

MAJALAH

**KUMPULAN ALIH BAHASA DI
BIDANG PETERNAKAN DAN
KESEHATAN HEWAN**

**DISUSUN OLEH :
CECEP SASTRAWILUDIN, S.Pt
PARAMEDIK VETERINER MAHIR**

**EDISI 7
JUNI 2021**

MAJALAH

**KUMPULAN ALIH BAHASA DI
BIDANG PETERNAKAN DAN
KESEHATAN HEWAN**

EDISI 7

TAHUN 2021

**CECEP SASTRAWILUDIN, S.Pt
PARAMEDIK VETERINER MAHIR**

DAFTAR ISI

No.	Judul	Halaman
1	Operasi Caesar Sapi di Lapangan	1
2	Deteksi Isolat Lokal Pengkodean Gen OMP31 Brucellocis Protein OMP 31kDa dengan Reaksi Rantai Polimerase	20
3	Resistensi Bakteri dari Enterobakteri terisolasi di Aljazair Barat	25
4	Jumlah dan Jenis Bakteri di Vagina Sapi Bali selama Estrus dan Bunting	33
5	Pengaruh hyperacetylasasi histon terhadap perkembangan praimplantasi embrio sapi sexing jantan dan betina	39

Operasi Caesar Sapi di Lapangan

Kenneth D. Newman, DVM, MS

Rumah Sakit Hewan Prescott, 2725 Edward Street North, Prescott, Ontario, K0E1T0, Kanada

Tujuan ideal dalam melakukan operasi caesar adalah pelestarian sapi dan anak sapi dan efisiensi reproduksi sapi di masa depan. Baik breed (misalnya, susu versus daging sapi) dan pengalaman cenderung mempengaruhi frekuensi, kemudahan, dan keberhasilan prosedur ini. Praktik susu cenderung melakukan operasi caesar lebih sedikit, tetapi ini terjadi sepanjang tahun. Sebagai perbandingan, operasi caesar dalam praktik daging sapi sangat banyak dan sangat terkonsentrasi selama akhir musim dingin dan awal musim semi. Selain itu, kondisi cuaca buruk yang terkait dengan praktik melahirkan sapi memerlukan fasilitas peternakan yang sesuai untuk melakukan operasi caesar. Suhu lingkungan sekitar di beberapa wilayah di Amerika Utara mungkin tidak selalu kondusif untuk operasi di peternakan, terutama di beberapa operasi daging sapi. Sejumlah variabel menentukan apakah prosedur berhasil. [1–3]. Untuk alasan ini, adalah bermanfaat untuk mengkategorikan operasi caesar sebagai prosedur elektif, darurat (nonemphysematous), atau emphysematous. Artikel ini mencakup indikasi, pendekatan, anestesi, dan teknik bedah untuk operasi caesar di lapangan.

Indikasi

Indikasi untuk melakukan operasi caesar meliputi faktor ibu dan janin [1,2,4]. Indikator ibu meliputi: sapi dara yang belum matang, kelainan bentuk panggul, kegagalan dilatasi serviks, torsi uterus yang tidak dapat dikoreksi, robekan rahim, hidrops, dan kelumpuhan prepartum.[4]. Faktor risiko pada sapi meningkat pada umur sapi dara jika berumur kurang dari 2 tahun (odds ratio 3,09 dibandingkan dengan sapi multiparus), masa kebuntingan yang lama, selang waktu yang lama dari pertama lahir sampai pembuahan, masa kering yang panjang, Berotot[5,6] (rasio odds 10,85 dibandingkan dengan breed tidak berotot ganda) [7] atau pejantan Piedmont (rasio odds 4,26 dibandingkan dengan pejantan jenis lain), dan sebelumnya melahirkan dengan operasi caesar (rasio odds 18,89 dibandingkan dengan mereka yang pernah melahirkan normal sebelumnya) [7]. Indikator janin meliputi kondisi janin normal dan patologis [2,4].

Kondisi janin normal terdiri dari ukuran janin yang terlalu besar (relatif terhadap ukuran panggul ibu yang normal) dan malposisi. Anak sapi yang bernilai tinggi, seperti transfer embrio atau kloning, dapat menjadi indikasi untuk operasi caesar elektif. Kondisi janin patologis meliputi anasarka janin, refleksi schistosomus, hidrosefalus, kembar siam, emfisematous, mumifikasi, dan gestasi yang lama. Tergantung pada keadaan, termasuk ketersediaan fetotom dan pengalaman praktisi, fetotomi tidak selalu merupakan pilihan yang layak. Tidak disarankan untuk melakukan fetotomi jika pembukaan serviks tidak lengkap, atau jika rahim berkontraksi dengan kuat atau rapuh.[4].

Pemilihan kasus

Pemilihan kasus cenderung diabaikan oleh klien dan dokter hewan. Ketika operasi caesar dianggap sebagai pilihan terakhir, hasil negatif lebih mungkin terjadi; Oleh karena itu, operasi caesar cenderung menjadi ramalan yang terpenuhi dengan sendirinya[1,3,8,9]. Ketika operasi caesar dipilih pada awal kasus distosia, prosedur ini lebih bermanfaat dan klien lebih setuju untuk operasi caesar di masa depan. Mengkategorikan prosedur sebagai prosedur elektif, darurat (nonemphysematous), atau emphysematous bermanfaat, karena hasil yang diharapkan dan komplikasi yang diantisipasi secara dramatis berbeda untuk ketiga situasi ini.

Kondisi sapi pada saat operasi diakui sebagai penentu utama yang mempengaruhi hasil [1–3,8,10]. Sapi yang menjalani operasi seksio sesaria elektif cenderung tidak mengalami komplikasi intraoperatif dan pascaoperasi. Sapi yang menjalani operasi caesar darurat (misalnya, malpresentasi atau torsi uterus) lebih mungkin mengalami komplikasi intraoperatif dan pascaoperasi (misalnya, peritonitis) dan kecil kemungkinannya untuk bertahan hidup. Penilaian klinis yang cepat (misalnya, kurang dari 20 menit) dikaitkan dengan peningkatan hasil yang berhasil dalam dua survei praktisi[9,11] dan dalam pengalaman penulis. Kasus kegawatdaruratan yang ideal adalah sapi yang telah bersalin singkat, yang memiliki anak sapi hidup, dan keputusan untuk melakukan operasi caesar dibuat dengan cepat tanpa manipulasi obstetrik yang berkepanjangan baik oleh klien atau dokter hewan yang merawat. Manipulasi yang berlebihan oleh pemilik dan dokter hewan tanpa membuat kemajuan menuju keberhasilan melahirkan anak sapi dikaitkan dengan komplikasi pasca operasi yang lebih tinggi. Jika kaki depan dan kepala tidak dapat dimanipulasi ke dalam jalan lahir, keputusan untuk melakukan operasi caesar harus segera dilakukan. Selanjutnya, untuk mengakomodasi pinggul yang lebih besar yang terkait dengan breed sapi, harus ada ruang yang cukup di saluran panggul untuk kepala anak sapi dan kaki depan,

Pendekatan

Pendekatan tradisional telah dijelaskan dengan baik dalam literatur sebelumnya [1-4,12,13]. Pengekangan yang tepat (berdasarkan breed), ruang, cahaya, bantuan yang tersedia, lokasi, dan pengalaman dan kepercayaan dokter hewan [4] adalah masalah yang perlu dipertimbangkan sehubungan dengan alasan yang mendasari untuk melakukan operasi caesar, karena ini dapat menentukan pendekatan bedah [1,4,12]. Dua pilihan utama adalah apakah akan melakukan operasi pada sapi yang berdiri atau berbaring. Bergantung pada perilaku sapi, pendekatan telentang menggunakan sedasi dan mengikat kaki ke depan dan belakang mungkin lebih tepat jika tidak ada saluran. Jika sapi mungkin tidak tetap berdiri selama operasi, mungkin lebih mudah untuk memulai dengan dia dalam posisi berbaring daripada membuatnya jatuh intraoperatif. Pendekatan telentang memfasilitasi eksteriorisasi uterus, terutama bila terdapat janin yang terlalu besar (misalnya, emfisematous), sehingga mengurangi kemungkinan kontaminasi rongga perut.[12] Pendekatan telentang dapat berupa garis tengah atau langsung di atas tanduk hamil (misalnya, paramedian atau sayap rendah) [12].

Pendekatan ank berdiri dapat dilakukan dari kiri atau kanan, tetapi lebih sering dilakukan dari kiri [1,4,11,12]. Keuntungan utama dari pendekatan kiri adalah bahwa rumen mencegah pengeluaran isi usus kecil. Prolaps rumen dapat terjadi jika sapi mengejan selama operasi, yang dapat mencegah manipulasi dan eksteriorisasi uterus. Anestesi epidural caudal dapat mengurangi ketegangan perut. Prolaps rumen juga dapat dikurangi dengan menggunakan selang lambung sebagai selang naso-trakea untuk menghambat penumpukan tekanan perut positif. Dalam kasus yang paling ekstrim (misalnya, sapi bawah), penulis telah melakukan rumenotomi untuk menghilangkan isi rumen yang cukup untuk memfasilitasi penyelesaian operasi caesar tanpa mempengaruhi hasil sapi dan anak sapi. Ketika kehamilan terletak di tanduk kanan, beberapa praktisi merasa lebih mudah untuk menggunakan pendekatan yang tepat untuk mengeksteriorisasi tanduk gravid. Pendekatan miring kiri pada sapi yang berdiri telah dijelaskan oleh Paroki dan rekan-rekannya [14]. Teknik ini mungkin berguna saat mengeluarkan betis besar atau ketika isi rahim terkontaminasi. Sayatan ini lebih besar dan memanjang lebih kranial-ventral dibandingkan dengan sayatan vertikal tradisional. Insisi dimulai 10 cm kranial dan 8-10 cm ventral ke aspek kranial tuber coxae. Sayatan diperpanjang cranioventral pada sudut 45 derajat, berakhir 3 cm caudal ke rusuk terakhir. Apeks kornu uteri lebih mudah dijangkau, sehingga memudahkan manipulasi dan eksteriorisasi uterus. Oblique abdomen bagian dalam diinsisi sejajar dengan serat otot; jeroan perut memberikan ketegangan pada otot ini, yang menyebabkan aposisi selama penutupan.

Beberapa produsen memiliki fasilitas pemanas ketika bantuan melahirkan atau operasi caesar diperlukan. Dalam situasi ekstrim (misalnya, gudang yang tidak dipanaskan dan suhu lingkungan jauh di bawah titik beku), lampu panas ditempatkan di atas bidang bedah secara efektif mencegah lapisan otot dan tangan penulis dari pembekuan intraoperatif. Atau, beberapa klinik memiliki fasilitas pengangkutan yang dipanaskan dan dilengkapi dengan saluran di mana operasi caesar dilakukan secara rawat jalan (Gambar 1). Keuntungan lain dari klinik pengangkutan adalah winch di atas kepala untuk memfasilitasi ekstraksi anak sapi secara intraoperatif. Selanjutnya, penulis mengamati bahwa sayatan kulit yang lebih kecil diperlukan dan beberapa operasi caesar dapat dilakukan secara berurutan dengan mudah saat winch digunakan.

Anestesi dan pengendalian

Sedasi mungkin diperlukan pada sapi yang gelisah. Meskipun xylazine hidroklorida adalah obat penenang yang paling banyak digunakan dalam praktik sapi, ia juga meningkatkan tonus uterus, sehingga membuat manipulasi dan eksteriorisasi uterus gravid lebih sulit.[1,15,16]. Karena xylazine mengubah anatomi laring dan faring dan merusak sensasi pada sapi perah dewasa[17], ada peningkatan risiko pneumonia aspirasi yang berkembang pasca operasi jika sapi yang dibius diposisikan baik lateral atau dorsal recumbency. Selanjutnya, xylazine juga dapat menyebabkan ataksia, efek yang tidak diinginkan saat melakukan operasi caesar berdiri.



Gbr. 1. Sistem chute dengan side bar yang dapat dilepas dan headgate yang dapat disesuaikan untuk fasilitas pengangkutan. Perhatikan lokasi winch yang dioperasikan dengan tangan di atas di sudut kiri belakang chute. Setelah insisi uterus dan pemasangan rantai pedet steril pada kaki pedet, klien kemudian mengoperasikan winch untuk memfasilitasi kelahiran pedet. Untuk meningkatkan keamanan dan kenyamanan selama operasi, matt karet ditempatkan di lantai yang berdekatan dengan parasut. (Courtesy of Rodney Webber, DVM, Rosthern, SK, Kanada.)

Di sebagian besar operasi susu, pengekangan diberikan terutama oleh halter dan "tail jack" yang dikelola oleh produsen. Ketersediaan saluran dalam operasi daging sapi bervariasi. Sapi potong yang pendiam dan berperilaku baik dapat dikendalikan secara memadai mirip dengan kebanyakan sapi perah; namun, tidak ada pengganti untuk saluran yang kokoh ketika berhadapan dengan sapi potong yang kurang kooperatif. Ketika halter adalah satu-satunya cara menahan diri pada sapi perah, penulis telah menemukan bahwa kombinasi 7,5 mg acepromazine maleate dan 10 mg butorphanol tartrat diberikan secara intravena memberikan sedasi yang memadai (kecuali sapi itu sudah dalam keadaan sangat bersemangat) untuk berdiri pembedahan tanpa menyebabkan ataksia atau peningkatan tonus uterus.

Kombinasi ketamin hidroklorida (0,04 mg/kg intramuskular [IM]), butorphanol tartrat (0,01 mg/kg IM), dan xylazine hidroklorida (0,02 mg/kg IM) dapat memberikan pengendalian kimiawi yang memuaskan selama 1 jam pada sapi yang sangat cemas; penulis telah menggunakan kombinasi ini untuk prosedur lain di peternakan dan mengantisipasi ini mungkin juga berguna untuk operasi caesar berdiri. Kombinasi yang lebih kuat dari ketamin hidroklorida (0,1 mg/kg IM), butorphanol tartrat (0,025 mg/kg IM) dan xylazine hidroklorida (0,05 mg/kg IM) memberikan pengendalian kimiawi yang memuaskan selama 30 menit tanpa menginduksi anestesi umum. Penulis telah menggunakan kombinasi ini untuk herniorrhaphy, amputasi cakar, dan perubahan gips di peternakan dan juga mengantisipasi ini akan memberikan sedasi yang memadai untuk operasi caesar telentang. Pemberian obat tambahan mungkin diperlukan dalam situasi tertentu untuk memperpanjang sedasi. Untuk rincian lebih lanjut dari kombinasi ini dan kombinasi lain yang berguna untuk pengendalian bahan kimia yang efektif, silakan lihat artikel yang ditulis oleh Abrahamsen di tempat lain dalam edisi ini.

Pendekatan bedah menentukan teknik anestesi lokal yang digunakan. Teknik anestesi lokal didokumentasikan dengan baik dalam literatur lain meningkatkan durasi dan

menurunkan toksisitas anestesi lokal dengan menyebabkan vasokonstriksi, komplikasi insisional, seperti penyembuhan tertunda dan pengelupasan kulit, telah dikaitkan dengan penggunaan lidokain dengan epinefrin untuk blok saluran. [21]. [1–3,18–21]. Teknik yang paling umum adalah paravertebral proksimal dan paravertebral distal, blok "L" terbalik, dan blok garis. Teknik yang digunakan mencerminkan preferensi ahli bedah; penulis merasa lebih efisien untuk memberikan paravertebral distal pada sapi yang kurang dikondisikan (misalnya, susu) dan paravertebral proksimal pada sapi yang lebih dikondisikan (misalnya, daging sapi). Meskipun blok paravertebral proksimal lebih menantang secara teknis dan membutuhkan lebih banyak pengekanan dan jarum panjang (minimal 20 gauge panjang 10 cm), blok ini menggunakan dosis anestesi lokal terkecil, memberikan daerah anestesi maksimum, dan menginduksi relaksasi otot panggul yang maksimal. Ketika fasilitas tidak memadai (tidak ada saluran) dan dongkrak ekor tidak cukup untuk mencegah sapi menendang, adalah mungkin untuk memberikan blok paravertebral proksimal ketika berdiri di sisi yang berlawanan dengan menjangkau daerah lumbal. Blok distal membutuhkan lebih sedikit keterampilan dan pengendalian dan dapat dilakukan dengan menggunakan jarum 18 gauge 1,5 inci. Blok ini bekerja dengan baik, asalkan suntikan anestesi lokal dikipas di atas dan di bawah tepi proses transversal. Blok garis adalah yang paling tidak menantang secara teknis, tetapi membutuhkan anestesi lokal dalam jumlah besar [18–20]. Meskipun epinefrin dilaporkan

Terlepas dari blok anestesi lokal mana yang diberikan, efektivitas blok harus selalu diuji sebelum memulai operasi. Pada kesempatan langka, penulis memiliki sapi yang merespon secara tidak teratur ketika antek anestesi diujidsapi itu tampaknya menendang ahli bedah secara acak tanpa rangsangan yang menyakitkan. Namun, anestesi panggul yang konsisten ditunjukkan ketika garis pandang sapi terhalang (misalnya, minta klien berdiri di samping bahu sapi). Solusi yang efisien adalah dengan menempatkan baik kantong pakan kosong atau rompi atau jaket di atas mata sapi dan menahannya di tempat dengan tali pengikat untuk mengurangi isyarat visual sapi selama operasi.

Anestesi epidural kaudal [18–21] menggunakan 2% lidokain hidroklorida, yang menurunkan kepekaan akar saraf kaudal saat mereka muncul dari dura, sering diindikasikan jika manipulasi betis atau obstetrik telah memulai kontraksi perut yang kuat (refleks Ferguson) dan seharusnya tidak mempengaruhi kontrol motorik tungkai belakang asalkan berlebihan volume tidak diberikan. Sebuah epidural ekor xylazine telah dijelaskan dalam literatur lain [21–24]. Xylazine, (0,05–0,07 mg/kg) diencerkan dengan 0,09% natrium klorida untuk menghasilkan volume akhir 5 hingga 7,5 mL. Sapi menjadi sedikit ataxic (tetapi tetap berdiri) pada 80% kasus. Xylazine epidural memiliki onset tertunda sekitar 30 menit, dan anestesi lokal tambahan diperlukan pada 15% hingga 20% sapi. [24]. Oleh karena itu, teknik ini mungkin bukan yang paling efisien dalam situasi lapangan. Teknik ini dapat digunakan bersama dengan teknik lokal untuk meningkatkan sedasi dan analgesia pada pasien yang kurang kooperatif. Sebagian dari volume natrium klorida 0,9% dapat diganti dengan lidokain 2% untuk anestesi epidural kaudal yang lebih lengkap. [20]. Sebagai alternatif, anestesi epidural anterior dapat memberikan anestesi ank [19,21], tetapi kemungkinan epidural yang paling menantang secara teknis untuk diberikan [21]. Berbeda dengan epidural ekor, epidural anterior mempengaruhi kontrol motorik tungkai belakang [19,21]. Jika epidural tidak diberikan, ekor harus selalu diikat ke kaki sapi untuk

mencegah kontaminasi intraoperatif. Setelah pemberian epidural, tail jack tidak lagi efektif dalam memberikan penahan tambahan jika diperlukan.

Persiapan pasien

Rincian persiapan pasien telah dilaporkan sebelumnya dalam literatur lain [25,26]. Pencabutan rambut dengan menggunting saja telah dilaporkan memicu reaksi kulit yang lebih sedikit tanpa perbedaan yang signifikan pada infeksi insisional dibandingkan dengan menggunting dan mencukur.[27]. Untuk memfasilitasi persiapan pasien secara cepat di peternakan, penulis biasanya memberikan blok anestesi lokal distal atau paravertebral sebelum kliping. Area yang dipotong harus memanjang 20 cm hingga 30 cm di kedua sisi sayatan yang dimaksud[25].

Karena penulis cenderung tidak menggunakan tirai untuk operasi caesar berdiri di lapangan, kliping dan pembersihan area yang lebih besar (terutama ventral untuk sayatan yang dimaksudkan) kemungkinan mencegah kontaminasi (Gambar 2.). Sapi dengan bulu tebal (misalnya, sapi potong) dapat dipotong secara efisien hanya dalam beberapa menit dengan menggunakan sepasang gunting besar (Oster Clipmaster Clipper, Sunbean Products Inc., Boca Raton, Florida) dan pisau standar. Situs sayatan yang dimaksud dipotong menggunakan pisau #40 (Oster Golden A5, Sunbean Products Inc., Boca Raton, Florida) Penulis biasanya menggunakan scrub klorheksidin glukonat sampai permukaan kulit tampak cukup bersih, yang diikuti dengan isopropil alkohol dan povidon -larutan yodium. Ada lebih sedikit unit pembentuk koloni dan kultur negatif setelah dicuci dengan klorheksidin glukonat dibandingkan dengan povidon-iodin.[28]. Klorheksidin glukonat cenderung tidak menutupi derajat kebersihan, karena penggunaannya memerlukan pengamatan saat permukaan kulit cukup bersih dibandingkan dengan povidon-iodin.

Persiapan ahli bedah

Rincian persiapan ahli bedah telah dilaporkan dalam literatur sebelumnya [25,26]. Paket operasi harus dipasang di lokasi aman yang berdekatan dengan ahli bedah. Tabel operasi dadakan dapat dibuat dari satu atau dua balok persegi yang dipasang di belakang ahli bedah. Direkomendasikan gaun kedap air[29]. Penulis lebih suka memakai setelan obstetrik dua potong (OB suit J-30SR, Jorgensen Laboratories Inc., Loveland, Colorado) untuk kenyamanan, terutama di iklim yang lebih dingin agar tetap kering dan hangat. Jika kondisi hangat, bagian atas dapat dilepas dengan mudah dan sarung tangan lateks baru dikenakan setelah betis dilepas dan jahitan insisi uterus ditutup. Karena kondisi lingkungan yang ada selama operasi bovine field, topi dan masker tidak diperlukan; namun, sarung tangan bedah lateks steril dan lengan plastik sangat direkomendasikan[25]. Ketika plastik



Gbr. 2. Area yang direkomendasikan untuk dipotong selama persiapan pasien untuk pendekatan paralumbar kiri atau oblik untuk operasi caesar. (Courtesy of Matt D.Miesner, DVM, MS, Manhattan, KS.)

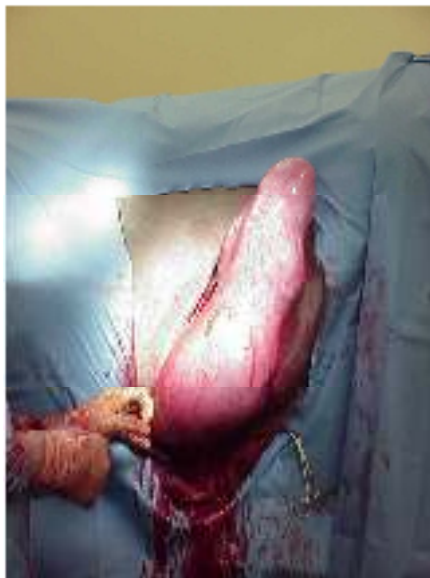
lengan dikenakan dengan sarung tangan lateks, ujung lengan plastik dapat dipotong untuk meningkatkan sensasi sentuhan [25]. Rantai anak sapi yang steril juga direkomendasikan untuk memfasilitasi pelepasan anak sapi. Diperlukan minimal satu asisten yang mampu secara fisik. Waktu yang ideal untuk menginstruksikan asisten tentang kapan dan bagaimana membantu selama operasi adalah ketika ahli bedah sedang mempersiapkan; kadang-kadang pengingat diperlukan intraoperatif jika asisten tampak terlalu ingin memberikan bantuan.

Teknik bedah

Rincian teknik bedah untuk melakukan operasi caesar dijelaskan dengan baik dalam literatur lain [1-4,18]. Sayatan dinding perut harus cukup besar untuk mengeluarkan janin dengan aman. Sayatan kecil di perut cenderung meningkatkan tingkat kesulitan dalam mengeluarkan janin dan meningkatkan risiko emfisema subkutan dan pembentukan seroma. Setelah mengidentifikasi rahim, bagian rahim yang berisi kaki belakang ditarik ke atas ke sayatan perut dengan meraih metatarsal betis. Menempatkan satu tangan di bawah hock dan yang lainnya pada aspek punggung pastern memfasilitasi "mengunci" kaki ke dalam sayatan perut (Gambar. 3 dan 4). Dengan presentasi sungsang atau posterior, tungkai depan digenggam. Hal ini meningkatkan tingkat kesulitan eksteriorisasi uterus dan mungkin memerlukan insisi yang lebih besar. Lengkungan rahim yang lebih besar harus dieksteriorisasi, dan dengan menggunakan pisau bedah kedua, sayatan harus dibuat di sepanjang kelengkungan rahim yang lebih besar, menghindari pembuluh darah besar dan karunkel. Memulai sayatan di bagian paha dan memperluas sayatan ke arah distal ke arah kaki akan mencegah rahim meluncur ke bawah di sekitar kaki betis. Jika tanduk gravid terletak di seberang sayatan paralumbar, rahim dapat



Gbr. 3. Dengan memegang hock dan fetlock, uterus dapat dimanipulasi sampai ke sayatan dan dieksteriorisasi. (Courtesy of Matt D.Miesner, DVM, MS, Manhattan, KS.)



Gambar 4. Rahim terkunci pada sayatan. (Courtesy of Matt D.Miesner, DVM, MS, Manhattan, KS.)

dimanipulasi dan dieksteriorisasi. Pertama, raih dengan kedua tangan di bawah rahim gravid dan kunci tangan di sekitar aspek dorsal tanduk rahim gravid. Kedua, tarik ke bawah dan ke arah ahli bedah dengan kedua tangan untuk menyelesaikan rotasi. Namun, menjahit sayatan rahim yang tertutup setelah ekstraksi janin akan lebih sulit, karena rahim yang robek cenderung mengoreksi diri.

Sayatan rahim yang kecil meningkatkan risiko robekan rahim, yang biasanya terjadi pada sudut miring ke sayatan rahim dan meningkatkan tingkat kesulitan dalam penutupan rahim. Robekan rahim selama operasi menyumbang 6,8% dari komplikasi[30], yang sebanding dengan pengalaman penulis. Tidak ada perbedaan yang diamati pada kelangsungan hidup sapi dengan robekan rahim dan apakah anak sapi itu hidup atau mati (kecuali janin emfisematous) pada saat operasi. Sayangnya, dampak robekan rahim pada pembentukan adhesi dan efisiensi reproduksi tidak diketahui.

Dalam keadaan ideal, tumpahan isi rahim ke dalam perut harus dihindari. Setelah kedua kaki dieksteriorisasi (dan kadang-kadang kepala jika berhadapan dengan presentasi

anterior), rantai anak sapi dapat ditempatkan pada kaki anak sapi untuk memfasilitasi ekstraksi janin. Saat betis dikeluarkan, rahim harus ditahan di tempatnya untuk mencegah tumpahnya isi rahim ke dalam perut. Proses ini dapat difasilitasi dengan menggunakan forsep penggenggam rahim sapi. Juga, tali pusat harus diregangkan dan dipecah secara terkendali dengan memegangnya berdekatan dengan dinding perut. Retraksi normal dan kontraksi arteri umbilikalisis mungkin terganggu oleh eksisi bedah tali pusat. Jika operasi caesar elektif dilakukan, perhatian harus diberikan pada pembuluh darah umbilikalisis, karena pembuluh darah tersebut tidak dipersiapkan untuk ruptur spontan dan lebih rentan terhadap perdarahan yang berlebihan. Penjepitan sementara arteri dan vena umbilikalisis mungkin diperlukan; namun, penulis telah mengamati peningkatan insiden pada infeksi pusar ketika pembuluh darah ini diligasi menggunakan bahan jahitan. Setelah sapi diangkat, selalu memeriksa betis kedua. Teknik yang disukai penulis adalah menggunakan lengan dalam gerakan menyapu di sekitar rahim untuk memaksimalkan eksteriorisasi rahim dan memfasilitasi penjahitan sayatan rahim. Jika plasenta mudah terlepas dari caruncles, plasenta harus dikeluarkan; jika tidak, potong bagian yang menggantung di luar rahim.

Jika pedet masih hidup dan uterus sehat (misalnya, prosedur elektif), satu lapis penutupan dengan bahan jahitan yang dapat diserap (misalnya, 3 chromic catgut) menggunakan jarum lancip sudah cukup. Penutupan dua lapis direkomendasikan jika anak sapi mati, jika diduga terdapat cairan uterus yang terkontaminasi (misalnya, prosedur darurat atau emfisematous), atau jika dinding uterus terganggu atau robek selama ekstraksi janin. Menutup rahim bisa lebih mudah dengan asisten memegang bagian dorsal tanduk rahim ke sayatan rahim dan membiarkan rahim menggantung ke bawah secara vertikal; kedua sisi insisi uterus lebih berlawanan, yang memudahkan penjahitan. Pola jahitan pembalik terus menerus (misalnya, Cushing, Utrecht, atau Lembert) yang tidak mengambil gigitan ketebalan penuh harus digunakan, karena mereka memberikan segel ketat, meminimalkan paparan jahitan, dan meningkatkan penyembuhan, karena rahim pada awalnya sembuh dengan kontak serosal-serosal. Penulis lebih suka menggunakan jahitan Cushing atau Utrecht, karena pola Lembert membutuhkan lebih banyak bahan jahitan, lebih banyak bahan jahitan yang terbuka, dan membutuhkan lebih banyak waktu untuk menyelesaikannya. Paparan jahitan (terutama pada simpul), daripada jenis bahan jahitan, dianggap sebagai penyebab perlengketan yang paling signifikan di sepanjang insisi uterus.

Di lapangan, #3 atau #4 chromic catgut (Chromicgut, Ethicon, Johnson & Johnson, Somerville, New Jersey) secara historis adalah bahan jahitan yang paling banyak digunakan dalam operasi sapi, karena ketersediaan, biaya, dan kenyamanan pengemasan. [25]. Catgut berasal dari sub-mukosa usus domba atau serosa usus sapi dan dikepang dan mudah ditangani, meskipun memiliki keamanan simpul yang buruk. Catgut polos kehilangan kekuatan tariknya dengan sangat cepat, sedangkan catgut chromic kehilangan 50% kekuatan tariknya setelah 7 hari. Kerusakan dipercepat dengan adanya infeksi. Karena kekhawatiran mengenai ensefalopati bovine spongiform, penggunaan catgut di negara-

negara tertentu yang terkena dampak dilarang[31]. Meskipun memiliki kekuatan tarik awal tertinggi dibandingkan dengan bahan jahitan lainnya, poliglekapron 25 (Monocryl, Ethicon, Johnson & Johnson, Somerville, New Jersey) juga memiliki kehilangan kekuatan tarik yang sangat cepat dan harus digunakan hanya untuk penutupan rahim dan bukan untuk penutupan rahim, otot atau linea alba. Polyglactin 910 (Vicryl, Ethicon, Johnson & Johnson, Somerville, New Jersey), polydioxanone (PDS, Ethicon, Johnson & Johnson, Somerville, New Jersey), dan polyglyconate (Maxon, Ethicon, Johnson & Johnson, Somerville, New Jersey) akan menjadi bahan jahitan yang tepat untuk penutupan rahim, otot, dan linea alba. Bahan sintesis memiliki keunggulan signifikan dibandingkan bahan biologis. Poliglaktin 910 memiliki keunggulan kualitas bahan yang seragam, tidak mudah rusak oleh instrumen bedah, memiliki kualitas penanganan yang unggul (yaitu, kurang kaku, lebih baik untuk mengikat simpul, dan tidak terlalu berjumbai), dan menyebabkan reaksi inflamasi ringan dibandingkan dengan poliglaktin 910 biasa. senar. Tidak diketahui apakah poliglaktin 910 menginduksi lebih sedikit pembentukan bekas luka di dalam miometrium, yang secara positif dapat mempengaruhi kesuburan di masa depan. Kerugian dari polyglactin 910 adalah peningkatan drag (karena dikepang) dan biaya. Dari bahan-bahan tersebut, penulis lebih memilih menggunakan poliglaktin 910, karena mudah ditangani; namun, kehati-hatian harus dilakukan karena keamanan simpul yang buruk. Meskipun poliglaktin 910 dikepang dan lebih rentan terhadap wicking bakteri karena aksi kapiler, bahan jahitan ini tetap stabil di lingkungan yang terinfeksi.

Gumpalan darah harus dihilangkan dengan lembut menggunakan irigasi dan tangan yang menggunakan sarung tangan, karena gumpalan ini dapat menimbulkan adhesi yang dapat mempengaruhi kesuburan di masa depan. Spons kasa tidak boleh digunakan untuk membersihkan rahim, karena ini menyebabkan lecet serosa, yang meningkatkan kemungkinan perlengketan rahim yang merugikan. Bursa ovarium harus diperiksa, karena bekuan darah dapat menempel di sana, menyebabkan perlengketan, dan mempengaruhi kesuburan di masa depan. Cairan isotonic, seperti salin fisiologis steril atau larutan elektrolit seimbang, dapat digunakan untuk membilas uterus. Setelah dibilas, rahim diganti di dalam perut. Kombinasi heparin (40 U/kg) dan potasium penisilin (22.000 U/kg), ceftiofur hidroklorida (1 mg/kg), atau oksitetrasiklin hidroklorida (200 mg/kg) dicampur dengan 500 mL 0. Larutan irigasi natrium klorida 9% yang ditanamkan di perut untuk lavage perut digunakan secara empiris (tergantung pada ahli bedah) sebagai bantuan untuk mengurangi pembentukan adhesi. Mengganti sarung tangan bedah baru setelah rahim ditutup berpotensi mengurangi risiko kontaminasi perut.

Dinding perut biasanya membutuhkan dua sampai tiga lapis penutupan. Peritoneum dan transversus biasanya ditutup dalam satu lapisan, menggunakan bahan jahitan yang dapat diserap (misalnya, 3 chromic catgut) dalam pola kontinu sederhana. Otot oblik internal dan eksternal ditutup bersama menggunakan bahan jahitan yang dapat diserap (misalnya, 3 chromic catgut) dalam pola kontinu sederhana. Untuk mengurangi ruang mati dan potensi pembentukan seroma, lapisan dapat ditempelkan secara berkala ke lapisan sebelumnya. Mengurangi ruang mati juga dapat menghambat pembentukan seroma dan infeksi

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

insisional[25]. Kulit dapat ditutup menggunakan bahan jahitan yang tidak dapat diserap (misalnya, 3 poliamida) dalam pola jahitan terus menerus, jahitan terputus sederhana, atau jahitan terputus sederhana (Gambar 5) Jika pola ford interlocking digunakan, rekomendasi saat ini adalah menempatkan beberapa jahitan terputus sederhana di dasar sayatan (Gambar 6). Jahitan ini dapat dilepas untuk memfasilitasi drainase jika terjadi infeksi insisional.



Gambar 5. Jahitan interlocking Ford untuk penutupan kulit. Perhatikan penggunaan jarum serpentine besar untuk mempercepat proses penjahitan. (Courtesy of Matt D.Miesner, DVM, MS, Manhattan, KS.)



Gambar 6. Foto jahitan ford interlocking yang lengkap untuk penutupan kulit setelah pendekatan miring kiri untuk operasi caesar. (Courtesy of Matt D.Miesner, DVM, MS, Manhattan, KS.)

Torsi uterus yang tidak dikoreksi menghadirkan dilema yang menarik bagi ahli bedah hewan; apakah seseorang melepas betis sebelum atau setelah mengoreksi torsi intraoperatif? Torsi uterus pada sapi biasanya diputar berlawanan arah jarum jam (63%) bila dilihat dari belakang sapi, dengan tanduk gravid kanan diputar di atas tanduk kiri[32]. Karena fossa paralumbar kiri kemungkinan, secara default, pendekatan yang paling umum, tanduk kanan gravid akan berdekatan dengan insisi dinding tubuh, yang memfasilitasi eksteriorisasi uterus. Namun, melepas betis terlebih dahulu cenderung membuat penjahitan insisi uterus lebih sulit tanpa asisten bedah. Sebagai alternatif, koreksi torsi sebelum pelepasan betis menempatkan tanduk kanan gravid berlawanan dari insisi dinding tubuh kiri, yang membuatnya sulit untuk mengeksteriorisasi uterus. Memilih pendekatan berdasarkan arah puntir mungkin merupakan solusi yang ideal. Misalnya, torsi berlawanan arah jarum jam dapat didekati dari fossa paralumbar kanan, torsi pertama dikoreksi secara intraoperatif, kemudian uterus dieksteriorisasi, betis diangkat, dan insisi uterus dijahit tertutup.

Perawatan pasca operasi

Penggunaan, jenis, dan frekuensi antibiotik bervariasi berdasarkan kasus per kasus. Tidak seperti prosedur yang dilakukan di lingkungan rumah sakit yang terkendali, operasi caesar yang dilakukan di peternakan secara rutin diberikan antibiotik. Antibiotik yang paling umum digunakan adalah penisilin G prokain (22.000 U/kg IM quaque (q) 24 jam selama 3-5 hari), oksitetrasiklin (6,6-11 mg/kg intravena, IM, atau subkutan (SQ) q 24 jam untuk 3-5 hari), atau ceftiofur hidroklorida atau ceftiofur sodium (1,1-2,2 mg/kg intravena, IM, atau SQ q12-24 jam selama 3-5 hari). Khususnya pada sapi potong, orfenicol (20 mg/kg IM q 48 jam atau 40 mg/kg SQ q96 jam) juga dapat digunakan. Di Kanada dan Amerika Serikat, aminoglikosida tidak boleh digunakan pada hewan penghasil makanan. Kepatuhan klien dapat meningkat saat menggunakan oksitetrasiklin atau orfenikol, karena antibiotik ini tidak memerlukan pemberian setiap hari. Dalam keadaan ideal, konsentrasi jaringan antibiotik yang tinggi harus ada pada saat operasi[33]. Oleh karena itu, idealnya antibiotik harus diberikan sebelum operasi. Ketika komplikasi pra operasi dan intraoperatif marginal (misalnya, anak sapi hidup, sapi memiliki rahim yang sehat, dan kontaminasi rongga perut minimal), penulis menggunakan penisilin G prokain (IM) dalam susu dan oksitetrasiklin (sebaiknya SQ) di sapi potong. Ketika komplikasi parah (misalnya, ada betis emfisematous, rahim terganggu, atau kontaminasi perut parah) dan risiko peritonitis tinggi, penggunaan ekstralabel oxytetracycline (20 mg/kg IV q 24 jam) diberikan setiap hari selama 5-7 hari (maksimum) bermanfaat berdasarkan pengalaman penulis. Perlakuan lebih dari 7 hari cenderung menghambat mikroflora dan motilitas rumen. Dalam beberapa keadaan, menempatkan 14 gauge 5. sebotol garam fisiologis atau dekstrosa) dapat memfasilitasi perawatan sehari-hari. Selanjutnya, pembilasan heparin-saline dapat dibuat dengan cepat menggunakan tabung pengumpul darah berwarna hijau. Ketika antibiotik digunakan, penarikan susu dan daging yang tepat harus diikuti. Jika diperlukan, penggunaan label tambahan antibiotik harus dilakukan dengan hati-hati dan dengan perhatian khusus untuk mencegah pelanggaran residu.

Untuk analgesia pascaoperasi, obat antiinflamasi nonsteroid, seperti unixin meglumine (2,2 mg/kg intravena setiap 12 jam selama 2-3 hari) atau ketoprofen (3 mg/kg intravena, IM setiap 24 jam selama 2-3 hari) akan menjadi pilihan yang tepat. Flunixinmeglumine juga mungkin berguna dalam mencegah pembentukan adhesi perut. Flunixin meglumine dilisensikan untuk penggunaan intravena pada sapi perah menyusui di Kanada dan Amerika Serikat. Saat ini, ketoprofen disetujui untuk digunakan pada sapi perah laktasi di Kanada tetapi tidak di Amerika Serikat, tetapi dapat digunakan di bawah Undang-Undang Penggunaan dan Klarifikasi Obat Hewan tahun 1994 atau mungkin disetujui di masa mendatang. Ketika obat anti-inflamasi nonsteroid digunakan, penarikan susu dan daging yang tepat harus diikuti. Jika diperlukan,

Komplikasi

Daftar ekstensif komplikasi pra operasi, operasi, pasca operasi, dan jangka panjang telah dilaporkan [10]. Komplikasi pra operasi meliputi: persalinan tertunda, anoreksia, kematian janin, janin emfisematous, ekstraksi paksa, kelainan janin, fraktur tungkai janin, inersia uterus, trauma uterus, ruptur uteri, obturator/sciatic nerve cowage, dan trauma berat selama manipulasi. Komplikasi operatif meliputi: trauma uterus berlebihan, kontaminasi rongga peritoneum, trauma gastrointestinal, dan trauma berlebihan pada dinding abdomen dan penutupan uterus yang tidak adekuat. Komplikasi pascaoperasi meliputi: peritonitis, pembentukan seroma, retensio plasenta, metritis, endometritis, dehiscence jahitan kulit, emfisema subkutan, perlengketan, mastitis, mengejan, dan kematian sapi atau anak sapi. Komplikasi jangka panjang termasuk: sapi yang lebih rendah, sapi yang lemah, kehilangan produksi, peningkatan interval melahirkan, peningkatan layanan per konsepsi, aborsi spontan,

Eksteriorasi rahim

Operasi sesar sapi dianggap sebagai prosedur bersih-terkontaminasi. Eksteriorasi uterus dan menghindari kontaminasi abdomen adalah yang paling penting saat menangani anak sapi yang mati atau setelah manipulasi obstetrik yang ekstensif. Komplikasi intraoperatif yang paling umum diamati dalam studi 1.000 seksio sesaria terjadi di luar rahim (20,8% sulit, 5,8% tidak mungkin) [30]. Ahli bedah yang lebih berpengalaman tampaknya memiliki lebih sedikit kesulitan dalam mengeluarkan rahim. Berdasarkan pengalaman penulis, sapi lebih mungkin bertahan hidup ketika rahim dieksteriorisasi selama operasi; ketika rahim tidak dieksteriorisasi, peningkatan kelangsungan hidup tercatat pada sapi yang memiliki janin hidup. Selanjutnya, peningkatan kelangsungan hidup diamati pada sapi di mana rahim dieksteriorisasi untuk mengeluarkan janin mati dibandingkan dengan ketika rahim tidak dieksteriorisasi.

Ketika rahim berkontraksi dengan kuat pada janin, akan lebih sulit untuk mengoreksi malpresentasi atau mengeluarkan rahim selama operasi caesar. Klor dan isoksuprin telah tersedia untuk praktisi sapi sebagai bantuan dalam manipulasi kebidanan[34,35]. Namun, obat-obatan ini saat ini tidak diizinkan untuk digunakan pada hewan penghasil

makanan di Amerika Utara. Dalam percobaan baru-baru ini menggunakan agonis reseptor B₂-adrenergik, ritodrin dan terbutalin secara efektif melemaskan miometrium dalam produk susu.[36] dan sapi potong [37], masing-masing. Penelitian lebih lanjut diperlukan sebelum agen tokolitik ini digunakan dalam kasus klinis. Isoxsuprine memiliki sifat simpatomimetik dengan kesamaan struktural dengan epinefrin[34]. Oleh karena itu, epinefrin mungkin memiliki sifat farmakologi tokolitik yang melekat. Dosis empirik 10 mL epinefrin 1:1000 yang diencerkan menggunakan sejumlah kecil cairan isotonik dan diberikan secara intravena 10 menit sebelum operasi tampaknya merelaksasi uterus, sehingga memfasilitasi eksteriorisasi uterus. Pemberian epinefrin pada sapi terpilih dengan distosia (misalnya, malpostur atau presentasi sungsang) telah cukup mengendurkan miometrium dalam banyak kasus untuk memfasilitasi manipulasi obstetrik dan persalinan pervaginam yang berhasil pada anak sapi menurut pengalaman penulis. Pada beberapa kesempatan, penulis mengamati ekskursi pernapasan berlebihan sementara dan hiperhidrosis umum pada sapi di mana epinefrin diberikan secara perioperatif, yang kemungkinan merupakan hasil dari pemberian yang cepat, dan sapi kembali normal pada akhir operasi. Penulis memperhatikan bahwa dinding rahim cenderung menipis, karena miometrium berelaksasi, yang membuat penutupan sayatan rahim menjadi lebih sulit. Jarum runcing kecil diperlukan untuk menghindari gigitan dengan ketebalan penuh, dan jahitan harus ditempatkan lebih rapat untuk memastikan penutupan rahim yang tepat.

Selaput janin tertahan

Plasenta sapi biasanya dilepaskan dalam waktu 24 jam setelah operasi [9]. Kegagalan untuk melepaskan plasenta dalam waktu ini dianggap sebagai selaput janin yang tertahan. Plasenta dikeluarkan dengan mudah selama operasi 6% dari waktu, dan 59% sapi melepaskan plasenta dalam waktu 12 jam setelah melahirkan[8]. Terjadinya retensi ketuban antara 35% dan 40,8% [8,38], yang umumnya diterima lebih tinggi dibandingkan dengan anak sapi tanpa bantuan. Dalam kasus ketika plasenta tidak dikeluarkan selama operasi, oksitosin (20 United States Pharmacopeia (USP) q 3 jam IM) dapat diberikan pada hari ke 2 dan 3 pasca melahirkan, kemudian meningkatkan dosis dan frekuensi oksitosin menjadi 30 USP q 2 jam pada hari ke 4[39]. Dosis yang lebih kecil diberikan lebih sering dianjurkan, daripada dosis tinggi kurang frekuensi. Dosis yang lebih kecil menginduksi kontraksi uterus yang produktif dengan cara tubuloservikal, sedangkan dosis tinggi tampaknya menyebabkan kejang seperti tetanik, yang dapat berlangsung antara 6 dan 10 menit.[39].

Penyerahan diri

Tingkat 14,8% sapi menjadi telentang intraoperatif telah dilaporkan dalam literatur lain [30]. Dipercaya bahwa sapi lebih cenderung menjadi telentang selama upaya untuk mengeluarkan uterus, karena rasa sakit yang timbul dari traksi pada ligamen luas selama manipulasi uterus yang sulit. Pemberian xylazine epidural sebelum operasi atau

butorphanol tartrat intraoperatif dapat mengurangi rangsangan nyeri. Sapi yang tetap berdiri selama prosedur memiliki peluang bertahan hidup yang lebih baik, dengan laporan tingkat kelangsungan hidup sapi 91%-94% dan tingkat kelangsungan hidup anak sapi 95%-100%[8]. Dalam pengalaman penulis, sapi yang jatuh intraoperatif lebih mungkin untuk mengembangkan peritonitis dan mengalami kematian pasca operasi yang lebih besar dibandingkan dengan sapi yang tetap berdiri selama operasi.

Kematian

Sebuah studi retrospektif yang mengamati 159 operasi caesar sapi perah menemukan korelasi kuat antara kelangsungan hidup sapi dan kelangsungan hidup anak sapi pada saat operasi. [38]. Kelangsungan hidup sapi menurun dari 86% dengan anak sapi hidup, menjadi 79% dengan anak sapi mati, menjadi 33% dengan janin emfisematous. Waktu operasi lebih dari 1 jam mengurangi tingkat kelangsungan hidup sapi dari 96% menjadi 86%[9]. Komplikasi paling umum yang terkait dengan kematian ibu adalah peritonitis, toksemia, metritis, ruptur uteri, dan perlemakan hati[10]. Secara umum diterima bahwa sapi potong mentolerir operasi dengan lebih baik dan memiliki hasil yang lebih baik, karena mereka biasanya memiliki kondisi tubuh yang lebih berat dan kebutuhan metabolisme yang jauh lebih rendah dibandingkan dengan sapi perah. Infeksi oleh *Clostridium chauvoei* jauh ke lokasi operasi dilaporkan jarang (0,5%) dan telah dikaitkan dengan kematian mendadak sapi dalam waktu 24 jam setelah operasi [10].

Baru-baru ini, sebuah penelitian menunjukkan toksisitas yang timbul dari kontaminasi perut dengan pelumas obstetrik berbasis polimer polietilen (PEP) yang disetujui untuk digunakan pada sapi. [40]. Meskipun pelumas ini telah digunakan dengan aman dan efektif untuk pelumasan obstetrik, kontaminasi peritoneum hanya sedikit 1,25 g PEP (setara dengan 1,0 L larutan 0,5% berat per volume (b/v)) beracun bagi sapi, tetapi mekanismenya tidak diketahui. Sapi-sapi tersebut mati atau mengalami gejala klinis yang cukup parah untuk menjamin euthanasia manusiawi dalam waktu 3–6,5 jam setelah infus intra-abdomen PEP. Karena PEP sering digunakan selama distosia berat, ada peningkatan risiko kontaminasi abdomen dengan PEP selama operasi jika isi uterus tumpah. Di belakang, toksisitas ini dapat menjelaskan, sebagian, kematian sapi mendadak dalam waktu 24 jam setelah operasi caesar diamati dalam laporan anekdot dan oleh penulis.

Peritonitis

Insiden peritonitis yang nyata relatif rendah yaitu 10,5% [30]. Itu tanda-tanda klinis peritonitis diperkirakan terjadi 3-4 hari setelah operasi [1,4,15]. Dalam survei praktisi, peritonitis dianggap sebagai penyebab utama kematian (70,3%), diikuti oleh syok (18,1%)[11]. Peritonitis dapat disebabkan oleh kompromi dinding rahim bahkan sebelum operasi[10]. Peritonitis dapat disebabkan oleh eksogen (melalui insisi abdomen) atau flora bakteri endogen [41]. Cairan janin dapat terkontaminasi oleh bakteri flora bakteri anaerob

obligat, terutama setelah pecahnya kantung ketuban atau manipulasi obstetrik yang ekstensif. Bakteri dapat dibiakkan dari cairan rahim sebelum kantung ketuban pecah; namun, jumlah mereka meningkat secara signifikan setelah kantung itu pecah. Selama operasi caesar, cairan rahim sangat terkontaminasi 83% dari waktu oleh populasi polimikroba. Sejak manipulasi obstetrik berkepanjangan tampaknya meningkatkan risiko peritonitis, mereka memvalidasi pengamatan bahwa penilaian klinis yang cepat ketika memutuskan untuk melakukan operasi caesar dikaitkan dengan hasil yang sukses.

Komplikasi sayatan

Kerugian dari pendekatan telentang termasuk peningkatan waktu pembedahan, peningkatan risiko perdarahan intraoperatif, pembentukan seroma pasca operasi, dan herniasi insisional. Lapisan wajah tipis yang terkait dengan pendekatan lateral lebih cenderung mengalami herniasi. Linea alba memberikan lapisan penahan yang lebih kuat dibandingkan dengan pendekatan paramedian atau oblique rendah; Selain itu, ada lebih sedikit lapisan penutupan dibandingkan dengan pendekatan paramedian dan miring rendah, yang akan mengurangi waktu operasi.

Komplikasi yang terkait dengan infeksi insisional paralumbar adalah antara 1,3% [9] dan 8,2% [8] dan dehiscence 3,8% [9]. Terjadinya emfisema subkutan telah dilaporkan antara 0% dan 41% [8,9,15]. Perbedaan dalam persiapan tempat pembedahan, teknik anestesi lokal, panjang sayatan, kesulitan mengeluarkan betis melalui sayatan, waktu operasi, dan penggunaan, jenis, dan durasi antibiotik pasca operasi membuat sulit untuk membuat kesimpulan yang jelas dari laporan ini. Emfisema subkutan dapat dikurangi dengan menutup peritoneum bersama dengan transversus, sehingga menutup perut. Menerapkan tekanan ke dinding perut yang berlawanan untuk mengeluarkan udara intraabdominal selama penutupan lapisan pertama juga telah disarankan sebagai sarana untuk mengurangi emfisema subkutan.[10].

Adhesi

Prasyarat untuk pembentukan adhesi adalah trauma jaringan, bakteri, dan inflamasi; Oleh karena itu, perawatan medis untuk pencegahan adhesi meliputi teknik pembedahan yang baik, antibiotik, dan obat antiinflamasi nonsteroid. Ketidakseimbangan antara pembentukan fibrin dan fibrinolisis diyakini menghasilkan pembentukan adhesi. Adhesi dapat secara klinis tidak relevan, menguntungkan, atau merugikan, dan signifikansinya ditentukan oleh lokasi dan derajatnya. Perlengketan yang merugikan di perut sapi setelah operasi caesar terutama terkait dengan elemen saluran reproduksi; ovarium, infundibulum, saluran telur, dan rahim dalam urutan menurun adalah elemen yang paling penting sehubungan dengan kesuburan masa depan. Adhesi uterus yang sudah ada sebelumnya ditemukan pada 9,4%[30] sapi dibandingkan dengan 20% -60% [30,41] sapi yang pernah menjalani operasi caesar sebelumnya. Prinsip operasi Halsted adalah andalan pencegahan adhesi[42,43]. Dalam satu penelitian, perbedaan yang signifikan diamati antara ahli bedah dan pembentukan adhesi [41].

Kesuburan

Seksio sesaria pada sapi perah tidak mengubah interval ke pelayanan pertama atau panjang kebuntingan berikutnya [44]. Sapi yang menjalani operasi caesar mengalami peningkatan layanan per konsepsi dan hari buka[4,8,10]. Interval melahirkan hingga konsepsi adalah 110 hari (memberi atau menerima 43 hari) pada sapi perah dan 99 hari (memberi atau menerima 18 hari) pada sapi potong. Tidak ada perbedaan dalam tingkat aborsi antara operasi caesar dan persalinan normal yang diamati[44]. Tingkat kehamilan pada sapi perah dan sapi potong setelah operasi caesar masing-masing adalah 72% dan 91% [8]. Tarif ini tampaknya masuk akal untuk kasus-kasus rutin. Tingkat kebuntingan yang lebih rendah pada sapi perah

dapat dikaitkan dengan variabel pengganggu, seperti pemusnahan untuk alasan non-reproduksi (misalnya, ketimpangan). Pada sapi potong, korelasi negatif diamati antara kesuburan dan tingkat bantuan melahirkan yang diperlukan, terutama ketika operasi caesar dilakukan;[45] namun, efek kondisi tubuh tidak dipertimbangkan dan mungkin merupakan variabel pengganggu.

Produksi

Efek dari operasi caesar pada produksi susu sulit untuk dijelaskan karena banyak variabel pengganggu. Ketika efek kawanan, tahun, paritas, musim melahirkan, dan aborsi dikoreksi, sapi yang menjalani operasi caesar cenderung tidak mencapai 100 hari dalam susu (DIM), dan menghasilkan, rata-rata, 79,9 kg susu lebih sedikit dalam 100 DIM pertama dibandingkan dengan kontrol [44]. Studi kedua menegaskan bahwa seluruh pengurangan susu terjadi selama 100 DIM . pertama[46]. Tidak ada perbedaan yang diamati antara kelompok antara 100 DIM dan 240 DIM[44].

Janin emfisematous

Menghapus janin emfisematous dengan fetotomi tidak selalu merupakan pilihan yang layak. Dari 159 ekor sapi perah yang dirujuk ke rumah sakit hewan untuk operasi caesar, 16 ekor sapi mengalami emfisematous feti.d6 sapi (33%) selamat dan keluar dari rumah sakit [38]. Biasanya sapi-sapi ini beracun, pireksia, hipotensi, dan syok, membutuhkan manajemen intensif perioperatif. Dalam keadaan ideal, sapi-sapi ini akan dikirim ke lembaga rujukan; namun, ini tidak selalu merupakan pilihan dan harus dikelola di pertanian. Obat penenang, jika diperlukan, harus digunakan dengan hati-hati, karena sapi-sapi ini sering mengalami hipotensi. Antibiotik pra operasi, anti- inflamasi, dan terapi cairan (salin hipertonic intravena dan cairan oral) diberikan untuk menstabilkan sistem kardiovaskular sapi. Dalam pengalaman penulis, meminimalkan kontaminasi rongga perut (dengan menggunakan pendekatan ventral, eksteriorisasi rahim, dan mengganti sarung tangan dan instrumen untuk penutupan dinding perut) telah meningkatkan prognosis untuk kelangsungan hidup sapi; namun, kesuburan sapi tampaknya buruk.

Ringkasan

Tujuan dari operasi caesar adalah pelestarian sapi dan anak sapi dan efisiensi reproduksi sapi di masa depan. Hasil dari operasi caesar adalah ramalan yang terpenuhi dengan sendirinya. Sejumlah variabel dapat mempengaruhi hasil yang sukses dari prosedur ini; pemilihan kasus adalah variabel yang paling penting dan sering diabaikan. Selain itu, persiapan pasien dan ahli bedah, teknik pembedahan, viabilitas betis pada saat pembedahan, dan eksteriorisasi uterus dapat mempengaruhi hasil akhir. Selain itu, teknik bedah yang baik termasuk penanganan jaringan yang lembut, bahan dan pola jahitan yang tepat, dan lipatan insisi uterus yang memadai untuk mencegah kebocoran, dikombinasikan dengan antibiotik dan obat anti-inflamasi bila diindikasikan, dapat membantu meminimalkan perlengketan yang merugikan yang dapat mempengaruhi efisiensi reproduksi sapi di masa depan.

Referensi

- [1] Frazer GS, Perkins NR. Cesarean section. *Vet Clin NorthAm Food Anim Pract* 1995;11(1):19–35.
- [2] Fubini SL. Surgery of the uterus. In: Fubini SL, Ducharme NG, editors. *Farm animal surgery*. St. Louis (MO): Saunders; 2005. p. 382–90.
- [3] Newman K, Anderson D. Cesarean section in cows. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2005;21(1):73–100.
- [4] Campbell M, Fubini S. Indications and surgical approaches for cesarean section in cattle. *Compend Contin Educ Vet Pract* 1990;12:285–91.
- [5] Walker D, Vaughan J. *Bovine and equine urogenital surgery*. Philadelphia: Lea & Febiger;1980. p. 85–98.
- [6] de Kruif A, Mijten P, Haesebrouck F, et al. Actinobacillosis in bovine caesarean sections. *Vet Rec* 1992;131(18):414–5.
- [7] BarkemaH, Schukken Y, Guard C, et al. Cesarean section in dairy cattle: a study of risk factors. *Theriogenology* 1992;37:489–506.
- [8] Cattell JH, Dobson H. A survey of caesarean operations on cattle in general veterinary practice. *Vet Rec* 1990;127(16):395–9.
- [9] Dawson JC, Murray R. Caesarean sections in cattle attended by a practice in cheshire. *Vet Rec* 1992;131(23):525–7.
- [10] Dehghani S, Ferguson J. Cesarean section in cattle: complications. *Compend Contin Educ Vet Pract* 1982;4:s387–92.
- [11] Vaughan L, Mulville P. A survey of bovine caesarean sections in Ireland. *Ir Vet J* 1995;48: 411–5.
- [12] Noorsdy JL. Selection of an incision site for cesarean section in the cow. *Vet Med Small Anim Clin* 1979;74(4):530–7.
- [13] Oehme FW. The ventro-lateral cesarean section in the cow. *Vet Med Small Anim Clin* 1967; 62(9):889–94.
- [14] Parish SM, Tyler JW, Ginsky JV. Left oblique celiotomy approach for cesarean section in standing cows. *J Am Vet Med Assoc* 1995;207(6):751–2.
- [15] Sloss V, Dufty JH. Elective caesarean operation in hereford cattle. *Aust Vet J* 1977;53(9): 420–4.
- [16] LeBlanc M, Hubbell J, Smith H. The effects of xylazine hydrochloride on uterine pressure in the cow. *Theriogenology* 1984;21:681–90.
- [17] Anderson D, Gaughan E, DeBowes R, et al. Affects of chemical restraint on the endoscopic appearance of laryngeal and pharyngeal anatomy and sensation in adult cattle. *AmJ Vet Res* 1994;55(9):1196–200.
- [18] Turner S, McIlwraith C. *Techniques in large animal surgery*. Philadelphia: Lea & Febiger; 1989. p. 225–8, 277–83.
- [19] Skarda RT. Local and regional anesthetic techniques: ruminants and swine. In: Thurman J, Tranquilli W, Benson G, editors. *Lumb and Jones' veterinary anesthesia*. Baltimore (MD): Lippincott Williams and Wilkins; 1996. p. 486–96.
- [20] MuirWW,Hubbell J, Skarda RT, et al. *Handbook of veterinary anesthesia*. St. Louis (MO): Mosby; 2000. p. 57–71.

- [21] Ivany JM, Muir WW. Farm animal anesthesia. In: Fubini SL, Ducharme NG, editors. Farm animal surgery. St. Louis (MO): Saunders; 2005. p. 97–103.
- [22] Zuagg J, Nussbaum M. Epidural injection of xylazine: a new option for surgical anesthesia of the bovine abdomen and udder. *Vet Med* 1990;85(9):1043–6.
- [23] St. Jean G, Skarda RT, Muir WW, et al. Caudal epidural analgesia induced by xylazine administration in cows. *Am J Vet Res* 1990;8:1232–6.
- [24] Caulkett N, Cribb P, Duke D. Xylazine epidural analgesia for cesarean section in cattle. *Can Vet J* 1993;34:674–6.
- [25] Desrocher A. General principles of surgery applied to cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2005;21(1):1–17.
- [26] Fubini SL, Trent AM. Preoperative preparation. In: Fubini SL, Ducharme NG, editors. Farm animal surgery. St. Louis (MO): Saunders; 2005. p. 45–9.
- [27] Bedard S, Desrocher A, Fecteau G, et al. Comparison of four protocols for pre-operative preparation in cattle. *Can Vet J* 2001;42(3):199–203 [in French].
- [28] Desrocher A, St. Jean G, Anderson DE, et al. Comparative evaluation of two surgical scrub preparations in cattle. *Vet Surg* 1996;25(4):336–41.
- [29] Desrocher A. General principles of surgery applied to cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2005;21(1):1–17.
- [30] Hoeben D, Mijten P, de Kruif A. Factors influencing complications during caesarean section on the standing cow. *Vet Q* 1997;19(2):88–92.
- [31] Desrocher A, Harvey D. Surgeries of the abomasum in cattle. Montreal, Quebec: University of Montreal; 2002.
- [32] Frazer GS, Perkins NR, Constable PD. Bovine uterine torsion: 164 hospital referral cases. *Theriogenology* 1996;46:739–58.
- [33] Divers TJ. Peri-operative antimicrobials and analgesics. In: Fubini SL, Ducharme NG, editors. Farm animal surgery. St. Louis (MO): Saunders; 2004. p. 49–51.
- [34] Menard L. Tocolytic drugs for use in veterinary obstetrics. *Can Vet J* 1984;25:389–93.
- [35] Menard L. The use of clenbuterol in large animal obstetrics: manual correction of bovine dystocias. *Can Vet J* 1994;35(5):289–92.
- [36] Boileau MJ, Babkine M, Desochers A. Effect de la ritodine sure le myometre lors de manimulations obstetricales chez la vache. *Med Vet Q* 2001;31:191.
- [37] Boileau MJ, Washburn KE, Clarke CR, et al. Terbutaline pharmacokinetics in cows: preliminary data. *Can J Vet Res* 2007;71(1):70–3.
- [38] Bouchard E, Daignault D, Belanger D, et al. Cesarienne chez la vache laitiere: 159 cas. *Can Vet J* 1994;35(12):770–4.
- [39] Frazer G. Hormonal therapy in the postpartum cow—days 1 to 10—fact or fiction. *Bovine Practitioner* 2001;109–30.
- [40] Frazer GS, Silveira F, Anderson DE, et al. Systemic effect of peritoneal instillation of a polyethylene polymer based obstetrical lubricant in cows. *Bovine Practitioner* 2004;208–10.
- [41] Mijten P, van den Bogaard A, Hazen M, et al. Bacterial contamination of fetal fluids at the time of cesarean section in the cow. *Theriogenology* 1997;48:513–21.
- [42] Slatter D, editor. Textbook of veterinary surgery. 2nd edition. Philadelphia: WB Saunders Co. 42; 1985.
- [43] Southwood LL, Baxter GM. Current concepts in management of abdominal adhesions. *Vet Clin North Am Equine Pract* 1997;13(2):415–35.
- [44] Barkema H, Schukken Y, Guard C, et al. Fertility, production and culling following cesarean section in dairy cattle. *Theriogenology* 1992;38:589–99.
- [45] Ducrot C, Cimarosti I, Bugnard F, et al. Calving effect on French beef-cow fertility. *Prev Vet Med* 1994;19:126–36.
- [46] Rougoor C, Dijkhuizen A, Barkema H, et al. The economics of caesarian section in dairy cattle. *Prev Vet Med* 1994;19:27–37.

Deteksi Isolat Lokal Pengkodean Gen OMP31 Brucellosis Protein OMP 31kDa dengan Reaksi Rantai Polimerase

**Wiwik Misaco Yuniarti^{1*}, Didik Handijatno², Emy Koestanti Sabdoningrum³,
Wiwiek Tyasningsih²**

Departemen Ilmu Klinis¹, Departemen Mikrobiologi², Dinas Peternakan³
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Mulyorejo Kampus C Unair,
Surabaya, 60115, Indonesia.

ABSTRAK

Brucellosis babi adalah zoonosis yang menyerang babi, yang disebabkan oleh bakteri Brucellosis, dan merupakan penyebab kerugian reproduksi babi yang penting secara ekonomi. Pada manusia, brucellosis bisa menjadi penyakit serius, melemahkan dan terkadang kronis yang dapat mempengaruhi berbagai organ. Pada babi, Brucellosis terjadi pada janin, plasenta, cairan janin dan cairan vagina setelah aborsi atau lahir mati. Penelitian ini menggunakan janin yang diaborsi sebagai sampel. Untuk isolasi Brucellosis, bahan diinokulasikan pada kaldu brucella steril dan kemudian pada cawan media agar selektif brucella. Isolat yang dicurigai Brucellosis dilakukan pewarnaan Gram dan pewarnaan Ziehl-Neelsen (MZN) modifikasi Stamp untuk memastikan kemurnian kultur dan karakter morfologi. Isolat Brucella murni yang dicurigai, dianalisis untuk profil biokimia mereka untuk diferensiasi spesies Brucella berdasarkan tes biokimia. Hasil penelitian menunjukkan dan meyakinkan bahwa isolat yang diperoleh adalah Brucellosis. Uji PCR menghasilkan amplifikasi pita 723-bp dari gen omp31 target Brucellosis sebagai isolat lokal. Protein membran luar imunodominan yang mapan (31 kDa omp) dapat menjadi tonggak untuk pengembangan diagnostik yang efektif untuk memberantas penyakit.

KATA KUNCI: Brucellosis, omp31, PCR, 723 bp

PENGANTAR

Brucellosis merupakan penyakit zoonosis yang dapat menyerang babi, yang disebabkan oleh Brucellosis. Spesies lain dapat terinfeksi Brucellosis setelah kontak langsung dengan alat kelamin atau cairan tubuh dari babi yang terinfeksi dan dapat menular dari satu manusia ke manusia lainnya. Porcine brucellosis bisa sulit didiagnosis dengan teknik isolasi dan identifikasi dan butuh waktu untuk mendapatkan hasilnya. Oleh karena itu, serologi secara umum dianggap sebagai teknik yang lebih dapat diandalkan untuk mengidentifikasi antibodi spesifik terhadap Brucella sp. Saat ini, uji serologis langsung untuk deteksi brucellosis babi belum tersedia [1,2,3,4,5].

Membran sel Brucella terdiri dari 3 lapisan; membran sitoplasma, membran sitoplasma perifer, dan membran luar [6]. Protein pada membran luar disebut sebagai protein membran luar (OMPs) [7,8]. OMP Brucella menunjukkan imunogenisitas yang sangat kuat, yang mungkin berhubungan dengan kelangsungan hidup Brucella dalam makrofag [9]. Pada Brucellosis, salah satu protein spesifik dikodekan oleh gen OMP 31.

Sebuah studi baru-baru ini menunjukkan bahwa protein dalam keluarga OMP25/OMP31 sangat terkonservasi sebagai antigen imunodominan dan terkait dengan virulensi Brucella [10]. Karakteristik ini mendukung Omp31 sebagai subunit yang menjanjikan untuk kit deteksi dan kandidat vaksin terhadap brucellosis.

Untuk mendapatkan alat diagnostik baru, diperlukan langkah-langkah awal termasuk isolasi, ekstraksi dan pemurnian. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi gen OMP31 yang mengkode isolat lokal *Brucellocis* dengan metode *polymerase chain reaction* (PCR). Hasil yang diperoleh dari penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai diagnosis *brucellosis* babi.

BAHAN DAN METODE

Koleksi sampel

Sampel yang dikumpulkan secara aseptik dari janin dan ditabur sesaat setelah aborsi (membran janin, isi perut janin, dan usap vagina) dilakukan isolasi bakteri dan karakterisasi molekulernya melalui PCR.

Isolasi bakteriologis dan identifikasi *Brucellocis*

Untuk isolasi *Brucellocis*, bahan diinokulasi pada kaldu *brucella* steril kemudian di atas media agar selektif *brucella* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Pelat diamati setiap 24 jam untuk perkembangan pertumbuhan. Setelah pertumbuhan, koloni yang dicurigai *Brucella* berdasarkan karakteristik kultur [11] diambil dan digoreskan ke piring agar selektif *Brucella* lainnya dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 hari untuk mendapatkan kultur murni.

Karakterisasi Morfologi Isolat

Isolat yang diduga *Brucellocis* dilakukan pewarnaan Gram dan pewarnaan Ziehl-Neelsen (MZN) modifikasi Stamp [12] untuk memeriksa kemurnian kultur dan karakter morfologi. Metode pewarnaan Ziehl-Neelsen modifikasi stempel dilakukan dengan larutan basa fuchsin 0,4%, diikuti dengan penghilangan warna cepat dengan larutan asam asetat 0,5%, dan counterstaining dengan larutan metilen biru 1%. Apusan diperiksa secara mikroskopis dengan lensa objektif minyak imersi (x100).

Konfirmasi biokimia dari isolat

Isolat murni *Brucella* yang dicurigai, dianalisis profil biokimianya untuk diferensiasi spesies *Brucella* berdasarkan uji biokimia, yaitu, katalase, oksidase, hidrolisis urea, uji reduksi nitrat, produksi indol, dan pemanfaatan sitrat sesuai metode standar [11,12].

Karakterisasi Molekul dari isolat *Brucellocis*

Primer PCR digunakan untuk mendeteksi urutan DNA dari gen yang mengkode protein membran luar31 (OMP-31) yang dilaporkan untuk *Brucella* dalam database GenBank yang terletak di NCBI (Leal-Klevezas et al., 1995). Urutan primer forward adalah forward 5'ATG AAG TCC GTA ATT TTG GCG TCC3' dan reverse 5'TTA GAA CTT GTA GGT CAG ACC GAC 3'. Untuk konfirmasi molekuler dari isolat ini, amplifikasi gen OMP-31 dilakukan menggunakan PCR (Qiagen). DNA diekstraksi dari isolat *brucella* dengan menggunakan minikit DNA QIAMP (QIAGEN, Hilden, Jerman), sesuai dengan instruksi pabrik.

Pengomposisian reaksi menggunakan Top Taq Master Mix adalah Master mix (intron)12,5 l, DW 0,5 l, Primer EAE1 1 l, Primer EAE2 1 l, template 5 l (total 20 l). Pusaran

lembut dan putar ke bawah. Kondisi siklus termal adalah sebagai berikut: langkah denaturasi awal pada 95 ° C selama 5 menit, diikuti oleh 35 siklus denaturasi pada 94 ° C selama 30 detik, anil pada 56 ° C selama 1 menit dan ekstensi pada 72 ° C selama 1 menit, dengan ekstensi akhir pada 72°C selama 5 menit.

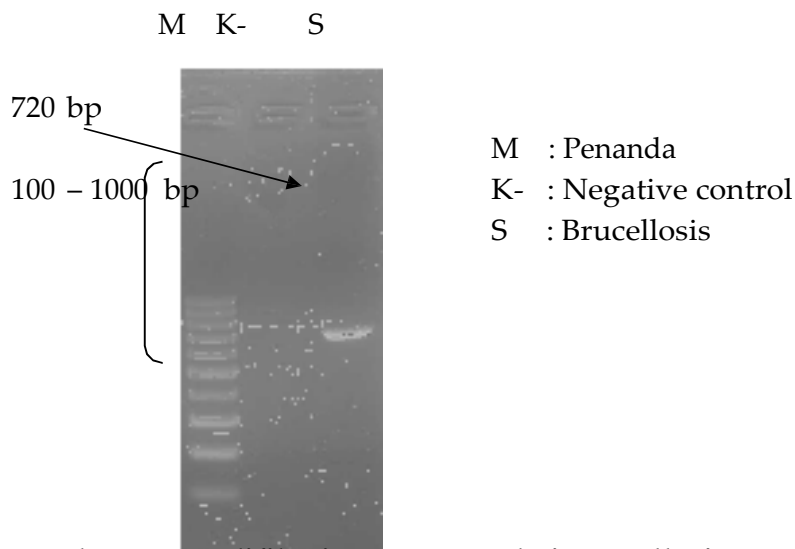
Produk PCR dinilai dengan elektroforesis dalam gel agarosa 2% dan kemudian diwarnai dengan etidium bromida (0,5 g/mL). Gel difoto di bawah sinar ultraviolet [13].

HASIL DAN DISKUSI

Semua bahan yang diaborsi yang dikumpulkan dari kasus aborsi diinokulasi pada pelat agar Brucella selektif dan isolat menghasilkan koloni yang karakteristik, sangat kecil, berkilau dan halus, bulat, dan pin-point. Pemeriksaan mikroskopis kultur yang diwarnai Gram menunjukkan kokobasil Gram-negatif kecil dan, pada pewarnaan Ziehl-Neelsen (MZN) yang dimodifikasi, organisme bernoda merah dengan latar belakang biru. Isolat ini selanjutnya dinilai untuk karakter biokimia dan seperti penelitian sebelumnya, isolat ditemukan positif untuk katalase, oksidase, hidrolisis urea dan uji reduksi nitrat dan negatif untuk produksi indol, dan pemanfaatan sitrat. Semua isolat menunjukkan karakter morfologi yang mirip dengan temuan sebelumnya [11] dengan uji biokimia yang sejalan dengan temuan penelitian lain [11,12].

Untuk memastikan isolat yang ditemukan adalah Brucellosis, uji hidrolisis urea hanya membutuhkan waktu 20 menit, sedangkan spesies lain membutuhkan waktu 1 - 2 jam. Mereka dapat tumbuh dengan adanya thionin pada konsentrasi standar dan tanpa memerlukan tambahan CO₂ [14]. Satu-satunya metode yang pasti dan paling dapat diandalkan untuk diagnosis brucellosis hewan didasarkan pada isolasi Brucella spp. Oleh karena itu, isolasi B. melitensis dan lainnya pada media kultur yang sesuai direkomendasikan untuk diagnosis yang akurat [15].

Uji PCR menghasilkan amplifikasi pita 723-bp dari gen omp31 target Brucellosis sebagai isolasi lokal. Analisis PCR diulang dua kali. Hasilnya diberikan pada Gambar 1. Akurasi dan reliabilitas data PCR yang diperoleh dari Brucellosis dikonfirmasi dengan analisis sekuens DNA.



Gambar 1. Amplifikasi gen omp31 dari Brucellosis

PCR adalah alat yang andal dan cepat untuk mendeteksi secara langsung *B. suis* dalam sampel klinis. Untuk diagnosis brucellosis telah ditetapkan dan menunjukkan kegunaannya. Namun sampai saat ini dan sepengetahuan penulis belum ada deskripsi dari satu probe PCR yang mampu mendeteksi semua yang relevan secara praktis. *Brucellosis*. Pengujian diuji 100% spesifik untuk *Brucellosis* dan negatif untuk lainnya *Brucella sp.* dan tidak terkait erat *Brucella* jenis.

KESIMPULAN

Brucellosis terutama bertanggung jawab atas brucellosis pada babi dan juga untuk penularan infeksi ke manusia. Untuk pengendalian *Brucellosis*, diagnosis yang efektif diperlukan dan semua ini hanya dapat diputuskan setelah studi epidemiologis termasuk isolasi agen etiologi dari kasus klinis. Negara seperti Indonesia, dengan populasi babi besar yang dipelihara di dekat manusia selalu berada di ujung tanduk *Brucella* zoonosis. Protein membran luar imunodominan yang mapan (31 kDa omp) dapat menjadi tonggak untuk pengembangan diagnostik yang efektif untuk memberantas penyakit.

PENGAKUAN

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi atas dukungannya dalam penelitian ini berkaitan dengan pendanaan penelitian melalui Program Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi (PUPT) Desentralisasi, 2016.

MINAT BERSAING

Para penulis menyatakan bahwa mereka tidak memiliki kepentingan bersaing.

KONTRIBUSI PENULIS

WMY, EKS, DH, WT melakukan pekerjaan penelitian utama, DH melakukan analisis statistik dan menganalisis data utama dalam percobaan. EKS membantu menyusun naskah. Semua penulis membaca dan menyetujui naskah akhir.

REFERENSI

1. Alton G.G. (1990). – *Brucella suis*. In *Animal brucellosis* (K. Nielsen & J.R. Duncan, eds). CRC Press, Boca Raton, Florida, 411–422.
2. Ferris R. A., M. A Schoenbaum, and R. P. Crawford. 1995. Comparison of serologic tests and bacteriologic culture for detection of *Brucellosis* in swine from naturally infected herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 207, 1332–1333. 51
3. Cvetnic Z., S. Spicic, S. Curic, B. Jukic, M Lojkic., D. Albert, M. Thiébaud and B. Garin-bastuji. 2005. Isolation of *Brucella suis* biovar 3 from horses in Croatia. *Vet. Rec.*, 156, 584–585.
4. Ferrão-beck L., R. Cardoso, P. M. Munoz, M. J. de Miguel, D. Albert, A. C. Ferreira, C. M. Marín, M. Thiébaud, I. Jacques, M. Grayon, M. S. Zygmunt, B. Garin-bastuji, J. M. Blasco and M. I.Sá. 2006. Development of a multiplex PCR assay for polymorphism analysis of *Brucella suis* biovars causing brucellosis in swine. *Vet. Microbiol.*, 115, 269–277.
5. Fretin D., e A. M. Whatmor, S. al Dahouk, H. Neubauer, B. Garin-bastuji, D Albert., M. van Hessche, M. Menart, J. Godfroid, K. Walravens and P. Wattiau. 2008. *Brucella suis* identification and biovar typing by real-time PCR. *Vet. Microbiol.* 131, 376–385.
6. Checa A.G., C.M. Pina, A.J. Osuna-Mascaro and E.M. Harper. 2014. Crystalline organization of the fibrous prismatic calcitic layer of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Eur. J. Mineral.* 26: 495-505
7. Sun, D., H. Zhang, S. Lv, and H. Wang. 2013. Identification of a 43-kDa outer membrane protein of *Fusobacterium necrophorum* that exhibits similarity with pore-forming proteins of other *Fusobacterium* species. *Res. Vet. Sci.* 95: 27-33.
8. Guo P., N. Wang, Y.J. Liu and C.P. Lu. 2014. Antimicrobial susceptibility and characterization of outer membrane proteins of *Aeromonas hydrophila* isolated in China. *J. Integr. Agr.* 13: 911-917.

9. Bowden, R.A., A. Cloeckaert, M.S. Zygmunt and G. Dubray. 1998. Evaluation of immunogenicity and protective activity in BALB/c mice of the 25 kDa major outer membrane protein of *Brucella melitensis* (OMP25) expressed in *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.* 47: 39-48
10. Minhas-Ramneek, P., H.N. Pawar, D. Kaur, and D. Deka. 2013. Development and evaluation of PCR assay based on outer membrane protein 22 gene for genus specific diagnosis of *Brucella*. *Proc. Natl. Acad. Sci. India, Sect. B Biol. Sci.* 83: 615-619
11. Alton G.G., L.M. Jones, R.D. Angus and J.M. Verger. 1988. *Techniques for the brucellosis laboratory*, 1st Ed. National Institute of Agricultural Research, Paris, 1-190.
12. Koneman E. W., S. D. Allen, W. M. Janda , P. C. Schreckenberger, and W. C. Jr. Win. 1997. *Brucella* species. in *Diagnostic microbiology*, 5th Ed. Lippincott Philadelphia, pp 431-436.
13. Arasoglu T., M. Gulluce, H.Ozkan, A. Adiguzel, and F. Sahin. 2003. PCR detection of *Brucella abortus* in cow milk samples collected from Erzurum, Turkey. *Turk J Med Sci* (2013) 43: 501-508.
14. Al Dahouk, S., K. Nockler, H. Tomaso, W.D. Spletstoesser, G. Jungersen, U. Riber, T. Petry, D. Hoffmann, H.C Scholz, A Hensel, and H. Neubauer. 2005. Seroprevalence of brucellosis, tularemia, and yersiniosis in wild boars (*Sus scrofa*) from north-eastern Germany. *Journal of veterinary medicine. Infectious diseases and veterinary public health*, 52(10), 444-455.
15. Traxler, R. M., M. W. Lehman, E. A. Bosserman, M. A. Guerra and T. L. Smith, 2013. A literature review of laboratory-acquired brucellosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 51, 3055–3062.

Resistensi Bakteri dari Enterobakteri terisolasi di Aljazair Barat

Y. Ahmad Ammara, b, M. Moulay, R. Bouzidc, Q. Namaurd, H. Aggad*

^aUniversitas Tiaret, Institut Ilmu Kedokteran Hewan, Laboratorium Higiene dan Patologi Hewan,

Tiaret, Aljazair

^bUniversitas Maskara, Aljazair

^cSekolah Tinggi Kedokteran Hewan Nasional, Aljir, Aljazair

^dUniversitas Mostaganem, Aljazair

ABSTRAK

Infeksi karena Enterobacteria bertanggung jawab atas kerugian yang signifikan dalam industri unggas dan merupakan penyebab paling sering penolakan karkas di rumah jagal. Antibiotik dapat berkontribusi untuk mengurangi infeksi bakteri. Penggunaannya telah meningkat dalam beberapa tahun terakhir.

Di Aljazair barat, 150 galur enterobacteriaceae komensal diisolasi (termasuk 101 *Escherichia coli*, 27 *Proteus mirabilis*, 13 *Enterobacter kloaka*, 9 *Klebsiella pneumoniae*) dari asal yang berbeda di barat Aljazair. Serotipe 51 *Escherichia coli* strain menunjukkan bahwa 28% dari serogrup mereka milik serogrup Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC): O1 (28%), O78 (14%), O2 (6%), O78 dan 52% tidak dapat diketik.

Kerentanan in vitro terhadap antimikroba ditentukan dengan uji difusi cakram. Sebagian besar isolat resisten terhadap betalaktam, kuinolon, tetrasiklin, trimetoprim sulfametoksazol. *Escherichia coli* strain menyajikan tingkat resistensi yang tinggi: asam nalidiksat 84%, flumequin 94%, enrofloxacin 86%, Tetracycline 92%, Trimethoprim/sulfamethoxazol 91%, Amoksisilin 92%, cefalotin 80%. *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae* dan *Klebsiella pneumonia* (berturut-turut) menunjukkan resistensi terhadap asam nalidiksat (81, 77, 100%), flumequin (81, 84, 100%), enrofloxacin (77, 53, 77%), tetrasiklin (100, 84, 77%), trimetoprim sulfametoksazol (74, 69, 77%), amoksisilin (62, 77, 100%), ceftiofur (44, 61, 55%).

Semua isolat menunjukkan resistensi yang rendah terhadap colistine, furane, Amoksisilin/asam klavulanat, gentamisin, kloramfenikol dan neomisin, dengan pengecualian *Proteus* mengisolasi yang tadi...

Semua isolat resisten terhadap setidaknya dua antibiotik, 63% hingga 6 antibiotik dan 4% hingga 11 antibiotik. Untuk tes PCR, Tidak ada gen kuinolon resistensi antimikroba yang terdeteksi setelah pengujian 20E. coli terisolasi.

Tingginya tingkat resistensi antimikroba pada isolat bakteri mungkin memiliki implikasi besar bagi kesehatan manusia dan hewan dengan implikasi ekonomi yang merugikan.

KATA KUNCI: E.coli, antibiotik, antibiogram, ayam, PCR.

1. PERKENALAN

Infeksi Enterobacteria bertanggung jawab atas kerugian ekonomi yang besar dalam industri unggas. Meskipun resistensi meningkat, profilaksis dan antibioterapi tetap menjadi satu-satunya cara untuk melawan bakteri ini.

Resistensi bakteri terhadap agen antimikroba merupakan masalah yang semakin penting dalam praktik medis [1]. Penyebaran bakteri resisten telah menyebabkan

peningkatan mortalitas dan morbiditas yang cukup besar serta biaya pengobatan [2]. Konsentrasi tinggi mikroba ini di saluran pencernaan mendukung pertukaran dan penyebaran gen resistensi [3, 4].

Pekerjaan ini dilakukan untuk memperkirakan resistensi antimikroba dari isolat Enterbacteria dari ayam di Aljazair barat.

2. BAHAN-BAHAN DAN METODE-METODE

2.1 Lokasi dan Prosedur Pengambilan Sampel

Penelitian dilakukan di Aljazair bagian barat (Mostaganem, Mascara, Tiaret, Tlemcen, Ain Temouchent dan Sidi Bel Abess) dari September 2010 sampai Juli 2015. Sampel untuk isolasi meliputi permukaan (soil swabbing, dinding dan langit-langit), telur dan kotoran.

Sampel disemai langsung pada agar bromocresol purple (BCP) Mc Conkey Sorbitol dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

Identifikasi makroskopis dan mikroskopis (Bacilli Gram dengan silia peritrichous), tes biokimia dan sistem indeks profil analitis 20E (Biomerieux, Prancis) dilakukan menurut Quinn [5].

2.2 Serotipe

Lima puluh E. coli isolat dari wilayah Tlemcen, Ain Temouchent dan Sidi Bel Abess dilakukan serotipe dengan uji aglutinasi menggunakan antiserum spesifik yang dibangkitkan terhadap antigen O1:K1, O2:K1, dan O78 (Biovac, France) menurut Finazzi et al. [6].

2.3 Antibiogram:

Sensitivitas antibiotik ditentukan dengan metode difusi cakram [7] pada media padat Mueller-Hinton (Institut Pasteur, Aljazair) sesuai dengan pedoman CLSI [8]. Cakram kertas standar berisi antibiotik yang digunakan di Aljazair (tabel 1) diletakkan di atas media. Pelat diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 ° C dan diameter zona hambat ditafsirkan dengan mengacu pada tabel bacaan Enterobakteri seperti yang direkomendasikan oleh Komite Antibiogram dari Masyarakat Perancis untuk Mikrobiologi [9].

Tabel 1 : Cakram antibiotic

keluarga	Antibiotik + Disk charge (µg)	Sigle	Asal
Betalaktam	Amoksisilin (10)	AMX	Bioanalisis, Prancis,
	Amoksisilin/asam klavulanat (20+30)	AMC	Bioanalisis, Prancis,
	Ceftiofur (30)	EFT	Oksoid, Angleterre
Sefalosporin	Sefalotin (30)	KF	Oksoid, Angleterre
	Neomisin (30)	ndak	Bio-rad, Prancis
Aminosida	Gentamisin (10)	CN	Bioanalisis, Prancis,
Sulfamid	Trimetoprim/sulfametoksazol (1,25)	SXT	Bioanalisis, Prancis,
Tetrasiklin	Tetrasiklin (30)	TE	Bio-rad, Prancis
	Asam nalidixat (30)	tidak	Bio-rad, Prancis
kuinolon	Flumequin (30)	UB	Bio-ra, Prancis
	Enrofloksasin (5)	ENR	Bioanalisis, Prancis,
Polipeptida	Kolistin (10)	CT	Oksoid, Angleterre
Furan	Nitrofurantoin (300)	FT	Himedia, Indonesia
Fenikol	Kloramfinikol (30)	C	Bioanalisis, Prancis,

2.4 Deteksi gen resisten antibiotik

Multipleks reaksi berantai polimerase dengan primer oligonukleotida spesifik digunakan untuk menguji terjadinya gen resisten antibiotik pada 20 E. coli isolat

dikonfirmasi yang menunjukkan resistensi terhadap asam nalidiksat, flumequin dan enrofloxacin.

DNA strain resisten kuinolon dari E. coli diekstraksi dengan metode perebusan sesuai pedoman [10]. amplifikasi PCR dari qnr gen (qnrA, qnrB, qnrS) dilakukan dengan primer tertentu. Produk PCR dianalisis dengan elektroforesis dalam gel agarosa 1%, yang mengandung ehidium bromida (1 g/ml) yang disangga dengan Tris-borat-EDTA (0,1%). Produk PCR dipisahkan dengan elektroforesis pada gel agarosa (1%).

3. HASIL DAN PEMBAHASAN:

Di Aljazair barat, 150 galur Enterobacteriaceae diisolasi menurut prosedur bakteriologis biasa. Escherichia coli mewakili 67,33% dari strain ini (N = 101) dan Proteus 18% (N = 27) (tabel 2).

Tabel 2: Distribusi menurut asal

	Telur, Kotoran, Permukaan Nb (%)	ayam pedaging Nb (%)	ayam Nb (%)	Total Nb (%)
E.coli	20 (13,33)	63(42)	17 (11,33)	101 (67,33)
Proteus	09 (06)	09 (06)	09 (6)	27 (18)
Enterobakter	05 (3,33)	02 (1,33)	06 (4)	13 (8,66)
Klebsiella	05 (3,33)	03 (02)	02 (1,33)	09 (06)
Total	39 (26)	77 (51,33)	34 (22,66)	150 (100)

E. coli dominan (67%) diikuti oleh Proteus (18%), mengungkapkan bahwa E. coli adalah yang paling luas bakteri dalam pemeliharaan unggas sesuai dengan Yehezkiel et al. (11) dan Santos et al.. (12) yang melaporkan dominasi yang sama dengan tingkat masing-masing 80% dan 44% pada unggas.

Selain itu, Enterobacteria sering diisolasi di laboratorium bakteriologi, di antaranya E. coli merupakan spesies yang paling sering ditemukan [4; 13].

3.1 Serotipe

Di antara isolat 28%, 6% dan 14% masing-masing milik O1, O2 dan O78 patogen unggas. Namun, 52% isolat tidak dapat diketik karena keragaman serologisnya atau merupakan serotipe lain; O35, O88, O136. Sebaliknya, Seifi et al. (14) menemukan bahwa O78 dan O1 adalah serotipe yang dominan.

3. 2 Antibiogram

Resistensi bakteri dicatat untuk setiap antibiotik yang diuji (kecuali Klebsiella untuk gentamisin) (tabel 3).

Tabel 3: Frekuensi resistensi antimikroba (%)

Ropangan	tidak	UB	ENR	TE	SXT	AMC	AMX	KF	EFT	CT	tidak	CN	FT	C
E. coli	84*	94*	86	92	91	17	92*	80*	41	21	27*	03	16	05
Proteus	81	81	77	100	74	85	62	03	44	74	62	14	96	62
Enterobakter	77	84	53	84	69	15	77	15	61	23	15	07	15	15
Klebsiella	100	100	77	88	77	22	100	22	55	11	22	00	55	22

NA: Asam nalidiksat; UB : Flumequin; ENR : Enrofloxacin; TE : Tetrasiklin; SXT : Trimetoprim/sulfametoksazol; AMC : Amoksisilin/asam klavulanat; AMX : Amoksisilin; KF : Sefalotin; EFT : Ceftiofur; CT : Colistin; N : Neomisin; CN : Gentamisin; FT : Nitrofurantoin; C. Kloramfinikol.

* Resistensi mikroba dinilai pada 51 isolat

Semua isolat menunjukkan resistensi yang rendah terhadap colistine, furane, Amoksisilin/asam klavulanat, gentamisin, kloramfenikol dan neomisin, dengan pengecualian *Proteus* isolat yang lebih peka terhadap gentamisin

Meskipun kloramfenikol dan gentamisin dilarang dalam kedokteran hewan di Aljazair, resistensi rendah yang diamati menunjukkan penggunaan yang tidak sah tetapi jarang (karena seringkali lebih murah dan lebih mudah diakses oleh sebagian besar populasi). Atau, mereka bisa menjadi mutan spontan yang resisten terhadap antibiotik ini [15]. Frekuensi ini tampaknya tinggi dan memungkinkan pembagian antibiotik menjadi dua kelompok; kelompok pertama termasuk antibiotik yang tingkat resistensinya tinggi:

- Untuk *E.coli*, flumequin (94%), Tetrasiklin dan Amoksisilin (92%), Trimethoprim/Sulfamethoxazole (91%), Enrofloxacin (86%), cefalotine (80).
- Untuk *Proteus*: tetrasiklin (100%), furan (96%), Amoksisilin (85%), asam nalidiksat dan flumequin (81%), Enrofloxacin (77%), Trimethoprim/Sulfamethoxazole dan colistine (74%),
- Untuk Enterobakter : flumequin dan Tetrasiklin (84%), asam nalidiksat dan Amoksisilin (77%), Trimetoprim/Sulfametoksazol (69%),
- Dan akhirnya ke *Klebsiella* : 100% tahan terhadap asam nalidiksat, flumequin dan Amoksisilin, Tetrasiklin 88% dan 77% terhadap Enrofloxacin dan Trimethoprim/Sulfamethoxazole. *Klebsiella* masuk akal untuk gentamisin. Kelompok kedua terdiri dari antibiotik dengan resistensi rendah:
- Untuk *E.coli*, amoksisilin/asam klavulanat, colistin gentamisin, nitrofurantoin dan kloramfenik.
- *Proteus*; sefalotin dan neomisin
- Enterobakteri; amoksisilin/klavulanat, sefalotin, neomisin, gentamisin, nitrofurantoin, kloramfenikol
- *Klebsiella* : kolistin dan gentamisin.

Gentamycin dan chloramphenicol dilarang di Aljazair; resistensi yang diamati dapat dijelaskan oleh penggunaan antibiotik yang tidak sah yang menyebabkan bakteri ini mengembangkan resistensi atau persistensi yang lebih tua. Dibandingkan dengan karya lain di wilayah yang sama, tingkat resistensi antimikroba dari antimicrobial *E. coli* dalam jangka waktu saat ini tampaknya mengungkapkan peningkatan perkembangan resistensi untuk beberapa antibiotik. Memang, untuk tiga antibiotik, tetrasiklin, enrofloxacin dan trimethoprim/tulfaméthazone, itu lulus masing-masing dari 82%, 14% dan 42% [16] menjadi 87%, 45% dan 70% [17] daripada 90,4%, 69,3% dan 70,2 % pada tahun 2010 [18] untuk mencapai tingkat luar biasa 92%, 86% dan 91% dalam penelitian ini.

Hasil kami lebih tinggi daripada yang dilaporkan di Aljazair Timur pada tahun 2014 untuk trimetoprim-sulfmetoksazol dan enrofloksasin (82%) tetapi resistensi terhadap tetrasiklin dilaporkan lebih tinggi (100%) [19].

Demikian juga, resistensi antibiotik terhadap amoksisilin, flumequin, asam nalidiks, amoksisilin, dan sefalotin juga sangat tinggi. Fenomena ini dapat dijelaskan dengan semakin banyaknya penggunaan antibiotik tersebut serta keragaman mekanisme resistensi bakteri.

Resistensi terhadap colistin diturunkan dari 3%, 5,5%, 13%, Hammoudi [16], Messai [19] dan Benameur et al. [18] masing-masing menjadi 21% dalam penelitian ini. Resistensi yang

rendah ini dapat dijelaskan dengan penggunaan moderat dari pengobatan ini di satu sisi dan fakta bahwa mutasi kromosom yang menyebabkan resistensi pada colistin jarang terjadi [20].

Mengenai *Proteus*, resistensi yang tinggi tercatat terutama untuk tetrasiklin (100%) sesuai dengan Nahar et al. (21) yang melaporkan tingkat 94,4% di Bangladesh. Tingkat resistensi yang sangat tinggi dari *Proteus* strain tetrasiklin, nitrofurantoin dan kolistin mungkin karena resistensi alami.

Ada banyak penelitian tentang sensitivitas antimikroba pada *Proteus* pada manusia tetapi pada unggas, tidak ada data yang tersedia [22]. Resistensi bakteri lebih tinggi untuk kuinolon (asam nalidiksat dan flumequin (81%), enrofloxacin (77%). Hasil ini lebih rendah daripada yang diperoleh (93%) oleh Nemati [22] di Iran tetapi lebih tinggi dari yang dilaporkan di Bangladesh [21] dan juga dapat dijelaskan dengan tingginya tingkat pemanfaatan antibiotik ini yang banyak tersedia di pasar Aljazair.

Di tingkat Mediterania, tingkat resistensi yang tercatat dalam penelitian kami tetap tinggi dibandingkan dengan yang terdaftar di Maroko; 88% menjadi amoksisilin, 67% menjadi trimetoprim/sulfametoksazol dan 76% menjadi enrofloxacin [23].

Seperti halnya trimetoprim/sulfametoksazol (74%), antibiotik banyak digunakan dalam pengobatan salmonellosis dan selama koksidiosis apa yang bisa menjadi asal mula transfer resistensi.

Perbedaan ini dapat dihubungkan dengan perbedaan frekuensi penggunaan antibiotik ini untuk mengobati atau mencegah penyakit.

Tingkat resistensi mikroba ini, yang mencerminkan pentingnya penggunaan obat-obatan ini dalam peternakan unggas, patut dicatat.

Resistensi yang cukup besar diamati terhadap Beta-laktam (amoksisilin/asam klavulanat (85%) dan amoksisilin (62 %), jauh lebih unggul daripada yang (16%) yang diperoleh Nahar et al. [21]. Munculnya resistensi terhadap -laktam antibiotik mengganggu, karena -laktam sering tetap menjadi pilihan khas oleh dokter dalam mengobati berbagai infeksi yang disebabkan oleh *Proteus* sp. [24].

Tingkat resistensi yang tinggi diamati terhadap kuinolon (asam nalidiksat 77% dan 100%, flumequin 84% dan 100%), enrofloxacin (53% dan 77%), tetrasiklin (84%, 88%), trimetoprim/sulfametoksazol (69% dan 77%) dalam Enterobakter dan *Klebsiella* masing-masing. Ini semua perawatan yang sudah rutin dilakukan untuk merawat ayam dari penyakit bakteri.

Tingkat enrofloxacin kurang penting dibandingkan kuinolon lainnya; itu adalah generasi baru yang memimpin munculnya antibioresistance secara bertahap. Semakin banyak bukti ilmiah menunjukkan bahwa bakteri resisten ini, termasuk patogen, dapat ditransfer ke manusia melalui rantai makanan [25].

Karena resistensi alami, semua isolat resisten terhadap amoksisilin. Resistensi yang kurang penting diamati pada ceftiofur (61%, 55%) di Enterobakter dan *Klebsiella* masing-masing. Serta resistensi yang rendah terhadap colistin menyebabkan penggunaan moderat dan untuk kloramfenikol, gentamisin dan furan, molekul yang tidak digunakan dalam kedokteran hewan obat.

Semua strain Enterobacteria yang diisolasi memiliki setidaknya dua resistensi terhadap antibiotik ini, 95% hingga setidaknya 4 antibiotik dan 4% sampai 11 antibiotik (tabel 4).

Tabel 4: Strain dari Enterbacterea multiresisten

Nb antibiotik	< 2	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
%	00	1.33	3.33	18	14	11.33	10	15.33	15.33	7.33	4

Hasil ini mendekati yang dilaporkan di Senegal di mana semua strain resisten terhadap setidaknya satu antibiotik [26] dan di Nigeria setidaknya tiga antibiotik [27]. Penggunaan antibiotik dapat menjadi faktor penting dalam munculnya seleksi kemunculan dan penyebaran bakteri resisten dalam kedokteran hewan. Multiresistensi mungkin karena pengobatan sendiri oleh peternak dan molekul bergantian sebelum perawatan pertama membuah hasil. Tidak ada kepentingan yang melekat pada penundaan pemrosesan. Memang, banyak antibiotik sering diberikan secara bersamaan untuk profilaksis atau infeksi. Hal ini menunjukkan bahwa penyalahgunaan dan penggunaan antibiotik yang sembarangan mungkin merupakan awal dari tingginya insiden resistensi dan multiresistensi antibiotik.

3.3 Gen resistensi

Tidak ada gen resistensi antibiotik kuinolon yang terungkap dalam pengujian *E. coli* terisolasi. Hal ini dapat dijelaskan oleh fakta bahwa primer yang digunakan tidak memungkinkan skrining semua varian yang dijelaskan sejauh ini dan rendahnya jumlah isolat yang diperiksa [24]. Selain itu, gen lain dari resistensi plasmid dalam kuinolon baru-baru ini dijelaskan qnr C dan qnr D dan yang tidak dapat diamplifikasi oleh primer ini [28; 29]. Honoré dkk. [30] melaporkan prevalensi galur qnr-positif secara global sebesar 0,7% hingga 1,8% di antara galur ESBL dan 0% pada galur no-ESBL yang resisten kuinolon.

Pada tahun 1998, mekanisme baru resistensi kuinolon dijelaskan dalam strain Amerika Utara dari *K. pneumoniae* [31]. Hebatnya, resistensi ini adalah plasmid yaitu dapat ditransfer dari strain enterobacteria di strain lain. Lokalisasi pada elemen seluler DNA ini, menjelaskan hubungan gen tipe qnr ini dengan gen yang mengkode resistensi terhadap keluarga antibiotik lain. Memang, tipe liar *E. coli* galur yang membawa pMG252 berlapis ke agar yang mengandung asam nalidixat atau siprofloksasin 100 kali lebih mungkin menimbulkan mutan resisten spontan daripada galur bebas plasmid [32]. Selain itu, ditunjukkan qnr gen memberikan tingkat resistensi kuinolon sedang, tetapi dapat memfasilitasi pemilihan mutan yang menunjukkan resistensi tingkat tinggi [33]. Setelah diidentifikasi di Amerika Serikat, mekanisme resistensi ini ditemukan di lebih banyak strain Amerika Utara [34]; beberapa *E. coli* strain di Cina [28] dan baru-baru ini di *E. coli* strain dari Korea Selatan [35].

4. Kesimpulan

Enterobacteriaceae dan khusus *Escherichia coli* umumnya digunakan sebagai bakteri indikator untuk surveilans dan pemantauan munculnya resistensi antimikroba. Temuan penelitian kami menunjukkan tingkat resistensi yang tinggi, yang lebih penting, munculnya resistensi terhadap generasi baru antimikroba (enrofloxacin) dan resistensi multidrug, adalah panggilan untuk perhatian.

Kami mendalilkan banyak faktor, seperti, automedication peternak, penggantian antibiotik sebelum antibiotik pertama memiliki kesempatan untuk menghasilkan hasil, dan penggunaan antibiotik yang berat tanpa tes antibiogram sebelumnya, pada usia yang berbeda di kandang unggas.

Tingkat yang mengkhawatirkan dari resistensi antimikroba individu dan beberapa pada isolat bakteri dari ayam mungkin memiliki implikasi besar bagi kesehatan manusia dan hewan dengan implikasi ekonomi yang merugikan. Ini merupakan bahaya kesehatan masyarakat karena kemungkinan penularan patogen potensial ini ke manusia melalui kontak dan konsumsi zat makanan yang terkontaminasi. Hal ini dapat menyebabkan penyebaran yang signifikan dari bakteri resisten antibiotik; obat-obatan yang digunakan untuk mengobati penyakit manusia akan menjadi kurang efektif, dan ini merupakan ancaman yang sangat signifikan bagi kesehatan masyarakat.

Temuan kami menuntut sistem pengawasan ketat untuk dikembangkan di Aljazair untuk pemantauan resistensi antimikroba dan biosafety di *P. mirabilis* dan patogen lain yang ditemukan dalam produk unggas. Ada banyak penelitian tentang sensitivitas antimikroba pada *Escherichia coli* pada sampel unggas Aljazair tetapi, pada Enterobacteria komensal lainnya, tidak ada lagi data yang ditemukan. Kami berharap bahwa temuan penelitian kami akan memberikan kontribusi untuk melayani sebagai informasi dasar untuk yang masa depan.

Ucapan Terima Kasih

Kami berterima kasih kepada Dr. C. Brown (UGA, Athena) untuk meninjau naskah.

REFERENSI

- 1- Cohen R., E. Bingen, E. Grimprel, J. Raymond and D. Gendrel, 2011. Resistance aux antibiotiques : un nouveau tournant a ne pas manquer. Archives de Pediatrie. 18(4) : 359-61.
- 2- Behzadi P., E. Behzadi and R. Ranjbar, 2014. Multidrug-Resistant Bacteria. Infectio. ro. 39(3): 29-31.
- 3- Dyar Oj, N.Q. Hoa, N.W. Trung, H. D. Phuc, M. Larsson, N. T. Chuc and C.S. Lundborg, 2012. High prevalence of antibiotic resistance in commensal *Escherichia coli* among children in rural Vietnam. BMC infectious diseases. 12(92): 8.
- 4- Bao L., R. Peng, Ren X., R. Ma, J. Lian, Y. Wang, 2013. Analysis of some common pathogens and their drug resistance to antibiotics. Pakistan J. Med. Sc. 29(1): 135-139.
- 5- Quinn P.J., Carter M.E., Markey B., Carter G.R.. Clinical Veterinary Microbiology. Wolfe Publishing, Spain. 1994; 209-236.d
- 6- Finazzi G., Cardeti G., Pacciarini M.L., Losio M., Tagliabue S. Characterization of strains of *Escherichia coli* isolated from rabbits with enteritis in Lombardia and Emilia Romagna during the triennium 1997-1999. J. World Rab. Sci. Assoc. 2000; 8:241-247.
- 7- Bauer A. W., Kirby W. M., Sherris J. C., Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol. 1966; 45(4): 493-496
- 8- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard M2-A10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009
- 9- CA-SFM: Comite de l'antibiogramme. French Society of Microbiology. 2010. 10-10- Kim HB, Park CH, Kim CJ, Kim EC, Jacoby GA, Hooper DC. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants over a 9-year period. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53(2):639-45.
- 11-Ezekiel C. N., A. O. Olanmoye, J. M. A. Oyinloye, dO. B. Olaoye and A. O. Edun. Distribution, Antibiogram and Multidrug Resistance in Enterobacteriaceae from Commercial Poultry Feeds in Nigeria. African journal of microbiology research 5(3):294-301. 2011.
- 12- Santos MM, Alcantara ACM, Perecmanis SI, Campos AI, Santana AP. 2014. Antimicrobial Resistance of Bacterial Strains Isolated from Avian Cellulitis. Brazilian Journal of Poultry Science. 2014. 16(1), 13-18

- 13- Okalla Ebongue C., Dongmo Tsi azok M., Nda Mefo'o J. P., Ngaba G. P., Beyiha G., Adiogo D. Evolution de la resistance aux antibiotiques des enterobacteries isolees a l'Hopital General de Douala de 2005 a 2012. The Pan African Medical J. 2015.
- 14- Seifil S., R. Khoshbakht, A. R. Atabak. antibiotic susceptibility, serotyping and pathogenicity evaluation of avian escherichia coli isolated from broilers in northern Iran. Bulgarian Journal of Veterinary Medicine, 2015, 18(2), 173-179.
- 15- Iwaki M, Noguchi N, Nakaminami H, Sasatsu M, Ito M. Antimicrobial activity and frequency of spontaneous gentamicin-resistant mutants in bacteria related skin infections. J. Phrama. Soc. Japan. 2011;131(11):1653-9.
- 16- Hammoudi, A., Aggad, H. Antibioresistance of Escherichia coli Strains Isolated from Chicken Colibacillosis in Western Algeria. Turkish J. Veterinary and Animal Sci. 2008; 32(2): 123-126.
- 17- Aggad, H., Ahmed Ammar, Y., Hammoudi, A and Kihal, M. Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* Isolated from Chickens with Colibacillosis. Global Veterinaria. 2010; 4 (3): 303-306.
- 18- Benameur Q., Guemour D., Hammoudi A., Aoudia H., Aggad H., Humblet M-F., Saegerman C., 2014 ; Antimicrobial resistance of Escherichia coli isolated from chickens in west of Algeria. Inter. J. Sci. Basic App. Res. 2014; 13(1): 366-370
- 19- Messai C.R, Khelef D , Boukhors K.T , Radji N , Goucem R., Hamdi T-M. Antimicrobial susceptibility of Escherichia coli strains isolated from broil er chickens affected by colibacillosis in Setif.African Journal of Microbiology Research. 2013; 7(21): 2668-2672.
- 20- Garnacho-Montero J., Ortiz-Leyba C., Jimenez-Jimenez F. J., Barrero Almodovar A. E., Garcia-Garmendia J. L., Bernabeu-Wintell M., Gallego Lara S. L., Madrazo-Osuna J. Treatment of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii ventilator-associated pneumonia (VAP) with intravenous Colistin : a comparison with imipcnem-susccptible VAP. Clin. Infect. Dis. 2003; 36 (9): 1111-1118.
- 21- Nahar A., Siddiquee M, Nahar S., Anwar K. S., Islam S. Multidrug Resistant-Proteus Mirabilis Isolated from Chicken Droppings in Commercial Poultry Farms: Bio-security Concern and Emerging Public Health Threat in Bangladesh. J. Biosafety Health Educ. 2014; 2: 120.
- 22- Nemat M. Antimicrobial resistance of proteus isolates from poultry. Euro. J. Exp. Bio. 2013; 3(6):499-500.
- 23- Hafed Z., Benguedour R. Youssef A., Lotfi Z., Mahjoub A., Nabyl B., Nabil A., Sbaibi R. Profil d'antibiorresistance d'Escherichia coli d'origine aviaire: cas de poulet de chair dans la region de grande Casablanca. Am. J. innov. res. appl. sci. 2015; 2(2):50-54.
- 24- Wong M. H., Wan H. Y., Chen S. Characterization of multidrug-resistant Proteus mirabilis isolated from chicken carcasses. Foodborne Path. Disea. 2013; 10: 177-181.
- 25- Fielding B. C., Mnabisa A., Gouws P. A., Morris T. Antimicrobial-resistant Klebsiella species isolated from free-range chicken samples in an informal settlement. Arch. Med. Sci. 2012; 8:39-42.
- 26- A. Fofana, R. Bada Alamedji, M. Seydi, A.J. Akakpo. Anti bioresistance of *Escherichia coli* strains isolated from raw chicken meat in Senegal. Dakar Medical, 2006, 511: 57-62.
- 27- Ojo, O. E., O. G. ogunyinka, M. Agbaje, J. O. Okuboye, O. O. Kehinde, M. A. OYEKUNLE: Antibiogram of Enterobacteriaceae nterobacteriaceae isolated from free-range isolated from free-range chickens in Abeokuta, Nigeria. hickens in Abeokuta, Nigeria. Vet. arhiv 82, 577-589, 2012.
- 28- Wang M., Guo Q., Xu X., Wang X., Ye X., Wu S., Hooper D.C., Wang M. New plasmid-mediated quinolone resistance gene, qnrC, found in a clinical isolate of Proteus mirabilis. Antimicrob. Agents Chemother. 2009; 53(5):1892-1897.
- 29- Cavaco L. M., Hasman H., Xia S., Aarestrup F. M. qnrD, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in Salmonella enteric serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin. Antimicrob. Agents Chemother. 2009; 53:603-608.
- 30- Honore S., Lascols C., Malin D., Targaouchi R., Cattoir V., Legrand P., Soussy C-J., Cambau E. Emergence et diffusion chez les enterobacteries du nouveau mecanisme de resistance plasmidique aux quinolones Qnr (Resultats hopital Henri-Mondor 2002-2005). Pathologie Biologie. 2006; 54: 270-279.
- 31- Martinez-Martinez L., Pascual A., Jacoby G.A. Quinolone resistance from a transferable plasmid. Lancet. 998. 351:797-9.
- 32- Martinez-Martinez, L., A. Pascual, and G. A. Jacoby. 1998. Quinolone resistance from a transferable plasmid. Lancet 351:797-799).
- 33- Corkill, J. E., J. J. Anson, and C. A. Hart. 2005. High prevalence of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrA* in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* from blood cultures in Liverpool, UK. J. Antimicrob. Chemother. 56:1115-1117).
- 34- Jacoby G.A. Mechanisms of resistance to quinolones. Clin. Infect. Dis. 2005; 41(Suppl 2): 120-126.
- 35- Wang M., Tran J. H., Jacoby G. A., Zhang Y., Wang F., Hooper D. C. Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of Escherichia coli from Shanghai, China. Antimicrob. Agents Chemother. 2003; 47: 2242-2248.

Jumlah dan Jenis Bakteri di Vagina Sapi Bali selama Estrus dan Bunting

Ketut Tono PG¹, Putu Henrywaesa Sudipa², I Gusti Ketut Suarjana³

¹Laboratorium Bakteriologi dan Mikologi Hewan, Departemen Patobiologi Hewan, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana, Bali, Indonesia E.mail: ketut_tono@unud.ac.id

²Laboratorium Bakteriologi dan Mikologi Hewan, Departemen Patobiologi Hewan, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana, Bali, Indonesia E.mail: henrywaesa@unud.ac.id

³Laboratorium Bakteriologi dan Mikologi Hewan, Departemen Patobiologi Hewan, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana, Bali, Indonesia E.mail :kt_suarjana@unud.ac.id

Penulis yang sesuai: ketut_tono@unud.ac.id

Abstrak.Sapi Bali memiliki potensi yang sangat baik untuk pasokan daging dan anak sapi, karena mereka memiliki kemampuan beradaptasi yang baik dengan sifat reproduksi yang berkualitas baik. Namun, sifat reproduksi yang baik terancam oleh penyakit yang disebabkan oleh bakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui jumlah dan jenis bakteri pada vagina sapi Bali yang estrus dan bunting. Sampel menggunakan swab vagina dari 30 sapi. Sampel terdiri dari 10 swab dari sapi non-estrus dan tidak bunting (kontrol / normal), 10 swab dari sapi estrus, dan 10 swab dari sapi bunting. Setelah swab dilakukan menggunakan cotton bud, hasil swab disimpan di media transport Stuart. Sampel ditanam dalam media darah untuk diidentifikasi dan jumlah koloni dihitung, kemudian dilanjutkan dengan pewarnaan Gram dan tes biokimia kemudian hasilnya disajikan secara deskriptif. Hasilnya adalah jumlah tertinggi koloni sapi estrus (1034 koloni), dibandingkan dengan sapi non-estrus dan non-bunting (407 koloni) dan bunting (376 koloni). Jenis bakteri ini didominasi oleh *Klebsiella* sp. (42,85%), *Eschericia coli* (28,7%), *Streptococcus* sp. (14,28%) dan *Bacillus* sp. (14,28%).

Kata kunci: Bakteri, Sapi Bali, Vagina Swab

I. PENDAHULUAN

Sapi Bali (*Bos sondaicus*, *Bos javanicus*, *Bos / Bibosbanteng*) adalah salah satu jenis sapi yang penting bagi pengembangan dukungan industri pariwisata

di Bali dan Indonesia pada umumnya. Ini karena sapi Bali sangat bagus potensi pasokan daging dan anak sapi karena mereka memiliki kemampuan beradaptasi yang baik dengan sifat reproduksi yang baik [7].

Namun, sifat reproduksi yang baik ini terancam oleh penyakit yang disebabkan oleh bakteri. Salah satu akibat dari infeksi bakteri adalah aborsi. Aborsi adalah masalah utama bagi petani karena kehilangan janin yang kadang-kadang diikuti oleh penyakit rahim dan kemandulan yang berkepanjangan. Menurut [9], agen penyebab aborsi diklasifikasikan ke dalam beberapa kelompok, yaitu fisik, genetik, nutrisi, kimia, obat, keracunan, hormon, dan penyakit. Sedangkan penyakitnya umumnya disebabkan oleh bakteri, virus, jamur dan protozoa. Infeksi bakteri sangat merugikan sapi Bali, dalam hal ini bakteri dalam saluran reproduksi sapi betina, pada saat estrus di mana sapi siap dikawinkan dan saat bunting yang mampu menyebabkan aborsi. Karena itu,

II BAHAN DAN METODE

Penelitian dimulai pada bulan Mei 2019, sampel diambil di Sobangan Desa, Badung, Bali. Kemudian sampel diperiksa di Laboratorium Bakteriologi dan Mikologi di Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana. Sampel diambil menggunakan

swab vagina dari 30 sapi. Sampel terdiri dari 10 swab dari sapi non-estrus dan tidak bunting (kontrol / normal), 10 swab dari sapi estrus, dan 10 swab dari sapi bunting. Setelah swab dilakukan menggunakan cotton bud, hasil swab disimpan di media transport Stuart. Sampel ditanam dalam media darah untuk diidentifikasi dan jumlah koloni dihitung, kemudian dilanjutkan dengan pewarnaan Gram dan tes biokimia kemudian hasilnya disajikan secara deskriptif.

III. HASIL DAN DISKUSI

Jumlah koloni yang tumbuh paling banyak adalah sapi atestrus, ini berbanding terbalik dengan wahyu [6], di mana hasil penelitian menunjukkan bahwa selama estrus di mana hormon estrogen mendominasi selama fase folikel, ada peningkatan migrasi leukosit ke lumen uterus dengan demikian meningkatkan aktivitas bakterisida. Tetapi hasil yang berlawanan diperoleh dalam penelitian [2], di mana bakteri diisolasi selama fase folikuler (proestrus dan estrus) hanya 22,47% dibandingkan dengan fase luteal

(metestrus dan diestrus) yaitu 77,53% dari siklus estrus.
jumlah total bakteri dalam keadaan normal

Tabel 1. Jumlah Koloni yang Tumbuh di Media yang Diambil dari Sapi Normal dan bukan Estrus (Kontrol)

Sampel	Jumlah Koloni
A1	33
A2	99
A3	40
A4	10
A5	10
A6	95
A7	39
A8	20
A9	93
A10	31
Total Koloni	470
Rata-rata	47

Tabel 2. Jumlah Pertumbuhan Koloni di Media yang Diambil dari Sapi yang Bunting

Sampel	Jumlah Koloni
B1	36
B2	12
B3	33
B4	29
B5	54
B6	11
B7	6
B8	36
B9	60
B10	99
Total Koloni	376
Rata-rata	37,6

Tabel 3. Jumlah Pertumbuhan Koloni di Media yang Diambil dari Sapi Anestrus

Sampel	Jumlah Koloni
E1	11
E2	55
E3	181
E4	110
E5	60
E6	47
E7	176
E8	106
E9	190
E10	98
Total Koloni	1034
Rata-rata	103,4

Tabel 4. Jenis Bakteri dan Persentase Bakteri pada Sampel

Bakteri	Persentase (%)
<i>Eschericia coli</i>	28,7
<i>Streptococcus sp.</i>	14,28
<i>Klebsiella sp.</i>	42,85
<i>Bacillus sp.</i>	14,28

Jumlah terkecil koloni bakteri dalam penelitian ini ditunjukkan oleh sapi Bali bunting, ini konsisten dengan penelitian [6], di mana sapi yang memiliki usia kebuntingan 3 bulan berhasil diisolasi oleh bakteri hanya 12,94% dari total isolat bakteri, kemudian semakin besar usia kebuntingan, jumlah bakteri yang berhasil diisolasi lebih sedikit di mana pada usia kebuntingan 6 bulan, hanya 11,18% yang berhasil diisolasi dan pada usia 9 bulan

hanya 8,82% dari total isolat berhasil diisolasi. Ini ditambahkan oleh [6] di mana jumlah isolat yang berhasil diisolasi lebih banyak diperoleh pada usia awal kebuntingan (42,08%) dibandingkan dengan usia akhir kebuntingan (15,83%).

Empat jenis bakteri yang tumbuh adalah bakteri yang sering ditemukan di area vagina sapi, menurut [4] flora mikroba dari sapi yang sehat.

saluran reproduksi terdiri dari kombinasi mikroorganisme aerob, anaerob fakultatif, dan anaerob wajib. *Lactobacilli* ditemukan hadir dalam jumlah rendah dalam mikrobiota vagina sapi; selain itu, *Enterobacteriaceae* adalah salah satu populasi yang dominan [5]. Ini konsisten dengan hasil penelitian yang dilakukan yaitu *Klebsiella* sp. *Enterobacteriaceae*, dan jumlahnya paling dominan di antara bakteri lain. Kemudian bakteri dominan ditemukan selain *Klebsiella* sp. adalah *E.Coli*, yang menurut penelitian [1] *E. coli* adalah flora normal yang paling umum ditemukan pada sapi. Ini tidak mengherankan karena sanitasi, kondisi lingkungan, sistem pemuliaan dan kondisi umum hewan mempengaruhi kolonisasi rasio bakteri pada vagina [8].

Menurut [6] pada fase folikuler (proestrus dan estrus) bakteri yang paling sering diisolasi adalah *Bacillus* Spp. (22,58%) diikuti oleh *Corynebacterium* Spp., *Staphylococcus* Spp. dan *Streptococcus* Spp. (masing-masing 19,35%), *E. coli* dan *Salmonella* (masing-masing 6,45%), dan jamur *Micrococcus* dan vaginal (masing-masing 3,23%), menunjukkan hasil bakteri yang berhasil diisolasi 18,24% dari 170 bakteri yang diisolasi. Pada fase luteal (metestrus dan diestrus) bakteri yang paling dominan adalah *Staphylococcus* Spp. (19,05%) diikuti oleh *Corynebacterium* Spp. (14,29%), *Bacillus* Spp., *E. coli* dan *Streptococcus* Spp. (Masing-masing 11,90%), *Micrococcus* (9,52%), *Salmonella* (7,14%), dan *Klebsiella*, *Proteus* dan jamur vaginal (masing-masing 4,76%), bakteri yang berhasil diisolasi adalah 24,71% dari total 170 bakteri isolat. [3] berhasil mengisolasi *E. coli* (17,7%), *Klebsiella* Spp. (5,81%), *Staphylococcus* (12,79%), dan *Bacillus* Spp. (9,30%) dari 40 sampel sapi bunting. Hasil penelitian kami adalah beberapa bakteri yang berhasil kami isolasi menunjukkan hasil yang sama pada penelitian dari [6] dan [3], di mana kami berhasil mengisolasi *Klebsiella* sp. for 42,85%, diikuti oleh *Eschericia coli* selama 28, 7%, dan masing-masing dari *Streptococcus* sp.type dan *Bacillus* sp. 14,28% dari 30 sampel, semua bakteri ini selalu muncul jika dilihat dari beberapa penelitian lain.

V. KESIMPULAN

Jumlah koloni terbesar tumbuh di media yang spesimen diambil dari estrus Sapi Bali melalui swab vaginal, berjumlah 1034 koloni, dengan rata-rata 103,4 koloni per sampel. Jumlah koloni itu tumbuh kadang bervariasi dengan setiap studi, tetapi pada umumnya bakteri yang dapat diisolasi di dalam fase folikuler (proestrus dan estrus) adalah kurang dari fase luteal (metestrus dan diestrus) atau bisa dikatakan tidak bunting dan fase fase, lalu jumlah bakteri yang dapat diisolasi pada sapi bunting berkurang dengan bertambahnya usia kebuntingan.

Bakteri yang tumbuh mendominasi oleh *Klebsiella sp.* untuk 42,85% dari 30 sampel, diikuti oleh *Escherichia colifor* 28,7%, dan masing-masing *Streptococcus sp* tipe dan *Bacillus sp.* sebesar 14,28%. Dari beberapa penelitian yang telah dilakukan, bakteri yang sama juga muncul, tetapi dengan berbeda persentase.

REFERENSI

- [1] Azawi OI, Omran SN, Hadad JJ. 2008. "A study of endometritis causing repeat breeding of cycling Iraqi buffalo cows". *Reprod. Domest. Anim.* 43(6):735-43.
- [2] El-Jakee JA, Ahmed WM, El-Seedy FR, El-Moez SA. 2008. Bacterial profile of the genital tract in female buffaloes during different reproductive stages. *Global Vet.* 2(1), 7-14.
- [3] Jadon RS, Dhaliwal GS, Jand SK. 2005. Prevalence of aerobic and anaerobic uterine bacteria during peripartum period in normal and dystocia-affected buffaloes. *Anim. Reprod. Sci.* 88(3-4): 215-224.
- [4] Otero C, Silva De Ruiz C, Ibañez R, Wilde OR, De Ruiz Holgado AAP, Nader-Macias ME. 1999. Lactobacilli and enterococci isolated from the bovine vagina during the estrous cycle. *Anaerobe.* 5:305–307. doi:10.1006/anae. 1999.0245.
- [5] Otero C, Saavedra L, Silva De Ruiz C, Wilde O, Holgado AR, Nader-Macias ME. 2000. Vaginal bacterial microflora modifications during the growth of healthy cows. *Lett.* 31:251–254. doi: 10.1046/j.1365-2672.2000.00809. x.
- [6] Patel CI, Panchal MT, Dhama AJ, Bhandari BB, Mathakiya RA. 2019. Isolation of Bacteria from the Vaginal Aspirates of Cyclic, Acyclic, Endometritic and Pregnant Crossbred Cows. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.* 8(3):536- 542
- [7] Suranjaya IG, Ardika IN, Indrawati RR. 2010. Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Produktivitas Sapi Bali di Wilayah Binaan Proyek Pembibitan dan Pengembangan Sapi Bali di Bali. *Majalah Ilmiah Peternakan.* 13(3): 83-87.
- [8] Sheldon IM, Noakes DE, Rycroft AN, Pfeiffer DU, Dobson H. 2002. Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. *Reproduction.* 123:837–845. doi: 10.1530/rep.0.1230837.
- [9] Toelihere MR. 2006. "Ilmu kebidanan pada ternak sapi dan kerbau". Jakarta (Indonesia): Universitas Indonesia Press.

Pengaruh hyperacetylasasi histon terhadap perkembangan praimplantasi embrio sapi sexing jantan dan betina

Diterima : 15 September 2009

Disetujui : 5 February 2010

Clara S. Oliveira^{A,B}, Naiara Z. Saraiva^A, Marcela M. de Souza^A, Tatiane A. D. Tetzner^A, Marina R. de Lima^A and Joaquim M. Garcia^A

^ADepartment of Preventive Veterinary Medicine and Animal Reproduction, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária]Sao Paulo State University, Jaboticabal, São Paulo 14884-900, Brazil.

^BCorresponding author. Email: claraaslade@gmail.com

Abstrak

Trichostatin A (TSA) menginduksi hyperacetylasasi histone oleh deacetylase histon dan akibatnya menghambat ekspresi gen meningkat. Hipotesis adalah bahwa suplementasi TSA selama kultur in vitro (IVC) dari embrio sapi akan meningkatkan tingkat blastosis, khususnya di embrio berkualitas rendah dan betina. Oosit dipupuk secara terpisah dengan spermatozoa X dan Y dan, 70 jam setelah IVF, media IVC dilengkapi dengan 5 nM dan 15nM TSA untuk 48 atau 144 h. Inkubasi embrio betina dengan 5 15nM nM dan TSA mengakibatkan peningkatan serupa di tingkat H3K9 asetilasi histon. Namun, untuk melihat efek yang sebanding pada tingkat H3K9 histone asetat pada embrio jantan, media kultur perlu dilengkapi dengan 15nM TSA (sebagai lawan 5 nMTSA untuk embrio betina). Perlakuan embrio jantan dan betina dengan 5 nMTSA selama 48 jam atau embrio betina dengan 5 nM for 144 h tidak berpengaruh pada tingkat blastosis, meskipun 15nM TSA dikompromikan perkembangan embrio. Terminal deoxyribonucleotidyl transferase-mediated dUTP-digoxigenin nick akhir label (TUNEL) mengungkapkan apoptosis assay meningkat pada embrio betina diperlakukan dengan 5 nM TSA untuk 144 jam, serta pada embrio jantan dan betina diperlakukan dengan 15nMTSA for 48 jam, tapi ini peningkatan apoptosis tidak diamati dalam embrio low quality. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa perlakuan TSA mempromosikan hyperacetylasasi histone, tetapi tidak memiliki efek menguntungkan pada produksi in vitro embrio sapi jantan dan betina selama pengembangan praimplantasi.

Pengantar

Meskipun IVF telah didirikan di sapi sejak tahun 1980-an (Brackett *et al.*, 1982), hasil yang diperoleh secara in vitro masih jauh lebih rendah dibandingkan yang diperoleh secara in vivo. Meskipun tingkat pembelahan tinggi untuk oosit sapi matang dan dibuahi in vitro, hanya 25-40% dari zigot berkembang ke tahap blastosis (Lonergan 1994). Selain itu, dalam kultur in vitro (IVC) meningkatkan proporsi embrio jantan, yang berkembang lebih cepat (Avery *et al.*, 1992.) dan mencapai tahap blastosis lebih sering (Xu *et al.*, 1992.).

Selama tahap awal embrio sapi, blastomer menggunakan maternal diwariskan komponen untuk sintesis protein (Lonergan *et al.*, 2003.) dan aktivasi genom embrio hanya terjadi selama transisi dari delapan sampai tahap 16-sel (*et al.*, Badar. 2007). Transisi ibu-zigotik sangat penting untuk aktivasi sejumlah besar gen, sehingga mencapai suatu pola ekspresi gen yang kompatibel dengan perkembangan embrio dan diferensiasi (Schultz 2002).

Tingginya angka kematian embrio diamati setelah IVF di sapi mungkin terkait dengan penangkapan perkembangan selama masa transisi dari siklus sel keempat kelima (Memili dan First 2000) sebagai akibat dari ketidakmampuan embrio untuk memodifikasi struktur kromatin represif dan untuk mengaktifkan transkripsi gen penting bagi perkembangan (Betts dan King 2001). Selain itu, embrio IVF yang memperoleh transkripsi aktif dapat hadir epigenetic modifications berubah kromatin (Enright *et al.*, 2003a.) yang menghasilkan profil transkripsi gen yang berbeda antara embrio sapi yang diproduksi in vitro dan in vivo (Wrenzycki *et al.*, 2004). Beberapa gen disajikan pada tingkat yang rendah dalam embrio IVF, seperti transkrip terkait dengan pematangan dan kavitas (Wrenzycki *et al.*, 1996), stres adaptasi (Rizos *et al.*, 2002.), metabolisme embrio (Bertolini *et al.*, 2002.) dan kromosom X inaktivasi (Wrenzycki *et al.*, 2002.). Fungsi-fungsi ini dapat ditingkatkan pada embrio IVF oleh upregulation gen masing-masing. Trichostatin A (TSA) adalah molekul yang mempromosikan peningkatan global dalam ekspresi gen (Johnstone 2002) dan, sehingga, TSA dapat mempengaruhi profil transkripsi gen diekspresikan pada tingkat yang rendah di in vitro-diproduksi (IVP) embrio, meningkatkan ekspresi ini lebih dekat ke tingkat normal gen.

Peningkatan ekspresi gen juga dapat membantu embrio berkualitas rendah, termasuk embrio betina perlahan-lahan berkembang, untuk mengatasi penindasan kromatin dan untuk mencapai pola ekspresi gen yang kompatibel dengan pengembangan lebih lanjut. Renovasi kromatin memainkan

peran dalam regulasi ekspresi gen di embrio praimplantasi (Patterton dan Wolffe 1996). Di antara modifikasi epigenetik, asetilasi histon berhubungan dengan ekspresi gen meningkat dengan mengizinkan akses faktor transkripsi untuk (Schubeler *et al.*, 2004.) DNA. Setelah pembuahan, embrio ismethylated genom dan gen disajikan pada tingkat yang sangat rendah (Dean *et al.*, 2001.). Asetilasi histon puncak pada saat aktivasi genom embrio, kompatibel dengan kenaikan keseluruhan tingkat ekspresi gen, sedangkan penurunan tingkat asetilasi terhadap 16 sel dan tahap morula (Maalouf *et al.*, 2008). Asetilasi histon diatur oleh dua enzim utama: (1) asetiltransferase histone menambahkan kelompok asetil ke ekor histone, menetralkan dan melemahkan mengikat untuk nukleosom, dan (2) histone deacetylase (HDAC), yang, sebaliknya, menyingkirkan kelompok asetil dan menyebabkan pemadatan kromatin dan membungkam dari segmen DNA pada situs itu (Johnstone 2002). Studi telah menunjukkan partisipasi HDAC dalam proses asetilasi di blastomer (Ma dan Schultz 2008). TSA reversibel inhibits HDAC pada konsentrasi nanomolar, bertindak Kelas onmost I dan II HDAC (Zupkovitz *et al.*, 2006.). Oleh karena itu, TSA mempromosikan hyperacetilasi histone, mengarah ke peningkatan global pada ekspresi gen.

Tujuan dari studi ini adalah untuk mengevaluasi dampak TSA pada IVP embrio sapi betina dan jantan. Kami menguji hipotesis bahwa TSA akan meningkatkan tingkat produksi in vitro embrio dengan meningkatkan tingkat asetilasi histon, terutama di embrio betina, yang lebih sensitif terhadap kultur in vitro (IVC; Edwards *et al.*, 2001), dan embrio berkualitas rendah .

Bahan dan metode

Suplemen

Kecuali dinyatakan lain, reagensia dan media kultur dibeli dari Sigma Chemical (St Louis, MO, USA).

Persiapan dan Pemilihan Oosit

Ovarium sapi dikumpulkan di rumah pemotongan lokal dan diproses 2 jam setelah pemotongan. Ovarium dicuci di saline (37°C) dan folikel berukuran 3-8mm dengan diameter yang disedot dengan jarum 18-gauge dipasangkan dengan syringe 20 mL. Cumulus Oosit Kompleks (COCs) menyajikan setidaknya tiga lapisan sel cumulus dan sitoplasma homogen dipilih di bawah mikroskop stereo. COCs dicuci di HEPES-buffer-TCM 199 (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA) ditambah dengan 10% serum janin sapi (FBS; Cripion, Andradina, Brazil), 16 piruvat⁻¹ mgmL natrium dan 83,4 mgmL⁻¹ amikasin (Instituto Biochimico, Rio de Janeiro, Brazil).

Maturasi In Vitro

Kelompok 15 COCs dialihkan ke drop 100-mL medium yang mengandung sodium bikarbonat-buffered TCM-199 dilengkapi dengan FBS 10%, 1.0 mgmL⁻¹ FSH (Folltropin; Bioniche Kesehatan Hewan, Belleville, Kanada), 50 mgmL⁻¹ gonadotrophin human chorionic (Profasi; Serono, Sao Paulo, Brazil), 1.0 mgmL⁻¹ estradiol, 16 mgmL⁻¹ natrium piruvat dan 83,4 mgmL⁻¹ amikasin, ditutupi dengan minyak mineral steril (Dow Corning, Midland, MI, USA) dan diinkubasi selama 24 jam pada 38.5°C dalam suasana 5% CO₂ di udara di bawah kelembaban jenuh.

Fertilisasi In Vitro

Setelah IVM, sel-sel kumulus yang sebagian dikeluarkan dari oosit oleh pipetting. Kelompok 25 oosit dicuci dua kali dan dipindahkan ke drop 30 mL piruvat laktat albumin Tyrode's (TALP) medium dengan serum albumin 0,6% sapi (BSA), 10 mgmL⁻¹ heparin, 18 penicillamine mM, 10 hypotaurine mM dan 1,8 adrenalin mM dan ditutupi dengan minyak mineral steril. Sedotan beku semen dari banteng yang sama bergender dengan sitometri (Lagoa da Serra, Serta ~ ozinho, Brasil) digunakan. Aliran sperma cytometric sortir berdasarkan perbedaan dalam kandungan DNA adalah metode terbaik untuk pemisahan spermatozoa X dan Y kromosom-bearing, dengan akurasi sekitar 90% (Seidel *et al.*, 1999;. Hamano 2007). Setiap jerami, mengandung sekitar 2 juta spermatozoa, telah disentrifugasi secara terpisah pada gradien 45/90 Percoll terputus selama 7 menit pada 3600G. Pelet itu resuspended di 700 mL medium TALPIVF dan disentrifugasi kembali selama 5 menit pada 520g. Setelah sentrifugasi, 80 mL medium yang mengandung pelet itu dikumpulkan dari bagian bawah tabung dan homogen dalam tabung kerucut. Suspensi akhir itu dibagi di antara lima drop yang mengandung oosit pada konsentrasi akhir sekitar 104 spermatozoa untuk setiap oosit. Pelat diinkubasi pada 38.58C selama 20 jam dalam suasana CO₂ 5% di udara di bawah kelembaban jenuh.

Kultur In Vitro

Setelah IVF, zigot yang gundul sel kumulus oleh pipetting kuat sebelum kultur dalam cairan oviducal sintesis (SOF) medium dengan 2,5 FBS% dan 5mgmL⁻¹ BSA di 38.5°C dalam CO₂ 5% di

udara di bawah kelembaban jenuh. Kelompok 15-20 dugaan zigot dikultur dalam drop 100-mL sampai waktu perlakuan dengan TSA. Tingkat pembelahan ditentukan 48 jam setelah IVF, sedangkan pengembangan blastosis dievaluasi 7 hari setelah IVF.

Perlakuan dengan TSA

Embrio dicuci dan dipindahkan pada drop 100 mL medium IVC yang telah disuplementasi dengan 0 (kontrol), 5 dan 15nM TSA 70 jam setelah IVC. Embrio dikultur pada media yang ditambah dengan TSA untuk 48 atau 144 jam. Setelah 48 jam, embrio pada kelompok 0 (kontrol), 5 nM dan 15 nM dipindahkan pada drop IVC tanpa penambahan TSA, sedangkan embrio dari kelompok 5 nM setelah 144 jam dipindahkan ke drop medium IVC segar yang disuplementasi dengan 5 nM TSA.

Imunositokimia dari H3K9 Asetilasi

Setelah 48 jam perlakuan dengan TSA, embrio difiksasi dalam paraformaldehide 4% selama 1 jam dan disimpan di 48C di phosphatebuffered saline (PBS) ditambah dengan 3% BSA dan 0,5% Triton X-100 hingga 1 minggu. Tetap embrio diinkubasi dengan larutan blocking (3% BSA dan 0,2% Tween-20 dalam PBS) selama 1 jam pada suhu kamar. Selanjutnya, embrio diinkubasi dengan antibodi primer (antibodi mouse H3K9 anti-asetat (H3K9ac) monoklonal; 1: 100) selama 12 jam pada 48C. Embrio itu kemudian dicuci tiga kali dalam PBS selama 10 menit setiap kali sebelum diinkubasi dengan antibodi sekunder (Cy3-terkonjugasi domba antibodi anti-mouse; 1: 200) selama 2 h. Inti diwarnai dengan 10 mLmL⁻¹ Hoechst 33342 selama 10 menit. Embrio itu kemudian dicuci tiga kali selama 10 menit setiap kali dalam PBS dan diperiksa di bawah mikroskop fluoresensi. Reaksi di mana antibodi primer dihilangkan menjabat sebagai kontrol negatif. Gambar struktur masing-masing yang diambil dengan kamera AxioCam dan disimpan dengan menggunakan perangkat lunak AxioVision 4.7.1 (Carl Zeiss, Jena, Jerman).

Perbedaan tingkat H3K9ac antara kelompok-kelompok diestimasi oleh menghubungkan skor asetilasi untuk setiap embrio, mengelompokkan derajat reaktivitas sel sebagai G0 baik, GI, dan GII GIII berdasarkan intensitas respon H3K9ac. Nilai asetilasi akhir untuk setiap embrio dihitung sebagai $(1 \times nGI + 2 \times nGII + 3 \times nGIII) / (nG0 + nGI + nGII + nGIII)$, dimana n adalah jumlah sel.

Pengujian Apoptosis dan Penentuan Jumlah Total Sel Blastosis

Blastosis dievaluasi oleh terminal pengujian deoxyribonucleotidyl transferase-mediated dUTP-digoksigenin nick end-labelling (TUNEL) (In Situ Deteksi Cell Death Kit, Fluorescein; Roche Applied Science, Mannheim, Jerman) menurut protokol yang dijelaskan oleh Paula-Lopes dan Hansen (2002). Secara singkat, blastosis paraformaldehide-tetap diinkubasi dengan 0,5% Triton X-100 dalam PBS untuk 30 menit pada suhu kamar. Selanjutnya, embrio dialihkan kepada solusi akhir yang berisi 10 mL larutan enzim (terminal transferase deoxynucleotidyl) dan 90 mL larutan label (fluorescein-dUTP) dan diinkubasi selama 1 jam pada 38.58C, diikuti dengan inkubasi dengan 50 mgmL⁻¹ RNase A untuk 1 jam pada suhu kamar. Inti diwarnai dengan 10 mLmL⁻¹ Hoechst 33342 untuk 10min, setelah blastosis dicuci tiga kali dalam PBS. Sampel kontrol positif diinkubasi dengan 50 IUmL⁻¹ DNase selama 1 jam sebelum inkubasi dengan larutan enzim-dUTP akhir. Sampel kontrol negatif diinkubasi tanpa enzim. Jumlah sel apoptosis dan jumlah inti ditentukan di bawah mikroskop fluoresensi (IX-70, Olympus, Tokyo, Jepang) pada panjang gelombang 330-385 nm (Hoechst 33.342) dan 420-490 nm (fluorescein).

Jumlah rata-rata jenis kelamin-yang spesifik sel dalam blastosis dihitung dengan menggabungkan data dari empat kelompok eksperimental. Embrio yang dinilai sebagai kualitas tinggi jika jumlah sel di atas kualitas rata-rata dan rendah jika jumlah sel di bawah rata-rata.

Analisis Statistik

Perbedaan tingkat blastosis dan apoptosis antara kelompok-kelompok dianalisis dengan uji Chi-squared (X^2) menggunakan software MINITAB, rilis 14.1 (Minitab, State College, PA, USA). Total jumlah sel dan H3K9ac tingkat dianalisis dengan ANOVA satu arah dan berarti dibandingkan dengan uji Tukey menggunakan GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Prism, San Diego, CA, USA).

Hasil

Awal percobaan yang dilakukan menggunakan semen konvensional (data tidak ditampilkan) menunjukkan bahwa inkubasi dengan konsentrasi TSA lebih tinggi dari 15nM selama 24 jam adalah racun bagi kultur embrio. Hanya konsentrasi 5 nM TSA menghasilkan produksi blastosis dekat tingkat dengan yang diperoleh untuk kultur kontrol bila diterapkan sampai Hari 7 perkembangan (144 jam).

Pengaruh Perlakuan dengan TSA pada Tingkat H3k9ac

Dua ulangan sesuai dengan 58 jantan dan 77 embrio betina pada Hari 5 pengembangan dan mengandung antara 10 dan 32 sel ($n=18-33$ per kelompok eksperimen) dianalisis. Setelah 48 jam perlakuan dengan TSA, tingkat H3K9ac dalam embrio betina diperlakukan dengan 5 dan 15nM TSA lebih tinggi dari mereka yang berada di kelompok kontrol ($P<0.05$) dan tidak ada perbedaan yang signifikan dalam tingkat H3K9ac antara kelompok perlakuan dengan 5 dan 15nM TSA ($P>0.05$). Untuk embrio jantan, perawatan TSA H3K9ac mengakibatkan tingkat lebih tinggi ($P<0.05$) yang tergantung konsentrasi, dengan tingkat H3K9ac lebih tinggi di embrio perlakuan dengan 15nM TSA daripada embrio perlakuan dengan 5 nM ($P<0.05$). Tidak ada perbedaan yang signifikan diamati pada tingkat H3K9ac antara embrio jantan dan betina diperlakukan dengan konsentrasi yang sama TSA ($P>0.05$; Gambar 1.).

Pengaruh Hyperacetylation Histon terhadap Perkembangan Embrio Jantan dan Betina

Dalam penelitian ini, 579 embrio sexing jantan dan 419 embrio sexing betina diperoleh di tujuh ulangan ($n=90-155$ embrio dibelah per kelompok eksperimen) dianalisis. Tak satu pun dari konsentrasi TSA diuji meningkatkan tingkat blastosis (Tabel 1). Pada 15nM, TSA berkurang ($P<0.05$) produksi blastosis di kedua embrio jantan dan betina ($P<0.05$).

Embrio jantan ditemukan lebih sensitif terhadap perlakuan berkepanjangan dengan TSA. Misalnya, perlakuan embrio jantan dengan 5 nM TSA untuk 144 jam mengurangi tingkat blastosis ($P<0.05$), sedangkan penurunan serupa di tingkat blastosis untuk embrio betina tidak terlihat, dengan tingkat blastosis di 5 nM TSA 144 jam yang diberlakukan sama pada embrio sexing betina di kelompok kontrol (Tabel 1; $P<0.05$).

Tabel 1. Pengaruh suplementasi dalam medium kultur dengan Trichostatin A pada perkembangan embrio sapi jantan dan betina

Persentase blastosis dihitung sebagai proporsi dari jumlah embrio yang membelah. Nilai dalam baris dan kolom dengan huruf superscript berbeda berbeda secara signifikan ($P<0.05$). TSA, Trichostatin A

	Male embryos		Female embryos	
	No. cleaved embryos (%)	No. blastocysts (%)	No. cleaved embryos (%)	No. blastocysts (%)
0 (control)	155 (88.57)	66 (42.58) ^a	111 (86.71)	51 (45.95) ^a
5 nMTSA for 48 h	142 (87.11)	60 (42.25) ^{ab}	105 (81.39)	43 (40.95) ^{abc}
15nMTSA for 48 h	135 (78.48)	39 (28.89) ^c	90 (70.86)	25 (27.78) ^c
5 nMTSA for 144 h	147 (83.05)	46 (31.29) ^{bc}	113 (86.92)	38 (33.63) ^{abc}

Pengaruh Hyperacetylation Histon pada Jumlah Sel dan Apoptosis pada Embrio Sexing Jantan dan Betina

Dalam penelitian ini, tiga ulangan sesuai dengan 63 embrio sexing jantan dan 49 embrio sexing betina blastosis ($n=10-18$ per kelompok eksperimen) dianalisis. Persentase yang lebih tinggi sel apoptosis ($P<0.05$) diamati pada embrio betina dibandingkan dengan embrio jantan setelah perlakuan dengan konsentrasi yang sama TSA (Tabel 2). Meskipun demikian, perlakuan dengan 5 nMTSA selama 48 jam tidak berpengaruh terhadap persentase sel apoptosis pada embrio jantan dan betina.

Setelah inkubasi embrio dengan TSA, khususnya 15nM selama 48 jam dan 5 nM untuk 144 jam, peningkatan apoptosis diamati pada embrio betina ($P<0.05$). Perlakuan embrio sexing jantan dengan 15nM TSA selama 48 jam juga mengakibatkan peningkatan apoptosis ($P<0.05$; Tabel 2).

Inkubasi embrio dengan TSA tidak berpengaruh terhadap jumlah sel dalam blastosis jantan atau betina, terlepas dari konsentrasi yang diuji ($P>0.05$; Tabel 2). Jumlah total sel blastosis Hari 7 lebih tinggi pada kelompok kontrol jantan dibandingkan dengan kelompok embrio betina yang perlakuan dengan TSA ($P<0.05$).

Jumlah sel rata-rata total untuk semua perawatan untuk embrio sexing jantan dan sexing betina masing-masing adalah 90,53 dan 62,01. Analisis apoptosis pada embrio berkualitas tinggi (yaitu dengan jumlah sel di atas rata-rata; 29 embrio sexing jantan dan 25 embrio sexing betina; $n=5-10$ per kelompok eksperimen) menunjukkan persentase yang sama sel apoptosis pada kelompok kontrol ($P>0.05$). Apoptosis meningkat secara signifikan ($P<0.05$) setelah perlakuan embrio sexing jantan dan betina dengan 15nM TSA selama 48 jam, serta setelah perlakuan embrio betina dengan 5 nM TSA untuk 144 jam. Namun, evaluasi embrio berkualitas rendah (yaitu mereka yang dengan jumlah sel di bawah rata-rata; 25 embrio sexing jantan dan 27 embrio sexing embrio betina; $n=4-9$ per kelompok eksperimen) menunjukkan ada perbedaan yang signifikan dalam apoptosis dalam kelompok yang sama-seks setelah perlakuan TSA ($P>0.05$), meskipun ada kecenderungan untuk apoptosis menurun pada kelompok ini.

Tabel 2. Pengaruh suplementasi dalam medium kultur dengan Trichostatin A pada apoptosis pada embrio sapi jantan dan betina

Total jumlah sel diberikan sebagai mean_s.d tersebut. jumlah n=struktur. Nilai dengan huruf superscript huruf yang berbeda dalam baris dan kolom berbeda secara signifikan ($P<0.05$); nilai dalam kolom dengan huruf kecil berbeda superscript berbeda secara signifikan ($P<0.05$). TSA, Trichostatin A

	Male embryos			Female embryos		
	No. blastocysts	Apoptosis rate (%)	Total cell number	No. blastocysts	Apoptosis rate (%)	Total cell number
0 (control)	18	1.49 ^A	96.61±35.60 ^a	13	3.19 ^{BE}	67.38±29.33 ^b
5 nM TSA for 48 h	16	2.05 ^{AE}	94.18±38.54 ^a	13	3.40 ^B	61.00±23.35 ^b
15nMTSA for 48 h	15	3.62 ^{BD}	82.26±36.51 ^a	10	7.56 ^C	58.20±17.47 ^b
5 nMTSA for 144 h	14	1.96 ^A	87.42±22.78 ^a	16	5.33 ^{CD}	60.87±21.10 ^b

Percobaan kedua dilakukan untuk menentukan apakah peningkatan apoptosis diamati pada percobaan pertama yang terkena inner cell mass (ICM) atau trofektoderm (TE) pola apoptosis. Dalam percobaan, jumlah sel dan kejadian apoptosis dinilai secara terpisah untuk ICM dan TE dalam kontrol betina, 15nM 48 jam dan 5 nM 144 kelompok h, serta pengendalian jantan dan 15nM 48 kelompok h (11 jantan dan 19 betina diperluas blastosis; n=4-8 per kelompok eksperimental).

Apoptosis lebih tinggi pada ICM daripada di TE di h 15 nM 48 jantan dan kontrol betina dan 5 nM kelompok 144 jam ($P<0.05$). Pada kelompok embrio jantan dan betina 15 nM 48 jam, apoptosis pada ICM memiliki jumlah yang lebih tinggi, namun tidak ada perbedaan yang signifikan terdeteksi antara ICM dan TE ($P>0.05$).

Apoptosis dalam ICM mirip dalam kelompok yang sama-seks tanpa perlakuan TSA ($P>0.05$). Dalam TE, apoptosis ini setara dengan yang di kontrol masing-masing untuk embrio jantan diperlakukan dengan 15nM TSA selama 48 jam dan embrio betina diperlakukan dengan 5 nM TSA untuk 144 jam ($P>0.05$), tetapi meningkat pada embrio betina diperlakukan dengan 15nM TSA selama 48 jam ($P<0.05$).

Apoptosis pada embrio jantan dan betina dalam kelompok kontrol adalah sama untuk sel ICM dan TE ($P>0.05$). Membandingkan embrio jantan dan betina diperlakukan dengan 15nM TSA selama 48 jam, apoptosis lebih besar di TE embrio betina ($P<0.05$), namun tingkat serupa apoptosis terdeteksi dalam ICM ($P>0.05$).

Diskusi

Temuan utama dari penelitian ini adalah bahwa TSA menginduksi hyperacetylation dari H3K9 selama IVC embrio praimplantasi sapi, dan bahwa hal itu meningkatkan apoptosis dan menurunkan tingkat blastosis bila digunakan pada konsentrasi 15 nM.

Penelitian telah menunjukkan bahwa, pada embrio sapi, tingkat asetilasi rendah pada tahap empat sel, tetapi meningkatkan pada tahap eightcell ketika transisi ibu-zigotik terjadi (Yang *et al.*, 2007; Maalouf *et al.*, 2008). Setelah aktivasi genom embrio (EGA), kromatin menjadi transcriptionally aktif (Henery *et al.*, 1995). Dalam konteks ini, penelitian pada tikus menunjukkan pentingnya HDAC1 untuk pembentukan organisasi kromatin (Ma dan Schultz 2008). Siklus pertama replikasi DNA setelah EGA murine sangat penting untuk ekspresi gen endogen maksimum. Dalam hal ini, perlakuan dengan inhibitor HDAC secara signifikan meningkatkan tingkat ekspresi gen (Aoki *et al.*, 1997). Jadi, saat suplementasi TSA dipilih dalam penelitian ini adalah 70 jam setelah IVF, ketika sebagian besar embrio pada tahap delapan sel. Perlakuan untuk 48 jam mengevaluasi efek pada siklus sel keempat dan kelima, sedangkan perlakuan untuk 144 h efek dievaluasi pada siklus sisa perkembangan praimplantasi.

TSA telah berhasil digunakan dalam produksi klon pada sapi untuk meningkatkan efisiensi rekombinasi epigenetik sel dewasa. Dalam kasus ini, TSA dilengkapi pada konsentrasi mulai dari 50nm ke 1 mM pada sel donor inti (Enright *et al.*, 2003b; Wee *et al.*, 2007; Ding *et al.*, 2008) dan embrio segera setelah langkah fusi embrio (Ding *et al.*, 2008; Iager *et al.*, 2008). Dalam penelitian ini, 25 dan 50nm TSA tidak mengizinkan perkembangan embrio yang memadai bila diterapkan untuk waktu yang lebih lama dari 24 jam (data tidak ditampilkan). Sebuah konsentrasi 15nM juga membahayakan perkembangan embrio jantan dan betina. Sebaliknya, perlakuan dengan 5 nM TSA selama 48 jam tidak mempengaruhi perkembangan embrio jantan atau betina, dan perlakuan untuk 144 jam tidak berpengaruh terhadap perkembangan embrio betina. Penelitian pada sel batang embrio telah menunjukkan bahwa sel-sel berdiferensiasi lebih sensitif terhadap efek TSA dibandingkan sel dibedakan (Dai dan Rasmussen 2007). Dalam hal ini, kami mengamati bahwa konsentrasi yang lebih rendah dari TSA harus digunakan untuk perlakuan blastomer untuk memperoleh tingkat tinggi asetilasi tanpa mengorbankan perkembangan embrio.

Kualitas embrio yang dihasilkan secara *in vitro* dapat disimpulkan secara tidak langsung berdasarkan tarif apoptosis dalam embrio dan jumlah sel. Dalam penelitian ini, tingkat apoptosis yang lebih tinggi dan penurunan jumlah sel diamati pada Hari 7 embrio betina. Penelitian telah menunjukkan bahwa perkembangan embrio betina lebih lambat (Avery *et al.*, 1992.), bahwa mereka lebih peka terhadap kondisi stres dari IVC (Edwards *et al.*, 2001) dan bahwa mereka memiliki jumlah sel total yang lebih kecil (Xu *et al.*, 1992). Namun, analisis embrio mengandung jumlah sel total atas rata-rata dalam penelitian ini menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan dalam apoptosis antara embrio kontrol betina dan jantan. Dengan demikian, tingkat apoptosis tinggi diamati pada embrio betina mungkin mencerminkan proporsi yang lebih rendah embrio berkualitas tinggi dibandingkan dengan embrio jantan.

Perlakuan dengan TSA menghasilkan peningkatan serupa di apoptosis pada embrio jantan dan betina, yang sekitar 2,4 kali lipat lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol masing masing untuk embrio jantan atau betina saat 15nM TSA digunakan. Pola yang sama terlihat untuk embrio berkualitas tinggi. Namun, perlakuan TSA tidak signifikan mengubah persentase sel apoptosis pada embrio lowquality dan, memang, ada kecenderungan untuk apoptosis menurun pada betina berkualitas rendah dan embrio jantan setelah perlakuan TSA. Peningkatan apoptosis sel-diperlakukan TSA telah dilaporkan oleh Koyama *et al.*, (2000). Dalam penelitian tersebut, efek apoptosis TSA diusulkan menjadi karena hyperasetilasi dari histon karena bentuk santai DNA mudah dikatalisis oleh endonuklease. Apoptosis adalah peristiwa fisiologis perkembangan embrio dan dapat mencegah sel yang rusak dari kontribusi terhadap pembentukan individu, sehingga berfungsi sebagai mekanisme bertahan hidup dalam kondisi stres (Paula-Lopes dan Hansen, 2002). Namun, tingkat apoptosis yang tinggi berhubungan dengan penurunan viabilitas (Jousan *et al.*, 2008.) dan embrio kematian (Antunes *et al.*, 2010).

Menurut Fouladi-Nashta *et al.*, (2005), tingkat apoptosis diantara sel-sel dari ICMare biasanya lebih tinggi daripada sel TE tersebut. Hal ini dikonfirmasi dalam studi ini, di mana apoptosis lebih tinggi antara ICMcells pada semua kelompok eksperimental, dengan pengecualian embrio betina berkultur di hadapan 15 nM TSA selama 48 jam dan embrio kontrol jantan. Dalam kelompok ini apoptosis angka antara sel-sel PTT cenderung lebih tinggi dibandingkan sel TE. Apoptosis TE setara pada kontrol jantan dan embrio TSA yang perlakuan, tapi betina 15 nM embrio TSA-diperlakukan disajikan tingkat apoptosis yang lebih tinggi TE daripada kelompok kontrol. Ada kemungkinan bahwa peningkatan yang diamati dalam embrio betina terkena 15 nM TSA selama 48 jam dapat mengakibatkan kegagalan berikutnya implantasi.

Meskipun perlakuan dengan 5 nM TSA untuk 144 jam meningkatkan apoptosis embrio betina, TSA tidak mempengaruhi perkembangan embrio dalam kelompok eksperimen. Pada embrio jantan diperlakukan dengan 5 nM TSA untuk 144 jam, tidak ada perubahan dalam apoptosis namun perkembangan blastosis dikompromikan. Secara keseluruhan, hasil menunjukkan bahwa embrio betina lebih sensitif terhadap efek TSA pada hyperasetilasi H3K9 menyebabkan kenaikan tarif apoptosis dari embrio jantan. Namun, ambang batas untuk efek TSA mengakibatkan kematian embrio tampaknya lebih rendah pada jantan daripada embrio betina.

Adalah mungkin bahwa, pada embrio TSA yang perlakuan yang dipamerkan tidak ada efek merugikan pada perkembangan, ada ekspresi gen secara keseluruhan lebih tinggi yang bermanfaat bagi perkembangan pasca-implantasi, terutama dalam hal embrio berkualitas rendah dan betina.

Kesimpulannya, perlakuan TSA meningkatkan H3K9ac, tetapi tidak memiliki efek menguntungkan pada perkembangan praimplantasi embrio sapi jantan atau betina dalam hal parameter dievaluasi dalam studi ini. Satu studi pada tikus melaporkan bahwa embrio telah somit lebih ketika TSA diberikan kepada betina hamil setelah implantasi embrio (Nervi *et al.*, 2001). Oleh karena itu, studi lebih lanjut diperlukan untuk menyelidiki pola-pola ekspresi gen dan kegiatan perkembangan pasca-implantasi pada embrio perlakuan dengan TSA.

Ucapan Terima Kasih

Penulis berterima kasih kepada Roberta Vantini untuk bantuan teknis di laboratorium IVF. Penelitian ini didukung oleh Lembaga Penelitian Dukungan Negara Sao Paulo (FAPESP).

Daftar Pustaka

1. Antunes,G.,Chaveiro,A., Santos,P.,Marques,A., Jin,H. S., anddaSilva,F.M. (2010). Influence of apoptosis in bovine embryo's development. *Reprod. Domest. Anim.* **45**, 26–32. doi:10.1111/J.1439-0531.2008.01131.X
2. Aoki, F., Worrall, D. M., and Schultz, R. M. (1997). Regulation of transcriptional activity during the first and second cell cycles in the preimplantation mouse embryo. *Dev. Biol.* **181**, 296–307. doi:10.1006/DBIO.1996.8466

3. Avery, B., Jorgensen, C. B., Madison, V., and Greve, T. (1992). Morphological development and sex of bovine *in vitro*-fertilized embryos. *Mol. Reprod. Dev.* **32**, 265–270. doi:10.1002/MRD.1080320312
4. Badr, H., Bongioni, G., Abdoon, A. S. S., Kandil, O., and Puglisi, R. (2007). Gene expression in the *in vitro*-produced preimplantation bovine embryos. *Zygote* **15**, 355–367. doi:10.1017/S0967199407004315
5. Bertolini, M., Beam, S. W., Shim, H., Bertolini, L. R., Moyer, A. L., Famula, T. R., and Anderson, G. B. (2002). Growth, development, and gene expression by *in vivo*- and *in vitro*-produced Day 7 and 16 bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.* **63**, 318–328. doi:10.1002/MRD. 90015
6. Betts, D. H., and King, W. A. (2001). Genetic regulation of embryo death and senescence. *Theriogenology* **55**, 171–191. doi:10.1016/S0093-691X(00) 00453-2
7. Brackett, B. G., Bousquet, D., Boice, M. L., Donawick, W. J., Evans, J. F., and Dressel, M. A. (1982). Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol. Reprod.* **27**, 147–158. doi:10.1095/BIOL REPROD27.1.147
8. Dai, B., and Rasmussen, T. P. (2007). Global epiproteomic signatures distinguish embryonic stem cells from differentiated cells. *Stem Cells* **25**, 2567–2574. doi:10.1634/STEMCELLS.2007-0131
9. Dean, W., Santos, F., Stojkovic, M., Zakhartchenko, V., Walter, J., Wolf, E., and Reik, W. (2001). Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **98**, 13 734–13 738. doi:10.1073/PNAS.241522698
10. Ding, X., Wang, Y., Zhang, D., Wang, Y., Guo, Z., and Zhang, Y. (2008). Increased pre-implantation development of cloned bovine embryos treated with 5-aza-20-deoxycytidine and trichostatin A. *Theriogenology* **70**, 622–630. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2008.04.042
11. Edwards, J. L., King, W. A., Kawarsky, S. J., and Ealy, A. D. (2001). Responsiveness of early embryos to environmental insults: potential protective roles of HSP70 and glutathione. *Theriogenology* **55**, 209–223. doi:10.1016/S0093-691X(00)00455-6
12. Enright, B. P., Jeong, X. Y., Yang, X., and Tian, X. C. (2003a). Epigenetic characteristics of bovine donor cells for nuclear transfer: levels of histone acetylation. *Biol. Reprod.* **69**, 1525–1530. doi:10.1095/BIOLREPROD. 103.019950
13. Enright, B. P., Kubota, C., Yang, X., and Tian, X. C. (2003b). Epigenetic characteristics and development of embryos cloned from donor cells treated by trichostatin A or 5-aza-20-deoxycytidine. *Biol. Reprod.* **69**, 896–901. doi:10.1095/BIOLREPROD.103.017954
14. Fouladi-Nashta, A. A., Alberio, R., Kafi, M., Nicholas, B., Campbell, K. H., and Webb, R. (2005). Differential staining combined with TUNEL labelling to detect apoptosis in preimplantation bovine embryos. *Reprod. Biomed. Online* **10**, 497–502.
15. Hamano, K. (2007). Sex preselection in bovine by separation of X- and Y-chromosome bearing spermatozoa. *J. Reprod. Dev.* **53**, 27–38. doi:10.1262/JRD.18141
16. Henery, C. C., Miranda, M., Wiekowski, M., Wilmut, I., and DePamphilis, M. L. (1995). Repression of gene expression at the beginning of mouse development. *Dev. Biol.* **169**, 448–460. doi:10.1006/DBIO. 1995.1160
17. Iager, A. E., Ragina, N. P., Ross, P. J., Beyhan, Z., Cunniff, K., Rodriguez, R. M., and Cibelli, J. B. (2008). Trichostatin A improves histone acetylation in bovine somatic cell nuclear transfer early embryos. *Cloning Stem Cells* **10**, 371–380. doi:10.1089/CLO.2007.0002
18. Johnstone, R. W. (2002). Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **1**, 287–299. doi:10.1038/ NRD772
19. Jousan, F. D., De Castro e Paula, L. A., Brad, A. M., Roth, Z., and Hansen, P. J. (2008). Relationship between Group II caspase activity of bovine preimplantation embryos and capacity for hatching. *J. Reprod. Dev.* **54**, 217–220. doi:10.1262/JRD.19175
20. Koyama, Y., Adachi, M., Sekiya, M., Takekawa, M., and Imai, K. (2000). Histone deacetylase inhibitors suppress IL-2-mediated gene expression prior to induction of apoptosis. *Blood* **96**, 1490–1495.
21. Lonergan, P. (1994). Growth of preimplantation bovine embryos. *Acta Vet. Scand.* **35**, 307–320.
22. Lonergan, P., Rizos, D., Gutierrez-Adan, A., Fair, T., and Boland, M. P. (2003). Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reprod. Domest. Anim.* **38**, 259–267. doi:10.1046/J.1439-0531.2003.00437.X
23. Ma, P., and Schultz, R. M. (2008). Histone deacetylase 1 (HDAC1) regulates histone acetylation, development, and gene expression in preimplantation mouse embryos. *Dev. Biol.* **319**, 110–120. doi:10.1016/J.YDBIO. 2008.04.011
24. Maalouf, W. E., Alberio, R., and Campbell, K. H. S. (2008). Differential acetylation of histone H4 lysine during development of *in vitro* fertilized, cloned and parthenogenetically activated bovine embryos. *Epigenetics* **3**, 199–209.
25. Memili, E., and First, N. L. (2000). Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. *Zygote* **8**, 87–96. doi:10.1017/S0967199400000861
26. Nervi, C., Borello, U., Fazi, F., Buffa, V., Pelicci, P. G., and Cossu, G. (2001). Inhibition of histone deacetylase activity by trichostatin A modulates gene expression during mouse embryogenesis without apparent toxicity. *Cancer Res.* **61**, 1247–1249.
27. Patterton, D., and Wolffe, A. P. (1996). Developmental roles for chromatin and chromosomal structure. *Dev. Biol.* **173**, 2–13. doi:10.1006/DBIO. 1996.0002

28. Paula-Lopes, F. F., and Hansen, P. J. (2002). Apoptosis is an adaptive response in bovine preimplantation embryos that facilitates survival after heat shock. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **295**, 37–42. doi:10.1016/S0006-291X(02)00619-8
 29. Rizos, D., Lonergan, P., Boland, M. P., Arroyo-García, R., Pintado, B., de la Fuente, J., and Gutiérrez-Adán, A. (2002). Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. *Biol. Reprod.* **66**, 589–595. doi:10.1095/BIOLREPROD66.3.589
 30. Schübeler, D., MacAlpine, D. M., Scalzo, D., Wirbelauer, C., Kooperberg, C., *et al.* (2004). The histone modification pattern of genes revealed through genome-wide chromatin analysis of a higher eukaryote. *Genes Dev.* **18**, 1263–1271. doi:10.1101/GAD.1198204
 31. Schultz, R. M. (2002). The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo. *Hum. Reprod. Update* **8**, 323–331. doi:10.1093/HUMUPD/8.4.323
 32. Seidel, G. E., Jr, Schenk, J. L., Herickhoff, L. A., Doyle, S. P., Brink, Z., Green, R. D., and Cran, D. G. (1999). Insemination of heifers with sexed sperm. *Theriogenology* **52**, 1407–1420. doi:10.1016/S0093-691X(99) 00226-5
 33. Wee, G., Shim, J. J., Koo, D. B., Chae, J. I., and Lee, K. K. (2007). Epigenetic alteration of the donor cells does not recapitulate the reprogramming of DNA methylation in cloned embryos. *Reproduction* **134**, 781–787. doi:10.1530/REP-07-0338
 34. Wrenzycki, C., Herrmann, D., Carnwath, J. W., and Niemann, H. (1996). Expression of the gap junction gene connexin43 (Cx43) in preimplantation bovine embryos derived *in vitro* or *in vivo*. *J. Reprod. Fertil.* **108**, 17–24. doi:10.1530/JRF.0.1080017
 35. Wrenzycki, C., Lucas-Hahn, A., Herrmann, D., Lemme, E., Korsawe, K., and Niemann, H. (2002). *In vitro* production and nuclear transfer affect dosage compensation of the X-linked gene transcripts G6PD, PGK, and Xist in preimplantation bovine embryos. *Biol. Reprod.* **66**, 127–134. doi:10.1095/BIOLREPROD66.1.127
 36. Wrenzycki, C., Herrmann, D., Lucas-Hahn, A., Lemme, E., Korsawe, K., and Niemann, H. (2004). Gene expression patterns in *in vitro*-produced and somatic nuclear transfer-derived preimplantation bovine embryos: relationship to the large offspring syndrome? *Anim. Reprod. Sci.* **82**–**83**, 593–603. doi:10.1016/J.ANIREPROSCI.2004.05.009
 37. Xu, K. P., Yadav, B. R., King, W. A., and Betteridge, K. J. (1992). Sex-related differences in developmental rates of bovine embryos produced and cultured *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* **31**, 249–252. doi:10.1002/MRD.1080310404
 38. Yang, X., Smith, S. L., Tian, X. C., Lewin, H. A., Renard, J. P., and Wakayama, T. (2007). Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. *Nat. Genet.* **39**, 295–302. doi:10.1038/NG1973
- Zupkovitz, G., Tischler, J., Posch, M., Sadzak, I., Ramsauer, K., *et al.* (2006). Negative and positive regulation of gene expression by mouse histone deacetylase 1. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 7913–7928. doi:10.1128/MCB.01220-06