

Identification of Protozoa in The Blood and Digestive Tract on Water Monitor Lizard (*Varanus salvator*)

Identifikasi Protozoa pada Darah dan Saluran Pencernaan Biawak Air (*Varanus salvator*)

¹⁾Azizah Bilqis Nurkarimah,²⁾Mufasirin,³⁾Ratna Damayanti,²⁾Lucia Tri Suwanti, ⁴⁾Boedi Setiawan, ²⁾Endang Suprihati

¹⁾Student, Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga,

²⁾Department of Veterinary Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga,

³⁾Department of Basic Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga,

⁴⁾Department of Veterinary Clinic, Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga.

Received: 27-06-2020, Accepted: 27-06-2020, Published Online: 29-06-2020

Co-Author email : mufasirin@fkh.unair.ac.id

Abstract

The aim of this research is to identify the various of protozoa in the blood and digestive tract on water monitor lizard (*Varanus salvator*) was captured in Sidoarjo, East Java. This research was taken on March until June 2019. This research used a non-experimental method through an observation study. As many as 50 water monitor lizard were used this research and examined at the Laboratory of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga. The samples of this research were made in thin blood smear using Giemsa stain, while fecal examination using native method, sucrose flotation, and modified Ziehl-Neelsen stain. The results showed that two various of protozoa found were single infection. Observations on the blood was obtained *Haemogregarina* sp. (14%) and observations of feces obtained *Eimeria* sp. (2%). The conclusion of this research indicate that type of protozoa was *Haemogregarina* sp. and *Eimeria* sp. were found on water monitor lizard (*Varanus salvator*).

Keywords: *Eimeria* sp., *Haemogregarina* sp., *Varanus salvator*, water monitor lizard.

Pendahuluan

Biawak air (*Varanus salvator*) merupakan salah satu satwa endemik Indonesia yang diminati sebagai hewan peliharaan eksotik di dunia. Biawak dapat ditemukan hampir di seluruh kepulauan Indonesia. Keberadaan biawak yang mudah ditemukan di alam bebas memberikan kesempatan potensi eksploitasi oleh manusia. Pemelihara hewan kesayangan khususnya dari golongan reptil sebagian besar kurang memahami tata cara pemeliharaan yang benar (Dalton dkk., 1995). Sebagian masyarakat mengkonsumsi daging biawak. Biawak yang ditangkap di alam bebas tidak menjamin bebas dari penyakit. Keadaan tersebut dapat menimbulkan risiko penyebaran penyakit, termasuk penyakit parasit pada reptil maupun pemelihara. Beberapa faktor yang dapat mendukung penyebaran dan berkembangnya penyakit antara lain makanan yang tidak sehat, lingkungan yang tercemar, dan perilaku hidup manusia (Natadisastra dan Agoes, 2009). Salah satu parasit yang dapat menginfeksi biawak

adalah protozoa. Protozoa tersebut dapat menginfeksi darah maupun saluran pencernaan.

Berdasarkan laporan dari Hanafiah dkk. (2018), diduga terdapat banyak parasit yang dapat menginfeksi biawak air. Mader (1996) menemukan beberapa parasit khususnya protozoa pada darah dan saluran pencernaan reptil. Jenis protozoa yang dapat menginfeksi biawak antara lain, *Cryptosporidium* sp. (Prabayuda, 2017), *Entamoeba invadens* (Chia dkk., 2009), *Giardia* sp. (Upton and Zien, 1997), *Eimeria ramadanensis* (Abdel-Aziz dkk., 2019), dan *Haemogregarina* sp. (Cook dkk., 2016). Beberapa protozoa yang ditemukan pada biawak bersifat zoonosis, sehingga dapat menyebabkan penyakit pada manusia seperti cryptosporidiosis dan giardiasis.

Manusia memanfaatkan biawak untuk memenuhi kebutuhan hidup, seperti menggunakan kulit sebagai perhiasan, daging untuk konsumsi dan obat, serta untuk peliharaan (Shine dkk., 1996). Interaksi antara manusia

dengan biawak yang ditangkap liar memiliki potensi terjadi penularan parasite (zoonosis). Penularan parasite yang bersifat zoonosis berkaitan erat dengan kebersihan dan sanitasi. Parasitit yang bersifat zoonosis jika menginfeksi manusia pada umumnya tidak menimbulkan gejala klinis yang jelas, sehingga seringkali diabaikan. Infeksi parasit yang ringan pada hewan umumnya tidak menimbulkan gejala klinis, tetapi dapat mengakibatkan kematian apabila terjadi infeksi berat (Sopha, 2018). Penelitian tentang biawak air dan identifikasi agen penyebab penyakitnya masih jarang dilaporkan (Wilson, 2010).

Pada penelitian ini akan dilakukan identifikasi protozoa pada darah dan saluran pencernaan biawak air yang didapat di pemotongan Sidoarjo dengan pemeriksaan mikroskopik. Biawak air dapat digunakan sebagai model untuk mempelajari berbagai macam protozoa yang menyerang jenis bangsa varanidae yang lain. Hasil penelitian ini juga dapat digunakan sebagai referensi potensi penyebaran penyakit parasitik pada biawak yang bersifat zoonosis.

Metode

Bahan dan Materi Penelitian

Bahan penelitian pemeriksaan darah menggunakan sampel darah biawak, metanol absolut, pewarna Giemsa 20%, akuades dan minyak emersi. Pemeriksaan feses dibutuhkan bahan berupa sampel feses biawak, larutan kalium bikromat, larutan sukrosa 40%, akuades, carbol fuchsin 0,3%, asam alkohol 3%, malachite green 0,3 %.

Pemeriksaan darah dibutuhkan alat berupa kaca obyek, kaca penutup, kotak penyimpanan, *staining jar*, tabung EDTA, dan mikroskop. Alat penelitian pada pemeriksaan feses menggunakan pot sampel, kertas label, lidi atau pengaduk, saringan teh, pipet, kaca obyek, kaca penutup, mikroskop, tabung sentrifus, alat sentrifus, dan rak tabung.

Sampel penelitian

Sampel penelitian adalah 50 ekor biawak masing-masing berupa sampel darah dan feses yang di dapat dari tempat pemotongan biawak di Sidoarjo.

Pemeriksaan darah metode ulas darah dengan pewarnaan Giemsa

Sampel darah diambil dari darah yang mengalir setelah biawak dipotong dan ditampung menggunakan tabung EDTA 3 ml.

Sampel darah yang sudah diambil diteteskan ke satu kaca obyek dengan posisi mendatar. Kaca obyek dipegang dengan ibu jari dan telunjuk tangan kiri. Kemudian kaca obyek lain yang ujungnya rata dipegang dengan tangan kanan, kaca obyek pada tangan kanan disentuhkan pada tetesan darah sehingga darah pada kaca obyek yang berada di tangan kiri menyebar pada ujung kaca obyek tangan kanan. Kaca obyek pada tangan kanan dimiringkan dengan kemiringan 30-45° terhadap kaca obyek pada tangan kiri, dan kaca obyek pada tangan kanan didorong sehingga darah terhapus membentuk hapusan tipis. Hapusan darah dikeringkan dengan cara diangin-anginkan pada suhu kamar. Kemudian hapusan darah diberi label. Cara membuat pewarnaan ulas darah dengan pewarnaan Giemsa diawali dengan memfiksasi hapusan darah ke dalam larutan methanol absolut selama 3 menit. Kemudian hapusan darah dimasukkan ke dalam larutan Giemsa 10 - 20 % selama 30 menit. Preparat diangkat dan dicuci dengan air mengalir sampai air cucian bening. Ulas darah dikeringkan dengan meletakkan kaca obyek posisi berdiri pada bidang miring atau diangin-anginkan (Suwanti dkk., 2011).

Metode Natif

Akuades diteteskan di atas kaca obyek sebanyak dua tetes. Sampel feses diambil menggunakan tusuk gigi dan oleskan di atas kaca obyek yang telah ditetesi akuades. Sampel dan akuades dihomogenkan menggunakan tusuk gigi. Setelah feses dan akuades homogen, campuran homogen tersebut ditutup dengan kaca penutup. Preparat diperiksa di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x (Taylor dkk., 2007).

Metode Apung Sukrosa (*Sucrose Flotation Method*)

Feses biawak sebanyak 3 gram, ditambahkan air sehingga volume 15 ml. Larutan diaduk sehingga homogen dan didiamkan selama 15 menit. Larutan disaring dan disentrifugasi dengan kecepatan 1800 rpm selama 10 menit. Endapan dibiarkan dan supernatan dibuang. Sesuai dengan metode (Dubey, 1972), hasil endapan di tambahkan dengan larutan sukrosa 40% hingga 30 ml. Setelah dicampur, larutan kembali disentrifugasi selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk diambil sebanyak 1 cc pada setiap tabung kemudian diperiksa di bawah mikroskop perbesaran 400x.

Metode Pewarnaan Modifikasi Tahan Asam (Modified Ziehl Neelsen)

Sediaan sampel diletakkan dengan bagian apusan feses menghadap ke atas pada rak pengecatan dengan jarak 1 jari antara satu sediaan dengan sediaan lain. Sediaan difiksasi dengan metanol absolut. Carbol fuchsin 0,3% dituang melalui kertas saring sampai menutupi seluruh permukaan sediaan dan dibiarkan hingga kering. Sesudah kering sediaan dibilas dengan air suling secara hati-hati. Selanjutnya sediaan dituangi dengan asam alkohol 3% sampai semua warna merah fuchsin luntur. Kemudian sediaan dibilas kembali dengan air mengalir. Sediaan yang sudah terbilas dituang malachite green 0,3% selama 10-20 detik. Sediaan dibilas dengan air mengalir secara hati-hati dan dikeringkan pada rak pengering. Pemeriksaan sediaan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x dan 1000x (Beauty dkk., 2014).

Analisis Data

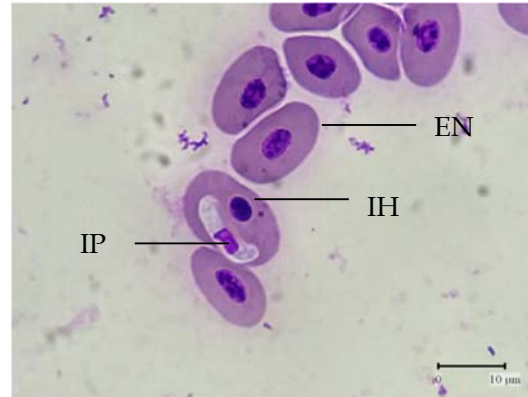
Data yang diperoleh dari hasil identifikasi protozoa pada darah dan saluran pencernaan biawak air disajikan secara deskriptif.

Hasil

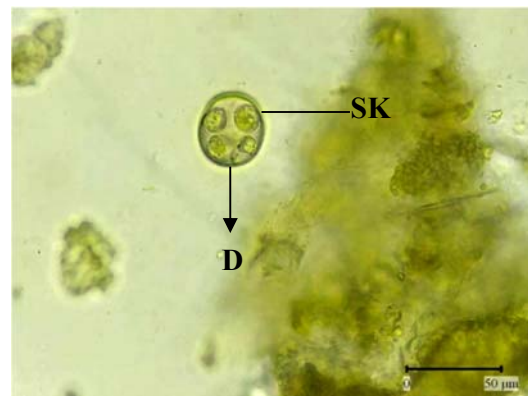
Pemeriksaan protozoa pada 50 ekor biawak air yang didapat dari tempat pemotongan biawak di Sidoarjo selama bulan Maret-Juni 2019 ditemukan dua macam jenis protozoa antara lain satu genus protozoa darah yaitu *Haemogregarina* sp., dan satu genus protozoa dari saluran pencernaan yaitu *Eimeria* sp.

Pada pemeriksaan ulas darah pada biawak terlihat *Haemogregarina* sp. berbentuk lonjong seperti sosis, berwarna pucat dengan inti lebih gelap, terletak di dalam sitoplasma eritrosit dan mendesak inti eritrosit hingga ke tepi. *Haemogregarina* sp. ditemukan pada tujuh ekor dari 50 ekor biawak yang diamati (14%). Gambaran *Haemogregarina* sp. dapat dilihat pada Gambar 1.

Pemeriksaan feses biawak melalui metode natif didapatkan ookista *Eimeria* sp. yang telah bersporulasi dengan empat sporokista masing-masing berisi dua sporozoit, berbentuk ovoid, dan memiliki dinding yang berbatas jelas. Ukuran ookista *Eimeria* sp. yang ditemukan bervariasi. *Eimeria* sp. ditemukan pada satu ekor dari 50 ekor biawak yang diamati (2%). Gambaran *Eimeria* sp. dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 1. *Haemogregarina* sp. pada pemeriksaan mikroskopis perbesaran 1000x. EN: Eritrosit normal, IH: Inti hospes, IP: Inti Protozoa.



Gambar 2. *Eimeria* sp. pada pemeriksaan mikroskopis perbesaran 400x. SK: Sporokista, D: Dinding Ookista.

Pembahasan

Berdasarkan hasil penelitian pada 50 ekor biawak yang diambil dari tempat pemotongan biawak di Sidoarjo, didapatkan tujuh ekor biawak positif (14%) *Haemogregarina* sp. dan satu ekor biawak positif *Eimeria* sp. (2%), sehingga jumlah biawak yang terinfeksi protozoa bersifat tunggal sebanyak 8 ekor (16%). Jumlah tersebut lebih tinggi daripada penelitian yang dilakukan sebelumnya oleh Hanafiah dkk. (2018) di Banda Aceh yang melaporkan tidak ditemukan adanya protozoa pada biawak. Perbedaan tersebut kemungkinan disebabkan karena perbedaan kondisi wilayah, dimana biawak hidup, umur, serta waktu penelitian yang berbeda pada biawak yang diteliti. Menurut Wilson and Carpenter (1996), kerentanan hewan terhadap parasit dapat disebabkan antara lain, kapasitas penangkaran, suhu lingkungan, kebersihan, musim, jumlah parasit, ketersediaan hospes, serta gizi dan umur hospes.

Haemogregarina sp. terlihat pada pemeriksaan ulas darah dengan pewarnaan Giemsa. Gamont *Haemogregarina* sp. tampak berbentuk lonjong seperti sosis yang terletak di dalam eritrosit, parasit berwarna pucat dengan inti gelap keunguan, mendesak inti eritrosit hingga ke tepi. Karakteristik tersebut sesuai dengan penelitian yang dilakukan Tomédkk. (2018), *Haemogregarina* sp. merupakan parasit intraeritrositik yang berbentuk memanjang dengan inti parasit berwarna gelap, dan parasit mendesak inti eritrosit. Hasil pengukuran *Haemogregarina* sp. pada penelitian ini adalah $11,38 \times 2,45 \mu\text{m}$. Pengukuran tersebut sesuai dengan rata-rata ukuran gamont pada penelitian Rabie and Hussein (2014), yaitu $(10-12,1) \times (2,2-4,4) \mu\text{m}$.

American Association of Zoo Veterinarians (AAZV) menyebutkan bahwa *Haemogregarina* sp. ditularkan melalui gigitan vektor, sehingga kontak langsung antar hewan bukan merupakan faktor risiko infeksi (AAZV, 2013). Tungau dari genus *Ophionyssus* berperan sebagai vektor dalam siklus hidup *Haemogregarina* sp. (Bannert dkk., 1995). Habitat biawak pada lingkungan yang kotor memungkinkan biawak mudah terinfeksi ektoparasit. Musim pada saat pengambilan sampel juga berpengaruh pada penyebaran parasit. Pengambilan sampel dilakukan pada bulan Maret-Juni saat musim hujan, sehingga kelembaban di daerah pemotongan biawak Sidoarjo menjadi tinggi. Kelembaban yang tinggi merupakan faktor yang cocok untuk perkembangan parasit (Subronto, 2006).

Infeksi *Haemogregarina* sp. pada reptil tidak dapat menular terhadap manusia. Reptil yang terinfeksi *Haemogregarina* sp. umumnya tidak menimbulkan gejala klinis, namun reptil dengan tingkat parasitemia yang tinggi dapat mengalami anemia, lemas dan anoreksia (AAZV, 2013).

Selain *Haemogregarina* sp., spesies protozoa yang ditemukan adalah *Eimeria* sp. Di dalam penelitian Abdel-Aziz dkk. (2019), ookista *Eimeria* sp. dapat diidentifikasi dengan ciri terdapat empat sporokista, dan masing-masing sporokista mengandung dengan dua sporozoit, berbentuk ovoid, memiliki mikropil, ukuran ookista bervariasi $(23,7-30,5) \times (16,7-24,6) \mu\text{m}$. Sporulasi terjadi dalam waktu 72 jam pada suhu kamar. Karakteristik tersebut sesuai dengan *Eimeria* sp. yang ditemukan melalui pemeriksaan natif pada penelitian ini, yaitu tampak ookista yang sudah bersporulasi berisi empat sporokista, ukuran $31,96-32,25 \mu\text{m}$, tanpa

mikropil, dan memiliki bentuk ovoid. Perbedaan ukuran dan keberadaan mikropil kemungkinan disebabkan karena perbedaan jenis *Eimeria* pada biawak (Abdel-Aziz, 2019).

Penyebaran *Eimeria* sp. bergantung dengan suhu, kelembaban, manajemen perawatan dan kebersihan lingkungan. Penelitian ini dilakukan ketika musim hujan dimana suhu lingkungan rendah dan kelembaban tinggi, sehingga kemungkinan timbul adanya infeksi *Eimeria* sp. pada biawak. Manajemen perawatan dan kebersihan lingkungan biawak tidak terkontrol karena biawak yang digunakan pada penelitian ini berasal dari tangkapan liar. Prevalensi *Eimeria* sp. yang rendah berkaitan pada faktor-faktor seperti, suhu, kelembaban, dan manajemen lingkungan, sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap infeksi *Eimeria* sp. pada biawak.

Eimeria sp. merupakan penyebab coccidiosis pada reptil dan tidak bersifat zoonosis terhadap manusia. Coccidiosis yang disebabkan infeksi *Eimeria* sp. pada reptil biasanya tidak patogen, namun faktor predisposisi seperti stres, pakan, gangguan pencernaan, dan infeksi sekunder membuat protozoa tersebut patogen. Reptil yang menderita coccidiosis berat biasanya ditandai dengan anoreksia, penurunan berat badan, dan diare yang disertai darah (Raś-Noryńska and Sokół, 2015).

Pada penelitian ini tidak ditemukan protozoa yang bersifat zoonosis seperti, *Cryptosporidium* sp. dan *Giardia* sp. Pemeriksaan *Cryptosporidium* sp. pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode apung sukrosa dan modifikasi pewarnaan tahan asam (*Modified Ziehl-Neelsen*) pada feses biawak. *Cryptosporidium* sp. yang memiliki ukuran kecil kemungkinan menjadi penyebab terlewatkannya identifikasi saat diperiksa menggunakan mikroskop, sehingga diperlukan metode lanjutan yang lebih mendalam seperti PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (Robinson dkk., 2008).

Hasil identifikasi *Giardia* sp. yang dilakukan melalui metode natif pada feses biawak adalah negatif. Pemeriksaan melalui metode yang lain diperlukan untuk menemukan *Giardia* sp. pada biawak, salah satunya dengan melakukan swab mukosa saluran pencernaan bagian bawah kemudian diperiksa menggunakan mikroskop (Raś-Noryńska and Sokół, 2015). Uji IFA (*Immunofluorescence Assay*) dapat digunakan untuk mengidentifikasi kista *Giardia*

sp., karena uji tersebut memiliki spesifisitas dan sensitivitas yang tinggi dalam mendeteksi *Giardia* sp. (El-Nahas dkk., 2012).

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, maka dapat diambil kesimpulan bahwa jenis protozoa yang ditemukan pada biawak air adalah *Haemogregarina* sp. dan *Eimeria* sp.

Daftar Pustaka

- [AAZV] American Association of Zoo Veterinarians. 2013. Haemogregarines of Reptiles. www.aazv.org/resource/resmgr/IDM/IDM_Hemogregarines_of_Reptil.pdf. [8 Juli 2019]
- Abdel-Aziz A, Abou-Senna FM, Abdel-Gawad MA and El-Nour MFA. 2019. A new species of *Eimeria* (Apicomplexa: Eimeriidae) from the desert monitor, *Varanus griseus griseus* (Lacertilia: Varanidae). www.researchgate.net/publication/334224688. [8 Agustus 2019].
- Bannert B, Lux E and Sedlacek J. 1995. Studies on endoand ectoparasites of Canarian Lizards. *Sci.Herp.*1995: 293-296.
- Beauty, E.O., U.N. Uchechukwu, S.U. Chukwunke and O.O. Francis. 2014. Comparative diagnostic techniques for *Cryptosporidium* infection. *J. Molecules.* 19: 2674-2683.
- Chia MY, Jeng CR, Hsiao SH, Lee AH, Chen CY and Pang VF. 2009. Entamoeba invadens myositis in a common water monitor lizard (*Varanus salvator*). *Vet. Pathol.*46: 673-676.
- Cook CA, Netherlands EC and Smit NJ. 2016. Redescription, molecular characterisation and taxonomic re-evaluation of a unique African monitor lizard haemogregarine *Karyolysus paradoxa* (Dias, 1954) n. comb. (Karyolysidae). *ParasiteVect.* 9(1): 347.
- Dalton C, Hoffman R and Pope J. 1995. Iguana-associated salmonellosis in children. *J. Parasitol.* 14:319-329.
- Dubey JP. 1972. A simplified method for isolation of *Toxoplasma gondii* from the faces of cats. *J. Parasitol.* 58: 1005-1007.
- El-Nahas HA, Salem DA, El-Henawy AA, El-Nimr HI, Abdel-Ghaffar HA and El-Meadawy AM. 2013. *Giardia* diagnostic methods in human fecal samples: A comparative study. *Clinic. Cytomet.* 84B(1): 44-49.
- Hanafiah M, Alfiansyah HD dan Sayuti A. 2018. Identifikasi parasit pada biawak air (*Varanus salvator*). *Jurnal Sain Veteriner.* 36(1): 24-31.
- Mader DR. 1996. Section IV Medicine Parasitology. Di dalam: Mader DR, editor Reptile Medicine and Surgery. USA. W.B. Saunders. Company: 343-364.
- Natadisastra D dan Agoes R. 2009. Parasitologi Kedokteran Ditinjau dari Organ Tubuh yang Diserang. EGC. Jakarta.
- Prabayuda FD. 2017. Identifikasi *Cryptosporidium* sp. pada Biawak Air (*Varanus salvator*) yang didapat di Surabaya [Tesis]. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga.
- Rabie SAH and Hussein AA. 2014. A description of *haemogregarina* species naturally infecting white-spotted gecko (*Tarentola annularis*) in Qena, Egypt. *J. Parasitol.* 44(2): 351-358.
- Raś-Noryńska M and Sokół R. 2015. Internal parasites of reptiles. *Ann. Parasitol.* 61(2): 115-117.
- Robinson G, Elwin K and Chalmers RM. 2008. Unusual *Cryptosporidium* Genotypes in Human Cases of Diarrhea. *Emerg. Infect. Dis.* 14: 1800-1802.
- Shine R, Harlow PS, Keogh JS and Boeadi. 1996. Commercial harvesting of giant lizards: the biology of water monitors *Varanus salvator* in Southern Sumatra. *Biol. Cons.* 77: 125-134.
- Sopha P. 2018. Risiko Penularan Zoonosis Parasitik pada Mahasiswa Kedokteran Hewan. <https://www.researchgate.net/publication/323768393>. [8 Agustus 2019].
- Subronto. 2006. Penyakit Infeksi Parasit dan Mikroba pada Anjing dan Kucing. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Suwanti LT, Lastuti NDR, Mufasirin dan Suprihati E. 2011. Petunjuk dan Laporan Praktikum Ilmu Penyakit Protozoa. Departemen Parasitologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya
- Taylor MA, Coop RL and Wall RL. 2007. *Veterinary Parasitology*. 3rd. Blackwell Publishing Ltd. UK. p. 798.

- Tomé B, Pereira A, Harris DJ, Carretero MA and Perera A. 2019. A paradise for parasites? Seven new haemogregarine species infecting lizards from the Canary Islands. *J. Parasitol.* 1-12.
- Upton SJ and Zien CA. 1997. Description of a *Giardia varani*-like flagellate from a water monitor, *Varanus salvator*, from Malaysia. *J. Parasitol.* 83(5): 970
- Wilson B. 2010. Lizards. Di dalam: Ballard BM, Cheek R, editor. *Exotic Animal Medicine for the Veterinary Technician*. 2nd. Blackwell Publishing Professional. UK. p. 76-84, 87-90, 104-106.
- Wilson SC and Carpenter JW. 1996. Endoparasitic diseases of reptiles. *Seminars Avian Exo. PetMed.* 5: 64-74.