al., 1987). Perhitungan *design effect* perlu dilakukan untuk mengkoreksi agar tidak menimbulkan bias yang besar pada pengambilan sampling tahapan ganda dan kluster (Sumiarto and Budiharta, 2018) sehingga diperoleh 365 sampel swab kloaka, dengan 5 ekor setiap peternakan sehingga terdapat 73 peternakan ayam komersial yang digunakan sebagai sampel pada penelitian ini. Penelitian di mulai bulan Maret sampai September 2019. Pengumpulan data pelengkap berupa data peternak, manajemen peternakan, dan observasi lapangan disekitar peternakan dilakukan saat pengambilan sampel melalui wawancara dan pengisian kuesioner oleh peternak. Data kemudian dianalisis dengan analisis linier regresi menggunakan *statistix9* (*Analytical software*).

Variabel *dependent* pada penelitian ini adalah proporsi kejadian *multidrug resistance* pada peternakan ayam komersial di Kabupaten Blitar. Pengujian *multidrug resistance* pada sampel swab kloaka dilakukan dengan menggunakan uji kepekaan antibiotik pada agar *Mueller-Hinton* (Merck, Jerman), sesuai rekomendasi dari *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI) menggunakan 5 macam golongan antibiotik yang berbeda, antara lain golongan beta lactam antibiotik ampicillin 10µg (Oxoid, England), golongan aminoglikosida antibiotik streptomycin 10µg (Oxoid, England),

golongan makrolida antibiotik erythromycin 15µg (Oxoid, England), golongan tetrasiklin antibiotik tetracycline 30 µg (Oxoid, England), dan golongan sulfonamide antibiotik sulphamethoxazole-trimethoprim 25µg (Oxoid, England). Hasil evaluasi menunjukkan adanya zona hambat yang muncul pada cawan diinterpretasi berdasarkan panduan CLSI yaitu sensitif, intermediat, resisten (CLSI, 2017; Effendi et al., 2018). Variabel *independent* pada penelitian ini antara lain spesies ternak (broiler), jenis usaha (JUMitra), pakan (PakRacik), dukungan dokter hewan (Dukudrh), sanitasi kandang (SaniKan), pemberian klorin pada air minum (Tritklor), pengendapan pada air minum (Tritendap), program pemberian antibiotik (ProgAb), penggunaan kombinasi antibiotik (AbKombi), serta pengambil keputusan penggunaan antibiotik (Refdrh, Reftmn, dan RefTS). Variabel *independent* merupakan variabel faktor risiko yang secara signifikan mempengaruhi variabel *dependent*.

### Hasil dan Pembahasan

#### Distribusi kasus dan faktor risiko kejadian *multidrug resistance Escherichia coli*

Resistensi antibiotik terhadap bakteri *coli* pada tingkat peternakan ayam di Kabupaten Blitar menunjukkan prevalensi yang cukup tinggi sekitar 90 – 100%, hampir semua peternakan ayam di Kabupaten Blitar mengalami resistensi terhadap antibiotik. Resistensi di tingkat peternakan di Kabupaten Blitar (Tabel 1) menunjukkan angka tertinggi sebesar 98.6% pada antibiotik ampicillin dan erythromycin, 95.9% pada antibiotik streptomycin, dan sebesar 93.2% pada antibiotik tetracycline dan sulfamethoxazole-trimethoprim. Resistensi antibiotik di peternakan ayam secara keseluruhan menunjukkan prevalensi 100% di Kecamatan Udanawu, Bakung, Talun, dan Garum, sedangkan di kecamatan Ponggok, Srengat, dan Kademangan memiliki variasi tingkat prevalensi antara 75 – 100%. Antibiotik ditambahkan dalam pakan ayam di peternakan ayam komersial untuk mencegah dan mengobati penyakit *colibacillosis* maupun *staphylococcosis*. Pemakaian AGP (antibiotic growth promoters) dapat meningkatkan prevalensi resistensi bakteri dan

Tabel 1. Resistensi *Escherichia coli* terhadap antibiotik pada peternakan ayam komersial di Kabupaten Blitar

Kecamatan	Peternakan (n = 73)	Tingkat resistensi									
		AMP		S		E		TE		SXT	
		R	%	R	%	R	%	R	%	R	%
Ponggok	20	20	100	18	90	19	95	19	95	20	100
Srengat	23	22	95.6	22	95.6	23	100	20	86.9	18	78.3
Kademangan	8	8	100	8	100	8	100	7	87.5	8	100
Udanawu	6	6	100	6	100	6	100	6	100	6	100
Bakung	4	4	100	4	100	4	100	4	100	4	100
Talun	8	8	100	8	100	8	100	8	100	8	100
Garum	4	4	100	4	100	4	100	4	100	4	100
Total	73	72	98.6	70	95.9	72	98.6	68	93.2	68	93.2

Keterangan: R (Resistant), Antibiotik Ampicillin (AMP), Streptomycin (S), Erythromycin (E), Tetracycline (TE), dan Sulfamethoxazole-Trimethoprim (SXT).

meninggalkan residu antibiotik pada produk asal ternak (Noor and Poeloenga, 2014; Etikaningrum and Iwantoro, 2017). Antibiotik yang sering digunakan dalam bidang peternakan ayam meliputi beta lactam, tetrasiklin, sulfonamide, trimethoprim, bacitracin, erytromycine, neomycin, nystatin, oxytetracycline, dan streptomycin, (Purnami, 2000; Noor and Poeloenga, 2014; Rugumisa *et al.*, 2016).

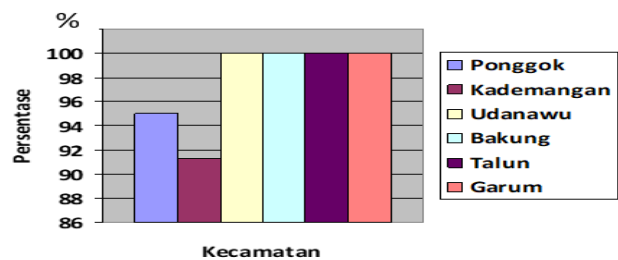
Distribusi kasus kejadian *multidrug resistance* bakteri *Escherichia coli* pada peternakan ayam komersial di Kabupaten Blitar menunjukkan prevalensi kejadian sebesar 95.9% (Tabel 2). Hasil ini sesuai dengan kejadian resistensi antibiotik pada peternakan ayam broiler sebesar 93.2% di Kabupaten Subang (Niasono *et al.*, 2019). Bakteri *Escherichia coli* merupakan bakteri yang secara alami terdapat dalam sistem pencernaan manusia dan hewan, namun fenomena resistensi bakteri *Escherichia coli* ini terjadi karena adanya tekanan selektif antibiotik untuk menghambat pertumbuhan bakteri yang diberikan secara terus menerus (Lestari and Severin, 2009). *Escherichia coli* sebagai bakteri komensal yang bersifat *multidrug resistance* menjadi masalah kesehatan karena *Escherichia coli* mampu men-transfer gen resisten ke bakteri patogen lain dalam saluran cerna (Masruroh *et al.*, 2016). *Multidrug resistance* adalah resistensi terhadap tiga atau lebih golongan antimikroba yang berbeda (Handayani *et al.*, 2017). Berdasarkan penelitian terdahulu terdapat kejadian resistensi terhadap antibiotik yaitu 93.7% (ampisilin), 75% (streptomisin), 68.75% (eritromisin), 62.5% (sulfametoksazol), dan 18.75% (doksisisiklin), hasil tersebut menunjukkan bahwa *Escherichia*

*coli* bersifat *multidrug resistance* (Masruroh *et al.*, 2016).

Tabel 2. Kejadian *multidrug resistance* bakteri *Escherichia coli* pada peternakan ayam komersial di Kabupaten Blitar

Kecamatan	Peternakan (n = 73)	<i>Multidrug resistance</i>	
		Jumlah	%
Ponggok	20	19	95
Srengat	23	21	91.3
Kademangan	8	8	100
Udanawu	6	6	100
Bakung	4	4	100
Talun	8	8	100
Garum	4	4	100
Total	73	70	95.9

Penyebaran kejadian *Multidrug Resistance* bakteri *Escherichia coli* pada peternakan ayam komersial di Kabupaten Blitar (Gambar 1) menunjukkan di Kecamatan Kademangan, Udanawu, Bakung, Talun, dan Garum sebesar 100%, sedangkan di Kecamatan Ponggok dan Srengat masing masing sebesar 95 % dan 91.3%. Keberagaman jenis antibiotik yang digunakan di peternakan, perbedaan geografis letak peternakan, dan sistem produksi unggas yang beragam memberikan perbedaan pada pola resistensi terhadap antibiotik (Bywater *et al.*, 2004).



Gambar 1. Kejadian *Multidrug Resistance* bakteri *Escherichia coli* pada peternakan ayam komersial di Kabupaten Blitar

Frekuensi distribusi variabel faktor risiko (Tabel 3), menunjukkan data demografi peternak, sebanyak 53 responden adalah peternak berjenis kelamin laki laki (72,6%), dengan latar belakang pendidikan sebagian besar adalah SMA (58,9%). Aspek manajemen pemeliharaan ternak menunjukkan bahwa pada praktik peternakan ayam komersial di Kabupaten Blitar kurang (28,8 %) memiliki dukungan dari dokter hewan dalam pemeliharaan ternaknya. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa pada peternakan ayam broiler hanya sekitar 24% yang memiliki dukungan dokter hewan di lingkungan peternakannya (Niasono, 2019). Peternakan ayam komersial di Kabupaten Blitar yang menjalankan usaha peternakan dengan melibatkan peran dokter hewan dalam pengawasan kesehatan ternaknya masih dalam jumlah yang kecil, hal ini dapat disebabkan jumlah dokter hewan yang masih belum

memenuhi seluruh cakupan wilayah sehingga menjadi salah satu faktor dalam kurangnya peran dokter hewan dalam pengawasan peternakan ayam komersial terutama dalam pengawasan penggunaan antibiotik. Kurangnya pelayanan dokter hewan di peternakan ayam komersial dan adanya kemudahan akses mendapatkan antibiotik, serta peternak tidak ingin mengalami kerugian menjadikan salah satu faktor penyebab penggunaan antibiotik secara tidak rasional sebagai pencegahan (52,1 %) dipeternakan. Peningkatan intervensi serta adanya kebijakan diperlukan untuk mengurangi penyalahgunaan penggunaan antibiotik di peternakan. Intervensi perilaku pada peternak seperti edukasi, penyuluhan, atau peningkatan dukungan oleh dokter hewan, sehingga mengurangi penggunaan antibiotik pada hewan (Di Martino *et al.*, 2019).

Korelasi merupakan salah satu teknik analisis statistik yang sering digunakan. Analisis korelasi memiliki istilah data penyebab

Tabel 3. Frekuensi distribusi dan Korelasi variabel faktor risiko terhadap kejadian *multidrug resistance* bakteri *Escherichia coli* di peternakan ayam komersial

Kriteria	Variabel	Kode	Freskuensi distribusi	p-value
Spesies ayam	1. Layer		56,2% (41/73)	0.0017*
	2. Broiler		43,8% (32/73)	
Pendidikan	1. Sekolah Dasar	PddkSD	8,2% (6/73)	0.3193
	2. Sekolah Menengah Pertama	PddkSMP	0% (0/73)	-
	3. Sekolah Menengah Atas	PddkSMA	58,9% (43/73)	0.0599*
	4. Perguruan Tinggi	PddkPT	32,9% (24/73)	0.0097*
Jenis Usaha	1. Mandiri	JUMandiri	75,3% (55/73)	0.0002*
	2. Kemitraan	JUMitra	24,7% (18/73)	
Pakan	1. Pakan Pabrik	PakPabrik	58,9% (43/73)	0.0554*
	2. Pakan Racik	PakRacik	41,1% (30/73)	
Dukungan drh	1. Ada	Dukudrh	28,8% (21/73)	0.0014*
	2. Tidak	NonDukudrh	71,2% (52/73)	
Sanitasi Kandang	1. Bersih	SaniKan	43,8% (32/73)	0.0145*
	2. Kurang			
Klorin pada air minum	1. Ada	Tritklor	47,9% (35/73)	0.0568*
	2. Tidak			
Pengendapan air minum	1. Ada	Tritendap	45,2% (33/73)	0.2443
	2. Tidak			
Program antibiotik	1. Ada	ProgAb	76,7% (56/73)	0.0008*
	2. Tidak			
Rotasi antibiotik	1. Ada	RotasiAb	41,1% (30/73)	0.6105
	2. Tidak			
Penggunaan antibiotik	1. Pencegahan	UseCegah	52,1% (38/73)	0.7438
	2. Pengobatan	UseObati	47,9% (35/73)	
Antibiotik kombinasi	1. Ada	AbKombi	49,3% (36/73)	0.1995
	2. Tidak			
Pengambil keputusan penggunaan antibiotik	1. Dokter Hewan	Refdrh	19,2% (14/73)	0.0355*
	2. Teman	Reftmn	2,7% (2/73)	0.0481*
	3. Pengalaman sendiri	Refdiri	53,4% (39/73)	0.4114
	4. <i>Technical Service</i>	RefTS	24,7% (18/73)	0.0002*

Keterangan : (\*) signifikan  $p < 0,05$

dan data akibat. Data penyebab atau data yang mempengaruhi disebut variabel bebas (*independent*) dengan lambing X dan data akibat atau data yang dipengaruhi disebut variabel terikat (*dependent*) dengan lambing Y. Korelasi pearson digunakan untuk menyatakan ada atau tidaknya hubungan yang signifikan antara variabel satu dengan yang lainnya (Usman and Akbar, 2006). Korelasi faktor risiko kejadian *multidrug resistance* bakteri *Escherichia coli* di peternakan ayam komersial (Tabel 3) menunjukkan bahwa faktor risiko spesies ayam, pendidikan peternak, jenis usaha peternakan, jenis pakan, dukungan dokter hewan pada pemeliharaan ternak, pemberian klorin pada air minum, adanya program antibiotik, dan referensi penggunaan antibiotik merupakan faktor risiko yang secara signifikan berkorelasi terhadap kejadian *multidrug resistance* bakteri *Escherichia coli* di peternakan ayam komersial.

**Pemodelan kejadian *Multidrug resistance* bakteri *Escherichia coli***

Hasil pemodelan kejadian *multidrug resistance* bakteri *Escherichia coli* pada peternakan ayam komersial menggunakan analisis multivariat dengan analisis regresi linier metode stepwise karena variabel *dependent* pada analisis ini berupa proporsi kejadian *multidrug resistance* bakteri *Escherichia coli* pada peternakan ayam komersial. Variabel *independent* merupakan faktor risiko yang berkorelasi terhadap kejadian kejadian *multidrug resistance* bakteri *Escherichia coli* pada peternakan ayam komersial di Kabupaten Blitar. Hasil model *stepwise regression* menunjukkan variabel yang berpengaruh adalah variabel pendidikan (NonPddkPT), jenis usaha peternakan (JUMitra), program pemberian antibiotik (ProgAb), dan sanitasi kebersihan kandang (SaniKan). Hasil dari variabel terpilih

tersebut kemudian dimasukkan sebagai variabel *independent* pada regresi linier.

Hasil analisis (Tabel 4) menghasilkan persamaan model regresi linier kejadian *multidrug resistance* bakteri *Escherichia coli* pada peternakan ayam komersial  $(Y) = 0.52018 + 0.14839 \text{ NonPddkPT} + 0.19412 \text{ JUMitra} - 0.14570 \text{ SaniKan} + 0.15203 \text{ ProgAb}$ . Model ini memiliki *wilk saphiro* mendekati 1 ( $W = 0,9701$ ) dengan nilai signifikan ( $p = 0,0803$ ) sehingga model persamaan ini merupakan model yang baik untuk kejadian *multidrug resistance* bakteri *Escherichia coli* peternakan ayam komersial di Kabupaten Blitar. Berdasarkan persamaan tersebut dapat kemukakan bahwa nilai persamaan regresi mempunyai tanda positif dan negatif (+/-) yang artinya terdapat hubungan positif atau meningkatkan kejadian *multidrug resistance* bakteri *Escherichia coli* peternakan ayam komersial pada variabel pendidikan peternak selain Perguruan Tinggi, jenis usaha kemitraan, dan adanya program pemberian antibiotik, sedangkan variabel sanitasi kebersihan kandang memiliki hubungan negatif atau mencegah kejadian *multidrug resistance* bakteri *Escherichia coli* peternakan ayam komersial. Peningkatan nilai variabel *independent* akan meningkatkan variabel *dependent*, variabel pendidikan peternak selain Perguruan tinggi mampu meningkatkan kejadian *multidrug resistance* bakteri *Escherichia coli* peternakan ayam komersial sebesar 0.14839, variabel jenis usaha peternakan mampu meningkatkan sebesar 0.19412, variabel program pemberian antibiotik mampu meningkatkan sebesar 0.15203, sedangkan variabel sanitasi kebersihan kandang mampu mencegah kejadian *multidrug resistance* bakteri *Escherichia coli* peternakan ayam komersial sebesar 0.14570.

Tingkat pendidikan peternak dapat mempengaruhi pola berpikir yang akan berpengaruh pada luasnya wawasan dan kemampuan peternak sehingga akan meningkatkan pola pemeliharaan peternakan. Jenis usaha kemitraan mendominasi pada peternakan ayam broiler, sedangkan pada peternakan ayam layer didominasi oleh jenis usaha peternakan mandiri. Inti kemitraan memberikan bantuan serta menanggung biaya operasional selama periode pemeliharaan ternak ayam, mulai dari biaya pakan sampai dengan biaya obat

Tabel 4. Pemodelan kejadian *multidrug resistance* bakteri *Escherichia coli* pada peternakan ayam komersial di Kabupaten Blitar

Variabel	Koefisien	P
Constant	0.52018	0.0000
NonPddkPT	0.14839	0.0173
JUMitra	0.19412	0.0065
SaniKan	-0.14570	0.0131
ProgAb	0.15203	0.0341

obatan. Peternakan kemitraan memiliki rencana pemeliharaan dari inti kemitraan, sehingga pada peternakan kemitraan sebagian besar memiliki rencana program pemberian antibiotik. Aspek pemberian antibiotik pada ternak menunjukkan bahwa sebagian besar peternak ayam komersial (76,7%), terdapat adanya program pemberian antibiotik secara periodik pada ternak, dengan tujuan penggunaan antibiotik sebagai pencegahan penyakit (52,1%). Hasil penelitian sesuai dengan penelitian pada peternakan ayam broiler yang menunjukkan terdapat 89% peternakan ayam broiler memiliki rencana penggunaan antibiotik dan terdapat 81% menggunakan antibiotik sebagai pencegahan (Niasono, 2019).

Perunggasan secara umum menggunakan antibiotik untuk meningkatkan performa produksi melalui perbaikan konversi pakan, meningkatkan pertumbuhan dan mencegah penyakit terutama kontrol infeksi saluran cerna (Mehdi *et al.*, 2018). Peternak memprioritaskan peningkatan produktivitas ternak dengan menggunakan antibiotik sebagai pencegahan penyakit, sehingga menyebabkan peningkatan kejadian resistensi antibiotik (Bellet, 2018). Perpaduan faktor risiko yang menyebabkan peluang tingginya resistensi antibiotik yaitu seperti kurangnya profesional kesehatan (dukungan dokter hewan), pendidikan peternak, penjualan obat-obatan, penjualan antibiotik tanpa resep, dosis yang tidak tepat, penggunaan antibiotik spektrum luas, dan mudahnya aksesibilitas antibiotik yang dijual bebas (Mouhieddine *et al.*, 2015).

### Kesimpulan

Distribusi kasus kejadian *multidrug resistance* pada peternakan ayam komersial di Kabupaten Blitar menunjukkan prevalensi sebesar 95.9%. Pemodelan kejadian *multidrug resistance* bakteri *Escherichia coli* pada peternakan ayam komersial menghasilkan model regresi linier dengan faktor risiko yang menyebabkan kejadian *multidrug resistance* pada peternakan ayam komersial yaitu faktor risiko pendidikan peternak, jenis usaha peternakan kemitraan, adanya program pemberian antibiotik pada peternakan, dan sanitasi kebersihan kandang.

### Daftar Pustaka

- Bellet, C. (2018). Drug resistance and the dynamics of livestock farm practices. *Journal of Rural Studies*. 63: 57–64.
- Bywater, R., Deluyker, H., Deroover, E., de Jong, A., Marion, H., McConville, M., Rowan, T., Shryock, T., Shuster, D., Thomas, V., Vallé, M., and Walters, J. (2004). A European survey of antimicrobial susceptibility among zoonotic and commensal bacteria isolated from food-producing animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 54:744–754.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2017). M100 Performance Standards for Antimicrobial. 27th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, USA. from: [www.clsi.org](http://www.clsi.org)
- Djafri, D. (2015). Pemodelan Epidemiologi Penyakit Menular. *Jurnal Kesehatan Masyarakat Andalas*. 10: 1–2.
- Effendi, M.H., Bintari, I.G., Aksoro, E.B., and Hermawan, I.P. (2018). Detection of blaTem gene of *Klebsiella pneumoniae* Isolated from swab of food-producing animals in East Java. *Tropical Animal Science Journal*. 41: 174–178.
- Etikaningrum, and Iwantoro, S. (2017). Kajian residu antibiotika pada produk ternak unggas di Indonesia. *Jurnal Ilmu Produksi dan Teknologi Hasil Peternakan*. 05:29–33.
- Handayani, R. S., Siahaan, S., and Herman, M. J. (2017). Resistensi antimikroba dan penerapan kebijakan pengendalian di Rumah Sakit di Indonesia. *Jurnal penelitian dan pengembangan pelayanan kesehatan*. 1:131–140.
- Kurniawati, A.F., Satyabakti, P., and Arbianti, N. (2015). Perbedaan risiko *multidrug resistance organisms* (MDROS) menurut faktor risiko dan kepatuhan *hand hygiene*. *Jurnal Berkala Epidemiologi*. 3: 277–289.
- Lestari, E. S., and Severin, J. A. (2009). Antimicrobial resistance in Indonesia: prevalence, determinants and genetic basis. Erasmus MC: University Medical

- Center Rotterdam. Thesis. Available from: <https://repub.eur.nl/pub/17713/>
- Martin, S.W., Meek, A.H., and Willeberg, P. (1987). *Veterinary epidemiology principles and methods*. First edit. Iowa State University Press, Ames, United States of America.
- Di Martino, G., Crovato, S., Pinto, A., Dorotea, T., Mascarello, G., Brunetta, R., Agnoletti, F., and Bonfanti, L. (2019). Farmers attitudes towards antimicrobial use and awareness of antimicrobial resistance: a comparative study among turkey and rabbit farmers. *Italian Journal of Animal Science*. 18: 194–201.
- Masruroh, C. A., Sudarwanto, M. B., and Latif, H. (2016). Tingkat kejadian *Escherichia coli* penghasil Extended Spectrum Beta-Lactamase yang diisolasi dari feses broiler di Kota Bogor. *Jurnal Sain Veteriner*. 34:42–49.
- Mehdi, Y., Létourneau-Montminy, M.P., Lou Gaucher, M., Chorfi, Y., Suresh, G., Rouissi, T., Brar, S.K., Côté, C., Ramirez, A.A., and Godbout, S. (2018). Use of antibiotics in broiler production: Global impacts and alternatives. *Animal Nutrition*. 4: 170–178.
- Mouhieddine, T.H., Olleik, Z., Itani, M.M., Kawtharani, S., Nassar, H., Hassoun, R., Houmani, Z., El Zein, Z., Fakih, R., Mortada, I.K., Mohsen, Y., Kanafani, Z., and Tamim, H. (2015). Assessing the lebanese population for their knowledge, attitudes and practices of antibiotic usage. *Journal of Infection and Public Health*. 8: 20–31.
- Niasono, A.B. (2019). Resistensi antibiotik terhadap *Escherichia coli* yang diisolasi dari peternakan ayam broiler di Kabupaten Subang. Institut Pertanian Bogor. Thesis
- Niasono, A.B., Latif, H., and Purnawarman, T. (2019). Resistensi antibiotik terhadap bakteri *Escherichia coli* yang diisolasi dari peternakan ayam pedaging di Kabupaten Subang, Jawa Barat. *Jurnal Veteriner*. 20: 187–195.
- Noor, S.M., and Poeloenga, M. (2014). Pemakaian antibiotika pada ternak. *Lokakarya Nasional Keamanan Pangan Produk Peternakan*. 56–64.
- Purnami. 2000. Kumpulan makalah program pendidikan profesi dokter hewan Laboratorium kesmavet Fakultas kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Rugumisa, B. T., Call, D. R., Mwanyika, G. O., Mrutu, R. I., Luanda, C. M., Lyimo, B. M., Subbiah, M., and Buza, J. J. (2016). Prevalence of antibiotic-resistant fecal *Escherichia coli* isolates from penned broiler and scavenging local chickens in Arusha, Tanzania. *Journal of Food Protection*. 79:1424–1429.
- Suardana, I.W., Utama, I.H., Putriningsih, P.A.S., and Rudyanto, M.D. (2014). Uji kepekaan antibiotika isolat *Escherichia coli* O157: H7 asal feses ayam. *Buletin Veteriner Udayana*. 6: 19–27.
- Sudarwanto, M.B., Lukman, D.W., Latif, H., Pisestyani, H., Sukmawinata, E., Akineden, Ö., and Usleber, E. (2016). CTX-M producing *Escherichia coli* isolated from cattle feces in Bogor slaughterhouse, Indonesia. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 6: 605–608.
- Sumiarto, B., and Budiharta, S. (2018). *Epidemiologi veteriner analitik*. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Syah, S.P., Widyastuti, W., and Gustiar, R. (2011). Modeling dalam Epidemiologi. from: <https://www.scribd.com/doc/58601435/Modeling-dalam-Epidemiologi>
- Usman, H., and Akbar, P.S. (2006). *Pengantar statistika edisi kedua*. Bumi aksara, Yogyakarta.
- World Health Organization. (2017). Stop using antibiotics in healthy animals to prevent the spread of antibiotic resistance. from: <http://www.who.int/news-room/detail/07-11-2017-stop-using-antibiotics-in-healthy-animals-to-prevent-the-spread-of-antibiotic-resistance>

## **Analisis Kualitas Daging Ayam Broiler Asal Pasar Swalayan dan Pasar Tradisional di Kota Medan Sumatera Utara**

### ***Analysis of The Quality of Broiler Chicken From Modern and Traditional Market in Medan, North Sumatera***

**Angelina Susanty<sup>1\*</sup>, Dhirgo Adji<sup>2</sup>, Ma'ruf Tafsin<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Fakultas Pertanian, Universitas Sumatera Utara, Medan,

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

\*Email: [angelinasusanty@live.com](mailto:angelinasusanty@live.com)

Naskah diterima: 20 Februari 2020, direvisi: 30 September 2021, disetujui: 30 Oktober 2021

#### **Abstract**

Broiler chicken is one of the largest contributors of animal protein from livestock and is a leading commodity in Indonesia. Currently, the broiler chicken industry has grown rapidly and has become the largest contributor of animal protein and the main source of consumer menus which are very easy to obtain in both modern and traditional markets. After reaching the population of broiler chickens, government policies began to emphasize on improving the quality of meat by changing the characteristics of the meat such as appearance, texture, moisture content, firmness, tenderness, smell, taste and the nutritional content in it is no exception. Thirty-two samples of broiler chicken meat consisting of 16 meat samples purchased from 4 modern markets and 16 samples purchased from 4 traditional markets were used as research objects. Thirty-two samples of broiler chicken consisting of 16 samples purchased from 4 supermarkets and 16 samples purchased from 4 traditional markets were used as research objects. Each fresh 100 grams sample was purchased and immediately packed in aluminum foil, packed in a cooler box then sent to the Food and Nutrition Laboratory, Inter-University Center, Gadjah Mada University for proximate analysis. The results of the examination of water concentration showed that the average of water content of thigh meat from supermarkets was  $76.26 \pm 0.86$  %; supermarket breast meat  $74.135 \pm 0.92$  %; thigh meat from the traditional market  $75 \pm 0.56$  % and breast meat from the traditional market:  $75.64 \pm 1.044$  %. Analysis of the average levels of the ash concentration respectively: thighs from the supermarket  $0.96 \pm 0.027$  %, chest from the supermarket  $1.095 \pm 0.05$  %, thighs from the traditional market  $1.034 \pm 0.106$  % and breasts from the traditional market  $1.155 \pm 0.11$ %. The average of carbohydrate levels were consecutive: Thighs meat from the supermarket:  $5.6 \pm 1.33$  %; chest of origin of the supermarket:  $6.7 \pm 1.078$  %; Thighs from traditional markets  $4.5 \pm 0.60$  % and chest from traditional markets from  $5.3 \pm 0.69$  %. The Average of fat content of broiler meat in the thigh, from supermarket:  $2.56 \pm 0.63$  %; chest origin supermarket  $1.2 \pm 0.5$  %; thigh meat from traditional markets:  $3.15 \pm 0.21$  % and breast meat from traditional markets:  $1.8 \pm 0.227$  %. The mean protein content in broiler chickens from high to low were respectively protein in breast meat from supermarkets:  $16.83 \pm 0.42$  %; breasts from the traditional market:  $15.63 \pm 1.09$  %, thighs from the supermarket:  $14.5 \pm 0.57$  % and thighs from the traditional market:  $13.6 \pm 0.38$  gr / 100 %. Based on all of the data collection, the result of statistical analysis using a 2x2 factorial pattern showed that there were no significant differences of water content ( $P > 0.05$ ) whereas: the ash, carbohydrates, fats and proteins showed significant ( $P \leq 0.05$ ). Based on all of the results it can be concluded that chicken meat from supermarket was better quality than chicken meat from traditional market

**Keywords:** ash content; broiler; carbohydrate content; fat content; meat, protein content; water content

## Abstrak

Ayam broiler, merupakan salah satu penyumbang terbesar protein hewani asal ternak dan merupakan komoditas unggulan di Indonesia. Saat ini, industri ayam broiler telah berkembang pesat dan menjadi penyumbang terbesar protein hewani maupun sumber utama menu konsumen yang sangat mudah diperoleh baik di pasar modern maupun tradisional. Setelah tercapainya jumlah populasi ayam broiler, kebijakan pemerintah mulai ditekankan pada peningkatan kualitas daging dengan mengubah karakteristik daging seperti halnya penampilan, tekstur, kadar air, kekencangan, kelembutan, bau, rasa dan tidak terkecuali kandungan nutrisi di dalamnya. Tiga puluh dua sampel daging ayam broiler yang terdiri dari 16 sampel daging dibeli dari 4 supermarket dan 16 sampel yang dibeli dari 4 pasar tradisional dipergunakan menjadi obyek penelitian. Masing masing sampel seberat 100 gram segar dibeli dan langsung dikemas dalam aluminium foil, dikemas dalam kotak dengan pendingin selanjutnya dikirim ke Laboratorium Pangan dan Gizi, Pusat Antar Universitas, Universitas Gadjah Mada untuk dilakukan analisis proksimat. Hasil dari pemeriksaan menunjukkan bahwa rerata kadar air daging paha asal supermarket sebesar  $76,26 \pm 0,86$  %; daging dada asal supermarket  $74,135 \pm 0,92$  %; daging paha asal pasar tradisional  $75 \pm 0,56$  % dan daging dada asal pasar tradisional :  $75,64 \pm 1,044$  %. Analisis rerata kadar Abu daging broiler berturut turut : paha dari supermarket  $0,96 \pm 0,027$  %, dada dari supermarket  $1,095 \pm 0,05$  %, paha dari pasar tradisional  $1,034 \pm 0,106$  % dan dada dari pasar tradisional  $1,155 \pm 0,11$  %. Rerata kadar karbohidrat tersebut berturut turut : Daging paha asal supermarket :  $5,6 \pm 1,33$  %; dada asal supermarket :  $6,7 \pm 1,078$  %; Paha asal pasar tradisional  $4,5 \pm 0,60$  % dan dada asal pasar tradisional  $5,3 \pm 0,69$  %. Rerata kadar lemak daging broiler pada bagian paha, asal supermarket :  $2,56 \pm 0,63$  %; dada asal supermarket  $1,2 \pm 0,5$  %; daging paha asal pasar tradisional :  $3,15 \pm 0,21$  % dan daging dada asal pasar tradisional :  $1,8 \pm 0,227$  %. Rerata kadar protein pada ayam broiler dari tinggi ke rendah berturut turut adalah protein pada daging dada asal supermarket :  $16,83 \pm 0,42$  %; dada yang berasal dari pasar tradisional:  $15,63 \pm 1,09$  %, Paha yang berasal dari supermarket:  $14,5 \pm 0,57$  % dan paha yang berasal dari pasar tradisional:  $13,6 \pm 0,38$  %. Berdasarkan semua data yang diperoleh analisis statistik menggunakan pola faktorial 2x2 menunjukkan Tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada kadar air ( $P > 0,05$ ), sedangkan kadar abu, karbohidrat, lemak dan protein menunjukkan hasil yang signifikan ( $P \leq 0,05$ ). Berdasarkan hasil penelitian ini disimpulkan bahwa daging ayam yang berasal dari supermarket mempunyai kualitas yang lebih baik dibandingkan daging ayam yang berasal dari pasar tradisional.

**Kata kunci:** broiler; daging; kadar abu; kadar air; kadar karbohidrat; kadar lemak; kadar protein

## Pendahuluan

Daging ayam memegang peranan penting terkait peranannya dalam memenuhi kebutuhan protein masyarakat Indonesia. Menurut data yang ada, rata rata konsumsi per kapita daging ayam ras dari masyarakat Indonesia tahun 2017-2021 diperkirakan sebesar 5,68 kg per kapita per tahun, sedikit dibawah sapi yang 7,5 kg per kapita/ tahun (Anonim, 2021). Proyeksi konsumsi daging ayam ras luar rumah tangga nasional per horeka per industri tahun 2017 sebesar 410,45 ribu ton dan pada tahun 2021 angka ini diperkirakan akan meningkat menjadi 1,23 juta ton di tahun berikutnya (Ditjen PKH, 2021).

Daging ayam termasuk bahan makanan yang disukai masyarakat dalam kaitannya dengan pemenuhan protein hewani karena selain mengandung gizi yang lengkap juga mengandung

sejumlah unsur yang dibutuhkan manusia yaitu protein, karbohidrat, lemak, air, mineral dan vitamin serta memiliki rasa dan aroma yang enak (Bonny *et al.*, 2017; Bonny *et al.*, 2018). Ayam broiler, saat ini, merupakan salah satu penyumbang terbesar protein hewani asal ternak, lebih besar dari sapi, dan merupakan komoditas unggulan hingga saat ini. Industri ayam broiler telah berkembang pesat, baik di Indonesia maupun negara lainnya, karena daging ayam menjadi sumber utama menu konsumen yang sangat mudah diperoleh baik di pasar modern maupun tradisional (Troy and Kery, 2010).

Menurut Geay *et al.* (2001) kesadaran masyarakat akan arti pentingnya kesehatan menuntut adanya pelabelan pada kemasan makanan seperti halnya kandungan gizi, kadar lemak, rendah kalori maupun pemberitahuan informasi lainnya. Situasi ini menjelaskan bahwa suatu pemberitahuan tidak



tertulis yang menyangkut pada kualitas bahan makan tidak hanya didasarkan atas atribut estetika seperti konformasi, ada atau tidak adanya cacat karkas, memar, bagian karkas yang hilang, dan sobeknya kulit (aspek fisik), namun juga termasuk pada nilai nutrisi di dalamnya. Kualitas hidup masyarakat sangat tergantung dari gizi sehari-hari yang diperoleh dari bahan makanan yang dikonsumsi, sehingga selain protein, makanan tersebut harus mengandung lemak, karbohidrat, vitamin dan mineral dalam komposisi yang sehat.

Masalah utama yang di hadapi masyarakat Indonesia sebenarnya adalah karena sampai saat ini tidak ada pemberitahuan terbuka tentang kandungan gizi daging ayam yang dijual baik di pasar modern maupun tradisional, bahkan semua jenis daging yang dijual tidak pernah disertai dengan pelabelan tentang kandungan gizi pada kemasan daging yang dijual. Kondisi seperti ini akan menimbulkan satu pendapat bahwa daging yang dimakan sehari-hari, tidak peduli asal muasalnya di nilai memiliki nilai nutrisi yang sama. Pelabelan pada kemasan daging yang dijual sebenarnya sangat dibutuhkan masyarakat saat ini, pada era keterbukaan, masyarakat dibebaskan untuk bisa memilih jenis daging yang terbaik untuk dikonsumsi. Meskipun tingkat konsumsi daging (termasuk daging ayam broiler) yang semakin meningkat dinilai baik, namun peningkatan konsumsi daging juga mempunyai korelasi negatif terhadap lingkungan dan kesehatan manusia (Tillman and Clark, 2014). Scollan *et al.* (2014) mengatakan bahwa pergeseran model dalam diet ini lazim disebut sebagai transisi nutrisi (McAfee *et al.*, 2010; Pethick *et al.*, 2011). Penurunan konsumsi daging sapi telah diamati di banyak negara Eropa, termasuk negara Perancis yang merupakan produsen dan konsumen daging sapi terbesar di Eropa. Fenomena ini masih terlihat terutama untuk daging sapi (Sans and Legrand, 2018; Tomasevic *et al.*, 2018), namun tidak mustahil juga akan terjadi pada konsumsi daging ayam. Perubahan fenomena di negara produsen daging eropa ini terutama terjadinya penurunan proporsi konsumsi daging sapi yang disertai dengan peningkatan permintaan konsumen pada daging berkualitas tinggi. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui perbedaan kualitas daging ayam broiler yang dijual di Pasar modern

dan pasar tradisional di wilayah Sumatra Utara melalui analisis proksimat. Kualitas daging ayam dalam penelitian ini tanpa meliputi analisis genetik, pakan yang dikonsumsi, umur panen yang juga berpengaruh pada komposisi, sehingga hasil yang diperoleh sebatas pada metoda yang dipergunakan dan masih mungkin berbeda apabila dilakukan penelitian yang lebih dalam.

## **Materi Dan Metode**

### **Materi**

Materi berupa 100 gr daging ayam broiler tanpa kulit yang diambil pada bagian paha dan dada yang berasal dari masing-masing 16 ekor ayam yang dijual di empat pasar modern dan 16 ekor ayam yang dijual di empat pasar tradisional di daerah Sumatra Utara. Daging dikemas dalam kotak stereoform ditambah pendingin es batu dan dikirim ke Laboratorium Pangan dan Gizi, Pusat Antar Universitas, Universitas Gadjah Mada, untuk dilakukan analisis proksimat.

### **Metode**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Pangan dan Gizi, Pusat Antar Universitas, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Analisis terhadap sampel daging dilakukan dengan mengukur kandungan air, kadar abu, kadar protein, kadar karbohidrat dan kadar lemak.

#### **Analisis kadar air**

Kadar air diukur secara gravimetrik. Satu gram sampel daging diletakkan pada cawan petri kosong yang sudah konstan, ditimbang menggunakan neraca analitik (Mettler Toledo), selanjutnya dikeringkan menggunakan oven (*Harareus instruments*) pada suhu 105°C selama 3-4 jam, selanjutnya disimpan dalam desikator yang diisi dengan adsorben silica gel dan ditimbang kembali sampai diperoleh berat yang konstan.

#### **Analisis kadar abu**

Pengujian kadar abu menggunakan metoda gravimetrik. Tiga gram daging diletakkan pada cawan petri kosong yang sudah konstan, ditimbang menggunakan neraca analitik (*Mettler Toledo*), selanjutnya diarangkan menggunakan

hotplate (*Thermolyne Cimarec-2*), dan diabukan dalam tanur (*Thermolyne 1500*) pada suhu 550-600°C selama 3-4 jam, selanjutnya disimpan dalam desikator yang diisi dengan adsorben silica gel dan ditimbang kembali sampai diperoleh berat yang konstan.

### Analisis kadar protein

Kadar protein daging diukur menggunakan metode Kjeldahl. Metode ini terdiri atas 3 tahapan yaitu : destruksi, distilasi dan titrasi. Satu gram sampel daging ditimbang dengan neraca analitik (Mettler Toledo) dan dimasukkan dalam labu Kjeldahl, ditambah 5 gram garam Kjeldahl (mengandung CuSo<sub>4</sub> dan K<sub>2</sub>So<sub>4</sub>) (E-Merck) dan ditambahkan 10 mL larutan asam sulfat pekat (E-Merck), kemudian didestruksi selama 3-4 jam. Larutan hasil destruksi di larutkan dalam volume 50 mL, kemudian dipipet sebanyak 5 mL menggunakan pipet volum dan dimasukkan ke dalam labu destilasi. Larutan didestilasi dengan 10 mL larutan NaOH 30% (E-Merck) dan destilatnya ditampung dalam labu *Erlenmeyer* 100 mL yang telah berisi 10 mL larutan asam borat 3% (E-Merck) dan 2-3 tetes indikator tashiro dalam suasana dingin sampai volumenya mencapai 75 mL. kemudian dititrasi menggunakan buret dengan larutan HCl 0,1 N yang telah dibakukan dengan larutan borax sampai terjadi perubahan warna dari hijau ke ungu. Dicatat volume pemakaian larutan HCl yang digunakan untuk mentitrasi larutan contoh dan dihitung kadar proteinnya.

### Analisis kadar karbohidrat

Pengujian karbohidrat merujuk pada metode SNI 01-2891-1992 butir 10.4, ditimbang sebanyak 2,5 g contoh dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer 300 mL dan ditambahkan 100 mL larutan HCl 3% dan direfluks selama 3 jam. Kemudian didinginkan dan dinetralkan dengan NaOH 30% menggunakan kertas indikator pH. Larutan disaring menggunakan kertas saring whatman 40 dan filtratnya ditampung dalam labu ukur 250 mL dan diencerkan sampai tanda batas. Pipet 20 mL larutan *luff schoorl* dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer 300 mL, kemudian ditambahkan 20 mL larutan contoh dan beberapa butir batu didih, kemudian ditambahkan aquades sampai volumenya 50

mL dan di refluks selama 10 menit. Setelah itu, larutan didinginkan dan ditambah 25 mL larutan asam sulfat 6N dan 15 mL larutan KI 20%. Kemudian dititrasi dengan larutan thio sulfat 0,1 N sampai warna larutan menjadi kuning muda, dan ditambahkan 5 mL larutan amilum 0,2% dan dititrasi kembali sampai warna biru tepat hilang. Perlakuan di atas digunakan juga untuk analisis blanko.

### Penentuan kadar lemak

Pengujian kadar lemak total merujuk pada metode SNI 01-2891-1992 butir 8.1 dan 8.2, ditimbang sebanyak 5 g contoh dimasukan ke dalam labu erlenmeyer 300 mL, kemudian ditambahkan 45 mL aquades dan 55 mL larutan HCl 25%. Kemudian di hidrolisis dengan refluks tertutup selama 30 menit. Larutan hasil hidrolisis didinginkan dan disaring menggunakan kertas saring bebas lemak sampai filtrat bebas Cl menggunakan larutan AgNO<sub>3</sub> 0,1 M. Kemudian kertas saring tersebut dimasukan ke dalam timble dan ditutup permukannya dengan glasswool kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 100-101<sup>o</sup>C selama 6 jam , setelah kering masukan *timble* ke dalam alat *soxhlet*, kemudian diekstraksi dengan petroleum eter selama 4 jam. Lemak yang diperoleh dikeringkan dalam oven selama 1 jam pada suhu 100-101<sup>o</sup>C, setelah itu disimpan dalam desikator yang berisi adsorben silica gel selama 20 menit dan ditimbang dengan menggunakan neraca analitik (Mettler Toledo) sampai beratnya konstan.

### Analisis statistik

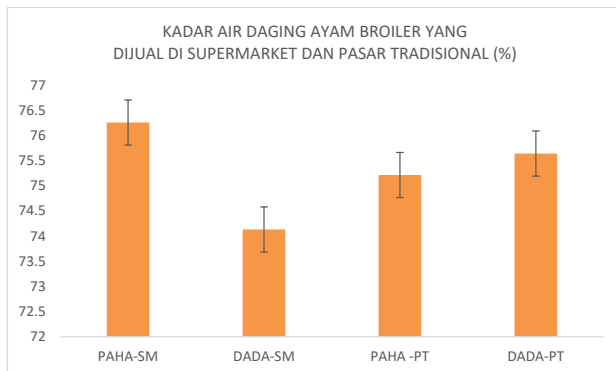
Perbedaan kadar air, abu, karbohidrat, protein dan lemak dari daging baik bagian paha maupun dada serta yang berasal dari supermarket maupun pasar tradisional selanjutnya dianalisis menggunakan analisis variansi pola faktorial 2x2 pada tingkat kesalahan 5%.

## Hasil dan Pembahasan

### Kadar Air

Rerata kadar air dalam daging ayam broiler yang dijual di super market adalah sebagai berikut : Daging Paha asal supermarket : 76,26±0,86 %; Daging Dada asal supermarket : 74,135 ±0,92 %; Daging paha asal Pasar

Tradisional :  $75 \pm 0,56\%$  dan daging paha asal pasar tradisional :  $75,64 \pm 1,044\%$  (Gambar 1).



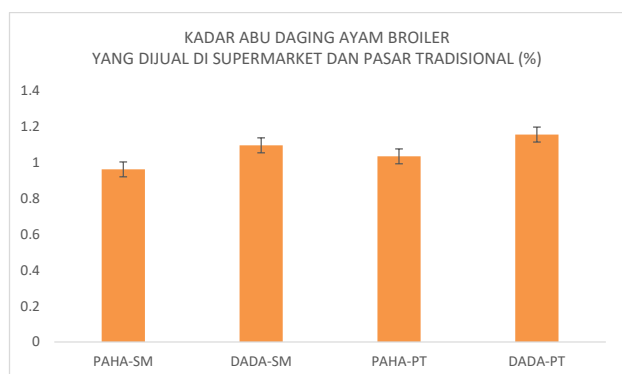
Gambar 1. Kadar air dari daging ayam broiler yang dijual di supermarket dan pasar tradisional

Rerata kadar air dalam penelitian ini menunjukkan bahwa daging paha ayam broiler mengandung air yang paling tinggi, disusul dada ayam asal pasar tradisional, paha ayam asal pasar tradisional dan dada ayam asal supermarket. Analisis statistik menggunakan pola factorial analisis varians menunjukkan perbedaan yang signifikan pada masing masing kelompok perlakuan ( $P \leq 0,05$ ). Tomasevice *et al.* (2018) mengatakan bahwa daging merupakan jaringan yang mudah rusak dan merupakan media yang cocok bagi pertumbuhan mikroba, disebabkan tingginya kandungan air dan zat gizi seperti protein. Menurut Hedrick (2008), daging dan olahannya dapat dengan mudah menjadi rusak atau busuk, oleh karena itu, penanganan yang baik harus dilakukan selama proses berlangsung. Beberapa mikroba patogen yang biasa mencemari daging adalah *Escherichia coli*, *Salmonella sp*, dan *Staphylococcus sp*. Kontaminasi mikroba pada daging sapi dapat berasal dari peternakan dan rumah potong hewan yang tidak higienis, begitu juga sumber air dan lingkungan tempat diolahnya daging tersebut sebelum sampai kepada konsumen (Mukartini *et al.*, 1995). Pertumbuhan mikroba pada daging sangat dipengaruhi oleh kadar air daging tersebut. Kandungan air dalam bahan makanan mempengaruhi daya tahan bahan makanan terhadap serangan mikroba. Kandungan air tersebut dinyatakan dengan *water activity*, yaitu jumlah air bebas yang dapat digunakan oleh mikroorganisme untuk pertumbuhannya. Kelembaban dan kadar air biasanya berpengaruh

terhadap pertumbuhan mikroorganisme. Bakteri dan jamur memerlukan kelembaban di atas 85% untuk pertumbuhannya (Al Saimary, 2015). Hedrick (2008) menyatakan bahwa kadar air yang meningkat dipengaruhi oleh jumlah air bebas yang terbentuk sebagai hasil samping dari aktivitas bakteri. Rataan kadar air daging hasil penelitian berkisar antara 68,73 - 73,80% yang masih berada dalam rentang normal daging sapi. Beberapa data diperoleh menunjukkan angka kadar air diatas 73,80, hal ini bisa terjadi kemungkinan adanya proses pencucian daging sebelum dijual ke pasar tertentu. Tomasevic *et al.* (2018) menyatakan bahwa kadar air daging berkisar antara 65 – 80%. Adanya perbedaan kadar air daging dapat dipengaruhi oleh kandungan lemak intramuskular, apabila kadar lemak daging meningkat, akan menyebabkan penurunan kadar air. Kadar air otot daging sering mempunyai hubungan negatif yang signifikan dengan kadar lemak daging. Seperti halnya pada penelitian ini, kadar air yang rendah dari ayam broiler terkait dengan kadar lemak dalam daging ayam broiler tersebut.

### Kadar Abu

Kadar abu dalam daging ayam broiler yang dijual di supermarket dan yang dijual di pasar tradisional ditunjukkan pada Gambar 2.



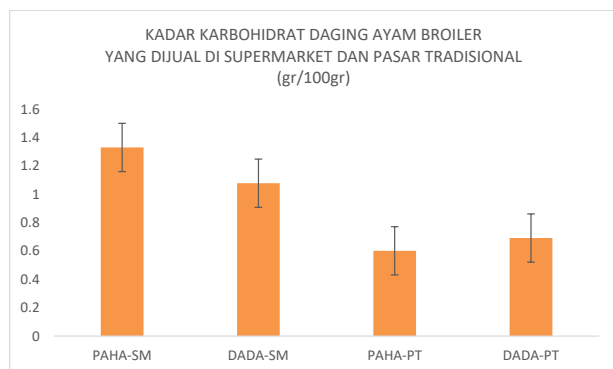
Gambar 2. Kadar abu daging ayam Broiler yang dijual di supermarket dan pasar tradisional

Kadar abu suatu bahan makanan menunjukkan kandungan mineral yang terdapat dalam bahan tersebut, kemurnian, serta kebersihan suatu bahan yang dihasilkan. Penentuan konstituen mineral bahan hasil pertanian dapat dibedakan menjadi 2 tahapan yaitu : Penentuan abu (abu total, abu larut, abu tidak larut), dan penentuan individu komponen. Penentuan abu

total dapat digunakan untuk berbagai tujuan yaitu untuk menentukan baik tidaknya suatu proses pengolahan, untuk mengetahui jenis bahan yang digunakan, dan sebagai parameter nilai gizi bahan makanan. Pada penelitian ini, hasil analisis statistik menggunakan pola factorial, analisis varians menunjukkan adanya perbedaan kadar abu dalam daging ayam broiler yang dijual di supermarket dan pasar tradisional ( $P \leq 0,05$ ), berturut-turut: Paha dari supermarket  $0,96 \pm 0,027\%$ , dada dari supermarket:  $1,095 \pm 0,05\%$ , Paha dari pasar tradisional  $1,034 \pm 0,106\%$  dan dada dari pasar tradisional  $1,155 \pm 0,11\%$ . Tinggi rendahnya kadar abu dalam daging menunjukkan adanya korelasi jumlah mineral, kemurnian, atau tingkat higienitas suatu bahan. Oleh karena itu, angka kadar abu suatu bahan pangan tidak boleh lebih dari 3% (Rahmi, 2015). Pada penelitian ini, hasil pengukuran kadar abu menunjukkan rata-rata masih pada kisaran angka 1% dan angka ini masih ada dibawah standar yang disampaikan oleh Rahmi (2015).

### Kadar Karbohidrat

Kadar karbohidrat dalam daging ayam broiler yang dijual di supermarket dan pasar tradisional, sebagai berikut :



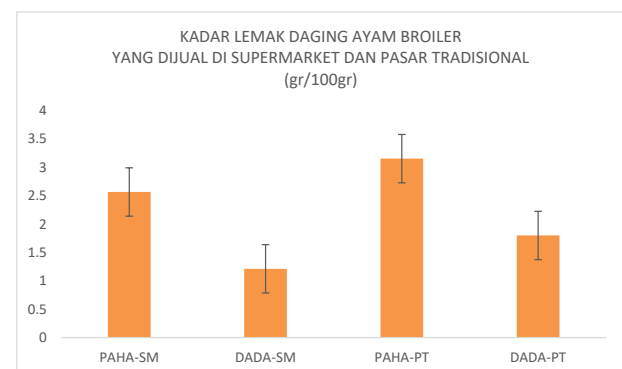
Gambar 3. Rerata kadar Karbohidrat dalam daging ayam broiler yang dijual di supermarket dan yang dijual di pasar tradisional

Analisis statistik kadar karbohidrat dalam daging ayam broiler bagian paha dan dada, yang dijual di supermarket dan pasar tradisional menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ( $P \leq 0,05$ ). Rerata kadar karbohidrat tersebut berturut-turut: Daging paha asal supermarket:  $5,6 \pm 1,33$  gr/100gr; dada broiler asal supermarket  $6,7 \pm 1,078$  gr/100gr; Paha asal

pasar tradisional  $4,5 \pm 0,60$  gr/100gr dan dada asal pasar tradisional  $5,3 \pm 0,69$  gr/100gr. Kisaran kadar karbohidrat dalam daging disebabkan oleh kemampuan menyimpan glikogen dalam tubuh dan perlakuan sebelum pemotongan yang berpengaruh terhadap proses glikolisis. Proses glikolisis secara perlahan akan berhenti dan akan berlangsung glikolisis secara anaerob dengan mengubah glikogen menjadi asam laktat (Jiang *et al.*, 2005). Hal ini erat hubungannya dengan pakan yang dikonsumsi hewan tersebut diatas. Pakan yang diberikan pada diduga mengandung karbohidrat tinggi, dimana selain mengkonsumsi rumput-rumputan biasanya juga diberikan biji-bijian seperti jagung dan gandum.

### Kadar lemak daging

Kadar lemak daging ayam broiler yang dijual di supermarket dan pasar tradisional berturut-turut: Daging paha, asal supermarket  $2,56 \pm 0,63$  gr/100gr; daging dada asal supermarket  $1,2 \pm 0,5$  gr/100gr; daging paha asal pasar tradisional  $3,15 \pm 0,21$  gr/100gr dan daging dada asal pasar tradisional:  $1,8 \pm 0,227$  gr/100gr. Terdapat perbedaan yang signifikan ( $P \leq 0,05$ ) dari rerata kadar lemak dari supermarket dan pasar tradisional. Lemak dalam daging ayam broiler dikategorikan dalam konsentrasi yang cukup tinggi dan, lemak pada bagian paha dari ayam broiler asal pasar tradisional menjadi yang paling tinggi diantara lemak dalam daging bagian dada (Gambar 4).



Gambar 4. Kadar lemak daging ayam broiler yang dijual di supermarket dan pasar tradisional.

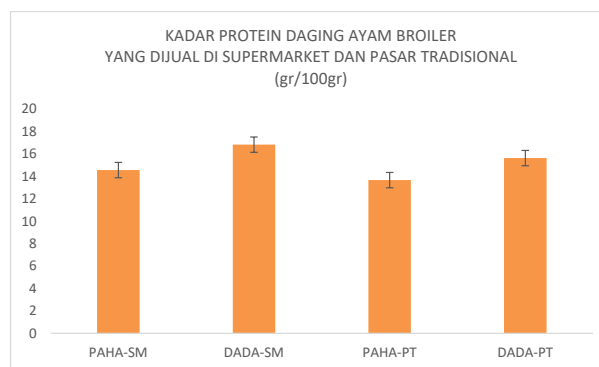
Kadar lemak dalam daging tergantung dari pakan yang dikonsumsi sehari-hari. Daging ternak ayam broiler berasal dari ayam yang semula dipelihara secara teratur dalam model peternakan semi modern atau modern yang diberikan ransum

dengan kualitas tertentu. Kandungan lemak yang tinggi pada ternak menunjukkan efisiensi atau penggunaan ransum menurun. Hal itu terjadi karena kandungan energi dalam ransum yang berlebih akan disimpan sebagai lemak. Sebagian besar lemak terdapat di bawah kulit, di sekeliling alat pencernaan, ginjal, urat daging dan tulang. Lemak abdomen yang terbentuk selama pemeliharaan akan dibuang pada saat pengolahan, sehingga terjadi pemborosan energi dalam ransum. Kandungan energi tersebut seharusnya dapat digunakan untuk meningkatkan kualitas daging dan penampilan ternak. Disamping itu, kandungan lemak dalam daging ternak yang relatif tinggi dapat menimbulkan masalah bagi kesehatan manusia seperti obesitas, aterosklerosis dan penyakit degeneratif lainnya. Ternak merupakan hewan yang dipelihara sebagai penghasil daging yang telah banyak di budidayakan dan di konsumsi oleh masyarakat, selain mempunyai nilai gizi yang tinggi daging ternak merupakan sumber protein hewani.

Era perdagangan bebas menuntut produksi pakan yang berkualitas tinggi, untuk menghasilkan pangan yang memenuhi persyaratan mutu, aman dan menyehatkan (Nutraceutical). Keamanan pakan, kesehatan ternak, dan keamanan pangan harus sesuai dengan standar SNI (Standard Nasional Indonesia) dan standard internasional (*Codex Alimentarius Commission*). Pakan ternak secara ideal diharapkan memenuhi kriteria yang dapat digunakan setiap hari, komponennya terdiri dari bahan pakan yang bersifat natural dan biasa digunakan untuk pakan ternak, kandungan nutrient yang baik dan dapat mengurangi resiko penyakit. Sifat tersebut dapat dipenuhi antara lain dengan pakan fungsional yaitu merupakan pakan yang mengandung probiotik yang berfungsi untuk meningkatkan system imun, dapat menurunkan asam lemak jenuh, merupakan formula yang mampu menghidrolisa komponen protein dan sebagian komponen pakan atau kombinasinya mampu meningkatkan bioavailabilitas atau ketersediaan pakan (Gopinger *et al.* 2017).

### Kadar Protein

Kadar protein daging ayam broiler yang berasal dari supermarket dan pasar tradisional adalah seperti yang tertera pada gambar dibawah ini:



Gambar 5. Kadar protein dalam daging ayam broiler yang dijual di supermarket dan pasar tradisional.

Pada grafik terlihat bahwa kadar protein daging ternak dari tinggi ke rendah berturut turut adalah protein pada daging dada asal supermarket: 16,83±0,42 gr/100gr; dada yang berasal dari pasar tradisional: 15,63±1,09 gr/100gr, Paha yang berasal dari supermarket: 14,5±0,57 gr/100gr dan Paha yang berasal dari pasar tradisional: 13,6±0,38 gr/100 gr. Protein adalah komponen solid terbesar di dalam daging, oleh karena itu daging dikatakan sebagai makanan sumber protein. Protein yang terkandung dalam daging merupakan protein yang sempurna karena mampu mensuplai asam amino esensial yang dibutuhkan tubuh dan mudah dicerna. Pada penelitian ini, terdapat perbedaan yang signifikan konsentrasi protein daging pada ayam broiler, dada, paha dari supermarket dan pasar tradisional ( $P \leq 0,05$ ).

Tingginya kadar protein terkait dengan nilai kesehatan dan kestabilan pakan yang diberikan selama pemeliharaan. Menurut Anonim (2020), kandungan protein dalam dada ayam lebih tinggi dibandingkan dalam paha ayam, meskipun secara umum keduanya tetap bisa dikatakan mengandung nutrisi yang baik. Protein merupakan komponen utama dalam semua sel hidup yang tersusun atas unit unit molekul kecil penyusun yang disebut asam amino yang berangkaian satu sama lain dengan ikatan peptida dan berfungsi sebagai unsur pembentuk sel dan penghasil energi. Protein adalah sumber asam-asam amino yang mengandung unsur unsur C, H, O dan N serta mengandung fosfor dan belerang (Zhou *et al.*, 2010). Asam amino diperlukan oleh makhluk hidup sebagai penyusun protein atau sebagai kerangka molekul-molekul penting. Asam amino disebut esensial apabila suatu spesies memerlukannya tetapi tidak mampu mempro-

duksi sendiri dan disebut bukan esensial apabila spesies tersebut mampu memproduksinya sendiri (Heger and Pack, 1996).

Berdasarkan hasil analisis menggunakan analisis statistik pola faktorial yang membedakan asal daging (supermarket dan pasar tradisional) dan bagian daging broiler (daging paha dan daging dada), hampir kesemuanya menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ( $P < 0,05$ ). Pengamatan dengan analisis proksimat dapat dilihat terutama pada kandungan karbohidrat, lemak dan protein menunjukkan bahwa daging bagian paha lebih tinggi akan karbohidrat dan lemak, sedangkan daging dada lebih banyak mengandung protein. Menurut Maharani *et al.* (2013), retensi protein dalam bagian daging ayam tergantung retensi protein dari pakan yang dikonsumsi. Tingginya retensi akan berkontribusi pada deposisi protein dalam daging. Selain itu, aktivator enzim *calcium activated neutral protease* (CANP) atau kalsium dalam bentuk ion yang rendah akan mengurangi kemampuan kalsium dalam memicu CANP, sehingga sintesis lebih tinggi dibandingkan degradasi dan meningkatkan protein dalam daging. Perbedaan kandungan karbohidrat, lemak dan protein dalam daging yang berasal dari supermarket dan pasar tradisional menjelaskan bagaimana konsumsi dan jenis pakan yang diberikan selama pemeliharaan kemungkinan berbeda antara ayam yang dijual di supermarket dan pasar tradisional. Perbedaan kemampuan dalam retensi protein, karbohidrat dan lemak terkait dengan mutu dari pakan yang diberikan, dengan kata lain konsumen yang berniat mencari daging dengan kandungan gizi yang lebih baik, disarankan membeli daging ayam yang dijual di supermarket, yang kemungkinan lebih didominasi asupan daging ayam dari peternakan modern yang terkontrol dibandingkan dengan yang dijual di pasar tradisional (Leeson *et al.*, 1996; Scollan *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2018).

### Ucapan Terima Kasih

Ucapan terimakasih kepada Dr.drh. Dhirgo Adji, M.P., laboratorium Pangan dan Gizi, Pusat Antar Universitas, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, atas bantuan analisis proksimat dan statistik dalam penelitian ini.

### Daftar Pustaka

- Anonim (2020). Produksi Ayam Ras Indonesia. Badan Pusat Statistik (BPS) Indonesia.
- Al Saimary.E.I.(2015). Pyrex Journals Bacterial Quality of Meat Products From Various Basrah Restaurants. Pyrex Journal of Microbiology and Biotechnology Res. Vol 1(2) pp 018-027, May 2015.
- Bonny, S.P.F., Hocquette ,J.F., Pethick,D.W., Farmer, L.J., Legrand, I., Wierzbicki, J., Allen, P, Polkinghorne, R.J. and Gardner, G.E. (2016). The variation in the eating quality of beef from different sexes and breed classes cannot be completely explained by carcass measurements. *Animal*. 10:987–995.
- Bonny, S.P.F., Hocquette, J.F., Pethick, D.W., Legrand, I., Wierzbicki, J.P., Allen, L.J., Farmer,L.J., Polkinghorne, R.J., and Gardner, G.E. (2017). Untrained consumer assessment of the eating quality of beef: 1. A single composite score can predict beef quality grades. *Animal*. 11:1389–1398.
- Bonny, S.P.F., Hocquette, J.F., Pethick, D.W., Legrand, I., Wierzbicki, J.P., Allen, L.J., Farmer,L.J., Polkinghorne, R.J., and Gardner, G.E. (2018). The variability of the eating quality of beef can be reduced by predicting consumer satisfaction. *Animal*. 12: 2434–2442.
- Ditjen PKH (2020). Daging Ayam Berpotensi Naik Tahun 2021. Laporan Kementerian Pertanian melalui Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan (Ditjen PKH)
- Geay, Y.,Bauchart, D.,Hocquette, J.F. and Culioli,J.(2001). Effect of nutritional factors on biochemical structural and metabolic characteristics of muscles in ruminants, consequences on dietetic value and sensorial qualities of meat. *Annales de biologie animale biochimie biophysique* 41 (1): 1-26.
- Gopinger, E., Krabbe, E.L., Surek, D., Lopes, L.S. and Avila, V.S. (2017). Live performance, carcass and bone quality responses of grower and finisher broiler to dietary metabolizable energy level. *Brazil. J. Poul Sci*. 19: 559-566.

- Hedrick, H.B. (2008). Principles of meat science, 3 ed. Dubuque: Kendall/Hunt Publishing. 354 p.
- Heger, J. and Pack, M. (1996). Effects of glycine + serine on starting broiler performance as influenced by dietary crude protein levels. *Agric Biol Res* 49: 257-265.
- Hu, Y.D., Lan, D., Zhu, Y., Pang, H.Z., Mu, X.P. and Hu, X.F. (2018). Effect of diet with different energy and lipase levels on performance, digestibility and carcass trait in broilers. *Asian-Australian J. Anim. Sci.* 31: 2175-1284.
- Jiang, Q., Waldroup, P.W. and Fritts, C.A. (2005). Improving the utilization of diet low in crude protein. Evaluation of special amino acid supplementation on diets low in crude protein. *Int. J. Poul Sci.* 4: 115-122.
- Leeson, S., Caston, L. and Summers, J.D. (1996). Broiler response to diet energy. *Poultry Science*. Vol 75: 529-535.
- Maharani, P., N. Suthama, dan H. I. Wahyuni (2013). Massa kalsium dan protein daging pada ayam arab petelur yang diberi ransum menggunakan azolla microphylla. *Anim. Agric. J.* 2 : 18-27.
- McAfee, A.J., McSorley, E.M., Cuskelly, G.J., Moss, B.W., Wallace, J.M., Bonham, M.P., and Fearon, A.M. (2010). Red meat consumption: an overview of the risks and benefits. *Meat Sci.* 84:1-13.
- Mukartini, S.C., Jehne, B., Shay and Harfer, C.M.L. (1995). Microbiological status of beef carcass meat in Indonesia. *J. Food Safety* 15-291-303
- Pethick, D.W., Ball, A.J., Banks, R.G. and Hocquette, J.F. (2011). Current and future issues facing red meat quality in a competitive market and how to manage continuous improvement. *Anim Prod Sci.* 51:13-18.
- Popkin, B.M. (2001). The nutrition transition and obesity in the developing world. *J Nutr.* 131:871S-873S.
- Rahmi, H. (2015). Aktivitas antibakteri ekstrak ethanol 60% dan ekstrak air buah naga merah Terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Rekapangan: *Jurnal Teknologi Pangan*, 9 (1). pp. 15-18.
- Sans, P and Legrand, I. (2018)., in : Ellis-Oury MP, Hocquette JF, La Chaine de La Viande Bovine production, transformation, valorisation et consommation. Editions Lavoisier, Paris: p 125-142
- Scollan, N.D., Dannenberger, D., Nuernberg, K., Richardson, I., MacKintosh, S., Hocquette, J.F., Moloney, A.P. 2014. Enhancing the nutritional and health value of beef lipids and their relationship with meat quality. *Meat Sci.* 97: 384-394.
- Tillman, D and Clarck, M. (2014). Global diets link environmental sustainability and human health. *Nature* .515: 518-522.
- Tomasevic, I., Novakovic, S., Solowiej, B., Zdolec, N., Skunca, D., Krocko, M., Nedomova, S., Kolaj, R., Aleksiev, G., and Djekic, I. (2018). Consumers' perceptions, attitudes and perceived quality of game meat in ten European countries. *Meat Sci.* 142: 5-13.
- Troy, D.J. and Kerry, J.P. (2010). Consumer perception and the role of science in the meat industry. *Meat Sci* 86(1):214-26.
- Zhou, G.H., Xu, X.L., and Liu, Y. (2010). Preservation technologies for fresh meat—a review. *Meat Science*, vol. 86, no. 1, pp. 119-128.

## **Faktor Risiko Potensial terhadap *Canine Leptospirosis* di Ragunan Animal Hospital Jakarta, Indonesia**

### ***Risk Factors Potencial from Canine Leptospirosis at Ragunan Animal Hospital Jakarta, Indonesia***

**Ambar Retnowati<sup>1\*</sup>, Agustin Indrawati<sup>2</sup>, Upik Kesumawati Hadi<sup>2</sup>, Safika<sup>2</sup>, Pratitis S. Wibowo<sup>3</sup>, Susan M. Noor<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Program Studi Kesehatan Masyarakat Veteriner, Kampus IPB Dramaga, Institut Pertanian Bogor, Bogor

<sup>2</sup>Departemen Ilmu Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner, Kampus IPB Dramaga,  
Institut Pertanian Bogor, Bogor

<sup>3</sup>Rumah Sakit Hewan Jakarta, Jalan Harsono RM. No 28 Ps. Minggu, Jakarta

<sup>4</sup>Laboratorium Bakteriologi, Balai Besar Penelitian Veteriner, Bogor

Email: ambarretnowati@yahoo.com

Naskah diterima: 5 Oktober 2020, direvisi: 3 Juli 2021, disetujui: 15 Juli 2021

#### **Abstract**

Incidence of *Canine Leptospirosis* in Jakarta related to clinical symptoms, disease severity and dog mortality due to confirmed cases is not widely known. The skill and knowledge of veterinarians who are unfamiliar with disease diagnosis can exacerbate disease incidence and increase the potential for death in dogs. This study aims to (1) identify the distribution of leptospirosis sample characteristics in dogs (2) analyze the relationship and measure risk factors with the incidence of leptospirosis in dogs. The study was conducted from January to August 2020 on 40 dogs suspected of leptospirosis in the category of 16 cases and 24 controls at Ragunan Animal Hospital, South Jakarta. The selected sample category was a dog with suspected leptospirosis characterized by symptoms of fever, vomiting, diarrhea, anorexia, myalgia, conjunctival suffusion, a history of exposure or activity to a contaminated environment such as flooding and contact with rats which are a reservoir of *Lepstopira*. Furthermore, the hematology, blood chemistry and Polymerase Chain Reaction (PCR) tests were carried out as confirmation. Dogs with symptoms of leukocytosis and thrombocytopenia on a hematology test accompanied by an increase in the urea, creatinine, ALP and ALT values were then taken blood or urine samples for PCR confirmation tests. The independent factors associated with the incidence of leptospirosis in dogs were significantly univariate analysis (at  $p < 0.25$ ) followed by multivariate logistic regression analysis showing the sex of the dog with OR = 0.119 (95% CI = 0.015-0.973), history of vaccination with OR = 0.176 (95% CI = 0.037 - 0.829) has an effect on the incidence of leptospirosis in dogs in Jakarta.

**Keywords:** Canine; Risk Factor; Leptospirosis; Jakarta

#### **Abstrak**

Kejadian leptospirosis pada anjing di Jakarta terkait dengan gejala klinis, keparahan penyakit dan kematian anjing akibat kasus yang terkonfirmasi belum banyak diketahui. Kemampuan dan pengetahuan dokter hewan yang belum terbiasa dalam mendiagnosa penyakit dapat memperburuk kejadian penyakit dan meningkatkan potensi kematian pada anjing. Penelitian ini bertujuan (1) mengidentifikasi distribusi karakteristik sampel leptospirosis pada anjing (2) menganalisis hubungan dan mengukur faktor risiko dengan kejadian leptospirosis pada anjing. Penelitian dilakukan pada Januari hingga Agustus 2020 pada 40 ekor anjing suspek leptospirosis dengan kategori 16 kasus dan 24 kontrol di Rumah Sakit Hewan Ragunan Jakarta Selatan. Kategori sampel yang di pilih adalah anjing suspek leptospirosis ditandai dengan gejala demam, vomitus, diare, anoreksia, mialgia, konjuktiva suffusion, ada riwayat terpapar atau beraktifitas dengan lingkungan yang terkontaminasi



seperti banjir dan kontak dengan tikus yang merupakan reservoir *Lepstopira*. Selanjutnya dilakukan uji hematologi, kimia darah dan uji *Polymerase Chain Reaction* (PCR) sebagai konfirmasi. Anjing dengan gejala *leukositosis* dan *thrombocytopenia* pada uji hematologi disertai peningkatan nilai kadar ureum, kreatinin, nilai ALP dan ALT selanjutnya dilakukan pengambilan sampel darah atau urin untuk dilakukan uji konfirmasi PCR. Faktor independen yang berhubungan terhadap kejadian leptospirosis pada anjing secara signifikan dilakukan analisis univariate (pada  $p < 0,25$ ) dilanjutkan analisis regresi logistik multivariat menunjukkan jenis kelamin anjing dengan OR = 0,119 (95% CI = 0,015-0,973), Riwayat vaksinasi dengan OR = 0,176 (95% CI = 0,037 – 0,829) berpengaruh terhadap kejadian leptospirosis pada anjing di Jakarta.

**Kata kunci:** Anjing; Faktor risiko; Leptospirosis; Jakarta

## Pendahuluan

Leptospirosis merupakan zoonosis yang disebabkan oleh bakteri gram negatif dan menimbulkan masalah kesehatan terutama daerah rawan banjir (Desvars 2011). Menurut Kementerian Kesehatan terdapat 895 kasus di manusia selama 2018, dengan tingkat fatalitas kasus 17,8% dengan morbiditas tahunan mencapai 39,2 per 100.000 orang. DKI Jakarta merupakan salah satu wilayah endemik leptospirosis (Kemendes 2019). Kejadian leptospirosis yang tidak terdiagnosa dan tidak dilakukan pengobatan dapat meningkatkan risiko tingkat keparahan penyakit menuju organ (*weil disease*) yang memiliki tingkat kematian  $>70\%$  dari kasus (Gasem 2020).

Penelitian *Lepstopira* pada anjing di Swiss selama 10 tahun melaporkan bahwa serovars *Australis* dan *Bratislava* menunjukkan tingkat seropositif tertinggi dengan masing-masing 70,5% dan 69,1%. Gejala klinis utama terdapat pada organ ginjal (99,6%), paru (76,7%), dan hati (26,0%), serta sindrom hemoragik (18,2%) yang menyebabkan angka kematian sebesar (43,3%) (Major 2014). Berdasarkan hal tersebut kasus leptospirosis anjing menunjukkan ciri dan tingkat keparahan yang mirip dengan infeksi pada manusia sehingga dapat dijadikan sebagai model untuk melakukan karakterisasi dan deteksi penyakit, identifikasi, gejala klinis (umum dan spesifik) yang berasosiasi terhadap tingkat keparahan penyakit dan mortalitas. Kemunculannya kembali kasus leptospirosis di suatu negara atau daerah dengan tingkat insiden yang sangat tinggi pada anjing akibat perubahan iklim, terjadinya banjir dan sanitasi yang buruk harus dilihat sebagai peringatan dan menekankan kepada masyarakat dan pemangku

kepentingan perlunya peningkatan kewaspadaan (Garba 2018).

Gejala klinis leptospirosis yang tampak pada anjing seperti demam, mialgia, anoreksia, muntah, dan diare sehingga belum ada yang spesifik (Knopfler 2018). Tujuh hari invasi bakteri, tanda-tanda ringan dan terbatas pada kelesuan dan hiperemi ringan. Anjing yang terinfeksi dengan tanda-tanda klinis yang parah pada 9 hari dan memburuk hingga hari ke-13. Gejala lain seperti gagal ginjal akut dan penyakit hati juga sering ditemukan pada anjing (Reagan 2019). Dokter hewan harus mencurigai adanya leptospirosis pada anjing dengan tanda gagal ginjal atau hati, uveitis, perdarahan paru, penyakit demam akut, atau aborsi (Sykes 2011). Menurut Collantes (2016) diagnosa awal leptospirosis pada fase awal cukup penting dalam penentuan perawatan dan prognosis yang tepat pada anjing terinfeksi. Hal tersebut merupakan tantangan bagi Dokter Hewan saat mendiagnosa kasus berdasar gejala klinis awal karena munculnya berbagai faktor risiko, gejala klinis non-spesifik dan nilai pengujian hematologi non-prediktif, sehingga dibutuhkan pengujian hematologi yang ditandai leukositosis dan thrombocytopenia (Mayor 2014).

Hambatan yang signifikan untuk mencapai diagnosa adalah tanda-tanda klinis yang sering tidak spesifik yang terkait leptospirosis, mulai dari tingkat keparahan dari tidak ada tanda klinis hingga penyakit berakhir dengan kematian. Dokter hewan harus mencurigai adanya leptospirosis pada anjing dengan faktor resiko atau tanda klinis yang signifikan (Schuller 2015). Ketepatan diagnosa dari infeksi ini sangat penting dalam manajemen kasus kaitannya dengan pilihan antibiotik saat pengobatan. Diagnosis

dini leptospirosis pada anjing harus dilakukan karena sifat zoonosisnya dari penyakit dan kebutuhan untuk memulai intervensi dalam langkah awal pelaksanaan terapi pada anjing yang terinfeksi secara tepat (Gutierrez 2019). Diferensial diagnosa *canine leptospirosis* diantaranya penyakit cacing jantung (*heartworm disease*), *autoimmune hemolytic anemia*, *bacteremia*, *infectious canine hepatitis virus*, *hepatic neoplasia*, *trauma*, *lupus*, *Rocky Mountain spotted fever*, *Ehrlichiosis*, *toxoplasmosis*, *renal neoplasia*, dan *renal calculi* (Nilufer 2004). *Leptospira* patogen terdeteksi secara signifikan pada anjing sebesar (18%) dengan gejala klinis non spesifik (Collantes 2016). Anjing di daerah perkotaan sangat rentan terhadap infeksi meskipun ada atau tidak ada faktor predisposisi kasus yang diketahui. Faktor risiko yang telah dikaitkan dengan leptospirosis termasuk paparan air, jenis kelamin jantan, dan anjing penggembala atau pekerja dalam beberapa studi penelitian (Harkin 2011; Goh 2019).

Keterbatasan dan bahkan belum ada informasi mengenai diagnosa awal anjing suspek leptospirosis berdasarkan gejala klinis dan uji penunjang awal menjadi alasan dilakukan penelitian ini. Penelitian ini bertujuan (1) mengidentifikasi distribusi karakteristik sampel leptospirosis pada anjing (2) menganalisis hubungan dan mengukur faktor risiko dengan kejadian leptospirosis pada anjing. Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan kontribusi terhadap Dokter hewan dan petugas pelayanan kesehatan hewan dalam penegakan diagnosa awal dan membantu dalam skrining, terapi dan pengobatan leptospirosis. Selanjutnya, dapat dilakukan penelitian dan pengujian lebih lanjut mengenai karakterisasi genetik bakteri *Leptospira* sehingga dapat memberikan kontribusi dalam penanganan kasus dimasa depan kaitannya dengan program vaksinasi, pencegahan dan pengendalian penyakit *Leptospira* pada anjing.

### Materi dan Metode

Penelitian dilakukan di Rumah Sakit Hewan (RSH) Ragunan Jakarta Selatan pada bulan Januari hingga Agustus 2020. RSH Ragunan, Jakarta Selatan merupakan rumah sakit hewan rujukan pelayanan kesehatan hewan

oleh praktisi dokter hewan di wilayah Jakarta karena mempunyai fasilitas yang lengkap dan memadai. Penelitian ini merupakan penelitian observasional analitik dengan total sampel 40 ekor anjing suspek *Leptospira* di RSH Ragunan, Jakarta Selatan.

Kategori anjing suspek leptospirosis ditandai dengan gejala demam, anoreksia, *myalgia*, *conjunctiva suffusion* dan ada riwayat terpapar atau beraktifitas dengan lingkungan yang terkontaminasi seperti banjir dan kontak dengan tikus yang merupakan reservoir *Leptospira*. Kriteria inklusi kasus yaitu minimal memiliki 2 gejala atau tanda klinis berikut: demam, anoreksia, mialgia, muntah, sesak nafas, icterus, *suffusion conjungtiva*. Tahap selanjutnya dilakukan uji pendukung diagnosa yaitu uji hematologi, uji kimia darah dan uji konfirmasi PCR pada darah atau urin yang menunjukkan hasil positif. Pemeriksaan kimia darah yang dilakukan untuk mendukung diagnosa leptospirosis meliputi kadar ureum, creatinine, AST (*Aspartate Aminotransferase*), ALT (*Alanine Aminotransferase*) dan ALP (*Alkaline phosphatase*). Berdasarkan uji laboratorium PCR untuk deteksi DNA bakteri, sampel yang diperoleh terdiri dari 16 kasus terkonfirmasi atau positif PCR

Instrumen yang digunakan saat penelitian adalah kuesioner. Variabel yang diamati meliputi gejala klinis pada anjing dan informasi yang berkaitan dengan risiko kejadian *Leptospira* pada anjing oleh pemilik hewan. Informasi yang ditanyakan meliputi a) adanya riwayat terpapar lingkungan yang terkontaminasi, tinggal di daerah banjir sehingga kontak dengan air yang terkontaminasi bakteri *Leptospira* b) kontak erat dengan tikus dalam 7 hari terakhir sebelum sakit c) melakukan aktifitas berburu bangkai hewan di persawahan, perkebunan atau menangkap tikus di sekitar tempat tinggal atau sebagai anjing penjaga kebun, gudang dan bangunan dalam tiga sampai tujuh hari sebelumnya, d) sumber air minum yang digunakan selama pemeliharaan, dan e) riwayat vaksinasi dalam 1 tahun terakhir. Faktor risiko diatas disajikan dalam tabel frekuensi distribusi sebagai data pendukung kriteria anjing suspek leptospirosis.

Hasil pengamatan distribusi karakteristik sampel dalam bentuk tabel dan dianalisis se-

cara deskriptif (Budiharta 2002). Pengukuran faktor risiko dianalisis dengan *univariate*, variabel yang signifikan dengan nilai  $p < 0,250$  dilanjutkan dengan uji regresi logistik *multivariate*. Analisis statistik menggunakan aplikasi IBM SPSS versi 26.0.

### Hasil dan Pembahasan

Penelitian ini merupakan pertama yang dilakukan di Indonesia untuk mengidentifikasi karakteristik kasus leptospirosis pada anjing dan mengukur hubungan atau asosiasi faktor risiko terhadap kasus leptospirosis pada anjing. Penelitian dilakukan di fasilitas pelayanan kesehatan hewan dalam hal ini Rumah Sakit Hewan Ragunan Jakarta Selatan yang mempunyai fasilitas pengujian laboratorium hematologi dan kimia darah memadai, RSH Ragunan sebagai rumah sakit hewan rujukan di wilayah Jakarta dan mempermudah dalam pemilihan *screening* pengambilan sampel. Data mengenai distribusi karakteristik terhadap subjek penelitian dapat dilihat pada Tabel 1.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa anjing jantan memiliki proporsi lebih besar baik dalam kelompok kasus dan kelompok kontrol, anjing dibawah umur satu tahun (*puppy*) terkena kasus *Leptospira* 7/16 ekor (43,75%). Riwayat vaksinasi dari hasil kuesioner rata-rata dari kelompok kasus 11/16 ekor (68,75%) dilakukan

vaksinasi tetapi masih terkena *Leptospira*, hal tersebut harus dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai studi efikasi vaksin dan pengukuran titer antibodi keberadaan vaksin dilapangan. Anjing dipelihara sekitar 14/16 ekor (87,50%) tidak dikandangkan dan dari riwayat dalam kelompok kasus, anjing yang terkena *Leptospira* 11/16 ekor (68,75 %) dalam 3-7 hari sebelumnya ada riwayat kontak dengan hewan pengerat dalam hal ini tikus disekitar tempat tinggalnya.

Selama periode Januari – Agustus 2020 ditemukan 40 anjing suspek leptospirosis yang memenuhi kriteria, 22/40 ekor diantaranya anjing meninggal saat dalam masa perawatan di fasilitas pelayanan kesehatan hewan atau *Case Fatality Rate* (CFR) selama penelitian sebesar (55%). Anjing berasal dari daerah kategori rawan banjir atau berada pada daerah banjir. Pada kelompok kasus sejumlah 15/16 ekor (93,75%). Satu ekor anjing dalam penelitian yang mengkonsumsi air matang. Rata-rata pasien datang di fasilitas Rumah Sakit Hewan merupakan pasien rujukan, data menunjukkan pada kelompok kasus 9/ 16 ekor (56,25%) merupakan pasien rujukan dan 16/24 ekor (66, 67 %) pada kelompok pasien yang terkonfirmasi negatif berdasarkan uji laboratorium PCR. Negatif uji PCR bisa terjadi pada pasien rujukan karena adanya aktifitas pemberian antibiotik di fasilitas pelayanan pertama atau klinik hewan

Tabel 1. Asosiasi antara faktor risiko potensial dan *Leptospira* positif (PCR) (P-value < 0.25)

No	Variabel dan Kategori	Keterangan	Kasus positif PCR	Negatif PCR	OR	95%CI	p-value
1	Jenis Kelamin	Betina Jantan	6 10	2 22	0,152	0,026-0,886	0,024**
2	Umur	<i>Puppy</i> <i>Adult</i>	7 9	6 18	0,429	0,111-1,657	0,215*
3	Riwayat Vaksinasi	Vaksin Tidak Vaksin	11 5	7 17	0,187	0,047-0,741	0,014**
4	Kontak Tikus (3-7 hari)	Ya Tidak	11 5	11 13	2,600	0,689-9,806	0,154*
5	Sumber Air Mineral	Air Matang Air Mentah	1 15	0 24	1,067	0,940-1,211	0,215*

Keterangan : \* = Variabel yang menjadi kandidat dalam uji regresi logistik ( $p < 0,25$ ) ; \*\* = signifikan dengan nilai ( $p < 0,05$ )

sebelumnya, sifat bakteri *Leptospira* yang sangat sensitif terhadap antibiotik membuat DNA *Leptospira* menjadi rendah atau tidak ada sehingga pada pengujian PCR negatif, atau bakteri sudah berinfeksi ke organ, dan penyakit berada pada fase leptospirosis dan menginvasi target organ seperti ginjal yang ditandai dengan gagal ginjal akut dan ke organ hati yang ditandai dengan ikterik pada anjing. Anjing dapat menyebabkan *shedding* bakteri melalui urin. PCR dapat dilakukan pada sampel darah dan urin sebelum pemberian antibiotik karena akan menimbulkan *false negative*, yang mempengaruhi sensitivitas, spesifitas dan nilai prediksi positif karena menghasilkan tes PCR negatif (Schuller et al 2015). Pengujian kasus leptospirosis harus multitest dan komprehensif, hasil PCR harus diinterpretasikan secara hati-hati dengan hasil uji lainnya dalam hal ini *gold standart* MAT dan mempertimbangkan manifestasi klinis pada anjing yang biasanya bersifat individu saat terjadi kasus dilapangan. Pengujian MAT pada kasus leptospirosis dilakukan secara *convalescent* dengan jarak pengambilan satu atau dua minggu (Miller et al 2011; Fraune 2013). Hambatan dalam penelitian ini adalah mendapatkan serum sampel lanjutan, hal ini disebabkan rata-rata anjing mengalami kematian atau sulit dilakukan *tracing* pemeriksaan kembali ke Rumah Sakit Hewan setelah anjing dinyatakan sembuh.

Hasil penelitian menunjukkan signifikan dengan  $p < 0,05$  pada variabel jenis kelamin dan status vaksinasi. Faktor jenis kelamin dengan nilai OR = 0,152 (95% CI = 0,026-0,886), yang artinya anjing betina mempunyai tingkat protektif 84,8 % untuk tidak terkena leptospirosis dibandingkan anjing jantan, hal ini dikarenakan sifat anjing jantan dalam beraktifitas diluar lingkungan dan berpotensi lebih besar untuk terkontaminasi lingkungan dan sanitasi yang buruk. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Azócar-Aedo dan Monti (2016), yang menyatakan kejadian *canine leptospirosis* pada anjing jantan prevalensi lebih tinggi dibandingkan dengan anjing betina. Faktor lain yang berpengaruh adalah peningkatan risiko dapat dijelaskan sebagian oleh peningkatan aktivitas di luar ruangan dan perilaku khusus anjing jantan termasuk mengendus dan menjilat

urin, berpotensi terjadi kontak dan penularan antar anjing (Lopez 2019). Hasil penelitian anjing di Jakarta menunjukkan bahwa anak anjing di bawah 1 tahun dapat berisiko terkena leptospirosis dengan nilai 43,75%. Penelitian di Swiss pada anjing muda 20,50% lebih berisiko terkena leptospirosis, yang diakibatkan adanya paparan berlebih dari lingkungan selama proses sosialisasi atau proses tanggap kebal yang belum sempurna, gangguan kekebalan umum misalnya, akibat malnutrisi atau perkembangan yang buruk (Mayor 2014). Variabel lain adalah status vaksinasi hewan dengan nilai OR= 0,187 (95% CI = 0,047 – 0,741). Vaksin komersial yang ada dilapangan dapat mencegah kejadian leptospirosis pada anjing karena munculnya kekebalan dalam individu anjing. Vaksinasi dapat memblokir transmisi agen *Leptospira* pada anjing ke manusia khususnya serovar *canicola* dan *icterohaemorrhagiae* akibat adanya kontak dekat anjing dan manusia yang mengakibatkan transmisi agen karena adanya paparan urin anjing atau akibat air banjir yang tercemar bakteri *Leptospira* (Natarajaseenivasan 2012).

Hasil uji logistik regresi dilakukan untuk mengetahui seberapa besar variabel independen (faktor yang diduga signifikan terhadap anjing kasus leptospirosis) mempengaruhi variabel dependen yaitu kematian pada anjing. Dari semua variabel bebas dengan analisis univariate yang mempunyai nilai  $p \leq 0.25$  dimasukkan ke persamaan regresi logistik seperti pada Tabel 2. Hasil akhir analisa multivariate bahwa jenis kelamin dan status vaksinasi mempunyai nilai  $p < 0,05$  yang berarti adanya hubungan pengaruh atau interaksi antara kedua variabel dengan kasus *Leptospira* pada anjing. Kontak tikus mempunyai nilai  $p < 0,10$ . Adanya hubungan pengaruh atau interaksi kontak tikus dengan kejadian leptospirosis pada anjing dengan nilai signifikan lebih besar. Kelemahan dalam penelitian ini yaitu pada pelaksanaan pengumpulan data dan kuesioner ke pemilik anjing untuk memastikan kontak tikus harus dibutuhkan pengamatan yang lebih jelas dan spesifik diantaranya anjing kontak dengan tikus, anjing kontak dengan urin atau kotoran yang tercemar atau anjing memakan atau berburu tikus pada saat pemeliharaan.



Gambar 1. Anjing dalam penelitian dengan gejala klinis yang menyertai yaitu demam, muntah, diare, myalgia dan ikterik menunjukkan suspek leptospirosis

Tabel 2. Hasil akhir analisa regresi logistik hubungan faktor risiko terhadap kejadian *Leptospira* pada anjing

No	Variabel dan Kategori	<i>b</i>	<i>SE</i>	OR	p-value	95%CI
1	Jenis Kelamin		1,071	0,119	0,047	0,015-0,973
2	Riwayat Vaksin		0,791	0,176	0,028	-0,037-0,829
3	Kontak Tikus		0,836	4,057	0,094	0,788-20,874

Tingkat mortalitas dalam penelitian ini mencapai 55,00%, oleh karena itu pemilihan pengobatan terapi harus dilakukan dengan tepat dalam pemberian antibiotik. Ampisilin 500 mg setiap 6 jam atau doksisisiklin 100 mg pemberian dua kali sehari dapat digunakan untuk terapi leptospirosis ringan, sedangkan untuk kasus berat dapat digunakan Penisilin G 1,5 MU secara intravena setiap 6 jam (Edwards 2004; Eric 2015).

Penelitian untuk deteksi *Leptospira* pada anjing dapat dikategorikan menjadi beberapa tahapanataulangkahagarkasustertanganidengan tepat yaitu: Tahapan awal berupa diagnosa dini yang tepat dari gejala tidak spesifik dan spesifik pada kasus *Leptospira* pada anjing didukung pemeriksaan minimal hematologi ditandai adanya leukositosis dan thrombocytopenia. Tahapan selanjutnya dilakukan pengujian kimia darah, pengukuran kadar ureum, kreatinin, AST, ALT dan ALP terjadi peningkatan dari nilai normal akan berkontribusi memberikan data dukung sehingga menurunkan tingkat mortalitas dan mencapai kesembuhan. Tahapan konfirmasi dilakukan uji laboratorium berupa serologis dan molekuler untuk karakterisasi bakteri

dan jenis serovar yang menginfeksi. Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk identifikasi karakteristik bakteri *Leptospira* pathogen pada anjing dan faktor risiko kejadian leptospirosis.

### Kesimpulan

Tingkat mortalitas kasus leptospirosis pada anjing dalam penelitian sebesar 55,00%, dalam studi ini menemukan faktor risiko potensial signifikan melalui analisis *multivariate* yaitu jenis kelamin dan riwayat vaksinasi dengan nilai *p-value* < 0,05, kontak tikus nilai *p-value* < 0,10 yang berasosiasi dengan kejadian leptospirosis pada anjing.

### Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada Badan Pengembangan Sumber daya Manusia Kementerian Pertanian Republik Indonesia, Rumah Sakit Hewan Jakarta di Ragunan (Drh Hamdi, Drh Topan dan Tim), Praktek Drh. Mandiri (Drh. Made, Drh. Imox, Drh. Anik dan Drh Yudi).

### Daftar Pustaka

Azócar Aedo L, Monti G. 2015. Meta-Analyses of Factors Associated with Leptospirosis

- in Domestic Dogs. *Zoonoses Public Health*. 63. doi:10.1111/zph.12236
- Budiharta, S dan Suardana I.W. (2002). *Epidemiologi dan Ekonomi Veteriner*. Penerbit Udayana Bali. <https://scholar.google.co.id/scholar?oi=bibs&cluster=9628917383055217777&btnI=1&hl=en> javascript:void(0).
- Collantes TM, David J, Vergara E, Armea S, and Flores M. 2016. Detection of Pathogenic Leptospire and Analysis of Factors and Clinical Signs Associated With Canine Leptospirosis. *Philippine Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 42(1) 41–48
- Desvars A, Cardinale E, Michault, A. (2011). Animal leptospirosis in small tropical areas. *Epidemiology and Infection*, Vol.139(2):167-188.
- Edwards, C. N., & Levett, P. N. (2004). Prevention and treatment of leptospirosis. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 2(2), 293–298. <https://doi.org/10.1586/14787210.2.2.293>
- Eric Klaasen, H. L., & Adler, B. (2015). Recent advances in canine leptospirosis: focus on vaccine development. *Veterinary medicine (Auckland, N.Z.)*, 6, 245–260. <https://doi.org/10.2147/VMRR.S59521>
- Fraune, C. K., Schweighauser, A., & Francey, T. (2013). Evaluation of the diagnostic value of serologic microagglutination testing and a polymerase chain reaction assay for diagnosis of acute leptospirosis in dogs in a referral center. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 242(10), 1373–1380. <https://doi.org/10.2460/javma.242.10.1373>
- Garba B, Bahaman AR, Bejo SK, Zakaria Z, Mutalib AR, and Bande F. (2018). Major epidemiological factors associated with leptospirosis in Malaysia. In *Acta Tropica* 178:242-247. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.12.010>
- Gasem, M. H., Hadi, U., Alisjahbana, B., Tjitra, E., Hapsari, M., Lestari, E. S., Aman, A. T., Lokida, D., Salim, G., Kosasih, H., Merati, K., Laras, K., Arif, M., Lukman, N., Sudarmono, P., Lisdawati, V., Lau, C. Y., Neal, A., & Karyana, M. (2020). Leptospirosis in Indonesia: diagnostic challenges associated with atypical clinical manifestations and limited laboratory capacity. *BMC infectious diseases*, 20(1), 179. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-4903-5>
- Goh, S. H., Ismail, R., Lau, S. F., Megat Abdul Rani, P. A., Mohd Mohidin, T. B., Daud, F., Bahaman, A. R., Khairani-Bejo, S., Radzi, R., & Khor, K. H. (2019). Risk Factors and Prediction of Leptospiral Seropositivity Among Dogs and Dog Handlers in Malaysia. *International journal of environmental research and public health*, 16(9), 1499. <https://doi.org/10.3390/ijerph16091499>
- Gutierrez, L., Mendoza, J., Rangel, A. B., Tapia, G., Bernad, M. J., & Sumano, H. (2019). Outpatient Clinical Trial in Dogs With Leptospirosis Treated With Enrofloxacin Hydrochloride-Dihydrate (ENRO-C). *Frontiers in veterinary science*, 6, 360. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00360>
- Harkin KR. (2012). Canine leptospirosis: A perspective on recent trend. *Today Veterinary Practice* 2(4): 27-33.
- [Kemenkes] Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. (2019). *Profil Kesehatan Indonesia 2018*. Jakarta
- Knopfler, S., Mayer-Scholl, A., Luge, E., Klopffleisch, R., Gruber, A. D., Nockler, K., & Kohn, B. (2017). Evaluation of clinical, laboratory, imaging findings and outcome in 99 dogs with leptospirosis. *The Journal of small animal practice*, 58(10), 582–588. <https://doi.org/10.1111/jsap.12718>
- López, M. C., Vila, A., Rodón, J., & Roura, X. (2019). *Leptospira* seroprevalence in owned dogs from Spain. *Heliyon*, 5(8), e02373. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02373>
- McCallum, K. E., Constantino-Casas, F., Cullen, J. M., Warland, J. H., Swales, H., Lingham, N., Kortum, A. J., Sterritt, A. J., Cogan, T., & Watson, P. J. (2019). Hepatic

- Leptospiral* infections in dogs without obvious renal involvement. *Journal of veterinary internal medicine*, 33(1), 141–150. <https://doi.org/10.1111/jvim.15340>
- Major, Andrea & Schweighauser, Ariane & Francey, Thierry. (2014). Increasing Incidence of Canine Leptospirosis in Switzerland. *International journal of environmental research and public health*. 11. 7242-60. 10.3390/ijerph110707242
- Miller M, Annis K, Lappin MR, Lunn KF. (2011). Variability in Results of the Microscopic Agglutination Test in Dogs with Clinical Leptospirosis and Dogs Vaccinated against Leptospirosis. *J Vet Intern Med*. 25:426–432. doi:10.1111/j.1939-1676.2011.0704.x.
- Natarajaseenivasan K. (2012). Humoral Immune Response of Inactivated Bivalent *Leptospira* Vaccine among Dogs in Tiruchirappalli, Tamilnadu, India. *World J Vaccines*. 2:85–90. doi:10.4236/wjv.2012.22011.
- Nilufer Aytug. (2004). Leptospirosis an Alarm Disease. World Small Animal Veterinary Association World Congress (WSAVA). *Proceeding*. Rhodes. Greece
- Reagan, K. L., & Sykes, J. E. (2019). Diagnosis of Canine Leptospirosis. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 49(4), 719–731. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2019.02.008>
- Schuller S, Francey T, Hartmann K, Hugonnard M, Kohn B, Nally JE, Sykes J. (2015). European consensus statement on leptospirosis in dogs and cats. *J Small Anim Pract*. 56(3):159–179. doi:10.1111/jsap.12328.
- Sykes, J. E., Hartmann, K., Lunn, K. F., Moore, G. E., Stoddard, R. A., & Goldstein, R. E. (2011). 2010 ACVIM small animal consensus statement on leptospirosis: diagnosis, epidemiology, treatment, and prevention. *Journal of veterinary internal medicine*, 25(1), 1–13. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2010.0654.x>

## Gangguan Pertumbuhan Organ Limfoid Ayam Broiler yang Menderita Omfalitis

### *The Growth Impairment of Broiler Chicken Lymphoid Organs with Omphalitis*

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

Department Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Univeritas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

\*E-mail: bambangsutrisno@mail.ugm.ac.id

Naskah diterima: 8 Oktober 2020, direvisi: 3 Juni 2021, disetujui: 22 November 2021

#### Abstract

This study aimed to observe the growth impairment of primary and secondary lymphoid tissues suffering from omphalitis through histopathologic examination stained with routine hematoxylin-eosin and immunohistochemical staining streptavidin biotin towards interleukin-10 (IL-10) in young chicken. In this study, 24 broiler day old chicken (DOC) were used and collected from a hatchery in Central Java, Indonesia. All DOC were divided into two groups consist of 12 DOC (Group A) and 12 omphalitic DOC (Group B) respectively. All DOC were looked after in different cages, fed, and drunk at libitum. At day 3, 6 and 9, four out of chicken from each group were weighed and then necropsied. The tymus, bursa of Fabricius, and spleens were then collected and weighed. All tissues were processed histopathologically with routine hematoxylin-eosin and immunohistochemical streptavidin biotin stains. The weight index data of spleen, bursa of Fabricius, and tymus were analysed using the SPSS version 22 IBM statistical program. The results showed that the weight indexes of spleen, bursa of Fabricius and thymus of omphalitic chicken (Group B) were lower than that of the healthy chicken (Group A). Thymus weight index was significantly different ( $P < 0,05$ ). The histopathological lesions in the lymphoid organs were observed in all chicken in Group B. The lesions were characterized by depletion and necrosis of the lymphocytes. The chicken from Group A did not have any changes in the lymphoid organs. The immunostaining streptavidin biotin with polyclonal antibody anti IL-10 expression of bursa of Fabricius in the omphalitic chicken (Group B) had very little IL-10 compared to the healthy chicken (Group A). In conclusion, the omphalitis caused significant decreases of weight index and impaired growth of lymphoid organs characterized by depletion and necrosis lymphocytes.

**Keywords:** broiler DOC; hematoxylin-eosin; immunohistochemical streptavidin biotin; lymphoid organs; omphalitis

#### Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk melihat gangguan pertumbuhan jaringan limfoid primer dan sekunder yang menderita omphalitis dengan pemeriksaan histopatologi diwarnai dengan pewarnaan hematoksilin-eosin rutin dan pewarnaan imunohistokimia streptavidin biotin terhadap interleukin-10 (IL-10) pada ayam muda. Ayam umur 24 hari (DOC) broiler digunakan dan dikumpulkan dari tempat penetasan yang sama di Jawa Tengah di Indonesia. Semua 24 DOC dibagi menjadi dua kelompok yang masing-masing terdiri dari 12 DOC sehat (Grup A) dan 12 omfalitik DOC (Grup B). Semua DOC dirawat di kandang yang berbeda, diberi makan dan diminum di libitum. Pada hari ke 3, 6 dan 9, empat ekor ayam dari masing-masing kelompok ditimbang untuk kemudian dinekropsi. Timus, bursa Fabricius dan limpa dikumpulkan dan ditimbang. Semua jaringan diproses secara histopatologi dengan pewarnaan hematoksilin-eosin rutin dan pewarnaan biotin streptavidin imunohistokimia imunopatologi. Data indeks berat limpa, bursa Fabricius dan timus dianalisis menggunakan program statistik IBM SPSS versi 22. Hasil penelitian menunjukkan bahwa indeks bobot limpa, bursa Fabricius dan timus ayam omfalitik (kelompok B) lebih rendah dibandingkan dengan indeks bobot ayam sehat (kelompok A). Indeks



berat timus berbeda nyata ( $P < 0,05$ ). Lesi histopatologis pada organ limfoid diamati pada semua ayam di Grup B. Lesi ditandai dengan nekrosis dan berkurangnya jumlah limfosit. Ayam dari Grup A tidak mengalami perubahan pada organ limfoid. *Streptavidin biotin immunostaining* dengan ekspresi antibodi poliklonal anti IL-10 pada bursa Fabricius pada ayam omfalitik (Grup B) memiliki IL-10 yang sangat sedikit jika dibandingkan dengan ayam sehat (Grup A). Kesimpulan, omfalitis menyebabkan penurunan indeks berat badan yang signifikan dan gangguan pertumbuhan organ limfoid yang ditandai dengan deplesi dan nekrosis limfosit.

**Kata kunci:** streptavidin biotin imunohistokimia; DOC broiler; hematoksilin-eosin; omphalitis; organ limfoid

## Pendahuluan

Omfalitis atau penyakit ayam lembek adalah peradangan pada kantung kuning telur dan disertai dengan tali pusat (pusar) yang tidak sembuh karena infeksi (Shahjada *et al.*, 2017). Bahkan kejadian infeksi selalu melibatkan keduanya karena kantung kuning telur dan tali pusat terletak menyatu. Proses infeksi dapat terjadi akibat penutupan tali pusat yang tidak tuntas pada saat inkubasi, walaupun hal ini sangat jarang. Infeksi juga dapat terjadi secara *in ovo* jika ayam mengalami inflamasi pada saluran telur (salpingitis), radang saluran telur ovarium (ooforitis) atau mengikuti inseminasi buatan pada ayam betina. Meskipun demikian, omfalitis umumnya terjadi karena kondisi di tempat penetasan yang tidak higienis dan terkontaminasi oleh bakteri dari cangkang telur di peternakan *broiler breeder* dari kotoran kandang unggas. *Litter* dapat berperan sebagai sumber utama kontaminasi bakteri atau funggal (Ahmed *et al.*, 2012). Omfalitis merupakan penyebab utama kematian ayam pada minggu pertama karena bakteri menembus cangkang telur yang berpori sehingga dalam kondisi inkubasi cocok untuk pertumbuhan bakteri (El-Sawah *et al.*, 2016). Beberapa bakteri seperti *Streptococcus spp.*, *Escherichia coli*, *Proteus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Pasteurella spp.*, *Klebsiella spp.* (Jalob *et al.*, 20015) dan *Salmonella spp.*, (Shahjada *et al.* 2017 dan Saad *et al.*, 2017) telah diisolasi dari kantung kuning telur ayam yang terinfeksi. Di antara jenis bakteri di atas, *E.coli* adalah yang paling sering terisolasi dari kantung kuning telur yang berkaitan dengan kejadian omfalitis pada ayam sekitar 51% - 57% (Khalifa *et al.* 2013 dan Amare *et al.*, 2013). Pemeriksaan ayam umur sehari (DOC) oleh pekerja di

pembibitan biasanya terbatas pada ayam yang secara klinis menunjukkan gejala lemah dan pincang, tetapi ayam omfalitis yang secara klinis sehat masih lolos dari petugas, sehingga kejadian penyakit terjadi pada peternakan komersial. Menurut Fassenko dan O'Dea (2008), performa ayam yang tidak optimal akibat omfalitis disebabkan oleh infeksi subklinis sehingga nutrisi yang seharusnya digunakan untuk pertumbuhan dikerahkan untuk melawan infeksi. Selain itu, bakteri penyebab omfalitis menyebabkan perubahan komposisi protein sehingga nutrisi esensial menjadi rusak dan tidak dapat digunakan untuk pertumbuhan (Rai *et al.*, 2005). Kuning telur diabsorpsi secara simultan melalui tali pusat (*yolk stalk*) dan pembuluh darah setelah telur menetas (Esteban *et al.*, 1991; Noy dan Sklan, 1998). Pada umur muda kantung kuning telur sangat penting untuk perkembangan sistem pencernaan dan respon imun pada ayam broiler (Osama *et al.*, 2013). Selama 3 hari terakhir inkubasi terjadi peningkatan suplai darah embrionik pada usus halus yang menyebabkan peninggian vili usus, sehingga permukaan vili cukup untuk penyerapan nutrisi dan juga peningkatan berat usus (Uni *et al.*, 2003). Periode umur 3 hari juga merupakan masa kritis untuk perkembangan usus (Geyra *et al.*, 2001). Pertumbuhan usus ayam terjadi sangat cepat selama 24 jam setelah mengkonsumsi karbohidrat (Uni *et al.*, 2000 dan Sklan, 2001). Pertumbuhan usus ini penting karena berhubungan dengan penyerapan nutrisi dan pertumbuhan pasca penetasan. Perkembangan organ limfoid seperti timus, bursa Fabricius, dan limpa dimulai pada hari ke-10 embrio hingga hari ke-14 atau ke-15 masa embrio pada ayam kampung dan pada hari ke-20 masa embrio untuk ayam negeri (Islam *et al.*, 2017). IgM positif teridentifikasi di bursa

Fabricius pada hari ke-10 dan di pulpa putih lien pada hari ke-14 selama perkembangan embrio ayam. Sedangkan imunoglobulin (Igs) limfosit terdeteksi pada hari ke-8 sampai ke-20 pada embrio ayam. IgG positif pertama kali muncul di bursa Fabricius dan limpa pada hari ke-20 perkembangan embrio (Islam *et al.*, 2013). Seiring dengan perkembangan tersebut, ekspresi gen interleukin 4 (IL-4), interleukin 10 (IL-10), interleukin 18 (IL-18) dan interferon  $\gamma$  yang dapat terdeteksi paling dini pada 12 hari perkembangan embrio dan meningkat hingga mencapai puncaknya pada 7 hari setelah menetas (Abdul-Careem *et al.*, 2007). Studi gangguan pertumbuhan vili intestinum pada ayam *broiler* yang menderita omfalitis telah banyak dilakukan (Kawalilak *et al.*, 2010), namun studi gangguan pertumbuhan organ limfoid pada ayam broiler akibat omfalitis belum pernah dilaporkan.

### Materi dan Metode

Bahan penelitian menggunakan ayam broiler umur sehari (DOC) sebanyak 24 ekor yang terdiri atas 12 ekor ayam menderita omfalitis dan 12 ekor ayam sehat. Antibodi IL-10 (Bioss Antibody) dan bahan buffer buffer formalin 10%, dan bahan pembuatan preparat histopatologi seperti etanol bertingkat, xilol, parafin dan lain-lain digunakan untuk pemrosesan jaringan.

Alat yang digunakan adalah kandang untuk peliharaan ayam, alat untuk pembuatan preparat histopatologi seperti prosesing jaringan (Leica, Jerman), *floating bath* (perentang jaringan) (American Optical, USA), *tissue embedding centre* (American Optical, USA), mikrotom putar (Yamato, Jepang), dan mikroskop yang dilengkapi dengan kamera (Olympus, Jepang).

### Desain eksperimental

Penelitian ini menggunakan 24 ekor ayam umur 1 hari (DOC) broiler yang berasal dari tempat penetasan yang sama di Jawa Tengah di Indonesia. Seluruh sampel DOC dibagi menjadi dua kelompok yang masing-masing terdiri dari 12 DOC sehat (Grup A) dan 12 DOC omfalitis (Grup B). Semua DOC dirawat di kandang yang berbeda, diberi makan dan diminum di libitum. Pada hari ke 3, 6 dan 9, empat ekor ayam dari masing-masing kelompok ditimbang untuk

kemudian dinekropsi. Selanjutnya semua organ limfoid seperti timus, bursa Fabricius, dan limpa diambil dan kemudian ditimbang beserta berat badan ayam. Penimbangan tersebut dilakukan untuk mendapatkan indeks bobot organ limfoid.

### Pemeriksaan indeks berat organ limfoid

Penentuan indeks berat organ limfoid seperti bursa Fabricius, timus, dan limpa dilakukan dengan menimbang masing-masing berat badan, berat organ limfoid, bursa Fabricius timus, dan limpa seperti dilansir (Hartati, *et al.*, 2015) sebagai berikut:

$$\text{Berat Indeks Organ Limfoid} = \frac{\text{Berat Organ Limfoid}}{\text{Berat Ayam}}$$

dimana:

Bobot organ limfoid = bobot tiap organ limfoid  
Bobot Ayam = bobot tiap ayam

### Pemeriksaan jaringan dan gambaran histopatologi

Semua organ limfoid diambil sampelnya dan difiksasi ke dalam larutan *buffered formalin* 10% selama 72 jam. Semua sampel dipotong dan diproses dalam pengolah jaringan (Leica, Jerman). Pemrosesan dilanjutkan dengan penanaman jaringan dalam blok parafin di pusat penyematan jaringan (American Optical, USA), dan pemotongan di mikrotom dengan ketebalan 5  $\mu\text{m}$ . Pewarnaan dilakukan dengan hematoxylin dan eosin (HE) dan imunohistokimia dengan antibodi anti-IL-10 yang kemudian diperiksa di bawah mikroskop (Olympus, Jepang).

### Analisis Hasil

Kajian indeks berat badan organ limfoid dirancang dengan menggunakan rancangan multifaktorial 2 x 3 dan dianalisis dengan menggunakan statistik ANOVA program SPSS versi 22. Pemeriksaan histopatologi dan imunohistokimia dianalisis dengan metode deskriptif kualitatif.

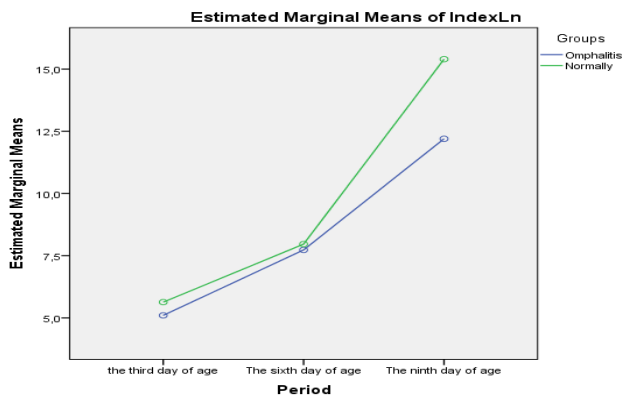
## Hasil dan Pembahasan

### Indeks berat organ limfoid

Pemeriksaan indeks berat organ limfoid dimaksudkan untuk mengetahui bagaimana

perkembangan organ limfoid khususnya bursa Fabricius, timus dan limpa yang berhubungan dengan kejadian omfalitis. Indeks bobot dipilih untuk menghindari bias karena ukuran ayam yang tidak seragam, dengan harapan indeks bobot organ limfoid dapat mewakili perkembangan limfoid itu sendiri.

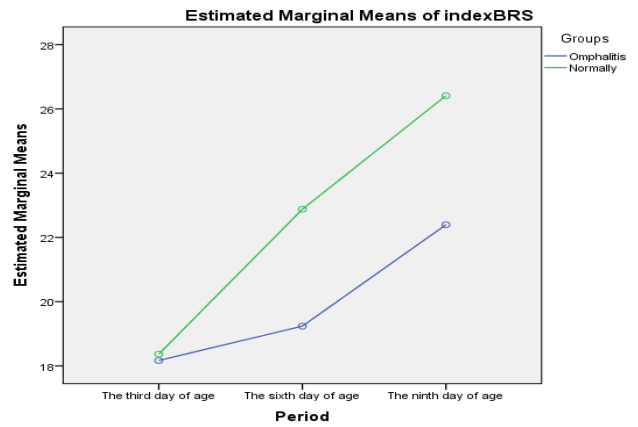
Pemeriksaan indeks berat limpa tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna ( $P > 0,05$ ), tetapi terdapat kecenderungan perbedaan indeks berat badan ayam yang menderita omfalitis dan sehat. Nilai indeks berat limpa pada penelitian ini menunjukkan bahwa organ limpa tidak mampu berkembang sesuai dengan perkembangannya akibat omfalitis. Hal ini dapat dibuktikan melalui grafik perkembangan limpa. Pada ayam yang mengalami omfalitis pada umur setelah menetas cenderung lebih rendah



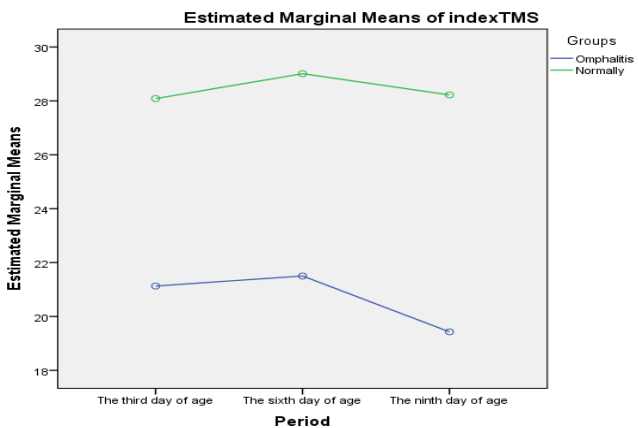
Gambar 1. Grafik perkembangan indeks bobot limpa ayam broiler omfalitis sembilan hari setelah menetas

Pemeriksaan bursa indeks berat bursa Fabricius juga menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan ( $P > 0,05$ ) antara ayam omfalitis dan normal, meskipun ada kecenderungan bursa Fabricius yang berasal dari ayam omfalitis menunjukkan indeks yang lebih rendah seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.

Pemeriksaan indeks berat timus agak berbeda dengan indeks berat limpa dan bursa Fabricius, analisis statistik indeks berat timus menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $P < 0,05$ ) antara ayam yang menderita omfalitis dan ayam normal. Indeks berat timus ayam omfalitis lebih rendah dari ayam normal seperti yang ditunjukkan pada Gambar 3.



Gambar 2. Grafik perkembangan indeks bobot tumbuh bursaFabricius ayam broiler omfalitis sembilan hari setelah menetas

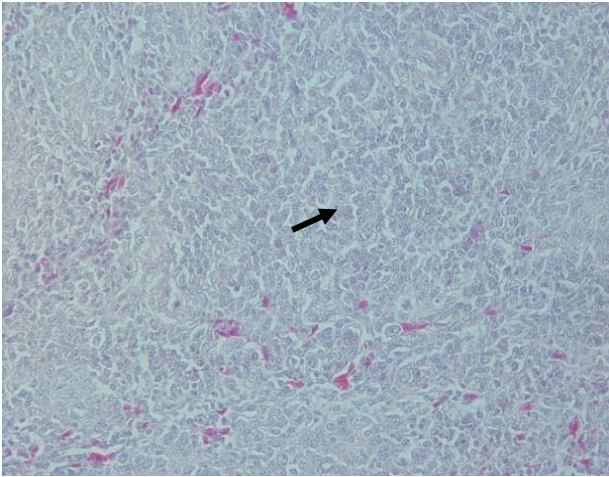


Gambar 3. Grafik perkembangan indeks bobot timus ayam broileromfalitis sembilanhari setelah menetas

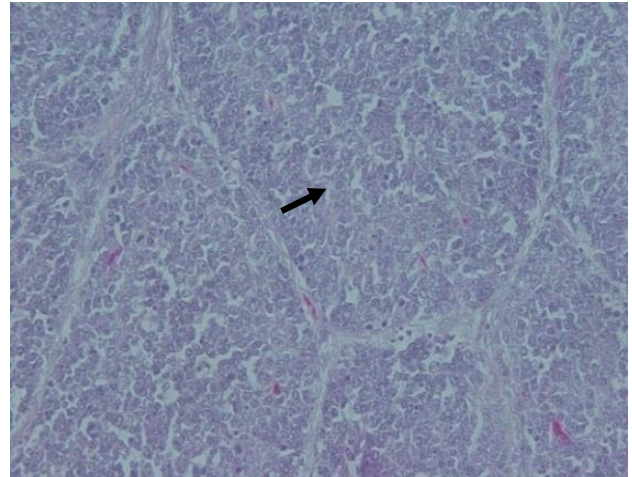
### Secara histopatologi organ limfoid

Gambaran histopatologi organ limfoid primer dan sekunder untuk memperkuat hasil indeks bobot organ limfoid, hasil penelitian menunjukkan bahwa organ limfoid primer dan sekunder ayam penderita omfalitis telah mengalami nekrosis limfosit, sehingga limfosit yang terkandung di dalamnya berkurang, hal ini sangat berbeda dengan hasil pengamatan organ limfoid ayam sehat ,yang menunjukkan rata-rata organ limfoid berkembang dengan baik sampai hari kesembilan setelah menetas.

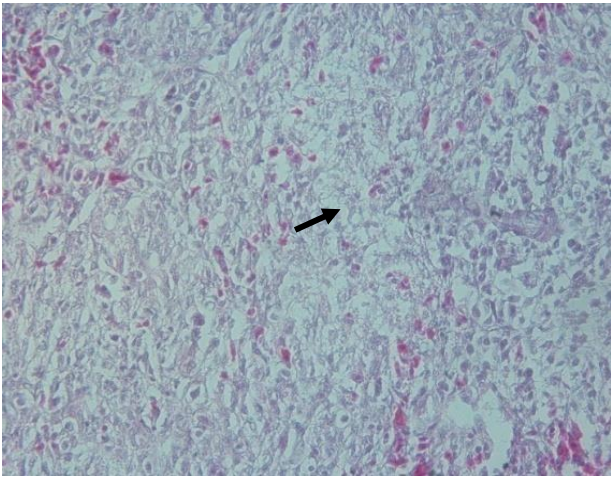
Pemeriksaan organ limpa pada ayam omfalitis menunjukkan nekrosis limfosit pada pulpa putih, sehingga hanya mengandung sedikit limfosit seperti terlihat pada Gambar 5., sedangkan ayam normal sebagai pembanding menunjukkan limfosit masih normal pada pulpa putih. dari limpa,limfosit tampak padat seperti yang ditunjukkan Gambar 4.



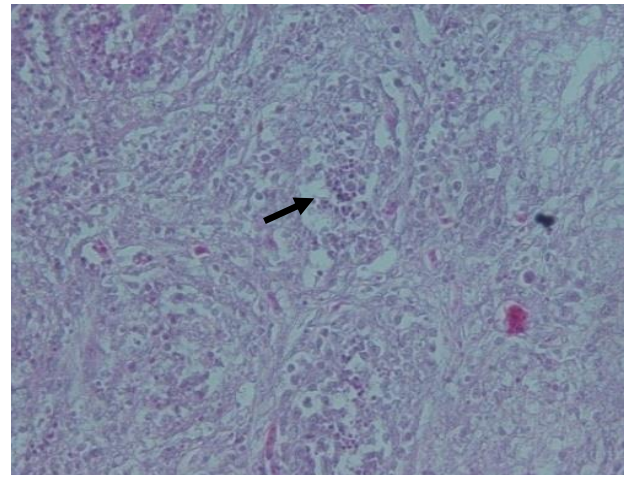
Gambar 4. Limpa ayam normal, terdapat gugusan limfosit pada pulpaputih (anak panah)



Gambar 6. Bursa Fabricius ayam normal terlihat folikel besar berisi penuh dengan limfosit (anak panah)



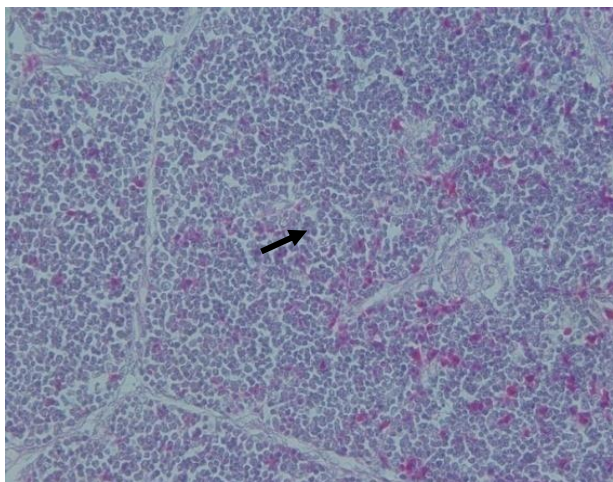
Gambar 5. Limpa ayam omfalitis, ditemukan banyak ruang-ruang kosong dan limfosit yang jarang pada pulpa putih (anak panah)



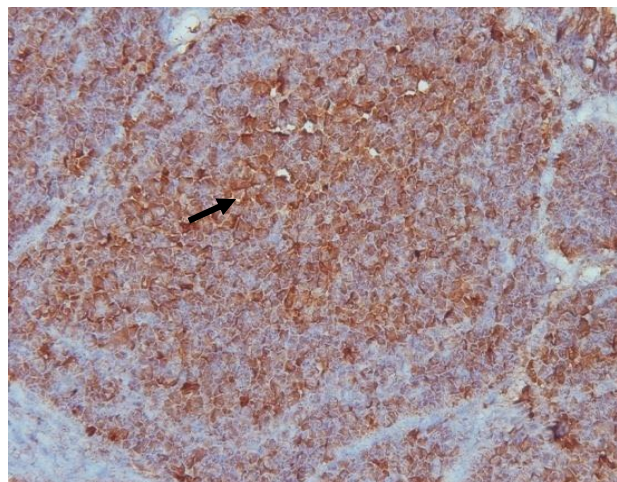
Gambar 7. Bursa Fabricius ayam omfalitis terlihat atrofi folikel dan banyak limfosit deplesi (anak panah)

Gambaran histopatologi bursa Fabricius pada ayam omfalitis dengan rata-rata menunjukkan deplesi dan nekrosis limfosit baik pada korteks maupun medula folikel limfoid, sehingga folikel bursa Fabricius tidak berkembang dengan baik bahkan cenderung mengalami atrofi seperti pada gambar (Gambar 7). Pemeriksaan bursa fabricius pada ayam kelompok normal sebagai pembandingan terlihat folikel limfoid masih mengandung limfosit yang masih tampak padat baik di korteks maupun di medula. Hal ini menunjukkan bahwa ayam yang tidak menderita omfalitis (normal), bursaFabricius berkembang secara normal terlihat seperti gambar (Gambar 6).

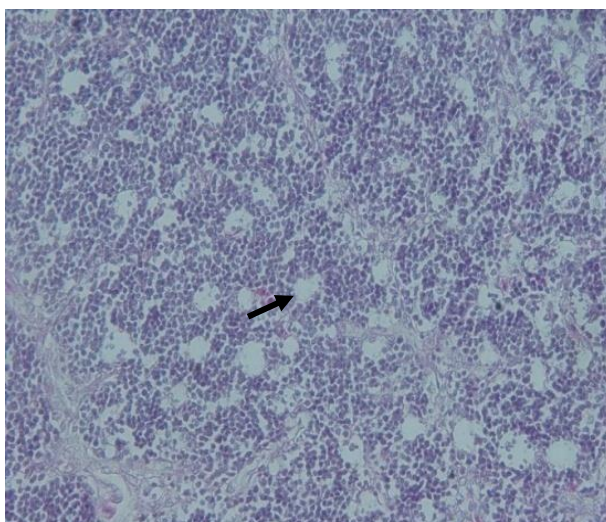
Gambaran histopatologi organ timus pada kelompok ayam omfalitis menunjukkan perubahan yang mirip dengan organ limpa dan bursa Fabricius, deplesi dan nekrosis limfosit pada korteks timus seperti terlihat pada Gambar 9., ditandai dengan vakuolisasi pada area korteks timus. Deplesi dan nekrosis mengakibatkan berkurangnya jumlah limfosit di korteks, sehingga terjadi atrofi pada organ timus. Deplesi terjadi pada hampir semua ayam omfalitis sejak umur hari ketiga sampai umur hari kesembilan penelitian. Sebagai perbandingan, organ timus kontrol normal menunjukkan korteks timus tampak limfosit tersusun lebih padat dan tidak terlihat vakuolisasi(Gambar 8).



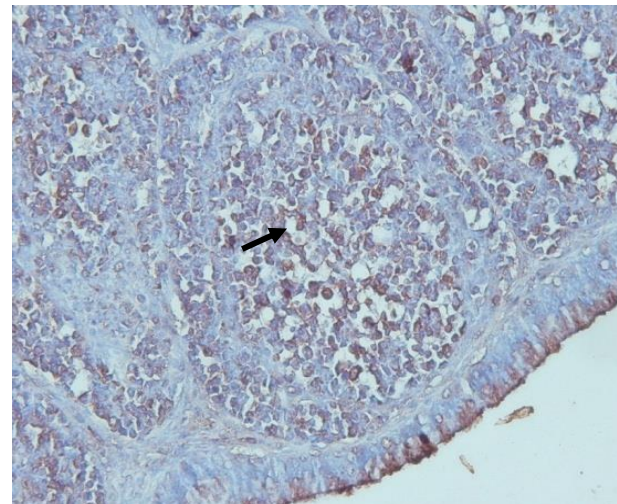
Gambar 8. Timus ayam normal terlihat limfosit tersusun lebih padat di korteks (anak panah)



Gambar 10. Bursa Fabricius ayam normal terlihat folikel besar terlihat berisi penuh dengan limfosit dan ekspresi IL-10 (anak panah)



Gambar 9. Timus ayam omfalitis terlihat banyak limfosit deplesi, sehingga bagian kortikal mengalami banyak vakuolisasi (anak panah)



Gambar 11. Bursa Fabricius ayam omfalitis terlihat atrofi folikel dengan banyak limfosit deplesi (vakuolisasi), dan ekspresi minimal IL-10 (anak panah)

### Ekspresi Interleukin-10

Perkembangan organ limfoid ayam pada embrional dan awal kehidupan setelah menetas juga diiringi dengan ekspresi gen interleukin 4 (IL-4), interleukin 10 (IL-10), interleukin 18 (IL-18) dan interferon  $\gamma$ . Ekspresi Interleukin-10 ayam omfalitis pada penelitian ini menunjukkan ekspresi minimal pada limfosit bursa Fabricius seperti terlihat pada Gambar 11. Berbeda dengan ayam kontrol (ayam sehat) pada penelitian ini justru menunjukkan ekspresi interleukin-10 maksimal pada organ yang sama (lihat Gambar 10).

Bobot limpa, bursa Fabricius dan timus sangat dipengaruhi oleh kandungan limfosit di dalam organ tersebut dengan penambahan

limfosit di dalam dan bobot organ bertambah. Jumlah limfosit pada organ tersebut dipengaruhi oleh beberapa faktor: Faktor pertama adalah penyakit. Penyakit dapat menyebabkan kerusakan limfosit atau bahkan kematian limfosit yang mengakibatkan jumlah limfosit berkurang sehingga bobot organ limfoid juga berkurang. Faktor kedua adalah imunomodulator emperian imunomodulator pada ayam yang telah divaksinasi menunjukkan kepadatan limfosit tinggi pada organ limfoid dan meningkatkan bobot organ limfoid (Hartati *et al.*, 2015). Indeks berat organ limfoid pada ayam omphalitis lebih rendah dibandingkan ayam sehat karena terjadi kematian atau kerusakan sejumlah limfosit pada folikel. Kematian atau deplesi limfosit yang terdapat di dalam organ limfoid mengakibatkan

penurunan indeks berat organ limfoid seperti terlihat pada Gambar 1,2 dan 3. Perubahan tersebut serupa dengan penelitian bahwa infeksi *E.coli* dengan  $10^7$ cfhu/0,5 ml pada ayam broiler menyebabkan deplesi limfosit di bursa Fabricius dan limpa sehingga terjadi atrofi pada organ tersebut (Sharma et al., 2016). Pendapat ini didasarkan pada anggapan bahwa omfalitis merupakan infeksi pada tali pusar ayam muda baru menetas yang mengakibatkan terjadinya gangguan penyerapan nutrisi dari kuning telur dan berdampak kurangnya nutrisi untuk perkembangan usus yang selanjutnya berakibat pada gangguan perkembangan organ limfoid termasuk timus. Infeksi *E. coli ekstra intestinal (ExPEC)* ayam broiler menyebabkan jaringan limfoid primer terjadi peningkatan kuat fagosom, lisosom dan sitokin serta menurunkan reseptor sel T (TCR), siklus sel, dan pensinyalan P53 pada timus serta menekan reseptor sel B (BCR) di bursa Fabricius secara signifikan (Sun et al., 2016).

Deplesi dan nekrosis limfosit kelompok ayam omfalitis, membuktikan bahwa infeksi bakteri pada ayam menyebabkan terhambatnya perkembangan organ limfoid terutama limpa, bursa Fabricius dan timus, hal ini juga telah dibuktikan oleh Sharma et al.(2016) bahwa infeksi organisme patogen dapat menyebabkan nekrosis atau atrofi organ limfoid yang ditandai dengan berkurangnya populasi limfosit. BursaFabricius tidak akan memproduksi antibodi secara maksimal untuk perlindungan terhadap patogen. Pendapat ini didokumentasikan oleh peneliti Qureshi et al., 1998) bahwa terdapat nekrosis limfosit pada folikel limfoid yang tidak mampu memproduksi titer antibodi secara maksimal bahkan cenderung menghasilkan titer antibodi yang rendah pada bursa Fabricius. Data pemeriksaan ini memperkuat hasil indeks bobot bursa Fabricius ayam sebelumnya yang memang menunjukkan grafik indeks bobot bursa Fabricius omfalitis lebih rendah dari pada ayam normal.

Interleukin-10 merupakan sitokin yang meningkat secara alami pada organ limfoid sesuai dengan perkembangan embryonal hingga menetas, ekspresi gen IL-10 dapat dideteksi pada embrio ayam pada hari ke-12 dan secara bertahap meningkat hingga puncaknya pada

hari ke-7 hingga hari ke-14 setelah menetas (Abdul-Careem et al., 2007). Hasil penelitian menunjukkan ekspresi IL-10 pada folikel bursa Fabricius ayam sehat lebih maksimal jika dibandingkan dengan ayam omfalitis seperti terlihat pada Gambar.10 dan 11, hal ini berbeda dengan studi yang dilakukan oleh Arendt et al.(2016).Studi tersebut menunjukkan bahwa infeksi *Emeria* pada ayam dapat meningkatkan ekspresi interleukin-10 pada limfosit usus. nfeksi protozoa, infeksi virus, dan bakteri juga dapat meningkatkan ekspresi IL-10 (Parvizi et al., 2015 dan Barjesteh et al., 2013). Penurunan ekspresi IL-10 pada ayam omfalitis pada ayam yang masih muda sangat dipengaruhi oleh kepekaan ayam terhadap infeksi mikroorganisme pada usia dini. Anak ayam yang lebih dewasa tampaknya lebih toleran terhadap infeksi sehingga meningkatkan ekspresi IL-10.

### Kesimpulan

Kejadian omfalitis pada ayam broiler menyebabkan penurunan indeks berat organ limfoid dan menyebabkan gangguan pertumbuhan organ limfoid yang ditandai dengan deplesi dan nekrosis limfosit serta ekspresi minimal IL-10. Hasil ini dapat menggambarkan dampak penyakit omfalitis terhadap perkembangan ayam, sehingga dapat segera mengafkir apabila terdapat kejadian omfalitis pada DOC.

### Ucapan Terima Kasih

Kami mengucapkan terima kasih kepada Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada yang telah memberikan dana insentif Penelitian BPPTN FKH UGM dan izin untuk melakukan penelitian.

### Daftar Pustaka

- Abdul-Careem, M.F., Hunter, D.B., Lambourne, M.D., Barta, J. and Sharif, S. (2007). Ontogeny of Cytokine Gene Expression in The Chicken Spleen. *Poultry Science*. 86: 1351-1355.
- Ahmed, Z.A.M., Sendik, M., Alharery, M.D., Khalaf, M.A., Nasr, S.A., and Abdelrahman, H.A. (2012). Microbial Ecology of Composting Dead Poultry and their Wastes. *GlobVet*.9(6): 683 – 690.

- Amare, A., Amin, A.M., Shiferaw, A., Nasir, S., and Negussie, H. (2013). Yolk Sac Infection ( Omphalitis) in Kombolcha Poultry Farm, Ethiopia. *American-Eurasian of Scientific Research*. 8 (1): 10 – 14
- Arendt, M., Sand., J.M., Marcone, T.M., and Cook , M.E. (2016). Interleukin-10 neutralizing antibody for detection of intestinal luminal levels and as a dietary additive in Emerica challenged broiler chicks. *Poultry Science*.95: 430 – 438.
- Barjesteh, N., Hodgins, D.C., St.Poul, M., Quinteiro-Filho, W.M., DePass, C., Monteiro, M.A. and Sharif, S. (2013). Induction of chicken cytokine responses in vivo and in vitro by lipooligosaccharide of *Camphylobacter jejuni* HS:10 *Veterinary Microbiology*.164: 122- 130.
- El –Sawah, A.A., Dahshan, A.M., Nasef, S.A., El-Nahass, E.S., and Nayel,A.I.(2016). Characterization of *E. coli* and *Salmonella* spp. isolates associated with omphalitis in baby chicks. *Journal of Veterinary Medical Research*. 23(1): 91-100.
- Esteban, S., Rayo, J.M., Moreno, M., Sastre, M., Rial, R.V. and Tour, J.a. (1991). Arole played by the viteline diverticulum in the yolk sac resorption in young post hatched chickens. *J. Comp. Physiol*. 160: 645-648.
- Fasenko, G.M. and O’Dea, E.E. (2008). Evaluating broiler growth and mortality in chicks with minor navel conditions at hatching. *Poult. Sci*. 87: 594-597.
- Geyra, A., Uni, Z., and Sklan, D. (2001). The effect of fasting at different ages on growth and tissue dynamics in the small intestine of the young chick. *Br.J.Nutr*. 86: 53-61.
- Hartati, S., Untari, T.,Fitriyani, I., and Sutrisno, B. (2015). Evaluation of Immunomodulatory Activity of the Herbals Formula Viranur, Turmeric (*Curcuma heyneana* Val.) and Phyllanthus(*Phyllanthus niruri* L.) in Layer Chicken Vaccinated with Avian Influenza.*Journal of Agriculture Science and Technology A.5* (8): 695 -702.
- Islam, M.N., Khan, M.Z.I, Jahan, M.R., and Shinoda, K. (2017). Developmental trajectory of prenatal lymphoid organ in native chicken: a macroanatomical study. *Asian J. Med.. Res*.3(4): 432 – 436.
- Islam, M.N., Khan, M.Z.I, Jahan, M.R., Fujinaga, R. and Shinoda, K., (2013). Ontogenic development of immunoglobulins (Igs)-positive lymphocytes in the lymphoid organs of native chicken of Bangladesh. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*. 1: 96 – 101.
- Jalob, Z.K., Farhan, W.H., Ibrahiem, Z. Y., and Jumaa, B.N. (2015). Bacterial and PathologicalStudy of Omphalitis in Broiler Chicks. *Kufa Journal For Veterinary Medical Sciences*.6 (2): 17- 26.
- Kawalilak, L.T., Ulmer Franco,A.M. and Fasenko,G.M., 2010. Impairedintestinal villi growth in broiler chicks with unhealed navels, *PoultryScience*, 89 (1): 82 - 87
- Khalifa, E., Hamed, N.A., and Abd El Rahman, AER. AEM. (2013). *Escherichia coli* as acausative agent in omphalitis in broiler chicks.*Animal Health Research Journal*.I (3) : 26-35.
- Noy, Y., and Sklan, D. (1998). Yolk utilization in the newly hatched poult. *Br.Poult. Sci*. 39: 446-451.
- Osama, H.A.A. and Huwaida E.E.M.(2013). Effect of Surgical Removal of The Residual Yolksac on The development of The digestive system and Immune Response in Broiler chicks during early days post-hatch. *Journal of Animal and Feed Research*. 3(4): 181 – 185.
- Parvizi,P., Brisbin,J.T., Read, L.R. and Sharif, S.(2015). Cytokine gene expression in lung mononuclear cells of chickens vaccinated with herpesvirus of Turkey and infected with Marek’s disease virus. *Viral Immunol*. 28: 538 – 543.
- Qureshi, M.A .; Hussain, I and Heggen, C.L. (1998). Understanding Immunology in Disease Development and

- Control. *Symposium: Infectious Poultry Diseases*. Pp1126 – 1129.
- Rai, M.F., Khan, S.A., Aslam, A. and Khalid, S. (2005). Effects of yolk sac infection in chicken. *Avian Poult. Biol. Rev.* 16: 87-93.
- Saad, Z.A., Nasef, S.A., Elhariri, M., Elhelw, R., and Azzeldeen, N. (2017). Resistance associated with bacterial pathogens causing omphalitis in baby chicks. *Research*. 14(4): 845 – 851.
- Shahjada, Z., Hussain, K., Islam, Md. M., Majumder, S., Hasan, I., Rahman, M., and Saha, S. (2017). Bacteria causing omphalitis in newly hatched chicks from broiler and layer flocks and their antibiotic profiles. *International Journal of Natural and Social Sciences*. 4(2): 73 – 81.
- Sharma, V., Jakhar, K.K., and Dahiya, S. (2016). Immunopathological studies on broiler chicken experimentally infected with *Escherichia coli* and supplemented with neem (*Azadirachta indica*) leaf extract. *Veterinary World*. 9(7): 735 – 741.
- Sklan, D. (2001). Development of digestive tract of Poultry. *World's Poult. Sci. J.* 57: 415 – 428.
- Sun, H., Bi, R., Liu, P., Nolan, L.K. and Lamont, S.J. (2016). Combined analysis of primary lymphoid tissues' Transcriptomic response to extra-intestinal *Escherichia coli* (ExPEC) infection. *Development and Comparative Immunology*. 57: 99 -106.
- Uni, Z., Tako, E., Gal-Garber, O., and Sklan, D. (2003). Morphological, molecular, and functional changes in the chicken small intestine of the late term embryo. *Poult. Sci.* 82: 1747-1754.
- Uni, Z., Geyra, A., Ben-Hur, H., and Sklan, D. (2000). Small intestinal development in the young chick: Crypt formation and enterocyte proliferation and migration. *Br. Poult. Sci.* 41: 544-551.



## Daya Antelmintik Serbuk Kulit Nanas (*Ananas Comosus*) terhadap Cacing *Haemonchus Contortus* pada Domba

### *The Anthelmintic Potency Of Pineapple (Ananas Comosus) Peel Powder against Haemonchus Contortus Worm in Sheep*

Dewi Pranatasari, Rido Florensus Manik, Budi Purwo Widiarso, Wida Wahidah Mubarakah\*

Politeknik Pembangunan Pertanian Yogyakarta Magelang, Jl. Magelang- Kopeng Km 7 Purwosari,  
Tegalrejo, Magelang, Jawa Tengah

\*Corresponding author, email: [wida\\_wahidah02@yahoo.co.id](mailto:wida_wahidah02@yahoo.co.id)

Naskah diterima: 7 Juni 2021, direvisi: 22 Juli 2021, disetujui: 30 November 2021

#### Abstract

The problem facing sheep breeders in breeding sheep was digestive tract parasite of worm (nematodiasis and haemonchosis). Resistance to anthelmintics was the reason for the study of alternative medication of *H. contortus* infection. It aimed at finding out the effectiveness of the application of pineapple peel powder as *H. contortus* anthelmintic in sheep and the dose of the pineapple peel powder as the *H. contortus* anthelmintic. It used 15 sheep that were assigned to 5 groups. Group I served as positive control with the application of albendazole (Kalbazen) anthelmintic, Group II was treated using the pineapple peel powder at the dose of 150 mg/kg BW. Group III was treated using the pineapple peel powder at the dose of 200 mg/kg BW. Group IV was treated using the pineapple peel powder at the dose of 250 mg/kg BW. And, Group V served as negative control without any treatment. The treatments were conducted for 14 days and were analyzed using comparative descriptive method by comparing initial data (before the treatments) and final data (after the treatments). The comparative data showed that there was significant change in the observed variables. The results of the study showed that the pineapple peel powder could be used as the anthelmintic of the *H. contortus* in the sheep and the dose of 250 mg/kg BW most significantly decreased the mean number of the eggs of the worm per gram of feces.

**Keywords:** anthelmintic; *Haemonchus contortus*; pineapple peel powder; sheep

#### Abstrak

Permasalahan yang dihadapi peternak dalam melakukan budidaya ternak domba adalah gangguan parasit saluran pencernaan, berupa cacingan (*nematodiasis* atau *haemonchosis*). Adanya resistensi terhadap antelmintik menyebabkan pengembangan penelitian mengenai alternatif pengobatan terhadap *H. Contortus*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektifitas pemberian serbuk kulit nanas sebagai obat cacing *Haemonchus contortus* pada ternak domba dan mengetahui dosis penggunaan serbuk kulit nanas sebagai obat cacing *Haemonchus contortus*. Penelitian ini menggunakan 15 ekor domba yang dibagi dalam 5 kelompok. Kelompok I sebagai kontrol positif diberikan obat cacing albendazol (Kalbazen); kelompok II diberi perlakuan serbuk kulit nanas dosis 150 mg/kg BB; kelompok III diberi serbuk kulit nanas 200 mg/kg BB; kelompok IV diberi serbuk kulit nanas 250 mg/kg BB dan kelompok V sebagai kontrol negatif atau tanpa perlakuan. Perlakuan diberikan selama 14 hari dan hasil kemudian dianalisis dengan analisis diskriptif komperatif, yaitu dengan membandingkan hasil awal (sebelum perlakuan) dengan data akhir (setelah perlakuan). Berdasarkan hasil dari perbandingan data tersebut akan diketahui perubahan variabel yang akan

diamati. Dari penelitian diketahui bahwa pemberian serbuk kulit nanas dapat digunakan sebagai obat cacing *Haemonchus contortus* pada ternak domba dan pemberian dosis sebanyak 250 mg/kg BB dapat menurunkan rata-rata penurunan jumlah telur cacing per gram feses terbanyak.

**Kata kunci:** antelmintik; domba; *Haemonchus contortus*; serbuk kulit nanas

## Pendahuluan

Penyakit merupakan salah satu faktor penghambat kinerja produksi dan reproduksi domba. Berikut beberapa penyakit yang sering menyerang domba. Penyakit ini disebabkan oleh cacing *Fasciola gigantica* (Cacing hati), cacing *Neosascaris vitulorum* (Cacing gelang), cacing *Haemonchus contortus* (Cacing lambung), cacing *Thelazia rhodesii* (Cacing mata). Cara mengobatinya dengan memberikan Zanil atau Valbazen yang diberikan lewat minuman, dapat juga diberi obat cacing seperti Piperazin dengan dosis 220 mg/kg berat tubuh domba (Rukmana dan Herdi, 2015).

Menurut Nugroho (2012) salah satu penyakit akibat cacing nematoda yang umumnya menyerang dan mengakibatkan kerugian ekonomi cukup tinggi pada ternak adalah *haemonchosis*. *Haemonchus sp* adalah cacing yang berparasit pada domba dan kambing. Salah satu spesies cacing *Haemonchus* yaitu *H. contortus* adalah spesies yang sangat merugikan pada kedua hospes tersebut (Sumartono, 2002).

Siklus hidup *Haemonchus contortus* pada ruminansia bersifat langsung, tidak membutuhkan hospes intermediet. Cacing dewasa hidup di abomasum, memproduksi telur. Telur dikeluarkan oleh ternak bersama-sama pengeluaran feses. Di luar tubuh hospes, pada kondisi yang sesuai, telur menetas dan menjadi larva. Larva stadium L1 berkembang menjadi L2 dan selanjutnya menjadi L3, yang merupakan stadium infeksi. Larva infeksi menempel pada rumput-rumputan dan teringesti oleh domba. Selanjutnya larva akan dewasa di abomasum (Dwinata, *et al.*, 2017).

Gejalaklinis yang ditimbulkan akibat infeksi cacing *H. Contortus* pada domba yaitu domba mengalami anemia dan penurunan *Packed Cell Volume* (PCV), diare, dehidrasi dan terjadinya akumulasi cairan pada jaringan sub mandibular (bottle jaw), abdomen, rongga thoraks dan dinding usus. Infeksi cacing ini juga dapat menyebabkan tingkat pertumbuhan domba yang

lebih rendah, mengurangi kinerja reproduksi yang terlihat nyata, memiliki kerentanan yang lebih tinggi terhadap paparan penyakit dan menyebabkan kematian (Browning, 2006).

*Haemonchus contortus* merupakan cacing yang patogenik, luas penyebaran dan tingkat infeksi dapat mencapai 80%. Penyakit ini pada umumnya menyerang ternak ruminansia, terutama kambing dan domba. Upaya peternak dalam penanggulangan penyakit ini adalah dengan pemberian obat cacing yang secara berkala, namun pemberian obat cacing yang dilakukan secara terus-menerus dengan jenis obat yang sama dikhawatirkan akan menimbulkan resistensi terhadap obat tersebut. Untuk mengurangi terjadinya resisten maka perlu adanya pergantian jenis obat cacing atau mencampur jenis obat cacing. Salah satu alternatif penanggulangan terhadap infeksi cacing tersebut ialah dengan menggunakan obat yang berasal dari tanaman nanas (Manurung dan Beriajaya, 2003).

Pemberian antelmintik 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 antelmintik baru merupakan pendekatan terbaik dalam mengendalikan *helminthiasis*. Tumbuh-tumbuhan dengan khasiat antelmintik 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 antelmintik. Penelitian, secara *in vitro* maupun *in vivo* telah dilakukan untuk mengetahui efek dari beberapa tumbuhan sumber tanin terhadap nematoda (Bahuaud *et al.*, 2006).

Untuk mengurangi terjadinya resisten maka perlu adanya pergantian jenis obat cacing atau mencampur jenis obat cacing (Anderson *et al.*, 1988). Oleh karena itu peternak sering menggunakan obat tradisional yang ada di setiap lokasi pedesaan, tetapi sayangnya obat tradisional ini belum dibuktikan secara ilmiah kemanjurannya. Salah satu alternatif penanganan terhadap infeksi cacing ialah dengan menggunakan obat berasal dari tanaman nanas.

Menurut penelitian Yeragamreddy *et al.*, (2013) menyatakan bahwa kulit nanas positif mengandung tanin, saponin, steroid, flavonoid, fenol dan senyawa-senyawa lainnya. Tanin terkondensasi yang termasuk dalam golongan flavonoid diduga memiliki kemampuan daya antelmintik yang mampu menghambat enzim dan merusak membran (Shahidi dan Naczki, 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 akan mengiritasi membran mukosa saluran pencernaan cacing sehingga penyerapan zat-zat makanan terganggu, sedangkan senyawa tanin terkondensasi dapat melemaskan cacing dengan cara merusak protein kutikula tubuh cacing (Dalimartha, 2009).

Berdasarkan uraian di atas diduga bahwa serbuk kulit nanas (*Ananas comosus*) memiliki kemampuan sebagai agen antelmintik terhadap cacing dewasa *Haemonchus contortus*. Hal ini menjadi penting untuk dilakukannya penelitian pada tanaman herbal yang merupakan salah satu bentuk obat tradisional sebagai alternatif antelmintik.

### Materi dan Metode

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kesehatan Hewan Politeknik Pembangunan Pertanian Yogyakarta Magelang. Penelitian ini meliputi pembuatan serbuk kulit nanas, percobaan *in vivo*, dan pemeriksaan feses. Pembuatan serbuk kulit nanas dilaksanakan di Desa Glagahombo, percobaan *in vivo* dilaksanakan Kecamatan Magelang Selatan dan pemeriksaan feses dilaks-

anakan di Laboratorium Kesehatan Hewan Politeknik Pembangunan Pertanian Yogyakarta Magelang.

Kulit nanas yang digunakan dalam penelitian diperoleh dari penjual buah nanas di Pasar Gotong Royong Kota Magelang. Tahap awal dalam pembuatan serbuk kulit nanas adalah memisahkan kulit nanas dari daun dan daging buah nanas, tujuan dari pemisahan ini ialah agar mempercepat proses pengeringan. Selain itu tujuan dari pemisahan ini adalah agar kulit nanas tidak berjamur dikarenakan daging buah nanas yang bersifat lembab dan mudah ditumbuhi jamur. Tahap kedua adalah pengirisan kulit nanas dengan ukuran 1x1 cm. Hal ini bertujuan agar proses pengeringan lebih cepat dan menghindari dari jamur jika ukurannya lebih besar. Setelah dilakukan pengirisan kulit kemudian ditimbang untuk mengetahui berat awal kulit nanas sebelum dilakukan pengeringan. Tahap ketiga adalah proses pengeringan kulit nanas dengan menggunakan sinar matahari. Waktu yang diperlukan dalam proses pengeringan selama  $\pm 14$  hari tergantung dari kondisi cuaca. Tingkat kekeringan kulit nanas sangat berpengaruh pada proses penyerbukan dan daya simpan serbuk. Tahap ke empat adalah proses penyerbukan atau penghalusan. Proses ini membutuhkan alat bantu berupa blender agar mempermudah dan mempercepat proses penyerbukan. Setelah menjadi serbuk kemudian dilakukan penimbangan untuk mengetahui berat akhir dari serbuk kulit nanas. Tahap yang ke lima adalah pengemasan serbuk dan pengujian kandungan serbuk kulit nanas di laboratorium. Dalam percobaan *In Vivo*, domba yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebanyak 15 ekor dipilih secara acak. Sebelum dilakukannya percobaan, domba-domba tersebut diambil sampel fesesnya untuk diperiksa jumlah telur cacing yang terdapat pada feses tersebut. Feses yang diperiksa merupakan feses yang diambil secara rektal atau yang baru keluar. Metode yang digunakan dalam pengujian feses merupakan metode natif. Sedangkan metode untuk menghitung jumlah telur cacing per gram feses (EPG) menggunakan metode *mc master*. Jumlah ternak domba yang digunakan sebanyak 15 ekor dan dibagi menjadi 5 kelompok secara acak, kelompok 1 sebagai kontrol positif

diberikan obat kimia (*Kalbazen*) dengan zat aktif Albendazol, sedangkan kelompok 2, kelompok 3 dan kelompok 4 diberikan serbuk kulit nanas dengan dosis masing masing sebanyak 150 mg/kg BB, 200 mg/kg BB dan 250 mg/kg BB per oral diberikan satu hari sekali selama 14 hari, untuk kelompok 5 sebagai kontrol negatif atau tanpa perlakuan. Pemberian serbuk kulit nanas ini dilakukan dengan cara mencampur serbuk dengan air lalu disaring kemudian diberikan kepada ternak. Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah jumlah telur cacing per gram feses.

Analisis data yang digunakan penelitian ini adalah analisis diskriptif komperatif, yaitu dengan membandingkan hasil awal (sebelum perlakuan) dengan data akhir. Berdasarkan hasil dari perbandingan data tersebut akan diketahui perubahan variabel yang akan diamati.

### Hasil dan Pembahasan

Pembuatan serbuk kulit nanas dilakukan 3 minggu sebelum diberikan kepada ternak domba. Kulit nanas diperoleh dari padang buah nanas yang ada di Pasar Gotong Royong Kota Magelang. Bahan yang telah dikumpulkan kemudian di pisahkan antara kulit dan sisa daging nanas tersebut, tujuan dari pemisahan ini ialah agar kulit nanas tidak busuk. Setelah dipisahkan dari dagingnya kemudian kulit nanas dipotong dengan ukuran kurang lebih 1 cm x 1 cm, hal ini agar kulit nanas lebih mudah kering jika dipotong dengan ukuran yang kecil.

Proses pengeringan kulit nanas dilakukan selama  $\pm$  14 hari menggunakan panas sinar matahari. Proses pengeringan berjalan dengan baik karena cuaca yang mendukung. Setelah  $\pm$  14 hari kulit nanas yang sudah kering tahap selanjutnya adalah proses penyerbukan kulit nanas. Proses penyerbukan kulit nanas dibantu dengan menggunakan blender. Hal yang perlu diperhatikan dalam proses penyerbukan ini adalah memastikan kulit nanas benar-benar kering karena serbuk yang tidak terlalu kering akan sulit dalam proses penyerbukan dan dikhawatirkan akan membuat serbuk cepat mengalami pembusukan.

Hasil dari proses penyerbukan ini adalah sebanyak 877 gram serbuk kulit nanas siap pakai. Ciri-ciri serbuk yang baik yaitu tidak

berjamur, berbau wangi khas nanas, berwarna kuning atau kuning kecoklatan.

Uji kandungan serbuk kulit nanas dilakukan di Laboratorium Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Gadjah Mada Yogyakarta, adapun kandungan yang diuji adalah kandungan tanin. Berikut merupakan kandungan tanin serbuk kulit nanas :

Tabel 1. Hasil Uji Kandungan Tanin Serbuk Kulit Nanas

	Sampel/kode	Macam Analisa	Hasil analisa	
			UI.1	UI.1
1	Kulit Nanas	Tanin (mg as.tannat/g sampel)	4,65	5,12

Sumber : Laboratorium Fakultas Teknologi Pertanian UGM Yogyakarta

Dari rabel diatas diketahui bahwa kandungan tanin pada serbuk kulit nanas adalah sebesar 5,12%. Sebelum diberi perlakuan domba terlebih dahulu dilakukan pemeriksaan awal. Tujuan dari pemeriksaan awal ini ialah untuk mengetahui kondisi awal sampel. Metode yang digunakan untuk mengetahui jumlah telur cacing haemonchosis yaitu secara mikroskopis dengan metode Mc Master. Metode Mc Master digunakan untuk mengetahui dan menghitung jumlah telur per gram tinja (EPG). Berdasarkan pemeriksaan feses yang telah dilakukan diperoleh hasil sebagai berikut :

Pada penelitian ini menunjukkan dosis 250 mg/kg BB merupakan dosis yang paling berkhasiat dalam menurunkan nilai EPG, bahkan lebih tinggi dari albendazole, mempunyai efek daya antelmintik terbesar terhadap cacing *Haemonchus contortus* (Tabel 2), hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Mubarokah *et al.*, (2019) yang menyatakan bahwa secara in vivo selama 14 hari menggunakan infusa biji buah pinang dosis 79 mg/ml menurunkan EPG dari  $1485 \pm 386.62$  menjadi  $0 \pm 0.00$  terhadap telur cacing *Ascaridia galli* pada ayam, sedangkan pada penelitian in vitro dihasilkan konsentrasi terbaik untuk membunuh cacing *A. galli* adalah 25% (Mubarokah *et al.*, 2019) dengan mendapatkan letal konsentrasi sebesar 21,18% (Mubarokah *et al.*, 2018). Hal tersebut dikarenakan adanya kandungan tanin pada infusa biji buah pinang yang diyakini menyebabkan rusaknya protein pada kutikula cacing dan menyebab-

kan kematian cacing, sesuai dengan penelitian terhadap profil protein cacing, ternyata cacing *A.galli* yang diberi perlakuan infusa biji buah pinang menghasilkan pita protein yang lebih sedikit dibandingkan control negatif (tanpa perlakuan) (Mubarokah *et al.*, 2019)

Tanin bisa mempengaruhi cacing-cacing dewasa baik secara langsung maupun secara tidak langsung. Reaksi langsung terjadi ketika tanin melekat pada kutikula cacing-cacing itu (Zhong *et al.*, 2014). Diketahui bahwa kutikula nematoda memainkan banyak peran penting di dalam menjalankan fungsi penyerapan, perlindungan dan selektif. Lebih jauh, kutikula nematoda menjadi tempat yang menjadi sasaran utama obat-obat anthelmintik (Alvarez *et al.*, 2007).

Hasil yang sama juga menunjukkan bahwa tanin bisa 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). 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).

### Kesimpulan

Serbuk kulit nanas dapat menurunkan nilai EPG ( $P < 0,01$ ) dan dosis 250 mg/kg BB merupakan dosis yang paling berkhasiat dalam menurunkan nilai EPG, bahkan lebih tinggi dari albendazole.

### Ucapan Terimakasih

Kami mengucapkan terimakasih kepada Civitas Akademika Politeknik Pembangunan Pertanian Yogyakarta Magelang atas dukungan dan bantuan dalam penelitian ini.

### Daftar Pustaka

- Alvarez, L.I., Mottier, M.L. and Lanusse, C.E. (2007). Drug Transfer Into Target Helminthes Parasites. *Trends Parasitol.* 23: 97-104.
- Anderson, N.P.J., Martin and Jarret, R.J. (1988). Mixtures of Anthelmintics: a Strategy

Against Resistance. *Australian Veterinary Journal.* 65: 62–64.

- 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.
- Browning, M.L.L. (2006). *Haemonchus contortus* (Barber Pole Worm) Infestation in Goats. Extension Animal Scientist. Brazil (US): Alabama A & M University.
- Dalimartha, S. (2009). Atlas Tumbuhan Obat Indonesia. Jakarta. Penebar Swadaya.
- Dwinata, I. (2017). Modul Identifikasi Parasit Cacing. Diakses Desember 23, 2019. [https://simdos.unud.ac.id/uploads/file\\_pendidikan\\_1\\_dir/e3ca741312f1b844f8b0a0216935f77.pdf](https://simdos.unud.ac.id/uploads/file_pendidikan_1_dir/e3ca741312f1b844f8b0a0216935f77.pdf).
- Manurung, J. dan Beriajaya. (2003). Penelitian Secara *In Vitro* Penggunaan Daun dan Kulit Buah Nanas sebagai Antelmintik *Haemonchus contortus*. Laporan. Balai Penelitian Veteriner. Bogor.
- 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. *Experimental Parasitol.* 133(3): 281-286.
- Max, R.A., Dawson, J.M., Wakelin, D., Buttery, P.J., Kimambo, A.E., Kassuku, A.A. dan Mtenga, L.A. (2002). Effect of Condensed Tanin 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.
- Mubarokah, W.W., Nurcahyo, W., Prastowo, J. dan Kurniasih, K. (2018). Daya Anthelmintik Infusa Biji Buah Pinang (*Areca catechu*) Terhadap Cacing

- Ascaridia galli* Secara *In Vitro*. *Jurnal Sain Veteriner*. 37(1):252-257.
- Mubarokah, W.W., Nurcahyo, W., Prastowo, J. dan Kurniasih, K. (2019). In Vitro and In Vivo *Areca catechu* Crude Aqueous Extract as An Anthelmintic Against *Ascaridia galli* Infection in Chickens. *Veterinary World*. 12(6):877-882.
- Mubarokah, W.W., Nurcahyo, W., Prastowo, J. dan Kurniasih, K. (2019). Pengaruh In Vitro Infusa Biji Buah Pinang (*Areca catechu*) terhadap Tingkat Kematian dan Morfometri *Ascaridia galli* Dewasa. *Jurnal Sain Veteriner*. 37(2):166-171
- Mubarokah, W.W., Nurcahyo, W., Prastowo, J. dan Kurniasih, K. (2019). The Population, Protein Profile and Ultrastructure of *Ascaridia galli* in Chicken Treated Using *Areca catechu* Crude Aqueous Extract. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*. 44(4):392-399.
- Nugroho, Z.F. (2012). Keragaman dan Kelimpahan Nematoda Usus pada Kambing yang Dipelihara dengan Tatalaksana Pemeliharaan yang Berbeda di Kecamatan Sumbang Kabupaten Banyumas. *Skripsi*. Fakultas Biologi Universitas Jendral Sudirman, Purwokerto.
- Rukmana, R. dan Herdi Y. (2015). Wirausaha Penggemukan Domba dan Perawatan Domba Ketangkasan. Lily Publisier, Yogyakarta.
- Sambodo, P., Prastowo, J., Kurniasih, K. and Indarjulianto, S. (2018). *In Vitro* potential Anthelmintic Activity of *Biophytum petersianum* on *Haemonchus contortus*. *Veterinary World*. 11(1): 1-4.
- Shahidi, F. and Naczki, M. (1995). *Food Phenolics*. Technomic Inc, Basel. p.481-482
- Sumartono. (2002). Genotipe Molekuler *Haemonchus Sp.* Pada Domba dan Kambing Dalam Hubungannya Dengan Variasi Genetik Parasit. Lembaga Penelitian Yogyakarta. Diakses September 11, 2019. [Http://Repository.Ugm.Ac.Id/Digitasi/Index.Php?Module=Cari\\_Hasil\\_Full&Idbuku=9](http://Repository.Ugm.Ac.Id/Digitasi/Index.Php?Module=Cari_Hasil_Full&Idbuku=9).
- Waller, P.J. (1999). International Approaches to The Concept of Integrated Control of Nematode Parasites of Livestock. *International Journal Parasitol*. 29:155–164.
- Yeragamreddy, P.R., Ramalingam, P, Chilamakuru, N.B. dan Haribau R. (2013). In Vitro Antitubercular and Antibacterial Activities of Isolated Constituents and Column Fractions from Leaves of *Cassia occidentalis*, *Camellia sinensis* and *Ananas comosus*. *African Journal of Pharmacology and Therapeutics*. 2(4): P116-123.
- 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 Histopatologi Ren Tikus Putih (*Rattus Norvegicus L.*) Diabetes setelah Pemberian Cuka dari Kulit Nanas (*Ananas Comosus (L.) Mer.*)

### *Histological Structure Ren in Diabetic Rats (Rattus Norvegicus L.) after the Administration of Pineapple Skin Vinegar*

Tazkia Annisa, Agung Janika Sitasiwi\*, Sri Isdadiyanto, Siti Nur Jannah

Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro, Semarang  
Jl. Prof. Soedarto No.50275, Tembalang, Kec. Tembalang, Kota Semarang, Jawa Tengah 50275

\*Corresponding author, Email: [agssiwi@yahoo.co.id](mailto:agssiwi@yahoo.co.id)

Naskah diterima: 14 Juni 2021, direvisi: 18 Oktober 2021, disetujui: 18 Nopember 2021

#### Abstract

Diabetes mellitus is a metabolic disease that occurs due to impaired insulin secretion caused by progressive damage to beta cells. Pineapple skin vinegar contained acetic acid and antioxidants which have the potential to help repaired the structure of the nephron ren and other organs affected by diabetes. The purpose of this study was to examine the effectiveness of pineapple skin vinegar on improved the histological structure of diabetic rats (*Rattus norvegicus L.*). This study based on changed in the structure of the nephron in samples of normal and alloxan-induced mice pre-treatment and post-treatment. Twenty-four rats were divided into 6 groups, named normal control, positive control (diabetes + 0.4 mL apple vinegar), negative control (diabetes + water), dose test groups 1, 2, and 3 (pineapple vinegar 0.2 mL; 0.4 mL; 0.8 mL). Statistical analysis test used ANOVA then followed by Duncan test. The conclusion of this research, the pineapple skin vinegar showed the ability to repair the histopathological structure of white rats damaged by diabetes. The optimum dose needed was 0.8 mL to improved the histological structure of the nephron, as indicated by the glomerular diameter and the distance of the Bowman's capsule space to near normal.

**Keywords:** Alloxan; Bowman's capsule; Diabetes mellitus; glomerulus; pineapple skin vinegar

#### Abstrak

Diabetes melitus merupakan penyakit metabolik yang terjadi akibat gangguan sekresi insulin yang disebabkan kerusakan progresif sel beta. Cuka kulit nanas mengandung asam asetat dan antioksidan yang memiliki potensi untuk membantu perbaikan struktur nefron ren dan organ lain yang terpengaruh oleh penyakit diabetes. Penelitian ini bertujuan untuk menguji efektivitas cuka kulit nanas terhadap perbaikan struktur histologi nefron tikus putih (*Rattus norvegicus L.*) diabetes. Penelitian ini didasarkan pada perubahan struktur nefron pada sampel tikus normal dan tikus yang diinduksi aloksan *pre-treatment* dan *pasca-treatment*. Dua puluh empat ekor tikus dibagi ke dalam 6 kelompok, yaitu kontrol normal, kontrol positif (diabetes + cuka apel 0,4 ml), kontrol negatif (diabetes + air minum), kelompok uji dosis 1, 2, dan 3 (cuka nanas 0,2 ml; 0,4 ml; 0,8 ml). Hasil penelitian diuji statistik menggunakan ANOVA yang dilanjutkan dengan uji Duncan. Kesimpulan dari penelitian ini cuka kulit nanas dapat digunakan untuk memperbaiki struktur histopatologi ren tikus putih yang rusak karena diabetes, 0,8 ml merupakan dosis optimum yang mampu memperbaiki struktur histologis nefron yang ditunjukkan dengan diameter glomerulus serta jarak ruang kapsula Bowman yang mendekati normal.

**Kata kunci:** Aloksan; cuka kulit nanas; Diabetes melitus; glomerulus; kapsula Bowman.

## Pendahuluan

Diabetes melitus (DM) merupakan penyakit gangguan metabolik menahun akibat pankreas tidak memproduksi cukup insulin atau tubuh tidak dapat menggunakan insulin yang diproduksi secara efektif. Insulin adalah hormon yang mengatur keseimbangan kadar gula darah. Peningkatan konsentrasi glukosa di dalam darah (hiperglikemia) akan terjadi ketika insulin tidak bekerja secara optimal (Kemenkes RI, 2014). Penelitian Schonder *et al.*, (2008) menunjukkan bahwa Nefropati Diabetik (ND) merupakan komplikasi yang terjadi pada 40% dari seluruh pasien DM tipe 1 dan DM tipe 2, dan merupakan penyebab utama penyakit ginjal yang mengakibatkan menyempitnya ruang kapsula Bowman dan pembengkakan pada glomerulus.

Berbagai macam obat kimia sintetis banyak dikembangkan industri farmasi untuk terapi farmakologis diabetes. Penelitian Putra *et al.* (2016) membuktikan bahwa penggunaan obat sintetis untuk diabetes masih memunculkan berbagai efek samping seperti hipoglikemia, mual, pusing, tremor, muntah, dan konstipasi. Penggunaan cuka untuk terapi diabetes sudah cukup banyak diteliti oleh para ilmuwan baik di Indonesia maupun mancanegara. Cuka apel merupakan salah satu cuka yang paling umum digunakan dalam terapi diabetes.

Salah satu buah yang berpotensi untuk dijadikan cuka yaitu nanas. Selain dikonsumsi sebagai buah segar, nanas juga banyak digunakan sebagai bahan baku industri. Industri pengolahan nanas ini tiap jam dapat menghasilkan limbah sebanyak 50-65 % atau sebesar 15-19,5 ton limbah. Kulit nanas mengandung flavonoid, alkaloid, tanin, dan steroid. Kulit nanas juga mengandung enzim bromelin yang memiliki aktivitas anti-inflamasi, *antiedematous*, dan antitrombotik (Pavan *et al.*, 2012). Berdasarkan kandungan senyawa bioaktif yang dimilikinya, kulit nanas berpotensi tinggi untuk diolah menjadi pangan fungsional (Ketnawa *et al.*, 2012). Kulit nanas dapat diproses menjadi *vinegar* atau cuka melalui proses fermentasi. Perubahan biokimia yang terjadi selama fermentasi turut mengubah rasio komponen nutrisi sehingga mampu berpengaruh terhadap penurunan gula darah (Zhang *et al.*, 2012).

Penelitian ini dilakukan untuk menguji efektivitas cuka kulit nanas terhadap perbaikan struktur histologi ren (ginjal) tikus putih (*Rattus norvegicus L.*) diabetes. Pemanfaatan kulit nanas sebagai cuka ini diharapkan bisa menjadi alternatif untuk terapi penyakit diabetes baik secara represif, maupun kuratif. Penelitian ini juga diharapkan dapat menjadi acuan untuk riset terkait aktivitas antidiabetes selanjutnya.

## Materi dan Metode

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi dan Laboratorium Biologi Struktur dan Fungsi Hewan, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika (FSM), Universitas Diponegoro (UNDIP). Pembuatan preparat histopatologi dilakukan Laboratorium Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada.

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus L.*) jantan dari *strain Wistar* dengan bobot  $\pm 200$  gram, berumur 2-3 bulan, dan berada dalam keadaan normal. Tikus yang digunakan dalam penelitian ini total berjumlah 24 yang telah dikondisikan diabetes (kadar gula darah  $>200\text{mg/dL}$ ) dengan pemberian aloksan melalui injeksi intraperitoneal. Hewan diberi pakan dan minum secara *ad libitum*. Kelompok uji dan kontrol adalah sebagai berikut K0 : Kontrol normal, tikus normal tanpa perlakuan, K+ : Kontrol positif, tikus diabetes diberi 0,4 ml cuka apel, K- : Kontrol negatif, tikus diabetes tanpa perlakuan, P1 : Kelompok Uji Dosis I, tikus diabetes diberi cuka kulit nanas dosis 0,2 ml, P2 : Kelompok Uji Dosis II, tikus diabetes diberi cuka kulit nanas dosis 0,4 ml, P3 : Kelompok Uji Dosis III, tikus diabetes diberi cuka kulit nanas dosis 0,8 ml

Selama masa uji, dilakukan pengukuran terhadap kadar gula darah, bobot tubuh setiap 7 hari sekali, dan pengukuran konsumsi pakan dan minum setiap hari. Pembuatan preparat histopatologi ren dilakukan menggunakan metode parafin, dengan tebal sayatan 5 mikron dan pewarnaan hematoksilin eosin (HE).

Pengamatan preparat histologi struktur ren tikus putih diabetes yang diberi perlakuan cuka kulit nanas dilakukan di Laboratorium Biologi Dasar Kampus FSM UNDIP Semarang.



Preparat histopatologi diamati dan diukur di bawah fotomikrograf dengan perbesaran 400x dan 1000x dan dicatat perubahan mikroskopik yang ditemukan pada 3 bidang pandang yang dipilih secara acak. Parameter yang diamati ialah bobot organ (ren), diameter glomerulus dan jarak ruang kapsula Bowman.

Data hasil penelitian kemudian dikumpulkan dan diuji normalitas dan homogenitasnya. Uji statistik One Way Anova pada taraf kepercayaan 95% dilakukan untuk menganalisis data bobot ren, diameter glomerulus dan jarak ruang kapsula Bowman, lalu dilanjutkan dengan uji Duncan karena hasil dari uji statistik *One Way Anova* mempunyai perbedaan yang nyata. Pengujian statistik dilakukan dengan menggunakan aplikasi SPSS versi 22.0. Data perubahan struktur histologi ginjal disajikan secara deskriptif.

### Hasil dan Pembahasan

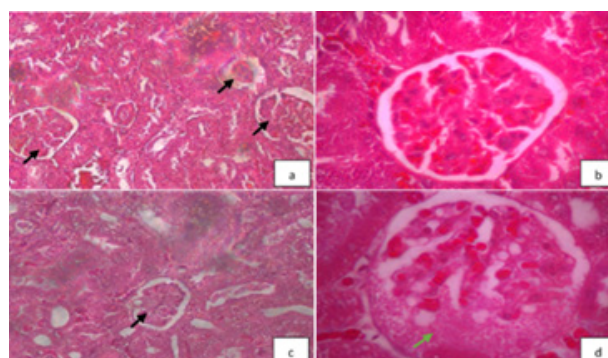
Sebelum dilakukan perlakuan, hewan uji diinduksi aloksan dengan dosis 30mg/200g BB guna membuat kadar gula darah naik (diabetes). Hewan uji dikatakan telah menderita diabetes jika mempunyai kadar gula darah dalam tubuh mencapai >200mg/dL (Akbarzadeh, 2007).

Berdasarkan hasil pengamatan pada Gambar 1 tikus normal dengan perbesaran 400x tampak glomerulus yang masih sempurna, belum ditemukan proliferasi (peningkatan ukuran), serta jumlah glomerulus berkisar antara 3-5 glomerulus. Diameter glomerulus dan jarak ruang kapsula Bowman tampak normal, tanpa ada pembengkakan atau penyempitan. Pengamatan ren yang diinduksi aloksan pada perbesaran 1000x menunjukkan glomerulus dan

kapsula Bowman pada ren mengalami nefrosis yang ditunjukkan dengan adanya proliferasi pada bagian sel glomerulus sehingga terjadi penyempitan pada ruang Kapsula Bowman (Gambar 1). Suarsana, et al., (2010) menjelaskan bahwa pada induksi diabetes eksperimental menggunakan aloksan menyebabkan nefrosis pada 40–50% populasi sel penyusun nefron pada ren. Kerusakan yang ditemukan terdapat pada jumlah glomerulus, diameter glomerulus, dan jarak ruang Kapsula Bowman.

Rata-rata bobot ren kanan, diameter glomerulus dan jarak ruang Kapsula Bowman yang telah dianalisis disajikan pada Tabel 1 sebagai berikut

Hasil analisis menunjukkan bahwa bobot ren K+ berbeda nyata dengan K-, namun tidak berbeda nyata dengan K0, P1, P2, dan P3. K- berbeda nyata dengan K+ dan kelompok uji



Gambar 1. Histologi Ren Tikus Normal dan Diabetes *Pre-treatment* a. Histologi ren tikus normal pada perbesaran 400x; b. Histologi ren tikus normal pada perbesaran 1000x. Tidak ditemukan perlemakan pada ruang Kapsula Bowman; c. Histologi ren tikus diabetes pada perbesaran 400x; d. Pembengkakan sel glomerulus dan ditemukan perlemakan pada ruang kapsula Bowman

Tabel 1. Rerata bobot ren kanan, diameter glomerulus dan jarak ruang Kapsula Bowman.

Kelompok Perlakuan	Bobot Ren Kanan (gram) (Mean ± SD)	Diameter Glomerulus (µm) (Mean ± SD)	Jarak Ruang Kapsula Bowman (µm) (Mean ± SD)
K0	1,07 <sup>ab</sup> ±0,12	68,680 <sup>ab</sup> ±11,449	10,32 <sup>b</sup> ±0,669
K+	0,80 <sup>a</sup> ±0,18	67,045 <sup>a</sup> ±17,501	10,87 <sup>b</sup> ±0,268
K-	1,30 <sup>b</sup> ±0,24	73,555 <sup>c</sup> ±5,805	8,20 <sup>a</sup> ±0,311
P1	1,08 <sup>ab</sup> ±0,11	72,850 <sup>bc</sup> ±1,633	8,88 <sup>ab</sup> ±0,544
P2	0,90 <sup>a</sup> ±0,16	71,395 <sup>bc</sup> ±3,613	9,20 <sup>ab</sup> ±0,912
P3	1,04 <sup>ab</sup> ±0,34	69,705 <sup>ab</sup> ±7,184	10,17 <sup>b</sup> ±0,381

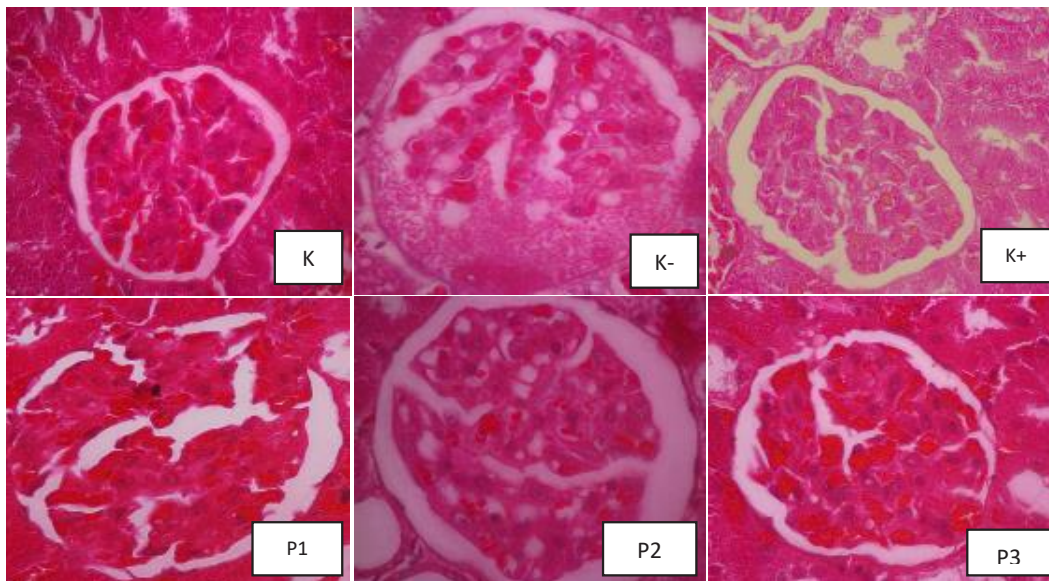
Keterangan: Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (p<0,05)

P2. Kelompok uji P2 berbeda nyata dengan K-, namun tidak berbeda nyata dengan K0, K+, P1 dan P3. Hal ini berarti, kondisi ren pada P2 mempunyai kemiripan dengan ren pada K+. Hasil analisis ini menunjukkan bahwa pemberian cuka nanas dosis 0.4 ml (P2) memberikan pengaruh terhadap bobot ren tikus putih yang ditunjukkan dengan ukuran bobot ren dalam kisaran nilai yang normal. Suhita, *et al*, (2013) menyatakan bahwa bobot relatif ginjal tikus dengan berat  $\pm 200$  gram adalah  $\pm 0.8$  gram.

Hasil uji Duncan menunjukkan bahwa K0 berbeda nyata dengan K-, namun tidak berbeda nyata dengan K+, P1, P2, dan P3. K+ berbeda nyata dengan K-, P1 dan P2, namun tidak berbeda nyata dengan K0, dan P3. K- berbeda nyata dengan K0, K+ dan P3, namun K- tidak berbeda nyata dengan P1 dan P2. Kelompok uji P3 berbeda nyata dengan K-, namun tidak berbeda nyata dengan K0, K-, P1 dan P2. Diameter glomerulus pada P3 tidak mempunyai perbedaan nyata dengan diameter glomerulus K0 dan K+, hal ini membuktikan bahwa pemberian cuka nanas dengan dosis 0,8 ml (P3) memberikan pengaruh terhadap regenerasi sel-sel penyusun glomerulus yang ditunjukkan dengan ukuran diameter glomerulus mendekati normal (dalam nilai yang sama dengan kelompok K0).

Hasil uji Duncan menunjukkan bahwa K0 berbeda nyata dengan K-, namun tidak berbeda nyata dengan K+, P3, P1, dan P2. K+ berbeda nyata dengan K-, namun tidak berbeda nyata dengan K0, P3, P1 dan P2. K- berbeda nyata dengan K0, K+ dan P3, namun tidak berbeda nyata dengan P1 dan P2. P3 berbeda nyata dengan K-, namun tidak berbeda nyata dengan K0, K+, P1, dan P2. Hasil analisis ini membuktikan bahwa pemberian cuka nanas dengan dosis 0,8 ml (P3) memberikan pengaruh terhadap regenerasi struktur sel penyusun ruang kapsula Bowman yang ditunjukkan dengan ukuran mendekati normal.

Berdasarkan hasil pengamatan histologi pada Gambar 2 masing-masing perlakuan, tampak bahwa kondisi glomerulus dan ruang Kapsula Bowman pada kelompok K+ dan P3 mengalami regenerasi menuju normal yang ditandai dengan mengecilnya ukuran diameter glomerulus dan pelebaran jarak ruang kapsula Bowman yang dikarenakan oleh aktivitas antioksidan dari cuka kulit nanas, dimana aktivitas antioksidan yang terkandung dalam cuka kulit nanas ini sebesar 51,46%. Nefron pada kelompok K- tampak paling rusak diantara yang lain karena di dalamnya sudah terdapat kerusakan berupa vakuolisasi, piknosis dan



Gambar 2. Histologi Ren Tikus setelah Pemberian Cuka Kulit Nanas 1,42%. Perbesaran 1000x. K0 menunjukkan histologi glomerulus dan kapsula Bowman normal; K+ regenerasi glomerulus dan kapsula Bowman oleh cuka apel dosis 0,4 ml; K- vakuolisasi glomerulus dan perlemakan pada kapsula Bowman akibat diabetes; P1 vakuolisasi glomerulus masih ditemukan pada uji dosis I; P2 regenerasi kapsula Bowman, namun vakuolisasi glomerulus masih ditemukan pada uji dosis II; P3 regenerasi glomerulus dan kapsula Bowman menyerupai kontrol positif

juga nekrosis dengan tingkat kerusakan berat. Kelompok P1 dan P2 menunjukkan histopatologi nefron yang belum pulih, dikarenakan masih terlihat pembengkakan ukuran glomerulus dan penyempitan ruang Kapsula Bowman serta masih ditemukannya vakuolisasi, piknosis, maupun nekrosis pada derajat ringan hingga berat. Suarsana *et al.*, (2010) menjelaskan bahwa pada kondisi diabetes akibat induksi aloksan dapat menyebabkan nefrosis, degenerasi, infiltrasi fibrosa, dan vakuolisasi

Perbaikan struktur pada ren disebabkan oleh aktivitas senyawa bioaktif dalam cuka seperti antioksidan dan asam asetat berperan dalam regenerasi sel nefron. Cuka yang digunakan memiliki kadar asam asetat sebesar 1,42%. Uji antioksidan terhadap cuka yang digunakan menunjukkan nilai rata-rata % inhibisi sebesar 51,46%. Akbarzadeh (2007) menyatakan bahwa perbaikan sel nefron terkait dengan aktivitas antioksidan yang terkandung pada cuka buah. Antioksidan mampu mengikat radikal bebas yang mampu menyebabkan kerusakan pada sel nefron serta antioksidan juga dapat menghambat kerusakan sel nefron, sehingga sel nefron yang tersisa masih tetap berfungsi. Metabolisme fungsi ren akan kembali normal seiring dengan perbaikan fungsi sel nefron.

### Kesimpulan

Pemberian cuka nanas dosis 0,8 ml per ekor per hari merupakan dosis optimum yang mampu memperbaiki struktur histologis nefron yang ditunjukkan dengan rata-rata diameter glomerulus serta jarak ruang kapsula Bowman yang mendekati normal.

### Ucapan Terim Kasih

Ucapan terimakasih kepada penyumbang dana DRPM proyek PTUPT Dikti atas nama Ibu Dr.Siti Nur Jannah M.Si.

### Daftar Pustaka

Akbarzadeh A. 2007. Induction of diabetes by streptozotocin in rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 22 (2):60 – 64.

Kemenkes RI. 2014. InfoDATIN : Situasi dan Analisis Diabetes Melitus. Jakarta: Pusat Data dan Informasi Kementrian Kesehatan R.

Ketnawa S, P Chaiwut, dan S Rawdkuen, 2012. *Pineapple wastes: A potential source for bromelain extraction. Food and Bioproducts Processing*, 90(3): 385–391

Pavan R, S Jain, Shraddha, dan A Kumar. 2012. Properties and therapeutic application of bromelain: a review. *Biotechnology research international*, 2012, 976203. doi:10.1155/2012/976203

Putra, R. J. S., A. Anisyah, dan Hananditia, R. P. 2016. Kejadian Efek Samping Potensial Terapi Obat Anti Diabetes Pasien Diabetes Melitus Berdasarkan Algoritma Naranjo. *Pharmaceutical Journal Of Indonesia*. 2(2): 45–50

Schonder, K.S., 2008. Chronic and End-Stage Renal Disease. In Burns, M.A.C., Wells, B.G., Schwinghammer, T.L., Malone, P.M., Kolesar, J.M., Rotschafer, J.C. and J. T. Dipiro, eds. *Pharmacotherapy Principles and Practice*. New York: The McGraw-Hill Companies, p. 373-380.

Suarsana IN, Priosoeryanto BP, Bintang M, dan Wresdiyati T. 2010. Profil Glukosa Darah dan Ultrastruktur Sel Beta Pankreas Tikus yang Diinduksi Senyawa Aloksan. *JITV*. 150: 118-123

Suhita, Ni Luh. P. R., W. Sudira., I. B. Winaya dan Oka. 2013. Histopatologi Ginjal Tikus Putih Akibat Pemberian Ekstrak Pegagan (*Centella asiatica*) Peroral. *Buletin Veteriner Udayana*. Vol. 5 No. 2

Zhang Z., Lv G, H Pan, L Fan, CR Soccol, dan A Pandey. 2012. Production of powerful antioxidant supplements via solid-state fermentatin of wheat (*Triticum aestivum* Linn.) by *cordyceps militaris*. *Food Technology and Biotechnology*. 50(1): 32-39.

## Peran Hemagglutinin dan Hemolisin pada *Escherichia coli* Sorbitol-negatif Isolat Burung Puyuh pada Proses Infeksi Secara in Vitro

### *Role of Hemagglutinin and Hemolysine in Escherichia coli Sorbitol-negative isolate of Quality Birds in the Infection Process in Vitro*

Khusnan\*, Wahyu Prihtiyantoro, Dwi Kusmanto

Akademi Peternakan Brahmaputra Yogyakarta,  
Jl. Ki Ageng Pemanahan Nitikan Sorosutan Umbulharjo Yogyakarta

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

Naskah diterima: 22 Oktober 2021, direvisi: 15 November 2021, disetujui: 29 November 2021

#### Abstract

*Escherichia coli sorbitol-negative* in quails cause economic loss due to the death, growth rate inhibition, decreased egg production, and increased medical treatment. *Escherichia coli sorbitol-negative* has many virulence factors, including hemagglutinin and hemolysin. The aim of this study is to determine the role of hemagglutinin and hemolysin in the infection process of *Escherichia coli sorbitol-negative* in vitro. This study was performed using 23 isolates of *Escherichia coli sorbitol-negative* from quails, 52.2% (12 of 23 isolates) had hemagglutinin, while 34.8% (8 out of 23 isolates) had hemolysin. Isolates with hemagglutinin were more attached to human buccal epithelial cells than isolates without hemagglutinin. The t-test analysis showed no significant difference ( $P>0.05$ ). Isolates with hemolysin were less phagocyted by macrophages compared to isolates which without hemolysin. The t-test analysis showed no significant difference ( $P>0.05$ ). *Escherichia coli sorbitol-negative* isolates from quails that have hemagglutinin and hemolysin are pathogenic isolates that possess the potential to cause colibacillosis and transmission between quails and other birds.

**Keywords:** *Escherichia coli*; hemagglutinin; hemolysin; Quail; Sorbitol-negative

#### Abstrak

Pada burung puyuh *Escherichia coli sorbitol-negative* menimbulkan kerugian ekonomi, karena menyebabkan banyak kematian, penghambat laju pertumbuhan, menurunkan produksi telur dan meningkatkan biaya pengobatan. *Escherichia coli sorbitol-negative* memiliki banyak faktor virulensi, diantaranya hemagglutinin dan hemolisin. Pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui peran hemagglutinin dan hemolisin pada proses infeksi *Escherichia coli sorbitol-negative* secara in vitro. Penelitian ini digunakan 23 isolat *Escherichia coli sorbitol-negative* asal burung puyuh, 52,2% (12 dari 23 isolat) memiliki hemagglutinin dan 34,8% (8 dari 23 isolat) memiliki hemolisin. Isolat-isolat yang memiliki hemagglutinin lebih banyak menempel pada sel epitel bukalis manusia dibandingkan isolat yang tidak memiliki hemagglutinin. Uji t-test didapatkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan ( $P>0,05$ ). Isolat-isolat yang memiliki hemolisin lebih sedikit difagosit oleh makrofag dibandingkan dengan isolat yang tidak memiliki hemolisin. Uji t-test didapatkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan ( $P> 0,05$ ). *Escherichia coli sorbitol-negative* isolat asal burung puyuh yang memiliki hemagglutinin dan hemolisin merupakan isolat patogen yang berpotensi menyebabkan kolibacillosis dan penularan antar burung puyuh maupun jenis unggas lain.

**Kata kunci:** burung puyuh; *Escherichia coli*; hemagglutinin; hemolisin; Sorbitol-Negatif

## Pendahuluan

Kolibasilosis merupakan penyakit yang penting dalam industri perunggasan (Salehi dan Ghanbarpour, 2010). Kolibasilosis pada unggas menimbulkan kerugian ekonomi karena menyebabkan penurunan produksi, bertambahnya biaya pengobatan maupun adanya kematian unggas (van der Westhuizen dan Bragg, 2012). Burung puyuh merupakan unggas yang dilaporkan rentan terhadap banyak penyakit (Roy et al., 2006; Hamad et al., 2012), salah satu diantaranya *colibacillosis* (Kenneth, 2008).

*Escherichia coli* dengan *sorbitol-negative* merupakan strain patogen didasarkan ketidakmampuan isolat memfermentasi sorbitol pada agar *Sorbitol MacConkey* (SMAC) (Jabur et al., 2016). Strain *Escherichia coli* dengan *sorbitol-negative* ditemukan pada darah jantung, cangkang telur dan embrio yang mati serta bulu burung puyuh (Roy et al., 2006). *Escherichia coli* patogen asal unggas memiliki banyak faktor virulensi (Salehi dan Ghanbarpour, 2010; Kalule et al., 2018), yang berkontribusi dalam proses infeksi dan patogenisitas (Sharma et al., 2007).

Terjadinya infeksi dan timbulnya gejala serta tingkat keparahan penyakit yang berbeda ditentukan oleh faktor-faktor virulensi yang dimiliki *Escherichia coli* patogen, diantaranya faktor yang berperan dalam proses koloni, adesi, invasi dan faktor kemampuan bakteri untuk bertahan hidup melawan pertahanan tubuh inang (Emody et al., 2003), kemampuan menghindari dari sel-sel fagosit (Goosney et al., 1999), dan kemampuan bakteri memperbanyak diri (Dobrindt dan Hacker, 2008).

Hemaglutinin dan hemolisin merupakan faktor virulensi yang penting pada *Escherichia coli* (Hogan et al., 1990), kedua faktor virulensi tersebut telah lama dideteksi pada *Escherichia coli* (Neter et al., 1952). Hemaglutinin pada *Escherichia coli* patogen berperan dalam proses koloni dan adesi pada sel inang (Bohach dan Snyder, 1985), serta memperparah penyakit (Edwards et al., 2000). Keberadaan hemaglutinin pada *Escherichia coli* isolat asal unggas telah dilaporkan oleh Knobl et al. (2006)

Hemolisin berperan *Escherichia coli* berperan meningkatkan pertahanan terhadap

antibodi dan menghindar dari sel-sel fagosit serta memperparah penyakit (Mittal et al., 2014). Keberadaan hemolisin pada *Escherichia coli* isolat asal burung puyuh telah dilaporkan Roy et al. (2006).

Penelitian ini bertujuan melakukan deteksi hemaglutinin dan hemolisin pada *Escherichia coli* dengan *sorbitol-negative* asal burung puyuh, serta perannya pada kemampuan adesi pada epitel dan pertahanan terhadap fagositosis makrofag secara in vitro

## Materi dan Metode

### Isolat *Escherichia coli*

Duapuluh empat isolat *Escherichia coli* asal burung puyuh dengan *Sorbitol MacConkey-negative* digunakan dalam penelitian ini telah diidentifikasi oleh Prihtiyantoro dan Khusnan (2016).

### Deteksi Hemaglutinin

Deteksi hemaglutinin menggunakan metode yang dikerjakan Wibawan et al., (1993). Digunakan darah domba dengan antikoagulan 0,2 M Sodium Sitrat pH 5,2, disentrifus dan dicuci dua kali dengan 0,15 M NaCl, kemudian dibuat larutan 2% dengan NaCl. Uji hemaglutinasi dilakukan dengan cara mereaksikan 20 µl larutan bakteri yang telah ditentukan *optical density* (OD) nya dengan *spekrofotometer transmisi* dan  $\lambda$  620 nm (kira-kira  $10^9$  bakteri/ml 0,15 NaCl) dengan 20 µl larutan eritrosit dalam tabung reaksi. Tabung reaksi digoyang selama 30 detik dan reaksi hemaglutinasi dicatat dengan ketentuan sebagai berikut: ++ reaksi kuat, + reaksi sedang dan – tidak ada reaksi.

### Deteksi Hemolisin

Deteksi keberadaan hemolisin pada *Escherichia coli* menggunakan metode yang dilakukan Mittal et al. (2014) dan Al-Saiedi dan Al-Mayah. (2014). Isolat *Escherichia coli* diinokulasi pada 5% agar darah domba dan diinkubasi semalam pada 37°C selama 18-24 jam. Keberadaan hemolisin ditandai dengan terbentuknya zona lisis disekitar koloni.

## Uji Adhesi

Uji adhesi *Escherichia coli* pada sel epitel, menggunakan sel-sel epitel bukalis manusia sesuai metode Salasia (1994). Sel epitel mukosa bukalis manusia diambil dengan mengerok lapisan mukosa bukalis menggunakan spatel kayu, hasil kerokan dimasukkan dalam 5 ml HBSS (*hanks balance salt solution*). Dilakukan pencucian dua kali dengan PBS (*phosphat buffer saline*). Sel-sel epitel bukalis yang diperoleh dihitung dengan menggunakan *haemocytometer* (AO, USA), sehingga diperoleh larutan bakteri kira-kira  $10^5$  sel/ml HBSS.

Larutan bakteri disiapkan dengan menumbuhkan isolat *Escherichia coli* pada media cair THB (*tod hewitt broth*) cair dalam tabung dan dieramkan pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$ , 18-24 jam. Biakan *Escherichia coli* THB kemudian disentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Pelet disuspensi dengan *Hank's balanced salt solution* (HBSS) dan ditentukan *optical density* (OD)-nya dengan spektrofotometer pada  $\lambda$  620 nm (kira-kira  $10^5$  bakteri/ml).

Pembuatan adhesi bakteri pada sel epitel dilakukan dengan menyampurakan 1 ml suspensi bakteri dengan 1 ml larutan sel-sel epitel bukalis manusia dalam tabung reaksi, setelah diinkubasikan selama 1 jam pada temperatur  $37^{\circ}\text{C}$  dalam *water bath*. Sel-sel epitel bukalis dipisahkan dari bakteri yang tidak melekat dengan cara menambahkan 50% larutan *percoll* dalam campuran tersebut dan sentrifus. Pelet yang terbentuk dipisahkan dan dicuci dua kali dengan larutan HBSS.

Larutan akhir yang terbentuk diteteskan dan diapuskan pada kaca objek dan dikeringkan, kemudian dilakukan pewarnaan dengan Giemsa selama 30 menit. Pengamatan dan perhitungan jumlah bakteri yang melekat pada sel epitel bukalis menggunakan mikroskop cahaya. Rerata jumlah bakteri yang melekat pada sel epitel dilakukan pada 10 sel epitel bukalis.

## Uji Fagositosis

Uji fagositosis menggunakan sel makrofag sesuai metode Salasia (1994). yang diambil dari cairan peritonium mencit. Mencit dibius dengan cara dimasukkan ke dalam kotak yang berisi chloroform. Setelah terbius, bagian rongga

perut mencit dibuka kemudian dimasukkan 3-5 mL larutan minimal essensial medium (MEM), selanjutnya dimasase. Cairan intraperitoneal yang mengandung makrofag diambil dengan menggunakan spuit steril kemudian dimasukkan ke dalam tabung steril dan disentrifus 2.000 rpm selama 15 menit pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  dilakukan dua kali berturut-turut. Supernatan dibuang dan pellet ditambah MEM sebanyak 3-5 mL. Makrofag dihitung dengan menggunakan *haemocytometer* sehingga diperoleh makrofag  $10^5$ sel/mL.

Uji viabilitas makrofag, digunakan untuk menghitung jumlah makrofag yang hidup. Cara yang dilakukan untuk uji viabilitas yaitu sebanyak 100  $\mu\text{L}$  makrofag dimasukkan ke dalam eppendorf kemudian ditambah dengan 10 $\mu\text{L}$  trypan blue, didiamkan selama satu menit, kemudian diteteskan pada hemocytometer dilihat di bawah mikroskop. Sel makrofag yang hidup akan terlihat bening dan makrofag yang mati berwarna biru. Makrofag peritoneal yang digunakan harus menunjukkan angka viabilitas di atas 70%

Uji fagositosis makrofag, dilakukukan dengan cara memasukkan 100  $\mu\text{L}$  suspensi bakteri ( $10^9$  bakteri/mL) ke dalam eppendorf kemudian ditambahkan 100  $\mu\text{L}$  makrofag ( $10^5$ sel/mL). Larutan diinkubasi dalam penangas air pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama satu jam. Setelah satu jam, diteteskan pada gelas objek, ditutup dengan gelas penutup dan diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya. Aktivitas fagositosis makrofag ditentukan dengan cara menghitung jumlah bakteri yang difagosit oleh setiap sel makrofag. Rerata jumlah bakteri yang difagosit dihitung dari 10 sel makrofag pada setiap preparat (Salasia dan Laemmler, 1994). Pengamatan hasil terhadap produksi hemolisin, kemampuan hemaglutinasi dan adesi dengan referensi. Perbandingan nilai rerata kemampuan bakteri melekat pada sel epitel dan kemampuan bakteri bertahan terhadap sel fagositik dianalisa menggunakan t-test

## Hasil dan Pembahasan

Hasil deteksi hemaglutinin pada *Escherichia coli* pada penelitian ini sebesar 52,2% (12 dari 23 isolat) memiliki hemaglutinin, dan 47,80% (11 dari 23 isolat) tidak memiliki he-

Tabel 1. Deteksi hemaglutinin pada *Escherichia coli sorbitol-negative* isolat asal burung puyuh dan rerata jumlah bakteri yang beradhesi pada sel epitel bukalis

No	No Sampel	n(%)	Hem aglutinin	Rerata Jumlah bakteri yang menempel/ sel epitel
1	9; 18; P2; P4.2; P5; P5.3; P6; P10; P11.1; P12, P17; P18.1	12(52,2)	+	109,97
2	2; 8; 12;16; 19; 20; 21; P16.2; P17.1; P19; P19.1	11(47,8)	-	108,98
	23	23(100)		

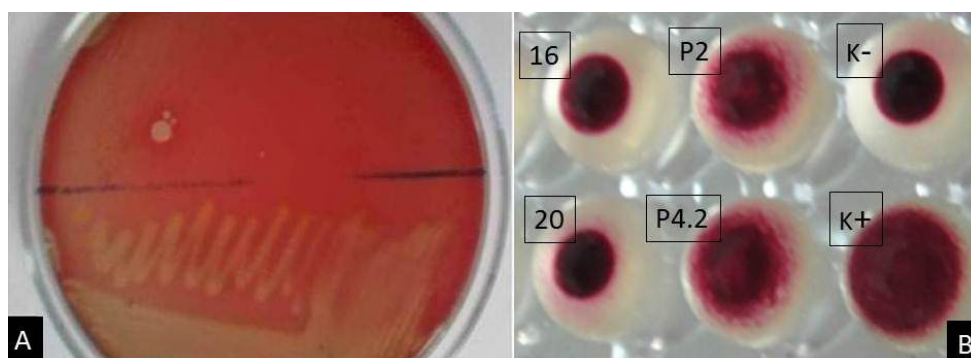
Tabel 2. Deteksi hemolisin pada *Escherichia coli sorbitol-negative* isolat asal burung puyuh dan rerata jumlah bakteri yang terfagosit oleh makrofag

No	No Sampel	n(%)	Hem olisin	Rerata jumlah bakteri yang difagosit/ makrofag
1	8; 9; 12; 18; P2; P12; P17; P19	8(34,8)	+	12,07
2	2; 16; 19; 20; 21; P4.2; P5; P5.3; P6; P10; P11.1; P16.2; P17.1; P18.1; P19.1	15(65,2)	-	12,68
	23	23(100)		

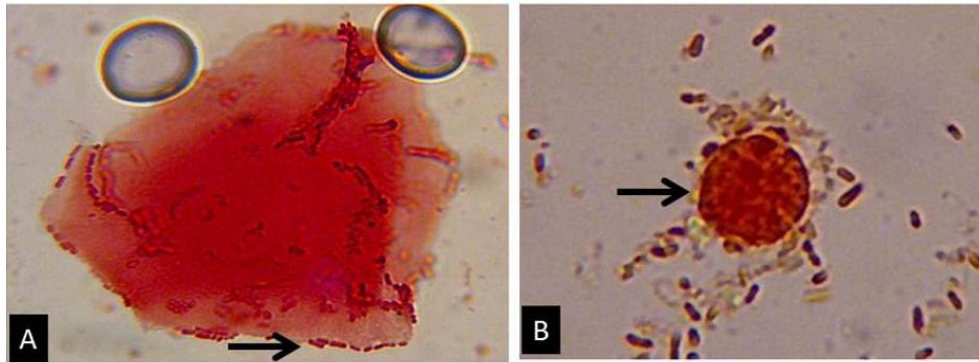
maglutinin (Tabel 1). Hasil deteksi hemolisin 34,80% (8 dari 23 isolat) memiliki hemolisin, dan 65,2% (15 dari 23 isolat) tidak memiliki hemolisin (Tabel 2). Isolat-isolat *Escherichia coli* yang memiliki hemaglutinin mampu melekat lebih banyak pada sel epitel bukalis manusia dibandingkan dengan isolat yang tidak memiliki hemagglutinin (109,97 dibanding 108,98/sel epitel).

Hasil analisa perbandingan dengan t-test tidak ada perbedaan secara nyata ( $P>0,05$ ). Isolat *Escherichia coli* yang memiliki hemo-

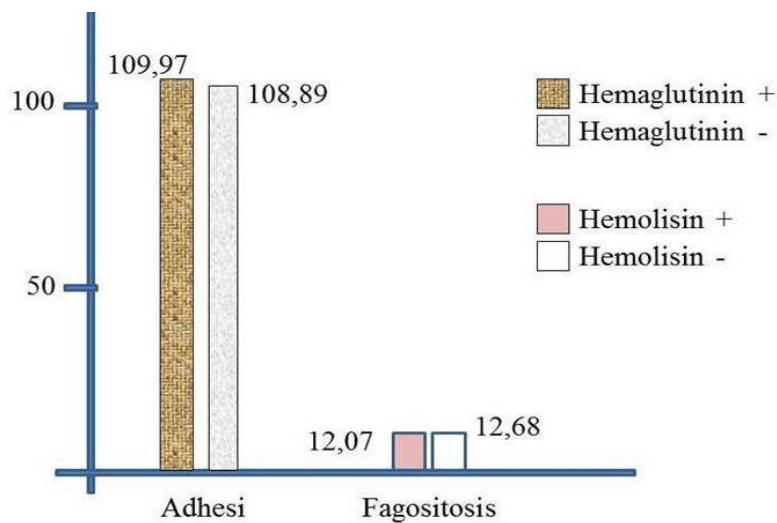
lisin difagosit oleh makrofag lebih sedikit dibandingkan dengan isolat yang tidak memiliki hemolisin (12,07 dibanding 12,68 bakteri/makrofag). Hasil analisa perbandingan dengan t-test tidak ada perbedaan secara nyata ( $P>0,05$ ) (Grafik 1). Isolat-isolat *Escherichia coli* yang memiliki hemaglutinin menggumpalkan eritrosit domba, dan isolat-isolat yang memiliki hemolisin tumbuh pada media agar darah domba dengan membentuk zona lisis di sekitar koloni (Gambar 1).



Gambar 1. A. Pertumbuhan koloni isolat *Escherichia coli* hemolitik, membentuk zona hemolisis disekeliling koloni. B. Uji hemaglutinasi, K-: kontrol negatif, isolat 16 dan 20 hemaglutinasi negatif, K+: kontrol positif, terjadi hemaglutinasi, isolat P2 dan P4.2 hemaglutinasi positif.



Gambar 2. A. *Escherichia coli* menempel pada sel epitel bukalis, B. *Escherichia coli* yang difagosit oleh makrofag



Grafik 1. Adhesi: Rerata jumlah *E. coli* yang beradesi pada sel epitel bukalis (isolat yang memiliki dan yang tidak memiliki hemaglutinin), Fagositosis: rerata jumlah yang *E. coli* yang difagosit oleh makrofag (isolat yang memiliki dan yang tidak memiliki hemolisin)

### Pembahasan

*Escherichia coli* patogen pada bangsa unggas menyebabkan infeksi pada sistem pencernaan maupun diluar saluran pencernaan. Kolibasilosis pada unggas menurut Kunert-Filho *et al.*, (2015) menyebabkan *septicemia, enteritis, granuloma, omphalitis, sinusitis, airsacculitis, arthritis/synovitis, peritonitis, pericarditis, perihepatitis, cellulitis, dan swollen head syndrome*. Pada burung puyuh kolibasilosis menyebabkan *septicemia, pericarditis, perihepatitis, airsacculitis, dan arthritis* (Moulin-Schouleur *et al.*, 2007).

Duapuluh tiga isolat *Escherichia coli* yang digunakan pada penelitian ini merupakan strain patogen, dan telah diidentifikasi sebagai *Escherichia coli sorbitol-negatif* (Prihtiyantoro

dan Khusnan, 2016). Identifikasi *Escherichia coli* strain patogen menggunakan agar selektif *Sorbitol MacConkey* (SMAC) (Stapp *et al.*, 2000). Menurut Zhao *et al.* (1995) *Escherichia coli* patogen tumbuh pada agar *Sorbitol MacConkey* dengan tidak memfermentasi sorbitol, yang ditandai dengan warna koloni keabuan. Agar *Sorbitol MacConkey* (SMAC) merupakan media selektif yang digunakan untuk membedakan *Escherichia coli* patogen dan non patogen yang ditandai dengan tidak memfermentasi sorbitol (Turbin, 2009). Deteksi *Escherichia coli* patogen dengan media *Sorbitol MacConkey* ini telah digunakan oleh beberapa peneliti (Sekhar *et al.*, 2017; Kalule *et al.*, 2018).

Infeksi terjadi karena kemampuan bakteri melakukan proses koloni, adesi, invasi dan



bertahan hidup melawan pertahanan tubuh inang (Emody *et al.*, 2003), serta kemampuan menghindari dari sel-sel fagosit (Goosney *et al.*, 1999). Hemagglutinin dan hemolisin merupakan faktor virulensi yang penting pada *Escherichia coli* patogen (Hogan *et al.*, 1990). Keberadaan hemagglutinin dan hemolisin pada *Escherichia coli* isolat asal broiler telah dilaporkan oleh Al-Saiedi dan Al-Mayah, (2014)

Hemagglutinin pada *Escherichia coli* patogen merupakan salah satu faktor virulensi yang penting (Bohach dan Snyder, 1985). *Escherichia coli* patogen isolat asal unggas dilaporkan memiliki hemagglutinin (Al-Saiedi dan Al-Mayah, 2014). Hemagglutinin pada *Escherichia coli* patogen berupa aglutinin yang terdapat pada permukaan sel dan tersusun dari komponen protein (Nowicki *et al.*, 1988). Keberadaan hemagglutinin pada *Escherichia coli* patogen secara *in vitro* dapat dideteksi dengan uji hemagglutinasi menggunakan eritrosit (Maheswari *et al.*, 2013).

Secara *in vitro* bakteri yang memiliki hemagglutinin akan mampu menggumpalkan eritrosit (Maheswari *et al.*, 2013; Fakruddin *et al.*, 2013). Hemagglutinin merupakan protein permukaan yang berperan pada proses adesi dengan reseptor eritrosit sehingga terjadi aglutinasi eritrosit (Ghunaim *et al.*, 2014; Huja *et al.*, 2015). Keberadaan hemagglutinin pada *Escherichia coli* patogen telah dibuktikan oleh Salit dan Gotschlich (1977), dengan uji hemagglutinasi menggunakan eritrosit babi dan manusia, *Escherichia coli* yang memiliki hemagglutinin akan menggumpalkan eritrosit, dengan mikroskop elektron terlihat adanya ikatan antara hemagglutinin dengan reseptor eritrosit.

Penelitian ini 54,17% isolat *Escherichia coli* memiliki hemagglutinin. Isolat-isolat tersebut pada uji hemagglutinasi menggumpalkan eritrosit domba. Hasil penelitian ini lebih besar dibandingkan dengan laporan Hamad *et al.* (2012), 18,2% *Escherichia coli* patogen isolat burung puyuh memiliki hemagglutinin. Prevalensi *Escherichia coli* patogen isolat asal unggas yang memiliki hemagglutinin sangat beragam. Isolat asal broiler yang memiliki hemagglutinin dilaporkan 61,3% (Fakruddin *et al.*, 2013), 84,3% (da Rocha *et al.*, 2002) dan 3,7% (Al-Saiedi dan Al-Mayah, 2014), dan

isolat asal layer sebanyak 20% (Sharada *et al.*, 2010). *Escherichia coli* patogen isolat asal ayam tidak memiliki hemagglutinin (Vidotto *et al.*, 1991). *Escherichia coli* patogen isolat asal manusia dilaporkan 100%, 74,8% dan 53,0% memiliki hemagglutinin (Maheswari *et al.*, 2013; Mittal *et al.*, 2014; Kaira dan Pai, 2018).

Hemagglutinin pada *Escherichia coli* patogen berperan pada proses awal infeksi (Dho-Moulin dan Fairbrother, 1999; da Rocha *et al.*, 2002), yaitu sebagai faktor *adhesin*, yang berperan dalam proses pelekatan bakteri pada sel epitel hospes (Kurl *et al.*, 1989). Hasil penelitian ini isolat-isolat yang memiliki hemagglutinin melekat lebih banyak dibandingkan dengan isolat yang tidak memiliki hemagglutinin (rerata 109,97 dibanding 108,98 bakteri/sel epitel,  $P > 0,05$ ). (Tabel 2). Hasil ini sesuai dengan Abrar *et al.* (2013) *Escherichia coli* yang memiliki hemagglutinin lebih banyak menempel pada sel epitel dibandingkan dengan yang tidak memiliki hemagglutinin. Keberadaan hemagglutinin ada hubungannya dengan kemampuan adesi serta tingkat patogenisitas bakteri (Klemm *et al.*, 2000). Hemagglutinin merupakan faktor koloni dan *adhesi* serta memperparah penyakit (Edwards *et al.*, 2000).

Hemolisin merupakan faktor virulensi yang penting pada *Escherichia coli* patogen (Fatima *et al.*, 2012) Keberadaan hemolisin pada *Escherichia coli* isolat asal broiler telah dilaporkan oleh Sharada *et al.* (2010) dan A Ruaa *et al.* (2014). Hasil penelitian ini 37,50% *Escherichia coli* isolat asal burung puyuh memiliki hemolisin. Hemolisin pada *Escherichia coli* secara *in vitro* pada agar darah akan melisis eritrosit sehingga terbentuk zona lisis disekitar koloni (Roy *et al.*, 2006). Hemolisin merupakan satu-satunya protein yang mampu melisis eritrosit (Herlax *et al.*, 2010). Metode ini sederhana dan cepat untuk menentukan keberadaan hemolisin (Moon *et al.*, 2006). Prevalensi *Escherichia coli* hemolitik hasil penelitian ini lebih rendah dibandingkan dengan laporan Roy *et al.* (2006), 45,2% *Escherichia coli* isolat puyuh merupakan strain hemolitik. Prevalensi strain *Escherichia coli* hemolitik isolat asal unggas dilaporkan sangat beragam. Isolat asal broiler dilaporkan 44,6%, 44,6%, 41,0% dan 53,3% merupakan *Escherichia*

*coli* hemolitik (Al-Saiedi dan Al-Mayah, 2014; Radwan *et al.*, 2014 dan Zahid *et al.*, 2016), dan isolat asal ayam petelur dilaporkan 45,0% dan 47,0% (Bashar *et al.*, 2011; Mittal *et al.*, 2014).

Beberapa peneliti melaporkan prevalensi *Escherichia coli* hemolitik sangat rendah. Shankar *et al.* (2010) dan Fodor *et al.* (2010) melaporkan isolat asal unggas sebesar 1,52%, dan 5%. Sharada *et al.* (2010) dan Rodriguez-Siek *et al.* (2005) melaporkan *Escherichia coli* hemolitik isolat asal ayam petelur sebesar 4,0% dan 4,0%. Kaira dan Pai (2018) melaporkan 27,64% *Escherichia coli* hemolitik. Osman *et al.* (2018) melaporkan *Escherichia coli* patogen asal broiler 97% hemolitik. Sebaliknya Vidotto *et al.* (1990); Emery *et al.* (1991); dan Santoyo *et al.* (2001) melaporkan *Escherichia coli* patogen isolat asal unggas tidak ada yang hemolitik.

Hasil penelitian ini isolat *Escherichia coli* hemolitik lebih sedikit difagosit oleh makrofag dibandingkan dengan isolat *Escherichia coli* non hemolitik 12,07 dibanding 12,68 bakteri/makrofag.  $P > 0,05$ ). Menurut Goosney *et al.* (1999) bakteri patogen mempunyai kemampuan bertahan hidup didalam tubuh inang, karena mampu menghindari dari respon antibodi maupun neutrofil dan makrofag sebagai sel-sel fagosit inang.

*Escherichia coli* hemolitik menurut Laura *et al.* (2016) merupakan strain patogen yang tahan terhadap antibodi dan sel-sel fagosit, serta mampu bertahan hidup dalam aliran darah (Welch *et al.*, 1995), dan tahan terhadap bakterisidal (Allan *et al.*, 1993), serta mampu menghindari terhadap sel-sel fagositik (Fatima *et al.*, 2012). Makrofag merupakan sel imun yang berperan dalam fagositosis bakteri (Aderem dan Ulevitch, 2000).

Hemolisin berperan meningkatkan patogenesitas *Escherichia coli* (Kukanur *et al.*, 2015) laporan terakhir menyebutkan hemolisin juga berperan membunuh makrofag (Ambika *et al.*, 2018). Menurut Mittal *et al.* (2014) dan Johnson, (1991) *Escherichia coli* hemolitik akan menyebabkan penyakit yang lebih parah dibandingkan isolat non hemolitik.

*Escherichia coli* hemolitik lebih sering menyebabkan penyakit dibandingkan dengan isolat yang bukan hemolitik (Grover *et al.*, 2013),

*Escherichia coli* patogen yang bersifat zoonosis umumnya hemolitik (Evans *et al.*, 1981). Secara *in vivo* telah dibuktikan bahwa *Escherichia coli* strain hemolitik diubah menjadi strain bukan hemolitik akan menurunkan virulensi (Welch *et al.*, 1981).

Hemaglutinin dan hemolisin merupakan faktor virulensi yang penting dan berperan dalam peningkatan patogenesitas *Escherichia coli* patogen. Virulensi dan patogenesitas *Escherichia coli* patogen juga dipengaruhi oleh kontribusi dari banyak faktor virulensi lainnya, dan faktor-faktor tersebut bersifat multifaktor (da Rocha *et al.*, 2002). Deteksi faktor virulensi yang dimiliki *Escherichia coli* patogen penting dilakukan untuk memahami faktor-faktor apa saja yang berperan dalam proses infeksi, proses interaksi dalam tubuh inang dan timbulnya berbagai macam gejala sakit. Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan hemaglutinin dan hemolisin pada *Escherichia coli* merupakan faktor virulensi yang penting sebagai faktor *adhesin* dan anti fagositik, sehingga menjadikan strain tersebut bersifat patogen.

### Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Prof. Dr. Drh. Siti Isrina Oktavia Salasia dan drh. Mitra, M.Sc. atas kerja samanya, serta Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan atas pendanaannya tahun anggaran 2015-2016

### Daftar Pustaka

- Abrar, M., Wibawan, I.W.T., Priosoeryanto, B.P., Soedarwanto, M. and Pasaribu, F.H. (2013). Role of *Staphylococcus aureus* Haemagglutinin in Adhesion Process on Udder Epithelial Cells. *Jurnal Kedokteran Hewan*, 7(1): 43-46.
- Aderem, A. and Ulevitch, R.J. (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*, 406: 782-787.
- Allan, B.J., van den Hurk, J.V. and Potter, A.A. (1993). Characterization of *Escherichia coli* isolated from cases of avian colibacillosis. *Can. J. of Vet. Res.*, 57: 146-151.
- Al-Saiedi, R.I.R. and Al-Mayah, A.A.S. (2014). Pathogenicity testing of several APEC

- isolates obtained from naturally infected broiler birds reared in Basrah. *Int. J. Poul. Sci.*, 13: 374-378
- Ambika, M., Murthy, V., Minh-Duy, P., Peters, K.M., Nhu, N.T., Welch, R.A., Ulett, G.C., Schembri, M.A. and Sweet, M.J. (2018). Regulation of hemolysin in uropathogenic *Escherichia coli* fine-tunes killing of human macrophages. *Virulence*. (9)1: 967-980.
- Bohach, G., and Snyder, I. (1985). Chemical and immunological analysis of the complex structure of *Escherichia coli* alpha-hemolysin. *J. Bacteriol.* 164: 1071-1080.
- da Rocha, A.C.G.P., da Silva, A.B., de Brito, B.G., de Souza, H.L., Pontes, A.P., Cristine, C.M., do Nascimento, V.P. and Salle, C.T.P. (2002). Virulence Factors of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Isolated from Broilers from the South of Brazil. *Av. Dis.*, 46(3): 749-752.
- Dho-Moulin, M. and Fairbrother, J.M. (1999). Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet. Res.*, 30: 299-316.
- Dobrindt, U. and Hacker, J. (2008). Targeting virulence traits: potential strategies to combat extraintestinal pathogenic *E. coli* infections. *Curr. Opinion in Microbiol*, 11: 409-413.
- Edwards, R.A., Schifferli, D.M. and Maloy, S.R. (2000). A role for Salmonella fimbriae in intraperitoneal infections. *Procc. of the National Academy of Sci.*, 97: 1258-1262.
- Emody, L., Kerenyi, M. and Nagy, G. (2003). Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. *Int. J. Antimicrobiol Agents*, 22: 529-533.
- Evans, D.J., Evans, D.G., Hohne, C., Noble, M.A., Haldane, E.V., Lior, H. and Young L.S. (1981). Hemolysin and K antigens in relation to serotype and hemagglutination type of *Escherichia coli* isolated from extraintestinal infections. *J. Clin. Microbiol*, 13:171-178.
- Fakruddin, M., Mazumdar, R., Chowdhury, A. and Mannan, K. (2013). A preliminary study on virulence factors and antimicrobial resistance in extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) in Bangladesh. *Ind. J. Med. Res.*, 137: 988-990.
- Fatima, N., Agrawal, M., Shukla, I. and Khan, P.A. (2012). Characterization of uropathogenic *E. coli* in relation to virulence factors. *Scientific Reports* 1:342. doi:10.4172/ scientificreports. 342.
- Fodor, I., Catana, N. and Herman, V. (2010). Epidemiological Studies on some *E. coli* Strains in Broiler Chickens.UASVM. *Vet. Med.*, 67(2): 74-76.
- Ghunaim, H., Abdu-Madi, M.A. and Kariyawasam S. (2014). Advances in vaccination against avian pathogenic *Escherichia coli* respiratory disease: potentials and limitations. *Vet. Microbiol*, 172: 13-22.
- Goosney, D.L., Celli, J., Kenny, B. and Finlay, B.B. (1999). Enteropathogenic *Escherichia coli* Inhibits Phagocytosis. *Infect. and Immunity*, 67(2): 490-495.
- Grover, P.S., Bareja, R., Jaryal, S.C. and Narang, V.K. (2013). Characterization of Haemolytic *Escherichia coli*. *Int. J. of Sci. and Res. Pub.*, 3(2): 1-6.
- Hamad, M., Al-Aalim, A., Al-Dabbagh, S. and Ali, H. (2012). Detection of organ bacterial load in quails. *Proc. 6<sup>th</sup> Scient. Conf., College of Vet. Med. University of Mosul, Iraq*, 23-24 May 2012, 26: 47-51.
- Herlax, V., Henning, M.F., Bernascon, A.M., Goni, F.M. and Bakas, L. (2010). Health The lytic mechanism of *Escherichia coli*  $\alpha$ -hemolysin associated to outer membrane vesicles Lytic action mechanism of OMVs-associated HlyA. *Nat. Sci.*, 2: 484-492
- Hogan, J.S., Todhunter, D.A., Smith, K.L. and Schoenberger, P.S. (1990). Hemagglutination and Hemolysis by *Escherichia coli* Isolated from Bovine Intramammary Infections. *J. Dairy Sci.*, 73: 3126-313.

- Huja, S., Oren, Y., Trost, E., Brzuszkiewicz, E., Biran, D., Blom, J., Goesmann, A., Gottschalk, G., Hacker, J., Ron, E.Z. and Dobrindt, U. (2015). *Gen. avenue to avian. colisepticemia. MBio.*, 6:1-13
- Italia, J.T., Rovira, H.G., Masangkay, J.S., Yoshikawa, Y., Talia, M.T., Rovira, J. Masangkay, S., Yoshikawa, Y., Perez, M.T.M., Reyes, A.W.B. and Baticados, W.N. (2012). Conventional isolation and polymerase chain reaction for detection of *Escherichia coli* O157:H7 from intestines of philippine bats. *Veterinarski Arhiv*, 82: 283-294.
- Jabur, Z.A., Fakhry, S.S., Hassan, M.A. and Kadhem, B.Q. (2016). Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in Food. *World J. of Exp. Biosci*, 4: 83-86.
- Johnson, J.R. (1991). Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin. Microbiol, Rev.*, 4(1): 80-128.
- Kaira, S.S. and Pai, C. (2018). Study of uropathogenic *Escherichia coli* with special reference to its virulence factors. *Int. J. of Comm. Med. and Publ. Health*, 5(1): 177-181.
- Kalule, J.B., Keddy, K.H., Mark, P. and Nicol, M.P. (2018). Characterisation of STEC and other diarrhetic *E. coli* isolated on CHROMagar™STEC at a tertiary referral hospital Cape Town. *BMC Microbiol*, 18: 1195-1197.
- Kenneth, A. (2008). Scaled quail management in Trans-Pecos Texas. Proc Wildlife Conference, Alpine, Texas, August 14, 2008, 18-19.
- Klemm, P. and Schembri, M.A. (2000). Bacterial adhesins: function and structure. *Int. J. Med. Microbiol*, 290: 27-35.
- Knobl, T., Gomes, T.A.T., Vieira, M.A.M., Ferreira, F., Bottino, J.A. and Ferreira, A.J.P. (2006). Some adhesins of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from septicemic poultry in Brazil. *Braz. J. Microbiol*, 37(3): 379-384.
- Kukanur, S., Meundi, M., Bajaj, A. and Kotigadde, S. (2015). Co-Relation between Virulence factors and antibiotic resistance of *E. coli*, with special reference to uropathogenic *E. coli*. *J. of Dent. and Med. Sci.*, 14(3): 15-21.
- Kunert-Filho, H.C., Carvalho, D., Grassotti, T.T., Soares, B.D., Rossato, J.M., Cunha, A.C., Brito, K.C., Cavalli, L.S. and Brito, B.G. (2015). Avian pathogenic *Escherichia coli*-methods for improved diagnosis. *World Poult. Sci J.*, doi: 10.1017/S0043933915000264
- Kurl, D.N., Haataja, S. and Finne, J. (1989). Hemagglutination activities of group B, C, D and G streptococci: Demonstration of novel sugar-specific cell-binding activities in *Streptococcus suis*. *Infect. Immun.* 57(2): 384-389.
- Laura, C., Rodney, R. and Welch, A. (2016). Hemolysin of uropathogenic *Escherichia coli*: A cloak or a dagger?, *Biochimica et Biophysica ACTA*. 538-545.
- Maheswari, U.B., Palvai, S., Anuradha, P.R. and Kammili, N. (2013). Hemagglutination and biofilm formation as virulence markers of uropathogenic *E. coli* in acute urinary tract infections and urolithiasis. *Ind. J. of Urol.*, 29: 277-281.
- Mittal, S., Sharma, M. and Chaudhary, U. (2014). Study of Virulence Factors of Uropathogenic *Escherichia coli* and Its Antibiotic Susceptibility Pattern. *Irian J. Pathol. and Microbiol*, 57(1): 61-64.
- Moon, G.S., Pyun, Y.R. and Kim, W.J. (2006). Expression and purification of a fusion-typed pediocin PA-1 in *Escherichia coli* and recovery of biologically active pediocin PA-1. *Int. J. of Food Microbiol*, 108(1): 136-140.
- Moulin-Schouleur, M., Reperant, M., Laurent, S., Bree, A., Mignon-Grasteau, S., Germon, P., Rasschaert, D. and Schouleur, C. (2007). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. *J. Clin. Microbiol*, 45(10): 3366-3376.

- Neter, E., Bertram, L.F., Zak, D.A. and Arbesman, C.E. (1952). Studies on hemagglutination and hemolysis by *Escherichia coli* antisera. *J. of Exp. Med.*, 96(1):1-15.
- Nowicki, B., Truong, L., Moulds, J. and Hull, R. (1988). Presence of the Dr receptor in normal human tissues and its possible role in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. *Am. J. of Pathol*, 133: 1-4.
- Osman, K.M., Hessain, A.M., Abo-shama, U.H., Girh, Z.M., Kabli, S.A., Hemeg, H.A. and Moussa, I.M. (2018). An alternative approach for evaluating the phenotypic virulence factors of pathogenic *Escherichia coli*. *Saudi J. of Biolog. Sci.*, 25: 195-197.
- Prihtiyantoro W dan Khusnan. (2016). *Karakterisasi fenotip dan genotip faktor-faktor virulensi Escherichia coli dari kasus kolibasilosis burung puyuh*. Laporan Penelitian Dasar. Kopertis Wilayah V Yogyakarta, Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan.
- Radwan, I.E.H., Sayed, H.S., Soad, A.A.A. and Marwa, A.Y.A. (2014). Frequency of some virulence associated genes among multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from septicemic broiler chickens. *Int. J. of Adv. Res.*, 2(12): 867-874.
- Rodriguez-Siek, K.E., Giddings, C.W., Doetkott, C., Johnson, T.J. and Nolan, L.K. (2005). Characterizing the APEC pathotype. *Vet. Res.*, 36: 241-256.
- Roy, P., Purushothaman, V., Koteeswaran, A. and Dhillon, A.S. (2006). Isolation, characterization, and antimicrobial drug resistance pattern of *Escherichia coli* isolated from Japanese quail and their environment. *J. of Appl. Poult. Res.*, 15: 442-446.
- Salasia, S.I.O. and Laemler C. (1994). Occurrence of haemagglutinating adhesin among virulent and avirulent isolates of *Streptococcus suis*. *Med. Sci. Res.*, 22: 763-764.
- Salasia, S.I.O. 1994. Untersuchungen zu mutmaßlichen Pathogenitätsfaktoren von *Streptococcus suis*. Veterinary Medicine Disertasi. Justus-Liebig-Universität-Gießen.
- Salehi, M. and Ghanbarpour, R. (2010). Characterization of *Escherichia coli* Isolates from Commercial Layer Hens with Salpingitis. *Am. J. of Anim. and Vet. Sci.*, 5 (3): 208-214.
- Salit, I.E. and Gotschlich, E.C. (1977). Hemagglutination by purified type I *Escherichia coli* pili. *J. Exp. Med.*, 146(5): 1169-1181.
- Sekhar, M.S., Sharif, N.M. and Rao, T.S. (2017). Serotypes of sorbitol-positive shiga toxinogenic *Escherichia coli* (SP-STEC) isolated from freshwater fish. *Int. J. of Fish. and Aqua. Stud.*, 5(3): 503-505.
- Shankar, T.V.S., Sharma, A. and Grover, Y. (2010). Studies on different virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Haryana Veterinarian*. 49: 45-47.
- Sharma, S., Bhat, G.K. and Shenoy, S. (2007). Virulence factors and drug resistance in *Escherichia coli* isolated from extraintestinal infections. *Ind. J. Med. Microbiol*, 25: 369-373.
- Stapp, J.R., Jelacic, S., Yoo-Lee, Y., Klein, E.J., Fischer, M., Clausen, C.R., Qin, X., Swerdlow, D.L. and Tarr, P.I. (2000). Comparison of *Escherichia coli* O157:H7 antigen selection in stool and broth cultures to that in sorbitol-MacConkey agar stool culture. *J. of Clin. Microbiol*, 38(9): 3404-3406.
- Tivendale KA, Logue C.M., Kariyawasam, S., Jordan, D., Hussein, A., Li, G., Wannemuehler, Y. and Nolan, L.K. (2010). Avian-pathogenic *Escherichia coli* strains are similar to neonatal meningitis *E. coli* strains and are able to cause meningitis in the rat model of human disease. *Infection and Immunity*. 78(8): 3412-3419.
- Turblin V. 2009. *E. coli* in poultry production: Laboratory Diagnostic of Avian

- Pathogenic Strains (APEC). 26 September 2009. CEVA Animal Health Asia Pacific. Selangor, Malaysia.
- van der Westhuizen, W.A. and Bragg, R.R. (2012). Multiplex polymerase chain reaction for screening avian pathogenic *Escherichia coli* for virulence genes. *Av. Pathol*, 41(1): 33-40.
- Vidotto, M.C., Muller, E.E., Freitas, J.C., Alfieri, A.A., Guimaraes, I.G. and Santos, D.S. (1990). Virulence factors of avian *Escherichia coli*. *Av. Dis.*, 34: 531-538.
- Vidotto, M.C., Cacao, J.M., Goes, C.R. and Santos, D.S. (1991). Plasmid coding for aerobactin production and drug resistance is involved in virulence of *Escherichia coli* avian strains. *Brazil J. Med. Biol. Res*, 24(7): 677-685.
- Welch, R.A., Dellinger, E.P., Minshew, B. and Falkow, S. (1981). Haemolysin contributes to virulence of extra-intestinal *E. coli* infections. *Nature*. 17: 665-667.
- Welch, R.A. (1991) Pore-forming cytolysins of gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol*, 5(3): 521-528.
- Wibawan, I.W.T., Laemmler, C. and Pasaribu, F.H. (1993). A haemagglutinin adhesion of group B Streptococci isolate from cases of bovine mastitis mediated adherence to hella cell. *J. Gen Microbiol*, 139: 2173.
- Zahid, A.A.H., AL-Mossawei, M.T.M. and Mahmood, A.B. (2016). In vitro and in vivo pathogenicity tests of local isolates APEC from naturally infected broiler in Baghdad. *Int. J. of Adv. Res.*, 3(3): 89-100.
- Zhao, T., Doyle, M.P., Shere, J. and Garber L. (1995). Prevalence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a survey of dairy herds. *Appl. and Envir. Microbiol*, 61: 1290-1293.

## Identifikasi Tipe Dehidrasi dan Profil Elektrolit Mayor pada Pasien Kucing di Rumah Sakit Hewan Prof. Soeparwi dan Beberapa Klinik Hewan di Wilayah Yogyakarta

### *Identification of Dehydration Type and Major Electrolyte Profile of Cat Patients in Prof. Soeparwi Animal Hospital and Animal Clinics in Yogyakarta*

Guntari Titik Mulyani<sup>1</sup>, Setyo Budhi<sup>2</sup>, Kurnia<sup>3</sup>

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

<sup>2</sup>Departemen Bedah dan Radiologi Fakultas Kedokteran Hewan, Univeritas Gadjah Mada, Yogyakarta

<sup>3</sup>Rumah Sakit Hewan Prof. Soeparwi Fakultas Kedokteran Hewan, Univeritas Gadjah Mada, Yogyakarta

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

Naskah diterima: 22 Oktober 2021, direvisi: 1 November 2021, disetujui: 29 November 2021

#### Abstract

Dehydration is defined as a lack of body fluids followed by loss of electrolytes, and changes in acid-base balance. In handling dehydrated patients, veterinarians do not always measure the electrolyte profiles due to equipment, time, and cost constraints. Information about the electrolyte profile that is common in patients requiring fluid therapy will assist veterinary practitioners in correcting the patient's electrolyte balance. The purpose of this study was to identify the type of dehydration and to determine the major electrolyte profile in cat patients in Prof. Soeparwi animal hospital and animal clinics in the Yogyakarta and surrounding areas. This study used 18 sick cats that were thought to be dehydrated, marked by decreased skin turgor, CRT >2 seconds, and cats that were suspected of having electrolyte balance disorders with symptoms of ascites, uropoetic disorders. Blood was drawn for all cats to measure Pack Cells Volume (PCV) levels. Patient clinical data and patient diagnosis were recorded, cats with changes in serum PCV levels were separated for examination of levels of sodium, chloride, potassium using Seamaty SMT-120V. The type of dehydration is identified based on the sodium level in the serum of a dehydrated cat. The results showed that most of the cat patients were dehydrated had low serum sodium levels (hyponatremia). There was 1 cat patient had low chloride levels. Potassium levels in cats with UT obstruction increased, which led to a decrease in the Na: K ratio. Cat bicarbonate levels did not show any change. From the results of the study, it was concluded that the type of dehydration that occurs in cats is hypotonic dehydration (71%). Most of the sodium levels (71%) decreased, most of the chloride levels (93%) were normal, most of the potassium levels (86%) were normal, and bicarbonate levels did not change. The advice given is to check electrolytes before doing fluid therapy. Prior to electrolyte testing, dehydrated cats can be given a sodium solution.

**Keywords:** cat; dehydration; electrolyte

#### Abstrak

Dehidrasi didefinisikan sebagai kekurangan cairan tubuh yang diikuti oleh kehilangan elektrolit, dan perubahan keseimbangan asam-basa. Dalam penanganan pasien dehidrasi, para dokter hewan tidak selalu melakukan pengukuran profil elektrolit karena kendala alat, waktu, dan biaya. Informasi tentang profil elektrolit yang biasa terjadi pada pasien yang membutuhkan terapi cairan akan membantu para praktisi dokter hewan dalam mengoreksi keseimbangan elektrolit pasien. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi tipe dehidrasi dan mengetahui profil elektrolit mayor pada pasien kucing di RSH Prof. Soeparwi dan beberapa klinik hewan di wilayah Yogyakarta dan sekitarnya. Penelitian

ini menggunakan 18 ekor kucing sakit yang diduga mengalami dehidrasi dengan ditandai dengan penurunan turgor kulit, CRT > 2 detik, dan kucing yang diduga mengalami gangguan keseimbangan elektrolit dengan gejala ascites, gangguan uropoetika. Seluruh kucing diambil darahnya untuk pengukuran kadar *Pack Cells Volume* (PCV). Dari 18 ekor kucing, dijumpai 14 kucing mengalami dehidrasi. Data klinis pasien dan diagnosis dicatat. Kucing diambil darahnya, serum dipisahkan untuk pemeriksaan kadar natrium, klorid, kalium dengan menggunakan Seamaty SMT-120V. Tipe dehidrasi diidentifikasi berdasarkan kadar natrium dalam serum kucing yang mengalami dehidrasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sebagian besar pasien kucing yang mengalami dehidrasi memiliki kadar natrium dalam serumnya yang rendah (hiponatremia). Terdapat 1 pasien kucing yang memiliki kadar klorid rendah. Kadar kalium kucing yang mengalami obstruksi UT terjadi peningkatan, yang menyebabkan terjadinya penurunan ratio Na:K. Kadar bikarbonat kucing tidak menunjukkan adanya perubahan. Dari hasil penelitian disimpulkan bahwa tipe dehidrasi yang terjadi pada kucing adalah dehidrasi hipotonik (71%). Profil natrium sebagian besar (71%) mengalami penurunan, kadar klorida sebagian besar (93%) dalam batas normal, kadar kalium sebagian besar dalam batas normal (86%), dan kadar bikarbonat tidak mengalami perubahan. Saran yang diberikan adalah melakukan pemeriksaan elektrolit sebelum melakukan terapi cairan. Sebelum dilakukan pemeriksaan elektrolit, pada kucing dehidrasi dapat diberikan larutan yang mengandung sodium.

**Kata kunci:** dehidrasi; elektrolit; kucing

### Pendahuluan

Air merupakan komponen penyusun tubuh sekitar 60% berat badan pada hewan sehat. Sebesar 66% air di intraseluler, dan 33% ekstraseluler (75% interstitial dan 25% intravaskuler). Pada anjing air di intravaskuler sebesar 8% berat badan, sedangkan pada kucing 6% dari berat badan (Tello and Peres-Freytes, 2017). Air berfungsi sebagai zat pelarut nutrient dalam tubuh untuk digunakan oleh sel. Air dan elektrolit tidak dapat dipisahkan dari komponen diet. Keseimbangan air sangat diperlukan dalam metabolisme dan semua material metabolisme dapat dimanfaatkan oleh sel tubuh jika sudah terlarut. Seluruh cairan tubuh didistribusikan ke dalam kompartemen intraseluler dan ekstraseluler (Anthara dan Suarta, 2011).

Elektrolit adalah senyawa di dalam larutan yang berdisosiasi menjadi partikel yang bermuatan (ion) positif atau negatif. Sebagian besar proses metabolisme memerlukan ion dan dipengaruhi oleh elektrolit. Konsentrasi elektrolit yang tidak normal dapat menyebabkan banyak gangguan. Fungsi utama empat elektrolit mayor, yaitu natrium ( $\text{Na}^+$ ), kalium ( $\text{K}^+$ ), klorida ( $\text{Cl}^-$ ), dan bikarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ) adalah pemeliharaan tekanan osmotik dan distribusi beberapa kompartemen cairan tubuh. Pemeriksaan keempat elektrolit mayor tersebut

dalam klinis dikenal sebagai profil elektrolit. Natrium adalah kation terbanyak dalam cairan ekstrasel, kalium kation terbanyak dalam cairan intrasel dan klorida merupakan anion terbanyak dalam cairan ekstrasel. Jumlah natrium, kalium dan klorida dalam tubuh merupakan cermin keseimbangan antara yang masuk terutama dari saluran cerna dan yang keluar terutama melalui ginjal (Ferawati dan Yaswir, 2012).

Dehidrasi merupakan suatu gangguan keseimbangan cairan atau air pada tubuh. Hal ini terjadi karena pengeluaran air melebihi pemasukan, sehingga jumlah air pada tubuh berkurang. Gangguan kehilangan cairan tubuh (*water depletion*) ini dapat juga disertai dengan gangguan keseimbangan zat elektrolit tubuh (*sodium depletion*) atau gangguan asam basa tubuh, seperti pada kasus muntah, diare dan polyuria akibat diuretic maupun defisiensi aldosterone. Selain itu, kasus lain yang menyebabkan dehidrasi adalah kekurangan asupan air minum, luka bakar yang luas serta hidropascites (Suartha, 2009). Tipe dehidrasi dibatasi berdasarkan konsentrasi sodium dalam serum pada saat terjadi dehidrasi. Dehidrasi isotonik merupakan dehidrasi yang paling banyak terjadi tanpa perubahan kadar sodium. Dehidrasi hipertronic terjadi jika kadar sodium melebihi normal, sedangkan pada dehidrasi



hipotonik terjadi jika kadar sodium di bawah normal. Memahami tipe dehidrasi sangat penting pada saat *fluid therapy*, sehingga koreksi elektrolit dalam tubuh pasien dapat dilakukan secara tepat (Suartha, 2009).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui tipe dehidrasi dengan mengukur kadar sodium, klorida, kalium, dan bikarbonat pasien yang mengalami dehidrasi. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi acuan para dokter hewan dalam melakukan terapi cairan pada pasien yang mengalami dehidrasi, dan dapat mengingatkan kembali akan pentingnya mengetahui status elektrolit pasien sebelum melakukan *fluid therapy*.

### Materi dan Metode

Penelitian ini dilakukan terhadap sampel darah kucing pasien Rumah Sakit Hewan Prof. Soeparwi FKH UGM dan beberapa klinik hewan di wilayah Yogyakarta dan sekitarnya. Sejumlah 18 pasien dengan gejala klinis turgor kulit turun, *Capillary Refilling Time* (CRT) >2 detik, dan pasien dengan gangguan pada cairan tubuh (oedema, problema uropoetika) diambil darahnya untuk mengukur *Pack Cells Volume* (PCV). Serum darah dikoleksi dari pasien dengan PCV di atas normal sebanyak 0,5 ml untuk pemeriksaan elektrolit.

Pemeriksaan elektrolit dilakukan di RSH Prof. Soeparwi FKH UGM menggunakan alat spektrofotometer Seamaty SMT-120V (Chengdu Seamaty Technology Co.Ltd.). Jenis elektrolit yang diukur adalah: natrium, klorida, kalium, dan bikarbonat. Hasil pengukuran kadar elektrolit dicatat, tipe dehidrasi ditetapkan berdasar kadar natrium dalam sampel. Data pasien dicatat meliputi: umur, sex, gejala klinis serta diagnosis pasien.

### Hasil dan Pembahasan

Penelitian dilakukan terhadap 18 pasien dengan gejala klinis dehidrasi. Pada penelitian ini parameter dehidrasi ditetapkan dengan pemeriksaan klinis (turgor kulit turun, *Capillary Refilling Time* (CRT) >2 detik), dan pengukuran kadar PCV. Dari 18 ekor kucing yang diduga dehidrasi, hanya 14 ekor yang menunjukkan penurunan PCV. Pengukuran elektrolit dilakukan menggunakan spektrofotometer Seamaty SMT-

120V terhadap elektrolit mayor: natrium, klorida, kalium, dan bikarbonat.

Dehidrasi didefinisikan sebagai kekurangan cairan tubuh yang diikuti oleh kehilangan elektrolit, dan perubahan keseimbangan asam-basa (Lorenz *et al*, 1997). Gejala klinis dehidrasi yang dapat dipakai sebagai acuan adalah: (1) hilangnya elastisitas kulit (turgor), (2) membran mukosa kering, (3) waktu pengisian kapiler (*capillary refilling time*) yang bertambah, (5) kelelahan, depresi, dan shock (dehidrasi berat), (6) Pemeriksaan laboratorium : PCV dan plasma protein meningkat, BJ urin lebih dari 1.035 (Ellershaw *et al.*, 1995).

Menurut Suartha (2009) volume cairan yang bersirkulasi dipengaruhi konsentrasi elektrolit, protein plasma, dan partikel lain yang berperan aktif dalam proses osmosis, difusi dan pompa natrium-kalium. Tubuh akan kehilangan cairan dan elektrolit setiap hari sebagai konsekuensi dari metabolisme tubuh yang normal. Penge-luaran air dari tubuh dapat melalui empat jalan yaitu : (1) Pengeluaran air melalui respirasi pada hewan terengah-engah seperti anjing. Pada hewan lain sangat bervariasi tergantung atas jenis hewan, (2) Air keluar melalui kulit, karena difusi dari permukaan dan keringat. Jumlah yang keluar melalui keringat masing-masing hewan bervariasi tergantung dari jumlah kelenjar keringat pada kulit, (3) Keluar melalui feses, jumlahnya sangat sedikit dan pada masing-masing hewan volume bervariasi tergantung atas diet yang diberikan, (4) Keluar melalui urin (Suartha, 2009). Elektrolit yang keluar dari dalam tubuh lebih sedikit dibandingkan dengan air (Willyanto, 2010). Profil elektrolit kucing yang mengalami dehidrasi disajikan pada Tabel 1.

Pemeliharaan homeostasis cairan tubuh adalah penting bagi kelangsungan hidup semua organisme. Fungsi utama empat elektrolit mayor, yaitu natrium ( $\text{Na}^+$ ), kalium ( $\text{K}^+$ ), klorida ( $\text{Cl}^-$ ), dan bikarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ) adalah Pemeliharaan tekanan osmotik dan distribusi beberapa kompartemencairan tubuh. Pemeriksaan ke empat elektrolit mayor tersebut dalam klinis dikenal sebagai "profil elektrolit" (Supriyono, 2012). Dari 14 kucing yang mengalami gejala klinis dehidrasi, sebagian besar mengalami hiponatremia. Kucing yang mengalami hipo-

natremia didiagnosis dehidrasi, suspect Panleukopenia, Gingivitis dan Pankreatitis. Menurut Harjoeno (2006) kekurangan natrium dapat terjadi karena beberapa abnormalitas diantaranya penyakit ginjal yang disertai pengeluaran garam atau penyakit ginjal lain yang mengganggu kemampuan ginjal mengatur elektrolit. Natrium juga dapat keluar dari permukaan tubuh, misalnya melalui saluran cerna (muntah, pengisapan nasogastrik, fistula usus, diare kronis) atau kulit (berkeringat pada kulit normal, pengeluaran melalui luka bakar). Pada penelitian ini kasus hiponatremia pada pasien lebih banyak terjadi karena adanya problema pencernaan yang mengakibatkan hewan muntah dan diare, dan adanya gangguan ginjal, parasit darah dan adanya peritonitis.

Chew (1994) membedakan tipe dehidrasi berdasarkan kadar natrium dalam darah menjadi dehidrasi isotonik jika kadar natrium mencapai 145-157 mEq/L; dehidrasi hipotonik jika kadar natrium kurang dari 145 mEq/L; dan dehidrasi hipertonik jika kadar natrium mencapai lebih dari 157 mEq/L. Melihat kenyataan tersebut, tampaknya dehidrasi yang terjadi pada penelitian ini adalah dehidrasi hipotonik.

Klorida merupakan anion utama dalam cairan ekstrasel. Pemeriksaan konsentrasi klorida dalam plasma berguna sebagai diagnosis banding pada gangguan keseimbangan asam-basa. Pada penelitian ini penurunan kadar klorida terjadi pada pasien obstruksi UT. Menurut Harjoeno (2006) kadar klorida menurun misalnya pada sekresi cairan lambung yang berlebihan. sedang retensi klorida atau makan dengan garam berlebihan dapat menimbulkan hiperkloremia dengan asidosis metabolik, penggunaan obat yang dapat meninggikan kadar klorida atau menurunkan kadar klorida seperti thisid, furosemid, bikarbonat harus dihentikan sebelum pemeriksaan kadar klorida. Klorida jarang diperiksa tersendiri tetapi biasanya bersama-sama dengan elektrolit lain. Peningkatan kadar klorida dapat terjadi pada nephritis, obstruksi kelenjar prostat dan dehidrasi. Kadar rendah ditemukan pada gangguan fungsi gastrointestinal dan ginjal.

Fungsi kalium adalah memelihara keseimbangan osmotik dalam sel, meregulasi aktifitas otot, enzim dan keseimbangan asam basa. Kalium

merupakan kation utama dalam sel. Nilai normal kalium serum adalah 3,5-5,8 mmol/L (David dan Marten, 2010). Sekitar 98% jumlah kalium dalam tubuh berada di dalam cairan intrasel. Jumlah kalium ini dipengaruhi oleh umur dan jenis kelamin (Feriwati dan Yaswir, 2012). Kekurangan ion kalium dapat menyebabkan frekuensi denyut jantung melambat. Peningkatan kalium plasma 3-4 mmol/L dapat menyebabkan aritmia jantung, konsentrasi yang lebih tinggi lagi dapat menimbulkan henti jantung (Feriwati dan Yaswir, 2012). Pada penelitian ini 1 kucing mengalami hipokalemia, kondisi ini kemungkinan disebabkan karena adanya gangguan pencernaan (*suspect* panleukopenia) sehingga absorpsi kalium terganggu. Pasien dengan obstruksi UT mengalami peningkatan kadar kalium dan ratio Na:K dibawah normal. Ratio Na:K yang rendah (< 27) terjadi karena kadar kalium yang sangat tinggi (> 8mmol/L), hal ini kemungkinan terjadi karena pengeluaran kalium yang terganggu akibat obstruksi dari saluran kencing.

Kadar bikarbonat pada kucing yang sehat berkisar 13-25 mmol/L. Pengukuran kadar bikarbonat pada semua sampel kucing penelitian ini menunjukkan hasil pada batas normal. Bikarbonat ( $\text{HCO}_3$ ) berperan sebagai komponen basa dan disebut juga sebagai komponen metabolik. Ginjal mengatur keseimbangan asam basa dengan sekresi dan reabsorpsi ion hidrogen dan ion bikarbonat (Abramowitz, 2014).

### Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa tipe dehidrasi yang terjadi pada kucing pasien RSH Prof. Soeparwi dan beberapa klinik hewan di wilayah Yogyakarta dan sekitarnya didominasi dehidrasi hipotonik. Profil elektrolit mayor pada pasien kucing berupa: 71% memiliki kadar natrium di bawah normal (hyponatremia), 93% memiliki kadar klorida normal, 86% memiliki kadar kalium normal dan kadar seluruh sampel memiliki kadar bikarbonat normal.

Dari hasil penelitian disarankan dalam menentukan terapi cairan sebaiknya melakukan pengukuran elektrolit agar dapat dilakukan terapi yang tepat sesuai dengan kebutuhan elektrolit pasien. Namun demikian, jika melihat bahwa sebagian besar pasien kucing yang mengalami

dehidrasi terjadi penurunan kadar natrium dalam darahnya, maka terapi cairan yang diberikan disarankan mengandung natrium.

### Ucapan Terima Kasih

Ucapan terimakasih yang tak terhingga ditujukan kepada Dekan Fakultas Kedokteran Hewan UGM atas kepercayaannya kepada peneliti untuk menjalankan penelitian ini. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada seluruh staf RSH Prof. Soeparwi FKH UGM, dan dokter klinik swasta di wilayah Yogyakarta atas kerjasamanya dalam koleksi sampel.

### Daftar Pustaka

- Abramowitz, M. 2014. Acid-Base Balance and Physical Function. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 9(12):2030-2032.
- Anthara, I.M.S. dan Suartha, I. N. 2011. Homeostasis Cairan Tubuh Pada Anjing Dan Kucing. *Bulletin Vetriner Udayana*, 3(1): 23 – 37.
- Chew, DJ. 1994. Fluid Therapy For Dogs and Cats. In *Manual of Small Animal Practice*, Birchard SJ, Sherding RG. (Eds). Saunders. Sydney. WB Saunders Co. Pp. 64-75.
- David, W., dan Marten, 2010. Fungsi Ginjal dan Miksi. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*, edisi ke-22, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta, hh. 725-756.
- Ellershaw, JE., Sutcliffe, JM., and Saunders, CM. 1995. Dehydration and the dying patient. *J Pain Symptom Manage*, 10:192-197.
- Ferawati, I., dan Yaswir, R. 2012. *Jurnal Kesehatan Andalas. Fisiologi dan Gangguan Keseimbangan Natrium, Kalium dan Klorida serta Pemeriksaan Laboratorium*. 1(2): 80-84.
- Harjoeno, H. 2006. Perubahan Kadar Natrium dan Kalium Serum Akibat Pemberian Glukosa 40% pada latihan Fisik Akut. *Sari Pediatri*. 10: 79-80.
- Lorenz, M.D., Cornelius, L.M., dan Ferguson, D.C. 1997. *Small Animal Medical Therapeutics*. Philadelphia: Lippincott Raven Publisher.
- Suartha, Nyoman I. 2009. Terapi cairan pada Anjing dan Kucing. *Buletin Veteriner Udayana*, 2 (2) :69-83.
- Tello, L., and Perez-Freytes, R. 2017. Fluid and Electrolyte Therapy During Vomiting and Diarrhea. *Vet Clin Small Anim* 47:505–519.
- Willyanto, I. 2010. Terapi Cairan: Memilih Larutan Terbaik Untuk Tiap Pasien. *Seminar Sehari Continuing Education APDHKI Denpasar*. Bali 30 Januari 2010.

**Respons Imun Seluler Ayam Petelur Pascavaksinasi  
*Avian Influenza* Subtipe H5N1 Isolat dari Bali**

***Cellular Immune Response of Laying Chickens Post-Vaccination of  
Avian Influenza Subtype H5N1 Isolate from Bali***

Gusti Ayu Yuniati Kencana<sup>1\*</sup>, Tri Komala Sari<sup>1</sup>, I Nyoman Suartha<sup>2</sup>,  
I Ketut Tomy Caesar Ramanda<sup>1</sup>, Anak Agung Sagung Kendran<sup>3</sup>,

<sup>1</sup>Laboratorium Virologi Veteriner,

<sup>2</sup>Laboratorium Penyakit Dalam Veteriner,

<sup>3</sup>Laboratorium Patologi Klinik Veteriner,

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana,

Jl. PB Sudirman, Denpasar, Bali

\*Email: [yuniati\\_kencana@unud.ac.id](mailto:yuniati_kencana@unud.ac.id)

Naskah diterima: 25 Mei 2021, direvisi: 26 Juli 2021, disetujui: 29 November 2021

**Abstract**

Avian Influenza subtype H5N1 (AI-H5N1) is a virulent virus that is detrimental to laying chickens because it is highly contagious and mutates easily. Prevention of AI-H5N1 disease in laying chickens is carried out by vaccination, therefore to maintain the quality of the vaccine, continuous research is needed. This study aims to determine the potential of AI-H5N1 vaccine isolates from Bali based on cellular immune responses with total and differential leukocyte cell parameters. Antibody production is influenced by the nonspecific and specific immune system involving leukocytes, especially lymphocytes. Total of 40 layers of Novogen Brown strain were used for the research sample, kept since the age of one day on a commercial farm in Perean Village, Tabanan Regency, Bali. Laying chickens are vaccinated at 5 weeks of age by intramuscular injection at dose of 0.5 ml. Total of 20 laying chickens were taken randomly for samples from 40 treated chickens. Blood draws were performed once pre-vaccination and five times each week after vaccination with anticoagulants. Total leukocytes were examined by an auto hematology analyzer, while differential leucocytes with thin blood smear stained with Giemsa. Total and differential leukocyte data were analyzed by means of the variance test followed by the Duncan test. Results showed that AI-H5N1 vaccination from Bali isolates could increase total and differential leucocytes of laying chickens and had significant effect on the mean total leukocytes, the absolute values of heterophyll cells, eosinophils, lymphocytes, and monocytes, but had no significant effect on post-vaccination basophil cells. It was concluded that the AI-H5N1 vaccine isolated from Bali was proven to stimulate the cellular immune response of laying hens which was characterized by an increase in post-vaccination leukocytes, especially lymphocyte cells as precursors of antibody formation..

**Keywords:** avian influenza H5N1; differential leukocytes; isolate from Bali; total leukocytes; vaccinations

**Abstrak**

*Avian Influenza* subtipe H5N1 (AI-H5N1) adalah virus ganas yang merugikan peternakan ayam petelur karena sangat menular dan mudah bermutasi. Pencegahan penyakit AI-H5N1 pada ayam petelur dilakukan dengan vaksinasi, oleh karena itu untuk menjaga mutu vaksin maka diperlukan penelitian berkesinambungan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi vaksin AI-H5N1 isolat dari Bali berdasarkan respons imun seluler dengan parameter total dan diferensial sel leukosit. Produksi antibodi dipengaruhi oleh sistem imun nonspesifik dan spesifik yang melibatkan leukosit, terutama sel limfosit. Sebanyak 40 ekor ayam petelur *strain* Novogen Brown digunakan untuk sampel penelitian yang dipelihara sejak berumur satu hari pada peternakan

komersial di Desa Perean, Kabupaten Tabanan, Bali. Ayam petelur divaksinasi pada umur 5 minggu melalui injeksi intramuskuler dengan dosis 0,5 ml. Sebanyak 20 ekor ayam petelur diambil secara acak untuk sampel penelitian dari 40 ekor ayam perlakuan yang divaksinasi. Pengambilan darah dilakukan satu kali pascavaksinasi dan lima kali setiap minggu pascavaksinasi dengan antikoagulan. Total leukosit diperiksa dengan *auto hematology analyzer* sedangkan diferensial leukosit dengan hapusan darah tipis yang diwarnai Giemsa. Data total dan diferensial leukosit dianalisis dengan uji sidik ragam dan dilanjutkan dengan uji Duncan. Hasil penelitian menunjukkan vaksinasi AI-H5N1 isolat dari Bali dapat meningkatkan total dan diferensial leukosit ayam petelur dan berpengaruh nyata terhadap rerata total leukosit, nilai absolut sel heterofil, eosinofil, limfosit, dan monosit, tetapi tidak berpengaruh nyata terhadap sel basofil pascavaksinasi. Disimpulkan bahwa vaksin AI-H5N1 isolat dari Bali terbukti dapat merangsang respons imun seluler ayam petelur yang ditandai dengan peningkatan leukosit pascavaksinasi, terutama sel limfosit sebagai prekursor terbentuknya antibodi.

**Kata kunci:** *avian influenza* H5N1; diferensial leukosit; isolat dari Bali; total leukosit; vaksinasi

## Pendahuluan

Komoditas peternakan terbesar di Indonesia saat ini berasal dari sektor perunggasan, hampir 70% industri peternakan didominasi industri perunggasan (Yulistiya *et al.*, 2017). Perkembangan industri perunggasan khususnya peternakan ayam petelur di Provinsi Bali tersebar diseluruh kabupaten dan kota di Bali dengan populasi terbesar berada di Kabupaten Tabanan, sebesar 51,79% (Kurniawan *et al.*, 2013). Peternakan ayam petelur memiliki kendala berbagai penyakit salah satunya yaitu *Avian Influenza* (AI). Pertiwi *et al.*, (2020) menyatakan bahwa virus AI masih endemis di Bali. Keganasan virus AI dapat dibedakan menjadi dua, yaitu *low pathogenic avian influenza* (LPAI) yang menyebabkan penyakit ringan dan *highly pathogenic avian influenza* (HPAI) yang menyebabkan penyakit ganas contohnya subtipe H5N1 (Kencana, 2012; Swayne and Swartz, 2000).

Penyakit HPAI disebabkan oleh virus dari famili Orthomyxoviridae, genus influenza tipe A, subtipe H5N1 (OIE, 2015). Virus AI subtipe H5N1 dapat menular secara cepat di antara kelompok ternak unggas dan menimbulkan morbiditas dan mortalitas yang sangat tinggi (Kencana, 2012). Ayam petelur sangat peka terhadap virus AI dengan gejala klinis gangguan pernapasan atas dan gangguan reproduksi serta dapat menimbulkan kematian hingga 100% (Sharif *et al.*, 2014). Masa inkubasi penyakit AI berkisar antara 2-3 hari atau lebih sejak unggas terinfeksi virus dan mulai munculnya tanda-tanda klinis (Kencana, 2012). Salah satu strategi utama dalam penanggulangan penyakit AI di

Indonesia yaitu dengan program vaksinasi (OIE, 2005).

Vaksinasi pada ayam petelur bertujuan untuk memproduksi kekebalan spesifik yang protektif guna menghadapi penyakit virus di lapangan (Kencana *et al.*, 2015). Namun, vaksinasi AI sering mengalami kegagalan karena virus AI mudah mengalami perubahan materi genetik sehingga diperlukan pemantauan dan riset berkesinambungan tentang virus AI dalam rangka efikasi vaksin (El-Zoghby *et al.*, 2012). Virus AI-H5N1 asal Indonesia telah berevolusi menjadi beberapa *sub-lineage* sebagai akibat dari pengaruh geografi Indonesia yang berupa kepulauan, sehingga masing-masing wilayah memiliki kekhasan genetik yang berbeda-beda (Smith *et al.*, 2006). Tingkat keberhasilan vaksinasi AI-H5N1 sangat tergantung pada tingkat kecocokan antara *strain* virus lapangan dan vaksin yang digunakan untuk dapat memberikan perlindungan (protektif) terhadap penyakit AI. Vaksin yang baik adalah vaksin yang memiliki homologi genetik dan antigenik yang mendekati sempurna dengan virus yang beredar di wilayah yang bersangkutan (Mahardika *et al.*, 2009). Kencana *et al.*, (2020) menyatakan bahwa *seed* vaksin isolat virus AI subtipe H5N1 asal Bali (A/Chicken/Bali9C/GAY/2019) termasuk *clade* 2.3.2, memiliki kekerabatan 96,72% dengan *seed* vaksin pemerintah Indonesia A/duck/Sukoharjo/BBVW-1428-9/2012. Kandungan virus vaksin AI-H5N1 isolat dari Bali adalah sebesar 10<sup>6,9</sup> ELD50 dan telah lolos uji *seed* dari PT Sanbio Laboratories, Bogor (Kencana *et al.*, 2020). Uji laboratorium telah dilakukan di BSL-3 PT Sanbio Laboratories, dan saat ini sedang dilakukan uji lapang.

Penelitian ini merupakan uji lapang dari vaksin AI-H5N1 isolat dari Bali. Uji lapang vaksin diperlukan untuk mengetahui potensi dan keamanan vaksin di lapangan. Monitoring terhadap potensi vaksin AI-H5N1 isolat dari Bali juga perlu dilakukan dengan memeriksa titer antibodi ayam pascavaksinasi (Kencana *et al.*, 2016). Selain memeriksa titer antibodi, parameter lain yang dapat dijadikan sebagai acuan potensi vaksin juga dengan melihat variabel sel darah putih atau leukosit untuk mendeteksi kekebalan seluler terutama sel limfosit sebagai prekursor terbentuknya antibodi. Tingkat kekebalan seluler ayam pascavaksinasi dapat dilihat dari variabel total dan diferensial leukosit secara lengkap (Isroli *et al.*, 2009). Respons imun yang diperankan oleh leukosit bersifat nonspesifik dan spesifik, baik secara seluler maupun humoral. Walaupun kedua respons imun tersebut prosesnya berbeda, namun keduanya saling meningkatkan efektivitasnya. Respons imun nonspesifik yang bersifat seluler diperankan oleh sel heterofil, eosinofil, basofil, dan monosit. Pada respons imun spesifik, limfosit T bersifat seluler dan limfosit B bersifat humoral (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi vaksin AI-H5N1 isolat dari Bali berdasarkan respons imun seluler dengan parameter total dan diferensial leukosit ayam petelur pascavaksinasi.

## Materi dan Metode

### Pengambilan Sampel

Metode penelitian digunakan rancangan acak lengkap (RAL). Sebanyak 40 ekor ayam petelur *strain* Novogen Brown dipelihara sejak *day old chick* (DOC) digunakan untuk penelitian. Vaksinasi dilakukan secara intramuskuler pada ayam setelah berumur 5 minggu dengan vaksin inaktif AI-H5N1 isolat dari Bali dengan dosis 0,5 ml/ekor. Sebanyak 20 ekor ayam petelur diambil darahnya secara acak dari 40 ekor ayam yang divaksinasi AI-H5N1 isolat dari Bali. Koleksi sampel dilakukan enam kali, yakni satu kali pravaksinasi dan lima kali setiap minggu pascavaksinasi. Sampel darah ayam diambil dengan cara dilakukan *restrain* ayam pada posisi *dorsal recumbency*. Sebelum darah diambil,

kulit pada bagian pembuluh darah ayam terlebih dahulu didesinfeksi dengan menggunakan kapas yang berisi alkohol 70% (*alcohol swab*) untuk mencegah terjadinya kontaminasi. Sebanyak 1 ml darah diambil dengan *disposable syringe* volume 3 ml melalui *vena brachialis*, kemudian ditampung pada tabung berisi antikoagulan *ethylene diamine tetra acetic acid* (EDTA).

### Total Leukosit

Total leukosit dihitung dengan alat *auto hematology analyzer* (Rayto RT-7600 for Vet). *Auto hematology analyzer* (Rayto RT-7600 for Vet) merupakan alat otomatis yang digunakan untuk menghitung nilai komponen darah atau hemogram hewan. Mesin *auto hematology analyzer* (Rayto RT-7600 for Vet) dihidupkan, kemudian dimasukkan data profil unggas yaitu jenis kelamin dan umur ayam. Sebanyak 9,8  $\mu$ L sampel darah yang berisi antikoagulan EDTA diambil secara otomatis dengan *sampling needle*. Hasil penghitungan total leukosit dapat dilihat secara otomatis pada layar monitor.

### Diferensial Leukosit

Pemeriksaan diferensial leukosit dilakukan dengan metode hapusan darah tipis yang diwarnai Giemsa. Darah yang sudah tercampur dengan antikoagulan ditetaskan pada salah satu ujung dari gelas objek kemudian diambil gelas objek yang lain dan ditempatkan dekat tetesan darah tadi dengan membentuk sudut 45°. Selanjutnya gelas objek didorong ke arah depan dengan cepat hingga terbentuk ulasan darah tipis di atas gelas objek. Hapusan darah segera dikeringkan dengan cara dibiarkan di udara terbuka. Preparat hapusan darah selanjutnya difiksasi dengan *methanol* selama lima menit kemudian dikeringkan. Pewarnaan preparat dengan Giemsa selama 25-30 menit sesuai dengan prosedur Petithory *et al.*, (2005). Preparat kemudian dibilas dengan air mengalir dan dikeringkan dengan posisi vertikal pada rak khusus. Setelah preparat hapusan darah kering kemudian diperiksa di bawah mikroskop dengan pembesaran 1.000 kali dan menggunakan minyak emersi (Utama *et al.*, 2013). Penghitungan diferensial leukosit dilakukan hingga sel-sel leukosit berjumlah 100 dan hasilnya dinyatakan dalam persentase (%).

Hasil penghitungan persentase masing-masing sel leukosit dikalikan dengan total leukosit maka diperoleh nilai absolut sel-sel leukosit ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ).

**Analisis Data**

Data hasil pemeriksaan total dan diferensial leukosit kemudian dianalisis menggunakan uji sidik ragam (*one-way analysis of variance*) dan dilanjutkan dengan uji Duncan menggunakan *statistical package for the social sciences* (SPSS).

**Hasil dan Pembahasan**

Hasil pemeriksaan total dan diferensial leukosit ayam petelur pascavaksinasi menunjukkan bahwa vaksin AI-H5N1 isolat dari Bali berpengaruh nyata ( $P < 0,05$ ) terhadap respons imun seluler ayam petelur terutama terhadap rerata total leukosit dan nilai absolut sel heterofil, eosinofil, limfosit, dan monosit, tetapi tidak berpengaruh terhadap sel basofil. Rerata total leukosit terhadap waktu pengambilan sampel dimuat pada Tabel 1.

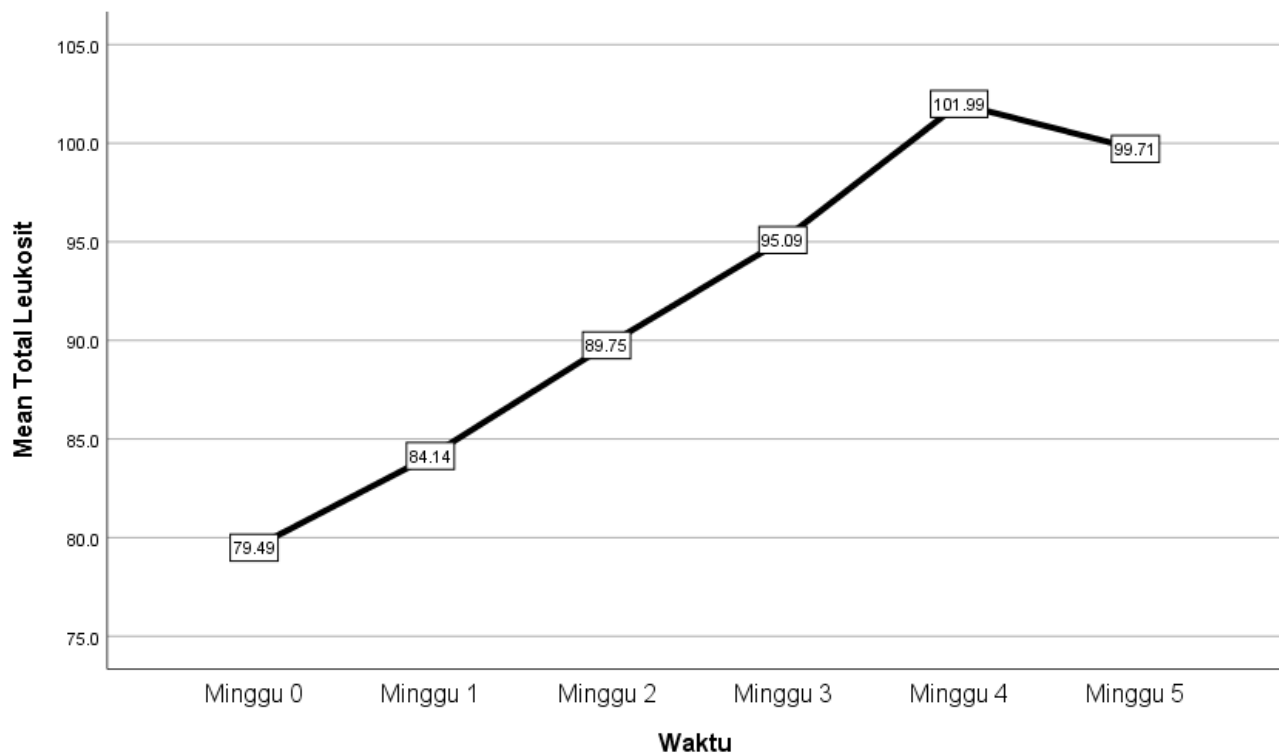
Tabel 1. Rerata Total Leukosit ( $\pm$ SD) Ayam Petelur Pascavaksinasi AI-H5N1 pada Peternakan Komersial di Desa Perean, Kabupaten Tabanan

Waktu Pengambilan Sampel (Minggu)	Total Leukosit ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	Standar Normal <sup>1)</sup> ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )
0	79,49 $\pm$ 6,97 <sup>a</sup>	12-30
1	84,14 $\pm$ 9,40 <sup>a,b</sup>	
2	89,75 $\pm$ 5,56 <sup>b,c</sup>	
3	95,09 $\pm$ 14,20 <sup>c,d</sup>	
4	101,99 $\pm$ 26,38 <sup>d</sup>	
5	99,71 $\pm$ 10,54 <sup>d</sup>	

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

<sup>1)</sup>Schalm, (2010)

Hasil penelitian rerata total leukosit minggu ke-0 (pascavaksinasi) sebesar 79,49  $\pm$  6,97 ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ). Peningkatan rerata total leukosit tertinggi pascavaksinasi, sebesar 101,99  $\pm$  26,38 ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ). Sedangkan rerata total leukosit terendah pascavaksinasi, sebesar 84,14  $\pm$  9,40 ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ). Grafik rerata total leukosit ayam petelur terhadap waktu pengambilan sampel dimuat pada Gambar 1.



Gambar 1. Grafik Rerata Total Leukosit Ayam Petelur Pascavaksinasi AI-H5N1 pada Peternakan Komersial di Desa Perean, Kabupaten Tabanan

Tabel 2. Rerata Nilai Absolut Sel-Sel Leukosit ( $\pm$ SD) Ayam Petelur Pascavaksinasi AI-H5N1 pada Peternakan Komersial di Desa Perean, Kabupaten Tabanan

Waktu (Minggu)	Sel-Sel Leukosit ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )				
	Heterofil	Eosinofil	Basofil	Limfosit	Monosit
	3-6 <sup>1)</sup>	0-1 <sup>1)</sup>	- <sup>1)</sup>	7-17,5 <sup>1)</sup>	0,15-2 <sup>1)</sup>
0	22,31 $\pm$ 5,11 <sup>a</sup>	0,83 $\pm$ 0,79 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0,00	51,68 $\pm$ 6,31 <sup>a</sup>	4,62 $\pm$ 4,09 <sup>a</sup>
1	23,24 $\pm$ 7,49 <sup>a</sup>	1,71 $\pm$ 2,28 <sup>a,b,c</sup>	0 $\pm$ 0,00	49,06 $\pm$ 7,19 <sup>a</sup>	10,09 $\pm$ 4,36 <sup>c</sup>
2	23,39 $\pm$ 7,56 <sup>a</sup>	2,89 $\pm$ 2,60 <sup>c</sup>	0 $\pm$ 0,00	56,47 $\pm$ 9,30 <sup>a,b</sup>	6,96 $\pm$ 2,89 <sup>a,b</sup>
3	28,95 $\pm$ 13,88 <sup>a,b</sup>	2,35 $\pm$ 1,91 <sup>b,c</sup>	0 $\pm$ 0,00	53,99 $\pm$ 9,60 <sup>a,b</sup>	9,77 $\pm$ 5,53 <sup>b,c</sup>
4	31,41 $\pm$ 16,4 <sup>b</sup>	1,20 $\pm$ 1,85 <sup>a,b</sup>	0 $\pm$ 0,00	59,90 $\pm$ 19,00 <sup>b,c</sup>	9,44 $\pm$ 4,01 <sup>b,c</sup>
5	23,10 $\pm$ 7,93 <sup>a</sup>	1,86 $\pm$ 2,17 <sup>a,b,c</sup>	0 $\pm$ 0,00	65,97 $\pm$ 9,02 <sup>c</sup>	8,75 $\pm$ 4,53 <sup>b,c</sup>

Keterangan: Huruf (superskrip) yang berbeda pada kolom sama menunjukkan berbeda nyata ( $P < 0,05$ ). Sebaliknya, huruf (superskrip) yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata ( $P > 0,05$ )

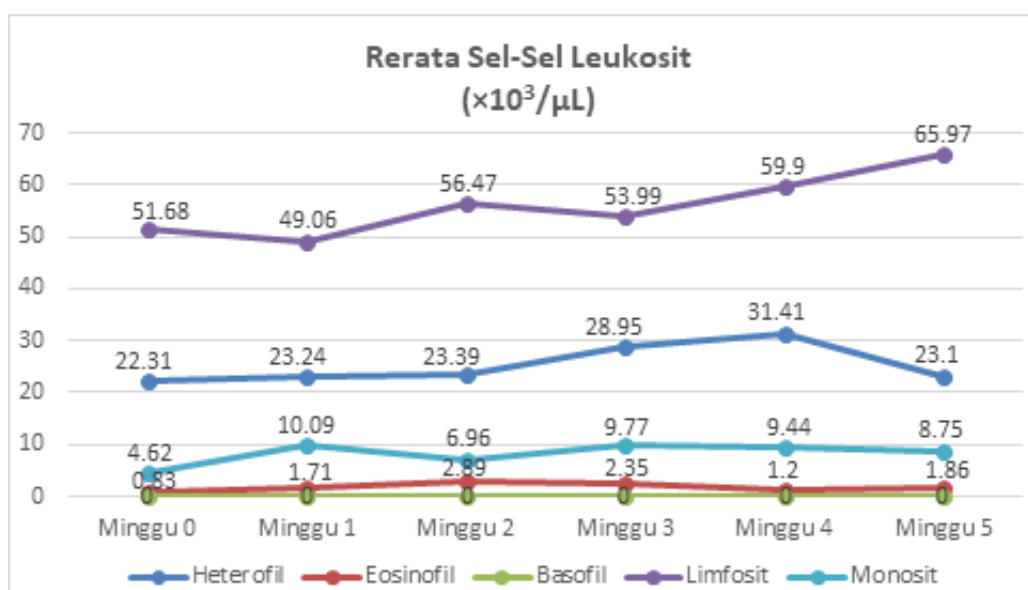
<sup>1)</sup>( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ); Standar Normal Schalm, (2010)

Rerata nilai absolut sel-sel leukosit ayam petelur pascavaksinasi AI-H5N1 isolat dari Bali pada pengambilan sampel setiap minggu dimuat pada Tabel 2. Rerata absolut sel-sel leukosit ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) minggu ke-0 (pascavaksinasi), yaitu heterofil 22,31  $\pm$  5,11; eosinofil 0,83  $\pm$  0,79; basofil 0  $\pm$  0,00; limfosit 51,68  $\pm$  6,31; dan monosit 4,62  $\pm$  4,09.

Rerata absolut sel-sel leukosit ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) minggu ke-1 sampai ke-5 pascavaksinasi dari rerata tertinggi hingga terendah yaitu sebagai berikut: rerata sel heterofil tertinggi sebesar 31,41  $\pm$  16,44 ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) dan rerata terendah, sebesar 23,10  $\pm$  7,93 ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ). Rerata sel eosinofil tertinggi, sebesar 2,89  $\pm$  2,60 ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) dan rerata terendah, sebesar 1,20  $\pm$  1,85

( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) sedangkan rerata sel basofil setiap minggunya adalah 0  $\pm$  0,00 ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ). Rerata sel limfosit tertinggi, sebesar 65,97  $\pm$  9,02 ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) dan rerata terendah, sebesar 49,06  $\pm$  7,19 ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ). Rerata sel monosit tertinggi, sebesar 10,09  $\pm$  4,36 ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) dan rerata terendah, sebesar 6,96  $\pm$  2,89 ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ). Grafik rerata nilai absolut sel-sel leukosit ayam petelur pada setiap minggu pengambilan sampel dimuat pada Gambar 2.

*Avian Influenza* adalah penyakit virus pada unggas, termasuk ayam dan unggas air liar yang disebabkan oleh virus influenza tipe A sub tipe H5N1 (Kencana, 2012). Vaksinasi bertujuan untuk memperoleh kekebalan spesifik yang protektif guna menghadapi kasus lapangan



Gambar 2. Grafik Rerata Nilai Absolut Sel-Sel Leukosit Ayam Petelur pada Setiap Minggu Pengambilan Sampel



(Kencana *et al.*, 2015). Patti *et al.*, (2013); Paul *et al.*, (2012) menyatakan bahwa dalam upaya tubuh membentuk zat kebal akibat vaksinasi, sel darah putih atau leukosit akan mengalami proliferasi, sehingga pada gilirannya akan terbentuk sel plasma yang akan memproduksi antibodi. Peneliti lain Sturkie, (2005) menyatakan bahwa vaksinasi mengakibatkan peningkatan jumlah leukosit.

Vaksinasi dengan vaksin inaktif AI-H5N1 isolat dari Bali memberikan pengaruh nyata ( $P < 0,05$ ) terhadap terbentuknya rerata total leukosit dan nilai absolut sel heterofil, eosinofil, limfosit, dan monosit, tetapi tidak berpengaruh terhadap sel basofil ayam petelur pascavaksinasi. Pada penelitian ini sel basofil tidak ditemukan. Hal tersebut bukan berarti bahwa pada dalam darah ayam petelur tidak ada sel basofil. Schalm, (2010) menyatakan bahwa pada ayam normal jarang ditemukan sel basofil. Basofil adalah sel darah putih yang mempunyai peranan dalam reaksi alergi. Menurut Kayadoe *et al.*, (2008) menyatakan bahwa basofil umumnya baru ditemukan dalam penghitungan 1.000 sel leukosit.

Rerata total leukosit minggu ke-0 (pravaksinasi) adalah sebesar  $79,49 \times 10^3/\mu\text{L}$ , dimana ayam dalam kondisi sehat. Rataan tersebut relatif lebih tinggi jika dibandingkan total leukosit ayam normal, yaitu 12.000-30.000 sel/ $\mu\text{L}$  (Kencana *et al.*, 2018; Schalm, 2010). Tingkat kesehatan hewan dapat diukur melalui total leukosit, dimana terjadinya peningkatan total leukosit dalam darah menandakan bahwa sistem pertahanan tubuh mengalami peningkatan (Soeharsono *et al.*, 2010). Total leukosit pada penelitian ini relatif lebih tinggi dari standar normal fisiologis ayam, hal ini karena ayam yang digunakan dalam penelitian ini merupakan ayam ras petelur perlakuan yang ditempatkan pada kandang terbuka pada saat penelitian berlangsung. Kondisi ini memungkinkan terjadinya paparan dari berbagai agen penyakit yang berasal dari lingkungan pemeliharaan, dimana lokasi penelitian juga endemis dengan penyakit lainnya seperti *newcastle disease* (ND), *infectious bronchitis* (IB), *infectious bursal disease* (IBD). Pencegahan terhadap penyakit-penyakit tersebut dilakukan pada kelompok ayam lainnya dengan vaksinasi.

Walaupun vaksinasi penyakit tersebut tidak dilakukan pada ayam perlakuan, kemungkinan hal tersebut dapat mempengaruhi proses fisiologis pada ayam perlakuan. Adanya paparan tersebut dapat menginduksi terjadinya proliferasi sel limfosit (Ulupi dan Ihwantoro, 2014). Hal ini sejalan dengan tingginya jumlah limfosit pravaksinasi, dengan rerata  $51,68 \times 10^3/\mu\text{L}$ . Limfosit merupakan unsur penting dalam sistem kekebalan tubuh yang berfungsi merespons antigen dengan membentuk antibodi (Yalcinkaya *et al.*, 2008).

Total leukosit ayam petelur minggu ke-1 pascavaksinasi meningkat secara tidak signifikan dan meningkat secara signifikan pada minggu ke-2 pascavaksinasi ( $P < 0,05$ ), dengan rerata sebesar  $89,75 \times 10^3/\mu\text{L}$ . Pada minggu ke-1 pascavaksinasi jumlah sel limfosit menurun secara tidak signifikan ( $P > 0,05$ ). Limfosit berperan untuk merespons antigen dengan membentuk antibodi dan pengembangan imunitas (Bikrisirna, 2013). Mengingat vaksin AI-H5N1 pada penelitian ini merupakan vaksinasi primer menggunakan vaksin inaktif, respons tubuh pada minggu ke-1 pascavaksinasi cenderung baru mulai terbentuk karena dalam proses pengenalan terhadap antigen vaksin. Hal ini sejalan dengan pernyataan Kencana *et al.*, (2016) yang menyatakan bahwa pada minggu ke-1 pascavaksinasi pemberian vaksin inaktif umumnya menghasilkan respons imun yang lambat. Menurunnya jumlah sel limfosit disebabkan pula oleh meningkatnya jumlah sel monosit dalam darah secara signifikan pada minggu ke-1 pascavaksinasi, dengan rerata sebesar  $10,09 \times 10^3/\mu\text{L}$ . Peningkatan sel monosit menandakan bahwa tubuh ayam merespons adanya antigen vaksin dengan membentuk respons imun nonspesifik seluler. Peningkatan jumlah monosit disebabkan karena monosit berperan dalam mengatur tanggapan kebal dengan mengeluarkan glikoprotein pengatur monokin seperti interferon dan interleukin I (Saputro *et al.*, 2016). Monosit adalah prekursor makrofag dalam sirkulasi darah. Menurut Fenner dan Fransk, (1995) menyatakan bahwa monosit atau makrofag berfungsi sebagai *antigen presenting cells* (APC). Interaksi sel limfosit dengan APC akan berperan dalam kekebalan humoral dengan menginduksi keluarnya sitokin yang merupakan alat komunikasi antar

sel. Kemampuan interaksi ini akan menginduksi pematangan sel limfosit B menjadi sel plasma yang akan menghasilkan antibodi.

Total leukosit ayam petelur pada minggu ke-3 pascavaksinasi mengalami peningkatan secara signifikan ( $P < 0,05$ ) serta puncaknya pada minggu ke-4 pascavaksinasi, dengan rerata sebesar  $101,99 \times 10^3/\mu\text{L}$ . Menurut Yulistiya *et al.*, (2017) menyatakan bahwa aktivitas fisiologis meliputi proses vaksinasi memberikan pengaruh terhadap jumlah leukosit. Peningkatan total leukosit pascavaksinasi ditandai dengan peningkatan jumlah limfosit akibat adanya efek imunostimulator dari vaksin yang digunakan (Amer *et al.*, 2013). Rerata jumlah sel limfosit hingga minggu ke-4 pascavaksinasi pada penelitian ini mengalami peningkatan walaupun meningkat secara perlahan atau tidak berbeda nyata dibandingkan minggu-minggu sebelumnya, dengan rerata sebesar  $59,90 \times 10^3/\mu\text{L}$ . Penelitian ini merupakan vaksinasi pertama atau primer menggunakan vaksin inaktif AI-H5N1. Suardana *et al.*, (2009) menyatakan bahwa respons imun primer dimulai pada saat hewan terpapar imunogen untuk pertama kalinya, umumnya titer antibodi yang terbentuk relatif sangat rendah. Sistem imun spesifik seluler yang bereaksi dengan antigen adalah limfosit T yang mengatur sintesis antibodi maupun sel T yang mempunyai fungsi efektor atau sitotoksik langsung, sementara limfosit B yang memproduksi antibodi spesifik humoral (Mazengia *et al.*, 2009).

Hewajuli dan Dharmayanti, (2015) menyatakan bahwa respons imun seluler mencapai puncak setelah tiga minggu atau lebih pascavaksinasi. Respons imun spesifik seluler adalah respons imun yang diperankan oleh sel limfosit T dalam membunuh mikroorganisme atau antigen melalui sistem efektor ekstraseluler oleh sel T sitotoksik dan sel T helper (Th) yang bersifat spesifik. Vaksinasi AI pada ayam terbukti meningkatkan jumlah limfosit T helper (Th) (Gioia *et al.*, 2008). Kaitan sel limfosit T dengan limfosit B adalah limfosit B memerlukan bantuan limfosit Th yang memberikan sinyal dari makrofag untuk sel B berdiferensiasi membentuk antibodi (Kresno, 2001). Pembentukan antibodi diawali oleh makrofag yang telah memfragmentasi antigen kemudian fragmen

antigen tersebut dipresentasikan kepada sel limfosit Th melalui MHC II yang terletak di permukaan makrofag. Sel Th berinteraksi dengan APC melalui  $\text{CD4}^+$  dan *T cell receptor* (TCR), kemudian sel Th teraktivasi dan berproliferasi serta mengeluarkan sitokin (IL-1) yang akan mengaktifkan sel B yang naif (sel matang yang belum terpapar antigen dan belum berdiferensiasi) menjadi sel plasma yang akan memproduksi antibodi spesifik (Hewajuli dan Dharmayanti, 2015).

Rerata total leukosit ayam petelur pada minggu ke-5 pascavaksinasi mengalami penurunan yang tidak berbeda nyata ( $P > 0,05$ ) dibandingkan minggu sebelumnya. Penurunan total leukosit pada minggu ini kemungkinan disebabkan karena menurunnya jumlah sel heterofil dalam darah secara signifikan ( $P < 0,05$ ), dengan rerata sebesar  $23,10 \times 10^3/\mu\text{L}$ . Menurut Kencana *et al.*, (2018) menyatakan bahwa penurunan jumlah heterofil dalam darah dapat menyebabkan penurunan total leukosit. Sementara rerata jumlah sel monosit mulai mengalami penurunan tetapi tidak berbeda nyata dibandingkan minggu sebelumnya. Penurunan sel monosit tersebut dapat mengindikasikan bahwa respons imun nonspesifik seluler sudah tidak memberikan respons terhadap antigen vaksin dan telah digantikan dengan respons imun spesifik. Hewajuli dan Dharmayanti, (2015) menyatakan bahwa pertahanan terhadap serangan virus akan digantikan oleh kekebalan spesifik apabila kekebalan nonspesifik tidak mampu melawan infeksi virus. Respons imun yang muncul pascavaksinasi AI adalah respons imun spesifik yang diperankan oleh limfosit (Amer *et al.*, 2013). Hal ini sejalan dengan rerata jumlah sel limfosit yang mengalami peningkatan secara signifikan, yaitu dengan rerata tertinggi sebesar  $65,97 \times 10^3/\mu\text{L}$ . Menurut Aiyer-Harini *et al.*, (2013) menyatakan bahwa dengan vaksin inaktif memerlukan waktu yang relatif lama untuk memicu pembentukan antibodi maksimal, namun respons kekebalan yang terbentuk dapat bertahan lebih lama di dalam tubuh ayam dibandingkan dengan penggunaan vaksin aktif.

Vaksinasi AI-H5N1 pada penelitian ini berpengaruh nyata terhadap terbentuknya sel heterofil, eosinofil, limfosit, dan monosit ayam petelur pascavaksinasi. Rerata sel eosinofil dan

heterofil yang meningkat secara signifikan pada minggu ke-2 dan ke-4 pascavaksinasi tidak memiliki kaitan secara langsung dengan respons imun tubuh ayam petelur terhadap vaksinasi AI-H5N1 karena fungsi utama heterofil adalah untuk membunuh bakteri melalui proses fagositosis (Redmond *et al.*, 2011). Selain itu faktor-faktor pendukung terhadap tinggi rendahnya heterofil diantaranya: kondisi lingkungan, tingkat stress, genetik, dan kecukupan nutrisi pakan (Puvadolpirod dan Thaxton, 2000). Eosinofil berperan untuk menghadapi infeksi parasitik dan alergi (Purnomo *et al.*, 2015). Pada pemeriksaan preparat hapusan darah tipis pada penelitian ini tidak ditemukan adanya parasit darah. Meningkatnya jumlah sel heterofil dan eosinofil dalam darah tidak selalu diasumsikan bahwa hewan sedang terinfeksi penyakit. Hal tersebut dapat menunjukkan bahwa meningkatnya respons imun nonspesifik seluler dari agen penyakit. Respons imun nonspesifik umumnya merupakan imunitas bawaan yakni respons terhadap bahan asing yang dapat terjadi walaupun tubuh sebelumnya tidak pernah terpapar oleh bahan tersebut (Kresno, 2000).

Sel monosit dan limfosit memiliki keterkaitan dengan vaksinasi, dimana fungsi monosit atau makrofag adalah sebagai *antigen presenting cells* (APC) yang menstimulasi pematangan sel limfosit yang berperan sebagai cikal bakal terbentuknya antibodi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sel monosit meningkat secara signifikan pada minggu ke-1 pascavaksinasi sebagai indikasi terbentuknya respons imun nonspesifik yang bersifat seluler terhadap antigen vaksin AI-H5N1 isolat dari Bali. Respons imun seluler spesifik ditandai dengan meningkatnya jumlah rerata sel limfosit sejak minggu ke-2 pascavaksinasi dan mencapai jumlah maksimal secara signifikan pada minggu ke-5 pascavaksinasi yakni sebesar  $65,97 \times 10^3/\mu\text{L}$ .

### Kesimpulan

Vaksin AI-H5N1 isolat dari Bali terbukti dapat merangsang respons imun seluler ayam petelur yang ditandai dengan meningkatnya total dan diferensial leukosit pascavaksinasi, terutama sel limfosit sebagai prekursor terbentuknya antibodi.

### Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini merupakan Hibah Invensi Udayana tahun 2021 dengan nomor kontrak B/96-62/UN14.4.A/PT.01.05/2021. Penulis mengucapkan terima kasih kepada LPPM Universitas Udayana atas dana PNBP, kepada mitra industri Produsen Vaksin Unggas PT Sanbio Laboratories, peternakan ayam petelur komersial "Tubagus Oky Farm", Balai Besar Veteriner Wilayah VII Denpasar atas kerja sama dan fasilitas risetnya serta semua pihak yang telah membantu penelitian ini.

### Daftar Pustaka

- Aiyer-Harini, P., Ashok-Kumar, H. G., Kumar, G. P., and Shivakumar, N. 2013. An Overview of Immunologic Adjuvants - A Review. *J Vaccines Vaccin.* 4(1): 1-4.
- Amer, M. M., Sherein, S. A., and Abeer, A. A. E. 2013. Evaluation of Some Avian Influenza Vaccines on Commercial Layer Chicks., *Medicine.* 60-78.
- Baratawidjaja, K. G., dan Rengganis, I. 2010. *Imunologi Dasar Edisi ke-9.* Balai Penerbit, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Bikrisirna, S. H. L., Mahfudz, L. D., dan Suthama, N. 2013. Ketahanan tubuh ayam broiler pada kondisi tropis yang diberi jambu biji merah (*Psidium guajava*) sebagai sumber antioksidan. *Agromedia.* 31 (2):46-57.
- El-Zoghby, E. F., Arafa, A. S., Kilany, W. H., Aly, M. M., Abdelwhab, E. M., and Hafez, H. M. 2012. Isolation of avian influenza H5N1 virus from vaccinated commercial layer flock in Egypt. *Virology journal,* 9(1): 1-8.
- Gioia, C., Castilletti, C., Tempestilli, M., Piacentini, P., Bordi, L., Chiappini, R., Agrati, C., Squarcione, S., Ippolito, G., Puro, V., Capobianchi, M. R., and Poccia, F. 2008. Cross-subtype Immunity against Avian Influenza in Persons Recently Vaccinated for Influenza. *Emerg Infect Dis.* 14(1): 121-128.
- Hewajuli, D. A., dan Dharmayanti, N. L. P. I. 2015. The Role of Non-specific and

- Specific Immune Systems in Poultry against Newcastle Disease. *WARTAZOA. Indonesian Bulletin of Animal and Veterinary Sciences*. 25(3): 135-146.
- Isroli, S., Susanti, E., Widiastuti, T., Yudiarti., dan Sugiharto. 2009. Observasi beberapa variabel hematologis ayam Kedu pada pemeliharaan intensif. *Prosiding Seminar Nasional Kebangkitan Peternakan*. Hal: 548-557.
- Kayadoe, M., Sambodo, P., dan Aronggear, Y. 2008. Perbandingan gambaran darah burung maleo gunung (*Aepodius Arfakianus*) betina dan unggas yang telah didomestikasi. *Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner*. Fakultas, Peternakan, Perikanan, Kelautan-Universitas Papua, Manokwari.
- Kencana, G. A. Y. 2012. *Penyakit Virus Unggas*. Penerbit Udayana University Press. Cetakan pertama. ISBN 978-602-7776-01-2.
- Kencana, G. A. Y., Suartha, I. N., Simbolon, M. P., Handayani, A. N., Ong, S., Syamsidar., dan Kusumastuti, A. 2015. Respon Antibodi Terhadap Penyakit Tetelo pada Ayam yang Divaksin Tetelo dan Tetelo-Flu Burung. *Jurnal Veteriner*. 16(2): 283-290.
- Kencana, G. A. Y, Suartha I. N., Paramitha, N. M. A. S, dan Handayani, A. N. 2016. Vaksin Kombinasi Newcastle Disease dengan Avian Influenza Memicu Imunitas Protektif pada Ayam Petelur terhadap Penyakit Tetelo dan Flu Burung. *J Veteriner*. 17(2): 257-264.
- Kencana, G. A. Y., Kendran, A. A. S., Helpina., dan Dewi, L. A. 2018. Total dan Diferensial Leukosit Ayam Petelur Pascavaksinasi Tetelo dan Flu Burung. *Jurnal Veteriner*. 19(2): 190-195.
- Kencana, G. A. Y., Suartha, I. N., Kardena, I. M., dan Nurhandayani, A. 2020. Karakterisasi Virus Avian Influenza Subtipe H5N1 Isolat Lapangan Asal Bali Untuk Kandidat Vaksin. *Jurnal Veteriner*: 530-538.
- Kresno, S. B. 2001. *Imunologi Diagnosis dan Prosedur Laboratorium*. Edisi IV (Dengan Perbaikan). Jakarta: FKUI.
- Kurniawan, M. F. T., Darmawan, D. P., dan Astiti, N. S. 2013. Strategi Pengembangan Agribisnis Peternakan Ayam Petelur di Kabupaten Tabanan. *Jurnal Manajemen Agribisnis*.
- Mahardika, I. G. N. K., Suartha, I. N., Suardana, I. B. K., Kencana, G. A. Y., dan Wibawan, I. W. T. 2009. Perbandingan Sekuens Konsensus Gen Hemaglutinin Virus Avian Influenza. *Jurnal Veteriner*. 10(1): 12-16.
- Mazengia, H., Gelaye, E., and Nega, M. 2009. Evaluation of newcastle disease antibody level after different vaccination regimes in three districts of Amhara Region, Northwestern Ethiopia. *J Infect Dis Immun*. 1: 16-19.
- Office International des Epizooties (OIE). 2005. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2004. Version Adopted May 2005, Chapter 2.7.12., Avian Influenza. <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A-00037.htm>. Diakses tanggal 15 Juni 2020.
- Office International des Epizooties (OIE). 2015. OIE terrestrial manual. Avian influenza (infection with avian influenza viruses). Chapter 2.3.4. [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.03.04\\_AI](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.04_AI). Diakses tanggal 15 Juni 2020.
- Patti, J., Miller P. J., Claudio, L. Afonso, C. L., John, J. E., and Dorsey, K. M. 2013. Effects of Newcastle disease virus vaccine antibodies on the shedding and transmission of challenge viruses. *Developmental & Comparative Immunology*. 41(4): 505-513.
- Paul, A., Usman, M., Manuel, Jt., and Mu, M. 2012. Vaccination Of Chickens Against Newcastle Disease With La Sota and V4 Vaccines Using Brans, Ground Grains and Water as Vehicles. *Vom J. Vet. Sci*. 9(1): 1-10.

- Pertiwi, B. I., Kencana, G. A. Y., dan Suartha, I. N. 2020. Seroprevalensi Penyakit Avian Influenza Subtipe H5N1 pada Ayam Buras di Pasar Beringkit dan Galiran, Bali. *Jurnal Sain Veteriner*. 38(3): 280-288.
- Petithory, J. C., Ardoin, F., and Ash, L. R. 2005. Rapid and Inexpensive Method of Diluting Giemsa Stain for Diagnosis of Malaria and Other Infestations by Blood Parasites. *J Clin Microbiol*. 43(1): 528.
- Purnomo, D., Sugiharto, S., dan Isroli, I. 2015. Total leukosit dan diferensial leukosit darah ayam broiler akibat penggunaan tepung onggok fermentasi rhizopus oryzae pada ransum. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*. 25(3): 59-68.
- Puvadolpirod and Thaxton. 2000. *Model of physiological stress in chicken*. Quantitative Evaluation. Departement of Poultry Science, Mississippi State University. 79: 391-395.
- Redmond, S. B. P., Chuammitri, C. B., Andreasen, D., Palic and Lamond, S. J. 2011. Genetic control of chicken heterophil function in advanced intercross lines: associations with novel and with known Salmonella resistance loci and a likely mechanism for cell death in extracellular trap production. *Immunogenetics*. 63: 449-458.
- Saputro, B. E., Sutrisna, R., Santosa, P. E., dan Fathul, F. 2016. Pengaruh Ransum yang Berbeda pada Itik Jantan Terhadap Jumlah Leukosit dan Diferensial Leukosit. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu*. 4(3).
- Schalm, O. W. 2010. *Schalm's Veterinary Hematology Sixth Edition*. Editor: Douglas J. Weiss, K. Jane Wardrop. New Jersey (US): Blackwell Pub.
- Sharif, A., Umer, M., and Ahmad, T. 2014. Prevention and Control of Avian Influenza in Poultry Production. *International Journal of Agriculture Innovations and Research*. 2(6): 976-981.
- Smith, G. J. D., Naipospos, T. S. P., Nguyen, T. D., de Jong, M. D., Vijaykrishna, D., Usman, T. B., Hasan, S. S., Dao, T. V., Bui, N. A., Leung, Y. H. C., Cheung, C. L., Rayner, J. M., Zhang, J. X., Poon, L. L. M., Li, K. S., Nguyen, V. C., Hien, T. T., Farrar, J., Webster, R. G., Chen, H., Peiris, J. S. M., and Guan, Y. 2006. Evolution and Adaptation of H5N1 Influenza Virus in Avian and Human Host in Indonesia and Vietnam. *Virology*. 350(2): 258-268.
- Soeharsono, L., Adriani, E., Hernawan, K. A., Kamil, dan Mushawwir, A. 2010. *Fisiologi Ternak Fenomena dan Nomena Dasar, Fungsi dan Interaksi Organ pada Hewan*. Widya Padjajaran, Bandung.
- Sturkie, P. D. 2005. *Avian Physiology*. Ed. 2nd. Comstock Pub. Ass. Coenell Univ. Press. Ithaca, N.Y.
- Suardana, I. B. K., Dewi, I. M. R. K., dan Mahardika, I. G. N. K. 2009. Respons Imun Itik Bali terhadap Berbagai Dosis Vaksin Avian Influenza H5N1. *Jurnal Veteriner*. 10(3): 150-155.
- Swayne D. E, and Suarez, D. L. 2000. Highly Pathogenic Avian Influenza. *Rev. Sci. Tech*. 19: 463-482.
- Ulupi, N., dan Ihwantoro, T. T. 2014. Gambaran darah ayam kampung dan ayam petelur komersial pada kandang terbuka di daerah tropis. *Jurnal Ilmu Produksi dan Teknologi Hasil Peternakan*. 2(1): 219-223.
- Utama, I. H., Kendran, A. A. S., Widyastuti, S. K., Virgania, P., Sene, S. M., Kusuma, W. D., dan Arisandi, B. P. 2013. Hitung Diferensial dan Kelainan-Kelainan Sel Darah Sapi Bali. *Jurnal Veteriner*. 14(4): 462-466.
- Yalcinkaya, I., Gungor, T., Basalan, M., and Erdem, E. 2008. Mannan Oligosaccharides (MOS) from *Saccharomyces cerevisiae* in Broilers: Effects on Performance and Blood Chemistry. *Turk. J. Vet. Anim. Sci*.
- Yulistiya, E., Santosa, P. E., dan Suharyati, S. 2017. Pengaruh Pemberian Dosis Vaksin Avian Influenza Inaktif Pada Itik Jantan Terhadap Jumlah Sel Darah Putih Dan Titer Antibodi Yang Dihasilkan. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu*. 4(4).

## Deteksi Kebuntingan Ternak Sapi: Aplikasi Test Strip *Dairy Cow Pregnancy Colloidal Gold Test Strip*

### *Pregnancy Detection in Cattle: Application of Dairy Cow Pregnancy Colloidal Gold Test Strip*

Sartika Juwita<sup>1\*</sup>, Mihrani<sup>1</sup>, Agusriady<sup>2</sup>, Aris Handono<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Jurusan Peternakan, Politeknik Pembangunan Pertanian Gowa,

Jl. Malino Km 7 Romanglompoa, Bontomarannu, Gowa, Sulawesi Selatan

<sup>2</sup>Medik Veteriner, Dinas Peternakan Kabupaten Bone, Jl. M.H Thamrin, Manurunge, Tanete Riattang, Kabupaten Bone, Sulawesi Selatan

\*Email: [tika\\_drh@yahoo.co.id](mailto:tika_drh@yahoo.co.id)

Naskah diterima: 24 Juli 2021, direvisi: 28 Oktober 2021, disetujui: 10 November 2021

#### Abstract

Early pregnancy detection in cattle is very important in terms of the economy because it will affect the income of farmers. Early pregnancy detection is necessary to shorten the calving interval by increasing breeders' knowledge to identify the animal's reproduction condition, hence it can carry out therapy and mate it as soon as possible. The determination of pregnant or non-pregnant cattle is carried out by pregnancy detection methods. This study aims to determine the accuracy of the test strip in the diagnosis of pregnancy in cattle. The test method used a test strip and pregnancy examination by palpation per rectal. Blood sampling through the jugular vein in each animal. Furthermore, the blood serum samples obtained were tested with a test strip. Test strips and examination of pregnancy by palpation per rectally is used to detect the pregnancy of 46 female Bali cattle from a community farm. The result shows that the test strip conducted 1 month after artificial insemination show a sensitivity of 75% and a specificity of 90%. Test strips can be used for early pregnancy detection in cattle.

**Keywords:** cattle; early pregnancy detection; pregnancy diagnosis method, test strip

#### Abstrak

Deteksi kebuntingan dini pada ternak sapi sangat penting ditinjau dari segi ekonomi karena akan mempengaruhi pendapatan peternak. Deteksi kebuntingan dini sangat penting untuk memperpendek *calving interval* melalui peningkatan pengetahuan peternak untuk mengidentifikasi status reproduksi, sehingga dapat melakukan terapi dan mengawinkannya sesegera mungkin. Kegiatan penetapan ternak sapi bunting atau tidak bunting dilaksanakan dengan metode deteksi kebuntingan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui akurasi *test strip* dalam diagnosis kebuntingan pada ternak sapi. Metode pengujian dengan menggunakan *test strip* dan pemeriksaan kebuntingan secara palpasi per rektal. Pengambilan sampel darah melalui vena jugularis pada masing-masing ternak. Selanjutnya sampel serum darah yang didapat di uji dengan *test strip*. *Test strip* dan pemeriksaan kebuntingan secara palpasi per rektal digunakan untuk mendeteksi kebuntingan 46 ekor ternak sapi Bali betina yang berasal dari peternakan rakyat. Hasil menunjukkan bahwa test strip yang dilakukan pada 1 bulan pasca inseminasi buatan menunjukkan sensitivitas 75% dan spesifisitas 90%. *Test strip* dapat digunakan untuk deteksi kebuntingan dini pada ternak sapi.

**Kata kunci :** deteksi kebuntingan dini; metode diagnosis kebuntingan; ternak sapi; *test strip*

## Pendahuluan

Kegiatan penetapan status reproduksi dilakukan untuk mengetahui status ternak bunting atau tidak bunting. Manfaat dilakukan penetapan status reproduksi adalah membantu penentuan ternak yang menjadi steril, memungkinkan seseorang untuk mengambil tindakan kuratif jika terjadi infertilitas ringan pada ternak, penentuan perawatan yang tepat dan pakan yang tepat sesuai kebutuhan kebuntingan, mengatur kelahiran sepanjang tahun, menjaga kawanan sapi dengan efisiensi tinggi (Mondal, 2018). Selain itu untuk mempertimbangkan pengeluaran betina-betina yang tidak produktif sehingga dapat menghemat biaya pemeliharaan baik pakan maupun tenaga, dapat meningkatkan ruangan kandang yang tersedia dan ternak betina yang tidak produktif dapat segera dijual ke RPH untuk mendapatkan dana tunai.

Kegiatan penetapan ternak sapi bunting atau tidak bunting dilaksanakan dengan metode deteksi kebuntingan yaitu: (1) Secara palpasi per rektal setelah 35 hari perkawinan. Metode ini dilakukan oleh petugas yang terampil dan berpengalaman dalam pemeriksaan palpasi per rektal; (2) Menggunakan alat ultrasonography (USG) sekitar 28 hari setelah perkawinan; dan (3) Menggunakan uji hormonal sekitar 18-24 hari setelah perkawinan baik dari cairan darah maupun cairan urin (Bekele et al., 2016). Deteksi kebuntingan dini pada sapi sangat penting ditinjau dari segi ekonomi karena akan mempengaruhi pendapatan peternak. Identifikasi hewan yang tidak bunting pada awal pasca pembuahan adalah yang terpenting untuk mempertahankan *calving interval* yang optimal (Abdullah et al., 2014). *Calving interval* merupakan kunci sukses dalam usaha peternakan. Semakin panjang *calving interval*, semakin turun pendapatan petani peternak karena jumlah anak yang dihasilkan akan berkurang selama masa produktif.

Inovasi teknologi reproduksi pendeteksi kebuntingan ternak dalam bentuk *test strip* belum dikembangkan di Indonesia. Inovasi ini merupakan hal baru di bidang teknologi reproduksi. Nova et al. (2014) menyatakan para peternak biasanya menggunakan cara untuk mendeteksi kebuntingan ternak di lapangan dengan melihat tingkah laku

ternak. Jika ternak tidak menunjukkan tanda-tanda berahi kembali setelah perkawinan terakhir, maka peternak menyimpulkan ternak tersebut bunting. Di sisi lain jika setelah perkawinan terakhir, ternak menunjukkan tanda-tanda berahi maka peternak menyimpulkan ternak tersebut tidak bunting. Akan tetapi, cara diatas tidaklah sepenuhnya efektif dan sering terjadi kekeliruan dalam prakteknya di lapangan (*false positive diagnosis*). Selanjutnya Frastantie (2017) menyatakan umumnya petugas mendeteksi kebuntingan dengan cara palpasi per rektal pada 60 hari setelah IB dan memperhatikan perubahan perilaku estrus ternak tersebut, apabila ternak telah dikawinkan tidak memperlihatkan gejala estrus, maka peternak menyimpulkan bahwa ternak bunting. Disisi lain jika ternak telah dikawinkan dan menunjukkan gejala estrus, maka peternak menyimpulkan bahwa ternak tidak bunting sehingga sering terjadi kesalahan dalam mendeteksi kebuntingan.

Permasalahan yang dihadapi di lapangan adalah kurangnya tenaga terampil untuk pemeriksaan kebuntingan dini pada ternak sapi. Oleh karena itu diperlukan pemanfaatan teknologi reproduksi untuk mendeteksi kebuntingan dini ternak yang akurat dan lebih mudah untuk dilaksanakan oleh petugas lapangan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui akurasi *test strip* dalam diagnosis kebuntingan pada ternak sapi.

## Materi dan Metode

### Preparasi Sampel

Penelitian ini menggunakan 46 ekor ternak sapi Bali betina produktif dari berbagai peternakan rakyat di Kabupaten Bone Provinsi Sulawesi Selatan.

### Pemeriksaan Palpasi per Rektal

Petugas PKB (Pemeriksa Kebuntingan) melaksanakan pemeriksaan kebuntingan secara palpasi per rektal pada sampel penelitian untuk memastikan umur kebuntingan ternak. Semua hewan diperiksa oleh operator yang sama yang memiliki pengalaman dan keterampilan untuk diagnosis kebuntingan dengan palpasi per rektal. Hewan-hewan dimasukkan ke kandang jepit dan operator dengan menggunakan *gloves* memasukkan tangan ke dalam rektum. Setelah mengeluarkan feses dari rektum, operator

memeriksa *cornua uteri* untuk memeriksa tanda-tanda kebuntingan, yaitu, asimetri antara dua *cornua uteri*, fluktuasi, selaput ketuban, dan vesikel amnion. Hewan diklasifikasikan bunting ketika satu atau lebih dari tanda-tanda kebuntingan terdeteksi.

**Uji Test Strip**

Setelah dilaksanakan pemeriksaan kebuntingan secara palpasi per rektal, dilakukan pengambilan sampel darah melalui vena jugularis pada masing-masing ternak. Selanjutnya sampel serum darah yang didapat di uji dengan *test strip (Dairy Cow Pregnancy Colloidal Gold Test Strip)*, produk dari Hebei Serun Import and Export Trade Co., Ltd, China. Dua tetes serum darah ditetaskan pada *test strip* selanjutnya ditunggu hasilnya selama 7 – 8 menit. Jika terlihat dua garis pada *test strip* menunjukkan hasil positif dan jika hanya terlihat satu garis menunjukkan hasil negatif. Selanjutnya hasil pemeriksaan palpasi per rektal dibandingkan dengan hasil pemeriksaan menggunakan *test strip*.

**Perhitungan Sensitifitas dan Spesifisitas**

Dalam penelitian uji diagnostik dan skrining dimana uji berskala data nominal 2 kategori maka hasil pengamatan disajikan dalam bentuk tabulasi silang. Dalam menampilkan tabulasi silang, hasil uji yang dinilai berada pada baris (*row*) sedangkan baku emas berada di kolom (*column*). Tabulasi silang disajikan sebagai berikut:

Berdasarkan tabulasi silang tersebut maka dapat didefinisikan terlebih dahulu arti dari tiap sel yaitu TP (*True Positive*) = jumlah yang dinyatakan positif oleh uji dan baku emas menyatakan positif; FP (*False Positive*) = jumlah yang dinyatakan positif oleh uji tetapi baku emas menyatakan negatif; FN (*False Negative*) = jumlah yang dinyatakan negatif oleh uji tetapi baku emas menyatakan positif; TN (*True Negative*) = jumlah yang dinyatakan negatif oleh uji dan baku emas juga menyatakan

negatif; TP+FN adalah keseluruhan jumlah baku emas positif; FP+TN adalah keseluruhan jumlah baku emas negatif; TP+FP adalah keseluruhan jumlah yang hasil ujinya positif; FN+TN adalah keseluruhan jumlah yang hasil ujinya negatif; Total adalah jumlah total sampel yang diteliti.

Sensitifitas, adalah proporsi hasil uji positif diantara ternak yang bunting atau dapat diterjemahkan dengan rumus sebagai berikut

$$\text{Sensitifitas} = \frac{\text{TP}}{\text{TP} + \text{FN}} \times 100\%$$

Sensitifitas menunjukkan kemampuan suatu uji untuk menyatakan positif ternak sapi yang bunting. Semakin tinggi sensitifitas suatu uji maka semakin banyak mendapatkan hasil uji positif pada ternak sapi yang bunting atau semakin sedikit jumlah negatif palsu.

Spesifisitas, adalah proporsi hasil uji negatif diantara ternak sapi yang tidak bunting atau dapat diterjemahkan dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Spesifisitas} = \frac{\text{TN}}{\text{FP} + \text{TN}} \times 100\%$$

Spesifisitas menunjukkan kemampuan suatu uji untuk menyatakan negatif ternak sapi yang tidak bunting. Semakin tinggi spesifisitas suatu uji maka semakin banyak mendapatkan hasil uji negatif pada ternak sapi yang tidak bunting atau semakin sedikit jumlah positif palsu.

**Hasil dan Pembahasan**

*Test strip* dapat digunakan untuk mendeteksi kebuntingan dini pada ternak sapi melalui deteksi tingkat hormon progesteron. Empat puluh enam sampel serum darah yang diambil dari ternak sapi Bali betina produktif di Kabupaten Bone dilakukan pengujian dengan menggunakan *test strip* dan pemeriksaan kebuntingan secara palpasi per rektal. Hasil pengujian empat puluh enam sampel tersebut ditampilkan pada Tabel 1.

Uji yang dinilai	Baku Emas ( <i>gold standard</i> )		
	Bunting	Tidak Bunting	
+	TP	FP	TP+FP
-	FN	TN	FP + TN
	TP+FN	FP+TN	Total



Tabel 1. Perbandingan antara jumlah positif dan negatif hasil pengujian *test strip* dengan pemeriksaan kebuntingan secara palpasi per rektal.

	Hasil pengujian	
	Alat test strip	Palpasi rektal
Positif	23 (50 %)	33 (71,7%)
Negatif	23 (50 %)	13 (28,3%)
Jumlah	46	46

Berdasarkan Tabel 1, dari 46 sampel yang diuji dengan menggunakan alat *test strip* menunjukkan sebanyak 23 (50%) sampel positif bunting sedangkan sebanyak 23 (50%) sampel negatif, sedangkan dengan pengujian secara palpasi rektal menunjukkan 33 (71,7%) sampel positif bunting dan sebanyak 13 (28,3%) sampel negatif bunting.

Gambar 1. Alat test strip dan hasil pengujian dengan menggunakan alat *test strip* (dokumen pribadi).

Sebanyak dua puluh tiga sampel positif bunting dengan menggunakan pemeriksaan *test strip* dan sebanyak tiga puluh tiga sampel positif bunting dengan menggunakan pemeriksaan palpasi per rektal tersebar pada umur kebuntingan yang berbeda (Tabel 2). Tabel 2 menunjukkan bahwa *test strip* mendominasi hasil pemeriksaan positif pada umur kebuntingan 1 – 5 bulan, sedangkan pemeriksaan dengan palpasi per rektal hasil mendekati 100% dari umur kebuntingan 1 – 8 bulan.

Tabel 2. Sebaran hasil pemeriksaan (positif) berdasarkan umur kebuntingan ternak.

Umur Kebuntingan (Bulan)	Jumlah Hasil Pemeriksaan (positif)	
	Test strip	PKB
1	4	4
2	4	3
3	4	7
4	5	6
5	4	6
6	1	4
7	0	2
8	1	1
Jumlah Sampel	23	33

Sensitivitas merupakan ukuran yang mengukur seberapa baik sebuah uji skrining/penapisan mengklasifikasikan ternak sapi yang bunting benar-benar bunting. Sedangkan spesifitas merupakan ukuran dari kemungkinan benar mengidentifikasi ternak sapi tidak bunting

dengan uji skrining/penapisan. Sensitifitas dan spesifisitas pengujian *test strip* dibandingkan dengan palpasi per rektal pada umur kebuntingan 1 bulan dengan menggunakan sebanyak 14 ekor sapi ditunjukkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Sensitifitas dan spesifisitas pengujian *test strip* pada umur kebuntingan 1 bulan.

Alat Test Strip	Hasil Uji Palpasi			
		Rektal		Jumlah
		Positif	Negatif	
Positif	3	1	4	
Negatif	1	9	10	
Jumlah	4	10	14	

Sensitifitas 75%, spesifisitas 90%.

Identifikasi awal kebuntingan setelah inseminasi buatan (AI) atau transfer embrio (ET) pada ternak adalah strategi penting untuk mengurangi *calving interval* dan meningkatkan efisiensi reproduksi ternak. Diagnosis kebuntingan dini sangat penting untuk memperpendek jarak kelahiran melalui peningkatan pengetahuan peternak untuk mengidentifikasi status reproduksi ternak, sehingga dapat melakukan terapi dan mengawinkannya sesegera mungkin. Idealnya masa kosong lamanya 60 hari pasca beranak, dan dianjurkan hewan perah untuk berkembang biak lagi. Peternak perlu mengetahui sesegera mungkin jika tidak terjadi kebuntingan pada ternak setelah dikawinkan, sehingga dapat mengawinkannya kembali pada periode estrus selanjutnya (Balhara et al., 2013; Palhao et al., 2019).

Pemeriksaan kebuntingan melalui palpasi per rektal, merupakan cara pemeriksaan yang sederhana, murah dan akurat, namun membutuhkan ketrampilan dan latihan yang intensif. Teknik ini mampu mendiagnosis kebuntingan dengan sensitivitas dan spesifisitas melebihi 95% (Gargiulo et al., 2012). Karen et al. (2010) melaporkan bahwa sensitivitas teknik ini pada ternak sapi mencapai 37,5% pada umur kebuntingan 31-35 hari, meningkat menjadi 93,8% pada umur kebuntingan 46-50 hari, dan mencapai 100% pada umur kebuntingan 51-55 hari.

*Dairy Cow Pregnancy Colloidal Gold Test Strip* merupakan salah satu produk yang didesain untuk mendeteksi kebuntingan ternak secara dini dengan menggunakan sampel darah, susu, saliva, dan urin. Produk *test strip* menggunakan prinsip kerja hormon progesteron dimana tingkat konsentrasi hormon ini akan bervariasi tergantung umur kebuntingan ternak

sapi. Konsentrasi progesteron yang rendah dalam darah pada 18 hingga 24 hari pasca perkawinan dapat mengindikasikan bahwa ternak tersebut tidak bunting dan progesteron yang tinggi mengindikasikan bahwa mungkin ternak tersebut sedang bunting (Marcus dan Hackett, 1986; Purohit, 2010). Sebanyak 46 ekor ternak sapi dilakukan pemeriksaan dengan menggunakan *test strip*. Hasil menunjukkan dengan menggunakan alat ini mampu mendeteksi kebuntingan umur 1 bulan dan pada umur kebuntingan 7 bulan alat *test strip* tidak menunjukkan hasil positif. Kemungkinan pada umur kebuntingan 7 bulan kadar hormon progesteron dalam tubuh ternak menurun sehingga tidak terdeteksi dengan akurat oleh alat *test strip*. *Test strip* baik digunakan untuk diagnosis kebuntingan dini (Xu *et al.*, 2016).

Progesteron merupakan hormon steroid yang memegang peranan penting dalam menjaga dan merawat kebuntingan yang dihasilkan oleh *corpus luteum* (CL) (Reese *et al.*, 2016). Progesteron dapat digunakan sebagai test kebuntingan karena CL hadir selama awal kebuntingan pada semua spesies ternak. Level progesteron dapat diukur dalam cairan biologis seperti darah kadarnya menurun pada hewan yang tidak bunting. Progesteron rendah pada saat tidak bunting dan tinggi pada hewan yang bunting. Konsentrasi progesterone bervariasi sesuai dengan tahap siklus estrus. Siklus estrus sapi menunjukkan bahwa konsentrasi progesteron pada susu atau serum mencapai nilai maksimum 13-14 hari setelah estrus, dan jika hewan tersebut bunting, progesteron terus meningkat hingga hari 21 setelah pembuahan (Balhara *et al.*, 2013). Diagnosa kebuntingan berdasarkan hormon progesteron pada sapi mempunyai kecermatan hanya 80-85%, tetapi untuk mendiagnosa sapi tidak bunting hormon ini mempunyai kecermatan hingga 100% (Mahaputra, 2002).

Sensitivitas dan spesifisitas merupakan istilah yang digunakan untuk mengevaluasi uji klinis. Secara umum semakin tinggi sensitivitas maka semakin rendah spesifitas dan sebaliknya (Lalkhen dan McCluskey, 2008). Semakin tinggi sensitifitas suatu uji maka semakin banyak mendapatkan hasil uji positif atau semakin sedikit jumlah negatif palsu. Semakin tinggi spesifisitas

suatu uji maka semakin banyak mendapatkan hasil uji negatif atau semakin sedikit jumlah positif palsu (Putra *et al.*, 2016). Sensitivitas dan spesifisitas digunakan dalam konteks penggambaran uji skrining terhadap uji standard referensi. Sensitivitas adalah kemampuan uji secara benarkan menunjukkan hasil positif sedangkan spesifisitas adalah kemampuan uji secara benar menunjukkan hasil negatif (Trevethan, 2017). Uji standard referensi yang digunakan adalah pemeriksaan palpasi per rektal. Pemeriksaan palpasi per rektal telah lama digunakan untuk mendiagnosis kebuntingan pada sapi (Palhao *et al.*, 2019). Nilai sensitivitas *test strip* sebesar 75 %, yang berarti kemampuan mendeteksi kebuntingan dini pada ternak memberikan hasil positif bagi ternak yang bunting sebesar 75 %. Nilai spesifisitas *test strip* sebesar 90%, yang berarti kemampuan mendeteksi kebuntingan dini pada ternak memberikan hasil negatif pada ternak yang tidak bunting sebesar 90 %.

### Kesimpulan

*Test strip* dapat digunakan untuk pemeriksaan kebuntingan dini pada ternak sapi. *Test strip* yang dilakukan pada 1 bulan pasca inseminasi buatan menunjukkan sensitivitas 75% dan spesifisitas 90%.

### Ucapan Terima Kasih

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terimakasih kepada Politeknik Pembangunan Pertanian Gowa yang telah mendanai penelitian ini.

### Daftar Pustaka

- Abdullah, M., Mohanty, T.K., Kumaresan, A., Mohanty, A.K., Madkar, A.R., Baithalu, R.K., and Bhakat, M. (2014). Early Pregnancy Diagnosis in Dairy Cattle: Economic Importance and Accuracy of Ultrasonography. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*. 2(8): 464-467.
- Balhara, A.K., Gupta, M., Singh, S., Mohanty, A.K., and Singh, I. (2013). Early pregnancy diagnosis in bovines: current status and future directions. *The Scientific World Journal*. 958540: 1-10.

- Bekele, N., Addis, M., Abdela, N., and Ahmed, W.M. (2016). Pregnancy diagnosis in cattle for fertility management: A review. *Glob Vet.* 16:355-364.
- Frastantie, D. (2017). Deteksi Kebuntingan Dini Pada Sapi Perah Dengan Pemeriksaan USG dan Analisis Hormon Steroid [Tesis]. Sekolah PascaSarjana IPB. Bogor. <http://repository.ipb.ac.id/jspui/bitstream/123456789/87855/1/2017dfr.pdf>.
- Gargiulo, G.D., Shephard, R.W., Tapson, J., McEwan, A.L., Bifulco, P., Cesarelli, M., Jin, C., Al-Ani, A., Wang, N., and Schaik, A.V. (2012). Pregnancy detection and monitoring in cattle via combined foetus electrocardiogram and phonocardiogram signal processing. *BMC Veterinary Research.* 8(1640): 1-10.
- Karen, A. M., Darwish, S., Ramoun, A., Tawfeek, K., Nguyen, V. H., de Sousa, N. M., Sulon J., Szenci O., and Beckers, J.F. (2011). Accuracy of transrectal palpation for early pregnancy diagnosis in Egyptian buffaloes. *Trop. Anim. Health Prod.* 43: 5-7.
- Lalkhen, A.G., and McCluskey, A. (2008). Clinical tests: sensitivity and specificity. Continuing Education in Anaesthesia. *Critical and pain.* Vol 8(6): 221-223.
- Mahaputra, L. (2002). Teknik Diagnosis Reproduksi Edisi I cetakan ke 3. Laboratorium Kebidanan FKH Univesritas Airlangga. Surabaya.
- Marcus, G. J., and Hackett, A. J. (1986). Use of enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of bovine serum and milk progesterone without extraction. *J. Dairy Sci.* 69: 818-824.
- Mondal, P. (2018). Pregnancy diagnosis of animals: importance, methods, and procedures. Retrieved maret 5, 2019, from <http://www.yourarticlelibrary.com/dairy-farm-management/pregnancy-diagnosis-of-animals-importance-methods-and-procedures/35867>.
- Nova, M.E, Riady G, dan Melia J. (2014). Diagnosis Kebuntingan Dini Menggunakan Kit Progesteron Air Susu Pada kambing Peranakan Ettawa (*Capra hircus*). *Jurnal Medika Veterinaria.* 8(2).
- Palhao, M.P., Guimaraes, C.R.B., Lima, J.F.J.F.M., Mendonca, M.R., Fernandes, C.A.C., Naves, J.P., Garcia, J.A.D., Gioso, M.M., Miglino, M.A., and Viana, J.H.M. (2019). Efficacy and limitations of different approaches to anticipate the diagnosis of pregnancy in cattle. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 71(6):1909-1916.
- Purohit, G. (2010). Methods of Pregnancy Diagnosis in Domestic Animals: The Current Status. WebmedCentral reproduction, WMC001305: 1-26.
- Putra, W.G.A.E, Sutarga, I.M, Kardiwinata, M.P, Suariyani, Ni L.P, Septarini, Ni.W, dan Subrata, I.M. (2016). Modul Penelitian Uji Diagnostik dan Skrining. Program Studi Kesehatan Masyarakat. Fakultas Kedokteran. Universitas Udayana. Denpasar.
- Reese, S.T., Pereira, M.C., Vasconcelos, J.L.M., Smith, M.F., Green, J.A., Geary, T.W., Peres, R.F.G., Perry, G.A., and Pohler, K.G. (2016). Markers of pregnancy: how early can we detect pregnancies in cattle using pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) and microRNAs?. *Anim Reprod.* 13(3): 200-208.
- Trevethan R. (2017). Sensitivity, specificity, and Predictive values: Foundation, Plia-bilities, and Pitfalls in Research and Practice. *Frontiers in Publick Health.* 5(307): 1-7.
- Xu, C., Yang, W., Xia, C., Wu, L., and Zhang, H. (2016). Development of a competitive Lateral Flow Immunoassay for progesterone in Dairy Cows' Milk. *Med Weter.* 72(8): 494-497.

## Efektivitas *Low Density Lipoprotein* (LDL) dari Kuning Telur Ayam terhadap Kualitas Semen Cair Domba

### *Effectivity of Low Density Lipoprotein (LDL) from Hen Egg yolk in Liquid Preservation of Ram Semen*

Dwitya Citraesti<sup>1</sup>, Wahono Esthi Prasetyaningtyas<sup>2\*</sup>, Ni Wayan Kurniani Karja<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Kedokteran Hewan, Insitut Pertanian Bogor

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

<sup>3</sup>Departemen Klinik Reproduksi dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Insitut Pertanian Bogor  
Jl. Agatis Kampus IPB Dramaga 16680

\*Corresponding author, Email: [wahono\\_esti@apps.ipb.ac.id](mailto:wahono_esti@apps.ipb.ac.id)

Naskah diterima: 29 Januari 2021, direvisi: 9 November 2021, disetujui: 29 November 2021

#### Abstract

Low-Density Lipoprotein (LDL) extracted from egg yolk has recently known can eliminate the adverse effect associated with the use of fresh egg yolk. The role of LDL in liquid preservation at 4°C of ram sperm has not been explored. The objective of this research was to assess the effects of substituting egg yolk with LDL for use as an extender in ram sperm preservation at 4°C, as well as on spermatozoa motility, viability, morphology, plasma membrane, and acrosome integrity, for 5 days. The semen was divided into five and diluted with Tris–fresh egg yolk (K), Tris–LDL5% (LDL5), Tris–LDL10% (LDL10), Tris–LDL15% (LDL15), and Tris–LDL20% (LDL20). The result showed a significant difference between LDL to fresh egg yolk for ram sperm quality ( $P<0.05$ ). The effectiveness of LDL on sperm quality decreased following the decrease in the concentration of LDL. Even though up to 20% concentration of LDL, it can not preserve the quality of diluted semen for motility, viability, and plasm membrane integrity.

**Keywords:** egg yolk; liquid preservation; low density lipoprotein; ram semen

#### Abstrak

Low Density Lipoprotein (LDL) yang diekstraksi dari kuning telur ayam diketahui mampu mengurangi efek negatif dari penggunaan kuning telur utuh. Peran LDL dalam preservasi semen cair domba pada suhu 4°C belum diketahui dengan jelas. Penelitian ini bertujuan mengkaji efektifitas penggantian kuning telur utuh dengan LDL dalam pengencer semen domba yang dipreservasi pada suhu 4°C selama 5 hari penyimpanan. Efektivitas dikaji berdasarkan parameter motilitas, viabilitas, morfologi, keutuhan membran plasma, dan keutuhan tudung akrosom spermatozoa. Semen dibagi menjadi lima bagian dan diencerkan dengan Tris-kuning telur utuh (K), Tris-LDL5% (LDL5), Tris-LDL10% (LDL10), Tris-LDL15% (LDL15) dan Tris-LDL20% (LDL20). Hasil penelitian menunjukkan bahwa ada perbedaan signifikan antara penggunaan LDL dibandingkan dengan kuning telur utuh terhadap kualitas spermatozoa domba ( $P<0.05$ ). Efektivitas LDL menurun mengikuti penurunan konsentrasi LDL. Penambahan LDL hingga konsentrasi 20%, tidak mampu mempertahankan kualitas semen cair dalam hal motilitas, viabilitas, dan keutuhan membran plasma.

**Kata kunci:** kuning telur; low density lipoprotein; preservasi cair; semen domba

## Pendahuluan

Teknologi inseminasi buatan (IB) bertujuan untuk meningkatkan populasi ternak, di Indonesia IB pada domba dapat menggunakan semen beku atau semen cair (Mulyono, 2011). Inseminasi buatan pada domba dengan menggunakan semen segar atau semen cair sudah terbukti keberhasilannya. Efektivitas semen cair lebih baik dibandingkan semen beku sehingga semen cair lebih sering digunakan (Kasimanickam *et al.*, 2011). Semen cair dihasilkan melalui teknik preservasi semen pada suhu 4-5°C (Perumal *et al.*, 2016). Preservasi semen dapat memperpanjang daya hidup dan daya fertilisasi spermatozoa, namun potensinya akan menurun seiring dengan bertambahnya periode penyimpanan. Penurunan potensi terjadi karena spermatozoa mengalami perubahan fisiologis dan struktur (Barbas dan Mascarenhas, 2009). Motilitas spermatozoa serta proses biologis lainnya sangat sensitif terhadap suhu dan akan menurun secara progresif pada saat spermatozoa didinginkan (Chantler *et al.*, 2000) dan efek ini bersifat *irreversible* (Parks, 1997). Efek *irreversible* akibat *cold shock* ini dapat dicegah dengan penambahan agen protektif ke dalam pengencer semen seperti penambahan kuning telur (Parks, 1997). Keberadaan kuning telur dalam pengencer dilaporkan dapat meningkatkan kemampuan fertilisasi spermatozoa (Shannon dan Curson, 1983) dan mencegah kerusakan membran plasma spermatozoa selama proses pendinginan (De Leeuw *et al.*, 1993).

Kuning telur dilaporkan mengandung banyak komponen seperti 68% *low density lipoprotein* (LDL), 16% *high density lipoprotein* (HDL), 10% globular protein (*livetines*), 4% *phosphoproteins* (*phosvitin*) dan 2% *protein minor* (Li-Chan *et al.*, 1995). Lebih lanjut Ariyani (2006) menyatakan bahwa kuning telur tidak saja merupakan sumber lemak, namun juga sebagai sumber protein yang berkisar antara 15-16% dan vitamin A 40.000 IU per 100 gr. Komponen LDL yang terdapat dalam kuning telur dipercaya merupakan komponen utama yang membantu spermatozoa untuk bertahan selama proses preservasi maupun kriopreservasi (Amirat *et al.*, 2004). Komponen lain seperti granula-granula dalam kuning telur (HDL)

diduga mempunyai pengaruh negatif terhadap viabilitas spermatozoa (Watson, 1976).

Penggantian penggunaan kuning telur dengan LDL telah dilaporkan memiliki daya proteksi terhadap spermatozoa selama proses preservasi dan kriopreservasi (Yamauchi *et al.*, 2009). Lebih lanjut, Dong *et al.*, (2008) melaporkan bahwa kuning telur dan LDL juga termasuk sebagai krioprotektan ekstraseluler. Kuning telur dan LDL tidak mampu melewati membran plasma (Aisen *et al.*, 2002) dan berfungsi melindungi membran plasma sebagai pelapis membran yang mampu menurunkan titik beku medium (Kundu *et al.*, 2002). Efektivitas penambahan *freeze-dried* LDL dalam pengencer spermatozoa menunjukkan hasil yang bervariasi. Penambahan *freeze-dried* LDL pada semen anjing hingga konsentrasi 3% (Neves *et al.*, 2014) dan pada semen beku domba hingga konsentrasi 20% (Moustacas *et al.*, 2011) tidak mampu memberikan daya preservasi yang baik dibandingkan dengan LDL murni ataupun kuning telur utuh. Sementara itu, penambahan *freeze-dried* LDL pada semen beku domba hingga konsentrasi 8% menunjukkan efek perlindungan yang sama dengan penggunaan kuning telur utuh selama proses kriopreservasi (Loaiza-Echeverri *et al.*, 2015). Efektivitas penambahan *freeze-dried* LDL dalam bahan pengencer sangat dipengaruhi oleh suhu penyimpanan dan proses *freeze-dried* (Boyer, 1986) atau bahan pengencer yang digunakan (Neves *et al.*, 2014).

Beberapa penelitian menggunakan LDL sebagai pengganti kuning telur utuh telah dilakukan. Pada pembekuan semen sapi, penambahan LDL mampu mempertahankan kualitas, daya fertilisasi, dan motilitas spermatozoa pasca *thawing* (Amirat *et al.*, 2004). Penambahan LDL pada semen kambing terjadi peningkatan motilitas pasca *thawing* (Al-Ahmad *et al.*, (2008). Pada semen anjing, penambahan LDL konsentrasi 8% dan glutamin 25 mM juga meningkatkan motilitas (Bencharif *et al.*, 2010). Pengencer yang ditambahkan dengan 6% LDL memiliki kualitas krioprotektif yang sama dengan pengencer komersial Equex® STAMP pada kucing (Bencharif *et al.* 2012). Penambahan LDL dari hasil ekstraksi kuning telur pada semen domba cair belum

dilaksanakan, sehingga penelitian ini bertujuan mengkaji efektivitas penambahan LDL hasil ekstraksi dari kuning telur ayam terhadap kualitas spermatozoa domba selama preservasi pada suhu 4° C.

### Materi dan Metode

Penelitian ini menggunakan 2 ekor domba jantan dewasa umur 5-6 tahun dengan bobot badan berkisar antara 30-40 kg. Semen dikoleksi melalui teknik vagina buatan di Kandang Unit Rehabilitasi Reproduksi FKH IPB. Pengencer yang digunakan adalah kombinasi dari tris (Merck®, Germany), fruktosa (Merck®, Germany), asam sitrat (Merck®, Germany), dan kuning telur. Komposisi pengencer menggunakan hasil modifikasi Schafer-Somi *et al.* (2006), yaitu untuk 10 ml pengencer adalah tris 0,3028 g, asam sitrat 0,17 g, fruktosa 0,125 g, dan air mili-Q 10 ml. Bahan-bahan dihomogenkan menggunakan mesin pengaduk otomatis dengan *magnetic stirer* di dalamnya. Penambahan kuning telur dalam pengencer dijadikan sebagai kontrol (K), sementara LDL ditambahkan ke dalam masing-masing tabung yang tersisa dengan konsentrasi 5% (LDL5), 10% (LDL10), 15% (LDL15), dan 20% (LDL20). Penisilin-streptomisin ditambahkan pada setiap tabung sebanyak 1.000 µg/ml dan streptomisin 1.000 µg/ml.

*Low Density Lipoprotein* (LDL) diekstraksi melalui metode Moussa *et al.*, (2002) dengan sedikit modifikasi dari Rauch (2013). Sumber LDL berasal dari telur ayam komersial, kemudian kuning telur dipisahkan dari kalaza dan albumin. Kuning telur yang masih memiliki membran vitellin diambil menggunakan spuit, disimpan dalam gelas piala dan direndam dalam air es. Kuning telur ditambah NaCl 0,17 M dengan perbandingan 1:2. Larutan dihomogenisasi dengan *magnetic stirer* selama 1 jam, kemudian larutan disentrifus dengan kecepatan 10.000 G selama 45 menit pada suhu 4°C. Supernatan hasil sentrifus selanjutnya ditambah ammonium sulfat dengan perbandingan 23,3 g per 100 g kuning telur (Rauch, 2013). Campuran *distirer* kembali selama 1 jam. Larutan disentrifus kembali dengan kecepatan 10.000 G selama 45 menit, supernatan dipisahkan dari pellet dan dimasukkan ke dalam membran dialisis

kemudian direndam selama 17 jam dalam aquades untuk menghilangkan ammonium sulfat. Setelah 17 jam, larutan disentrifus kembali dengan kecepatan yang sama seperti sebelumnya selama 45 menit. Supernatan dari hasil tersebut adalah LDL yang digunakan untuk penelitian ini. LDL dikoleksi, kemudian dimasukkan dalam minitube 1,5 ml dan disimpan pada suhu -20°C.

Semen segar dievaluasi sebelum dan setelah pengenceran. Evaluasi sebelum pengenceran meliputi volume, warna, konsistensi, motilitas, dan konsentrasi. Segera setelah pengenceran, sampel dievaluasi nilai motilitas, viabilitas, morfologi normal, keutuhan membran plasma (MPU), dan keutuhan tudung akrosom (TAU). Semen cair siap untuk melalui tahap preservasi suhu 4°C dalam kondisi *water jacket*. Pengamatan H0 dilaksanakan segera setelah pengenceran, kemudian setiap hari selama 5 hari semen dievaluasi kembali seperti setelah pengenceran (H1-H5).

Persentase spermatozoa motil adalah persentase spermatozoa yang bergerak progresif (bergerak ke depan). Nilai motilitas diperoleh dari pergerakan progresif spermatozoa (gerak normal maju) yang disajikan dalam persentase. Motilitas individu spermatozoa dievaluasi secara subjektif pada delapan lapang pandang yang berbeda dengan mikroskop cahaya pembesaran 200X dan 400X (Rasul *et al.*, 2001). Angka yang diberikan berkisar antara 0 dan 100% (Toelihere, 1993). Viabilitas spermatozoa adalah persentase spermatozoa yang hidup. Nilai ini dihitung dari perubahan warna kepala spermatozoa dengan sedikitnya 200 spermatozoa yang diamati dengan pewarnaan eosin-nigrosin. Pengamatan menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400X (Felipe *et al.*, 2008), yakni spermatozoa yang hidup ditandai oleh kepala berwarna bening, sedangkan yang mati ditandai oleh kepala berwarna merah. Nilai morfologi normal diperoleh dari pengamatan preparat yang sama dengan pengamatan viabilitas. Nilai morfologi normal diperoleh dari pengamatan morfologi normal dan abnormalitas yang tampak. Kedua parameter tersebut diamati pada 200 spermatozoa menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 400x. Evaluasi morfologi normal dipresentasikan dalam bentuk persentase yang

merupakan hasil pembagian jumlah spermatozoa normal dan jumlah sel spermatozoa terhitung.

Persentase MPU merupakan presentase spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh yang dievaluasi dengan metode *hypoosmotic swelling* (HOS) test (Jeyendran et al., 1984). Komposisi larutan hipoosmotik terdiri atas: 1,35 g fruktosa + 0,73 g natrium sitrat yang dilarutkan dengan akuabidestilata hingga mencapai volume 100 mL. Sebanyak 200 µl larutan hipoosmotik ditambahkan dengan 20 µl semen dan dicampur hingga homogen kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 45 menit. Preparat ulas tipis dibuat pada gelas objek dan dievaluasi dengan bantuan mikroskop cahaya pembesaran 400X terhadap minimum 200 spermatozoa. Spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh ditandai oleh ekor melingkar atau menggelembung, sedangkan membran plasma yang rusak ditandai oleh ekor lurus karena tidak dapat mampu menahan cairan yang masuk ke dalam sel (Ariswan et al., 2014).

Pengamatan TAU menggunakan pewarnaan *coomasie-blue*. Nilai TAU diperoleh dari perubahan warna pada kepala spermatozoa, diamati pada 200 spermatozoa, dengan pembesaran mikroskop 400x. Spermatozoa yang memiliki akrosom utuh terlihat adanya garis pembungkus pada bagian kepala dan garis cincin nukleus berwarna lebih biru (gelap). Sebaliknya, pada akrosom rusak garis-garis tersebut tidak tampak dan memiliki warna terang pada anterior atau terang pada keseluruhan kepala. Hasil evaluasi disajikan bentuk persentase dari hasil pembagian jumlah spermatozoa dengan tudung akrosom utuh dan total spermatozoa terhitung.

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan pengamatan

berulang sebanyak 5 kali. Data penelitian yang berupa persentase dianalisis menggunakan ANOVA dan jika ditemukan adanya perbedaan yang nyata antar perlakuan maka dilanjutkan dengan uji Duncan. Data diolah menggunakan program SPSS versi 15 pada taraf kepercayaan 95% ( $P < 0.05$ ).

## Hasil dan Pembahasan

Kualitas semen cair domba dalam pengencer yang ditambahkan dengan LDL pada periode penyimpanan lima hari ditampilkan pada Tabel 1. Motilitas spermatozoa setelah diencerkan dengan LDL 5%, 10%, dan 15% nilainya lebih rendah daripada spermatozoa dalam pengencer kuning telur (K) atau LDL 20% ( $P < 0.05$ ). Pola yang sama teramati sampai hari ke-5 penyimpanan. Penurunan motilitas spermatozoa pada semua kelompok perlakuan seiring dengan bertambah lamanya waktu penyimpanan semen ( $P < 0.05$ ). Setelah hari ke-5 penyimpanan, motilitas spermatozoa sudah di bawah 40% pada semua kelompok perlakuan. Rizal (2006) menyatakan sebab dari penurunan persentase motilitas, yaitu penurunan pH dalam semen yang berkaitan dengan peningkatan kebutuhan energi dalam bentuk Adenosin Trifosfat (ATP). Seiring lama penyimpanan, ketersediaan suplai energi semakin berkurang, sehingga terjadi proses respirasi anaerob yang menghasilkan ATP dan asam laktat. Asam laktat tersebut merubah pH medium pengencer menjadi lebih asam dan meningkatkan osmolaritas sehingga menurunkan daya motilitas spermatozoa.

Viabilitas semen cair domba dalam pengencer dengan LDL periode penyimpanan lima hari ditampilkan pada Tabel 2. Nilai viabilitas spermatozoa setelah proses pengenceran

Tabel 1. Motilitas spermatozoa domba dalam pengencer dengan penambahan LDL

Perlakuan	Lama Penyimpanan					
	H0 (%)	H1 (%)	H2 (%)	H3 (%)	H4 (%)	H5 (%)
K	80.0±0.0aA	74.0±2.2aB	69.0±2.2aC	58.0±2.7aD	48.0±2.7aE	34.0±2.2aF
LDL5	52.0±2.7bA	42.0±2.7bB	32.0±2.7bC	27.0±2.7bD	17.0±2.7bE	11.0±2.2bF
LDL10	61.0±2.2cA	53.0±2.7cB	47.0±2.7cC	39.0±2.2cD	31.0±2.2cE	17.0±2.7cF
LDL15	69.0±2.2dA	59.0±2.2dB	53.0±2.7dC	48.0±2.7dD	42.0±2.7dE	23.0±2.7dF
LDL20	78.0±2.7aA	66.0±2.2eB	61.0±2.2eC	52.0±2.7eD	46.0±4.2aE	29.0±2.2eF

Huruf a,b,c,d,e yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P < 0.05$ ) pada kolom yang sama. Huruf A,B,C,D,E,F yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P < 0.05$ ) pada baris yang sama. Kuning telur utuh 20% (K); Ekstrak Low Density Lipoprotein 5% (LDL5); Ekstrak Low Density Lipoprotein 10% (LDL10); Ekstrak Low Density Lipoprotein 15% (LDL15); Ekstrak Low Density Lipoprotein 20% (LDL20). Penyimpanan semen cair pada hari ke-0 (H0), hari ke-1 (H1), hari ke-2 (H2), hari ke-3 (H3), hari ke-4 (H4), hari ke-5 (H5).

Tabel 2. Viabilitas spermatozoa domba dalam pengencer dengan penambahan LDL

Perlakuan	Lama Penyimpanan					
	HO (%)	H1 (%)	H2 (%)	H3 (%)	H4 (%)	H5 (%)
K	83.6±2.2aA	80.0±1.3aB	73.8±2.3aC	69.8±2.6aD	64.7±1.6aE	59.7±1.1aF
LDL5	56.6±3.7bA	53.6±2.0bA	43.0±2.6bB	40.5±0.9bC	37.5±1.5bC	34.1±2.4bD
LDL10	66.8±1.6cA	62.5±1.8cB	58.4±1.7cC	54.9±2.0cD	50.2±1.5cE	46.7±2.9cF
LDL15	75.0±2.7dA	70.9±1.9dAB	67.8±2.5dB	63.1±3.5dC	57.5±4.2dD	53.4±4.4dD
LDL20	75.5±1.5dA	73.2±1.2eA	71.5±2.0aAB	68.3±2.4aB	61.3±5.1aDC	57.1±4.8aDC

Huruf a,b,c,d,e yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P<0.05$ ). Huruf A,B,C,D,E,F yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata antar baris ( $P<0,05$ ). Kuning telur utuh 20% (K); Ekstrak Low Density Lipoprotein 5% (LDL5); Ekstrak Low Density

menunjukkan pengencer yang ditambah kuning telur lebih tinggi dibandingkan dengan pengencer dengan LDL 5%, 10%, 15%, dan 20% ( $P<0.05$ ). Namun, sejak hari ke-2 hingga hari ke-5 penyimpanan, nilai viabilitas kontrol dan pengencer LDL 20% tidak menunjukkan perbedaan nilai ( $P>0.05$ ). Sementara itu, viabilitas terendah terdapat pada pengencer dengan penambahan LDL 5% ( $P<0.05$ ). Rendahnya daya tahan hidup disebabkan aktivitas metabolisme anaerob spermatozoa yang membentuk asam laktat dalam media pengencer yang minim substrat sumber energi. Asam laktat yang berlebih dalam pengencer merubah pH yang dapat menimbulkan efek racun dan kematian yang tinggi bagi spermatozoa (Widjaya, 2011).

Nilai viabilitas baik kontrol maupun perlakuan tampak menurun sampai hari ke-5 ( $P<0.05$ ). Menurut Juniandri *et al.*, (2014), senyawa yang berperan menjaga fungsi kehidupan spermatozoa adalah lesitin dan lipoprotein di dalam kuning telur. Komponen ini memiliki molekul besar yang tidak dapat menembus membran spermatozoa namun berfungsi melindungi dan mempertahankan integritas lipoprotein penyusun membran spermatozoa. Kerusakan membran sel sperma-

tozoa dapat menyebabkan permeabilitas membran meningkat sehingga memungkinkan partikel-partikel kontaminan masuk ke dalam sel dan menyebabkan sel mati (Juniandri *et al.*, 2014).

Morfologi normal spermatozoa yang diamati setiap hari selama periode penyimpanan 5 hari (Tabel 3), baik penambahan kuning telur (K) ataupun LDL tidak menimbulkan pengaruh yang signifikan terhadap morfologi normal ( $P>0.05$ ). Tidak adanya pengaruh perlakuan tersebut diduga karena pada perlakuan kuning telur utuh ataupun LDL, keduanya menyuplai senyawa lesitin. Lesitin mampu mempertahankan kualitas spermatozoa dengan mekanisme berikatan dengan membran plasma (White, 1993). Jenis abnormalitas yang diamati pada penelitian ini adalah abnormalitas sekunder yang terdiri dari ekor yang melingkar, kepala tanpa ekor, dan kepala pecah. Abnormalitas sekunder terjadi diluar proses spermatogenesis.

Keutuhan membran plasma spermatozoa pada pengencer dengan penambahan LDL selama lima hari penyimpanan ditunjukkan Tabel 4. Semua kelompok perlakuan secara umum menunjukkan penurunan nilai MPU seiring lama hari penyimpanan ( $P<0.05$ ).

Tabel 3. Morfologi normal spermatozoa domba dalam pengencer dengan penambahan LDL

Perlakuan	Lama Penyimpanan					
	HO (%)	H1 (%)	H2 (%)	H3 (%)	H4 (%)	H5 (%)
K	98.7±1.3A	98.0±1.0AB	97.6±1.1AB	97.0±0.8BC	96.8±0.8BC	95.9±1.0C
LDL5	97.7±0.7A	96.9±1.3A	96.2±1.5AB	96.0±1.4AB	95.0±2.3AB	94.0±3.1BC
LDL10	97.7±0.7A	97.2±0.9AB	96.3±1.3ABC	96.3±1.0ABC	95.5±1.9BC	94.6±2.4C
LDL15	97.7±0.7A	96.9±0.8AB	96.5±0.9BC	96.2±0.4BC	95.9±0.6BC	95.6±0.8C
LDL20	97.5±0.6A	97.1±0.6AB	96.5±0.8BC	96.4±0.6BC	96.0±0.6C	95.6±0.8C

Huruf A,B,C,D,E,F yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata antar baris ( $P<0,05$ ). Kuning telur utuh 20% (K); Ekstrak Low Density Lipoprotein 5% (LDL5); Ekstrak Low Density Lipoprotein 10% (LDL10); Ekstrak Low Density Lipoprotein 15% (LDL15); Ekstrak Low Density Lipoprotein 20% (LDL20). Penyimpanan semen cair pada hari ke-0 (H0), hari ke-1 (H1), hari ke-2 (H2), hari ke-3 (H3), hari ke-4 (H4), hari ke-5 (H5).



Tabel 4. Membran Plasma Utuh (MPU) spermatozoa domba dalam pengencer dengan penambahan LDL

Perlakuan	Lama Penyimpanan					
	HO (%)	H1 (%)	H2 (%)	H3 (%)	H4 (%)	H5 (%)
K	91.0±3.1aA	88.9±1.4aAB	86.1±0.7aB	82.6±2.0aC	78.6±1.8aD	75.9±2.9aD
LDL5	72.1±2.2bA	67.7±2.5bB	64.9±2.6bBC	62.3±3.5bCD	58.8±3.8bDE	56.6±4.0bE
LDL10	77.5±1.7cA	73.4±1.1cB	69.8±2.9cC	66.8±2.4cD	65.7±1.6cDE	63.9±2.0cE
LDL15	81.7±1.9dA	75.8±2.5dB	72.5±2.4cC	69.8±2.8cCD	67.3±1.9cDE	65.5±2.2cdF
LDL20	82.4±1.2eA	80.3±0.8eAB	77.1±3.1dBC	75.0±3.4dCD	72.4±3.9dD	68.2±2.8dE

*Superscript* a,b,c,d,e yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P<0.05$ ). *Superscript* A,B,C,D,E,F yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata antar baris ( $P<0.05$ ). Kuning telur utuh 20% (K); Ekstrak Low Density Lipoprotein 5% (LDL5); Ekstrak Low Density Lipoprotein 10% (LDL10); Ekstrak Low Density Lipoprotein 15% (LDL15); Ekstrak Low Density Lipoprotein 20% (LDL20). Penyimpanan semen cair pada hari ke-0 (H0), hari ke-1 (H1), hari ke-2 (H2), hari ke-3 (H3), hari ke-4 (H4), hari ke-5 (H5).

Setelah pengenceran nilai MPU kontrol lebih tinggi dibandingkan dengan pengencer yang ditambahkan LDL 5%, 10%, 15%, dan 20% ( $P<0.05$ ). Kondisi tersebut bertahan hingga hari ke-5 penyimpanan. Hal tersebut dijelaskan oleh Ducha *et al.*, (2012) bahwa penambahan kuning telur dapat melindungi spermatozoa terhadap *Reactive Oxygen Spesies* (ROS) sehingga keutuhan ultrastruktur dan membran spermatozoa dapat dijaga dengan baik. Makromolekul dalam kuning telur berupa lipid dan protein akan menjadi target oksidasi oleh ROS, sehingga ROS tidak akan mengoksidasi membran spermatozoa. Sehingga keutuhan membran plasma spermatozoa dapat terjaga akibat penambahan kuning telur dalam pengencer.

Kualitas tudung akrosom spermatozoa dalam pengencer dengan LDL pada periode penyimpanan 5 hari ditampilkan Tabel 5. Persentase tudung akrosom utuh (TAU) berkurang mengikuti lama hari penyimpanan. Kelompok perlakuan kontrol, LDL 15% dan 20% menunjukkan nilai tudung akrosom utuh (TAU) lebih tinggi dibandingkan dengan pengencer dengan LDL 5% dan 10% ( $P<0.05$ ) setelah pengenceran. Ketiganya

tidak menunjukkan perbedaan hingga hari ke-5 penyimpanan ( $P>0.05$ ). Hal yang sama juga terjadi pada LDL 5% dan 10% yang tidak berbeda nilainya hingga akhir penyimpanan ( $P>0.05$ ). Namun, ditinjau dari persentase rata-rata TAU, kelompok kontrol memiliki nilai TAU lebih tinggi dibanding LDL 15% dan 20%. Menurut Hammadeh *et al.*, (2001), kuning telur dapat berperan sebagai krioprotektan dan melindungi akrosom spermatozoa dari kerusakan. Keberadaan kuning telur di dalam pengencer, menyebabkan spermatozoa memiliki krioprotektan ekstrasel sehingga lebih dapat melindungi integritas membran spermatozoa. Nilai TAU menunjukkan kelompok kontrol lebih mampu mempertahankan keutuhan tudung akrosom spermatozoa.

## Kesimpulan

Penambahan LDL hingga konsentrasi 20%, tidak mampu mempertahankan kualitas semen cair dalam hal motilitas, viabilitas, dan keutuhan membran plasma. Penambahan LDL dengan konsentrasi 20% pada pengencer semen cair domba memiliki daya preservasi yang mendekati daya preservasi pengencer kuning telur. Meskipun, kemampuan preservasi

Tabel 5. Tudung Akrosom Utuh (TAU) spermatozoa domba dalam pengencer dengan penambahan LDL

Perlakuan	Lama Penyimpanan					
	HO (%)	H1 (%)	H2 (%)	H3 (%)	H4 (%)	H5 (%)
K	99.1±0.7aA	97.9±2.0aAB	97.2±1.6aABC	96.2±1.4aBCD	95.6±1.4aCD	95.0±1.5aD
LDL5	96.3±1.7bA	94.4±2.1bAB	93.2±2.5bBC	91.7±2.2bBCD	90.3±2.3bCD	88.8±2.5bD
LDL10	97.0±2.0bcA	95.9±1.8abAB	94.2±2.0bABC	93.0±2.4bcBCD	92.0±2.6bcCD	90.8±3.0bcD
LDL15	98.0±1.2abcA	96.8±1.4abAB	95.8±1.8abABC	94.4±2.4abcBCD	92.9±3.4abcCD	91.8±3.1abcD
LDL20	98.3±0.8acA	97.0±1.5aAB	96.0±1.8abABC	95.3±1.6acBC	94.4±2.4acBC	93.6±2.6acC

Huruf a,b,c,d,e yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P<0.05$ ). Huruf A,B,C,D,E,F yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata antar baris ( $P<0.05$ ). Kuning telur utuh 20% (K); Ekstrak Low Density Lipoprotein 5% (LDL5); Ekstrak Low Density Lipoprotein 10% (LDL10); Ekstrak Low Density Lipoprotein 15% (LDL15); Ekstrak Low Density Lipoprotein 20% (LDL20). Penyimpanan semen cair pada hari ke-0 (H0), hari ke-1 (H1), hari ke-2 (H2), hari ke-3 (H3), hari ke-4 (H4), hari ke-5 (H5).

pengencer yang ditambahkan LDL 20% belum menyamai pengencer kuning telur.

### Daftar Pustaka

- Aisen, E., Medina, V., and Venturino, A. 2002. Cryopreservation and post thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology*. 57: 1801–8.
- Al-Ahmad, M.Z.A., Chatagnon, G., Amirat Briand, L., Moussa, M., Tainturier, D., Anton, M., and Fieni., F. 2008. Use of Glutamine and Low-Density Lipoproteins Isolated from Egg Yolk to Improve Buck Semen Freezing. *Reprod Domest Anim*. 43: 429–436.
- Amirat, L., Tainturier, D., Jeanneau, L., Thorin, C., and Gerard, O. 2004. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*. 61: 895–907.
- Ariswan, Saili, T., Baa, L.O., and Rahadi, S. 2014. Membran plasma utuh spermatozoa epididimis kambing perranakan ettawa dalam natrium klorida dengan konsentrasi berbeda. *JITRO*. (1)1: 79-87.
- Ariyani, E. 2006. Penetapan kandungan kolesterol dalam kuning telur pada ayam petelur. Dalam Temu Teknis Nasional Tenaga Fungsional Pertanian 2006. Balai Penelitian Ternak.
- Barbas, J.P., and Mascarenhas, R.D. 2009. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank*. 10: 49–62.
- Bencharif, D., Amirat, L., Anton, M., Schmitt, E., Desherces, S. 2010. The advantages of LDL (low density lipoproteins) in the cryopreservation of canine semen. *Theriogenology*. 70: 1478–88.
- Bencharif, D., Amirat-Briand, L., Garand, A., Anton, M., Schmitt, E., Desherces, S., Delhomme, G., Langlois, ML., Barrière, P., Destrumelle, S., Vera-Munoz, O., Tainturier, D. 2012. The advantages of using a combination of LDL and glutamine in comparison with TRIS egg yolk and Equex STAMP extenders in the cryopreservation of canine semen. *Res Vet Sci*. 93:440-447.
- Boyer RF. 1986. *Modern Experimental Biochemistry*. California (US): Addison-Wesley. Hal 52-53
- Chantler, E., Abraham-Peskir, J.V., Little, S., McCann, C., and Medenwaldt, R. 2000. Effect of cooling on the motility and function of human spermatozoa. *Cryobiology*. 41:125–34.
- De Leeuw, F.E., De Leeuw, A.M., Den Daas, J.H., Colenbrander, B., and Verkleij, A.J. 1993. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*. 30:32–44.
- Dong, Q., Rodenburg, S.E., Huang, C., and VandeVoort, C.A. 2008. Effect of pre-freezing conditions on semen cryopreservation of rhesus monkey. *Theriogenology*. 70: 61–9.
- Ducha, N., Susilawati, T., Aulanni'am, Sri, W., and Pangestu, M. 2012. Ultrastructure and fertilizing ability of limousin bull sperm after storage in cep-2 extender with and without egg yolk. *PJBS*. 15(20): 979-985.
- Felipe, Y.E., Juarez-Mosqueda M.L., Hernandez-Gonzales, E.O., and Velancia, J.J. 2008. Viability of fresh and frozen bull sperm compared by staining techniques. *Acta Vet Bras*. 2:123-130.
- Hammadeh, M.E., George, T., Rosenbaum, P., and Schmidt, W. 2001. Association between freezing agent and acrosome damage of human spermatozoa from subnormal and normal sperm. *J Androl*. 32: 331-336.
- Jeyendran, R.S., Van der Ven, H.H., Perez, P.M., Crabo, B.G., and Zenevald, L.J. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *JRI*. 70: 219-228.
- Juniandri, Susilawati, T., and Isnaini, N. 2014. Perbandingan Pengencer Andromed dan CEP-2 terhadap Kualitas Spermatozoa

- Sapi Hasil Seksing dengan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll. *J Vet.* 15(2): 252-262.
- Kasimanickam, R., Vanmathy, K., Ahmed, T., and Kevin, P. 2011. Effect of semen extenders on sperm parameters of ram semen during liquid storage at 4°C. *Small Rumin Res.* 99: 208-213.
- Kundu, C.N., Chakraborty, J., Dutta, P., Bhattacharyya, D., and Ghosh, A. 2002 Effects of dextrans on cryopreservation of goat cauda epididymal spermatozoa using a chemically defined medium. *Reprod.* 123: 907-13.
- Li-Chan, E.C.Y., William, D.P., and Shuryo, N. 1995. The chemistry of egg and egg products. In *Egg Science and Technology Fourth Edition*. Stadelman, W.J., Newkirk, D., and Newby, L. (Ed). The Haworth Press Inc, New York (US). pp 105-151.
- Loaiza-Echeverri, A.M., Cruz, B.C., Snoeck, P.P.N., Mora, L.C.O., Parzewski, B., Neves, M.M., Heneine, L.G.D., and Henry, M. 2015. Low density lipoproteins added to an extender frozen or lyophilized are evenly efficient in cryoprotecting bovine sperm cells than when 16% whole egg yolk was added. *Semin Cienc Agrar.* 36: 1335-1346.
- Mulyono, S. 2011. *Teknik Pembibitan Kambing dan Domba*. Jakarta (ID): Penebar Swadaya. Hal 21.
- Moussa, M., Martinet, V., Trimeche, A., Tainturier, D., and Anton, M. 2002. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology.* 57: 1695-706.
- Moustacas, V.S., Zaffalon, F.G., Lagares, M.A., Loaiza-Eccheverri, A.M., Varago, F.C., Neves, M.M., Heneine, L.G., Arruda, R.P., and Henry, M. 2011. Natural, but not lyophilized, low density lipoproteins were an acceptable alternative to egg yolk for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology.* 75: 300-307.
- Neves, M.M., Heneine, L.G.D., and Henry, M. 2014. Cryoprotection effectiveness of low concentrations of natural and lyophilized LDL (low density lipoproteins) on canine spermatozoa. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 66: 769-777.
- Parks, J.E. 1997. *Hypothermia and mammalian gametes in Reproductive Tissue Banking*. San Diego: Academic Press. pp 229-261.
- Perumal, P., Srivastava, S.K., Ghosh, S.K., Baruah, K.K., Khan, M.H., Rajoriya, J.S., and Srivastava, N. 2016. Effect of low density lipoprotein on replacement of egg yolk in liquid preservation of mithun semen. *Indian J Anim Sci.* 86 (4): 55.
- Rasul, A., Ahmad, N., and Anzar, M. 2001. Changes in motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology during cryopreservation of buffalo spermatozoa. *J Androl.* 22: 278-283.
- Rauch, A. 2013. Cryopreservation of bovine semen in egg yolk based extenders. *Thesis*. Department of Large Animal Clinical Sciences, University of Saskatchewan. Saskatoon (CA).
- Rizal, M. 2006. Pengaruh penambahan laktosa di dalam pengencer tris terhadap kualitas semen cair domba garut. *J Indon Trop Anim Agric.* 31(4): 224-231.
- Schafer-Somi, S., Kluger, S., Knapp, E., Klein, D., and Aurich, C. 2006. Effects of semen extender and semen processing on motility and viability of frozen-thawed dog spermatozoa. *Theriogenology.* 66: 173-182.
- Shannon, P., and Curson, B. 1983. Effect of egg yolk levels on the fertility of diluted bovine sperm stored at ambient temperatures. *N Z J Agric Res.* 26(2): 187-189.
- Toelihere, M.R. 1993. *Inseminasi Buatan pada Ternak*. Bandung (ID): Angkasa.
- Watson, P.F. 1976. Electroejaculation, semen characteristics, and semen preservation of the brindled gnu. *J Reprod Fert.* 47: 123-6.

- Widjaya, N. 2011. Efek penambahan vitamin e dalam pengencer glukosa terhadap daya tahap hidup spermatozoa domba pada suhu 5°C. *JSPI*. 9 (1): 25-31.
- White, I.G. 1993. Lipid and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod Fertil Dev*.5: 639-658.
- Yamauchi, S., Nakamura, S., Lay, K.M., Azuma, T., Yakabi, T., Muto, N., Nakada, T., Ashizawa, K., and Tatemoto, H. 2009. Characteristics of Okinawan active Agu pig spermatozoa after addition of low-density lipoprotein to freezing extender. *J Reprod Dev*. 55: 558–565.

## Identifikasi Mikroba dari Lendir Estrus dan Deteksi Kebuntingan Sapi Kawin Berulang di Sleman, Yogyakarta

### *Microbes Identification from Estrus Mucus and Pregnancy Detection of Repeat Breeding Cows in Sleman, Yogyakarta*

Surya Agus Prihatno<sup>1\*</sup>, Abdul Samik<sup>2</sup>, Dea Indriani Astuti<sup>3</sup>, Muhammad Agil<sup>4</sup>, Usamah Afiff<sup>5</sup>,  
Anriansyah Renggaman<sup>3</sup>, Dedi Rahmat Setiadi<sup>4</sup>, Yosua Kristian Adi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departemen Reproduksi dan Obstetri, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

<sup>2</sup>Departemen Reproduksi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, Surabaya

<sup>3</sup>Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung, Bandung

<sup>4</sup>Departemen Klinik, Reproduksi, dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, IPB University, Bogor

<sup>5</sup>Departemen Ilmu Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, IPB University, Bogor

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

Naskah diterima: 18 Juli 2021, direvisi: 10 November 2021, disetujui: 29 November 2021

#### Abstract

Repeat breeding is condition of cows that have normal or near normal estrous cycles but fail to become pregnant after several insemination. This study aims to identify the microbes in the cervical and vaginal mucus of beef cattle and dairy cows that experience repeat breeding and detected the pregnancy after the third or more artificial insemination. A total of 14 beef cattle and 6 dairy cows that experience repeat breeding in the cattle herd in the Yogyakarta region of Indonesia were used as samples in this study. Cervical and vaginal mucus samples were collected using plastic sheet when the cow was re-estrus. The samples were put into the 5 ml Brain Heart Infusion Broth for bacterial isolation and identification. Pregnancy examination was carried out on day 45 after artificial insemination using ultrasound method. Bacteria that could be isolated and identified from cervical mucus and vaginal mucus of beef cattle and dairy cows included *Bacillus* sp., *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas* sp. Some cows detected positive in pregnancy examination even though the bacteria were presence in the cervical and/or vaginal mucus. There was various composition of bacteria found in the cervical mucus and vaginal mucus, of beef cattle and dairy cows with repeat breeding in livestock groups in Yogyakarta. The presence of bacterial in the cervical and vaginal mucus during estrus was not always become the causes of failed pregnancy.

**Keywords:** bacteria; beef cow; dairy cow; mucus; USG

#### Abstrak

Kawin berulang adalah kondisi sapi betina yang memiliki siklus estrus normal atau mendekati normal tetapi gagal bunting setelah beberapa kali dilakukan inseminasi buatan (IB) atau perkawinan alami. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi mikroba yang ada di lendir serviks dan vagina sapi potong dan sapi perah yang mengalami kawin berulang dan melakukan deteksi kebuntingan setelah IB ketiga atau lebih. Sampel dalam penelitian ini sebanyak 14 ekor sapi potong dan 6 ekor sapi perah yang mengalami kawin berulang di kelompok ternak yang ada di wilayah Sleman, Yogyakarta. Sampel lendir serviks dan vagina diambil dengan menggunakan plastik pelindung IB *gun* pada saat sapi estrus. Sampel dimasukkan ke dalam media *Brain Heart Infusion Broth* 5 ml untuk isolasi dan identifikasi bakteri. Pemeriksaan kebuntingan dilakukan pada hari ke-45 pasca inseminasi buatan menggunakan metode USG. Hasil penelitian menunjukkan bahwa jenis bakteri yang dapat diisolasi dan diidentifikasi dari lendir serviks dan lendir vagina sapi potong dan sapi perah

antara lain *Bacillus sp.*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, dan *Pseudomonas sp.* Beberapa sapi terdeteksi bunting pada pemeriksaan kebuntingan meskipun terdapat bakteri pada lendir serviks dan/atau vagina. Terdapat berbagai komposisi bakteri yang ditemukan pada lendir serviks dan lendir vagina pada sapi potong dan sapi perah yang mengalami kawin berulang di kelompok ternak yang ada di wilayah Sleman, Yogyakarta. Penelitian ini menunjukkan bahwa adanya bakteri pada lendir serviks dan vagina saat estrus ternyata tidak selalu menjadi penyebab gagalnya kebuntingan.

**Kata kunci:** bakteri; sapi potong; sapi perah; lendir; USG

## Pendahuluan

Upaya Pemerintah Indonesia untuk mencapai swasembada pangan nasional, khususnya daging dan susu sapi, masih terkendala sampai saat ini. Salah satu penyebabnya adalah masih tingginya angka gangguan reproduksi pada sapi, baik sapi potong maupun sapi perah, di tingkat peternakan rakyat. Gangguan reproduksi pada sapi potong menyebabkan kebuntingan tertunda sehingga populasi sapi potong tidak bertambah. Selain itu, pada sapi perah, gangguan reproduksi akan menghambat produksi susu. Masalah ini tentu saja merugikan bagi pemerintah dan peternak dari berbagai aspek. Sebagai contoh, pemerintah hingga saat ini masih harus mendatangkan daging dan susu sapi dari luar negeri untuk mencukupi kebutuhan dalam negeri, sedangkan bagi peternak, mereka harus menanggung kerugian ekonomi untuk biaya pemeliharaan dan pemeriksaan ternaknya selama tidak berproduksi.

Salah satu gangguan reproduksi pada sapi yang cukup tinggi di Indonesia adalah kawin berulang/ *repeat breeding*. Prevalensi kawin berulang pada sapi perah di D.I.Y. mencapai 29,4% (Prihatno *et al.*, 2013). Selain itu, Wijanarko dan Sumiarto (2014) melaporkan bahwa prevalensi kasus kawin berulang pada sapi potong di Kabupaten Grobogan mencapai 19%. Hal ini tentu mengkhawatirkan jika tidak segera dilakukan penanganan. Kawin berulang adalah kondisi di mana sapi betina yang telah melahirkan, memiliki siklus estrus normal atau mendekati normal, dan telah dikawinkan baik dengan IB atau kawin alami 2-3 kali atau lebih tetapi tidak terjadi kebuntingan (Amiridis *et al.*, 2009). Kegagalan kebuntingan akan menyebabkan *days open* atau waktu tanpa kebuntingan menjadi lebih panjang. Lamanya *days open* pada kondisi sapi normal kurang lebih 60-90 hari untuk sapi potong (Yulyanto *et al.*, 2014) dan 85 hari untuk sapi perah (Leksanawati,

2010). Kondisi ini memungkinkan seekor sapi dapat melahirkan satu kali dalam satu tahun. Kawin berulang utamanya disebabkan oleh dua hal, yaitu kegagalan fertilisasi dan kematian embrio dini (Gustafsson dan Emanuelson, 2002). Faktor yang dapat menyebabkan kedua hal tersebut antara lain defisiensi hormonal, kurangnya deteksi estrus, waktu inseminasi buatan yang tidak tepat, atau peningkatan mikroba di dalam uterus (Noakes *et al.*, 2016; Prihatno *et al.*, 2013).

Keberadaan mikroba pada saluran reproduksi tidak selalu menimbulkan gejala klinis sehingga sulit dideteksi dengan pemeriksaan luar. Adanya mikroba ini dapat menjadi salah satu penyebab terjadinya kawin berulang. Keberadaan mikroba hanya dapat didiagnosa dengan cara isolasi dan identifikasi di laboratorium. Mikroba di dalam uterus dapat dideteksi pada lendir yang keluar saat sapi sedang berahi atau estrus. Identifikasi jenis mikroba yang terdapat pada lendir serviks dan vagina sapi potong dan sapi perah yang mengalami kawin berulang di kelompok ternak yang ada di wilayah Sleman, Yogyakarta belum pernah dilaporkan sebelumnya. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi mikroba yang terdapat pada lendir serviks dan vagina sapi potong dan sapi perah yang mengalami kawin berulang dan mendeeteksi kebuntingan setelah dilakukannya IB ketiga atau lebih.

## Materi dan Metode

### Persetujuan Etik

Semua perlakuan terhadap hewan dan sampel dalam penelitian ini telah disusun sesuai dengan standar operasional penelitian ilmiah dan telah mendapatkan *Ethical Clearance* dari Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada dengan nomor 0148/EC-FKH/Int ./2019.

## Koleksi Sampel

Sebanyak 14 ekor sapi potong dan 6 ekor sapi perah yang dipelihara di peternakan rakyat di wilayah Sleman, Yogyakarta, dengan kondisi dan kebersihan kandang yang cukup baik digunakan dalam penelitian ini. Kriteria sapi yang dipilih adalah sapi yang sehat, pernah beranak minimal satu kali, dan pernah dilakukan IB dua kali atau lebih. Sampel lendir serviks dan vagina diambil pada saat sapi sedang estrus. Lendir dikumpulkan menggunakan *plastic sheet IB gun* yang telah dilindungi dengan *sheet protector* untuk mencegah kontaminasi. *Plastic sheet IB gun* dan *sheet protector* dimasukkan ke dalam saluran reproduksi sapi betina hingga leher serviks kemudian *Plastic sheet IB gun* didorong hingga muncul sekitar 1-2 cm dari ujung *sheet protector*. Lendir dihisap menggunakan spuit yang ditempelkan pada *plastic sheet IB gun*. Cairan lendir serviks dikumpulkan terlebih dahulu kemudian lendir vagina dikumpulkan. Sebanyak kurang lebih 1 ml sampel lendir dari masing-masing bagian dimasukkan ke dalam media (5 ml *Brain Heart Infusion Broth/ BHIB*) yang terdapat pada tabung yang berbeda kemudian disimpan di dalam freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  sebelum dilakukan pemeriksaan mikroba di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung. Setelah pengambilan lendir maka dilanjutkan dengan IB.

## Pemeriksaan Mikroba

Metode identifikasi bakteri mengacu pada Jang *et al.* (1976), OIE (2015), dan SMI (2015). Isolasi mikroba dilakukan menggunakan media diferensial selektif (*MacConkey Agar*) dan media Plat Agar Darah. Identifikasi bakteri dilakukan dengan membandingkan karakteristik morfologi dan mikroskopis isolat serta uji biokemis.

## Deteksi Kebuntingan

Pemeriksaan kebuntingan dilakukan pada hari ke-45 pasca IB. Pemeriksaan dilakukan menggunakan metode Ultrasonografi (USG). Sebelum dilakukan pemeriksaan, sapi terlebih dahulu di-*restrain* menggunakan tali supaya

aman bagi operator dan sapi. Ultrasonografi yang digunakan bertipe *portable* dan probe yang digunakan bertipe *linear*. Frekuensi USG yang digunakan pada pemeriksaan ini adalah 5.0 MHz. Kebuntingan ditandai dengan adanya gambaran *anechoic* dari kantung kebuntingan dan *hypoechoic* dari fetus di dalam kantung kebuntingan.

## Analisis Hasil

Hasil isolasi dan identifikasi bakteri serta hasil pemeriksaan kebuntingan dianalisis secara deskriptif. Data disajikan dalam bentuk Tabel dan histogram.

## Hasil dan Pembahasan

Hasil pemeriksaan mikroba menunjukkan adanya variasi jenis bakteri yang dapat terisolasi dan teridentifikasi baik pada lendir serviks maupun lendir vagina sapi potong dan sapi perah yang mengalami kawin berulang di kelompok ternak di wilayah Sleman, Yogyakarta. Bakteri yang dapat terisolasi dan teridentifikasi antara lain *Bacillus sp.*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, dan *Pseudomonas sp.*

Proporsi sapi potong yang pada lendir serviks dan/atau lendir vaginanya dapat terisolasi dan teridentifikasi bakteri cukup tinggi. Secara keseluruhan, 71% dari total jumlah sapi potong dapat diisolasi dan diidentifikasi bakteri pada lendir serviks dan/atau lendir vaginanya, sedangkan sebanyak 29% dari total jumlah sapi potong tidak ditemukan bakteri pada kedua sampel yaitu lendir serviks dan lendir vagina. Berdasarkan hasil tersebut, terdapat bakteri yang hanya terisolasi dan teridentifikasi pada sampel lendir serviks atau hanya pada sampel lendir vagina atau keduanya. Sebanyak 57% dari total sampel lendir serviks mengandung bakteri. Hasil yang sama (57%) juga ditemukan pada pemeriksaan sampel lendir vagina. Sedangkan dari total jumlah sapi potong, sebanyak 42,85% dapat terisolasi dan teridentifikasi bakteri baik pada lendir serviks maupun lendir vaginanya. Hasil pemeriksaan mikroba pada lendir serviks dan lendir vagina sapi potong dapat dilihat pada Tabel 1.

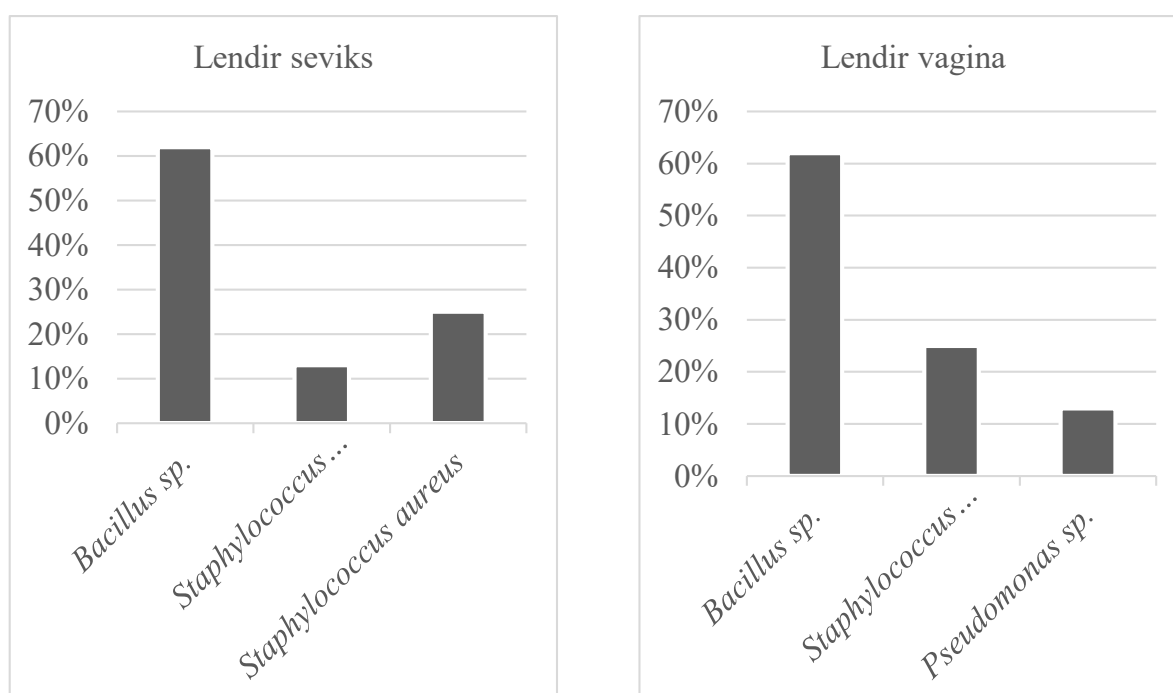
Tabel 1. Hasil identifikasi bakteri pada lendir serviks dan lendir vagina sapi potong yang mengalami kawin berulang di wilayah Sleman, Yogyakarta.

No. Sapi potong	Jenis bakteri		Pemeriksaan kebuntingan
	Lendir serviks	Lendir vagina	
1	<i>Bacillus sp.</i>	-	Bunting
2	-	-	Bunting
3	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Tidak
4	<i>Bacillus sp.</i>	-	Bunting
5	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Bacillus sp.</i>	Tidak
6	-	-	Bunting
7	-	-	Tidak
8	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus sp.</i>	Bunting
9	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Bacillus sp.</i>	Tidak
10	-	-	Bunting
11	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Bacillus sp.</i>	Tidak
12	-	<i>Pseudomonas sp.</i>	Tidak
13	-	<i>Bacillus sp.</i>	Tidak
14	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Tidak

Terdapat empat jenis bakteri yang dapat diidentifikasi dari sampel lendir serviks dan vagina sapi potong yaitu *Bacillus sp.*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, dan *Pseudomonas sp.* Tiga dari empat bakteri ditemukan pada sampel lendir serviks yaitu *Bacillus sp.*, *Staphylococcus epidermidis*, dan *Staphylococcus aureus* dengan persentase masing-masing 62%, 13%, dan 25%. Hasil yang

sedikit berbeda diperoleh pada pemeriksaan mikroba lendir vagina. Ada tiga jenis bakteri yang berhasil diisolasi dan diidentifikasi yaitu *Bacillus sp.*, *Staphylococcus epidermidis*, dan *Pseudomonas sp.* dengan persentase masing-masing 62%, 25%, dan 13% (Gambar 1).

Pemeriksaan kebuntingan pada sapi potong menunjukkan hasil positif sebanyak 43% dan hasil negatif sebanyak 57%. Sebanyak 50% dari



Gambar 1. Proporsi bakteri yang dapat terisolasi dan teridentifikasi dari sampel lendir serviks dan lendir vagina sapi potong yang mengalami kawin berulang di wilayah Sleman, Yogyakarta.



hasil positif pada pemeriksaan kebuntingan sapi potong ditemukan bakteri pada lendir serviks dan/atau lendir vaginanya dan sebanyak 50% lainnya tidak terdapat bakteri pada lendir serviks dan lendir vaginanya. Sebanyak 88% dari hasil negatif pada pemeriksaan kebuntingan sapi potong ditemukan bakteri pada lendir serviks dan/atau lendir vaginanya dan sebanyak 12% lainnya tidak terdapat bakteri pada lendir serviks dan lendir vaginanya (Tabel 1).

Hasil serupa diperoleh dari pemeriksaan bakteri pada lendir serviks dan lendir vagina sapi perah. Secara keseluruhan, 67% dari total jumlah sapi perah terisolasi dan teridentifikasi bakteri pada lendir serviks dan/atau lendir vaginanya. Sama dengan pemeriksaan bakteri pada sampel lendir serviks dan lendir vagina sapi potong, pada sampel lendir serviks dan lendir vagina sapi perah terdapat bakteri yang terisolasi dan teridentifikasi hanya dari sampel lendir serviks atau hanya dari sampel lendir vagina atau keduanya. Berdasarkan hasil pemeriksaan, sebanyak 33% dari total sampel lendir serviks dan sebanyak 50% dari total sampel lendir vagina terdapat bakteri. Bakteri yang sama dapat diidentifikasi pada lendir serviks dan lendir vagina dari satu ekor sapi perah. Sementara itu, dua ekor sapi perah atau sebanyak 33% dari total sapi perah tidak terdapat bakteri pada sampel lendir serviks dan lendir vaginanya. Data pemeriksaan bakteri pada lendir serviks dan lendir vagina sapi perah dapat dilihat pada Tabel 2.

Berbeda dengan sapi potong, hanya terdapat tiga jenis bakteri yang dapat diidentifikasi pada sampel lendir sapi perah yaitu *Bacillus sp.*, *Staphylococcus epidermidis*, dan *Staphylococcus aureus*. Dua dari tiga bakteri diidentifikasi dari

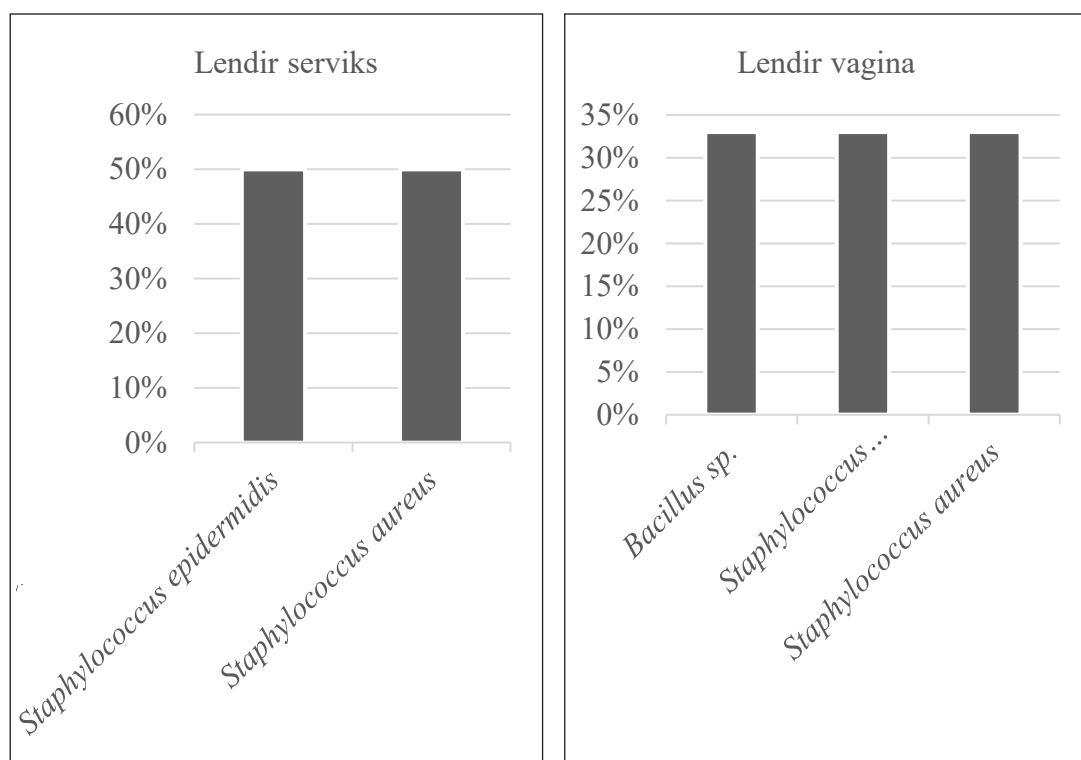
sampel lendir serviks yaitu *Staphylococcus epidermidis* dan *Staphylococcus aureus* dengan persentase masing-masing 50%. Hasil yang sedikit berbeda diperoleh pada pemeriksaan bakteri pada lendir vagina. Terdapat tiga jenis bakteri yang dapat diidentifikasi yaitu *Bacillus sp.*, *Staphylococcus epidermidis*, dan *Staphylococcus aureus* dengan persentase yang sama yaitu 33% (Gambar 2).

Pemeriksaan kebuntingan pada sapi perah menunjukkan hasil positif sebanyak 33% dan hasil negatif sebanyak 67%. Seluruh sapi perah (100%) yang menunjukkan hasil positif pada pemeriksaan kebuntingan terdapat bakteri pada lendir serviks dan/atau lendir vaginanya. Sebanyak 50% dari hasil negatif pada pemeriksaan kebuntingan terdapat bakteri pada lendir serviks dan/atau vaginanya dan sebanyak 50% lainnya tidak terdapat bakteri pada lendir serviks dan lendir vaginanya (Tabel 2).

Kawin berulang adalah kondisi sapi yang gagal bunting setelah beberapa kali inseminasi meskipun masih ada beberapa perdebatan di antara peneliti mengenai jumlah inseminasi (Levine, 1999). Patel *et al.* (2007) melaporkan bahwa kejadian kawin berulang pada sapi lebih tinggi dibandingkan dengan kerbau. Namun, faktor risiko kawin berulang serupa, yaitu termasuk paritas, penyakit peri-parturient, musim, ukuran kawanan, produksi susu, dan kesuburan yang buruk (Saraswat dan Purohit, 2016). Setelah periode post partum, infeksi bakteri sering terjadi pada sapi. Hal ini dapat menyebabkan endometritis klinis dan subklinis (Sheldon *et al.*, 2009). Janowski *et al.* (2013) melaporkan bahwa ada korelasi yang signifikan antara endometritis subklinis dan kawin berulang. Salah satu metode yang paling sering digunakan

Tabel 2. Hasil identifikasi bakteri pada lendir serviks dan lendir vagina sapi perah yang mengalami kawin berulang di wilayah Sleman, Yogyakarta.

No. Sapi perah	Jenis bakteri		Pemeriksaan kebuntingan
	Lendir serviks	Lendir vagina	
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Bunting
2	-	<i>Bacillus sp.</i>	Tidak
3	-	-	Tidak
4	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Bunting
5	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	Tidak
6	-	-	Tidak



Gambar 2. Proporsi bakteri yang dapat terisolasi dan teridentifikasi dari sampel lendir serviks dan lendir vagina sapi perah yang mengalami kawin berulang di wilayah Sleman, Yogyakarta.

untuk mendeteksi endometritis subklinis pada sapi adalah diagnosis sitologi dari sekresi endometrium, atau biopsi uterus (Kasimanickam *et al.*, 2004; Barlund *et al.*, 2008). Hasil serupa dengan penelitian ini dilaporkan oleh Al-Dori *et al.* (2020) yang menemukan beberapa jenis bakteri dari sekret vagina saat estrus pada sapi yang mengalami kawin berulang. Bakteri tersebut antara lain *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* dan *Staphylococcus epidermidis*, *E. Coli*, *Klebsiella*, dan *Proteus*, dengan proporsi yang paling banyak diisolasi adalah *Staphylococcus aureus* (Al-Dori *et al.*, 2020). Namun, pada penelitian ini juga dapat diidentifikasi *Bacillus sp.* dari lendir serviks dan *Pseudomonas sp.* dari lendir vagina sapi yang mengalami kawin berulang dengan *Bacillus sp.* adalah bakteri yang paling banyak terisolasi dan teridentifikasi. Identifikasi *Bacillus sp.* dan *Pseudomonas sp.* juga pernah dilaporkan oleh Gani *et al.* (2008) dari sampel biopsi uterus sapi yang mengalami kawin berulang. Giannattasio-Ferraz *et al.* (2019) menjelaskan bahwa bakteri utama yang ada di antara mikrobiota vagina adalah *Aeribacillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Bacteroides*, dan *Ruminococcus*. Anggota genus *Bacillus* serta *Streptococcus* dan *Enterococcus*

merupakan bakteri yang paling sering diisolasi dari intrauterin dan dianggap sebagai patogen oportunistik atau potensial (Wagener dan Drillich, 2018; Werner *et al.*, 2012; Westermann *et al.*, 2010). Teori sebelumnya menyatakan bahwa selama kebuntingan uterus bersifat steril dan dapat terkontaminasi oleh bakteri post partum (Schoenmakers *et al.*, 2019; Appiah *et al.*, 2020). Adanya bakteri pada lendir serviks dan lendir vagina dapat menyebabkan invasi menuju uterus, karena salah satu jalur masuknya bakteri ke dalam saluran reproduksi adalah dari vagina (Appiah *et al.*, 2020). Namun, dalam penelitian ini kami menemukan bahwa sapi masih bisa bunting ketika terdapat bakteri pada lendir serviks dan/atau lendir vagina. Temuan ini didukung oleh bukti terbaru dari laporan Human Microbiome Project yang menyatakan bahwa rahim tidaklah steril, tetapi memiliki kolonisasi bakteri tertentu di endometrium (Moreno *et al.*, 2017; Pelzer *et al.*, 2017; Baker *et al.*, 2018). Beberapa penelitian juga melaporkan bahwa keragaman dan hubungan filogenetik komunitas mikroba yang beragam di vagina hingga saat berkembang biak juga dapat menghasilkan kebuntingan yang baik pada sapi (Serrano *et al.*, 2019; Ault *et al.*, 2019).

## Kesimpulan

Terdapat empat jenis bakteri dengan komposisi yang berbeda yang dapat ditemukan pada lendir serviks dan lendir vagina sapi potong dan sapi perah yang mengalami kawin berulang di wilayah Sleman, Yogyakarta. Kebuntingan dapat terjadi pada sapi potong dan sapi perah yang mengalami kawin berulang yang pada lendir serviks dan/atau lendir vaginanya ditemukan bakteri saat estrus. Peranan bakteri pada saluran reproduksi sapi masih perlu diteliti lebih lanjut.

## Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Universitas Gadjah Mada yang telah mendanai sepenuhnya penelitian ini melalui Kerjasama Penelitian Indonesia - WCU (*World Class University*) Grant tahun 2019 dengan Nomor: 639/UN1/DITLIT/DIT-LIT/LT/2019.

## Daftar Pustaka

- Al-Dori, O. A., Ismaeel, M. A. and Noumy, B. S. (2020). Bacterial infection causes of subclinical endometriosis associated with repeated conception failure in cattle. *Eurasia. J. Biosci.* 14: 6267-6274.
- Amiridis, G. S., Tsiligianni, T. H., Dovolou, E., Rekkas, C., Vouzas, D. and Menegatos, I. (2009). Combined administration of gonadotropin-releasing hormone, progesterone, and meloxicam is an effective treatment for the repeat-breeder cow. *Theriogenology.* 72: 542-548.
- Appiah, M. O., Wang, J. and Lu, W. (2020). Microflora in the Reproductive Tract of Cattle: A Review. *Agriculture.* 10: 232.
- Ault, T. B., Clemmons, B. A., Reese, S. T., Dantas, F. G., Franco, G. A., Smith, T. P., Edwards, J. L., Myer, P. R. and Pohler, K. G. (2019). Uterine and vaginal bacterial community diversity prior to artificial insemination between pregnant and nonpregnant postpartum cows. *J. Anim. Sci.* 97: 4298-4304.
- Baker, J. M., Chase, D. M. and Herbst-Kralovetz, M. M. (2018). Uterine microbiota: Residents, tourists, or invaders? *Front. Immunol.* 9: 208.
- Barlund, C. S., Carruthers, T. D., Waldner, C. L. and Palmer, C. W. (2008). A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle. *Theriogenology.* 69: 714-723.
- Gani, M. O., Amin, M. M., Alam, M. G. S., Kayesh, M. E. H., Karim, M. R., Samad, M. A. and Islam, M. R. (2008). Bacterial flora associated with repeat breeding and uterine infections in dairy cows. *Bangl. J. Vet. Med.* 6(1): 79-86.
- Giannattasio-Ferraz, S., Laguardia-Nascimento, M., Gasparini, M. R., Leite, L. R., Araujo, F. M. G., de Matos Salim, A. C., de Oliveira, A. P., Nicoli, J. R., de Oliveira, G. C. and da Fonseca, F. G. (2019). A common vaginal microbiota composition among breeds of *Bos taurus indicus* (Gyr and Nellore). *Braz. J. Microbiol.* 50: 1115-1124.
- Gustafsson, H. and Emanuelson, U. (2002). Characterisation of the Repeat Breeding Syndrome in Swedish Dairy Cattle. *Acta. Vet. Scand.* 43(2): 115-125.
- Jang, S. S., Biberstein, E. L. and Hirsh, D. C. (1976). A Manual of Veterinary Clinical Bacteriology and Microbiology. Davis (US), Univ California Pr.
- Kasimanickam, R., Duffield, T. E., Foster, R. A., Gartley, C. L., Leslie, K. E., Walton, J. S. and Johnson, W. H. (2004). Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of sub clinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology.* 62: 9-23.
- Moreno, I. and Franasiak, J. M. (2017). Endometrial microbiota—new player in town. *Fertil. Steril.* 108: 32-39.
- Noakes, D. E., Parkinson, T. J. and England, G. C. W. (2016). Veterinary Reproduction and Obstetrics. 9th ed. Elsevier Sci, Edinburgh London.
- Patel, S. B., Hadiya, K. K. and Chavan, D. B. (2007). Incidence of reproductive disorders in cattle and buffaloes in Kaira district of Gujrat. *Indian J. Field Vet.* 3: 15-17.

- Pelzer, E., Gomez-Arango, L. F., Barrett, H. L. and Nitert, M. D. (2017). Maternal health and the placental microbiome. *Placenta*. 54: 30-37.
- Prihatno, S. A., Kusumawati, A., Karja, W. K. and Sumiarto, B. (2013). Prevalence and Risk Factors for Repeat Breeding in Dairy Cattle at Farmer Level. *Jurnal Veteriner*. 14(4): 452-461.
- Saraswat, C. S. and Purohit, G. N. (2016). Repeat breeding: Incidence, risk factors and diagnosis in buffaloes. *Asian Pacific Journal of Reproduction*. 5(2): 87-95.
- Schoenmakers, S., Steegers-Theunissen, R. and Faas, M. (2019). The matter of the reproductive microbiome. *Obst. Med*. 12: 107-115.
- Serrano, M. G., Parikh, H. I., Brooks, J. P., Edwards, D. J., Arodz, T. J., Edupuganti, L., Huang, B., Girerd, P. H., Bokhari, Y. A. and Bradley, S. P. (2019). Racioethnic diversity in the dynamics of the vaginal microbiome during pregnancy. *Nat. Med*. 25: 1001-1011.
- Sheldon, I. M., Cronin, J., Goetze, L., Donofrio, G. and Schuberth, H. J. (2009). Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. *Biol. Reprod*. 81(6): 1025-1032.
- S.MIs. UK Standards for Microbiology Investigation [SMIs]. (2015). Identification of *Pasteurella* species and morphologically similar organism. Public Health England. 3: 1-28.
- Wagener, K. and Drillich, M. (2018). Pathogenesis of uterine diseases in dairy cattle and implications for fertility. *Anim. Reprod*. 15(Suppl.1): 879-885.
- Werner, A., Suthar, V., Plöntzke, J. and Heuwieser, W. (2012). Relationship between bacteriological findings in the second and fourth weeks postpartum and uterine infection in dairy cows considering bacteriological results. *J. Dairy Sci*. 95: 7105-7114.
- Westermann, S., Drillich, M., Kaufmann, T. B., Madoz, L. V. and Heuwieser, W. (2010). A clinical approach to determine false positive findings of clinical endometritis by vaginoscopy by the use of uterine bacteriology and cytology in dairy cows. *Theriogenology*. 74: 1248-1255.
- Wijanarko, I. and Sumiarto, B. (2014). Prevalence and Factors Causing Repeat Breeding in Beef Cattle in Grobogan Regency. Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- World Organisation for Animal Health [OIE]. (2015). Fowl cholera. OIE Terrestrial Manual. 239: 1-10.
- Yulyanto, C. A., Trinil, S. and Ihsan, M. N. (2014). Reproductive performance of Ongole and Limousin cattle in Sawoo District, Ponorogo Regency and Tugu District, Trenggalek Regency. *JHIP*. 24: 49-57.

## **INDEK PENULIS**



## **INDEK SUBYEK**





