

## STUDI PERKEMBANGAN DAN SITOPATOLOGI *Eimeria tenella* PADA MEMBRAN CHORIOALLANTOIS

A STUDY OF THE DEVELOPMENTS AND CYTOPATHOLOGICALY EFFECTS OF *Eimeria tenella* IN THE CHORIOALLANTOIS MEMBRANE

Bambang Sutrisno<sup>1</sup>, Joko Prastowo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada

<sup>2</sup>Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada

### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perkembangan dari siklus hidup *Eimeria tenella* gambaran histopatologik membran *chorioallantois* sebagai akibat infeksi sporosista dan oosista *Eimeria tenella*, untuk mengetahui kemungkinan penggunaan membran *chorioallantois* sebagai medium kultur *Eimeria tenella*. Penelitian ini menggunakan 50 butir telur ayam berembrio umur 10 hari yang dibagi ke dalam 5 kelompok, masing-masing 10 butir. Kelompok I, telur diinfeksi dengan 5.000 oosista, kelompok II diinfeksi dengan 10.000 oosista, kelompok III diinfeksi dengan 25.000 sporosista, kelompok IV diinfeksi dengan 50.000 sporosista dan kelompok V diperlukan sebagai kontrol. Telur-telur tersebut diinkubasi pada suhu 41°C selama 6 hari. Mulai hari ke 2 setelah infeksi, dua telur dari masing-masing kelompok diperiksa dengan membuka kerabangnya, membran *chorioallantois* diamati untuk melihat perubahan makroskopik dan histologik. Hasil yang didapat adalah kelompok I dan II tidak ada perbedaan dan oosista tidak berkembang bahkan mengalami nekrosis. Kelompok III dan IV menunjukkan perkembangan di dalam membran *chorioallantois*, hari ke 2 setelah infeksi sel epitel membesar dan terisi oleh sporozoit, hari ke 3 setelah infeksi sudah ada skizon generasi I, hari ke 4 setelah infeksi sel-sel epitel membesar dan ada stadium makrogamet, skizon generasi II dan zigot, dan hari ke 5 setelah infeksi sudah terdapat stadium oosista. Inokulasi sporosista *Eimeria tenella* pada membran *chorioallantois* dapat berkembang menjadi stadium berikutnya, sedang inokulasi oosista *Eimeria tenella* pada membran *chorioallantois* tidak menunjukkan perkembangan. Membran *chorioallantois* dapat digunakan sebagai medium kultur *Eimeria tenella*.

**Kata kunci :** *Chorioallantois*, *Eimeria tenella*, Skizon , Makrogamet

### ABSTRACT

The aim of the study was subjected to know the development of *Eimeria tenella* life cycle and histopathologic effects in the chorioallantois membrane as culture medium for growing them. Fifty embryonated eggs at the tenth day was divided into five groups, each group consist of ten eggs. The eggs in the first until the fourth group were inoculated with 5,000 oocysts, 10,000 oocysts, 25,000 sporocysts and 50,000 sporocysts respectively, and the fifth group was a control group. The eggs was incubated at 41°C for 6 days. Two days later, two eggs of each were removed for investigation and the chorioallantois membranes were then histopathologically processed. These works were repeated until six days of incubation. The results showed that the oocysts inoculated eggs in the first and second group did not appear of development of oocysts. The other hand sporocysts inoculated eggs in the group of the third and fourth showed the development of *Eimeria tenella* in its chorioallantois membrane. The sporozoit contained epithelial cells appeared in the second days after inoculation. Schizont first generation, macrogamet and zygote, and oocysts appeared in the third, fourth and fifth days, respectively. The conclusion of the results showed that the chorioallantois membrane might use as culture medium for *Eimeria tenella*. Oocysts could not infect the egg without exisation processing.

**Key words :** *Chorioallantois*, *Eimeria tenella*, Schizont, Macrogamet.

## PENDAHULUAN

Permintaan terhadap hasil unggas (terutama daging broiler) akan terus meningkat dari tahun ke tahun. Tingkat kebutuhan protein hewani asal ternak yang ditargetkan 6 g perkapita perhari, ternyata pada tahun 1996 hanya dapat mencapai lebih kurang 4,31 g perkapita perhari atau 71,8% dari target yang ditetapkan oleh pemerintah (Anonim, 1999).

Salah satu kendala besar dalam usaha peningkatan produksi daging dan telur ayam adalah penyakit koksidiosis yang disebabkan oleh *Eimeria tenella*. *Eimeria tenella* adalah salah satu spesies *Eimeria* penyebab koksidiosis bentuk sekal pada ayam. Parasit protozoa tersebut hidup dilapisan epitelium intestinum dan mengalami multiplikasi di epitelium, sehingga dapat menyebabkan kerusakan jaringan intestinum, diare berdarah, penurunan berat badan, paralysis, terlambatnya produksi telur, kualitas telur menurun dan sering menyebabkan kematian (McDougald and Reid, 1991 : Shirley, 1995). Penyakit ini menduduki peringkat atas dalam menimbulkan masalah kematian pada peternakan ayam (McDougald and Reid, 1991 : Sainsbury, 1992). Di Amerika Serikat kerugian akibat koksidiosis dapat mencapai US\$ 34.854.000 pertahun (Levine, 1983), sedangkan kematian pada ternak ayam di suatu peternakan ayam dapat mencapai 5 - 10% (Gordon, 1977). Pada ayam muda, koksidiosis dapat menimbulkan kematian hingga 100 % yang disebabkan oleh infeksi berat, yang ditandai dengan hilangnya darah yang cukup banyak (Soulsby, 1986).

Studi mengenai patogenisitas *Eimeria tenella* pada telur ayam belum banyak dilakukan. Walaupun penularan secara alami koksidiosis umumnya dilakukan secara peroral bersamaan dengan masuknya pakan (McDougald and Reid, 1991), tetapi tidak tertutup kemungkinan telur dapat tercemar oleh oosista ataupun sporozoit koksidia yang berasal dari ayam yang terinfeksi koksidia. Apabila terjadi kerusakan pada dinding telur tersebut tentu dapat memungkinkan masuknya oosista kedalam telur dan berkembang lebih lanjut menjadi stadium berikutnya dari *Eimeria tenella* di dalam telur.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemungkinan penularan infeksi koksidiosis pada telur ayam, yaitu dengan cara mengetahui gambaran histopatologis pada membran *chorioallantois* yang terinfeksi oosista dan sporosista *Eimeria tenella* pada telur ayam.

## MATERI DAN METODE

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah oosista dan sporosista yang dilarutkan dalam larutan PBS yang ditambah dengan cairan empedu sebanyak 25 % dan dipersiapkan secara steril dengan antibiotik penicillin 100 IU/ml, streptomycin 100 µg/ml dan fungizone 0,01 %, dan 50 butir telur ayam berembrio.

Alat yang digunakan yaitu Sentrifus, saringan ukuran 100, 200 dan 325 mesh untuk memisahkan oosista dari kotoran, *glass beads* untuk memecah oosista, pipet Pasteur dan *disposable syringe* untuk memasukkan oosista dan sporosista ke dalam telur.

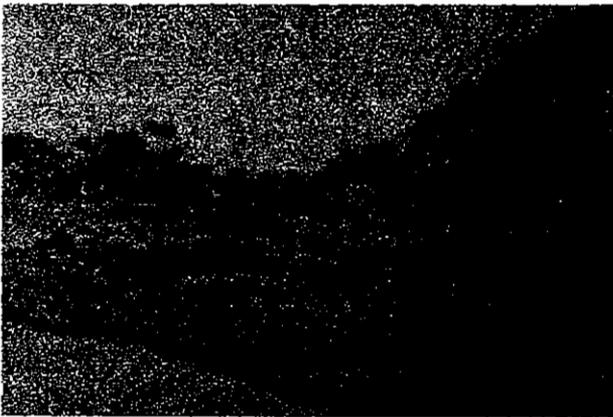
Metode perbanyakan oosista *Eimeria tenella* dilakukan dengan mensporulasikan oosista yang diperoleh dari lapangan di Laboratorium Parasitologi dengan cara memberi larutan kalium bikromat 2 % selama 2 hari. Selanjutnya oosista diinfeksi ke ayam umur 1 - 2 minggu dengan menggunakan dosis 5.000 oosista. Pada hari ke 6 setelah infeksi dilakukan pengambilan secara bertahap dari kotoran dengan menggunakan saringan 325, 200, 100 mesh. Hasil dari penyaringan selanjutnya disporulasikan dalam larutan bikromat 2 % selama 2 hari. Oosista yang sudah bersporulasi dipisahkan dari material feses yang lebih kecil dengan metode pengapungan menggunakan larutan gula 40 % (*sucrose cushion*) dengan perbandingan 1 : 1. Oosista hasil pengapungan dicuci 3 kali dengan larutan PBS dan disentrifus 3000 rpm. Untuk memperoleh sporosista, oosista yang telah disporulasi dipecah dengan menggunakan *glass beads* yang dicampur dengan larutan Clorox dan divortek selama 15 menit. Oosista dan sporosista yang terkumpul kemudian masing-masing dicuci dengan larutan PBS dengan cara sentrifugasi 3.000 rpm selama 10 menit sebanyak 3 kali dan dipersiapkan ke dalam 2 tabung steril. Tabung pertama dipersiapkan 1 x 10<sup>5</sup> sporosista per milliliter dan tabung ke dua berisi 2 x 10<sup>5</sup> oosista per milliliter, sedang sporosista dipersiapkan pada 2 tabung yang masing-masing isi 5 x 10<sup>6</sup> sporosista per milliliter (tabung 3) dan 1 x 10<sup>6</sup> sporosista per milliliter (tabung 4). Ke dalam masing-masing tabung ditambahkan cairan empedu ayam sebanyak 25 % dan disterilisasi dengan *penicillin* 100 IU/ml, *streptomycin* 100 µg/ml dan *fungizone* 0,01 %.

Telur-telur berembrio umur 10 hari yang digunakan untuk penelitian dikelompokkan secara acak menjadi 5 kelompok, masing-masing terdiri dari 10 butir telur berembrio. Kelompok I, telur

diinfeksi dengan 5.000 oosista (0,2 ml larutan tabung 1); kelompok II diinfeksi dengan 10.000 oosista (0,2 ml larutan tabung 2); kelompok III diinfeksi dengan 25.000 sporosista (0,2 ml larutan tabung 3); kelompok IV diinfeksi dengan 50.000 sporosista (0,2 ml tabung 4) dan kelompok V diperlukan sebagai kelompok kontrol. Telur-telur berembrio tersebut diinkubasikan pada suhu 41°C selama 6 hari. Mulai hari ke dua setelah infeksi, dua telur dari masing-masing kelompok dibuka kulitnya, membran *Chorioallantois* diamati untuk melihat perubahannya. Selanjutnya dipotong dan dimasukkan ke dalam larutan formalin 10 % untuk dibuat preparat histologik. Perlakuan ini diulang setiap hari hingga hari ke enam setelah infeksi. Perubahan membran *chorioallantois* telur diamati secara makroskopik dan mikroskopik.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

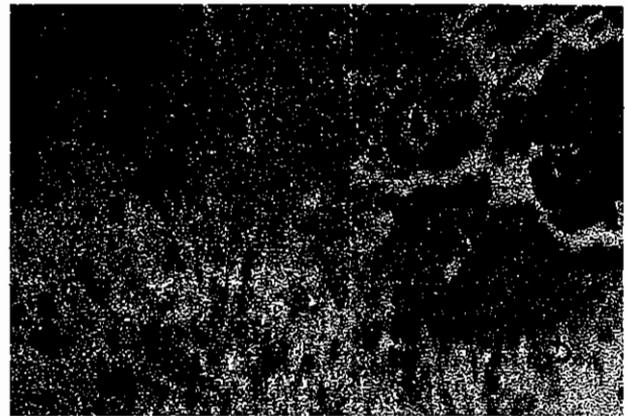
Penelitian ini menggunakan tambahan cairan empedu 25 % ke dalam larutan yang mengandung oosista maupun sporosista. Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa secara makroskopik



**Gambar 1.** Perubahan mikroskopik membran *chorioallantois* telur ayam pada hari ke 2 setelah diinfeksi dengan sporosista yang ditambah cairan empedu 25 %, tampak sel epitel membengkak (a) dan sporozoit (b)

membran *chorioallantois* yang telah diinfeksi sporosista yang diberi cairan empedu terdapat perdarahan (mulai 2 hari setelah infeksi). Gambaran makroskopik dari telur yang diinfeksi dengan oosista hanya menunjukkan sedikit perdarahan akibat akumulasi oosista pada lokasi tersebut. Sedang telur-telur kelompok kontrol tidak

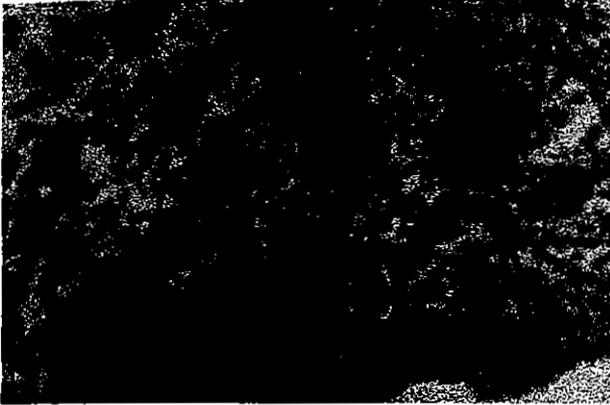
menunjukkan perubahan. Perdarahan yang terjadi pada telur yang diinfeksi dengan sporosista diduga sebagai akibat keluarnya merozoit generasi I atau merozoit generasi II dari skizont yang ada di dalam sel-sel epitel membran *chorioallantois*, sehingga terjadi kerusakan epitel-epitel tersebut dan pembuluh darah disekitarnya hingga tampak terjadi perdarahan. Kerusakan sel-sel epitel tersebut juga pernah dibuktikan oleh Jensen (1983) bahwa merozoit yang terbentuk di dalam skizon yang ada di dalam sel-sel kultur ginjal dapat keluar dari skizon dan menyebabkan kerusakan-kerusakan sel-sel kultur.



**Gambar 2.** Perubahan mikroskopik membran *chorioallantois* telur ayam berembrio pada hari ke 3 setelah diinfeksi dengan sporosista yang ditambah cairan empedu 25 % tampak di dalam sel epitel ada skizon generasi I kecil (a) dan skizon generasi I besar (b). (H&E : 400x)

Perubahan histopatologik membran *chorioallantois* yang diinfeksi sporosista yang ditambah dengan cairan empedu menunjukkan bahwa pada hari ke 2 setelah infeksi sporosista, sel epitel membran *chorioallantois* membesar dan di dalamnya terdapat parasit yang menyerupai buah pisang (Gambar 1), parasit tersebut adalah sporozoit yang masuk ke dalam sel hospes. Hari ke 3 setelah infeksi sebagian epitel membran *chorioallantois* sudah terdapat skizon generasi I, dimana ada bentukan bangunan bulat padat yang berada di dalam sel epitel (seperti pada Gambar 2). Hari ke 4 setelah infeksi tampak sebagian epitel membesar dan di dalamnya terdapat makrogamet (gamet betina) berbentuk bulat dengan inti ditengah dan di bagian tepinya terdapat bintik-bintik kecil

melingkar mengelilingi inti, gambaran lain berupa skizon yang di dalamnya terdapat sekumpulan merozoit yang padat serta ada gambaran stadium zigot di epitel yang lain. Sementara hari ke 5 setelah infeksi sebagian sel epitel tampak ada stadium zigot atau bahkan sudah dalam bentuk oosista yang belum bersporulasi, dimana sudah



**Gambar 3.** Perubahan mikroskopik membran *chorioallantois* telur ayam berembrio pada hari ke 5 setelah diinfeksi dengan sporosista yang ditambah cairan empedu 25 %, tampak di dalam sel epitel ada zigot atau bahkan sudah menjadi oosista (a). (H&E : 400x).

terdapat inti ditengah dan bagian plasma tampak lebih padat dan di bagian yang tepi sudah ada dinding tebal (Gambar 3). Sedang perubahan histopatologik membran *chorioallantois* yang telah diinfeksi oleh oosista yang ditambah dengan cairan empedu tampak tidak menunjukkan adanya gambaran perkembangan stadium *Eimeria tenella*, baik mulai hari ke 2 hingga hari ke 5, hanya menunjukkan gambaran oosista yang mengalami nekrosis, yakni dinding di bagian tepi masih tampak tebal dan di dalamnya tampak kosong yang hanya terisi sporosista yang memadat (Gambar 4) Histopatologik membran *chorioallantois* telur kelompok kontrol tidak menunjukkan perubahan dan tidak menunjukkan adanya stadium koksidia.

Pemberian cairan empedu ternyata mampu meningkatkan kemampuan sporozoit keluar dari dinding sporosista, tetapi tidak untuk oosista, hal ini disebabkan empedu atau garam-garam empedu akan meningkatkan motilitas sporozoit di dalam sporosista, dengan gerakan yang kuat dari sporozoit maka dinding sporosista akan robek, terlebih lagi dalam kondisi adanya CO<sub>2</sub> yang berada di dalam

telur yang akan meningkatkan permeabilitas dinding sporosista. Hal ini juga dikemukakan oleh Soulsby (1986) bahwa kondisi dimana CO<sub>2</sub> dan enzim tripsin yang optimum mampu meningkatkan permeabilitas *micropyle* sporosista, disamping itu empedu dapat memberi fasilitas tripsin masuk ke dalam sporosista dan mendigesti *micropyle*



**Gambar 4.** Perubahan mikroskopik membran *chorioallantois* telur ayam berembrio pada hari ke 5 setelah diinfeksi oosista yang ditambah dengan cairan empedu 25 %, tampak oosista masih utuh dan isi di dalamnya mengalami nekrosis (a). (H&E : 400x).

sehingga sporozoit dapat keluar dari sporosista. Selain itu juga empedu atau garam-garam empedu mampu meningkatkan motilitas sporozoit di dalam sporosista yang sangat berfungsi dalam proses eksistasi sporozoit (Jensen, 1983). Perlakuan oosista pada penelitian ini tidak menunjukkan perkembangan lebih disebabkan oleh sifat fisik dari dinding oosista yang lebih tebal dibanding dengan sporosista sehingga sporosista dan sporozoit untuk dapat keluar dari oosista memerlukan proses mekanik, seperti yang terjadi pada hospesnya (ayam). Seperti yang dikemukakan Reid *et al.* (1984) bahwa oosista infeksiif akan tertelan ayam melalui makanan dan minuman dan setelah mencapai ventrikulus oosista tersebut pecah sebagai akibat aksi mekanik lambung atau CO<sub>2</sub> dan membebaskan sporozoit oleh aktivasi empedu dan tripsin. Dari perkembangan *Eimeria tenella* yang ada tampaknya tidak jauh berbeda dengan perkembangan di hospes, seperti diketahui bahwa periode prepaten untuk *Eimeria tenella* pada hospes terjadi dalam waktu antara 4 – 7 hari setelah terjadi infeksi (Urquhart *et al.* 1987). Dalam penelitian ini pada hari ke 4 setelah infeksi sporosista telah

didapatkan gambaran stadium skizon generasi II dan makrogamet sudah terbentuk dan adanya kerusakan epitel.

#### KESIMPULAN

Inokulasi sporosista *Eimeria tenella* ditambah cairan empedu 25% sebagai pemicu pada membran *chorioallantois* dapat menyebabkan perkembangan ke stadium berikutnya. Inokulasi oosista *Eimeria tenella* pada membran *chorioallantois* tidak terjadi perkembangan stadium dari *Eimeria tenella*. Membran *chorioallantois* telur ayam berembrio dapat digunakan sebagai medium kultur parasit *Eimeria tenella*.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 1999. "Standarisasi Kualitas Produksi Ternak di Indonesia Untuk Pemenuhan Gizi Masyarakat". Seminar Nasional FKH UGM. Yogyakarta 27 Maret 1999.
- Gordon, R.F., 1977. *Poultry Disease*. Bailliere Tindall. London 126 - 133.
- Jensen, J.B., 1983. *In vitro Cultivation of Protozoan Parasites*. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida. 24 - 38.
- Levine, N.D., 1983. *Veterinary Parasitology*. Burgess Publishing Company. Minnesota. 73 - 88.
- McDougald, L.R. and Reid, W.M., 1991. *Coccidiosis in Disease of Poultry*, 9<sup>th</sup> Ed. Edited by Calnek, B.W., Barnes, H.J., Reid, W.M. and Yordder, H.W., Iowa State University Press, Iowa USA. 782 - 785.
- Reid, W.M., Long, L. and McDougald, L.R., 1984. *Coccidiosis in Disease of Poultry*, 8<sup>th</sup> Ed. Edited by Hoffstad, M.S., Barner, H.J., Calnek, B.W., Reid, W.M. and Yordder, H.W. The Iowa State University Press, Iowa USA. 693 - 708.
- Soulsby, E.J.L., 1986. *Helminths, Arthropods and Protozoa of Domestic Animals*. 7<sup>th</sup> Ed. Bailliere Tindall, London. 507 - 645.
- Sainsbury, D., 1992. *Poultry Health and management Chickens, Turkey, Ducks, Geese, Quail*. 3<sup>rd</sup> Ed. Blackwell Scientific Publication, London-Edinburg-Boston.
- Shirley, M.W. 1995. Biological Principle of Live Attenuated Vaccines. *Magyar Allatorvasaklapja* 51 (1) : 23 - 145.
- Urquhart, G.M., Armour, J., Duncan, J.L., Dunn, A.M. and Jennings, F.W., 1987. *Veterinary Parasitology*. ELBS. 217 - 223.