

BULETIN

LABORATORIUM

VETERINER

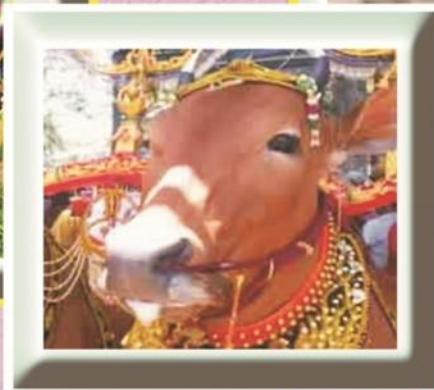
ISSN: 0853-7968

INFORMASI PETERNAKAN DAN KESEHATAN HEWAN

VOL: 19

NO: 4

EDISI TAHUN 2019



BALAI BESAR VETERINER WATES
DIREKTORAT JENDERAL PETERNAKAN DAN KESEHATAN HEWAN
KEMENTERIAN PERTANIAN



SUSUNAN DEWAN REDAKSI
BULETIN LABORATORIUM VETERINER
International Standard Serial Number (ISSN): 0853-7968

PENANGGUNG JAWAB

Drh. Bagoes Poermadjaja, MSc

PEMIMPIN REDAKSI

Drh. Basuki Rokhmat Suryanto

EDITORIAL BOARD

Drh. Indarto Sudarsono, MMT

Drh. Tugiyat

Drh. Didik Yulianto, MSc

Drh. Eni Fatiyah

Drh. Suhardi

Drh. Ari Puspita Dewi, MSc

Drh. Rohmadiyanto

Drh. Dewi Pratamasari, MSc

Drh. C. Setyo Rini Purnomo, MSc

Drh. Th. Siwi Susilaningrum

Drh. Elly Puspasari Lubis, MSc

Dr. drh. Sri Handayani Irianingsih, M. Biotech

Drh. Maria Avina Rachmawati, MSc

Drh. Hendra Wibawa, MSi, PhD

Suprihatin, SST

REDAKTUR PELAKSANA

Sugeng Zunarto, AMd.

Tri Cahyono Setyawan, S.Kom

Heri Purnama, SE

ALAMAT REDAKSI

BALAI BESAR VETERINER WATES

Jl Raya Yogya-Wates, Km 27, Wates, Kulonprogo, 55602

Telepon: 0274-773168, Fax: 0274-773354, e-mail: bbvetwates@pertanian.go.id

Redaksi menerima artikel ilmiah berupa: hasil penelitian, penyidikan dan pengamatan lapangan dalam bidang peternakan dan kesehatan hewan yang belum pernah dipublikasikan. Artikel ditulis dalam bentuk MS Word, jenis huruf Times New Roman dengan ukuran huruf 11spasi 1,5 paling sedikit 5 halaman dan paling banyak 10 halaman.

Surat dari

REDAKSI

Salam Veteriner,

Sahabat Buletin Veteriner, edisi kali ini redaksi menyajikan beberapa artikel yang dihimpun dari kolega dokter hewan maupun paramedik veteriner di Balai Besar Veteriner Wates (BBVet). Di sela kesibukannya menyukseskan Program Bedah Kemiskinan Rakyat Sejahtera (BEKERJA), mereka telah menyempatkan diri untuk menulis hasil investigasi maupun pengembangan metode yang telah dilakukan.

Oleh karena itu redaksi menyampaikan terimakasih kepada para penulis. Semoga Buletin Veteriner semakin berkembang sehingga pengetahuan dan informasi terkini tentang peternakan dan kesehatan hewan dapat bermanfaat bagi masyarakat.

Akhir kata, saran dan kritik yang membangun senantiasa kami harapkan supaya Buletin Veteriner semakin sempurna.

Daftar Isi

| | |
|---|-----|
| Surat Redaksi..... | iii |
| Daftar Isi..... | iii |
| Pewarnaan Streptavidin-Biotin Immunoperoksidase pada Sel MDBK untuk Deteksi Virus Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR) dan Bovine Viral Diarrhea (BVD) | 1 |
| Investigasi Kematian Ayam di Kabupaten Brebes Tahun 2018 | 8 |
| Investigasi Outbreak Penyakit Diduga Keracunan Theobromin pada Sapi di Kabupaten Klaten Tahun 2019 | 14 |
| Monitoring Mycoplasmosis pada Ayam Layer di Daerah Istimewa Yogyakarta Tahun 2019..... | 18 |

PEWARNAAN STREPTAVIDIN-BIOTIN IMMUNOPEROKSIDASE PADA SEL MDBK UNTUK DETEKSI VIRUS INFECTIOUS BOVINE RHINOTRACHEITIS (IBR) DAN BOVINE VIRAL DIARRHEA (BVD)Sri Handayani Irianingsih^{1*}, Desi Puspita Sari¹, Muhammad Afdhal Darul¹, Sutopo²¹Virologi-BBVet Wates, ²Patologi-BBVet Wates

*korespondensi: yanibiotech@gmail.com

ABSTRAK

Penyakit viral *Infectious Bovine Rhinotracheitis* (IBR) dan *Bovine Viral Diarrhea* (BVD) memiliki kemiripan gejala klinis seperti gangguan pernafasan, gangguan reproduksi dan aborsi. Kajian ini mempunyai tujuan, pertama untuk mengembangkan metoda identifikasi virus IBR dan virus BVD biotipe *cytopathic* (cp) dan *noncytopathic* (ncp) pada sel MDBK dengan menggunakan teknik pewarnaan *streptavidin-biotin immunoperoxidase*. Kedua, untuk mengetahui gambaran pewarnaan sel MDBK yang dilakukan pada gelas objek, *slide flask* dan *mikroplate 96 well*. Sel MDBK yang telah ditumbuhkan selapis (*monolayer*) dan diinfeksi virus IBR dan BVD dilanjutkan inkubasi dalam incubator CO₂, suhu 37°C selama 48 – 72 jam. Fiksasi sel MDBK post infeksi menggunakan larutan PBS-BSA (0,02%)-Aceton (35%). Pewarnaan sel pada gelas objek dilakukan dengan memindahkan sel MDBK terinfeksi ke gelas objek yang telah dilapisi *Poly L-Lysine* sedangkan pada *slide flask* dan *mikroplate 96 well* tanpa memindahkan. Sel MDBK dipindahkan dengan dua teknik, *trypsinizing* (biologik) dan *scrapping* (mekanik). Partikel virus IBR yang bereplikasi di intranuklear sel berikatan dengan antibodi monoklonal anti BHV-1. Replikasi virus BVD berlangsung di intrasitoplasma dan berikatan dengan antibodi monoklonal anti BVDV E2 (gp53). Antibodi sekunder yang telah dilabel biotin bereaksi dengan kompleks antigen-antibodi primer. Penambahan konjugat *streptavidin-horseradishperoxidase* (HRP) dan substrat hydrogen peroksida mengakibatkan perubahan kromogen *diaminobenzidine* (DAB) menjadi endapan berwarna kecoklatan. Adanya partikel virus IBR dan virus BVD biotipe cp menunjukkan perubahan sel (*cytopathic effect/cpe*) sebaliknya virus BVD biotipe ncp tidak menunjukkan *cpe*, namun keduanya tetap berwarna kecoklatan. Pewarnaan sel MDBK pada *slide flask* dan *mikroplate 96 well* menunjukkan hasil yang lebih jelas dan lebih mudah diterapkan dibandingkan pada objek gelas. Teknik pewarnaan ini mampu untuk mengidentifikasi virus IBR, cpBVD dan ncpBVD melalui isolasi virus pada sel MDBK dan selanjutnya dapat diterapkan untuk sampel lapangan.

Kata Kunci: antibodi monoklonal, sel MDBK, *streptavidin-biotin immunoperoxidase*, virus BVD, virus IBR.

PENDAHULUAN

Virus BHV-1 merupakan penyebab penyakit IBR yang tergolong virus DNA dalam genus *Varicellovirus*, subfamily Alphaherpesvirinae, family Herpesviridae. Terdapat tiga subtipe BHV-1 yaitu BHV-1.1, BHV-1.2a dan BHV-1.2b dengan tingkat virulensi subtipe BHV-1.1 lebih tinggi dibandingkan lainnya (Edwards *et al.*, 1990). Virus subtipe BHV-1.1 menyebabkan penyakit pernapasan berat dan dapat berkaitan dengan aborsi. Gejala klinis berupa gejala syaraf, demam, vulvovaginitis, *repeat breeders*,

balanopostitis, metritis, gangguan reproduksi bahkan abortus dan kematian pada sapi anak sapi (OIE, 2010). Virus BHV-1 juga menyebabkan immunosupresif secara luas pada ternak sapi terinfeksi, yang memicu infeksi sekunder viral dan bakterial. Penyakit IBR secara serologis dilaporkan pertama kali di Indonesia pada tahun 1982 oleh BPPH Lampung. Isolasi virus baru dilakukan pada tahun 1992 dan sejak saat itu, uji serologis dan isolasi agen penyakit dilakukan pada sapi dan kerbau di beberapa daerah di Indonesia serta seroepidemiologi dipelajari pada sapi perah di

Pulau Jawa (Sudarisman, 1992). Berdasarkan data tingkat seropositif IBR pada sapi di wilayah kerja BBVet Wates pada tahun 2013 sebesar 20% (394/1.953) sedangkan tahun 2014 sebesar 18% (281/1.554), yang mana kejadian lebih banyak pada sapi PO yang berasal dari pembelian di pasar. Kejadian seropositif IBR ini menggambarkan bahwa penyakit IBR telah tersebar dari tahun ke tahun di wilayah kerja BBVet Wates akan tetapi tidak menunjukkan gejala klinis karena tidak ditemukan adanya *shedding virus* dari ternak sapi saat disurvei (Irianingsih *et al.*, 2014b).

Virus *Bovine Viral Diarrhea* (BVDV) sebagai patogen viral penting pada sapi yang telah menyebar di seluruh dunia dan berdampak ekonomi bagi peternakan (Houe, 1995; Deregt, 2005), namun di beberapa Negara telah berhasil dieradikasi (OIE, 2015). Infeksi BVDV menimbulkan berbagai dampak, seperti gangguan fertilitas, immunosupresi, diare, trombositopenia, dan lebih sering tanpa gejala. Pada hewan bunting, infeksi transplasental mengakibatkan abortus, *still birth*, *malformation*, dan infeksi persisten (Becher *et al.*, 2003). Infeksi virus BVD diindikasikan telah menginfeksi ternak sapi bibit (Wiyono *et al.*, 1989) dan pada sapi di Indonesia (Sudarisman, 2011). Berdasarkan data tingkat seropositif BVD pada sapi di wilayah kerja BBVet Wates pada tahun 2012 sebesar 3% dan tahun 2013 diperoleh sebesar 15%. Tren persentasenya menunjukkan kenaikan setiap tahun. Pada tahun 2013, Balai Besar Veteriner Wates Yogyakarta telah mendeteksi antigen virus BVD menggunakan metoda uji ELISA Ag BVD sebanyak 30% (12/39) pada sapi perah (Irianingsih *et al.*, 2014a). Saepulloh dan Sendow (2015) melaporkan peredaran virus BVDV-1 subgenotipe -1a hingga -1d di daerah Jawa Barat, Jakarta, dan Jawa Tengah.

Virus BVD genotype-1 dan 2 berdasarkan *cytopathology* kultur sel terinfeksi, terbagi menjadi biotipe *cytopathic* (cp) dan *noncytopathic* (ncp) (Gripshover *et al.*, 2007; Fulton *et al.*, 2009). Virus cp BVD memberikan perubahan vakuola sitoplasmik sel, sel membulat (*cell rounding*), sel terlepas dari dasarnya dan kematian sel. Sebaliknya, ncp virus BVD menetapkan secara visual infeksi persisten tanpa perubahan pada sel kultur (Bolin, 2002). Biotipe ncp dijadikan sebagai penyebab penyakit terutama terkait

dengan penyakit respiratori dan enterik serta reproduksi pada peternakan bibit (OIE, 2015). Biotipe ncp virus BVD menjadi fokus utama diagnostik isolasi virus pada kultur sel. Hewan infeksi persisten sebagai pembawa virus seumur hidup dapat diidentifikasi melalui beberapa metoda, yaitu deteksi antigen viral, RNA viral dan isolasi virus dari specimen pada kultur sel yang diikuti dengan metoda *immune-labelling* untuk mendeteksi replikasi virus pada sel (OIE, 2015). Isolasi virus menggunakan kultur sel *bovine* dan sampel berupa darah, dan jaringan (Cornish *et al.*, 2005) serta dapat berupa serum, sel *buffy coat*, darah, dan leukosit (OIE, 2015).

Tujuan kegiatan ini yang pertama untuk mengembangkan metoda identifikasi virus IBR strain Colorado dan virus BVD-1 biotipe *cytopathic* (cp) dan *noncytopathic* (ncp) pada sel MDBK dengan menggunakan teknik pewarnaan *streptavidin-biotin immunoperoksidase*. Kedua, untuk mengetahui gambaran pewarnaan sel MDBK yang dilakukan pada gelas objek, *slide flask* dan *mikroplate 96 well*. Isolasi virus merupakan standard emas (*gold standard*) untuk diagnosa penyakit BVD dan IBR walaupun memerlukan waktu dan keahlian yang intensif (Deregt, 2005; Cornish *et al.*, 2005; OIE, 2015). Identifikasi agen penyakit IBR yang bersifat laten (OIE, 2013) dan penyakit BVD khususnya biotipe ncp dapat menggunakan pendekatan isolasi virus pada kultur sel kemudian dilanjutkan dengan uji pewarnaan immunositokimia. Pendekatan lainnya dapat menggunakan deteksi DNA virus dengan teknik PCR konvensional ataupun *real time* (OIE, 2013).

MATERI DAN METODA

Materi

Bahan yang digunakan adalah virus IBR strain Colorado, virus BVD-1 biotipe cp strain Singer dan biotipe ncp strain lapangan. Bahan pendukung yang digunakan adalah kultur sel MDBK, media *Advance Minimum Essential Media* (MEM), suplemen *Foetal Bovine Serum* (FBS) bebas BVDV, antibiotika (Penstrep dan Gentamycin), antifungi (Amphotericin B) dan Hepes Buffer, reagen immunositokimia *StarTrek HRP Detection System*®, antibodi monoklonal anti BHV-1, antibodi monoklonal anti BVDV E2 (gp53), enzim trypsin, dan larutan *Phosphat Buffer*

Salin (PBS) serta aceton. Peralatan yang digunakan adalah *flask*, *scraper*, *slide flask*, gelas objek, inkubator CO₂, sentrifus dan mikroskop *inverted*.

Metoda

Inokulasi Virus pada Sel MDBK

Kultur sel MDBK disiapkan pada *flask* 25 cm², *slide flask*, dan *microplate* 96 wells dengan konsentrasi 150.000 *cell/ml* sehingga setelah inkubasi 24 jam akan tumbuh selapis (*monolayer*). Sampel virus yang sudah diencerkan dari konsentrasi 10⁻¹ sampai dengan 10⁻⁸ menggunakan media *Advance MEM* diinokulasikan ke sel MDBK *monolayer*. Sel diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C kemudian ditambahkan media kultur sel dan diinkubasi dalam incubator CO₂, 37°C selama 48-72 jam. Sel diamati setiap hari terhadap perubahan morfologi sel.

Scrapping dan Trypsinizing Sel MDBK

Perlakuan sel sebelum difiksasi pada gelas objek yang telah diberi poly L-lysin adalah dengan melakukan *scrapping* dan *trypsinizing*. Teknik *scrapping* menggunakan *scraper* untuk mengambil sel pada *flask* dan ditempatkan pada gelas objek. Teknik *trypsinizing* menggunakan enzim trypsin untuk melepaskan sel menjadi berbentuk tunggal. Sel yang telah diberi perlakuan enzim trypsin lalu diteteskan pada gelas objek dan dibiarkan hingga kering. Pewarnaan streptavidin-biotin immunoperoxidase selanjutnya dilakukan untuk melihat adanya virus pada sel terinfeksi.

Pewarnaan Streptavidin-Biotin Peroksidase

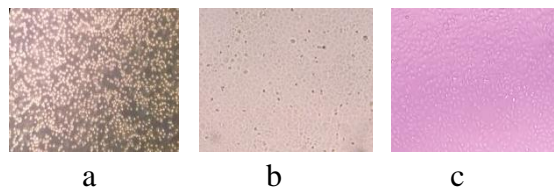
Virus yang telah diinokulasikan pada kultur sel MDBK dilanjutkan uji identifikasi menggunakan metoda imunositokimia dengan kit *StarTrek HRP Detection System*. Sel dicuci dengan larutan PBS kemudian dilanjutkan tahapan fiksasi menggunakan campuran larutan PBS+BSA 0.02% dan Aceton dengan konsentrasi akhir 35%. Tahapan uji imunositokimia sebagai berikut, sel dicuci dengan larutan PBST₂₀ kemudian diberikan cairan *Background sniper* dalam kit. Antibodi monoklonal anti BHV-1 dan antibodi monoklonal anti BVDV E2 (gp53) yang masing-masing diencerkan 1:100 sebagai antibodi primer direaksikan dengan sel yang berisi protein virus kemudian sel diberi *Trekki Universal Link* berisi antibodi sekunder yang

dilabel biotin. Sel selanjutnya diberi *Trek Avidin* yang berisi konjugat *streptavidin-horseradishperoxidase* (HRP) dan substrat hydrogen peroksida serta kromogen *diaminobenzidin* (DAB). Sel dicuci lagi dengan cairan PBST₂₀ dan diberi cairan *Hematoxilin* sebagai *counter stain*. Sel dicuci dengan cairan PBST₂₀ sebanyak 3 kali kemudian dikeringkan dan dibaca di bawah mikroskop. Sel yang terwarnai kecoklatan menunjukkan antigen virus terdapat dalam sel terinfeksi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Metoda isolasi dan identifikasi virus adalah salah satu teknik untuk mendiagnosa penyakit yang disebabkan Virus IBR dan BVD. Teknik isolasi yang dikerjakan dengan performans tinggi memberikan hasil yang dapat diandalkan (OIE, 2015). Kultur sel MDBK yang digunakan sebagai media pertumbuhan virus IBR dan BVD telah diuji terhadap keberadaan virus BVD, karena penggunaan *fetal bovine serum* (FBS) yang terkontaminasi virus BVD dapat menyebabkan kultur sel positif virus BVD (Nam *et al.*, 2015). Pemeriksaan suplemen FBS komersial terhadap virus BVD sangat penting dilakukan untuk menghindari adanya kontaminasi terhadap kultur sel (Zhang *et al.*, 2014). Sejumlah FBS dan *horse serum* komersial telah diperiksa terhadap virus BVD, selanjutnya FBS yang negative virus BVD digunakan sebagai suplemen media kultur sel.

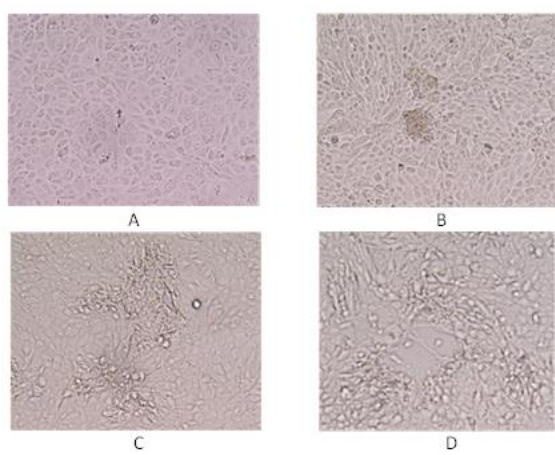
Metoda isolasi virus IBR dan BVD dilakukan pada sel MDBK yang sudah ditumbuhkan sebelumnya di *microplate* 96 well, *slide flask* dan *flask* 25cm² dengan konsentrasi yang telah disesuaikan. Bentuk sel MDBK non infeksi baik pada *flask* maupun *microplate* 96 well tampak pada Gambar 1. Sel MDBK *monolayer* kemudian diinokulasi virus IBR dan diinkubasi dalam inkubator CO₂ dengan suhu 37°C selama 48-72 jam.



Gambar 1. Sel MDBK dalam tahap awal pertumbuhan (a); Sel MDBK konfluen pada *flask* 25cm² (b); Sel

MDBK *monolayer* pada *microplate*
96 well (c) (Perbesaran 10x20)

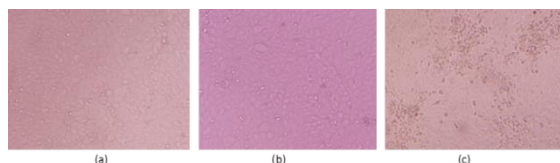
Pengamatan sel dilakukan setiap hari untuk mengetahui adanya perubahan *cytopathic* (CPE) yang mulai terlihat ketika 24 jam post infeksi hingga 72 jam seperti pada Gambar 2. Bentukan CPE yang diakibatkan oleh infeksi virus IBR meliputi sel yang membulat dan mengapung (*floating rounded cells*), *giant cells* dan sel monolayer lisis, dengan ciri khas berbentuk seperti anggur (*grapelike*) yang terinduksi mulai 48 jam post infeksi sehingga sel kehilangan viabilitas dan memiliki titer virus tinggi (Cardoso *et al.*, 2015). Virus IBR strain Colorado sebagai acuan standard yang digunakan pengujian diagnostik rutin terhadap sampel-sampel yang berhubungan dengan penyakit IBR.



Gambar 2. Sel MDBK yang diinfeksi virus IBR, 1 jam p.i (a); Bentukan CPE pada sel MDBK 24 jam p.i (b); Bentukan CPE pada sel MDBK 48 jam p.i (c); Bentukan CPE pada sel MDBK 72 jam p.i (d).
p.i = post infeksi (perbesaran 10x20)

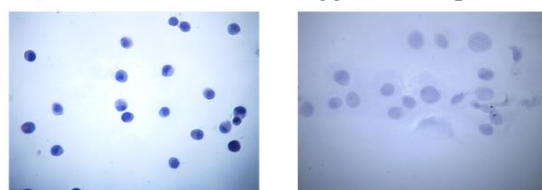
Isolasi virus cpBVD dan ncpBVD dilakukan seperti pada isolasi virus IBR. Adanya perubahan *cytopathic* terlihat pada sel MDBK yang terinfeksi virus cpBVD (72 jam p.i) sedangkan bentuk sel MDBK yang diakibatkan oleh infeksi virus ncpBVD tidak menunjukkan perubahan seperti pada Gambar 3(b). Bentuk kedua ini menjadi sangat penting dan memerlukan perhatian lebih dalam identifikasi virus ncpBVD. Sel mengalami

infeksi virus namun tidak menunjukkan adanya perubahan sel sehingga memerlukan uji identifikasi *Immunocytochemistry* (ICC).

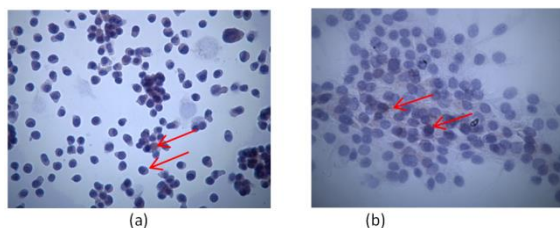


Gambar 3. Sel MDBK non infeksi umur 72 jam (a), Sel MDBK diinfeksi virus ncpBVD, 72 jam p.i (b), sel MDBK diinfeksi virus cpBVD, 72 jam p.i (c). (p.i : *post infection*; (perbesaran 10x20).

Sel MDBK yang sudah diinfeksi dan diinkubasi hingga 48-72 jam, kemudian difiksasi untuk dilakukan pewarnaan sebagai tahapan identifikasi virus. Identifikasi virus dengan metoda pewarnaan dapat dilakukan pada gelas objek, *slide flask*, dan *microplate*. Optimalisasi pada gelas objek dilakukan dengan teknik *scrapping* dan *trypsinized* sel MDBK non infeksi sebagai kontrol sel tampak pada Gambar 4 sedangkan sel yang diinfeksi virus pada Gambar 5. Penggunaan kromogen DAB pada pewarnaan Streptavidin-Biotin Immunoperoksidase menunjukkan berwarna kecoklatan pada sel yang diinfeksi virus baik dengan metoda *trypsinized* maupun *scrapping*. Sel terlihat utuh dan saling bertautan pada metoda *scrapping* sedangkan pada metoda *trypsinized*, sel terlihat tunggal dan terpisah.



Gambar 4. Pewarnaan Streptavidin-Biotin Immunoperoksidase Sel MDBK non infeksi pada gelas objek dengan metoda *trypsinized* (a); metoda *scrapping* (b) (Perbesaran 20x40)



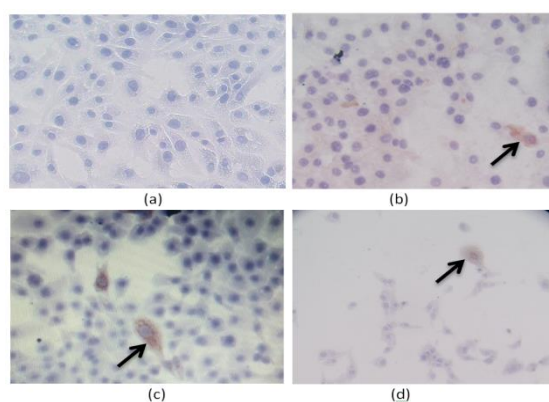
Gambar 5. Pewarnaan Streptavidin-Biotin Immunoperoxidase Sel MDBK terinfeksi pada gelas objek dengan metoda *trypsinized* (a); metoda *scrapping* (b). Tanda panah merah menunjukkan partikel virus dalam sel yang terwarna kecoklatan. (Perbesaran 20x40)

Sebagian besar sel *primary* dan *cell line* mempunyai sifat *plastic adherent* termasuk sel MDBK. Pewarnaan Streptavidin-Biotin sel MDBK pada gelas objek dilakukan dengan memindahkan sel dari flask ke gelas objek terlebih dahulu. Teknik pemindahan sel dilakukan dengan dua cara, yaitu *scrapping* (mekanik) dan *trypsinized* (biologik). Teknik *scrapping* adalah melepaskan sel dari permukaan tempat kultur secara mekanik menggunakan *scraper*, biasanya untuk sel yang sensitif terhadap protease dan sel yang mudah rusak dengan enzim. Teknik ini mempunyai kelemahan saat mengerok dan meletakkan lapisan sel agar tidak terlipat sebab bentuk sel yang terlipat dapat mengganggu pembacaan hasil.

Sel Teknik *trypsinized* digunakan untuk melepaskan dan memisahkan antar sel yang sudah konfluen sehingga dapat dikultur kembali. Enzim trypsin mempunyai aktivitas proteolitik yang jika reaksinya berlebihan mengakibatkan kerusakan protein permukaan sel sehingga fungsi sel terganggu (Huang *et al.*, 2010). Aktivitas enzim trypsin dapat dihentikan dengan menambahkan serum atau dengan konsentrasi trypsin yang rendah sehingga menghasilkan penyebaran yang lebih cepat, jumlah integrin yang lebih tinggi, dan pembentukan adhesi fokal yang cepat (Brown *et al.*, 2007). Sel tampak berbentuk tunggal dan terpisah satu dengan yang lain sehingga tidak menunjukkan keadaan sel post infeksi yang konkrit.

Pewarnaan selanjutnya dilakukan pada *slide flask* dan *microplate* (plastic), sel dibiarkan tetap berada di permukaan dasar *flask/microplate*. Tahapan pewarnaan sama seperti yang dilakukan pada gelas objek, yaitu dengan teknik Streptavidin-Biotin Immunoperoxidase. Antibodi monoklonal anti BHV-1 (1:100) digunakan untuk mengenal secara spesifik terhadap virus IBR sedangkan anti BVDV E2/gp53 (1:100) untuk virus BVD. Prinsip uji adalah mereaksikan antigen yang

terlokalisir pada sel menggunakan antibodi monoklonal spesifik sebagai antibodi primer dan direaksikan dengan antibodi sekunder yang dilabel biotin kemudian dilanjutkan dengan pemberian *conjugat streptavidin-HRP* dan substrat hydrogen peroksida serta kromogen DAB yang tersedia dalam kit komersial. Hasil pembacaan pada *slide flask* dan *microplate* mampu menunjukkan keadaan sel yang konkrit dan lebih mudah serta efektif dibandingkan pada gelas objek. Gambaran sel setelah dilakukan pewarnaan baik pada sel MDBK noninfeksi, terinfeksi virus IBR ataupun virus BVD, seperti tampak pada Gambar 6.



Gambar 6. Pewarnaan Streptavidin-Biotin Immunoperoxidase dengan kromogen DAB pada Sel MDBK, non infeksi sebagai control sel (a); infeksi virus IBR strain Colorado (b); infeksi virus ncpBVD (c);infeksi virus cpBVD (d). Tanda panah hitam menunjukkan adanya partikel virus dalam sel yang terwarna kecoklatan. (Perbesaran 10X20)

Sel MDBK yang terinfeksi virus BVD berwarna kecoklatan dan tampak merata di dalam sitoplasma sel. Hal ini menunjukkan adanya replikasi virus BVD pada intrasitoplasma sel (Fulton *et al.*, 2009). Bentuk sel yang terinfeksi ncpBVD tidak mengalami perubahan sehingga diperlukan uji konfirmasi apakah sel terinfeksi virus atau tidak. Sel tampak mengalami perubahan bentuk menjadi *giant cell* akibat infeksi cpBVD dan banyak yang mengalami lisis seperti pada Gambar 6(c). Penentuan biotipe ini sangat penting terkait dengan gejala klinis, pathogenesis, diagnosa dan pengendalian penyakit (Ammari *et al.*, 2010). Antibodi monoklonal anti-BVDV E2 (gp53) merupakan

antibody spesifik yang mengenal satu epitope antigenic utama virus BVD yaitu terhadap glikoprotein E2 (gp53) (Neill *et al.*, 2013; Abe *et al.*, 2016) yang dimiliki oleh virus BVD-1 dan BVD-2.

Infeksi virus IBR pada sel MDBK menunjukkan adanya perubahan cytopathic sel membulat, mengapung, dan mengalami lisis. Partikel virus IBR tampak berada di dalam nucleus sel, intranuklear dan dilepaskan melalui sitoplasma hingga keluar sel. Pada pewarnaan Streptavidin-Biotin Immunoperoksidase menggunakan antibodi monoklonal anti BHV-1 yang mengenal spesifik terhadap BHV-1/IBR sebagai protein viral. Ikatan antigen-antibodi primer terhadap BHV-1 dan BVDV E2 tersebut selanjutnya berikatan dengan antibodi sekunder yang sudah dilabel Biotin dan kemudian berikatan dengan *conjugat streptavidin-HRP* yang mempunyai subunit, sehingga 4 molekul biotin terikat dengan kuat. Penambahan substrat hydrogen peroksida mengubah kromogen DAB menjadi endapan berwarna kecoklatan menunjukkan adanya ikatan kompleks antigen dan antibodi tersebut. Teknik ini juga sering digunakan pada metoda ELISA untuk meningkatkan deteksi berbagai jenis target.

KESIMPULAN DAN SARAN

Virus IBR strain Colorado, virus cpBVD dan ncpBVD sebagai kontrol positif telah berhasil dipropagasi menggunakan *cell line* MDBK. Metoda identifikasi dengan pewarnaan streptavidin-biotin immunoperoksidase menggunakan mAb anti BHV-1 dapat diterapkan untuk deteksi virus IBR dan mAb anti BVDV E2/gp53 untuk deteksi virus cpBVD maupun ncpBVD. Uji pewarnaan ini dapat digunakan untuk mengidentifikasi virus IBR dan BVD melalui isolasi virus pada sel MDBK. Hasil pewarnaan pada *slide flask* dan *microplate 96 well* menunjukkan gambaran sel yang lebih jelas, efektif dan konkrit. Kajian ini perlu dilanjutkan dengan validasi metoda pengujian melalui beberapa parameter sehingga dapat diterapkan untuk sampel lapangan.

DAFTAR PUSTAKA

Abe, Y., Tamura, T., Torii, S., Wakamori, S., Nagai, M., Mitsuhashi, K., Mine, J., Fujimoto, and Y. Sakoda, Y. (2016). Genetic and antigenic characterization

of bovine viral diarrhea viruses isolated from cattle in Hokkaido, Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 78(1), 61–70

Ammari, M., McCarthy, F. M., Nanduri, B., and Pinchuk, L. M. (2010). Analysis of Bovine Viral Diarrhea Viruses-infected monocytes: identification of cytopathic and non-cytopathic biotype differences. *BMC Bioinformatics*, 11 Suppl 6(Suppl 6), S9-2105-11-S6–S9

Anonim, 2010, *Infectious Bovine Rhinotracheitis/Infectious Pustular Vulvovaginitis*, Chapter 2.04.13, OIE Terrestrial Manual, Pp. 1-17

Anonim, 2015, *Bovine Viral Diarrhoea*, Chapter 2.4.8, OIE Terrestrial Manual, P.1-22

Becher, P., Ramirez, R. A., Orlich, M., Rosales, S. C., König, M., Schweizer, M., Stalder, H., Schirrmeyer, H., and Thiel, H.J. (2003). Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: Implications for classification. *Virology*, 311(1), 96–104

Bolin, S. R. (2002). Bovine Viral Diarrhea Virus in Mixed Infection. In K. A. Brogden & J. M. Guthmiller (Eds.), *Polymicrobial Diseases*. Washington (DC): NCBI Cardoso, T.C., Ferreira, H.L., Okamura, L.H., Oliveira, B.R.S.M., Rosa, A.C.G., Gameiro, R., Flores, E.F., 2015, *Comparative analysis of the replication of bovine herpesvirus 1 (BHV1) and BHV5 in bovine-derived neuron-like cells*, Arch Virol 160:2683-2691

Brown, M.A., Wallace, C.S., Anamelechi, C.C., Clermont, E., Reichert, W.M., Truskey, G.A., 2007, The use of mild trypsinization conditions in detachment of endothelial cells to promote subsequent endothelialization of synthetic surfaces. *Biomaterial* 28:3928-3935

Cornish, T.E., van Olphen, A.L., Cavender, J.L., Edwards, J.M., Jaeger, P.T., Vieyra, L.L., Woodard, L.E., Miller, D.R., O’Toole, D., 2005. Comparison of ear notch immunohistochemistry, ear notch antigen-capture ELISA, and buffy coat virus isolation for detection of calves persistently infected with bovine viral diarrhea virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17, 110–117

- Deregt D. Chapter : Introduction and History in BVDV: Diagnosis, Management, and Control, Edited by Sagar M. Goyal and Julia F. Ridpath 2005, Blackwell Publishing. Pp. 3-34
- Edwards, S., White, H., Nixon, P., 1990. A study of predominant genotype of bovine herpesvirus-1 found in the UK. *Vet. Microbiol.* 22(2-3), 213-223
- Fulton, R. W., Whitley, E. M., Johnson, B. J., Ridpath, J. F., Kapil, S., Burge, L. J., Cook, B.J., and Confer, A. W. (2009). Prevalence of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in persistently infected cattle and BVDV subtypes in affected cattle in beef herds in south central United States. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 73(4), 283–291
- Gripshover, E. M., Givens, M. D., Ridpath, J. F., Brock, K. V., Whitley, E. M., and Sartin, E. A. (2007). Variation in Erns viral glycoprotein associated with failure of immunohistochemistry and commercial antigen capture ELISA to detect a field strain of bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary Microbiology*, 125(1–2), 11–21
- Huang, H., Hsing, H., Lai, T., Chen, Y., Lee, T., Chan, H., Lyu, P., Wu., C., Lu, Y., Lin, S., Lin, C., Lai, C., Chang, H., Chou, H., Chan, H. 2010. Trypsin-induced proteome alteration during cell subculture in mammalian cells. *Journal of Biomedical Science*. 17:36
- Houe H, Baker JC, Maes RK, Wuryastuti H, Wasito R, Ruegg PL, Lloyd JW. Prevalence of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus in 20 dairy herds in two counties in central Michigan and comparison of prevalence of antibody-positive cattle among herds with different infection and vaccination status. *J Vet Diagn Invest* 7:321-326 (1995)
- Irianingsih SH, Waluyati DE, Mulyawan, H., Rasa, F.S.T., 2014a. Kajian Pendahuluan Infeksi Persisten *Bovine Viral Diarrhoea* (IP-BVD) Pada Sapi Perah. Prosiding RATEKPIL 2014.
- Irianingsih, S.H., 2014b. Laporan Kegiatan Montoring Penyakit Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR) dan Bovine Viral Diarrhoea (BVD) pada Sapi sebagai Pendukung Keberhasilan Program SwaSembada Daging Sapi dan Kerbau. BBVet Wates Yogyakarta.
- Nam, B., Zheng, Y., Zhang, J., Shuck, K.M., Timoney, P.J, and Balasuriya, U.B.R. (2015). Complete Genome Sequence of Noncytopathic Bovine Viral Diarrhoea Virus 1 Contaminating a High-Passage RK-13 Cell Line. *Genome Announcements* 3(5):e01115-15
- Neill, J.D. (2013). Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus. *Biologicals*, 41(1), 2–7 Saepulloh M and Sendow I. Identification and Characterization of Bovine Viral Diarrhoea Virus from Indonesian Cattle. *Jurnal Veteriner* Maret 2015 Vol. 16 No. 1 : 1-7.
- Sudarisman. 1992. Studi Epidemiologi dan Isolasi Agen Penyakit *Infectious Bovine Rhinotracheitis* pada Sapi Perah di Indonesia. Laporan Hasil penelitian 1992 –1993. Balai Penelitian Veteriner, Bogor.
- Sudarisman. Bovine Viral Diarrhoea Pada Sapi Di Indonesia Dan Permasalahannya. *Wartazoa* Vol. 21 No. 1 Th. 2011
- Wiyono, A., Ronohardjo, P., Graydon, R., dan Daniels, P. (1989). Diare ganas sapi: Kejadian penyakit pada sapi bali bibit asal sulawesi. *Penyakit Hewan*, XXI(No. 38, Semester II), 77–83.
- Zhang, S., Tan, B., Ding, Y., Wang, F., Guo, L., Wen, Y., Cheng, S., and Wu, H. (2014). Complete genome sequence and pathogenesis of bovine viral diarrhoea virus JL-1 isolate from cattle in China. *Virology Journal*, 11(1), 67

INVESTIGASI KEMATIAN AYAM DI KABUPATEN BREBES TAHUN 2018

Endang Ruhiat^{1*}, Dwi Hari Susanta², Ira Pramastuti², M. Afdal Darul², Sri Wahyuningsih², Suprihatin²
^{1*2}Balai Besar Veteriner Wates

^{1*}Korespondensi penulis: endru284@gmail.com

ABSTRAK

Program pemerintah melalui kegiatan Bekerja (Bedah Kemiskinan Rakyat Sejahtera) yang dilakukan oleh Balai Besar Ternak Unggul dan Hijauan Pakan Ternak (BBPTHPT) Baturraden dengan memberikan paket bantuan ayam jawa super, pakan dan obat-obatan di Kabupaten Brebes telah selesai dilaksanakan pada bulan Desember 2018. Tujuan dari studi ini yaitu untuk mengetahui penyebab penyakit pada ayam jawa super, mengetahui proporsi kematian ayam program Bekerja, mengetahui gambaran cara pemeliharaan ayam oleh RTM Bekerja, dan mengetahui faktor risiko yang menyebabkan terjadinya kasus penyakit ayam pada RTM yang disurvei.

Investigasi dilakukan di Kabupaten Brebes (Kecamatan Ketanggungan dan Bulukamba) pada Bulan Desember 2019. Desain studi menggunakan metode kasus kontrol, dengan 12 RTM kasus dan 28 RTM kontrol. Jenis sampel yang diambil berupa swab oropharingeal dan swab lingkungan. Analisis yang digunakan secara deskriptif dan analisis kuantitatif (Epi Info). Hasil pengujian laboratorium terhadap sampel swab oropharingeal menunjukkan positif *Mycoplasma sp* 91,6% (11/12). Sedangkan hasil uji isolasi, identifikasi dan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) *Avian influenza* (AI) dan *New Castle Disease* (ND) menunjukkan hasil negatif. Hasil analisis kuantitatif RTM yang memelihara ayam kadang diluar kandang memiliki *odds ratio* yang lebih tinggi dan signifikan terhadap terjadinya kasus penyakit dibandingkan RTM yang ayamnya dipelihara selalu didalam kandang OR=16 [95%CI=1,03-246,61, p< 0.05].

Pengetahuan RTM tentang manajemen pemeliharaan dan kesehatan ayam merupakan salah satu kunci keberhasilan dalam upaya menekan terjadinya kasus penyakit dan kematian ayam, untuk mencapai hal ini diperlukan penyuluhan atau bimbingan teknis terhadap semua RTM sehingga diharapkan program bantuan ayam Bekerja bisa memberikan manfaat bagi masyarakat.

Kata kunci : RTM, Bekerja, PCR, Mycoplasma, AI, ND

PENDAHULUAN

Balai Besar Ternak Unggul dan Hijauan Pakan Ternak (BBPTHPT) Baturraden selaku penanggungjawab program Bedah Kemiskinan Rakyat Sejahtera (Bekerja) di Kabupaten Brebes, telah mendistribusikan bantuan ayam Jawa Super (buras) umur 4 minggu sebanyak 1.423.000 ekor kepada 28.460 Rumah Tangga Miskin (RTM), dengan rincian 50 ekor ayam per RTM di 4 Kecamatan dengan sebaran di 73 desa (BBTUHPT Baturraden, 2018). Salah satu tujuan dari program ini yaitu untuk meningkatkan penyediaan protein hewani dan diharapkan dapat memberikan tambahan penghasilan bagi RTM. Distribusi ayam kepada RTM telah selesai pada bulan Desember 2018.

Berdasarkan surat dari BBTUHPT Baturraden tertanggal 3 Desember 2018 dengan maksud permohonan monitoring terhadap

penyakit yang mungkin timbul pada ayam hasil bantuan pemerintah pada program Bekerja. Merespon hal tersebut Balai Besar Veteriner (BBVet) Wates selaku Unit Pelaksana Teknis (UPT) yang salah satu tupoksinya menangani kesehatan hewan melakukan kunjungan lapangan di Kabupaten Brebes (Kecamatan Ketanggungan dan Bulakamba) pada tanggal 11-12 Desember 2018 untuk mengetahui penyakit yang mungkin timbul dan penyebab kematian ayam Jawa Super dari program bantuan Bekerja..

Tujuan

Kegiatan monitoring ayam dari bantuan program Bekerja ini bertujuan untuk: a) mengetahui penyebab penyakit pada ayam jawa super, b) mengetahui proporsi kematian ayam, c) mengetahui gambaran cara pemeliharaan ayam oleh RTM dan mengetahui faktor resiko yang menyebabkan terjadinya kasus penyakit ayam pada RTM yang disurvei.

MATERI DAN METODE

Lokasi

Investigasi dilakukan di RTM yang memperoleh bantuan ayam dari program Bekerja di Kabupaten Brebes tepatnya di Kecamatan Ketanggungan dan Kecamatan Bulakumba selama dua hari tanggal 11 dan 12 Desember 2018.

Desain Studi

Desain studi menggunakan studi kasus-kontrol dimana RTM yang disurvei dikelompokkan menjadi dua group yaitu 12 RTM kasus dan 28 RTM kontrol.

Wawancara dan Pengambilan Sampel

Wawancara dilakukan dengan menggunakan kuisioner terhadap RTM kasus dan RTM kontrol. Pada RTM kasus dilakukan pengambilan sampel swab oropharingeal sebanyak 59 sampel, swab lingkungan 59 sampel dan serum 57 sampel. Sedangkan pada RTM kontrol tidak dilakukan pengambilan sampel hal ini dikarenakan untuk menghindari penularan penyakit yang bisa ditimbulkan oleh petugas investigasi.

Pengujian

Pengujian yang dilakukan yaitu kultur bakteri *Mycoplasma sp*, isolasi dan identifikasi Avian Influenza (AI) dan New Castle Disease (ND) Polymerase Chain Reaction (PCR) AI dan ND.

Analisis

Analisis deskriptif digunakan untuk menggambarkan latar belakang RTM yang disurvei yang meliputi aspek umur dan pengetahuan (pengalaman dalam memelihara ayam, pengetahuan tentang cara memelihara ayam dan aspek bimbingan teknis), aspek pemeliharaan ayam (pemelihara ayam, metode pemeliharaan dan lampu penerangan) dan aspek biosekuriti (akses keluar masuk kandang, tempat yang dikunjungi satu minggu sebelum kasus dan frekuensi desinfeksi kandang). Analisis kuantitatif dilakukan dengan menggunakan analisa regresi logistik (Epi Info) untuk mengetahui apakah faktor-faktor risiko berhubungan dengan ditemukannya kasus.

Definisi kasus

Definisi kasus positif yang ditetapkan yaitu kematian ayam pada RTM kasus yang ditandai dengan gejala klinis : batuk, pilek/leleran berlendir dari sinus atau paruh, susah bernafas, muka bengkak dan terdengarnya suara ketika bernafas/ngorok serta hasil uji menunjukkan positif *Mycoplasma sp*. Sedangkan unit epidemiologinya yaitu RTM.

Hipotesis dari outbreak ini yaitu kematian ayam jawa super usia 4 minggu diduga diakibatkan oleh penyakit dengan salah satu tanda klinis sebagai berikut: batuk, pilek/leleran berlendir dari sinus atau paruh, susah bernafas, muka bengkak dan terdengarnya suara ketika bernafas/ngorok.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kronologis dan Tanda Klinis Penyakit

Kematian ayam pada RTM kasus dimulai setelah satu minggu ayam dipelihara, jumlah kematian secara beruntun rata-rata 1 hari 2 ekor, gejala klinis yang muncul yaitu batuk, pilek/leleran berlendir dari sinus atau paruh, susah bernafas, muka bengkak dan terdengarnya suara ketika bernafas. Hasil pengujian isolasi dan identifikasi serta PCR New Castle Disease (ND) dan Avian Influenza (AI) hasilnya negatif sedangkan hasil kultur bakteri *Mycoplasma sp* disajikan pada (Tabel 1 dan 2).

Tabel 1. Hasil uji Kultur bakteri *Mycoplasma sp* dari Kecamatan Ketanggungan

| No | Kode sampel | Hasil |
|----|--------------------|---------|
| 1 | BKD SO Broth I.1 | Positif |
| 2 | BKD SO Broth I.2 | Positif |
| 3 | BKD SO Broth I.3 | Positif |
| 4 | BKD SO Broth II.1 | Positif |
| 5 | BKD SO Broth II.2 | Positif |
| 6 | BKD SO Broth II.3 | Positif |
| 7 | BKD SO Broth III.1 | Positif |
| 8 | BKD SO Broth III.2 | Positif |
| 9 | BKD SO Broth III.3 | Positif |
| 10 | BKD SO Broth IV.1 | Positif |
| 11 | BKD SO Broth IV.2 | Positif |
| 12 | BKD SO Broth IV.3 | Positif |
| 13 | BKD SO Broth V.1 | Positif |
| 14 | BKD SO Broth V.2 | Positif |
| 15 | BKD SO Broth V.3 | Positif |
| 16 | BKD SO Broth VI.1 | Positif |
| 17 | BKD SO Broth VI.2 | Positif |
| 18 | BKD SO Broth VI.3 | Positif |

Tabel 2. Hasil uji Kultur bakteri Mycoplasma sp dari Kecamatan Bulakamba

| No | Kode sampel | Kultur Mycoplasma |
|----|-------------------|-------------------|
| 1 | BRB SO Broth 15.1 | Negatif |
| 2 | BRB SO Broth 15.2 | Negatif |
| 3 | BRB SO Broth 15.3 | Negatif |
| 4 | BRB SO Broth 16.1 | Positif |
| 5 | BRB SO Broth 16.2 | Positif |
| 6 | BRB SO Broth 16.3 | Positif |
| 7 | BRB SO Broth 17.1 | Positif |
| 8 | BRB SO Broth 17.2 | Positif |
| 9 | BRB SO Broth 17.3 | Positif |
| 10 | BRB SO Broth 18.1 | Positif |
| 11 | BRB SO Broth 18.2 | Positif |
| 12 | BRB SO Broth 18.3 | Positif |
| 13 | BRB SO Broth 19.1 | Positif |
| 14 | BRB SO Broth 19.2 | Positif |
| 15 | BRB SO Broth 19.3 | Positif |
| 16 | BRB SO Broth 20.1 | Positif |
| 17 | BRB SO Broth 20.2 | Positif |
| 18 | BRB SO Broth 20.3 | Positif |

Jumlah RTM yang disurvei dalam kegiatan monitoring ini yaitu 40 RTM (20 RTM di Kecamatan Ketanggungan dan 20 RTM di Kecamatan Bulakamba). Jumlah kontrol sebanyak 28 RTM dan jumlah kasus sebanyak 12 RTM (Tabel 3.)

Tabel 3. Jumlah RTM yang di survey

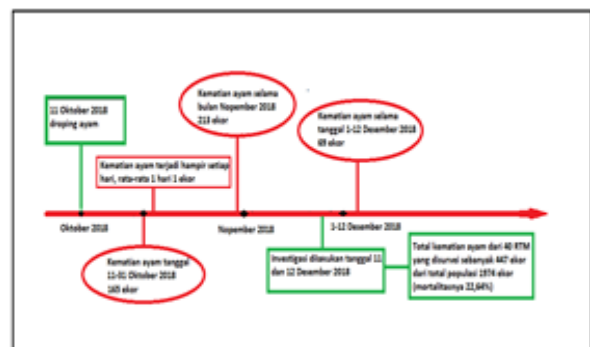
| Lokasi survei | RTM Kasus | RTM Kontrol |
|---------------|-----------|-------------|
| Ketanggungan | 6 | 14 |
| Bulukamba | 6 | 14 |
| Jumlah | 12 | 28 |

Dari jumlah 40 RTM yang disurvei yang terdiri dari dua kecamatan yaitu Kecamatan Ketanggungan (Desa Padakaton, Ciduwet dan Dukuhturi) dan Bulakamba (Desa Siwuluh, Grinting dan Rancawuluh) telah terjadi kematian pada RTM kontrol maupun RTM kasus (Tabel 4.)

Tabel 4. Jumlah ayam mati di RTM studi pada minggu ke 2 Desember 2018 di Kabupaten Brebes

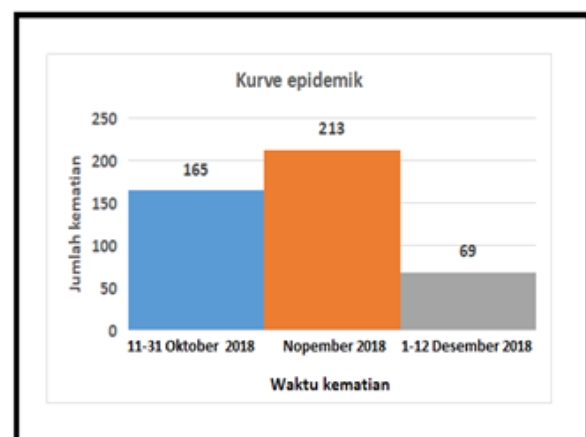
| Lokasi Survei | Jumlah | | | % Ayam Mati |
|---------------|-----------|---------------|------------|--------------|
| | RTM | Ayam diterima | Ayam Mati | |
| *Ketanggungan | | | | |
| Padakaton | 7 | 350 | 28 | 8 |
| Ciduwet | 7 | 350 | 51 | 14,57 |
| Dukuhturi | 4 | 200 | 141 | 70,5 |
| Kubangwungu | 2 | 100 | 23 | 23 |
| *Bulakamba | | | | |
| Siwuluh | 14 | 674 | 56 | 8,3 |
| Grinting | 1 | 50 | 5 | 10 |
| Rancawuluh | 5 | 250 | 143 | 57,2 |
| Jumlah | 40 | 1974 | 447 | 22,64 |

Kematian ayam terjadi sekitar satu minggu setelah ayam datang, dan terjadi hampir setiap hari, mortalitas ayam pada RTM yang disurvei dari bulan Oktober sampai dengan 12 Desember 2018 sebesar 22,26% (Gambar 1).



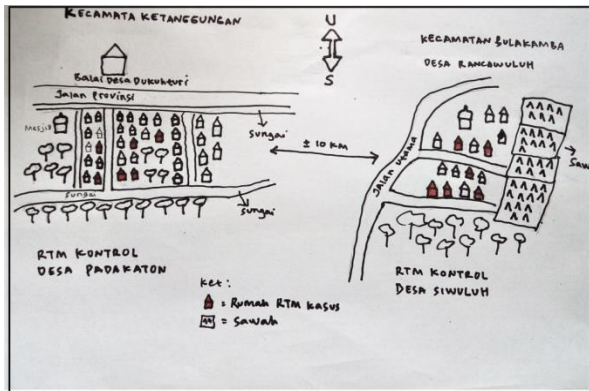
Gambar 1. Kerangka waktu kematian ayam di Kabupaten Brebes

Kematian ayam terjadi selama periode 11 Oktober 2018 sampai minggu kedua Desember 2018 (ketika investigasi dilakukan 11-12 Desember 2018) dengan jumlah kematian 447 ekor (Gambar 2).



Gambar 2. Kurve epidemik

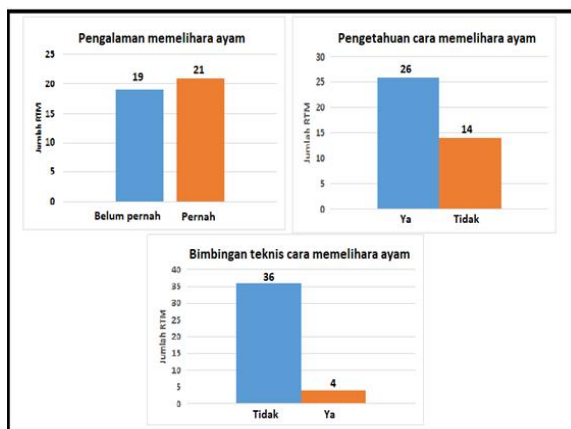
Kandang ayam di RTM kasus maupun RTM kontrol pada umumnya berada di samping atau di belakang rumah (Gambar 3).



Gambar 3. Peta partisipatif area kasus kematian ayam

Pengalaman dan pengetahuan RTM

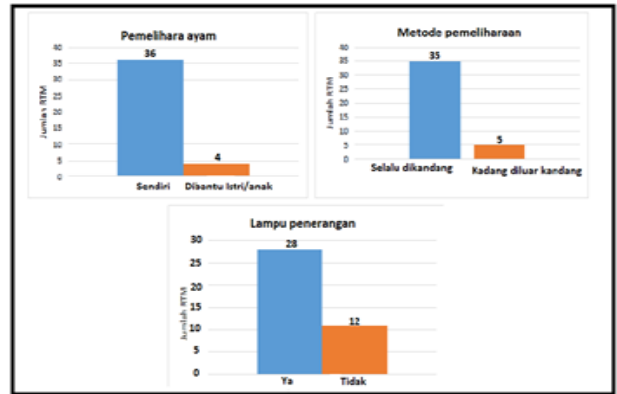
Latar belakang pengalaman dalam memelihara ayam, pengetahuan tentang cara memelihara ayam dan bimbingan teknis yang diperoleh RTM disajikan pada (Gambar 4).



Gambar 4. Grafik pengalaman cara memelihara ayam, pengetahuan cara memelihara, dan bimtek cara memelihara ayam

Pemeliharaan ayam

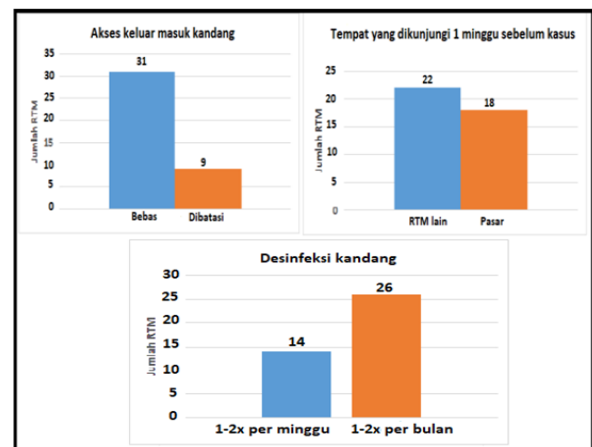
Hal yang diobservasi dari aspek pemeliharaan ayam berupa yang bertanggungjawab memelihara ayam, metode pemeliharaan dan penggunaan lampu ketika malam hari (Gambar 5).



Gambar 5. Grafik pemelihara ayam, metode pemeliharaan dan penggunaan lampu penerangan

Biosekuriti

Faktor risiko biosekuriti yang dikaji berupa akses keluar masuk kandang, tempat yang dikunjungi satu minggu sebelum kasus dan frekuensi desinfeksi kandang (Gambar 6).



Gambar 6. Grafik aspek biosekuriti meliputi orang yang sering keluar masuk kandang, tempat yang dikunjungi 1 minggu sebelum kasus dan frekuensi desinfeksi kandang.

Analisa kuantitatif dilakukan untuk mengetahui hubungan antara pengalaman beternak RTM terhadap outcome kasus penyakit. Hasil analisa regresi logistik (1 faktor resiko terhadap 1 outcome) (Tabel 5).

Tabel 5. Analisis regresi logistic pengetahuan peternak, metode pemeliharaan dan biosekurity

| Aspek pengetahuan, pemeliharaan dan biosekurity | Regresi logistik OR 95% (CI) | P |
|---|---------------------------------|-------------|
| Pengalaman beternak | 1,19 (0,23-6,11) | 0,83 |
| belum pernah | | |
| pernah | | |
| Mengetahui cara pemeliharaan | 1,75 (0,34-8,90) | 0,49 |
| tidak | | |
| iya | | |
| Bimtek pemeliharaan | 0,27 (0,2-2,71) | 0,26 |
| tidak | | |
| iya | | |
| Pemelihara | 0,37 (0,01-8,35) | 0,53 |
| dibantu istri/anak | | |
| RTM sendiri | | |
| Metode pemeliharaan: | 16 (1,03-246,61) | 0,04 |
| kadang diluar kandang | | |
| selalu dikandang | | |
| Penggunaan lampu penerangan: | 0,91 (0,13-5,98) | 0,92 |
| tidak | | |
| iya | | |
| Akses keluar-masuk kandang : | 0,66 (0,10-4,10) | 0,66 |
| bebas | | |
| dibatasi | | |
| Yang dikunjungi 1 minggu sebelum kasus : | 3,21 (0,68-15,21) | 0,14 |
| RTM lain | | |
| pasar | | |
| Desinfeksi kandang : | 0,83 (0,18-3,72) | 0,81 |
| 1-2x per bulan | | |
| 1-2x per minggu | | |

Berdasarkan hasil uji kultur bakteri *Mycoplasma* terhadap sampel swab oropharing ayam dari 6 RTM kasus menunjukkan 91,6% (11/12) menunjukkan hasil positif *Mycoplasma sp.* Bakteri ini merupakan salah satu bakteri penyebab penyakit *Chronic Respiratory Disease* (CRD). Pada kondisi tertentu menyebabkan gangguan pernafasan akut terutama pada ayam muda. Kondisi kandang yang terbuka dan berada di pinggir atau belakang rumah tanpa pembatas menjadi salah satu faktor penyebab penyakit CRD, hal ini sesuai dengan (Dijennak, 2012) penyakit ini dipengaruhi oleh faktor lingkungan seperti angin, lingkungan yang panas akibat pergantian musim, kadar amoniak yang tinggi, kondisi kandang dan lingkungan yang berdebu.

Kematian ayam terjadi satu minggu setelah ayam dipelihara gejala klinisnya berupa batuk, pilek/leleran berlendir dari sinus atau paruh, susah bernafas, muka bengkak dan terdengarnya suara ketika bernafas/ngorok. Mortalitas kematian ayam pada ayam yang disurvei di Kecamatan Ketanggungan dan Bulakamba sebesar 22,66%. mortalitas penyakit CRD pada ayam pedaging umumnya rendah,

kecuali bila terjadi komplikasi dapat mencapai 30% (Dijennak, 2012).

Sebagian besar RTM didua kecamatan sebelum mendapatkan bantuan ayam Bekerja belum pernah memelihara ayam atau sebesar 47,5% (19/40). Sekitar 65% (26/40) RTM memiliki pengetahuan cara memelihara ayam yang baik, namun sekitar 90% (36/40) RTM didua kecamatan belum pernah mendapatkan bimbingan teknis tentang cara memelihara ayam (Gambar 4). Dalam upaya keberhasilan program Bekerja, bimbingan teknis cara memelihara ayam merupakan salah satu faktor keberhasilan program ini, sehingga diharapkan ketika program ini berlanjut di tahun berikutnya, sebelum RTM menerima bantuan ayam terlebih dahulu diadakan bimbingan teknis secara menyeluruh kepada penerima bantuan.

Kepala RTM di dua Kecamatan di Kabupaten Brebes (Ketanggungan dan Bulakamba) 90% (36/40) yang bertugas sebagai pemelihara ayam dari bantuan program Bekerja dan hanya 10% (4/40) yang dibantu oleh istri/anak, metode pemeliharaan ayam 87,5% (35/40) selalu dikandangkan dan 12,5% (5/40) kadang diluar kandang dan 70% (28/40) menggunakan lampu penerangan ketika malam hari serta hanya 30% (12/40) tidak menggunakan lampu penerangan (Gambar 5).

Aspek biosekurity 77,5% (31/40) yang keluar masuk kandang tidak dibatasi hal ini dikarenakan lokasi kandang berada disamping atau di belakang rumah dimana rumah tidak memiliki pagar pembatas (umumnya kandang berada disamping gang rumah) sehingga tetangga mudah untuk melewati/keluar masuk kandang. Kondisi ini menjadi salah satu faktor terjadinya penularan penyakit. Kandang dengan tingkat kepadatan yang tinggi, masa istirahat yang pendek dan alas kandang (litter) yang terlalu banyak debu dan kondisi kandang yang lembab ketika musim hujan menjadi faktor pemicu yang signifikan terjadinya infeksi penyakit *Chronic Respiratory Disease* (CRD) atau lebih dikenal dimasyarakat dengan penyakit ngorok (Info Medion, 2014). Tempat yang dikunjungi satu minggu sebelum kasus oleh pemelihara ayam yaitu mengunjungi RTM lainnya sebesar 55% (22/40) dan 45% (18/40) mengunjungi pasar.

Hasil analisis kuantitatif terhadap aspek pengetahuan, pemeliharaan dan biosecurity yang menunjukkan hasil yang signifikan yaitu dari aspek pemeliharaan (aspek yang dianalisis yaitu ayam yang dipelihara kadang dikandangkan dan yang dipelihara selalu dikandangkan). RTM yang memelihara ayam kadang diluar kandang memiliki odds rasio yang lebih tinggi dan signifikan terhadap terjadinya kasus penyakit dibandingkan RTM yang ayamnya dipelihara selalu didalam kandang OR=16 [95%CI=1,03-246,61, p< 0.05].

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil uji laboratorium penyakit yang menyerang ayam pada RTM di Kabupaten Brebes disebabkan oleh bakteri *Mycoplasma sp.* Proporsi kematian ayam Bekerja di Kabupaten Brebes sebesar 22,64% dengan tanda klinis batuk, pilek/leleran berlendir dari sinus atau paruh, susah bernafas, muka bengkak, dan terdengar suara ketika bernafas/ngorok.

RTM Bekerja di Kabupaten Brebes yang mempunyai pengalaman dan pengetahuan cara memelihara ayam jumlahnya lebih banyak dibandingkan RTM yang tidak mempunyai pengalaman dan pengetahuan, namun sebagian besar RTM belum pernah mendapatkan bimbingan teknis cara memelihara ayam. Salah satu biosecurity yang dilakukan yaitu dengan melakukan desinfeksi kandang, dimana sebagian besar RTM melakukan desinfeksi kandang 1-2 kali per minggu. Faktor resiko yang berperan signifikan berdasarkan hasil studi analitik ini yaitu ayam yang dipelihara kadang diluar kandang memiliki resiko lebih tinggi terkena kasus penyakit dibandingkan ayam yang dipelihara selalu dikandangkan.

SARAN

Sebagian besar RTM telah mengetahui cara memelihara ayam yang baik, namun 90% RTM belum pernah mendapatkan bimbingan teknis sehingga diperlukan adanya penyuluhan/bimbingan teknis tentang manajemen pemeliharaan dan manajemen kesehatan ayam sebelum RTM menerima bantuan ayam, sehingga diharapkan bisa menekan terjadinya kasus penyakit dan kematian ayam.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 2014. Mengatasi Ngorok yang Tidak Kunjung Sembuh. [Internet]. <http://info.medion.co.id/component/content/article.html?id=1223:mengatasi-ngorok-yang-tidak-kunjung-sembuh>. 2014. Written On 18 March 2014. Posted in Artikel Broiler Penyakit
- Ditjen PKH 2014. Manual penyakit unggas. Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan. Dirkeswan, Kementerian Pertanian.
- Ditjen PKH. 2018. Petunjuk Teknis Kegiatan Bedah Kemiskinan Rakyat Sejahtera (Bekerja) Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan Tahun. Dirkeswan , Kementerian Pertanian.
- BPTUHPT Baturraden, 2018. Petunjuk Teknis Kegiatan Bedah Kemiskinan Rakyat Sejahtera (Bekerja) Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan Tahun 2018. Balai Besar Ternak Unggul dan Hijauan Pakan Ternak, Dirkeswan. Kementerian Pertanian.
- Wibawa, H., apriliana, U.I., Dharmawan, R., Pratamasari, D., Suryanto, B.R., Susanta, D.H., Farhani, N.R., Suhardi, Sari,D.P., Kumorowati, E., Poermadjaja, B. 2018. Hasil Investigasi Kasus Kematian dan Penurunan Produksi Telur Pada Sentra Peternakan Unggas Komersial di Jawa timur, Jawa Tengah, DI Yogyakarta Tahun 2018. Prosiding Rapat Teknis dan Pertemuan Ilmiah. Direktorat Kesehatan Hewan. Ditjen PKH, Kementerian Pertanian.

**INVESTIGASI OUTBREAK PENYAKIT DIDUGA KERACUNAN
THEOBROMIN PADA SAPI DI KABUPATEN KLATEN TAHUN 2019****Dwi Hari Susanta¹, Basuki Rochmat Suryanto², Koeswari Imran³**Korespondensipenulis: dwi-haris09@gmail.comMedik Veteriner Muda¹, Kepala Seksi Informasi Veteriner², Paramedik Veteriner²
Balai Besar Veteriner Wates**ABSTRAK**

Investigasi terhadap dugaan penyakit hewan yang diduga keracunan Theobromin pada sapi dilaksanakan sebagai tindak lanjut adanya laporan kematian 2 ekor sapi dan beberapa ternak sapi mengalami tanda klinis bentol-bentol di seluruh tubuh dan diare berdarah di Desa Cucukan, Kecamatan Prambanan, Kabupaten Klaten oleh Dinas Pertanian dan Peternakan Kabupaten Klaten. Investigasi dilakukan pada tanggal 21-22 Januari 2019. Tujuan Investigasi adalah untuk melakukan identifikasi agen penyebab dalam rangka peneguhan diagnosis, identifikasi faktor risiko, serta memberikan rekomendasi dan melaksanakan tindakan pengendalian di wilayah wabah. Berdasarkan tanda klinis dan pemeriksaan laboratorium, outbreak di Desa Cucukan, Kecamatan Prambanan, Kabupaten Klaten diduga keracunan oleh senyawa theobromin yang berada pada pakan. Analisa faktor resiko menunjukkan bahwa kasus sapi-sapi yang diberi pakan campuran 7,8 kali berpeluang mengalami keracunan dibandingkan dengan pemberian pakan jadi atau konsentrat.

PENDAHULUAN

Investigasi terhadap dugaan penyakit hewan yang diduga keracunan Theobromin pada sapi dilaksanakan sebagai tindak lanjut adanya Laporan kematian 2 ekor sapi dan beberapa ternak sapi mengalami tanda klinis bentol-bentol di seluruh tubuh dan diare darah di Desa Cucukan Kecamatan Prambanan Kabupaten Klaten oleh Dinas Pertanian dan peternakan Kabupaten Klaten, Investigasi dilakukan pada tanggal 21-22 Januari 2019.

Theobromin adalah senyawa alkaloid yang terdapat pada kulit kakao. Kulit Kakao baik digunakan sebagai pakan ruminansia, disamping kelebihan yang diberikan kulit kakao memiliki beberapa zat pembatas yang disebut dengan zat antinutrisi. Zat antinutrisi pada kulit kakao yaitu theobromin (Mahyudin dan Bakrie, 1993). Senyawa theobromin dapat menyebabkan gangguan kesehatan pada hewan seperti muntah, diare, sering buang air kecil, atau keringat secara berlebihan dan pendarahan internal. Zat antinutrisi lainnya adalah asam fitat dan lignin yang tinggi. Senyawa asam fitat sulit dicerna, fosfor dari asam fitat tidak dapat digunakan oleh tubuh hewan ruminansia. Asam fitat dapat mengikat unsur unsur mineral terutama kalsium, seng, besi, dan magnesium, serta dapat bereaksi dengan protein membentuk senyawa kompleks sehingga dapat menghambat pencernaan protein oleh enzim proteolitik akibat perubahan

konformasi protein. Kulit kakao juga mengandung lignin yang tinggi, lignin pada kulit kakao dapat menyebabkan terganggunya saluran pencernaan ternak. Apabila kulit kakao diberikan secara berlebihan dan terus menerus akan mengakibatkan dampak yang lebih serius seperti detak jantung yang tidak teratur, bergetar, bahkan bisa menyebabkan kematian. Gejala ini dapat terlihat 12 hari setelah mengkonsumsi kakao (Nelson, 2011).

Tujuan Investigasi adalah untuk melakukan identifikasi agen penyebab dalam rangka peneguhan diagnosis, identifikasi faktor risiko, serta memberikan rekomendasi dan melaksanakan tindakan pengendalian di wilayah wabah

MATERI DAN METODE

Investigasi dilaksanakan dengan observasi lapangan, wawancara dengan pengisian kuesioner dan pengambilan sampel. Investigasi dilakukan oleh tim dari Balai Besar Veteriner (BBVet) Wates dan Dinas Pertanian dan Peternakan Kabupaten Klaten di Desa Cucukan, Kecamatan Prambanan, Kabupaten Klaten, Propinsi Jawa Tengah pada tanggal 21-22 Januari 2019.

Kegiatan investigasi ini menggunakan pendekatan studi kasus-kontrol (*case-control study*) dimana peternak yang diinvestigasi dikelompokkan menjadi dua grup yaitu peternak

kasus dan peternak kontrol berdasarkan definisi kasus. Kasus ini didefinisikan sebagai sapi dengan tanda klinis bentol-bentol dipelupuk mata dan seluruh tubuh, diare berdarah, serta hasil pengujian pakan positif senyawa Theobromin. Analisa data terhadap gambaran dan pola kejadian penyakit dan kemungkinan faktor resiko dilakukan secara deskriptif dan analitik.

HASIL DAN PEMBAHASAN

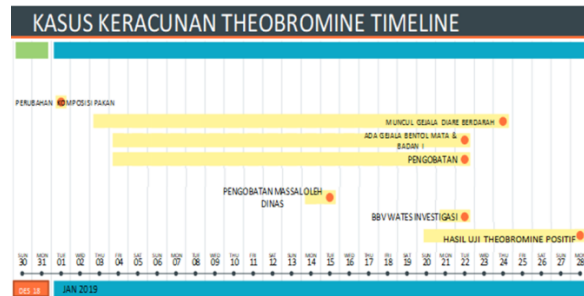
Kronologi Kejadian

Hasil investigasi kasus di Desa Cucukan, Kecamatan Prambanan, Kabupaten Klaten menemukan adanya Sapi yang mengalami gejala diare berdarah, bentol di pelupuk mata dan seluruh tubuh, serta ada 2 ekor sapi yang mengalami kematian.

Tabel 1. Populasi sapi di Desa Cucukan Prambanan Kabupaten Klaten

| No | Nama Kelompok Ternak | Jumlah Anggota | Populasi | Muncul Tanda Klinis | Kematian | Morbiditas | Mortalitas |
|----|----------------------|----------------|----------|---------------------|----------|------------|------------|
| | | | | | | % | % |
| 1 | Mukti Andini 1 | 33 | 100 | 49 | 2 | 49 | 2 |
| 2 | Mukti Andini 2 | 27 | 54 | 8 | 0 | 1,5 | 0 |
| 3 | Mukti Andini 3 | 28 | 52 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | Mukti Andini 4 | 20 | 48 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | Mukti Andini 5 | 25 | 43 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Jumlah | 133 | 297 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Tabel 1 menunjukkan Populasi sapi di Desa Cucukan Prambanan Kabupaten Klaten yang terdiri dari 133 Anggotakelompok ternak dengan populasi total 297 ekor sapi. Sapi-sapi dikelompokkan dalam kelompok Mukti Andini 1 yang terdiri 33 orang anggota dengan populasi 100 ekor, Mukti Andini 2 ada 27 orang anggota dengan populasi 54 ekor sapi, Mukti Andini 3 terdiri dari 28 orang anggota dengan populasi sapi 52, Mukti Andini 4 terdiri dari 20 orang anggota dengan populasi 48 ekor dan Mukti Andini 5 dengan anggota 25 populasi sapi 43 ekor. Mukti Andini 1 mempunyai mortalitas 2%, Morbiditas 49%, Kelompok Mukti Andini 2 mempunyai mortalitas 0%, Morbiditas 1,5%, sedangkan kelompok Mukti Andini 3-5 Morbiditas dan Mortalitas 0%, dalam hal ini kelompok Mukti Andini 1 dan 2 sebagai Kasus selanjutnya Kelompok Mukti Andini 3,4,5 sebagai kontrol.



Gambar 1. Timeline Kasus

Kronologi Kejadian, pada tanggal 1 Januari 2019 terjadi perubahan komposisi pakan dari pakan campuran yang sebelumnya tidak diberi campuran kulit kakao menjadi pakan campuran diberi tambahan kulit kakao. Pada tanggal 3 – 24 Januari 2019 muncul tanda klinis diare berdarah pada 30 ekorsapi dan 2 ekorsapi mati tanggal 5 Januari 2019, di peternak pada kelompok Mukti Andini 1. Tanda klinis yang sama ditemukan pada tanggal 11-18 Januari 2019 di Kelompok Mukti andini 2 , pada 6 ekor sapi yaitu tanda klinis diare berdarah dan bentol di pelupuk mata dan seluruh tubuh.. Setelah terjadi tanda klinis , dilakukan pengobatan oleh Dinas peternakan Kab. Klaten terhadap seluruh ternak yang mengalami gejala. Penghentian Hasil setelah dilakukan pengobatan, ada beberapa ternak yang sembuh, dan ada beberapa ternak yang mulai menunjukkan tanda klinis yang sama.

Pada tanggal 21-22 Januari 2019 tim BBVet Wates melakukan investigasi setelah ada laporan dari Dinas Peternakan Kabupaten Klaten. Kegiatan investigasi meliputi observasi, pengisian kuesioner dan pengambilan sampel . Pengambilan sampel berupa darah, serum, feses, pakan jadi ,bahan campuran pakan, dan air. Pemeriksaan dilakukan di Laboratorium BBVET Wates, meliputi pemeriksaan parasitologi, hematologi, isolasi bakteri, Isolasi dan PCR virus BVD, dan pemeriksaan residu pestisida menggunakan alat GC-MS untuk mengetahui agen penyebab penyakit.

Tabel 2. Hasil Pemeriksaan Laboratorium

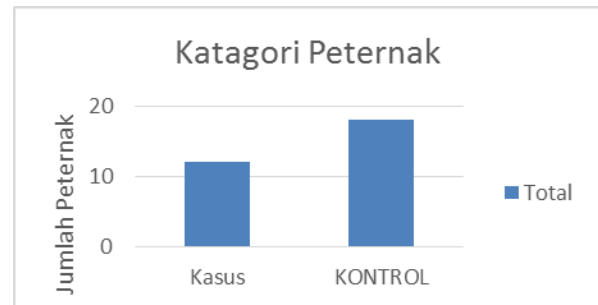
| No | Kecamatan | Desa | Hewan | Diagnosa |
|----|-----------|---------|-------|------------------------------------|
| 1. | Prambanan | Cucukan | Sapi | ANTHRAX NEGATIF (27) |
| 2 | Prambanan | Cucukan | Sapi | E.COLI NEGATIF (5) |
| 3 | Prambanan | Cucukan | Sapi | SALMONELLOSIS NEGATIF (5) |
| 4 | Prambanan | Cucukan | Sapi | BOVINE VIRAL DIARRHEA NEGATIF (27) |
| 5 | Prambanan | Cucukan | Sapi | CACINGAN NEGATIF (27) |
| 6 | Prambanan | Cucukan | Sapi | BOVINE VIRAL DIARRHEA NEGATIF (27) |
| 7 | Prambanan | Cucukan | Sapi | BOVINE VIRAL DIARRHEA NEGATIF (27) |

Pada pemeriksaan menggunakan alat GC-MS pada sampel kulit coklat, pakan campur manual 1. pakan jadi ember 2, pakan jadi kemas 4, pakan kl 2, terdeteksi senyawa theobromin.

Berdasarkan tanda klinis dan pemeriksaan laboratorium, outbreak di Desa Cucukan, Kecamatan Prambanan, Kabupaten Klatendisebabkan oleh keracunan oleh senyawa theobromin yang berada pada pakan ditunjukkan oleh hasil uji laboratorium kesmavet dengan pengujian sampel pakan dengan menggunakan alat GC-MS. Hasil pemeriksaan lainnya tidak terdeteksi agen penyakit yang disebabkan oleh bakteri dan virus. Theobromine merupakan senyawa alkaloid yang terdapat pada buah kakao/coklat, pada batas tertentu dapat meracuni ternak. Zat ini diduga dapat menghambat pertumbuhan mikroba rumen, sehingga dapat menurunkan kemampuan ternak di dalam mencerna dan memanfaatkan nutrisi yang dikonsumsi. Senyawa theobromin dapat menyebabkan gangguan kesehatan pada hewan seperti muntah, diare, sering buang air kecil, atau keringat secara berlebihan dan pendarahan internal (Mahyudin dan Bakrie, 1993).

Studi kasus dan kontrol di desain untuk membantu menentukan apakah sebuah paparan (*exposure*) berkaitan dengan *outcome* atau kasus/kejadian tertentu. Studi ini selalu bersifat retrospektif karena dimulai dari sebuah outcome kemudian dilacak kembali untuk menginvestigasi exposure (*Lewallen and Coutright, 1998*). Pada studi ini, penilaian terhadap outcome berdasarkan ada tidaknya kasus yang dijumpai pada peternak yang telah disurvei sesuai definisi kasus yang telah ditetapkan, sedangkan exposure yang dinilai adalah faktor-faktor risiko yang berhubungan terjadinya kasus pada peternakan berkaitan dengan cara pemberian pakan.

Jumlah Peternak yang disurvei dalam kegiatan outbreak investigasi ini adalah 30 peternak. Berdasarkan definisi kasus yang telah dijelaskan di Materi dan Metode, 12 peternak dikategorikan sebagai kasus yaitu peternak-peternak yang memberikan pakan campuran dan 18 Peternak sebagai kontrol adalah peternak-peternak yang memberikan pakan jadi/konsentrat.



Gambar 2. Katagori peternak kasus dan kontrol
Tabel 2. Odd ratio sapi yang diberi pakan campuran terhadap hasil uji positif theobromin

| DEFKLINIS | Pemberian Pakan Campur | | Subtotal | OR |
|-----------|------------------------|-------|----------|---------------------------|
| | Ya | Tidak | | |
| Kasus | 9 | 3 | 12 | 7,8(95% CI = 1.48 -41.22) |
| Kontrol | 5 | 13 | 18 | |
| Subtotal | 14 | 16 | 30 | |

Analisa faktor resiko menunjukkan bahwa kasus sapi-sapi yang diberi pakan campuran 7,8 kali berpeluang mengalami keracunan dibandingkan dengan pemberian pakan jadi atau konsentrat. Penggunaan kulit kakao sebagai pakan dibatasi oleh adanya zat antinutrisi yaitu suatu zat alkaloid yang disebut theobromin (3,7-dimethylxantine) dan dapat menimbulkan keracunan pada ternak (Ching dan Wong, 1986). Kulit kakao yang diberikan secara langsung pada ternak juga akan menurunkan berat badan ternak, sebab kandungan lignoselulosa yang tinggi menyebabkan pencernaan pod kakao menjadi rendah. Kandungan selulosa dan hemiselulosa pod kakao masing-masing sebesar 35 % dan 11 % (Sobamiwa, 1993).

KESIMPULAN

1. Berdasarkan tanda klinis dan pemeriksaan laboratorium, outbreak di Desa Cucukan, Kecamatan Prambanan, Kabupaten Klaten diduga keracunan oleh senyawa theobromin yang berada pada pakan.
2. Faktor resiko yang menyebabkan keracunan pada sapi-sapi dipeternakan adalah pemberian pakan campuran.

SARAN DAN REKOMEDASI

Pemberian kulit kakao dalam campuran pakan tidak boleh berlebihan karena mengandung zat antinutrisi yang apa bila diberikan secara berlebihan dapat membuat ternak keracunan, dan mengganggu proses pencernaan pada ternak ruminansia

DAFTAR PUSTAKA

- Sobamiwa, O. (1993). Use of cocoa-pod husk in poultry feeds: a particular reference to the Nigerian situation. Dalam: De Lafforest J (ed) Proceedings of 11th International Cocoa Research Conference, Yamoussoukro Cote D'Ivoire, 18-24 July 1993.
- Mahyuddin, P. and B. Bakrie. 1993. Different Levels of Cocoa Shell in Diets Of Growing Cattle. Ilmu dan Peternakan 6(2): 1 – 4.
- Balai Pengkajian Teknologi Pertanian (BPTP). 2010. Fermentasi Kulit Buah Kakao untuk Pakan Ternak. PDF nitropdf.com/professional. Sumatera Barat
- Departemen pertanian. 2014. Manfaat Limbah Buah Kakao sebagai Pakan Tambahan pada Ternak Sapi. [http:// cybex deptan.go.id](http://cybex.deptan.go.id)

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis sampaikan kepada Bapak drh Bagoes Poermadjaja M.Sc Kepala Balai Besar Veteriner Wates , Drh. Hendra Wibawa, M.Si, Ph.D selaku mentor, para teman sejawat Medik dan Paramedik di Balai Besar Veteriner Wates, Kepala Dinas Pertanian dan Peternakan kabupaten Klatensehingga laporan ini dapat diselesaikan

**MONITORING MYCOPLASMOSIS PADA AYAM LAYER DI DAERAH
ISTIMEWA YOGYAKARTA TAHUN 2019**

drh Nur Rohmi Farhani*), Mariyono**), Woro Subekti **),
drh Rizki Metyas Delviana*)

*) Medik Veteriner Laboratorium Bakteriologi
**) Paramedik Veteriner Laboratorium Bakteriologi
Balai Besar Veteriner Wates

ABSTRAK

Mycoplasmosis di Indonesia telah menyebar hampir di semua wilayah. Penyakit ini menyebabkan kerugian yang besar pada peternakan ayam. Mycoplasma pada unggas menyebabkan beberapa macam penyakit, diantaranya CRD (*Chronic Respiratory Disease*) disebabkan oleh *Mycoplasma galisepticum*, *Mycoplasma gallinarum* dan *Infeksious synovitis* disebabkan oleh *Mycoplasma synoviae*. BBVet Wates telah melakukan monitoring mycoplasmosis pada ayam layer di DIY. Sampel yang diambil berupa swab oropharing dalam media mycoplasma broth (200 sampel) dan serum darah ayam layer (270 sampel). Pengujian yang dilakukan adalah pengujian Isolasi dan Identifikasi *Mycoplasma sp.* terhadap sampel swab oropharing dan uji aglutinasi CRD dari sampel serum darah ayam layer. Tujuan kegiatan ini adalah untuk mengetahui penyebaran dan prevalensi kejadian mycoplasmosis pada ayam layer di wilayah DIY. Hasil pengujian di laboratorium, didapatkan hasil, untuk sampel serum, dari 270 sampel, seropositif 182 serum (67,41%), seronegatif 88 serum (32,59%). Menurut Heileili et al (2012), seroprevalensi mycoplasma pada musim dingin (61,48 %), lebih tinggi dibandingkan musim panas (47,7%). Sedangkan dari hasil uji kultur mycoplasma dari 200 sampel, sampel yang positif mycoplasma 98 sampel (49%). Hasil monitoring mycoplasmosis di DIY: seroprevalensi mycoplasma 67,41 % menunjukkan hasil yang lebih tinggi daripada literature Heileili et al, 2012. Hasil ini menunjukkan bahwa ada infeksi *Mycoplasma sp* pada peternakan ayam. Infeksi ini harus ditanggulangi dengan vaksinasi dan pemberian obat yang tepat, karena dapat menyebabkan pertumbuhan yang lambat, penurunan produksi telur dan kerugian yang banyak. Dari kuisioner, didapatkan informasi, ayam yang diambil sampel dalam monitoring ini sebagian besar menunjukkan gejala klinis lesu, nafas ngorok, bersin, lendir pada hidung, kepala tertunduk, ayam di kandang terlalu padat, kelembaban tinggi, kadar amoniak tinggi dan manajemen pemeliharaan yang kurang baik.

PENDAHULUAN

Mycoplasmosis di Indonesia telah menyebar hampir di semua wilayah.. Mycoplasma pada unggas menyebabkan beberapa macam penyakit, diantaranya CRD (*Chronic Respiratory Disease*) disebabkan oleh *Mycoplasma galisepticum*, *Mycoplasma gallinarum* dan *Infeksious synovitis* disebabkan oleh *Mycoplasma synoviae*. CRD merupakan penyakit pada saluran pernafasan unggas, dengan gejala klinis adalah radang cair keluar dari hidung, cairan berbusa dari mata, nafas ngorok, bersin dan kepala tunduk. Ayam yang terserang sering menjadi kerdil. Penyakit ini bersifat akut pada ayam-ayam muda sedangkan pada ayam dewasa bersifat laten dan kronis. Mycoplasmosis yang disebabkan oleh *Mycoplasma gallinarum* ini dapat menyebabkan kerugian ekonomi yang besar. Kerugian yang ditimbulkannya antara lain pertumbuhan yang lambat, daya tetas dan

produksi telur menurun serta biaya pengobatan yang mahal. Penyebaran penyakit ini dapat melalui kontak langsung ataupun kontak tidak langsung antar unggas antar unggas. Ayam-ayam yang sembuh dari penyakit ini dapat menjadi carier dalam waktu yang lama sehingga merupakan sumber penularan bagi ayam-ayam yang lain. Pencegahan dan penanggulangan yang tepat terhadap penyakit mycoplasmosis pada ayam, dapat mengurangi dampak kerugian yang ditimbulkan.

Tujuan kegiatan ini adalah untuk mengetahui penyebaran dan prevalensi kejadian mycoplasmosis pada ayam layer di wilayah DIY.

MATERI DAN METODE**A. BAHAN DAN ALAT**

Bahan dan alat dalam rangka monitoring Mycoplasma pada ayam layer adalah sebagai berikut : media mycoplasma broth, tabung ulir

5ml, spuit disposibel 3 ml, masker, glove, cotton swab batang kayu, virkon, alkohol, vitamin, plastik, spidol, rak, coolbox, espack, mycoplasma agar, incubator, antigen CRD, Bunsen, ose disposibel, rak tabung, anaerogen, cawan petri, mikroskop stereo.

B. METODA

Metoda Pengambilan Sampel di Lapangan
Metoda pelaksanaan kegiatan, Tim melakukan kunjungan ke lapangan, mengisi kuisioner dan mengambil sampel berupa darah ayam dan swab oropharing dari ayam hidup. Setiap kabupaten diambil sampel 4-5 peternakan, setiap peternakan diambil 20-25 sampel darah dan 4 sampel swab oropharing, dipool. Setelah diperoleh sampel dilakukan pemeriksaan di Laboratorium untuk uji CRD dari sampel serum dan isolasi kuman *Mycoplasma sp* dari swab oropharing. Sampel swab oropharing diambil dari ayam hidup kemudian dimasukkan dalam media transport mycoplasma yang telah dicampur dengan supplement.

Metoda Pengujian di Laboratorium Uji Aglutinasi CRD

Sampel serum diuji dengan antigen mycoplasma gallisepticum. Serum unggas yang pernah terinfeksi mycoplasma sp. mengandung antibodi/ Ab (zat kebal) terhadap bakteri Brucella abortus. Serum dari unggas yang bersangkutan apabila direaksikan dengan antigen (Ag) CRD akan bereaksi (terjadi ikatan Ag – Ab). Ikatan ini bisa saling silang sehingga membentuk masa, karena antigen CRD diberi warna, maka masa ikatan Ag–Ab ini lebih mudah dilihat.

Alat dan bahan uji : papan datar dengan permukaan berwarna putih, pengaduk (batang kaca atau tusuk gigi), Mikropipet 25 µl, Mikrotip 100 µl, Antigen CRD, sampel serum, kontrol serum positif CRD dan kontrol serum negatif
Prosedur Kerja: Teteskan masing - masing 25 µl serum kontrol dan sampel serum pada masing - masing kotak di atas papan datar, Teteskan 25 µl antigen CRD di dekat serum, Campur serum dan antigen dengan menggunakan pengaduk sampai membentuk zona oval dengan diameter ± 2 cm, Goyangkan papan datar selama 4 menit, Baca hasilnya.

Interpretasi Hasil : Hasil uji CRD dikatakan Positif bila pada campuran antigen dan serum terbentuk aglutinasi (bentukan seperti pasir). Ada tiga tingkatan positif, yaitu : Positif

satu (+/+1), Positif dua (++)/2), Positif tiga (+++)/3), Penentuan tingkatan positif tidak mutlak, biasanya ditetapkan berdasarkan kecepatan pembentukan aglutinasi, ukuran (halus/kasar) dan banyaknya aglutinasi/ butiran yang terbentuk. Hasil uji CRD dikatakan Negatif bila campuran serum dan antigen tetap homogen (tidak terjadi aglutinasi).

Isolasi dan Identifikasi *Mycoplasma sp*

Metoda Identifikasi Bakteri *Mycoplasma sp* di BBVet Wates dengan metode Isolasi dan Identifikasi *Mycoplasma sp*. Pengujian ini baru *Mycoplasma sp* belum sampai uji spesiesnya.

Media Uji Mycoplasma:

1. Mycoplasma Broth (100 ml)

Bahan : Micoplasma broth base 2,55 gr, Cystein Hcl 1 % 0,5 ml, Talus acetat 10 % 0,25 ml, phenol red 1 ml aquadest 70,25 ml. Semua bahan dicampurkan, di ph 7,8, autoclave suhu 121°C selama 15 menit, dinginkan suhu 55°C tambahkan suplemen dan antibiotika.

2. Mycoplasma suplemen (500 ml)

Bahan: Serum babi/kuda 20 ml, yang telah diaktifasi suhu 56°C selama 30 menit, Yeast extrac 10 % pH 8 sebanyak 5 ml, DNA 0,2 % 1 ml, Cycloheximide 1 ml, Ampicillin 1 ml, dextrose/glucose 10 % sebanyak 1 ml.

3. Mycoplasma agar (100 ml)

Bahan : Mycoplasma broth base 2,55 gram, Cystein HCL 1 % sebanyak 0,5 ml, tallus acetat 10 % sebanyak 0,25 %, Bacto agar no 3 1 gr, aquadest 70,25 ml, semua bahan dicampur, di pH 7,8, autoclave suhu 121°C selama 15 menit, kemudian dinginkan suhu 50°C tambahkan suplemen dan antibiotika (komposisi no 2).

Isolasi dan Identifikasi *Mycoplasma sp*.

Sampel swab oropharing dimasukkan dalam media mycoplasma broth, diinkubasi dengan CO2 pada suhu 37°C selama 2-3 hari, diamati fermentasinya, kemudian ditanam pada mycoplasma agar, inkubasi dengan CO2 pada suhu 37°C, diamati pertumbuhannya pada hari ke 3, hari ke 7 hari ke 14 dengan mikroskop stereo. Pada pemeriksaan dengan mikroskop stereo, mycoplasma agar bentuk koloni jernih yang menebal di bagian tengahnya seperti mata sapi. Bentuk ini merupakan bentuk khas dari bakteri mycoplasma.

Sifat-sifat Mycoplasma

Morfologi koloni *Mycoplasma* berbentuk pleomorfik dan subkultur pada media padat menghasilkan koloni-koloni cocoid dengan ukuran 0,25-0,50 mikron, bersifat Gram negatif. Bentuk koloninya bulat jernih dengan yang menebal dibagian tengahnya dan kalau dilihat dibawah mikroskop menyerupai bentuk-bentuk mata sapi, organisme ini dapat hidup secara aerob dan fakultatif anaerob.

Mycoplasma gallisepticum bersifat memfermentasi glukosa dan maltose menjadi asam tanpa membentuk gas, mereduksi 2,3,5-triphenil-tetrazolium chloride, dapat mengaglutinasi eritrosit marmut, ayam dan kalkun.

Mycoplasma gallisepticum sensitive terhadap Erythromycin, Bacitracin, Tylosin dan sinar matahari. Bakteri ini resisten terhadap Penicillin (1000 IU/ml) dan thalium acetat berkadar 1 : 4000.

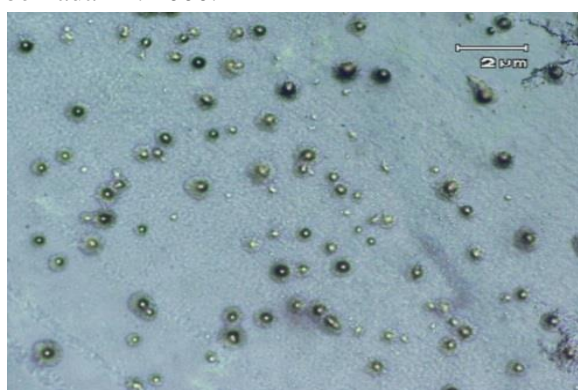


Foto mikroskopik *Mycoplasma* sp, dilihat dengan mikroskopstereo, perbesaran 1000x

DESAIN SAMPEL

Jumlah Sampel

Sampel yang diambil berupa darah ayam dan swab oropharing dari ayam hidup. Setiap kabupaten diambil sampel 4-5 peternakan, setiap peternakan diambil 10-15 sampel darah dan 10 sampel swab oropharing, dipool jadi 2 pool (Carter, 1993 revisi 5 hal 334).

Setelah diperoleh sampel dilakukan pemeriksaan di Laboratorium untuk uji aglutinasi CRD dari sampel serum dan isolasi kuman *Mycoplasma sp* dari swab oropharing. Sampel swab oropharing diambil dari ayam hidup kemudian dimasukkan dalam media transport mycoplasma yang telah dicampur dengan supplement. Sampel serum dipisahkan dari clotnya. Sampel dikemas dengan plastik steril dan dimasukkan dalam box pendingin yang telah diberi es pack. Sebelum

diuji, sampel disimpan dalam refrigerator suhu 4°C

Tabel jumlah sampel yang diambil :

| No | Kabupaten | Populasi Unggas | Sampel | |
|---------------|------------------|------------------|------------|-----------------|
| | | | Serum | Swab Oropharing |
| 1 | Kab. Gunungkidul | 80.294 | 60 | 50 |
| 2 | Kab. Sleman | 1.993.395 | 60 | 50 |
| 3 | Kab. Bantul | 444.925 | 60 | 50 |
| 4 | Kab. Kulon Progo | 705.494 | 60 | 50 |
| Jumlah | | 3.224.108 | 240 | 200 |

Jenis Sampel

Jenis sampel yang diambil adalah serum untuk uji aglutinasi CRD dan untuk isolasi bakteri adalah swab oropharing, yang dimasukkan dalam media transport mycoplasma disimpan pada suhu dingin.

Pelaksanaan Kegiatan

Kegiatan Monitoring Mycoplasmosis pada ayam Layer di DIY dilaksanakan pada bulan Februari dan April 2019.

PEMBAHASAN

Mycoplasmosis merupakan penyakit pada saluran pernafasan unggas, dengan gejala klinis adalah radang cair keluar dari hidung, cairan berbusa dari mata, nafas ngorok, bersin dan kepala tunduk. Ayam yang terserang sering menjadi kerdil. Penyakit ini bersifat akut pada ayam-ayam muda sedangkan pada ayam dewasa bersifat laten dan kronis.

| No | Kabupaten | Serum | Jenis Sampel | | | | |
|--------------|------------------|------------|--------------------------|---------------|-----------------|-------------------------|------------|
| | | | Hasil Uji Aglutinasi CRD | % Positif | Swab Oropharing | Hasil Kultur Mycoplasma | % Positif |
| 1 | Kab. Kulon Progo | 60 | 46 | 76,67% | 50 | 40 | 80% |
| 2 | Kab. Bantul | 60 | 50 | 83,30% | 50 | 11 | 22% |
| 3 | Kab. Sleman | 80 | 18 | 22,50% | 50 | 15 | 30% |
| 4 | Kab. Gunungkidul | 70 | 68 | 97,14% | 50 | 32 | 64% |
| TOTAL | | 270 | 182 | 67,41% | 200 | 98 | 49% |

Tabel. Tabel Hasil Pengujian sampel monitoring mycoplasmosis di DIY

Sampel serum diuji dengan antigen *Mycoplasma gallisepticum*. Serum unggas yang pernah terinfeksi mycoplasma sp. mengandung

antibodi/ Ab (zat kebal) terhadap bakteri *Mycoplasma gallisepticum*. Hasil uji CRD dikatakan Positif bila pada campuran antigen dan serum terbentuk aglutinasi (bentukan seperti pasir). Ada tiga tingkatan positif, yaitu :Positif satu (+/+1), Positif dua (++/+2), Positif tiga (+++/+3).

Menurut Heleili et al (2012), seroprevalensi mycoplasma pada musim dingin (61,48 %), lebih tinggi dibandingkan musim panas (47,7%). Dari hasil pengujian di laboratorium, didapatkan hasil, untuk sampel serum, dari 270 sampel, seropositif 182 serum (67.41%), seronegatif 88 serum (32,59%). Sedangkan ari hasil uji kultur mycoplasma dari 200 sampel, sampel yang positif mycoplasma 98 sampel (49%). Hasil monitoring mycoplasmosis di DIY: seroprevalensi mycoplasma 67,41 % menunjukkan hasil yang lebih tinggi daripada literature Heileili et al, 2012. Dari kuisisioner, didapatkan informasi, ayam yang diambil sampel dalam monitoring ini sebagian besar menunjukkan gejala klinis lesu, nafas ngorok, bersin, lendir pada hidung, kepala tertunduk, ayam di kandang terlalu padat, kelembaban tinggi, kadar amoniak tinggi dan manajemen pemeliharaan yang kurang baik.

Menurut Diyantoro (2017), Faktor resiko yang dapat mempengaruhi penularan mycoplasmosis : kepadatan ayam di flock (>3000 ekor / kandang), pemberian pakan sekali sehari, penyemprotan kandang 2 mg sekali dan penyemprotan kandang sebulan sekali atau jika ada kasus.

Gejala klinis mycoplasmosis adalah radang cair keluar dari hidung, cairan berbusa dengan gejala klinis adalah radang cair keluar dari hidung, cairan berbusa dari mata, pembengkakan *sinus periorbital*, nafas ngorok, bersin dan kepala tunduk. Ayam yang terserang sering menjadi kerdil, penurunan produksi telur (Akoso, 1993).

Kejadian mycoplasmosis terutama terjadi pada peternakan dengan tata laksana kesehatan yang tidak memenuhi persyaratan kesehatan (Akoso, 1993). Ayam muda lebih rentan terhadap CRD. Kejadian penyakit dipengaruhi oleh faktor lingkungan, faktor stress, manajemen pemeliharaan yang kurang baik, kadar amoniak yang tinggi, kandang atau lingkungan yang berdebu, pemeliharaan ayam dengan umur yang berbeda, dalam satu lokasi, fluktuasi suhu dan kelembaban yang tinggi (Anonim, 2014).

Penularan penyakit CRD dapat secara langsung melalui kontak langsung dengan hewan sakit, maupun secara tidak langsung melalui makanan, debu, alat kandang yang tercemar, dan udara (Anonim, 2014) maupun melalui lalu lintas telur dari bibit yang terinfeksi.

Pengobatan dengan Basitrasin, Eritromisin, Tilosin, Spektinomisin, dan Linkomisin melalui makanan, minuman atau injeksi, pemilihan bibit yang bebas CRD, perbaikan manajemen pemeliharaan ayam (Akoso, 1993).

KESIMPULAN DAN SARAN

Dari hasil kajian surveillans ini dapat disimpulkan bahwa terdapat infeksi *Mycoplasma sp* pada peternakan ayam. Oleh karena itu perlu dilakukan upaya pencegahan dengan vaksinasi dan pengobatan pada hewan yang terinfeksi menggunakan obat yang tepat, selain itu juga perlunya perbaikan manajemen pemeliharaan untuk meminimalkan infeksi penyakit.

DAFTAR PUSTAKA

- Akoso, Budi Tri, 1993. Manual Kesehatan Unggas. Panduan Bagi Petugas Teknis, Penyuluh dan Peternak, Penerbit Kanisius, Yogyakarta, hal 56 -58.
- Anonim, 1999. Metode Diagnosa Laboratorium Kesehatan Hewan. Direktorat Bina Kesehatan Hewan. 1999. Manual Standar, hal 163-165
- Anonim, 2014. Manual Penyakit Unggas. Cetakan ke-2. Direktorat Kesehatan Hewan, Dirjen Peternakan, Departemen Pertanian, hal 33 - 43
- Calnek, B.W, etc, 1991. Disease of Poultry. Ninth edition, Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA. Page 196 – 208
- Carter, G.R, 1990. Diagnostic Procedures in Veterinary Bacteriology and Mycology, Fifth Edition, Academic Press Inc.
- Cowan F. M and Steel's. 1993. Manual for Identification of Medical Bacteria. Barrow GI and Feltham RKA (EDS). Cambridge University Press. Great Britain. Cambridge, 225-230.

Rangga Tabu, 2000. Penyakit Ayam dan Penanggulangannya, penyakit Bakterial, Mikal dan Viral, Volume 1, hal 125-139

Saif, Y.M, etc,1991. Disease of Poultry. Ninth edition,Low State Press, Iowa, USA. Page 719-720