

MAJALAH



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

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

EDISI 5

JUNI 2020

MAJALAH

KUMPULAN ALIH BAHASA DI BIDANG PETERNAKAN DAN KESEHATAN HEWAN

EDISI 5

TAHUN 2020

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

DAFTAR ISI

No.	Judul	Halaman
1	Padang Rumput yang Dibudidayakan Mempengaruhi Asupan Nutrisi dan Perilaku Pemberian Makan Domba	1
2	Padang Rumput yang Dibudidayakan Mempengaruhi Asupan Nutrisi dan Perilaku Pemberian Makan Domba	9
3	Jumlah dan Jenis Bakteri di Vagina Sapi Bali selama Estrus dan Bunting	17
4	Hipofungsi Ovarium: Sebuah Kasus dalam Terapi Manajemen Sapi	23
5	Tinjauan Umum Penyebab Fungsional Infertilitas pada Sapi	30
6	Tingkat Hormon Pertumbuhan Pasca Perawatan Sapi Bali dengan Ethinil Estradiol dan Hormon Progesteron dalam Kombinasi dengan Mineral	36
7	<i>Kosakonia sp.</i> BAKTERI PROTEOLITIK YANG DIISOLASI DARI RUMEN DAN RETIKULUM SAPI ACEH	45
8	Pengaruh Antibodi Ibu terhadap Histopatogenesis Virus Penyakit Newcastle pada Ayam Broiler	50
	Jurnal Asli	55

Padang Rumput yang Dibudidayakan Mempengaruhi Asupan Nutrisi dan Perilaku Pemberian Makan Domba

JV Emerenciano Neto^{a,*}, GS Difante^b, HR Medeiros^c, EM Aguiar^c, LS Fernandes^d, TFM Trindade^c, MG Bezerra^e, HCB Oliveira^c, & RCP Galvão^c

^aUniversitas Federal Vale do São Francisco, Kolese Akademik Ilmu Hewan, Petrolina, Brasil

^bUniversitas Federal Mato Grosso do Sul, Fakultas Kedokteran Hewan dan Ilmu Hewan, Campo Grande, Brasil

^cUniversitas Federal Rio Grande do Norte, Unit Akademik Khusus dalam Ilmu Agraria, Macaíba, Brasil

^dUniversitas Federal Paraíba, Pusat Ilmu Agraria, Areia, Brasil

^eUniversitas Federal Wilayah Semi-Arid, Program Pengelolaan Tanah dan Air, Mossoró, Brasil

* Penulis yang sesuai: joao_neto@zootecnista.com.br

(Diterima 03-10-2019; Revisi 11-12-2019; Diterima 21-01-2020)

ABSTRAK

Penggembalaan yang dibudidayakan dapat meningkatkan produksi daging domba, tetapi perlu untuk memahami hubungan tanaman-hewan dalam lingkungan pastoral. Penelitian ini bertujuan untuk menilai pengaruh kultivar hijauan terhadap asupan dan perilaku makan domba. Empat perlakuan dievaluasi, terdiri dari kultivar *Panicum maksimum* cvs. Aruana dan Massai dan *Brachiaria brizantha* cvs. Marandu dan Piatã. Dua puluh empat domba, jantan dari genotipe Santa Inês, digunakan dengan enam ulangan per perlakuan. Makanan harian dan asupan nutrisi dievaluasi selain waktu dalam kegiatan merumput, ruminasi, dan bersantai. Hewan-hewan di padang rumput rumput Aruana menuntut waktu yang paling lama untuk merumput dan ruminasi ($p < 0,05$). Waktu senggang lebih tinggi ($p < 0,05$) pada hewan yang dipelihara di padang rumput Piatã. Asupan tertinggi bahan kering dan protein kasar dalam g / hari ($p < 0,05$) ditemukan pada hewan yang dipelihara di padang rumput Marandu, dan asupan yang lebih kecil ditemukan pada hewan yang dipelihara di padang rumput rumput Massai. Asupan daun daun lebih tinggi ($p < 0,05$) pada hewan yang dipelihara di padang rumput Massai dan Marandu. Asupan serat deterjen netral tidak berbeda di antara kultivar. Dapat disimpulkan bahwa struktur padang rumput dan komposisi kimia kultivar hijauan tropis mempengaruhi asupan nutrisi dan perilaku makan domba. Penawaran daun rendah dari padang rumput rumput Aruana secara negatif mempengaruhi perilaku makan domba, tetapi protein kasar dalam hijauan kultivar ini lebih menyukai asupan nutrisi, konversi pakan, dan kinerja domba.

Kata kunci: *Brachiaria brizantha*; merumput; LIPE®; *Panicum maksimum*; hal memamah biak

PENGANTAR

Dalam sistem penggembalaan ternak di lingkungan tropis Amerika Selatan, monokultur rumput abadi genera *Brachiaria* dan *Panicum* mendominasi dengan produksi hijauan, terkonsentrasi pada musim hujan (Sbrissia *et al.*, 2017). Penggunaan padang rumput yang dibudidayakan adalah alat yang berharga untuk meningkatkan produktivitas domba tetapi harus dianggap sebagai teknologi yang membutuhkan pengetahuan tentang hubungan timbal-balik hewan. Efisiensi dari sistem produktif hewan penggembalaan dipengaruhi oleh perubahan perilaku makan dalam kondisi yang membatasi asupan padang rumput karena ketidakmampuan untuk mempertahankan tingkat tinggi asupan bahan kering (Galli *et al.*, 1996).

Komposisi hijauan yang dipilih oleh hewan penggembalaan tergantung pada beberapa faktor, termasuk komposisi spesies hijauan yang tersedia, musim penggembalaan, dan tahap pertumbuhan, struktur padang rumput, dan preferensi individu hewan. Pola penggembalaan hewan menentukan

kualitas makanan yang dikonsumsi, di mana asupan bahan kering sangat penting untuk kinerja hewan dengan menentukan asupan nutrisi, mengingat protein utama dan energi yang dibutuhkan untuk perawatan pemeliharaan dan persyaratan produksi (Fontenele *et al.*, 2011).

Pemahaman tentang hubungan antara tanaman dan hewan dalam sistem penggembalaan menjadi tidak dapat dipastikan untuk keberhasilan dalam ternak, karena ada efek langsung antara perilaku makan, konsumsi, dan kinerja hewan. Namun, pengukuran asupan herba pada hewan penggembalaan sulit dilakukan; tidak ada metodologi yang halus dan tepat. Beberapa penelitian telah menggunakan teknik untuk memperkirakan asupan herba dan parameter nutrisi pada ternak penggembalaan seperti penanda eksternal dan internal (Azevedo *et al.* 2014), survei domba jenis ini jarang terjadi. Oleh karena itu, tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengevaluasi pengaruh kultivar hijauan terhadap hijauan dan asupan nutrisi, serta perilaku makan domba di padang rumput *Brachiaria* dan *Panicum*.

BAHAN DAN METODE

Percobaan ini dilakukan di area Kelompok Penelitian di Forage (GEFOR), yang terletak di Unit Akademik Khusus dalam Ilmu Pertanian - Universitas Federal Rio Grande do Norte - UFRN, di Macaíba, Rio Grande do Norte, Brasil. Koordinat geografis area percobaan adalah lintang $5^{\circ} 53' 35,12''$ selatan dan bujur $35^{\circ} 21' 47,03''$ Westland 160 m dari ketinggian.

Hewan, Desain Eksperimental, dan Diet

Daerah percobaan seluas 2,88 ha dibagi menjadi dua bidang seluas 1,44 ha, dengan empat modul 0,36 ha untuk setiap cultivar, yang dibagi lagi menjadi enam paddock dengan luas yang sama (0,06 ha). Periode evaluasi adalah dari April hingga September 2017, musim hujan di wilayah tersebut dengan curah hujan bulanan rata-rata 164 mm.

Perlakuan terdiri dari 4 jenis rumput tropis, dua kultivar Panicum maksimum: rumput Aruana dan Massai; dan dua Brachiaria brizantha: rumput Marandu dan Piatã. Padang rumput dikelola oleh stocking intermit-tenda. Masa istirahat padang rumput adalah 52 hari, waktu yang diperlukan untuk ketinggian kanopi mencapai 50 cm. Periode pendudukan masing-masing paddock adalah 52 hari, dan waktu diperlukan sehingga sekitar 50% dari massa yang tersedia dapat dihilangkan. Untuk memastikan tujuan ketinggian, kami menggunakan tingkat stocking variabel sesuai dengan pertumbuhan rumput dan jumlah hijauan yang tersedia.

Sampel dikumpulkan melalui simulasi penggembalaan manual selama periode evaluasi ketersediaan padang rumput. Komponen morfologis (helai daun dan batang) dipra-pengeringan pada suhu $55^{\circ} C$, ditumbuk di pabrik Wiley hingga 1 mm, dan kemudian dianalisis (Tabel 1).

Komposisi kimia sampel dianalisis menurut AOAC (2005): bahan kering (DM) ditentukan dengan pengeringan dalam oven pada $105^{\circ}C$ selama 16 jam (metode 973.18); abu dengan membakar pada $600^{\circ}C$ selama 4 jam (metode 942.05); protein kasar (CP) diperkirakan secara tidak langsung dari total nitrogen (N) ditentukan dengan metode Kjeldahl (metode 984.13), dan asam deterjen lignin (ADL) ditentukan dengan residu serat deterjen asam yang diperlakukan dengan 72% asam sulfat (metode 973.18). Serat deterjen netral (NDF) dan serat deterjen asam

(ADF) ditentukan menurut Van Soest *et al.* (1991), menggunakan tas poliester 16 mikron di Ankom 220 Fiber Analyzer (ANKOM Technology, Inc., NY, USA). Kami menentukan kecernaan bahan kering in vitro (IVDMD) dari varietas WCR menggunakan teknik dua tahap yang dijelaskan oleh Tilley & Terry (1963) untuk periode 72 jam menggunakan Ankom II Daisy Incubators (ANKOM Technologies, Inc.).

Untuk mengevaluasi komposisi kimia dari hijauan (Tabel 1), sampel dikumpulkan melalui simulasi penggembalaan manual selama periode evaluasi ketersediaan padang rumput. Santa Ines jantan dikebiri berusia dua puluh empat hari yang disembelih dengan bobot hidup rata-rata $23,8 \pm 1,6$ kg digunakan untuk evaluasi yang disimpan dalam kondisi siang hari (dari jam 7 pagi sampai jam 4 sore) dan ditempatkan di kandang dengan warung kolektif pada malam hari dengan akses ke air dan garam mineral ad libitum. Infestasi nematoda gastrointestinal dipantau setiap minggu dengan menghitung jumlah telur per gram tinja (EPG), di mana pernah mencapai 500 telur / g tinja diwajudkan aplikasi anthelmintik oral.

Pengambilan Sampel dan Pengukuran

Tunjangan hijauan (FA) dihitung dengan membagi massa hijauan (FM) yang tersedia dalam prapenggembalaan dengan periode occupation (OP) dengan tingkat stocking (SR), dinyatakan dalam kg DM / 100 kg berat hidup pada setiap hari ($FA = (FM / OP) / SR$), menurut Sollenberger *et al.* (2005). Hewan-hewan ditimbang setiap minggu, dan kenaikan rata-rata harian (ADG, g / hari) dihitung dengan perbedaan antara berat hewan pada awal dan akhir percobaan dibagi dengan hari percobaan.

Selama percobaan, empat periode (setiap dua bulan) pengiriman marker dan pengumpulan feses dilakukan selama dua tahap pekerjaan. Itu adalah hari-hari pertama dan terakhir pendudukan paddock, untuk memperkirakan keluaran tinja DM (FO; g / hewan / hari) menggunakan LIPE® sebagai penanda eksternal (Saliba *et al.*, 2015). Kapsul yang mengandung 250 mg LIPE® secara oral diperkenalkan selama tujuh hari (satu kapsul per hewan per hari) pada jam 8 pagi. Tinja dikumpulkan langsung dari bola rektum selama periode pengumpulan 5 hari, sekali sehari. Kotoran mulai dikumpulkan dua hari setelah dimulainya pemberian penanda sehingga homogenisasi dapat terjadi di seluruh saluran pencernaan. Setelah itu,

Tabel 1. Komposisi kimia dari komponen morfologi di padang rumput tropis

Komponen padang rumput tropis	Komposisi kimia (g / kg DM)						
	DM	CP	MM	NDF	ADF	ADL	IVDMD
Rumput Marandu (helai daun)	245	150	77	618	319	41	684
Rumput Marandu (batang)	212	84	78	726	444	61	603
Rumput piata (daun pisau)	273	120	71	656	331	38	668
Rumput piata (batang)	241	67	68	746	445	58	580
Rumput Massai (helai daun)	307	97	78	744	416	52	602
Rumput Massai (batang)	288	45	67	810	498	72	549
Rumput Aruana (helai daun)	236	162	86	707	369	60	650
Rumput Aruana (batang)	238	85	73	767	474	73	557

Catatan: DM = bahan kering, MM = bahan mineral, CP = protein kasar, NDF = serat deterjen netral, ADF = serat deterjen asam, ADL = deterjen asam lignin, IVDMD = kecernaan bahan kering in vitro.

Sampel tinja dihomogenisasi, dikeringkan (55°C selama 72 jam), dan tanah (1 mm) untuk analisis lebih lanjut.

Konsentrasi LIPE® dalam feses ditentukan menggunakan spektroskopi inframerah di laboratorium Simoes dan Saliba. Output tinja diperkirakan berdasarkan rasio jumlah marker yang diadministrasikan dengan konsentrasi marker dalam feses:

$$\text{FO}_{(\text{g}/\text{hewan}/\text{hari})} = (\text{MAO} / \text{MCF}) \times 100$$

di mana FO adalah output tinja, MAO adalah jumlah penanda yang ditawarkan (LIPE®), dan MCF adalah konsentrasi penanda dalam tinja (g / kg DM). Estimasi DMI diperoleh dengan menggunakan persamaan berikut:

$$\text{DMI}_{(\text{g}/\text{hari DM})} = \text{FO} \times \text{MCF} / \text{MCFO}$$

di mana FO adalah fecal output (g / day DM), MCF adalah konsentrasi marker dalam feses (g / kg DM), dan MCFO adalah konsentrasi marker dalam hijauan (g / day DM). Asupan daun dan batang daun (g / hari) diperkirakan berdasarkan proporsi massa setiap komponen morfologis yang menghilang dari pikel selama penggembalaan, dan proporsi ini diterapkan dalam konsumsi bahan kering, setelah diet dasar hanya padang rumput. Asupan nutrisi diperkirakan dengan jumlah dari jumlah yang dicerna dalam setiap komponen morfologi.

Evaluasi pola asupan dilakukan dengan pengamatan, yang dilakukan dalam shift 24 jam, dan aktivitas hewan dicatat setiap 5 menit. Hewan-hewan dievaluasi secara visual untuk perilaku makan, dengan tiga hewan uji untuk setiap pengamat. Kecepatan menggigit dihitung dari waktu yang diperlukan bagi hewan untuk melakukan 20 gigitan, kemudian berubah menjadi gigitan per menit (Hodgson, 1985). Aktivitas yang diamati adalah merumput, ruminasi, dan diam. Semua pengamatan untuk hari ditambahkan untuk setiap variabel dan dinyatakan dalam jam / hari. Efisiensi pemberian makan dan ruminasi ($\text{g}_{\text{DM}}/\text{h}$ dan $\text{g}_{\text{NDF}}/\text{h}$) diperoleh dengan membagi rata-rata harian DM dan asupan NDF dengan total waktu yang dihabiskan dalam penggembalaan dan ruminasi dalam 24 jam, masing-masing (Burger *et al.*, 2000).

Analisis statistik

Desain eksperimental adalah desain blok acak (kemungkinan efek daerah), data dianalisis untuk varian dan rata-rata dibandingkan dengan uji Tukey pada signifikansi 5%, menggunakan program statistik SISVAR 5.6 (Ferreira, 2011). Model untuk analisis data adalah sebagai berikut:

$$Y_{ij} = \mu + F_i + C_j + e_{ijk}$$

Tabel 2. Pasokan pakan dan asupan bahan kering oleh domba di padang rumput tropis

Variabel	Rumput				CV (%)
	Marandu	Piatã	Massai	Aruana	
Tunjangan hijauan (kg DM / 100 kg LW)	47.51 ^a	47.80 ^a	46.79 ^a	38.33 ^b	14,03
Tunjangan bilah daun (kg DM / 100 kg LW)	26.35 ^b	27.98 ^b	34.01 ^a	18.14 ^c	17.57
Tunjangan batang (kg DM / 100 kg LW)	21.16 ^a	19.82 ^a	12.78 ^b	20.20 ^a	14.89
Asupan bahan kering (g / hari)	730.92 ^a	698.90 ^b	623.65 ^d	655.23 ^c	2.17
Asupan bahan kering (% LW)	2.66	2.59	2.29	2.21	12,03
Asupan daun pisau (g / hari)	543.76 ^a	514.81 ^b	546.16 ^a	360.33 ^c	2.26
Asupan batang (g / hari)	187.15 ^b	184.09 ^b	77.48 ^c	294.90 ^a	2.20

Catatan: DM = mater kering, LW = berat hidup, Berarti dalam baris yang sama dengan superskrip berbeda berbeda nyata ($p < 0,05$).

di mana Y_{ijk} 1 adalah variabel dependen, μ adalah rata-rata keseluruhan, F_i adalah efek dari kultivar (rumput Marandu, rumput Massai, rumput Aruana, dan rumput Piata), C_j adalah yang efek dari blok, dan e_{ijk} adalah istilah kesalahan.

Korelasi diperoleh dengan analisis korelasi Pearson dan uji-t, dengan mempertimbangkan signifikansi pada $p < 0,05$. Kriteria untuk klasifikasi koefisien korelasi adalah $r \geq 80\%$ yang berarti hubungan yang kuat dan $50\% < r \leq 70\%$ menunjukkan korelasi sedang.

HASIL

Hijauan pakan terendah dan daun pisau diamati di padang rumput Aruana (Tabel 2), sementara Massai padang rumput menunjukkan tunjangan batang terendah ($p < 0,05$). Asupan bahan kering (DMI) tertinggi sebagai g / hari diamati pada hewan yang dipelihara di padang rumput Marandu dan yang terendah pada hewan yang dipelihara di padang rumput rumput Massai ($p < 0,05$). Asupan bahan kering dalam% LW tidak berbeda menurut kultivar ($p > 0,05$); asupan rata-rata adalah 2,43% dari bobot hidup mereka di hijauan kering.

Asupan tertinggi daun daun diamati pada hewan yang dipelihara di padang rumput Massai dan Marandu ($p < 0,05$) dan asupan tertinggi batang pada hewan yang dipelihara di padang rumput Aruana. Asupan protein kasar tertinggi (CPI) sebagai g / hari dan% LW ($p < 0,05$) diperoleh oleh hewan yang dipelihara di padang rumput Marandu dan yang terendah di padang rumput rumput Massai (Tabel 3). Asupan bahan mineral (MMI), serat deterjen netral (NDFI), dan serat deterjen asam (ADFI) dalam% LW tidak berbeda menurut kultivar ($p > 0,05$), diikuti oleh perilaku yang sama dengan DMI dalam% LW. ADFI tertinggi dalam g / hari dan deterjen asam lignin (ADLI) sebagai g / hari dan% LW diamati pada hewan di rumput Aruana. MMI dalam g / hari lebih tinggi pada hewan yang dipelihara di padang rumput Marandu. NDFI tidak berbeda menurut kultivar ($p > 0,05$).

Hewan-hewan yang dipelihara di padang rumput Aruana membutuhkan waktu yang paling lama ($p < 0,05$) waktu merumput (Tabel 4). Tingkat bit tertinggi ($p < 0,05$) diamati pada hewan yang dipelihara di padang rumput Marandu dan Aruana dan terendah di padang rumput Massai dan Piata (Tabel 4). Waktu tertinggi dihabiskan untuk ruminasi, dan waktu senggang yang paling pendek diamati pada domba yang disimpan di padang rumput Aruana ($p < 0,05$). Hewan-hewan yang dipelihara di rumput Aruana digembalakan terus menerus selama mereka

Tabel 3. Asupan komponen nutrisi oleh domba di padang rumput tropis

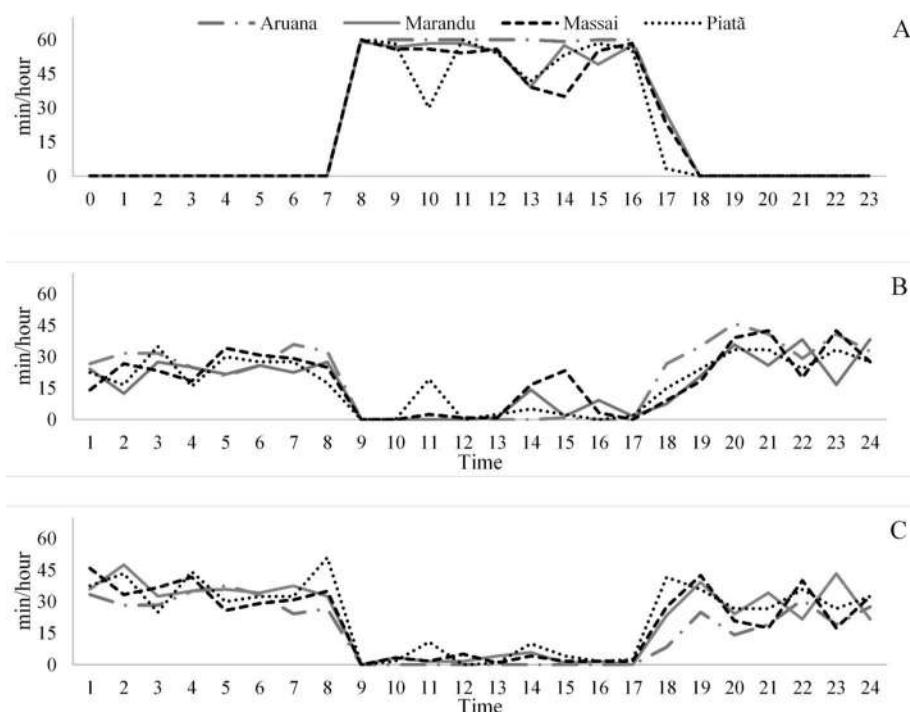
Variabel	Lama sekali				CV (%)
	Marandu	Piatā	Massai	Aruana	
Asupan protein kasar (g / hari)	97,29 ^a	74,11 ^c	56,46 ^d	83,44 ^b	2,12
(% LW)	0,35 ^a	0,27 ^b	0,21 ^c	0,28 ^b	11,44
Asupan bahan mineral (g / hari)	56,47 ^a	49,07 ^c	47,79 ^c	52,52 ^b	2,14
(% LW)	0,21	0,18	0,18	0,18	11,49
Asupan serat deterjen netral (g / hari)	471,92	475,05	469,11	480,94	2,18
(% LW)	1,72	1,76	1,72	1,63	11,75
Asupan serat deterjen asam (g / hari)	256,56 ^{bc}	252,32 ^c	265,79 ^b	272,74 ^a	2,16
(% LW)	0,94	0,94	0,98	0,92	11,73
Asupan deterjen lignin asam (g / hari)	33,71 ^b	30,24 ^c	33,98 ^b	43,15 ^a	2,10
(% LW)	0,12 ^b	0,11 ^b	0,13 ^b	0,15 ^a	11,36

Catatan: LW = bobot hidup, artinya dalam baris yang sama dengan superskrip berbeda berbeda nyata ($p < 0,05$).

Tabel 4. Waktu merumput, ruminasi, dan bersantai domba disimpan di rumput rumput tropis

Variabel	Lama sekali				CV (%)
	Marandu	Piatā	Massai	Aruana	
Waktu perawatan (jam / hari)	8,26 ^b	7,38 ^c	8,10 ^b	9,00 ^a	3,84
Tingkat menggigit (bit / mnt)	47,17 ^a	36,24 ^b	35,57 ^b	44,10 ^a	21,77
Waktu ruminasi (h / hari)	7,13 ^b	7,10 ^b	7,81 ^b	8,81 ^a	7,89
Waktu senggang (jam / hari)	8,41 _{ab}	9,26 ^a	8,03 ^b	6,22 ^c	9,62

Catatan: LW = bobot hidup, artinya dalam baris yang sama dengan superskrip berbeda berbeda nyata ($p < 0,05$).



Gambar 1. Merumput (A), memamah biak (B) dan bersantai / idle (C) kegiatan domba di padang rumput tropis rumput ical sesuai dengan waktu. Aruana (- - -), Marandu (—), Massai (- - - -), Piatā (-----).

tetap di padang rumput (7 pagi sampai 4 sore), hewan yang dipelihara dalam kultivar lain mengurangi waktu merumput pada periode antara jam 1 siang dan 3 sore (Gambar 1A). Setelah periode penggembalaan, hewan-hewan ini membagi waktu mereka menjadi kegiatan ruminasi dan bersantai, dengan keunggulan

untuk ruminasi dalam periode antara 5 sore dan 11 malam (Gambar 1B) dan untuk bersantai antara jam 11 malam dan 07 pagi hari berikutnya (Gambar 1C).

Efisiensi pakan tertinggi (g_{DM}/ h dan g_{NDF}/ h) diamati pada hewan yang dipelihara di padang rumput Piatā ($p < 0,05$)

Tabel 5. Efisiensi pakan dan ruminasi, perolehan rata-rata harian, konversi pakan domba di padang rumput rumput tropis

Variabel	Lama sekali				CV (%)
	Marandu	Piatā	Massai	Aruana	
Efisiensi pakan (gDM / jam)	88.50 ^b	94.89 ^a	77.06c	72.80c	4.24
Efisiensi pakan (gNDF / jam)	57.15 ^{bc}	64.50 ^a	57.96 ^b	53.44c	8.94
Efisiensi ruminasi (gDM / h)	103.16 ^a	99.25 ^a	80.31 ^b	74.57 ^b	9.12
Efisiensi ruminasi (gNDF / h)	66.60 ^a	67.46 ^a	60.40 ^{ab}	54.73 ^b	8.94
Penghasilan harian rata-rata (g / hari)	46.97 ^{ab}	41.36 ^b	42.63 ^b	65.15 ^a	35.75
Konversi umpan	15.70 ^a	16.89 ^a	14.63 ^a	10.06 ^b	14.61

Catatan: DM = bahan kering, NDF = serat deterjen netral, berarti pada baris yang sama dengan superskrip berbeda berbeda nyata ($p < 0,05$).

Tabel 6. Koefisien korelasi antara variabel perilaku makan, asupan dan konversi pakan domba di padang rumput rumput tropis

	GT	RT	LT	LBI	SI	ADLI	FE	KEMB
								ALI
GT	-	0,66 *	-0,87 *	0,70 *	0,53 *	0,87 *	-0,82 *	0,84 *
RT	-	-	-0,94 *	0,58 *	0,40 _{NS}	0,71 *	-0,75 *	0,81 *
LT	-	-	-	-0,67 *	-0,50 *	-0,83 *	0,82 *	-0,92 *
LBI	-	-	-	-	-0,85 *	-0,87 *	-0,71 *	0,57 *
SI	-	-	-	-	-	0,70 *	-0,17 _{NS}	0,73 *
ADLI	-	-	-	-	-	-	-0,75 *	0,82 *
FE	-	-	-	-	-	-	-	-0,58 *
RE	-	-	-	-	-	-	-	-
FC	-	-	-	-	-	-	-	-

catatan: GT = waktu merumput, RT = waktu ruminasi, LT = waktu senggang, LBI = asupan bilah daun, SI = asupan batang, ADLI = Lignin deterjen asam asupan, FE = efisiensi pakan, RE = efisiensi ruminasi, FC = konversi pakan, NS = (Tidak nyata), * = ($p < 0,05$).

(Tabel 5). Padang rumput rumput Marandu dan Piata memberikan efisiensi ruminasi yang lebih besar ($p < 0,05$) (gDM/ h dan gNDF/ h) dari rumput Aruana. Rata-rata perolehan harian tertinggi (ADG) dan konversi pakan terendah (FC) diamati di analisis rumput rumput Aruana bila dibandingkan dengan yang dipelihara di padang rumput rumput Massai dan Piata (Tabel 5). Variabel utama yang menunjukkan korelasi signifikan ($p < 0,05$), dan moderate untuk magnitude tinggi disajikan pada Tabel 6.

DISKUSI

Kelonggaran hijauan dan komponen morfologi adalah hasil dari kepadatan volumetrik komponen ini dalam struktur padang rumput, karena semua padang rumput tingginya 50 cm pada pra-pengembalaan. Bilah daun tertinggi dan pasokan batang terendah yang diamati pada tatanan Massai dapat merupakan hasil dari kepadatan tinggi anak-anak kultivar ini (Luna *et al.*, 2014). Suplai batang tertinggi pada kultivar lain dapat dijelaskan oleh persediaan hijauan di atas 20 kg DM / 100 kg LW. Menurut Gomez *et al.* (2010), dalam stocking intermiten, dari nilai ini terjadi akumulasi berlebihan batang dan material mati, yang juga menyebabkan penurunan kualitas hijauan yang ditawarkan.

DMI (g / hari) berhubungan langsung dengan kandungan serat deterjen netral kultivar (Tabel 1), hewan yang merumput mencari makan dengan NDF yang lebih rendah memperoleh asupan bahan kering yang lebih tinggi. Menurut Bosa *et al.* (2012), konsentrasi NDF dalam makanan ternak berbanding terbalik dengan asupan bahan kering oleh hewan. Artinya, semakin tinggi konten NDF, semakin rendah total asupan. DMI

lebih rendah dari 3,62% LW yang diamati oleh Pereira *et al.* (2018), untuk domba di tempat pemberian makan jerami rumput Massai. Asupan tertinggi yang diperoleh oleh penulis adalah hasil dari penggunaan konsentrasi protein, yang memungkinkan efek tambahan pada total asupan (Mabrouk *et al.*, 2008). Efek ini juga diamati oleh Jochims *et al.* (2010), yang mengamati asupan yang lebih rendah dari total DM pada hewan disimpan secara eksklusif di padang rumput millet, dan ini hanya 67% dari total asupan hewan yang menerima suplemen.

Hewan-hewan yang dipelihara di padang Massai dan Marandu menunjukkan asupan daun tertinggi ($p < 0,05$). Meskipun asupan tertinggi dari total hijauan (g / hari) diamati pada hewan yang mengkonsumsi rumput Marandu, pasokan pisau daun yang lebih besar diamati pada rumput Massai (Tabel 2) memungkinkan pemilihan yang lebih besar dari komponen ini oleh hewan. Konsumsi batang yang lebih rendah oleh hewan yang disimpan di rumput Massai mendukung pengamatan ini. Alasan yang sama menjelaskan tingginya asupan batang oleh hewan yang disimpan di rumput rumput Aruana dikonfirmasi oleh korelasi yang tinggi dan negatif (Tabel 6) antara daun pisau dan konsumsi batang. Biasanya, hewan lebih suka daun daripada batang, karena mereka lebih mudah dicerna dan bergizi; tanaman dewasa juga ditolak. Namun, di padang rumput dengan pasokan hijauan lebih sedikit,

CPI secara langsung terkait dengan konsentrasi CP diamati dalam komponen morfologi kultivar (Tabel 1). Meskipun konsentrasi CP tertinggi dalam daun diamati dalam pemupukan rumput Aruana, asupan yang lebih rendah dari komponen ini oleh hewan dalam kultivar ini membuat CPI menengah antara

Rumput Marandu dan Massai. Pereira *et al.* (2018) ob-dilayani CPI 0,48% LW pada domba yang diberi makan dengan Massai hay dan terkonsentrasi dalam rasio (2: 1). Perbedaan asupan antara studi dapat dikaitkan dengan penggunaan suplemen terkonsentrasi. Asupan nutrisi ini adalah variabel yang paling mempengaruhi kinerja hewan (Goes *et al.*, 2018). Suplementasi dapat dilakukan dan penting dalam periode musiman padang rumput (Sousa *et al.*, 2018).

NDFI yang diamati dapat mengindikasikan bahwa nutrisi ini memiliki asupan hijauan yang terbatas. Asupan nutrisi yang lebih rendah (413,76 g / hari NDF) oleh domba Santa Inês juga diamati oleh Fontenele *et al.* (2011), yang menyimpulkan bahwa asupan makanan dibatasi dengan mengisi kompartemen rumen. Menurut Harper & McNeill (2015), peningkatan asupan NDF dapat membatasi kemampuan ruminansia untuk mengonsumsi pakan yang cukup untuk memenuhi kebutuhannya. Dalam diet berbasis hijauan, pengisian rumen dan tingkat fade biasanya mengontrol in-gestion. ADLI tertinggi yang diamati pada hewan yang dipelihara di rumput Aruana dapat dikaitkan dengan asupan batang yang lebih tinggi oleh hewan-hewan ini. Variabel-variabel ini memiliki korelasi tinggi dan positif (Tabel 6). Selain itu, kultivar memiliki konsentrasi ADL yang lebih tinggi di batang (Tabel 1).

Hewan-hewan yang dipelihara di rerumputan Aruana tetap dalam aktivitas merumput selama mereka memiliki akses ke padang rumput (9 jam), tanpa melakukan kegiatan lain dalam periode ini. Hasil ini mungkin disebabkan oleh pasokan pisau daun yang lebih rendah yang diamati pada kultivar ini (Tabel 2), sehingga hewan tersebut menghabiskan lebih banyak waktu mencari daun untuk memenuhi kebutuhan harian mereka dari pengambilan hijauan. Menurut Pellegrini *et al.* (2011), domba merespons penurunan persentase daun hijau yang tersedia, meningkatkan waktu merumput, untuk mencoba mengimbangi penurunan kualitas makanan, karena aksesibilitas daun dan tingkat kematangan tanaman terkait erat dengan nilai gizi tanaman hijauan.

Semakin tinggi laju bit, semakin tinggi DMI (g / hari) di padang rumput Marandu, dan semakin rendahnya pasokan daun di padang rumput Aruana (Tabel 2) membenarkan tingginya tarif. Peningkatan bit rate dapat disebabkan oleh penurunan ketersediaan DM dan oleh komposisi morfologi padang rumput (Pedroso *et al.*, 2004). Hewan-hewan yang dipelihara di padang rumput Aruana menggunakan strategi perilaku di mana hewan mengkompensasi pengurangan asupan padang rumput dengan meningkatnya waktu merumput. Akibatnya, strategi ini menyiratkan peningkatan waktu ruminasi, dibuktikan dengan korelasi sedang yang diperoleh antara variabel-variabel ini (Tabel 6). Pompeu *et al.* (2009) mengamati 9,9 jam padang rumput untuk domba di padang rumput Tanzania, waktu tertinggi yang diperoleh adalah hasil dari tidak adanya pengekangan hewan,

Waktu ruminasi, terlepas dari tanaman pakan ternak, lebih tinggi dari 6,6 jam / hari yang diamati oleh Silva *et al.* (2016) pada domba yang dipelihara di padang rumput tropis di musim kemarau. Bahkan kualitas hijauan lebih rendah, penggunaan 1,5% LW dari suplemen konsentrat nyata meningkatkan kualitas makanan total hewan-hewan ini. Jika jumlah konsentrat

dipertimbangkan mengenai berat total asupan yang diperoleh dalam hal ini bekerja (Tabel 2), itu mewakili lebih dari 60% dari makanan hewan. Semakin tingginya permintaan waktu untuk merumput dan ruminasi menjelaskan semakin sedikit waktu luang hewan yang dipelihara di padang rumput Aruana, dengan korelasi negatif yang tinggi antara kegiatan-kegiatan ini (Tabel 6). Perilaku yang serupa diamati oleh Emerenciano Neto *et al.* (2018) untuk domba di padang rumput rumput Massai di bawah ketinggian kanopi yang berbeda. Menurut Pellegrini *et al.* (2011), partisipasi yang lebih besar dari komponen struktural dalam padang rumput mempengaruhi peningkatan waktu merumput dan pengurangan waktu luang hewan.

Distribusi saat diam dan ruminasi sesuai dengan jadwal mirip dengan hasil Pompeu *et al.* (2009), dengan frekuensi waktu luang yang lebih tinggi antara jam 11 malam dan 5 pagi dan tidak ada penggembalaan dalam periode dari jam 2 pagi sampai jam 5 pagi untuk domba di padang rumput Tanzania. Para penulis menunjukkan bahwa perilaku primitif sebagai perlindungan predator masih menyebabkan hewan lebih suka merumput di siang hari, bahkan dengan suhu tinggi. Periode yang sama juga digunakan untuk ruminasi. Efisiensi pemberian makan hewan yang dipelihara di padang rumput Piata adalah hasil dari asupan lignin deterjen asam yang lebih rendah dan waktu penggembalaan (Tabel 3 dan Tabel 4), dengan korelasi negatif yang tinggi antara kegiatan ini (Tabel 6). Peningkatan efisiensi ruminasi terjadi ketika ada pasokan daun daun yang lebih besar, yang memungkinkan tingkat umpan yang lebih tinggi (Pereira *et al.*, 2018). Menurut Carvalho *et al.* (2004), efisiensi ruminasi merupakan mekanisme penting dalam mengendalikan penggunaan makanan yang memiliki kecernaan rendah.

Dengan hijauan Aruana, hewan itu menunjukkan kenaikan berat badan harian yang lebih tinggi dan indeks konversi pakan yang lebih baik. Asupan protein kasar yang lebih tinggi dengan Aruana (yang, bagaimanapun, lebih rendah daripada yang diberi makan dengan Marandu) dapat berkontribusi pada hasil ini. Tetapi faktor lainnya harus dipertimbangkan, karena semakin lama waktu merumput. Menurut waktu yang lebih lama dihabiskan untuk merumput, domba-domba membagikan asupan herba mereka (yang merupakan makanan sementara dibandingkan dengan hijauan lainnya) selama waktu yang lama merumput. Kondisi ini dapat terjadi karena mereka makan terus menerus dan juga diizinkan untuk memperlambat transit pakan di saluran pencernaan, sehingga meningkatkan kecernaan dan, sebagai konsekuensinya, efisiensi pemanfaatan pakan dan kinerja pertumbuhan.

Konversi pakan terendah (FC) hewan yang disimpan di padang rumput Aruana adalah hasil dari asupan lignin deterjen asam tertinggi, dan variabel-variabel ini menunjukkan korelasi negatif sedang (Tabel 6). Asupan hijauan yang lebih tinggi tidak selalu yang paling tepat dan harus diamati dengan hati-hati (Cabral *et al.*, 2008), karena konversi tergantung pada kualitas asupan hijauan. Oleh karena itu, efisiensi makanan adalah alat penting dalam sistem produksi ternak, karena kenaikan berat badan saja tidak cukup, hewan-hewan ini juga harus efisien, dengan pengambilan yang memadai dan kinerja yang kompatibel.

KESIMPULAN

Struktur padang rumput dan komposisi kimia kultivar mempengaruhi asupan nutrisi, perilaku makan, dan kinerja domba. Penawaran pisau daun rendah dari padang rumput rumput Aruana negatif mempengaruhi perilaku makan domba, tetapi protein kasar dalam hijauan kultivar ini menyukai asupan nutrisi, konversi pakan, dan kinerja domba.

KONFLIK KEPENTINGAN

Para penulis menyatakan bahwa tidak ada konflik kepentingan dengan hubungan keuangan, pribadi, atau lainnya dengan orang atau organisasi lain yang terkait dengan pasangan yang dibahas dalam naskah.

PENGAKUAN

Kami berterima kasih kepada CNPq dan CAPES atas dukungan keuangan dalam mengembangkan studi ini dan beasiswa yang diberikan. Kami juga berterima kasih kepada GEFOR (Grupo de Estudos em Forragicultura -UFRN) untuk bantuan dalam melaksanakan penelitian ini.

REFERENSI

- AOAC (Association of Official Analytical Chemists).** 2000. Official methods of analysis. 17th edition. Washington, DC, USA.
- Azevedo, E. B., C. H. E. C. Poli, D. B. David, G. A. Amaral, L. Fonseca, P. C. F. Carvalho, V. Fischer, & S. T. Morris.** 2014. Use of faecal components as markers to estimate intake and digestibility of grazing sheep. *Livest. Sci.* 165: 42-50. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2014.04.018>
- Bosa, R., C. Faturi, H. G. R. Vasconcelos, A. M. Cardoso, A. F. O. Ramos, & J. C. Azevedo.** 2012. Intake and apparent digestibility with different inclusion levels of coconut meal for sheep feeding. *Acta Sci. Anim. Sci.* 34: 57-62. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v34i1.11936>
- Burger, P. J., J. C. Pereira, A. C. Queiroz, J. F. C. Silva, S. C. Valadares Filho, P. R. Cecon, & A. D. P. Casali.** 2000. Ingestive behavior in Dutch calves fed diets containing different levels of concentrate. *R. Bras. Zootec.* 29: 236-242. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982000000100031>
- Cabral, L. S., J. W. Santos, J. T. Zervoudakis, J. G. Abreu, A. L. Souza, & R. C. Rodrigues.** 2008. Intake and feeding efficiency in feed-lot lambs. *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.* 9: 703-714.
- Carvalho, C. G. G. P., A. J. V. Pires, F. F. Silva, C. M. Veloso, R. R. Silva, H. G. O. Silva, P. Bonomo, & S. S. Mendonça.** 2004. Ingestive behavior of dairy goats fed on cocoa meal or palm cake. *Pesq. Agropec. Bras.* 39: 919-925. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2004000900012>
- Emerenciano Neto, J. V., G. S. Difante, A. M. Q. Lana, H. R. Medeiros, E. M. Aguiar, D. B. Montagner, & J. S. Souza.** 2018. Forage quality and performance of sheep in Massai grass pastures managed at pre-grazing canopy heights. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 48: 1073-1081. <https://doi.org/10.4314/sajas.v48i6.10>
- Ferreira D. F.** 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciênc. Agrotec.* 35: 1039-1042. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001>
- Fontenele, R. M., E. S. Pereira, M. S. S. Carneiro, P. G. Pimentel, M. J. D. Cândido, & J. G. L. Regadas Filho.** 2011. Nutrient intake and ingestive behavior of Santa Inês lambs fed diets with different levels of metabolizable energy. *R. Bras. Zootec.* 40: 1280-1286. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982011000600017>
- Goes, R. H. T. B., M. M. Y. Carneiro, M. P. Osmari, K. A. Souza, R. T. Oliveira, & C. J. S. Souza.** 2018. Intake, digestibility, performance and carcass characteristics of ewes fed crambe replacing soybean meal in the diet. *Acta Sci. Anim. Sci.* 40: e37171. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci. v40i1.37171>
- Gómez, J. M. D., V. Fischer, C. H. E. C. Poli, P. C. F. Carvalho, E. J. Pegoraro, & E. Macari.** 2010. Effects of forage supply, grazing method, days of evaluation and breed on sheep behavior and temperament. *R. Bras. Zootec.* 39: 1840-1848. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982010000800029>
- Harper, K. J., & D. M. Mcneill.** 2015. The Role iNDF in the Regulation of Feed Intake and the Importance of Its Assessment in Subtropical Ruminant Systems (the Role of iNDF in the Regulation of Forage Intake). *Agriculture* 5: 778-790. <https://doi.org/10.3390/agriculture5030778>
- Hodgson, J.** 1985. The control of herbage intake in the grazing ruminant. *Proc. Nutr. Soc.* 44: 339-346. <https://doi.org/10.1079/PNS19850054>
- Jochims, F., C. C. Pires, L. Griebler, A. M. S. Bolzan, F. D. Dias, & D. B. Galvani.** 2010. Feeding behavior and forage intake of ewe lambs on pearl millet pasture with or without supplementation. *R. Bras. Zootec.* 39: 572-581. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982010000300017>
- Luna, A. A., G. S. Difante, D. B. Montagner, J. V. Emerenciano Neto, I. M. M. Araújo, & L. E. C. Oliveira.** 2014. Accumulation of forage and morphogenetic responses in forage grass by cutting. *Biosci. J.* 30: 1803-1810.
- Mabrouk, C., N. Moujahed, R. Ouzrout, & and C. Kayouli.** 2008. Effects of supplementation on pasture intake by ewes in South-eastern of Algeria. *Livest. Res. Rural Dev.* 20; e43.
- Pedroso, C. E. S., R. B. Medeiros, M. A. Silva, J. B. J. Jornada, J. C. Saibro, & J. R. F. Teixeira.** 2004. Sheep behavior at the pregnancy and at the lactation grazing on different phenological stages of annual ryegrass. *R. Bras. Zootec.* 33: 1340-1344. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982004000500028>
- Pellegrini, L. G., A. L. G. Monteiro, M. Neumann, P. C. F. Carvalho, A. L. P. Silva, S. B. C. Lustosa, & A. C.R. S. Pellegrin.** 2011. Behavior of lambs in ryegrass grazing (*Lolium multiflorum*) in different phenological phases submitted to nitrogen fertilization. *Rev. Ceres* 58: 329-335. <https://doi.org/10.1590/S0034-737X2011000300013>
- Pereira, G. F., P. O. Lima, L. C. S. L. C. Assis, & J.V. Emerenciano Neto.** 2018. Nutrient intake, feeding behavior and performance of sheep fed hay of tropical grasses at different cutting intervals. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 70: 897-904. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9775>
- Pompeu, R. C. F. F., M. C. P. Rogério, M. J. D. Cândido, J. N. M. Neiva, J. L. L. Guerra, & J. S. Gonçalves.** 2009. Nutrient intake, ingestive behavior and performance of ovine fed grasses of tropical grasses at different intervals between cuts. *R. Bras. Zootec.* 38: 374-383. <https://doi.org/10.1590/ S1516-35982009000200022>
- Saliba, E. O., E. P. Faria, N. M. Rodriguez, G. R. Moreira, I. B. M. Sampaio, J. S. Saliba, L. C. Gonçalves, I. Borges, & A. L. C. C. Borges.** 2015. Use of Infrared Spectroscopy to Estimate Fecal Output with Marker Lipe®. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 4: 1-10. <https://doi.org/10.19070/2326-3350-SI04001>
- Sbrissia, A. F., P. G. D. Duchini, J. R. Echeverria, T. Miqueloto, A. Bernardon, & L. F. Américo.** 2017. Animal production on cultivated pasturelands in regions of temperate climate of Latin America. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.*, 25: 47-60.
- Sollenberger, L. E., J. E. Mooreb, V. G. Allenc, & C. G. S. Pedreira.** 2005. Reporting Forage Allowance in Grazing Experiments. *Crop Sci.* 45: 896-900. <https://doi.org/10.2135/cropsci2004.0216>
- Sousa, S. V., M. J. Araújo, T. P. D. Silva, C. A. T. Marques, J. N. C. Torreão, L. R. Bezerra, I. S. S. Lima, & F. P. Gottardi.** 2018. Dietary supplementation for Santa Inês hair ewes on pasture at pre- and postpartum periods: dry matter in-take, digestibility, milk production, and mineral metabolism.

- Silva, L. F. N., G. S. Difante, L. S. Fernandes, I. M. M. Araujo, J. V. Emerenciano Neto, M. G. Costa, & N. R. O. Felisberto. 2016. Ingestive behavior of sheep in Panicum and Brachiaria pastures in dry season. Biosci. J. 32: 1018-1024. <https://doi.org/10.14393/BJ-v32n4a2016-32945>
- Tarazona, A. M., M. C. Ceballos, J. F. Naranjo, & C. A. Cuartas. 2012. Factores que afectan el comportamiento de consumo y selectividad de forrajes en rumiantes. Rev. Colom. Cienc. Pecua. 25: 473-487.
- Tilley, J. M. A. & R. A. Terry. 1963. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. J. Br. Grassl. Soc. 18: 104-111. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.1963.tb00335.x>
- Van Soest, P. J., J. D. Robertson, & B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. J. Dairy Sci. 74: 3583-3597. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)



J. Dairy Sci. 93: 3031–3038
doi: 10.3168 / jds.2009-2963
© Asosiasi Sains Susu Amerika® 2010

Colostrogenesis: Transfer massa imunoglobulin G₁ ke dalam kolostrum

CR Baumrucker,¹ AM Burkett, AL Magliaro-Macrina, dan CD Dechow

Departemen Peternakan dan Ilmu Hewan, Universitas Negeri Pennsylvania, University Park 16802

ABSTRAK

IgG sapi diperkirakan secara khusus diangkut oleh proses transcytosis melintasi sel epitelial susu selama colostrogenesis. IgG susu ap-pearance dalam kolostrum sapi biasanya dilaporkan sebagai konsentrasi dan menunjukkan IgG₁ konsentrasi menjadi sangat bervariasi karena variasi hewan, waktu pemerahan colostrum, dan efek pengenceran air. Untuk mengidentifikasi IgG hewan mentransfer kapasitas dan memisahkannya dari efek lain, tujuan kami adalah untuk menentukan IgG kolostrum pertama total massa. Kami mengumpulkan 214 sampel kolostrum pertama yang benar-benar diperah dengan catatan bobot colostrum dari 11 peternakan susu Pennsylvania yang berpartisipasi dalam Pennsylvania Dairy Herd Improvement Association, menganalisis kolostrum untuk IgG₁ oleh ELISA, dan dihitung total IgG₁ massa. Median dan rata-rata konsentrasi IgG₁ masing-masing adalah 29,4 mg / mL dan 37,5 ± 30,2 mg / mL, dengan kisaran 9 hingga 166 mg / mL. Namun, total massa IgG₁ memiliki median 209,1 g, rata-rata 291,6 ± 315,8 g, dan kisaran 14 hingga 2.223 g. IgG kolostrum konsentrasi menunjukkan tidak ada hubungan dengan volume kolostrum, tetapi IgG₁ Massa memiliki hubungan positif dengan volume. IgG kolostrum Massa terkait dengan IgG₁ konsentrasi ($R^2 = 0,58$). Dengan menggunakan catatan DHIA untuk 196 hewan, kami menetapkan produksi susu untuk hewan-hewan ini setara dengan 15-hari. Hubungan sekresi susu yang mapan dengan jaringan parenkim mammae (jaringan sekretori) dihitung dan tidak menunjukkan hubungan IgG₁ massa dengan jaringan parenkim mammae. Selain itu, kami menunjukkan bahwa sekitar 10% dari hewan sampel memiliki IgG₁ massa lebih besar dari 1 standar deviasi di atas rata-rata (high mass transfer) dan mewakili semua paritas yang diuji (1-7). Sedangkan hewan laktasi pertama menunjukkan jaringan parenkim yang dihitung secara keseluruhan lebih sedikit bila dibandingkan dengan paritas lain, sekitar 10% dari hewan kelompok laktasi pertama mampu mentransfer massa tinggi, dengan satu mengangkut 2.029 g ke dalam kolostrum pertama. Varians konsentrasi IgG₁ dapat dikaitkan dengan inklusi air, sedangkan transfer massa memberikan indikasi yang jelas tentang IgG hewan

kapasitas transfer. Mekanisme spesifik IgG susu sapi pemindahan tidak jelas, tetapi massa jaringan sekretori tidak menjelaskan variasi yang diamati. Kami berhipotesis bahwa variasi hewan dikaitkan dengan regulasi endokrin atau variasi genetik transporter.

Kata kunci: laktasi, mamaria, kolostrogenesis, kolostrum

PENGANTAR

Keberhasilan perusahaan susu komersial bergantung pada pasokan anak sapi pengganti yang dapat diandalkan dengan potensi yang baik untuk produksi susu. Meskipun praktik manajemen anak sapi telah berevolusi selama bertahun-tahun untuk mengurangi morbiditas dan mortalitas anak sapi, tingkat penyakit anak sapi neonatal saat ini tetap pada 9% dari sapi jantan prewean (USDA, 2002). Diare betis (gerusan) dan penyakit pencernaan lainnya menyumbang > 62% dari semua kematian sapi jantan prewean.

Pemindahan imunitas pasif ibu pada neonatus bervariasi di antara spesies, khususnya dengan anti-badan IgG (Butler, 1974). Pada sapi, transfer IgG₁ ke neonatus dilakukan hanya dengan menelan kolostrum karena transfer dalam rahim tidak terjadi. Transportasi mammae dari Ig ke dalam kolostrum sangat spesifik, pemekatan IgG₁ tetapi tidak IgG₂ (Larson et al., 1980). Immunoglobulin G₁ diduga diangkut melintasi sel epitel mammae oleh reseptor Fc neonatus (bFcRn) dengan proses yang disebut transcytosis (Ghetie dan Ward, 2000) dan di saluran usus betis dengan transfer pasif (Weaver et al., 2000).

Konsentrasi IgG₁ dan IgG₂ dalam serum (kira-kira sama dengan ~ 10-12 mg / mL), kolostrum, dan susu menunjukkan transfer IgG yang sangat selektif. Akuntansi untuk peningkatan 10 kali lipat dalam konsentrasi kolostrum diikuti oleh penurunan serupa pada susu matang, keduanya relatif terhadap konsentrasi serum (Sordillo et al., 1987). Penting untuk dicatat bahwa efek konsentrasi ini tidak terjadi dengan IgG₂. Studi telah menunjukkan variasi besar dalam konsentrasi IgG₁ di co-Lostrum diperah pertama. Sebuah penelitian terbaru oleh Kehoe et al. (2007) menunjukkan kisaran 10 hingga 79 mg / mL, dengan rata-rata 39,5 mg / mL dalam kolostrum pertama yang dikumpulkan dari 58 peternakan sapi perah Pennsylvania. Bagian dari variasi ini telah dikaitkan dengan waktu pemerahan kolostrum,

karena sejumlah besar komponen susu muncul secara massal dengan ASI yang tertunda setelah proses nifas. Molekul osmotik seperti laktosa mulai memasukkan lebih banyak air yang memiliki efek pengenceran pada IgG₁ konsentrasi. Dengan demikian, pemasukan air tersebut menginduksi variasi potensial pada setiap sampel kolostrum hewan tetapi tidak diharapkan mempengaruhi massa total kolostrum IgG₁. Literatur tidak memberikan informasi mengenai kemungkinan reabsorpsi IgG₁ ke dalam sel mamaria begitu telah disekresikan.

Dengan demikian, total massa IgG₁ dipindahkan oleh kelenjar susu akan independen dari masuknya air dan lebih berguna dalam membangun variasi hewan dalam kapasitas transportasi dan mungkin mekanisme transportasi yang ada selama colostrogenesis sapi perah. Kami berhipotesis bahwa transfer massa diferensial dapat dikaitkan dengan 1) jumlah kapasitas transcytosis yang ditetapkan per sel susu dan lebih atau kurang sel; 2) ekspresi diferensial dari kapasitas transcytosis per sel; atau 3) perbedaan ekspresi varian transcytosis yang memiliki kapabilitas yang berbeda untuk memindahkan IgG serum₁ untuk sekresi mammae.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menetapkan variasi genetik IgG₁ transfer massa terkait dengan kolostrum yang diperah pertama dan bandingkan temuan ini dengan IgG₁ konsentrasi, perkiraan massa jaringan sekretori mammae, dan informasi lain yang tersedia dalam upaya untuk menjawab hipotesis 1 di atas.

BAHAN DAN METODE

Koleksi Kolostrum

Nomor persetujuan Komite Perawatan dan Penggunaan Institut Kelembagaan Universitas Negeri Pennsylvania 28889 diperoleh untuk pengumpulan sampel kolostrum. Kami meminta 11 peternakan susu komersial di Pennsylvania untuk mengumpulkan semua kolostrum dari pemerah susu pertama dan mencatat bobot kolostrum. Sebuah tabung 50 mL disediakan untuk sampel kolostrum, identifikasi hewan, dan berat kolostrum. Kolostrum dibekukan oleh petugas pertanian sampai tanggal pengambilan sampel yang tidak pernah melebihi 4 minggu. Kolostrum beku dibiarkan mencair pada suhu pendingin dan subsampel volume yang dikumpulkan disentrifugasi pada $3.500 \times g$ selama 15 menit pada suhu kamar. Lemak permukaan dihilangkan dengan aspirasi dan supernat yang tersisa di atas pelet dikumpulkan dan dibekukan pada suhu -20 °C sampai analisis.

Hasil Susu pada 15 d dan

Perhitungan Jaringan Parenchyma

Bobot susu hari tes ($n = 196$) diperoleh dari DHIA. Kawanan terdaftar dalam pengujian susu bulanan dengan hari-tes pertama umumnya terjadi di antara melahirkan

dan 30 hari, sehingga catatan distandarisasi ke titik tengah interval itu. Bobot dianalisis dengan model yang mencakup angka paritas tetap, tanggal uji kawan, dan efek kurva produksi susu acak khusus untuk setiap sapi. Solusi digunakan untuk memperkirakan produksi susu pada d15 laktasi untuk semua sapi. Korelasi antara estimasi d 15 dari hasil dan hasil hari tes terdekat adalah 0,98. Untuk kambing menyusui, telah ditentukan bahwa sekitar 1,0 g jaringan parenkim diperlukan untuk menghasilkan 1,9 mL susu / hari (Linzell, 1966). Estimasi ini didukung oleh penelitian yang lebih baru dengan sapi perah (Dewhurst et al., 1993; Knight dan Dewhurst, 1994; Magaña-Seville dan Sandoval-Castro, 2003). Jaringan Pa-rencyma adalah ukuran sel sekretori dalam kelenjar susu yang menyediakan volume susu.

Analisis IgG₁

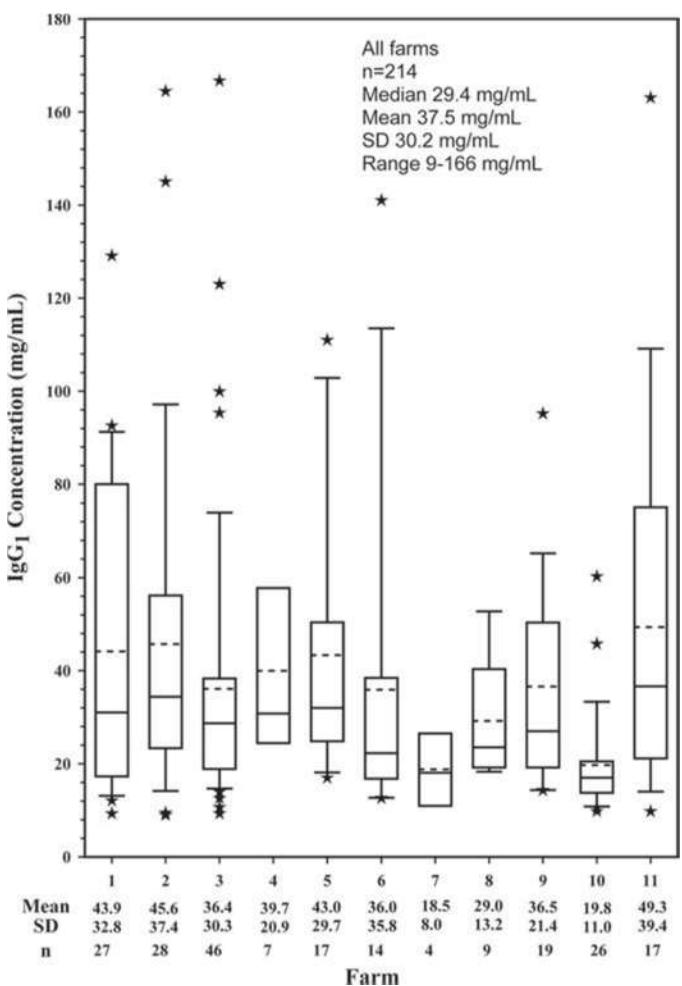
Sampel dianalisis dengan ELISA spesifik untuk IgG sapi₁ (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX; katalog no. E10-116). Antibodi penangkap dibuat pada pengenceran 1: 100 dalam volume total 100 μ L untuk setiap sumur. Sampel yang tidak dikenal adalah serial diencerkan dan awalnya 2 duplikat masing-masing dari 2 pengenceran (5×10^{-5} dan 5×10^{-6}) diuji untuk sensitivitas rentang dan korelasi. Setelah pendirian, kami menemukan bahwa 5×10^{-5} Faktor pengenceran paling baik untuk sebagian besar sampel, meskipun beberapa sampel memiliki IgG sangat rendah atau sangat tinggi konsentrasi diperlukan pengulangan pada dilusi yang berbeda. Pelat mikrotiter Microtek (Hsinchu, Taiwan) membaca horseradish peroxidase (Bethyl Laboratories Inc.) pengurangan tetramethyl benzidine (TMB, Rockland Immunochemicals Inc., Gilbertsville, PA) pada 450 nm setelah inkubasi akhir selama 10 menit pada suhu kamar. Koefisien variasi intra dan intraassay masing-masing adalah 9,26 dan 3,73%.

Analisis pH Sampel Kolostrum

Setelah subampling dan sentrifugasi, sampel kolostrum yang didinginkan yang tersisa (~ 50 mL) dengan cepat dipanaskan hingga 37 °C dalam bak air dan segera diuji pH dengan kombinasi elektroda flow-on-demand isi ulang Phresh (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA). Elektroda ini menyediakan sarana untuk menyiram sampel yang sangat kental atau kotor seperti kolostrum dari persimpangan setelah setiap tindakan untuk mencegah penyumbatan. Langkah-langkah pelapisan dilakukan dengan sering (setelah setiap 5 sampel) restandardisasi elektroda untuk memastikan akurasi.

Penentuan Kolostrum Laktosa

Sampel dipilih untuk mewakili pH rata-rata ($n = 10$) dan pH rendah ($n = 5$) untuk mengukur kadar laktosa



Gambar 1. Immunoglobulin G₁ konsentrasi dalam co-lostrum pertama yang diperah. Data berupa kotak petak dari 11 peternakan susu Pennsylvania dan mewakili 214 sampel kolostrum. Analisis dilakukan oleh ELISA. Data adalah median (—), berarti (...), dan batang kumis (kesalahan) yang mewakili persentil ke-10 dan ke-90, dengan konsentrasi sapi individual diplot (bentuk bintang) ketika jatuh di bawah ke-10 dan di atas persentil ke-90. Sumbu x menunjukkan rata-rata tambak, standar deviasi, dan jumlah hewan.

kolostrum. Laktosa dianalisis menggunakan Lactose Assay Kit (K624-100, BioVision, Mountain View, CA). Sampel diuji dalam rangkap dua setelah percobaan untuk menentukan pengenceran yang tepat dari sampel kolostrum yang disentrifugasi. Data dinyatakan sebagai miligram laktosa per mililiter sampel yang disentrifugasi.

Statistik

Data diplot dengan Sigma Plot (Systat Software Inc., Chicago, IL) dan regresi linier dihitung dengan cara kuadrat terkecil dan koefisien determinasi-bangsa (R^2) telah ditentukan (Systat Software Inc.). Im-munoglobulin G₁hubungan ditentukan menggunakan PROC CORR di SAS (SAS Institute, Cary, NC). Kapan korelasi telah P -nilai $<0,1$, variabel dideterminasi oleh PROC GLM di SAS.

HASIL

Gambar 1 menunjukkan IgG keseluruhan konsentrasi median, rata-rata, dan standar deviasi dari 214 sampel yang terkoleksi. Angka tersebut juga menunjukkan tambak, jumlah sampel, tambak IgG₁ berarti, dan standar deviasi dan plot variasi. Rata-rata keseluruhan dan rata-rata untuk semua peternakan dan hewan masing-masing adalah 29,4 dan 37,5 mg / mL, dengan kisaran 9 hingga 166 mg / mL. Empat belas hewan memiliki konsentrasi di atas persentil ke-90, sedangkan 13 memiliki konsentrasi di bawah ubin 10 persen. Konsentrasi median yang lebih rendah dari rata-rata menunjukkan bahwa sebagian besar peternakan memiliki IgG yang tinggi transfer hewan yang menambah rata-rata.

Gambar 2 menunjukkan IgG keseluruhan median massa, rata-rata, dan standar deviasi dari 214 sampel yang dikumpulkan. Angka tersebut juga menunjukkan tambak, jumlah sampel, tambak IgG₁ massa, dan standar deviasi dan plot variasi (persentil ke-10 dan ke-90; bar kesalahan) dari IgG₁massa dari sampel pertanian individu. Median keseluruhan dan rata-rata untuk semua IgG peternakan dan hewan massa masing-masing 209,1 dan 291,6 g, dengan kisaran 14 hingga 2.223 g. Empat belas hewan memiliki massa di atas persentil ke-90 dan 14 memiliki massa di bawah persentil ke-10. Nilai massa median yang lebih rendah untuk setiap tambak lagi menunjukkan bahwa sebagian besar tambak memiliki hewan yang mentransfer jumlah IgG yang tinggi massa dan berfungsi untuk meningkatkan rata-rata.

Gambar 3 membandingkan kedua IgG₁ konsentrasi dan massa ke volume kolostrum. Gambar 3A menunjukkan bahwa tidak ada korelasi IgG yang signifikan konsentrasi dengan volume colos-trum ($P = 0,65$), sedangkan Gambar 3B menunjukkan hubungan massa versus volume ($R^2 = 0,234$; $P < 0,0001$).

Gambar 4 menunjukkan IgG kolostrum total Massa berhubungan dengan konsentrasi kolostrum ($R^2 = 0,58$; $P < 0,0001$). Panah pada sumbu y menunjukkan rata-rata 291 g dan di mana ditambah 1 standar deviasi akan terjadi (606 g), di atas itu kami dianggap sebagai IgG tinggi transfer massal. Hewan pemindahan massal tinggi ($n = 14$) mewakili 6,5% hewan yang diuji. Semua peternakan kecuali 2 memiliki setidaknya 1 hewan transfer massal tinggi. Peternakan 7 dan 8 kemungkinan tidak menunjukkan jenis hewan ini karena hanya sedikit hewan yang diambil sampelnya (masing-masing $n = 4$ dan 9).

Gambar 5 tidak menunjukkan hubungan ($R^2 = 0,01$; $P = 0,62$) dari total massa kolostrum IgG ketika diplot terhadap massa jaringan parenkim yang dihitung untuk 196 hewan. Massa jaringan parenchyma dihitung dari catatan produksi DHIA seperti yang dijelaskan dalam Bahan dan Meth-ods.

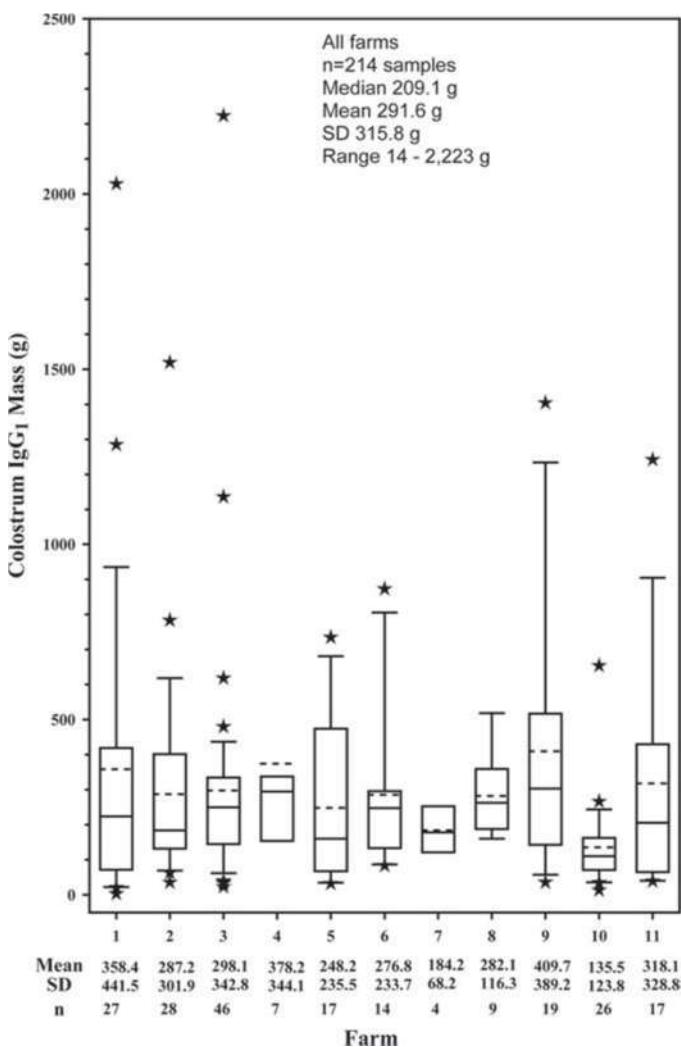
Gambar 6 menunjukkan bahwa di antara sapi laktasi pertama, yang umumnya jaringan parenkim yang lebih sedikit dihitung

daripada hewan paritas tinggi, ada 4 hewan yang kami anggap sebagai hewan transfer massa tinggi. Semua paritas yang diuji (1-7) memiliki beberapa hewan yang termasuk dalam kategori kapasitas transfer tinggi.

Gambar 7 menunjukkan tidak ada hubungan pH kolostrum bila dibandingkan dengan IgG kolostrum total₁ massa ($P= 0,92$). Yang mengejutkan, pH rata-rata kolostrum yang diukur pada 37 °C adalah $6,03 \pm 0,33$, dengan kisaran 4,85 hingga 6,85. PH rendah telah dikaitkan dengan fermentasi laktosa dan asam lemak (Polzin et al., 1977). Karena kami bergantung pada pertanian yang berpartisipasi untuk dengan cepat membekukan sampel colostrum setelah pengumpulan, kami ingin menguji laktosa dalam subset sampel kolostrum rata-rata dan pH rendah. Jika sampel kolostrum tetap pada suhu yang lebih hangat untuk periode waktu yang lama, fermentasi akan mengurangi kandungan laktosa. Konsentrasi laktosa dalam 15 sampel kolostrum yang dianalisis rata-rata $1,2 \pm 0,5$ mg / mL. 10 (pH $6,16 \pm 0,09$) sampel yang mewakili pH rata-rata memiliki konsentrasi laktosa $1,0 \pm 0,457$ mg / mL, sedangkan 5 (pH $5,22 \pm 0,133$) sampel yang mewakili pH rendah memiliki konsentrasi laktosa $1,578 \pm 0,448$ mg / mL

DISKUSI

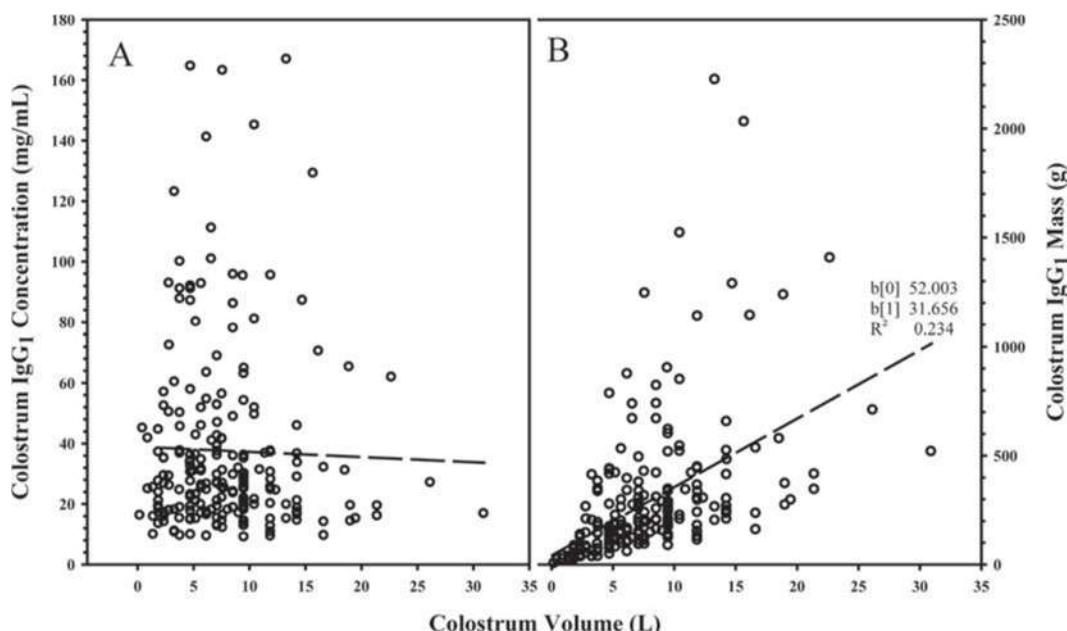
Kelas Ig pada ruminansia umumnya sama dengan spesies mamalia lainnya. Konsentrasi mereka dalam serum, kolostrum, dan susu telah didokumentasikan untuk menunjukkan transfer IgG yang sangat selektif₁, akuntansi untuk peningkatan 10 kali lipat dalam kolostrum diikuti oleh penurunan setara dalam susu matang relatif terhadap konsentrasi serum (Sordillo et al., 1987). Penting untuk dicatat bahwa efek konsentrasi ini tidak terjadi dengan IgG₂(Butler, 1974; Sasaki et al., 1976; Larson et al., 1980). Sedangkan konsentrasi menunjukkan transportasi spesifik IgG₁, itu tidak memberikan informasi mengenai kapasitas transfer massa dari proses. Konsep yang terakhir ini penting karena pada saat persalinan kolostrum (pemerahan pertama) setelah proses nifas, kelenjar susu sudah dalam transisi menuju produksi susu matang. Proses ini tampaknya mengakhiri IgG selektif₁ transfer ke kolostrum dan induksi jumlah berlebihan komponen susu dan telah digambarkan sebagai transisi antara laktogenesis I (perbedaan sekresi: pembentukan kolostrum) dan laktogenesis II (aktivasi sekretorik: permulaan sekresi susu yang berlebihan; Nguyen dan Neville, 1998). Di antara komponen susu matang, laktosa (gula susu) adalah osmole utama, tetapi ion-ion kecil juga tampak berkontribusi (Ontsouka et al., 2003). Dengan demikian, sekitar waktu nifas dan sesudahnya, susu laktosa dengan cepat ditambahkan ke sekresi sementara persimpangan ketat terbentuk untuk mempertahankan laktosa (Nguyen dan Neville, 1998), yang menghasilkan pemasukan lebih banyak air. Air meningkatkan volume kolostrum dan menurun



Gambar 2. Immunoglobulin G₁ massa dalam kolostrum diperah pertama. Data adalah plot kotak dari 11 peternakan susu Pennsylvania dan mewakili 214 sampel kolostrum. Analisis dilakukan oleh ELISA. Data adalah median (—), berarti (...), dan batang kumis (kesalahan) yang mewakili persentil ke-10 dan ke-90, dengan konsentrasi individu sapi diplot (bentuk bintang) ketika jatuh di bawah ke-10 dan di atas persentil ke-90. Sumbu x menunjukkan rata-rata tambak, standar deviasi, dan jumlah hewan. Massa dihitung dari volume kolostrum pertama dan IgG₁ konsentrasi ditunjukkan pada Gambar 1.

konsentrasi komponen kolostrum. Dengan demikian, variasi aktivasi sekretori pada masing-masing hewan dan waktu penghapusan kolostrum (di peternakan) setelah pemberian kontribusi berkontribusi terhadap variasi konsentrasi kolostrum tetapi tidak boleh mempengaruhi massa kolostrum IgG₁. Kami menunjukkan bahwa total massa IgG₁ dipindahkan oleh kelenjar susu sapi membentuk IgG hewan₁ kapasitas transfer selama kolostrogenesis.

Menariknya, Gambar 3 tidak menunjukkan hubungan yang signifikan ketika kami merencanakan IgG₁ konsentrasi terhadap volume co-lostrum, namun hubungan diamati ketika IgG₁ massa diplot terhadap volume. Ini jelas merupakan refleksi dari efek pengenceran air yang terjadi dengan



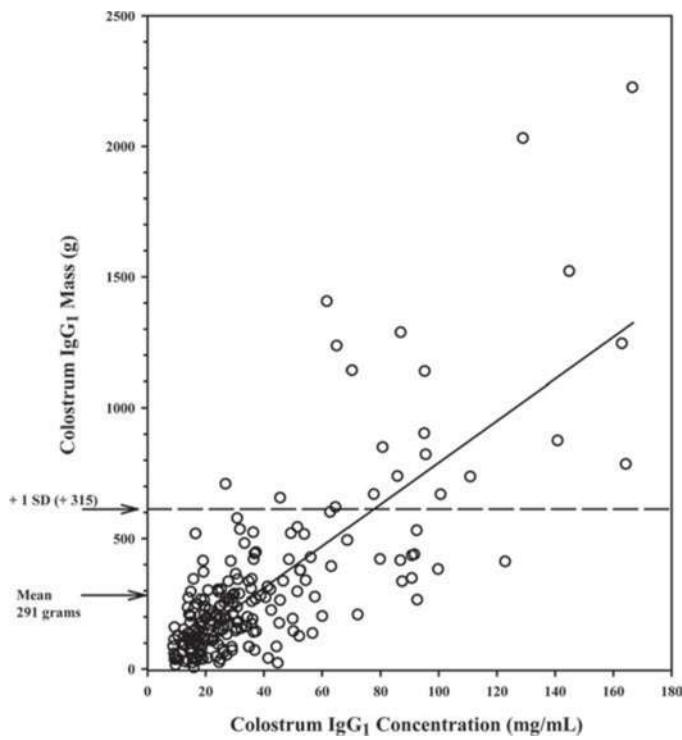
Gambar 3. Hubungan imunoglobulin G₁ A) konsentrasi dan B) massa ke volume kolostrum. Garis pada gambar menunjukkan hubungan linier kapal ($R^2 = 0,234$; $P < 0,0001$).

perhitungan konsentrasi; total massa tidak dipengaruhi oleh parameter ini. Namun demikian, volume hanya menjelaskan sebagian dari transfer massal. Merencanakan IgG₁ massa melawan IgG₁ konsentrasi jelas menunjukkan hubungan yang kuat ($R^2 = 0,58$), menunjukkan bahwa hewan yang dapat lebih berkonsentrasi IgG₁ di kolostrum mereka kemungkinan akan memiliki massa yang lebih besar.

IgG rata-rata konsentrasi dalam penelitian kami dari 214 sampel kolostrum adalah $37,5 \pm 30,2$ mg / mL. Temuan ini umumnya sesuai dengan laporan lain berkisar antara $48,2 \pm 28,9$ mg / mL (Pritchett et al., 1991) hingga laporan terbaru $39,5 \pm 12,2$ mg / mL (Kehoe et al., 2007). Temuan kami menunjukkan varians luas dengan hampir semua peternakan memiliki beberapa sapi dengan IgG sangat rendah dan tinggi konsentrasi kolostrum. Meskipun jelas bahwa sel mamaria fase kolostrum memiliki persimpangan ketat (Nguyen dan Neville, 1998; Stelwagen et al., 1998), selektivitas untuk IgG₁, massa tinggi, dan konsentrasi tinggi yang diperoleh oleh beberapa hewan tidak dapat dijelaskan dengan kebocoran. Kebocoran persimpangan yang rapat tidak akan memungkinkan konsentrasi di atas darah dan tidak akan mengecualikan IgG₂ dari kolostrum. Penelitian menunjukkan bahwa nutrisi tidak mempengaruhi konten IgG kolostrum (Halliday et al., 1978), sehingga kapasitas untuk mentransfer IgG tinggi konsentrasi ke dalam kolostrum harus bergantung pada mekanisme di kelenjar susu.

Tujuan utama dari penelitian ini adalah untuk menentukan total transfer massa IgG₁ pada sapi perah. Analisis kami mengungkapkan IgG rata-rata massa $291,6 \pm 315,8$ g untuk 214 sampel kolostrum yang dikumpulkan dari peternakan sapi perah Pennsylvania.

Varians konsentrasi yang dilaporkan untuk IgG kolostrum (Pritchett et al., 1991; Kehoe et al., 2007) kemungkinan disebabkan, sebagian, dengan masuknya air yang menghasilkan nilai yang lebih rendah. Massa jaringan parenkim sekretori susu berhubungan dengan kapasitas untuk menghasilkan volume susu selama menyusui. Secara umum, jumlah jaringan dicerminkan oleh jumlah DNA (sel) di kelenjar susu selama laktasi (Miller et al., 2006). Selama fase kolostrum prepartum, lebih sedikit sel mammae diharapkan muncul jika dibandingkan dengan sel sekretori yang hadir selama laktasi puncak (Capuco et al., 2003; Annen et al., 2007). Kami mengekstrapolasikan catatan produksi susu DHIA yang tersedia untuk memperoleh produksi susu pada hari ke 15 untuk menempatkan setiap hewan pada tahap menyusui yang sama. Meskipun jelas bahwa jaringan parenkim d 15 akan lebih besar daripada yang diamati setiap saat selama fase kolostrum, kami berasumsi bahwa periode awal laktasi ini akan mewakili massa yang hadir selama kolostrogenesis. Menggunakan kalkulasi jaringan parenkim d 15, kami menunjukkan bahwa tidak ada hubungan ($R^2 = 0,01$; $P = 0,608$) antara IgG₁ massa dan massa jaringan 15 parenkim. Data ini menunjukkan bahwa lebih banyak massa jaringan sekretori mammae (sel sekretori), walaupun menyediakan lebih banyak susu selama menyusui, tidak sama dengan transcytosis lebih banyak IgG₁ ke dalam kolostrum. Hal ini dapat dijelaskan oleh fakta bahwa sekresi susu meliputi banyak mekanisme untuk komponen dan jalur sekresi sedangkan transcytosis IgG₁ selama kolostrogenesis jelas lebih fokus (jalur kurang) dan mungkin lebih fleksibel untuk regulasi.



Gambar 4. Immunoglobulin G₁ hubungan massa dengan IgG₁ konsentrasi dalam kolostrum. Garis putus-putus menunjukkan di mana +1 SD terjadi; garis solid adalah hubungan linier ($R^2 = 0,58$; $P < 0,0001$).

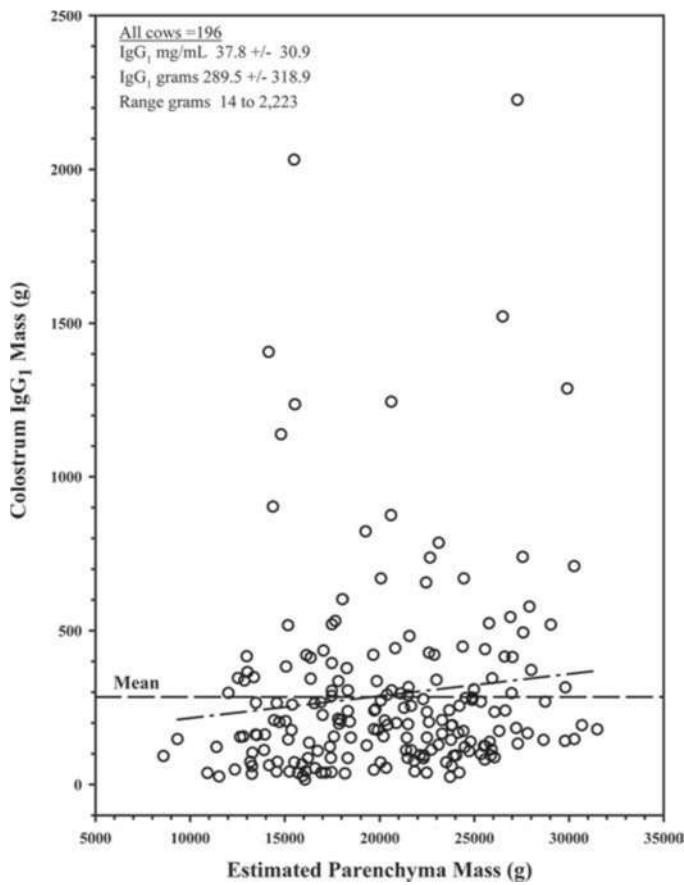
Nilai pH kolostrum 6,2 dan 6,32 telah dilaporkan oleh McIntyre et al. (1952), Nonnecke dan Smith (1984), dan Foley dan Otterby (1978). Sedangkan pembekuan kolostrum tidak mengubah komposisi atau pH (Carlson dan Muller, 1977), fermentasi colostrum menurunkan pH. Polzin et al. (1977) mengaitkan penurunan ini dengan produksi VFA dan bukan karena perubahan asam laktat. Kami meminta 11 petani yang berpartisipasi untuk segera membekukan sampel kolostrum untuk pengambilan selanjutnya; namun, kami tidak memiliki kendali atas waktu proses ini. Semua sampel diperoleh beku dari peternakan. Analisis kami terhadap kandungan laktosa dari pH rata-rata terpilih dan sampel kolostrum pH rendah tidak menunjukkan bahwa sampel kolostrum pH rendah telah mengalami fermentasi.

Kegagalan pemindahan IgG pasif sangat terkait dengan peningkatan kematian anak sapi yang disebabkan oleh penyakit menular (McGuire et al., 1976). Industri ini telah menetapkan pedoman pemberian kolostrum berkualitas tinggi ($> 50 \text{ mg / mL IgG}$) dalam beberapa jam pertama kelahiran dalam upaya untuk mencapai konsentrasi IgG serum anak sapi $\geq 13,4 \text{ mg / mL}$ (Tyler et al., 1996, 1999). Ada 2 alasan khusus untuk konsentrasi dan waktu ini. Pertama, ada masalah konsentrasi kolostrum yang sebagian disebabkan oleh keterlambatan memerah susu. Namun, kami menunjukkan masalah massa yang tidak mungkin dipengaruhi oleh inklusi air, menunjukkan IgG₁masalah transcytosis. Kolostrum sapi menunjukkan

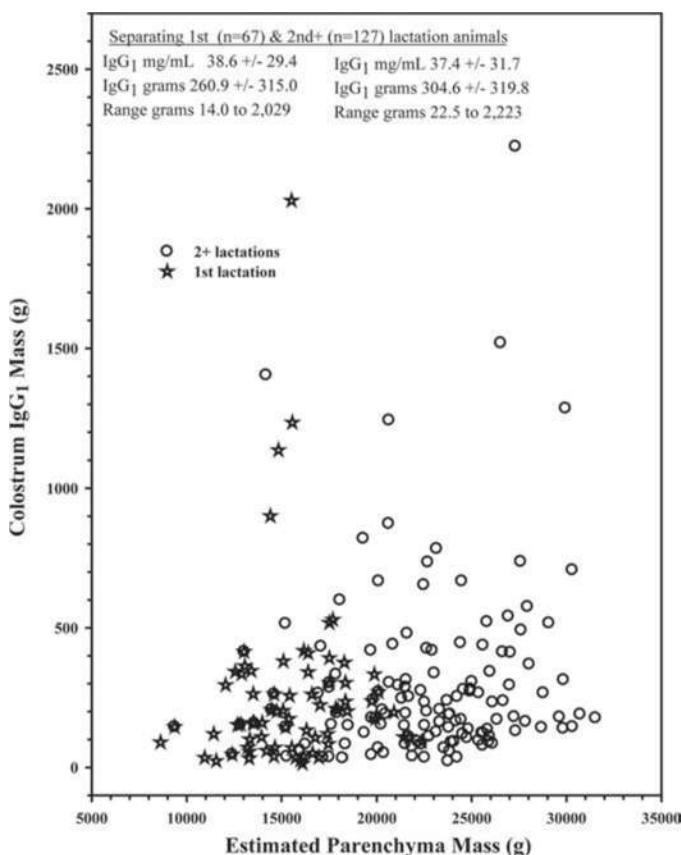
variasi hewan-ke-hewan yang sangat tinggi di IgG₁massa (14–2.223 g). Penyebab hipotesis dari variasi ini adalah endokrin (Casey dan Plaut, 2007) dan genetik (Doleschall et al., 2005; Mayer et al., 2005).

Studi telah dilakukan *in vivo* dan *in vitro* dalam upaya untuk memahami inisiasi dan terminasi colostrogenesis. Proses telah dilaporkan terdeteksi pada 2 minggu prepartum (Brandon et al., 1971) ketika sirkulasi 17-estradiol meningkat dan progesteron menurun (Convey, 1974; Tucker, 1979, 1981). Induksi buatan laktasi jelas menetapkan 17 β -estradiol dan progesteron sebagai komponen penting dari inisiasi ini (Smith et al., 1971; Smith dan Schanbacher, 1973; Willett et al., 1976; Barrington et al., 2000).

Studi yang dilakukan sekitar waktu nifas telah menunjukkan bahwa baik prolaktin (Barrington et al., 1999) dan glukokortikoid (Brandon et al., 1971; Winger et al., 1995), bagian dari kompleks laktogenik (Tucker, 1979, 1981), tampaknya menghambat proses kolostrogenesis dan



Gambar 5. Immunoglobulin G₁ hubungan massa dengan dihitung massa jaringan parenkim mammae. Garis yang rusak menunjukkan rata-rata massa; garis putus-putus adalah hubungan linier. Massa parenchyma diperkirakan selama d 15 laktasi dari catatan DHIA. (Garis putus-putus: $R^2 = 0,01$; $P = 0,62$).



Gambar 6. Immunoglobulin G₁ massa kolostrum laktasi pertama terkontraksi dalam paritas yang lebih besar ketika diplot terhadap massa jaringan parenkim mammary yang telah dihitung. Bentuk bintang adalah 67 kolostrum dari hewan pada laktasi 1; lingkaran terbuka adalah 127 kolostrum dari hewan dalam laktasi ≥ 2 . Massa parenkim diperkirakan selama 15 laktasi dari catatan DHIA.

menginduksi produksi susu berlebihan. Penting untuk dicatat bahwa IgG yang diusulkan transporter (bFcRn), ketika ditekan di jaringan susu tikus menyusui, telah dilaporkan hanya mendaur ulang IgG₁(Cianga et al., 1999; Lu et al., 2007) dan tidak melakukan transfer epitel dengan tran-scytosis (penampilan dalam susu tikus). Dengan demikian, beberapa keraguan tentang peran bFcRn dalam IgG sapi transcytosis selama pembentukan kolostrum telah disarankan (Cervenak dan Kacskovics, 2009). Namun, karena regulasi endokrin bFcRn dapat mengontrol mekanisme transcytosis / recycling dan pengujian dilakukan selama laktasi (Lu et al., 2007), kapasitas bFcRn untuk melakukan transcytosis tidak cukup diuji dengan transgenik. tikus

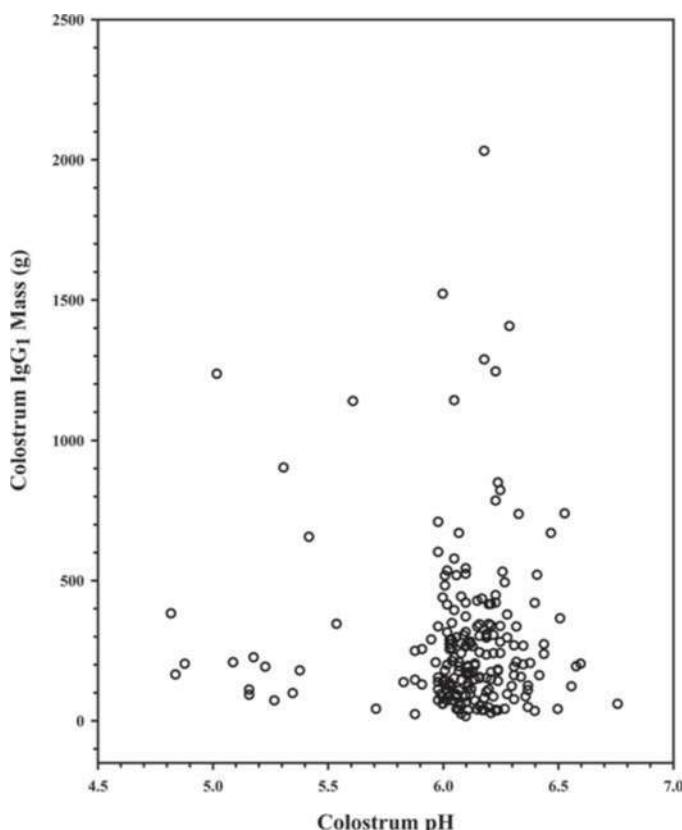
KESIMPULAN

Kami menunjukkan bahwa transfer massa IgG₁ selama colostrogenesis adalah variabel dan merupakan deskripsi IgG yang lebih baik transfer biologis yang tidak dipengaruhi oleh inklusi air. Kurangnya IgG₁ hubungan massa dengan massa

dari jaringan parenkim menunjukkan bahwa transfer massa tidak tergantung pada jumlah jaringan sekretori kelenjar susu. Bahwa semua paritas laktasi, termasuk laktasi pertama, memiliki hewan dengan kapasitas tinggi untuk mentransfer IgG₁. Massa mendukung temuan ini. Bahwa pH kolostrum sapi rendah pada kolostrum pertama diperah sulit untuk berdamai dengan kriteria mekanistik IgG₁ transcytosis oleh reseptor bFcRn. Namun, waktu IgG₁ transfer ke kolostrum belum terbentuk dan massa dapat ditranskosisikan pada awal kolostrogenesis ketika pH kolostrum lebih netral. Namun demikian, apa pun mekanisme transfer yang terjadi, beberapa sapi memiliki kapasitas diferensial yang besar untuk mentransfer IgG₁ massa selama kolostrogenesis yang memiliki efek kesehatan pada sapi bovine.

UCAPAN TERIMA KASIH

Para penulis mengakui kontribusi JM Daubert, Penn State University, dalam pengumpulan sampel kolostrum dari peternakan susu Pennsylvania. Penelitian ini didukung oleh CSREES-2008-34437-19335, USDA, dan Stasiun Percobaan Universitas Negeri Pennsylvania, Penn State University.



Gambar 7. Immunoglobulin G₁ hubungan massa dengan kolostrum pH. Data diukur pH pada suhu 37 ° C untuk masing-masing sampel kolostrum. Berarti adalah $6,03 \pm 0,33$.

REFERENSI

- Annen, EL, AC Fitzgerald, PC Gentry, MA McGuire, A. V. Capuco, LH Baumgard, dan RJ Collier. 2007. Pengaruh pemberian ASI terus menerus dan suplementasi somatotropin sapi pada pergantian sel epitel mammae. *J. Dairy Sci.* 90: 165–183.
- Barrington, GM, TE Besser, CC Gay, WC Davis, JJ Reeves, TB McFadden, dan RM Akers. 1999. Regulasi reseptor imunoglobulin G1: Efek prolaktin terhadap ekspresi *in vivo* dari reseptor imunoglobulin G1 sapi. *J. Endocrinol.* 163: 25–31.
- Barrington, GM, BS McEwen, MT Huyler, dan TE Besser. 2000. Regulasi colostrogeneis pada sapi. *Terkini. Melecut. Sci.* 70: 95–104.
- Brandon, MR, DL Watson, dan AK Lascelles. 1971. Mekanisme transfer imunoglobulin ke dalam sekresi susu sapi. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 49: 613–623.
- Butler, JE 1974. Imunoglobulin dari sekresi susu. Halaman 217–256 dalam Laktasi: Risalah Komprehensif. BL Larson, ed. Pers Akademik, New York, NY.
- Capuco, AV, SE Ellis, SA Hale, E. Long, RA Erdman, X. Zhao, dan MJ Paape. 2003. Persistensi laktasi: Wawasan dari studi proliferasi sel susu. *J. Anim. Sci.* 81 (Suppl. 3): 18–31.
- Carlson, SMA, dan LD Muller. 1977. Evaluasi komposisi dan metabolisme kolostrum diawetkan dengan empat metode selama suhu lingkungan hangat. *J. Dairy Sci.* 60: 566–571.
- Casey, TM, dan K. Plaut. 2007. Peran glukokortikoid dalam aktivasi sekretori dan sekresi susu, perspektif historis. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 12: 293–304.
- Cervenak, J., dan I. Kacskovics. 2009. Reseptor Fc neonatal memainkan peran penting dalam metabolisme IgG pada hewan ternak. Dokter hewan. *Immunol. Immunopathol.* 128: 171–177.
- Ciangi, P., C. Medesan, JA Richardson, V. Ghetie, dan ES Ward. 1999. Identifikasi dan fungsi reseptor Fc neonatal di kelenjar susu tikus menyusui. *Eur. J. Immunol.* 29: 2515–2523.
- Convey, EM 1974. Konsentrasi hormon serum pada ruminansia selama pertumbuhan mammae, laktogenesis, dan laktasi: Tinjauan. *J. Dairy Sci.* 57: 905–917.
- Dewhurst, RJ, M. Mitton, dan CH Knight. 1993. Kalibrasi teknik pengecoran busa poliuretan untuk memperkirakan berat udder sapi. *Anim. Melecut.* 56: 444. (Abstr.)
- Doleschall, M., Y. Zhao, B. Mayer, L. Hammarstrom, dan I. Kacskovics. 2005. Isolasi gen yang mengkode reseptor Fc neonatal sapi. Dokter hewan. *Immunol. Immunopathol.* 108: 145–150.
- Foley, JA, dan DE Otterby. 1978. Ketersediaan, penyimpanan, perawatan, komposisi, dan nilai makan dari surplus kolostrum: Ulasan. *J. Dairy Sci.* 61: 1033–1060.
- Ghetie, V., dan ES Ward. 2000. Berperan ganda untuk histokompatibilitas utama kompleks reseptor terkait kelas I FcRn. *Annu. Pdt. Immunol.* 18: 739–766.
- Halliday, R., AJ Russel, MR Williams, dan JN Peart. 1978. Efek dari asupan energi selama akhir kehamilan dan genotipe pada transfer imunoglobulin ke anak sapi dalam kawanan pengisap. Res. Dokter hewan. *Sci.* 24: 26–31.
- Kehoe, SI, BM Jayarao, dan AJ Heinrichs. 2007. Sebuah survei komposisi kolostrum sapi dan praktik manajemen kolostrum di peternakan sapi perah Pennsylvania. *J. Dairy Sci.* 90: 4108–4116.
- Knight, CH, dan RJ Dewhurst. 1994. Sekali sehari memerah susu sapi perah: Hubungan antara kehilangan hasil dan penyimpanan susu cisternal. *J. Dairy Res.* 61: 441–449.
- Larson, BL, HL Heary Jr., dan JE Devery. 1980. Produksi dan transportasi imunoglobulin oleh kelenjar susu. *J. Dairy Sci.* 63: 665–671.
- Linzell, JL 1966. Pengukuran volume ambing pada kambing hidup sebagai indeks pertumbuhan dan fungsi susu. *J. Dairy Sci.* 49: 307–311.
- Lu, W., Z. Zhao, Y. Zhao, S. Yu, Y. Zhao, B. Fan, I. Kacskovics, L. Hammarstrom, dan N. Li. 2007. Over-ekspresso FcRn sapi pada kelenjar susu menghasilkan peningkatan kadar IgG dalam susu dan serum tikus transgenik. *Imunologi* 122: 401–408.
- Magaña-Seville, H., dan CA Sandoval-Castro. 2003. Catatan Teknis: Kalibrasi teknik pengukuran volume ambing sederhana. *J. Dairy Sci.* 86: 1985–1986.
- Mayer, B., M. Doleschall, B. Bender, J. Bartyik, Z. Bosze, LV Frenyo, dan I. Kacskovics. 2005. Ekspresi dari reseptor Fc neonatal (FcRn) di kelenjar susu sapi. *J. Dairy Res.* 72 (Spec no): 107–112.
- McGuire, TC, NE Pfeiffer, JM Weikel, dan RC Bartsch. 1976. Kegagalan transfer imunoglobulin kolostral pada anak sapi yang sekarat karena penyakit menular. Selai. *Dokter hewan. Med. Assoc.* 169: 713–718.
- McIntyre, RT, DB Parrish, dan FC Fountaine. 1952. Properti kolostrum sapi perah. VII. pH, kapasitas buffer dan tekanan osmotik. *J. Dairy Sci.* 35: 356–362.
- Miller, N., L. Delbecchi, D. Petitetclerc, GF Wagner, BG Talbot, dan P. Lacasse. 2006. Pengaruh tahap laktasi dan paritas pada pembaruan sel kelenjar susu. *J. Dairy Sci.* 89: 4669–4677.
- Nguyen, DA, dan MC Neville. 1998. Pengaturan persimpangan yang ketat di kelenjar susu. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 3: 233–246.
- Nonnecke, BJ, dan KL Smith. 1984. Sifat biokimia dan antibakteri dari sekresi susu sapi selama involusi mammae dan saat nifas. *J. Dairy Sci.* 67: 2863–2872.
- Ontsouka, CE, RM Bruckmaier, dan JW Blum. 2003. Komposisi susu yang difraksinasi selama pengangkutan kolostrum dan susu matang. *J. Dairy Sci.* 86: 2005–2011.
- Polzin, HW, DE Otterby, dan DG Johnson. 1977. Respons anak sapi yang diberi kolostrum fermentasi atau diasamkan. *J. Dairy Sci.* 60: 224–234.
- Pritchett, LC, CC Gay, TE Besser, dan DD Hancock. 1991. Faktor manajemen dan produksi mempengaruhi konsentrasi imunoglobulin G1 dalam kolostrum dari sapi Holstein. *J. Dairy Sci.* 74: 2336–2341.
- Sasaki, M., CL Davis, dan BL Larson. 1976. Produksi dan pergantian imunoglobulin IgG1 dan IgG2 di dalam sapi di sekitar nifas. *J. Dairy Sci.* 59: 2046–2055.
- Smith, KL, LA Muir, LC Ferguson, dan HR Conrad. 1971. Transport selektif IgG1 ke kelenjar susu: Peran estrogen dan progesteron. *J. Dairy Sci.* 54: 1886–1894.
- Smith, KL, dan FL Schanbacher. 1973. Hormon menginduksi laktasi pada sapi. I. Performa laktasi setelah injeksi 17 β -estradiol dan progesteron. *J. Dairy Sci.* 56: 738–743.
- Sordillo, LM, SC Nickerson, RM Akers, dan SP Oliver. 1987. Komposisi sekresi selama involusi susu sapi dan hubungan dengan mastitis. *Int. J. Biochem.* 19: 1165–1172.
- Stelwagen, K., DC van Espen, GA Verkerk, HA McFadden, dan VC Farr. 1998. Kortisol plasma tinggi mengurangi permeabilitas persimpangan ketat susu di epitel susu sapi menyusui. *J. Endocrinol.* 159: 173–178.
- Tucker, HA 1979. Endokrinologi laktasi. *Semin. Perinatol.* 3: 199–223.
- Tucker, HA 1981. Kontrol fisiologis dari pertumbuhan mammae, laktogenesis, dan laktasi. *J. Dairy Sci.* 64: 1403–1421.
- Tyler, JW, DD Hancock, Paroki SM, DE Rea, TE Besser, SG Sanders, dan LK Wilson. 1996. Evaluasi 3 tes untuk kegagalan transfer pasif pada anak sapi. *J. Vet. Magang. Med.* 10: 304–307.
- Tyler, JW, DD Hancock, JG Thorne, CC Gay, dan JM Gay. 1999. Mempartisi risiko kematian terkait dengan transfer imunoglobulin kolostral yang tidak adekuat pada sapi perah. *J. Vet. Magang. Med.* 13: 335–337.
- USDA. 2002. Referensi Praktik Kesehatan dan Manajemen Susu di Amerika Serikat. APHIS, Fort Collins, CO.
- Weaver, DM, JW Tyler, DC VanMetre, DE Hostetler, dan GM Barrington. 2000. Pemindahan imunoglobulin kolostral secara pasif pada anak sapi. *J. Vet. Magang. Med.* 14: 569–577.
- Willett, LB, KL Smith, dan FL Schanbacher. 1976. Hormon menginduksi laktasi pada bovine III. Dinamika hormon yang disuntikkan dan endogen. *J. Dairy Sci.* 59: 504–514.
- Winger, K., CC Gay, dan TE Besser. 1995. Transfer Immunoglobulin G1 ke sekresi susu yang diinduksi: Efek deksametason. *J. Dairy Sci.* 78: 1306–1309.

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%), Escherichia 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 jumlah total bakteri dalam keadaan normal siklus estrus.

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 *Eschericia 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,Omrani 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,d 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-Macías 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, Dhami 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. "Ilmukebidanan pada ternaksapi dan kerbau". Jakarta (Indonesia): Universitas Indonesia Press.

Hipofungsi Ovarium: Sebuah Kasus dalam Terapi Manajemen Sapi

Herry Agoes Hermadi, Mas'ud Hariadi dan dan Suherni Susilowati Laboratorium Infertilitas, Departemen Fakultas Kedokteran Reproduksi, Universitas Airlangga

ABSTRAK

Ada dua sapi FH (Friesian Holstain) di Lani Dairy Farm Surabaya yang menderita hipofungsi ovarium setelah terapi sebagai berikut: Dalam kasus hipofungsi ovarium, masalah manajemen diselesaikan dengan memperbaiki sistem makan untuk meningkatkan skor kondisi tubuh, yang diperkirakan akan meningkat lebih dari dua kali lipat dengan memberikan pakan hijau 10% dari berat badan per hari. Pemulihan alami akan terjadi jika sapi diberikan dengan konsentrasi protein 17% disediakan 2% dari BB per hari selama satu bulan. Gangguan fungsi kelenjar hipofisis anterior dapat menyebabkan, antara lain, hipofungsi ovarium dengan permukaan ovarium yang halus karena tidak ada pertumbuhan folikel dan corpus luteum, walaupun ukurannya normal. Ini karena penurunan FSH dan LH dalam darah sangat rendah, makanan kurang, sanitasi buruk dan hewan-hewan terlalu lama di kandang sapi. Diagnosis dapat ditegakkan dengan palpasi rektum dan ultrasonografi. Untuk menstimulasi estrus dan ovulasi, kami menggunakan kombinasi persiapan gonadotropin dengan CIDR (Pengendalian Obat Internal), PMSG (Pregnum Mare Serum Gonadotropin) Folligon intervet 500 IU secara intramuskuler, PGF2 alpha (Lutalyse). Setelah BCS lebih dari 2. Kesimpulannya hipofungsi ovarium dapat diobati jika kondisi skor tubuh kurang dari 2 dan meningkatkan manajemen makan sesegera mungkin untuk mendapatkan BCS lebih dari 2.

Kata kunci: fungsi hypo ovarium, BCS, PMSG, CIDR dan PGF2 alpha

PENGANTAR

Peningkatan standar hidup, kecerdasan dan kesejahteraan rakyat adalah tujuan pembangunan nasional. Pengembangan dan peningkatan produksi ternak adalah salah satu faktor yang mendukung pencapaian tujuan tersebut. Berbagai kegiatan telah dilakukan untuk meningkatkan produktivitas ternak. Namun, pertumbuhan populasi yang cepat dan meningkatnya daya beli masyarakat menyebabkan permintaan daging dan susu menjadi di luar produksi mereka. Pada dekade 80-an, populasi sapi menurun 1,46% per tahun. Itu karena tingkat penyembelihan, terutama penyembelihan sapi betina produktif dan kematian ternak karena penyakit lebih tinggi daripada tingkat kelahiran. Tingkat kelahiran yang rendah dan penurunan populasi ternak terutama dipengaruhi oleh rendahnya tingkat kesuburan ternak dan kematian perinatal. Tingkat kelahiran dan pertumbuhan populasi adalah masalah reproduksi ternak atau pengembangbiakan ternak (Adjid. 2004). Dalam industri susu di seluruh dunia, gangguan reproduksi merupakan penyebab utama kerugian ekonomi dan tantangan bagi para ilmuwan dan teknisi. Dalam beberapa dekade terakhir, penurunan kesuburan dan peningkatan produksi susu telah banyak dilaporkan pada sapi perah. Dalam artikel ini, hubungan antara produksi susu, gangguan ovarium, dan kesuburan dalam kelompok sapi perah yang berproduksi tinggi dijelaskan secara singkat. Kami melakukan penelitian retrospektif 23204 penurunan kesuburan dan peningkatan produksi susu telah banyak dilaporkan pada sapi

perah. Dalam artikel ini, hubungan antara produksi susu, gangguan ovarium, dan kesuburan dalam kelompok sapi perah yang berproduksi tinggi dijelaskan secara singkat. Kami melakukan penelitian retrospektif 23204 penurunan kesuburan dan peningkatan produksi susu telah banyak dilaporkan pada sapi perah. Dalam artikel ini, hubungan antara produksi susu, gangguan ovarium, dan kesuburan dalam kelompok sapi perah yang berproduksi tinggi dijelaskan secara singkat. Kami melakukan penelitian retrospektif laktasi termasuk dalam program kontrol reproduksi, area geografis yang mengalami kondisi hangat dan dingin. (Yáñiz, et al, 2008).

Sebenarnya, jika kita melihat kasus-kasus gangguan reproduksi dan melaporkan hasil inseminasi di Jawa Timur, ada kasus yang penting untuk diketahui tetapi belum pernah dilaporkan, yaitu kejadian kawin berulang atau "breeding berulang". Hingga saat ini belum ada data pasti mengenai persentase "peternak berulang", walaupun ada banyak keluhan tentang kegagalan peternak inseminasi buatan atau kehamilan baru terjadi setelah beberapa kali inseminasi buatan. Salah satu kesulitan yang dihadapi di lapangan adalah bahwa peternak tidak membawa kartu inseminasi buatan, sehingga ia tidak tahu atau lupa waktu dan frekuensi inseminasi. Kesulitan berikutnya adalah bahwa sapi yang dibawa tidak sering sapi dengan keluhan gangguan reproduksi, atau dengan kata lain, itu tidak tepat sasaran, selain fasilitasnya kurang memadai. Dua tujuan utama dari program inseminasi buatan pada sapi adalah untuk meningkatkan kualitas genetik ternak lokal dan mencegah atau menghilangkan penyakit menular seksual. Jika dibandingkan dengan perkawinan alami, inseminasi buatan jauh lebih efisien dalam menyelamatkan pejantan, dan luasnya dan kecepatan penyebaran breed ternak unggul yang dihasilkan. Selain keuntungan ini, inseminasi buatan juga mengandung risiko yang sangat tinggi jika pemilihan sapi jantan kurang baik dalam proses produksi semen beku, atau penanganan dan distribusi di lapangan tidak dilakukan dengan benar. Potensi kerusakan berlipat ganda karena penyakit menular seksual dan keturunan cacat genetik cepat dan menyebar baik secara nasional maupun internasional (Frost et al, 1981). Inseminasi buatan telah dilakukan di negara kita selama sekitar setengah abad. Namun, hasil dari kemampuan inseminasi buatan pada keturunan superior berlipat ganda diragukan. Peningkatan populasi ternak kita masih sangat lambat dan tidak dapat memenuhi permintaan domestik. Makalah ini membahas beberapa dari banyak jenis masalah reproduksi yang ditemukan di lapangan dan beberapa penyakit menular seksual yang dapat menyebar melalui inseminasi buatan. Selanjutnya, kami akan menguraikan dalam makalah ini beberapa kasus hasil tim Pengendali Gangguan Reproduksi di beberapa kabupaten di Jawa Timur, dan beberapa jenis penyakit pada sapi yang dapat ditularkan melalui inseminasi buatan (Putro, 1991). Peningkatan populasi ternak kita masih sangat lambat dan tidak dapat memenuhi permintaan domestik. Makalah ini membahas beberapa dari banyak jenis masalah reproduksi yang ditemukan di lapangan dan beberapa penyakit menular seksual yang dapat menyebar melalui inseminasi buatan. Selanjutnya, kami akan menguraikan dalam makalah ini beberapa kasus

hasil tim Pengendali Gangguan Reproduksi di beberapa kabupaten di Jawa Timur, dan beberapa jenis penyakit pada sapi yang dapat ditularkan melalui inseminasi buatan (Putro, 1991).

Kasus Gangguan Reproduksi di Jawa Timur

Kerjasama antara Fakultas Peternakan Provinsi Jawa Timur dan Kedokteran Hewan Universitas Airlangga telah dirintis sejak tahun 1970-an, khususnya untuk pencegahan gangguan reproduksi, membentuk tim "Pemberantasan Sterilitas". Hingga saat ini tim telah berganti nama beberapa kali, antara lain, "Tim Kontrol Sterilitas" dan lainnya, dan sekarang lebih dikenal sebagai tim "Manajemen Gangguan Reproduksi". Dalam menangani kasus-kasus di bidang gangguan reproduksi, peran Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga 'masih dianggap kurang, karena perannya hanya terbatas dalam membuat diagnosis, padahal ia tidak ikut serta dalam pengobatan dan memantau hasil perawatan. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dalam perannya di lapangan dari tahun ke tahun, terutama dalam diagnosis gangguan reproduksi, hanya mencapai kurang dari 10% dari target yang diharapkan. Tabel 1 berisi hasil pemeriksaan gangguan reproduksi di Jawa Timur

Tabel 1. Hasil Pemeriksaan Gangguan Reproduksi pada Sapi di Jawa Timur pada tahun 2009 dan 2010

No.	Jenis Kasus	Jumlah kasus		%	
		2009	2010	2009	2010
1.	Hipofungsi ovarium	1220	1131	4.7	6.28
2.	Atrofi ovarium	206	228	0.8	1.3
3.	Kista ovarium	197	350	0,7	1.94
4.	CL yang persisten	926	1032	3.6	5.73
5.	Endometritis	432	492	1.7	2.73
6.	Pyometra	98	77	0,4	0,43
7.	Tumor uterus	12	3	0,05	0,03
8.	Lainnya	116	-	0,45	-
	Total kasus	3207	3310	12.35	22,72
	Jumlah sapi yang diperiksa	26	17		

Dari hasil gangguan reproduksi ini (Tabel 1), kasus hipofungsi ovarium menempati posisi tertinggi diikuti oleh corpus luteum dan kemudian endometritis persisten. Secara teoritis kasus-kasus di atas akan dibahas pada sub bab berikutnya. (Hariadi et al.2010)

BAHAN DAN METODE

Pengobatan Hipofungsi Ovarium

Dua sapi FH (Friesian Holstain) hadir di Lani Farmer Dairy Farm Surabaya yang menderita hipofungsi ovarium setelah terapi sebagai berikut: Dalam kasus hipofungsi ovarium, masalah manajemen diselesaikan dengan memperbaiki sistem pemberian makan untuk meningkatkan skor kondisi tubuh, yang diharapkan akan terjadi. tingkatkan lebih dari dua kali lipat dengan menyediakan pakan. Perbaikan sistem manajemen harus dilakukan untuk mengidentifikasi kesalahan dan pemberian makan ditingkatkan dengan pemberian pakan hijau 10% dari berat badan per hari. Pemulihan alami akan terjadi jika sapi diberikan dengan konsentrasi protein 17% disediakan 2% dari BB per hari selama 1 bulan. Ada dua sapi

FH (Friesian Holstain) di Lani Farmer Dairy Farm Surabaya yang menderita hipofungsi ovarium setelah terapi sebagai berikut: Dalam kasus hipofungsi ovarium, masalah manajemen diselesaikan dengan perbaikan sistem pemberian makan untuk peningkatan skor kondisi tubuh, yang diperkirakan akan meningkat lebih dari dua kali lipat dengan memberikan pakan hijau 10% dari berat badan per hari. Pemulihan alami akan terjadi jika sapi diberikan dengan konsentrat protein 17% disediakan 2% dari BB per hari selama 1 bulan. Gangguan fungsi kelenjar hipofisis anterior dapat menyebabkan, antara lain, hipofungsi ovarium dengan permukaan yang licin karena tidak ada pertumbuhan folikel dan korpus luteum, walaupun ukurannya normal. Itu karena penurunan FSH dan LH dalam darah sangat rendah, makanan kurang, sanitasi buruk dan hewan-hewan terlalu lama di kandang. (Hariadi et al.2011; Morrow, 1980; Eaglesome, dan Garcia, 1997) yang diperkirakan akan meningkat lebih dari dua kali lipat dengan memberikan pakan hijau 10% dari berat badan per hari. Pemulihan alami akan terjadi jika sapi diberikan dengan konsentrat protein 17% disediakan 2% dari BB per hari selama 1 bulan. Gangguan fungsi kelenjar hipofisis anterior dapat menyebabkan, antara lain, hipofungsi ovarium dengan permukaan yang licin karena tidak ada pertumbuhan folikel dan korpus luteum, walaupun ukurannya normal. Itu karena penurunan FSH dan LH dalam darah sangat rendah, makanan kurang, sanitasi buruk dan hewan-hewan terlalu lama di kandang. (Hariadi et al.2011; Morrow, 1980; Eaglesome, dan Garcia, 1997) yang diperkirakan akan meningkat lebih dari dua kali lipat dengan memberikan pakan hijau 10% dari berat badan per hari. Pemulihan alami akan terjadi jika sapi diberikan dengan konsentrat protein 17% disediakan 2% dari BB per hari selama 1 bulan. Gangguan fungsi kelenjar hipofisis anterior dapat menyebabkan, antara lain, hipofungsi ovarium dengan permukaan yang licin karena tidak ada pertumbuhan folikel dan korpus luteum, walaupun ukurannya normal. Itu karena penurunan FSH dan LH dalam darah sangat rendah, makanan kurang, sanitasi buruk dan hewan-hewan terlalu lama di kandang. (Hariadi et al.2011; Morrow, 1980; Eaglesome, dan Garcia, 1997) hipofungsi ovarium dengan permukaan yang licin karena tidak ada pertumbuhan folikel dan corpus luteum, walaupun ukurannya normal. Itu karena penurunan FSH dan LH dalam darah sangat rendah, makanan kurang, sanitasi buruk dan hewan-hewan terlalu lama di kandang. (Hariadi et al.2011; Morrow, 1980; Eaglesome, dan Garcia, 1997) hipofungsi ovarium dengan permukaan yang licin karena tidak ada pertumbuhan folikel dan corpus luteum, walaupun ukurannya normal. Itu karena penurunan FSH dan LH dalam darah sangat rendah, makanan kurang, sanitasi buruk dan hewan-hewan terlalu lama di kandang. (Hariadi et al.2011; Morrow, 1980; Eaglesome, dan Garcia, 1997)

Diagnosis dapat dibuat dengan palpasi rektal dan ultrasonografi. Fungsi yang tidak normal dari kelenjar hipofisis anterior dapat menyebabkan, antara lain, hipofungsi ovarium. Permukaan ovarium licin karena tidak ada pertumbuhan folikel dan corpus luteum pada keadaan ovarium normal ini. Itu karena penurunan FSH dan LH dalam darah, sanitasi yang buruk dan hewan-hewan terlalu lama di kandang dengan pemberian makanan dengan kualitas dan kuantitas yang buruk. Gejala klinis yang tampak adalah anestrus. Jika kondisi tubuh buruk dan kekurangan makan berlangsung lama, hipofungsi ovarium akan berubah menjadi atrofi ovarium. Atrofi ovarium adalah ovarium yang lebih kecil dari normal dan dengan permukaan yang licin karena folikel tidak tumbuh sehingga proses reproduksi tidak berjalan sama sekali. Kondisi tubuh ternak buruk dengan gejala klinis anestrus yang sangat panjang. Aplikasi praktis USG dalam reproduksi sapi termasuk pencitraan ovarium sebagai bantuan diagnostik,

pemeriksaan dan konfirmasi kista ovarium, deteksi kehamilan dini, dan identifikasi infertilitas. Meskipun palpasi rektal adalah metode yang mapan untuk melakukan pemeriksaan reproduksi, kemampuan pengumpulan informasi ultrasonografi jauh melebihi kemampuan palpasi rektum. Penilaian status kehamilan dan viabilitas janin pasca persalinan secara signifikan dapat meningkatkan efisiensi reproduksi. Metode tersebut dapat memainkan peran kunci dalam manajemen reproduksi untuk mengembalikan hewan terbuka dengan cepat ke program pemuliaan. Deteksi kehamilan dini hanya berguna ketika teknik memiliki tingkat akurasi yang tinggi untuk mendeteksi infertilitas. (Alemayehu. 2013). Gejala hipofungsi ovarium adalah anestrus. Folikel bawah tidak berkembang menjadi folikel dominan, BCS <2, setelah direproduksi atau memiliki keturunan. Penyebab hipofungsi ovarium adalah faktor manajemen yang gagal, seperti kelebihan populasi, faktor lingkungan, dan kandang terlalu panas dan padat. Diagnosis banding hipofungsi ovarium adalah hipoplasia ovarium di mana hewan tersebut mengalami obesitas, tidak subur sejak betis, dan vulva kecil dan genitalia karena faktor genetik. Jika HP tidak diobati, ovarium akan menyusut, yang ditetapkan sebagai atrofi (Toelihere, 1981).

HASIL

Diagnosis dapat dibuat dengan palpasi dubur dan ultrasonografi. Untuk mempercepat estrus dan ovulasi, persiapan LH dan FSH dikombinasikan dengan PMSG Folligon intrevet500 IUnit persiapan IM dan CIDR progesteron. Atrofi ovarium dapat dibedakan dari hipoplasia ovarium yang disebabkan oleh faktor genetik. Dalam keadaan hipoplasia, ovarium mirip dengan keadaan atrofi ovarium, yang sangat kecil, tetapi keadaan fisik tubuh jauh lebih gemuk. Pengobatan fungsi hypo ovarium dapat dilakukan dengan meningkatkan kualitas pakan, kandang harus sering dibersihkan dan ternak harus sering digembalakan. Ketika kondisi telah membaik, persiapan PMSG dapat diberikan secara intramuskuler (Darrel dan Kesler 2002, Opsomer et al. 2000). Kami menggunakan ultrasonografi dengan tipikal sonovet dengan probe linear yang harus dimasukkan ke dalam palpasi dubur untuk mengetahui permukaan ovarium dan kondisi folikel. Tidak ada pertumbuhan folikel bawah yang akan menjadi folikel dominan karena kekurangan FSH dan LH. Struktur folikel bawah termasuk pengukuran sekitar kurang dari 5 ml, warna larutan folikel adalah hitam atau hipoekogenik. Setelah terapi manajemen 30 hari kami menyuntikkan PMSG Folligon 500 IU dengan intramuskuler 2 hari sesudahnya. Tekstur gema adalah terminologi yang digunakan dalam USG untuk menggambarkan struktur jaringan relatif terhadap jaringan sekitarnya. Setelah injeksi Folligon (PMSG), angkanya berubah. Folikel menjadi dominan dengan diameter sekitar 14 mm, yang akan diovulasi dengan hypoechogenic. Tanda estrus akan muncul segera setelah ovulasi terjadi dan kami langsung melakukan inseminasi, dan akhirnya kami menemukan bahwa sapi-sapi itu berhasil hamil. Kemudian, 30 hari kemudian kami mengidentifikasi janin dengan vertebra, yang hiperekogenik, panas dalam isoekogenik, dan amnion air dengan warna hitam dalam hipoekogenik.

DISKUSI

Hipofungsi dan Atrofi Ovarium

Gangguan fungsi kelenjar hipofisis anterior dapat menyebabkan, antara lain, hipofungsi ovarium. Permukaan ovarium halus karena tidak ada pertumbuhan folikel dan corpus luteum pada keadaan ovarium normal ini. Ini disebabkan oleh penurunan FSH dan LH dalam darah. Hewan terlalu lama berada di kandang dengan pemberian makanan dengan kualitas dan kuantitas yang buruk (Radostits 0 M dan Blood DC, 1985). Gejala klinis yang terlihat adalah anestrus. Jika kondisi tubuh buruk dan kekurangan makan dalam waktu lama, hipofungsi ovarium akan berubah menjadi atrofi ovarium. Ovarium atrofi adalah ovarium yang lebih kecil dari normal dan dengan permukaan yang licin karena folikel tidak tumbuh sehingga proses reproduksi tidak berjalan sama sekali. Kondisi tubuh ternak tipis dengan gejala klinis anestrus yang sangat panjang. Diagnosis dapat dilakukan dengan palpasi dubur dan ultrasonografi. Sistem manajemen perlu ditingkatkan untuk menemukan lokasi kesalahan dan meningkatkan kualitas. Jika BCS telah meningkat lebih dari 2, palpasi rektal harus dilakukan untuk mengamati struktur dan perkembangan ovarium. Kemudian, untuk segera mengembalikan ternak ke dalam siklus dan untuk merangsang timbulnya estrus dan ovulasi, hewan dipasok dengan persiapan prohesteron FSH dan LH (C1DR atau PRID) dapat membantu (McDougall dan Compton, 2005; Pemayun, 2009.) Atrofi ovarium dapat dibedakan dari hipoplasia ovarium yang disebabkan oleh faktor genetik. Keadaan hipoplasia ovarium mirip dengan keadaan atrofi ovarium, di mana indung telur sangat kecil tetapi keadaan fisik tubuh jauh lebih gemuk. Hipoplasia ovarium adalah suatu kondisi di mana satu atau kedua ovarium tidak tumbuh dari lahir hingga dewasa, sehingga ovarium tidak dapat ditemukan. Jika ovarium tidak ada, mereka terlihat seperti penebalan kepala pin yang lunak. Wanita yang menderita gangguan ini sepenuhnya steril. (Valyushkin dan Gukov.1980).

KESIMPULAN

Hipofungsi ovarium dapat diobati jika kondisi skor tubuh kurang dari 2 dan manajemen makan ditingkatkan sesegera mungkin untuk mendapatkan BCS lebih dari 2.

REFERENSI

- Abdul Adjid RM. 2004. Strategi Alternatif Pengendalian penyakit Reproduksi Menular untuk Meningkatkan Efisiensi Reproduksi SapiPotong. Wartazoa 14(3):125-132.
- Alemayehu L. 2013. The Role of Trans-Rectal Ultrasonography in Artificial Insemination Program. Additional information is available at the end of the chapter.<http://dx.doi.org/10.5772/52721>
- Morrow DA, 1980. Current therapy in theriogenology; Diagnosis, treatment and prevention of reproductive disease in animal.W.B.Saunders Company Philadelphia.London-Toronto.
- Darrel J and Kesler,2002. Review of estrous synchronization systems: CIDR inserts Proceedings, The Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle Workshop, September 5-6, 2002, Manhattan, Kansas,
- Eaglesome MD and MM Garcia. 1997. Disease risks to animal health from artificial insemination with bovine semen. Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz. 16(1), 215-225.

Frost A J, Holroyd R G, Ladds, P W, and Williamson P E, 1981. Reproductive Diseases and Their Prevention. Australian Vice Chancellors Committee.

Hariadi.M, Harjopranyoto, Wurlina, Herry Agoes and Budi U, Reproductive Disorders Examination Results in Cows in East Java in 2009 and 2010 .Veterinarian Faculty Airlangga.University

Hariadi.M, Harjopranyoto, Wurlina Herry Agoes Budi U, Indah Norma and Hermin R.2011.Buku Ajar Ilmu Kemajiran pada Ternak. Departemen reproduksi Veteriner. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

McDougall,S. and C. Compton, 2005. *Reproductive Performance of Anestrous Dairy Cows Treated with Progesterone and Estradiol Benzoate*.J. Dairy Sci. 88:2388

Opsomer, G., Y. T. Grohn, J. Hertl, M. Coryn, H. Deluyker, and A. de Kruif. 2000. Risk factors for post partum ovarian dysfunction in high producing cows in Belgium: A field study. Theriogenology 53:841–857.

Radostits O M and Blood D C, 1985. Herd Health. W.B. Saunders Company. London Roberts S J, 1971. Veterinary Obstetrics and Genital Diseases. Edwards Brother Inc. Ann Arbor. Michigan.

Pemayun, T.G.O., 2009. *Induction of Oestrus with PMSG and Gn-RH in the Postpartum Anoestrus Dairy Cow*. Diakses pada <http://www.bulletinveteriner.com/induksi-estrus-dengan-pmsg-dan-gn-rh-pada-sapi-perah-anestrus-postpartum/> tanggal 11 Januari 2012

Putro, P.P., 1991. *The treatment of anoestrus and sub oestrus in dairy cattle using a progesterone controlled internal drug release (CIDR) or a synthetic Gonadotrophin-Releasing hormone Gn-RH*. Buletin FKH- UGM. Vol.10 no2.

Toelihere M R, 1981. Ilmu Kemajiran PadaTernak Sapi. Edisi Pertama. Institut Pertanian Bogor.

Valyushkin K.D and GukovF.D.1980 . Vitamin A in hypofunction of ovary [dairy cattle, chemotherapeutants- other, Byelorussian SSR]]. [Russian []Vitebskij Veterinarnyj Inst. (Byelorussian SSR) Ecole Nationale Veterinaire de Toulouse, 31 (France).

Yániz J¹, López-Gatius F, Bech-Sàbat G, García-Isprierto I, Serrano B, and Santolaria P.
2008. Relationships between milk production, ovarian function and fertility in high-producing dairy herds in north-eastern Spain.

Journal of Fertilization: In vitro - IVF-Worldwide, Reproductive Medicine, Genetics & Stem Cell Biology

Tinjauan Umum Penyebab Fungsional Infertilitas pada Sapi

Fitsum Abraham *

Departemen Kedokteran Hewan, Universitas Wolaita Sodo, Wolaita Sodo, SNNRG, Ethiopia

Abstrak

Meskipun masalah dalam peternakan tidak terhitung, infertilitas adalah salah satu hambatan utama dalam produksi ternak. Dalam makalah ini fungsional penyebab infertilitas seperti defisiensi luteal karena pola abnormal dari pulsa LH, penyakit ovarium kistik, dan cacat ovulasi, korpus luteum persisten, infertilitas yang berhubungan dengan anestrus, estrus yang tidak terdeteksi dan pembiak berulang disajikan sehubungan dengan sapi. Telah didokumentasikan bahwa dalam pengelolaan sapi, ada banyak kali ketika manipulasi aktivitas siklik normal memastikan produksi optimal atau nyaman bagi pemiliknya dengan menggunakan hormon untuk memanipulasi aktivitas siklik ovarium.

Kata kunci:

Sapi; Diagnosa; Hormon; Infertilitas; Pengobatan pengantar

Kinerja reproduksi adalah salah satu faktor terpenting yang mempengaruhi profitabilitas peternakan sapi perah dan perkembangan ekonomi nasional, serta standar hidup masyarakat pedesaan dan perkotaan. Karena, secara langsung atau tidak langsung mempengaruhi produksi susu, tingkat pemusnahan reproduksi dan biaya untuk penjualan pengembangbiakan dan pedet [1]. Sapi perah harus melahirkan satu kali setiap tahun untuk memaksimalkan efisiensi ekonomi. Sapi yang telah sangat dipilih untuk produksi susu dalam beberapa dekade terakhir telah mengalami penurunan kesuburan sapi, kesuburan adalah sifat multi-faktorial dan kemundurannya disebabkan oleh jaringan faktor genetik, lingkungan dan manajerial dan interaksi mereka yang kompleks menjadikannya sulit untuk menentukan alasan pasti penurunan ini [2].

Ovarium memainkan peran kunci dalam reproduksi dan gangguan fungsi mereka dapat menyebabkan kemandulan atau infertilitas. Istilah kesuburan diterapkan pada sapi menunjukkan keinginan dan kemampuan untuk kawin, kapasitas untuk bunting dan memelihara embrio dan akhirnya kekuatan untuk mengeluarkan betis dan membran janin yang normal. Kemandulan berarti ketidakmampuan mutlak untuk menghasilkan, sedangkan infertilitas menunjukkan tingkat kesuburan berkang yang mengakibatkan kegagalan produksi atau keterlambatan dalam memproduksi anak sapi hidup normal. Sebagian besar bentuk infertilitas fungsional menghasilkan anoestrus yang berarti kegagalan sapi untuk menampilkan estrus [3].

Kelangsungan hidup embrio adalah faktor utama yang mempengaruhi produksi dan efisiensi ekonomi di semua sistem produksi daging dan susu oleh ruminansia [4]. Pada sapi potong, perkiraan menunjukkan bahwa tingkat pembuahan untuk oosit adalah 90%, sedangkan tingkat melahirkan rata-rata untuk satu layanan adalah antara 40% dan 55%, menunjukkan tingkat kematian embrio / janin (tidak termasuk kegagalan pembuahan) sekitar 35% hingga 50 % [5]. Mayoritas kehilangan embrionik (70-80%) terjadi pada 3 minggu pertama kebuntingan terutama antara hari 7 dan 16 kebuntingan [6].

Hormon reproduksi dikelompokkan dalam dua kelompok sesuai dengan moda aksi mereka; hormon primer dan hormon sekunder (metabolisme). Hormon primer terlibat dalam berbagai aspek reproduksi, implantasi dan pemeliharaan kebuntingan, proses kelahiran, laktasi, perilaku ibu dan spermatogenesis. Hormon primer termasuk FSH, LH dan prolaktin dari kelenjar hipofisis anterior dan oksitosin dari kelenjar hipofisis posterior. Hormon sekunder diperlukan untuk kesejahteraan umum, keadaan metabolisme, dan pertumbuhan ternak. Memungkinkan efek penuh dari hormon primer yang secara tidak langsung terkait dengan reproduksi. Hormon sekunder disekresi oleh hipofisis, tiroid, paratiroid,

korteks adrenal, rahim dan pankreas. Hormon-hormon ini termasuk Hormon Merangsang Tiroid, Hormon Adrenocorticotropic, Hormon Anti-diuretic, Hormon Human Chorionic-Gonadotrophic dan insulin [7].

Progesteron yang diproduksi oleh CL mencegah siklisitas dengan bekerja pada hipofisis anterior dengan cara umpan balik negatif; Oleh karena itu, mengurangi pelepasan FSH dan LH. Ini mempersiapkan rahim untuk penerimaan sel telur yang dibuahi dan kebuntingan berikutnya. Ini juga membantu sapi mempertahankan kebuntingan dengan menekan kontraksi uterus dan mendorong perkembangan lapisan uterus [8]. prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) disekresikan oleh endometrium uterus dan juga mempengaruhi struktur pada ovarium, membantu untuk memulai ovulasi dengan menyebabkan kematian CL, yang menghasilkan penarikan mekanisme umpan balik negatif progesteron. Konsentrasi progesteron yang bersirkulasi tinggi merangsang produksi dan pelepasan PGF_{2α} dari rahim [9].

Periode postpartum memainkan peran penting dalam reproduksi sapi. Durasi postpartum anoestrus memiliki pengaruh penting pada kinerja reproduksi. Selama beberapa tahun terakhir, beberapa penelitian telah dicoba untuk mengobati anestesi postpartum yang berkepanjangan pada sapi dengan menggunakan perawatan hormon seperti hormon pelepas gonadotropin (GnRH), estrogen, prostaglandin (PG F2α) dan progesteron [10-12].

Oleh karena itu, tujuan dari makalah ini adalah:

- 124 Untuk memberikan gambaran tentang penyebab fungsional infertilitas pada sapi.
- 125 Untuk menyoroti perawatan untuk penyebab fungsional ketidaksuburan pada sapi.

Dinamika Folikuler dan Hormon selama Siklus Estrus

Siklus estrus dibagi menjadi fase yang berbeda, (fase folikuler, estrus, dan fase luteal) dan diatur oleh hormon yang dikeluarkan oleh

*Penulis yang sesuai: Fitsum Abraham, Departemen kedokteran hewan, Universitas Wolaita Sodo, Wolaita Sodo, SNNRG, Ethiopia, Telp: +251916542492; Surel: bubu77960@gmail.com

Diterima 27 Juni 2017; Diterima 31 Juli 2017; Diterbitkan 07 Agustus 2017

Kutipan: Abraham F (2017) Tinjauan Umum Tentang Penyebab Fungsional Infertilitas di Jakarta
Sapi JFIV Reprod Med Genet 5: 203. doi:[10.4172/2375-4508.1000203](https://doi.org/10.4172/2375-4508.1000203)

Hak cipta: © 2017 Abraham F. Ini adalah artikel akses terbuka yang didistribusikan di bawah ketentuan Lisensi Atribusi Creative Commons, yang memungkinkan penggunaan, distribusi, dan reproduksi tanpa batas dalam media apa pun, asalkan penulis dan sumber aslinya dikreditkan.

hipotalamus (GnRH), kelenjar hipofisis anterior (*follicle stimulating hormone (FSH)*) dan *luteinizing hormon (LH)*, ovarium (estradiol dan progesteron), dan uterus (prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}). Hormon sebelumnya berfungsi sebagai pembawa pesan kimiawi yang melakukan perjalanan dalam darah untuk jaringan target spesifik yang mengandung reseptor yang spesifik hormon dan mengatur fase siklus estrus. Kombinasi sekresi hormon dan metabolisme (hati, ginjal dan paru-paru) menjaga keseimbangan hormon yang benar selama fase folikuler, estrus, dan fase luteal dari siklus: folikel pra-ovulasi dan corpus luteum yang terbentuk selanjutnya adalah dua struktur ovarium primer yang mengatur siklus estrus melalui sekresi estradiol dan progesteron, masing-masing [13].

Proestrus, fase pertama dari siklus estrus yang merupakan fase membangun, selama fase ini folikel ovarium (di bawah pengaruh FSH dan LH) membesar dan mulai mengeluarkan estrogen, dimulai dalam satu atau dua hari regresi dari corpus luteum dari siklus sebelumnya. Terlambat pro-estus, dinding vagina menebal dan genitalia eksterna akan meningkat dalam vaskularisasi sebagai persiapan sanggama.

Estrus, periode penerimaan seksual, terutama diprakarsai oleh peningkatan estrogen dari folikel dewasa sesaat sebelum ovulasi. Dalam kebanyakan kasus, ovulasi terjadi dalam satu atau dua hari setelah timbulnya estrus perilaku.

Metestrus, fase postovulasi didominasi oleh fungsi corpus luteum. Selama periode ini, estrogen serum menurun dan progesteron meningkat [14].

Penyebab Fungsional Infertilitas pada Sapi

Biasanya, penyebab fungsional infertilitas cenderung memengaruhi masing-masing hewan dalam kawanan, tetapi secara agregat mereka merupakan penyebab penting infertilitas; lebih jauh lagi ketika mereka mempengaruhi sejumlah besar sub kelompok tertentu dalam kawanan mereka sering mencerminkan beberapa masalah lain, terutama gizi. Kebanyakan penyimpangan fungsional terjadi karena beberapa kelainan endokrinologis yang sering sulit ditentukan bahkan dengan metode pengujian hormon saat ini, terutama ketika sampel darah atau susu tunggal diperiksa. Kelainan terjadi sebagai akibat dari faktor bawaan; kekurangan gizi atau pengaruh sosial berlebih yang mungkin timbul dari metode peternakan modern, misalnya pengelompokan sejumlah besar sapi sehingga mengganggu pembentukan hierarki sosial yang stabil; dan tekanan produksi [3].

Beberapa penyebab umum dijabarkan sebagai berikut:

- a) Estrus yang tidak terdeteksi (silent estrus)
- b) Anoestrus
- c) Cacat ovulasi
- d) Corpus luteum persisten
- e) Ovarium kistik
- f) Defisiensi luteal
- g) Ulangi Peternak

Estrus tidak terdeteksi / silent estrus

Sapi itu menunjukkan estrus tetapi tidak ada yang bisa mengikuti sapi itu. Setelah masa pubertas, aktivitas ovarium siklik harus dipertahankan terus menerus selama masa hidup sapi kecuali selama kebuntingan dan untuk periode singkat di masa nifas. Satu-satunya cara pria kawanan tahu itu, ini terjadi ketika tanda estrus pada interval sekitar 21 hari. Mungkin saja ada tanda-tanda tetapi yang tidak diamati; dalam hal ini merupakan masalah manajemen [15].

Hasil studi tentang waktu perilaku estrus tidak konsisten dengan pola diurnal sederhana dan probabilitas harus dijelaskan dalam periode waktu di mana sapi dibiarkan tidak terganggu oleh kegiatan

pertanian lainnya. Estrus yang tidak terdeteksi dapat dikonfirmasikan dengan mengidentifikasi sapi, pemberian pencahaayaan yang memadai, detektor pemasangan panas dan alat bantu lainnya untuk mendeteksi pemasangan dan tindak lanjut harian sapi [16].

Anoestrus

Anoestrus adalah kegagalan sapi untuk menunjukkan estrus terbuka tetapi lebih umum merupakan masalah dengan deteksi estrus. Beberapa sapi menunjukkan estrus terbuka untuk waktu yang sangat singkat, memiliki beberapa tunggangan atau menunjukkan tanda-tanda estrus di tengah malam membuat deteksi estrus pada hewan-hewan ini sulit. Tingkat deteksi estrus di banyak peternakan kurang dari 50%, menjadi faktor yang sangat membatasi efisiensi reproduksi. Banyak faktor, seperti pijakan, manajemen, dan tingkat produksi susu, akan memengaruhi demonstrasi estrus. Walaupun sapi-sapi ini tidak diamati pada estrus, mereka memiliki siklus estrus normal dan akan merespon dengan baik program sinkronisasi ovulasi [17].

Anoestrus sejati: Ini dapat didefinisikan karena ovarium mungkin diam dan tidak aktif; ini disebut sebagai anoestrus sejati. Alasan kegagalan aktivitas normal mungkin tidak cukupnya pelepasan atau produksi gonadotropin untuk menyebabkan folikulogenesis, atau mungkin mencerminkan kegagalan ovarium untuk merespons [18]. Palpasi rektal klinis akan mengungkapkan ovarium kecil yang biasanya rata dan halus, tidak adanya corpus luteum, baik sapi yang sedang berkembang, dewasa atau yang mengalami kemunduran dalam anestesi yang benar akan memiliki ovarium yang hampir tidak berubah, sedangkan seekor sapi pada akhir dioestrus atau dioestrus awal (metaestrus) akan memiliki karakteristik yang berbeda. teraba corpus luteum

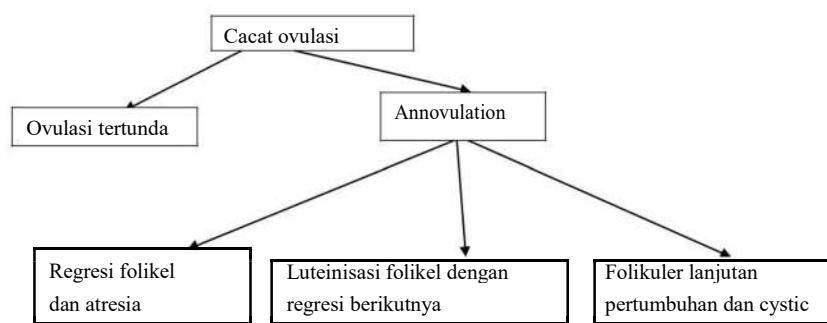
[19]. Hormon chorionic gonadotropin equine dapat digunakan untuk merangsang aktivitas ovarium, dapat menginduksi pertumbuhan folikel dan estrus; pada tingkat dosis 3000-4500 IU. GnRH, Progesteron, dan estrogen telah berhasil digunakan untuk mengobati anoestrus pada sapi perah [20].

Sub estrus atau hening panas: Mungkin ada aktivitas ovarium siklik yang normal tetapi sapi tidak menunjukkan tanda-tanda perilaku normal; ini digambarkan sebagai sub estrus atau hening panas. Ovulasi pertama dan kedua pascapartum sering tidak didahului oleh tanda-tanda perilaku estrus dan karenanya benar-benar 'panas diam'. Setelah estrus kedua tidak mungkin, yang dapat mengakibatkan 'pemanasan diam' yang sebenarnya terjadi. Ketika ovulasi terjadi tanpa adanya estrus yang teramat, kemungkinan besar akan terjadi kegagalan pengamatan karena durasi perilaku yang pendek dibandingkan dengan deteksi yang buruk [3].

Diagnosis kondisi dibuat pada riwayat klinis dan palpasi dubur dari sistem genital, tidak ada perbedaan yang dapat dibuat dari estrus yang tidak diamati, karena dokter akan memeriksa bukti aktivitas ovarium siklik seperti yang ditunjukkan oleh corpus luteum teraba. Penentuan progesteron dalam susu atau darah merupakan bantuan yang bermanfaat. Sehubungan dengan pengobatan, jika ada corpus luteum dewasa dan sapi tidak bunting, PGF_{2α}analog diikuti dengan inseminasi waktu tetap ditunjukkan. Jika corpus luteum berada pada tahap refrakter, injeksi ganda regimen prostaglandin digunakan dalam interval 11 hari. Atau implan progesteron lain dapat digunakan diikuti dengan inseminasi waktu tetap [21].

Cacat ovulasi

Ovulasi pada sapi adalah tipikal karena terjadi 10-12 jam setelah akhir estrus perilaku dan 18-26 jam setelah puncak LH ovulasi. Selama estrus dan setelah akhir estrus beberapa folikel mengalami perkembangan tetapi biasanya hanya satu atau kadang-kadang dua, berovulasi; folikel lain mengalami regresi dan menjadi atresia. Konsekuensi untuk kesuburan cacat anovulasi adalah dua kali lipat: baik oosit tidak dibebaskan



Gambar 1: Cacat ovulasi [3].

terlambat sehingga spermatozoa sekarang tidak mampu melakukan pembuahan, atau oosit sudah tua dan tidak mampu berkembang secara normal. Cacat ovulasi dapat terjadi karena dua penyebab: defisiensi atau ketidakseimbangan endokrin dan faktor mekanik. Ini adalah interaksi kompleks antara hormon ovarium, hipofisis anterior, dan hipotalamus. Jadi jika jumlah hormon hipofisis yang dilepaskan tidak cukup atau waktunya tidak tepat (ini terutama berlaku untuk LH), maka ovulasi tertunda atau gagal terjadi [22] (Gambar 1).

Ovulasi tertunda: Hormon yang penting untuk ovulasi tertunda adalah gelombang LH yang tertunda yang memainkan fungsi besar untuk kegagalan pembuahan. Jika ovulasi belum terjadi 24 jam setelah servis, sapi harus diinseminasi ulang.

Diagnosis kondisi sulit karena memerlukan palpasi rektal berurutan dari ovarium yang dapat melakukan intervensi diri dengan ovulasi dan dapat menyebabkan ruptur prematur. Telah direkomendasikan bahwa diagnosis dapat dibuat jika folikel tunggal dapat dideteksi dalam ovarium yang sama pada dua pemeriksaan berturut-turut, satu pada estrus puncak dan 24-36 jam kemudian. Penundaan ovulasi umumnya dianggap sebagai salah satu penyebab kegagalan konsepsi pada pembibitan siklik [15]. Perawatan terdiri dari menggunakan hormon-hormon yang mungkin mempercepat waktu ovulasi. Administrasi GnRH menyebabkan kenaikan cepat konsentrasi FSH dan LH dalam waktu 30 hingga 60 menit dan kembali ke nilai pra injeksi dalam waktu 4 jam. Pola pelepasan LH menyerupai yang pra-ovulasi diamati selama estrus terlambat pada hewan siklus normal [21].

Anovulasi: Anovulasi telah didefinisikan sebagai tidak adanya ovulasi yang mengarah pada anoestrus sejati atau penyakit ovarium kistik. Kadang-kadang anovulasi diamati sebelum dimulainya periode anoestrus anovulasi dengan folikel mengalami regresi dan menjadi atretik. Jika sapi diperiksa per rektum selama beberapa minggu pertama setelah melahirkan, sejumlah folikel ovulasi yang membesar sering dapat dideteksi. Mereka secara keliru digambarkan sebagai cystic, tetapi bersifat sementara dan tidak bertahan bahkan jika tidak ada pengobatan yang diberikan [23].

Diagnosis anovulasi hanya dapat dilakukan secara retrospektif dengan mencatat palpasi rektal atau Ultrasonografi yang dicurigai oleh folikel lebih lama dari yang diduga. Pengobatan diarahkan untuk memastikan bahwa ovulasi terjadi pada estrus berikutnya, maka GnRH yang diberikan seperti yang dijelaskan atau penundaan ovulasi ditunjukkan [24].

Corpus luteum persisten: Apa pun yang mengganggu produksi atau pelepasan luteolysin endogen, menghasilkan corpus luteum persisten. Kebuntingan adalah kondisi yang paling sering menyebabkan persistensi korpus luteum, tetapi di hadapan infeksi rahim dan radang jaringan terdapat gangguan pada produksi atau pelepasan luteolysin. Ada sedikit perusahaan

bukti bahwa persistensi korpus luteum dapat terjadi tanpa adanya lesi uterus [25].

Ovarium kistik: Disfungsi ovarium seperti cystic paling sering terjadi selama periode postpartum awal ketika ada transisi dari kondisi non-siklik selama kebuntingan ke pembentukan siklus teratur. Secara umum diterima bahwa folikel kistik berkembang karena disfungsi sumbu hipofisis-ovarium hipotalamus. Disfungsi ini memiliki etiologi multifaktorial, di mana faktor genetik, fenotipik dan lingkungan terlibat [26,27]. Ketika membahas patogenesis COF, perbedaan dapat dibuat antara cacat primer di hipotalamus-hipofisis dan cacat primer di tingkat ovarium dalam folikel itu sendiri. Namun, pembentukan COF dapat terjadi akibat defek pada ovarium / folikel dan juga hipotalamus / hipofisis [28].

Hipotesis yang paling banyak diterima yang menjelaskan pembentukan cystic adalah bahwa LH yang dilepaskan dari hipotalamus-hipofisis diubah: lonjakan LH pra-ovulasi tidak ada, tidak cukup besar atau terjadi pada waktu yang salah selama pematangan folikel dominan, yang menyebabkan untuk pembentukan cystic. Dipercaya bahwa mekanisme umpan balik yang diubah dari estrogen pada hipotalamus hipofisis dapat menghasilkan pelepasan GnRH / LH yang abnormal dan pembentukan cystic. Lonjakan GnRH / LH terjadi sebelum waktunya selama pertumbuhan folikel, yaitu, ketika tidak ada folikel yang mampu mengalami ovulasi, dapat memicu hipotalamus untuk tidak responsif terhadap umpan balik estradiol yang menghasilkan pembentukan cystic ovarium [29].

Folikel cystic : Ada beberapa definisi yang digunakan untuk menggambarkan folikel cystic ovarium dan definisi yang diterima secara tradisional adalah bahwa mereka adalah "struktur folikel 2,5 cm atau lebih besar yang bertahan untuk periode variabel tanpa adanya corpus luteum". Kami dapat mempertimbangkan folikel cystic ovarium sebagai struktur folikel pada ovarium tanpa adanya jaringan luteal, lebih besar dari ukuran folikel normal yang bertahan selama periode waktu yang signifikan dan mempengaruhi siklus estrus hewan [30].

Meskipun kami tidak dapat menentukan penyebab pasti dari folikel cystic ovarium, kami dapat mengenali bahwa mereka "berkembang ketika satu atau lebih folikel gagal berovulasi dan kemudian tidak mengalami kemunduran tetapi mempertahankan pertumbuhan dan steroidogenesis" [31]. Juga telah ditentukan bahwa cystic folikuler adalah struktur anovulasi sehingga, selama mereka bertahan, sapi akan tetap infertil [30]. Penyakit ovarium kistik adalah "patologi endokrin yang paling umum ditemukan pada sapi perah," dan kejadiannya "diyakini bervariasi mulai 1 hingga 30% tergantung pada kondisi kawanan dan jenis". Holsteins adalah yang paling rentan untuk mengembangkan kondisi kistik dibandingkan dengan ras lain, dan waktu diagnosis yang paling mungkin adalah 30-60 hari setelah proses kelahiran dalam sapi perah dengan hasil tinggi [28].

Folikel cystic , jika dibandingkan dengan kondisi kistik ovarium lainnya,

ditandai dengan dinding tipis dan menghasilkan jumlah progesteron yang sangat kecil. Kadang-kadang, kondisi persisten dapat menyebabkan peningkatan kadar testosterone, menyebabkan beberapa sapi menunjukkan perilaku agresif dan seksual maskulin. Namun, sebagian besar sapi kistik akan tetap berada dalam anoestrous selama kondisinya berlanjut. Cairan dalam folikel cystic mengandung banyak komponen, termasuk hormon seperti estradiol, progesteron, dan insulin [31].

Satu penjelasan yang diusulkan untuk pengembangan folikel cystic adalah bahwa "umpam balik positif estradiol pada pelepasan hormon pelepas gonadotropin (GnRH) dikompromikan" [32]. Ini tidak akan mengganggu kemampuan kelenjar hipofisis untuk melepaskan hormon luteinizing (LH) pada hewan kistik, tetapi fungsi keseluruhan dari hipotalamus poros hipofisis-ovarium akan diubah, dan lonjakan LH pra-ovulasi yang biasanya menginduksi ovulasi tidak terjadi. Pada hewan kistik, meskipun kegagalan ovulasi oleh folikel pra-ovulasi, lonjakan hormon perangsang folikel (FSH) akan terjadi, dan di bawah kondisi konsentrasi progesteron rendah dan konsentrasi LH tinggi, folikel dominan akan menyebabkan tumbuh menjadi ukuran yang lebih besar.

Cystic luteal: Penyakit ovarium kistik luteal ditandai oleh ovarium yang membesar dengan satu atau lebih cystic, yang dindingnya lebih tebal daripada folikel cystic karena lapisan jaringan luteal [34]. Cystic dengan dinding yang lebih tebal menghasilkan tingkat progesteron yang tinggi. Dalam penampilan, mereka halus dan bulat, dengan rongga bola yang dilapisi oleh lapisan jaringan fibrosa yang dikelilingi oleh sel-sel yang diluteinisasi [35]. "Cystic luteal dianggap sebagai cystic anovulasi dan berhubungan dengan infertilitas dan mukometra pada sapi" [24]. Bila dibandingkan dengan cystic folikular, cystic luteal lebih cenderung bertahan dalam jangka waktu yang lama dan dapat menyebabkan nymphomania pada beberapa hewan [36].

Cystic luteal "berkembang ketika ovulasi gagal terjadi dan teka mengalami luteinisasi" [35]. Cystic luteal terjadi ketika sel-sel cystic folikuler (granulosa dan teka) menjadi luteinisasi dan mulai memproduksi progesteron. Insiden cystic luteal meningkat dengan bertambahnya usia dan paling sering mempengaruhi sapi dengan produksi susu yang tinggi [37].

Kekurangan luteal: Progesteron diperlukan untuk pemeliharaan kebuntingan sampai 150-200 hari kebuntingan dan mungkin dalam beberapa kasus sampai term. Sumber utama hormon adalah CL sehingga jika ini tidak sepenuhnya terbentuk atau tidak berfungsi secara memadai maka progesteron yang diproduksi tidak mencukupi dan kebuntingan gagal. Kekurangan luteal telah dicurigai menyebabkan infertilitas selama bertahun-tahun dan, meskipun bukti sulit, cyclic non breeder atau pembiak berulang sering dirawat dengan asumsi ini [29].

Tidak mungkin pada palpasi dubur untuk membedakan antara CL normal dan abnormal; ada variasi alami dalam ukuran luteal dan posisi CL dalam ovarium. Itu variabel dan dengan demikian membuat estimasi ukurannya sangat sulit. Dengan menentukan konsentrasi progesteron dalam darah atau susu, dimungkinkan untuk melakukan penilaian fungsi luteal. Arthur et al. [38] menemukan bahwa pada 50% sapi yang mengalami ovulasi, namun gagal untuk bunting, nilai progesteron plasma enam atau lebih hari setelah ovulasi lebih rendah daripada kelompok yang mengandung. Diperpanjang konsentrasi progesteron rendah selama fase luteal awal telah dilaporkan pada 2% sapi [1] dan 18% sapi meskipun beberapa individu yang memiliki pola ini dikandung. Dalam sebuah penelitian di 91 post-partum sapi, nilai progesteron plasma selama dioestrus pertama setelah melahirkan adalah 34% lebih rendah pada 10% sapi daripada selama siklus kedua. Dalam studi yang sama progesterone levelnya serupa pada sapi bunting dan tidak bunting hingga 11 hari dari siklus [11].

[19]

Kawin berulang: Istilah repeat breeder atau repeat breeder syndrome dibuat untuk menggambarkan sapi yang gagal bunting setelah 3 atau 4 inseminasi pada sapi yang normal secara siklus tanpa kelainan klinis. Ulangi betina peternak kembali ke layanan berulang kali setelah dibesarkan dengan jantan subur. Faktor-faktor yang menyebabkan kelainan ini berlipat ganda, tetapi yang utama adalah anatomic, hormonal, manajemen dan infeksius dan bervariasi dari kawanan ke kawanan dan hewan ke hewan [39]. Ulangi sapi peternak menunjukkan tanda-tanda normal estrus setiap 18 hingga 24 hari tetapi membutuhkan lebih dari 3 layanan untuk menjadi bunting [40].

Dalam praktiknya, beberapa akan diinseminasi pada waktu yang salah, yang lain mungkin mengalami perubahan patologis pada bursa atau saluran telur yang sulit diraba atau infeksi uterus yang tidak terdiagnosis.

Tanda-tanda estrus setiap 18 hingga 24 hari tetapi membutuhkan lebih dari 3 layanan untuk bunting [40]. Beberapa kasus ini mungkin berhubungan dengan kematian embrio awal, kegagalan pembuahan, kualitas semen yang buruk dan sebagian besar kehilangan embrio pada sapi terjadi jauh lebih awal dalam kebuntingan daripada yang diyakini sebelumnya. Diagnosis peternak berulang bergantung pada catatan hewan, palpasi dubur, ultrasonografi, dan pemeriksaan vagina [41].

Ovulasi dimulai oleh peningkatan hormon luteinizing (LH), yang menghasilkan pecahnya folikel dan pelepasan sel telur. Setelah ovulasi ada periode singkat di mana sel telur dapat dibuahi. Karena periode antara tanda-tanda pertama estrus dan ovulasi terjadi pada 72 jam atau lebih, sapi yang beroovulasi kemudian harus diinseminasi setiap hari sampai deteksi rektum ovulasi dikonfirmasi. Ovulasi yang tertunda sebaiknya tidak dikacaukan dengan sindrom breeder berulang (breeder berulang). Sapi-sapi ini, jika tidak diinseminasi setiap hari sampai ovulasi, juga dapat kembali ke layanan berulang kali setelah inseminasi buatan sambil menunjukkan tanda-tanda normal estrus setiap 18 hingga 24 hari.

Pengobatan Berbagai Tanda Gangguan Endokrin

Penyakit ovarium kistik seperti cystic folikular diobati dengan hCG dengan dosis 3000 hingga 4.500 IU, GnRH dengan dosis 100-250 µg untuk luteinisasi, dengan dosis 0,5 µg untuk ovulasi. Aplikasi GnRH lebih dari 80% sapi masuk ke estrus dalam waktu 18 hingga 24 hari. Untuk cystic luteal, gunakan Progesteron dengan dosis 100 mg dalam minyak selama tiga kali berturut-turut dalam interval 48 jam. PGF_{2α} dan analognya dengan dosis 25 mg [30].

Anoestrus diobati dengan PMSG dengan dosis 3000 hingga 4.500 IU untuk merangsang aktivitas ovarium dan menginduksi pertumbuhan folikel dan ovulasi, GnRH dengan dosis 0,5 mg untuk merangsang pelepasan LH. Tetapi pada sapi menyusui suntikan kedua setelah 10 hari adalah penting setelah peningkatan sementara progesteron untuk memulai siklus normal [42].

Sub-estrus / hening panas diperlakukan dengan PGF_{2α}. Jika ada CL yang matang, satu dosis PGF_{2α} dapat merangsang sekresi LH. Jika tidak ada CL yang matang, administrasi ganda PGF_{2α} dosis pertama untuk maturation CL dan yang kedua untuk rilis progesteron [43]. GnRH adalah pengobatan terbaik untuk cacat ovulasi dan juga meningkatkan tingkat kebuntingan, karena dapat meningkatkan FSH dan LH dengan cepat [3].

Bilas rahim dengan aplikasi PGF_{2α} dan tanpa aplikasi antibiotik dapat menjadi metode pengobatan yang lebih baik untuk sapi betina yang berulang. Aplikasi hormon pelepas gonadotropin (GnRH) secara signifikan meningkatkan tingkat konsepsi pada pemulia berulang. Oleh karena itu, GnRH harus dipertimbangkan dalam terapi hormon untuk peternak berulang [42].

Citation: Abraham F (2017) An Overview on Functional Causes of Infertility in Cows. JFIV Reprod Med Genet 5: 203. doi: 10.4172/2375-4508.1000203

kesimpulan dan rekomendasi

Produksi hewan berkontribusi banyak pada pengembangan ekonomi nasional dan standar kehidupan yang lebih baik di daerah pedesaan dan perkotaan. Kinerja reproduksi adalah salah satu yang dapat mempengaruhi profitabilitas peternakan sapi perah dalam hal meningkatkan atau menurunkan produksi susu, tingkat pemusnahan reproduksi dan harga pasar sapi perah. Ini dapat dipengaruhi oleh jaringan faktor genetik (herediter), lingkungan dan manajerial (malnutrisi, kurangnya tindak lanjut dan stres yang intensif) dan interaksinya yang kompleks.

Penyebab fungsional infertilitas adalah sekunder dari faktor gizi dasar, turun temurun, stres dan pekerjaan. Seperti kita ketahui penyebab fungsional infertilitas biasanya memengaruhi masing-masing hewan dalam kawanan tetapi secara agregat mereka merupakan penyebab penting infertilitas; tetapi dalam efek yang luas, ketika masalah ini mempengaruhi sejumlah besar kelompok tertentu dalam kawanan mereka sering mencerminkan beberapa masalah lain, terutama masalah gizi.

Kesuburan adalah karakter multi-faktorial dan kemundurannya disebabkan oleh faktor-faktor tersebut di atas. Untuk meningkatkan produksi dan produktivitas, data yang memadai diperlukan sehubungan dengan penyebab ketidaksuburan fungsional dan lainnya.

Sejak beberapa tahun terakhir, Untuk mengobati penyimpangan reproduksi tersebut, perawatan hormon dan peningkatan manajemen adalah beberapa koreksi yang diberikan oleh dokter hewan dan pemilik peternakan untuk meningkatkan kinerja reproduksi hewan mereka.

Berdasarkan pernyataan konklusif di atas, rekomendasi berikut diteruskan:

- Dibutuhkan fasilitas diagnostik yang memadai untuk masalah reproduksi.
- Harus ada sarana untuk pemeriksaan organ reproduksi yang sering dan terperinci.
- Kesadaran di antara para petani tentang pengelolaan gangguan reproduksi karena nutrisi yang menyebabkan ketidakseimbangan atau tingkat hormon yang tidak memadai harus diciptakan.

Referensi

- [1] Plaizier JC, Lissemore KD, Kelton D, King GJ (1998) Evaluation of overall reproductive performance of dairy herds. *J Dairy Sci* 81: 1848-1854.
- [2] Walsh SW, Williams EJ, Evans AC (2011) A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Anim Reprod Sci* 123: 127-138.
- [3] Arthur GH, Noakes DE, Pearson H (1992) Arthur's veterinary reproduction and obstetrics. (6th edn), Great Britain, pp: 352-366.
- [4] Diskin MG, Morris DG (2008) Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reprod Domest Anim* 43: 2260-267.
- [5] Diskin MG, Murphy JJ, Sreenan JM (2006) Embryo survival in dairy cows managed under pastoral conditions. *Ani Reprod Sci* 96: 297-311.
- [6] Berg DK, van Leeuwen J, Beaumont S, Berg M, Pfeffer PL (2010) Embryo loss in cattle between day 7 and 16 of pregnancy. *Theriogenology* 73: 250-260.
- [7] Hafez ESE (1993) Reproduction in farm animals. (6th ed). Philadelphia, pp:59-104.
- [8] Millar RP, Lu ZL, Pawson AJ, Flanagan CA, Morgan K et al. (2004) Gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocr Rev* 25: 235-75.
- [9] Charlton H1 (2008) Hypothalamic control of anterior pituitary function: A history. *J Neuroendocrinol* 20: 641-646.
- [10] Metwally KK (2001) Postpartum anoestrus in buffalo and cows: Causes and treatment. Proceedings of the sixth scientific congress Egyptian society for cattle diseases, Egypt, Assuit University, pp: 259-267.
- [11] Singh C (2003) Response of anoestrus rural buffaloes (*Bubalus bubalis*) to intravaginal progesterone implant and PG F2a injection in summer. *J Vet Sci* 4: 137-141.
- [12] Edwell SM, Slawomir Z, Tomasz J (2004) Comparative study on the efficacy of hormonal and non-hormonal treatment methods in ovarian function affected dairy cows. *Vet Inst Pulawy* 48: 265-267.
- [13] Garverick HA, Smith MF (1993) Female reproductive physiology and endocrinology of cattle: *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, Saunders Co, Philadelphia, pp: 223-247.
- [14] Husveth F (2011) Physiological and reproduction aspects of animal production.
- [15] Pearson H, England GCW (1993) Veterinary reproduction and obstetrics, Bailliere Tindall: Great Britain 270-278.
- [16] Albright JL, Arave CW (1997) The behavior of cattle. CAB International, Wallingford, pp: 13-15.
- [17] Wiltbank MC, Gümen A, Sartori R (2002) Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. *Theriogenology* 57: 21-52.
- [18] Dransfield MBG, Nebel RL, Pearson RE, Warnick LD (1998) Current therapy in theriogenology. 81: 1874.
- [19] Peters AR, Ball HJH (1995) Reproduction in dairy cattle. (2nd ed), Black well science ltd, London, UK, pp: 23-61,89-105.
- [20] Cuppus PT (1991) Current veterinary therapy, Philadelphia, WB Saunders, pp: 692-695.
- [21] Cunningham JG (2002) Text book of Veterinary Physiology. (3rd ed), Saunders Company, pp: 692-695.
- [22] Espey LL (1994) Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. *Biol Reprod* 50: 233-238.
- [23] Nielsen TC (1995) Studies on reproduction in cows, Tokyo: Japan RacingAssociation, pp: 238-239.
- [24] Foley GL (1996) Pathology of the corpus luteum of cows. *Theriogenology* 45: 1413-1428.
- [25] Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK, McIntosh EW (2000) Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol Rev* 80: 1-29.
- [26] Peter AT (2004) An update on cystic ovarian degeneration in cattle. *Reprod Domest Anim* 39: 1-7.
- [27] Garverick HA1 (1997) Ovarian follicular cysts in dairy cows. *J Dairy Sci* 80:995-1004.
- [28] Yoshioka K, Iwamura S, Kamomae H (1996) Ultrasonic observations on the turnover of ovarian follicular cysts and associated changes of plasma LH, FSH, progesterone and oestradiol in cows. *Res Vet Sci* 61: 240-244.
- [29] Gumen A, Sartori R, Costa FMJ, Wiltbank MC (2002) A GnRH/LH surge without subsequent progesterone exposure can induce development of follicular cysts. *J Dairy Sci* 85: 43-50.
- [30] Youngquist RS, Threlfall WR (2007) Ovarian follicular cysts: Current therapy in large animal theriogenology, Saunders Elsevier, pp: 379-383.
- [31] Vanholder T1, Opsomer G, de Kruif A (2006) Aetiology and pathogenesis of cystic ovarian follicles in dairy cattle: A review. *Reprod Nutr Dev* 46: 105-119.
- [32] Bartolome JA, Thatcher WW, Melendez P, Risco CA, Archbald LF (2005) Strategies for the diagnosis and treatment of ovarian cysts in dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc* 227: 1409-1414.
- [33] Kaneko H, Todoroki J, Noguchi J, Kikuchi K, Mizoshita K, et al. (2002) Perturbation of estradiol-feedback control of luteinizing hormone secretion by immune neutralization induces development of follicular cysts in cattle. *Biol Reprod* 67: 1840-1845.
- [34] Kahn CM (2010) Cystic ovary disease: The Merck Veterinary Manual. (10th ed), Whitehouse Station 243-1247.
- [35] Schlafer DH (2007) Pathology of the ovary (No developmental Lesions). *Pathology of Domestic Animals* 3: 444-450.
- [36] Ball PJH, Peters AR (2004) Reproductive problems: Reproduction in cattle. Oxford, Blackwell Publications, UK, pp: 172-175.

-
37. [Peter AT, Levine H, Drost M, Bergfelt DR \(2009\) Compilation of classical and contemporary terminology used to describe morphological aspects of ovarian dynamics in cattle. Theriogenology 71: 1343-1357.](#)
38. Arthur GH, Noakes DE, Pearson H (2003) Veterinary reproduction and obstetrics, Bailliere Tindac, Great Britain, pp: 383-386.
39. [Singh J, Dadarwal D, Honparkhe M, Kumar A \(2008\) Incidence of various etiological factors responsible for repeat breeding syndrome in cattle and buffalos. IJVM 6:1.](#)
40. [Parkinson TJ \(1996\) Infertility: Veterinary reproduction and obstetrics. Saunders Company, USA 463-464.](#)
41. [Stevenson SJ, Call EP, Scobey RK \(1990\) Double insemination and gonadotropin-releasing hormone treatment of repeat breeding dairy cattle. J Dairy Sci 73: 1766-1772.](#)
42. [Vadakkadath Meethal S, Atwood CS \(2005\) The role of hypothalamic-pituitary-gonadal hormones in the normal structure and functioning of the brain. Cell Mol Life Sci 62: 257-261.](#)
43. [Hafez ESE \(1993\) Reproduction in Farm Animals, Philadelphia, pp: 59-104.](#)

Tingkat Hormon Pertumbuhan Pasca Perawatan Sapi Bali dengan Ethinil Estradiol dan Hormon Progesteron dalam Kombinasi dengan Mineral

Aletha Yuliana Mandala^{1*}, Ni Ketut Suwiti², I Wayan Suardana²

¹Mahasiswa Pascasarjana Kedokteran Hewan Universitas Udayana

²Laboratorium Bioteknologi Pusat Kedokteran Hewan Denpasar, Bali
Denpasar-Bali

*Penulis yang sesuai: mandalaaletha@gmail.com

Abstrak. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tingkat hormon pertumbuhan pasca pemberian sapi etinil estradiol dan hormon progesteron yang dikombinasikan dengan mineral. Total sampel 64 sapi bali dibagi menjadi 4: Kelompok I (Kontrol) tidak diberi hormon etinil estradiol, progesteron, dan mineral. Kelompok II diberi hormon etinil estradiol dan progesteron, tanpa mineral. Kelompok III tidak diberi hormon etinil estradiol dan progesteron, dengan pemberian mineral. Kelompok IV diberi hormon etinil estradiol, progesteron, dan mineral. Pada akhir penelitian, pengukuran dilakukan untuk menentukan tingkat hormon pertumbuhan menggunakan metode ELISA. Data penelitian dianalisis dengan analisis varian. Hasil penelitian menunjukkan bahwa hormon pertumbuhan sapi jantan (268.281 ± 73.13 pg / ml) lebih tinggi daripada betina (236.250 ± 13.79 pg / ml). ($264,94 \pm 74,42$ g / ml) dibandingkan orang dewasa ($239,59 \pm 14,05$ g / ml). Tingkat hormon pertumbuhan sapi bali dengan mineral tertinggi ($266,97 \pm 74,15$ pg / ml) dibandingkan tanpa mineral ($237,56 \pm 11,05$ pg / ml). Tingkat hormon pertumbuhan sapi bali dengan kadar etinil estradiol dan hormon progesteron yang lebih tinggi ($263,31 \pm 74,81$ g / ml) dibandingkan dengan tanpa hormon etinil estradiol dan hormon progesteron ($241,22 \pm 18,8$ g / ml). Hasilnya adalah usia dan efek seks pada tingkat hormon pertumbuhan dengan hormon etinil estradiol dan progesteron yang dikombinasikan dengan mineral. Pemberian hormon etinil estradiol dan progesteron yang dikombinasikan dengan mineral signifikan ($P < 0,05$) dapat meningkatkan tingkat hormon pertumbuhan sapi bali jantan muda.

Kata kunci: Hormon pertumbuhan, sapi bali, etinil estradiol dan hormon rogesteron, mineral, ELISA.

I. PENDAHULUAN

Sapi Bali adalah salah satu sapi lokal di Indonesia selain sapi Aceh, pesisir, dan Madura. Sapi Bali memiliki tingkat kesuburan yang tinggi (80% -82%), kemampuan beradaptasi yang baik terhadap lingkungan marginal. Mereka juga mudah bertani hampir di setiap wilayah di Indonesia dan bahkan di luar negeri misalnya Malaysia, Filipina dan Australia [1].

Aktivitasnya dalam pertumbuhan tergantung pada beberapa faktor yang melibatkan persediaan makanan, potensi genetik, dan lingkungan. Makanan ternak

juga sangat mempengaruhi tingkat hormon pertumbuhan. Secara tidak langsung, hormon pertumbuhan bekerja melalui hormon insulin-like growth factor 1 (IGF-1) yang diproduksi oleh berbagai jaringan sebagai respons terhadap hormon pertumbuhan [2]. Salah satu faktor penting dalam mengatur IGF-1 adalah pakan ternak. Mineral dan protein akan meningkatkan level IGF-1 dalam tubuh ternak dan jika tidak, defisiensi mineral dan protein dapat menurunkan level IGF-1, menghasilkan penurunan sekresi hormon pertumbuhan yang berakibat pada penurunan level hormon pertumbuhan [3]. Penggunaan hormon juga mempengaruhi tingkat hormon

pertumbuhan. Ada beberapa hormon yang berperan penting dalam fase pertumbuhan, seperti somatotropin, tiroksin, androgen, kombinasi estrogen dan progesteron, dan glukortikoid [4] [5]. Etinil estradiol dan progesteron dapat menstimulasi sekresi hormon pertumbuhan kelenjar hipofisis dan menyebabkan peningkatan kadar insulin dalam darah sehingga memudahkan metabolisme karbohidrat dan asam amino, kebutuhan energi terpenuhi, dan asam amino untuk protein pembentukan otot disebabkan untuk meningkatkan konsentrasi somatotropin dan IGF-1 sehingga kadar hormon pertumbuhan darah meningkat [6] [7] [8].

Pemberian etinil estradiol dan progesteron yang dikombinasikan dengan mineral dapat memengaruhi kadar hormon pertumbuhan yang dapat diukur dengan menggunakan metode ELISA [9]. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tingkat hormon pertumbuhan sapi bali baik jantan maupun betina pada masa muda dan pasca-dewasa pasca penambahan etinil estradiol dan hormon progesteron yang dikombinasikan dengan pemberian mineral.

II METODE PENELITIAN

Bahan Penelitian

Penelitian ini menggunakan kit Hormon Pertumbuhan Hormon ELISA yang terdiri dari microplate 96 well, standar, A (spesifik antibodi terkonjugasi Biotin) dan B (Avidin terkonjugasi Horse Radical Peroxidase), substrat (Tetrametyl benzidine), substrat pencuci, pelat kertas, pengencer standar, pengencer pengujian A dan B, hentikan larutan, PBS, dan air suling.

Populasi target dalam penelitian ini adalah 64 sapi bali yang dipelihara intensif di peternakan Mupu Amerta di Kabupaten Bangli, Provinsi Bali. 64 sampel dibagi menjadi 16 sapi muda, 16 sapi dewasa, 16 sapi muda dan 16 sapi betina dewasa, dikelompokkan menjadi 4: Grup I (Grup Kontrol) yang tidak

diberikan hormon etinil estradiol, progesteron, dan mineral. Kelompok II diberikan hormon etinil estradiol dan progesteron, tanpa suplemen mineral. Kelompok III tidak diberi hormon etinil estradiol dan progesteron, dengan suplemen mineral. Kelompok IV diberi etinil estradiol, progesteron, dan hormon mineral.

Sampel serum diperoleh dari pengumpulan darah menggunakan jarum venoject, melalui vena jugularis yang mengambil sekitar 10 ml darah. Serum ditempatkan pada suhu kamar selama 10-20 menit, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 2000-3000 rpm selama 20 menit untuk menghindari sedimentasi.

Pengukuran Tingkat Hormon Pertumbuhan

Prosedur tes ELISA digunakan dalam hal ini Studi mengacu pada metode Glory Science [10]. Tes ini dilakukan berdasarkan pada prosedur operasi standar ELISA Kit Bovine Growth Hormone (GH).

Prosedur penelitian dimulai dengan pengenceran standar yang dilakukan dengan mencampur standar dengan pengenceran standar. Pertama, disiapkan 5 tabung efendorf, kemudian diambil 50 μ l pengenceran standar untuk mengisi setiap tabung efendorf, kemudian diambil sebagai 100 μ l standar (5400pg / ml) dan dimasukkan ke dalam tabung pertama. Total 100 μ l larutan (campuran standar pengenceran dan standar) diambil dari tabung pertama dan dimasukkan ke dalam tabung kedua. Total 50 μ l larutan dari tabung kedua diambil dan dimasukkan ke dalam tabung ketiga tabung. Pada tahap ketiga ini proses ini diulangi sampai tabung kelima sehingga konsentrasi standar bernilai 300pg / ml.

Prosedur pengujian pertama dipersiapkan dengan baik untuk blank dan sampel, tetapi dalam well kosong tidak ada sampel yang ditambahkan dan Horseradish Peroxidase (HRP) - Conjugate. Selanjutnya, sampel pengenceran 40 μ l ditambahkan ke masing-masing sumur dan 10 μ l sampel ditambahkan ke plat uji. Setelah itu proses inkubasi mulai menggunakan perekat

telanjang selama 30 menit pada suhu 37°C. Pada saat itu, larutan pencuci menggunakan rasio 1: 20 dan larutan pencuci diencerkan 30 kali dengan air suling. Hasil pencucian OD digunakan selama proses pencucian. Pada saat pencucian, pita perekat dibuka, larutan dalam sumur dilepas, lalu tambahkan buffer cuci di setiap sumur selama 30 detik, setelah itu dikeringkan. Proses pencucian ini dilakukan sebanyak 5 kali. Menambahkan reagen HRP-Konjugat 50µl di setiap sumur kecuali sumur kosong. Kemudian diinkubasi setelah tutup dengan strip perekat selama 30 menit pada suhu 37°C. Setelah 30 menit, itu telah dicuci selama 30 detik selama 5 kali pengulangan. Setelah proses pencucian dilanjutkan dengan pewarnaan dengan menambahkan Larutan Chromogen A dan Larutan Chromogen B 50 µl pada masing-masing sumur selama 15 menit pada suhu 37 °C. Setelah 15 menit, reaksi berhenti dilakukan dengan menambahkan larutan berhenti 50µl di setiap sumur, dalam proses reaksi ini akan berubah warna dari biru menjadi kuning dan kita harus menunggu selama 15 menit. Setelah 15 menit pembacaan absorbansi dilakukan menggunakan pembaca ELISA 450nm dengan sumur kosong bernilai nol.

Tingkat hormon pertumbuhan sampel ditentukan dengan menggunakan $Y = e^{a + bx}$ [11]

TABEL 1. TINGKAT RATA-RATA PERTUMBUHAN HORMONE BALI CATTLE

Variabel	Rata-Rata Tingkat Hormon Notasi Pertumbuhan (pg / ml)	
Betina	236.25 ± 13.79	a
Jantan	268.28 ± 73.13	b
Dewasa	239.59 ± 14.05	a
Muda	264,94 ± 74,42	b
Tanpa Mineral	237.56 ± 11.05	a
Mineral	266.97 ± 74.15	b
Tidak ada hormon	241.22 ± 14.80	a
Hormon	263.31 ± 74.80	b

Informasi: Tingkat hormon pertumbuhan rata-rata adalah nilai rata-rata ± SEM. Nilai dengan huruf (a) tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan ($P > 0,05$), sedangkan nilai dengan huruf (b) menunjukkan perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$).

Pemberian hormon etinil estradiol dan progesteron dikombinasikan dengan mineral

persamaan, di mana Y adalah tingkat hormon pertumbuhan dalam serum ternak, a adalah rasionya antara konsentrasi tingkat hormon pertumbuhan dan OD, x adalah OD, dan b adalah koefisien.

Analisis data

Data penelitian telah dianalisis dengan analisis ragam, dan jika hasilnya adalah perbedaan nyata maka akan dilanjutkan dengan uji LSD (Perbedaan signifikan terkecil). Prosedur analitis akan mengikuti instruksi dari Sampurna dan Nindhia [12], menggunakan program SPSS (produk statistik dan solusi layanan).

III. HASIL DAN ANALISA

Hasil tes terhadap sampel serum dari empat perlakuan adalah nilai optical density (OD). Tingkat hormon pertumbuhan ditentukan oleh persamaan $Y = e^{5,261 + 1,199x}$ dengan X sebagai nilai OD Analisis rata-rata tingkat hormon pertumbuhan sapi jantan dan betina setelah pemberian etinil estradiol dan hormon progesteron yang dikombinasikan dengan mineral disajikan pada Tabel 1.

pada sapi secara signifikan ($P < 0,05$) lebih tinggi daripada pada sapi betina.

Pemberian hormon etinil estradiol dan progesteron yang dikombinasikan dengan mineral pada sapi muda secara signifikan lebih tinggi ($P <0,05$) dibandingkan pada sapi dewasa.

Pemberian mineral pada sapi bali secara signifikan ($P <0,05$) lebih tinggi daripada tanpa pemberian mineral.

Pemberian hormon etinil estradiol dan

progesteron pada sapi bali adalah secara signifikan ($P <0,05$) lebih tinggi daripada tanpa pemberian etinil estradiol dan hormon progesteron.

Analisis rata-rata kadar hormon pertumbuhan anak sapi jantan dan betina, usia muda dan dewasa, etinil estradiol dan progesteron dan hormon mineral disajikan pada Tabel 2.

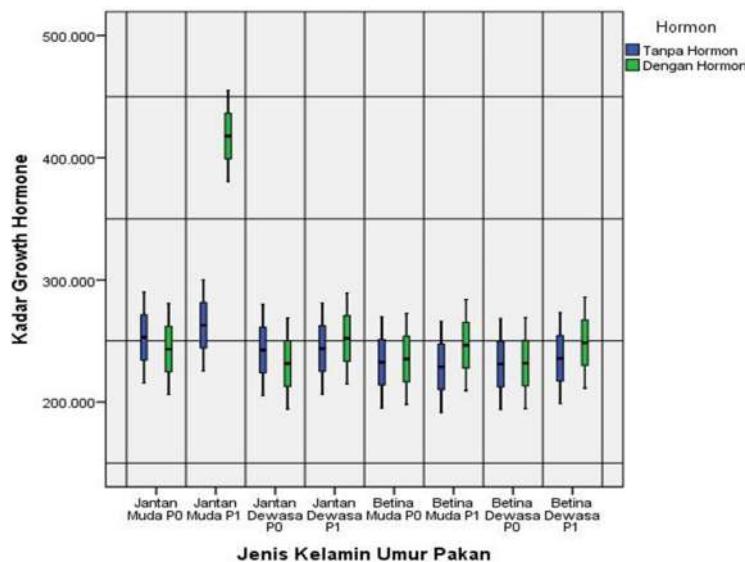
TABEL 2. TINGKAT RATA-RATA PERTUMBUHAN HORMON BALI JANTAN BETINA DAN BETINA, MUDA DAN DEWASA, ETHINYL ESTRADIOL DAN PROGESTERONE, DAN MINERAL

Seks	Usia	Mineral	Ethinyl Estradiol dan Progesteron	Tingkat rata-rata Hormon pertumbuhan (pg / ml)	Notasi
Jantan	Muda	M0	H0	252.75 ± 11.33	a
			H1	243.25 ± 2.63	a
	Dewasa	M1	H0	262.75 ± 5.66	a
			H1	$417,75 \pm 139,33$	b
Betina	Muda	M0	H0	$242,50 \pm 13,63$	a
			H1	231.50 ± 4.50	a
		M1	H0	243.75 ± 14.22	a
			H1	$252,00 \pm 21,19$	a
	Dewasa	M0	H0	232.50 ± 10.34	a
			H1	235.25 ± 2.75	a
		M1	H0	228.75 ± 4.34	a
			H1	$246,50 \pm 27,97$	a

Informasi: Nilai rata-rata hormon pertumbuhan adalah \pm SEM. Nilai dengan huruf yang sama tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan ($P > 0,05$), sedangkan nilai dengan huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan ($P <0,05$). M0 = Tidak Ada Mineral. M1 = Mineral. H0 = Tidak Ada Hormon. H1 = Hormon.

Pemberian etinil estradiol dan progesteron dan mineral pada sapi bali jantan muda secara signifikan lebih tinggi ($P <0,05$) daripada sapi bali dewasa, sapi betina

muda dan betina dewasa. Tingkat rata-rata hormon pertumbuhan sapi dalam empat perawatan disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Rata-rata Tingkat Hormon Pertumbuhan Sapi Bali dalam Empat Perawatan

Gambar 1. menunjukkan bahwa boxplots tidak berpotongan secara signifikan berbeda ($P < 0,05$) di mana sapi muda pasca-hormon etinil estradiol dan progesteron yang dikombinasikan dengan mineral menghasilkan tingkat hormon pertumbuhan tertinggi ($417,75 \pm 139,33$ pg / ml). Sedangkan boxplot berpotongan tidak berbeda secara signifikan ($P > 0,05$) di mana sapi dewasa, sapi muda dan dewasa tanpa dan administrasi etinil estradiol dan progesteron pasca-hormon dikombinasikan dengan mineral menghasilkan tingkat hormon pertumbuhan yang tidak signifikan. Tingkat hormon pertumbuhan dari empat perlakuan bervariasi (Tabel 2.), rata-rata \pm sapi tertinggi SEM ($417,75 \pm 139,33$ g / ml) pada sapi muda yang diberikan hormon etinil estradiol dan progesteron dikombinasikan dengan mineral administrasi, sedangkan yang terendah ($231,000 \pm 14,90$ pg / ml) dalam dewasa Betina tanpa pemberian hormon etinil estradiol, progesteron, dan mineral. Keadaan ini disebabkan oleh pertumbuhan ternak yang secara langsung dipengaruhi oleh habitat alami mereka (eksternal) dan genetik (internal). Faktor eksternal yang mempengaruhi pertumbuhan adalah tempat pemeliharaan yang terkait dengan pakan kondisi, sedangkan faktor internal yang mempengaruhi pertumbuhan adalah hormon

pertumbuhan [13].

Tabel 1 menunjukkan bahwa pemberian hormon etinil estradiol dan progesteron yang dikombinasikan dengan mineral pada sapi jantan secara signifikan ($P < 0,05$) lebih tinggi ($268,28 \pm 73,13$ pg / ml) dibandingkan pada sapi betina ($236,25 \pm 13,79$). Hasil serupa juga telah dilakukan oleh [14], yaitu tingkat hormon pertumbuhan rata-rata pada sapi angus jantan ($20,8 \pm 2,2$ ng / ml), betina ($14,9 \pm 1,8$ ng / ml), sapi jantan di sini ($15,7 \pm 3,4$ ng / ml), betina ($11,8 \pm 2,7$ ng / ml), sapi shorthorn jantan ($15,9 \pm 5,8$ ng / ml), betina ($12,1 \pm 3,8$ ng / ml), sapi persilangan jantan ($17,4 \pm 2,3$ ng / ml), betina ($12,7 \pm 2,7$ ng / ml). Hal ini disebabkan oleh gender yang mempengaruhi sekresi hormon pertumbuhan [15]. Gagasan yang sama juga diungkapkan oleh [16] bahwa hormon pertumbuhan dipengaruhi oleh jenis kelamin sehingga menyebabkan perbedaan kenaikan berat badan pada sapi.

Tingginya kadar hormon pertumbuhan ternak disebabkan oleh hormon androgen. Hewan jantan tumbuh lebih cepat daripada betina pada usia yang sama dengan memiliki testosteron salah satu androgen steroid, yang merupakan hormon pertumbuhan yang diproduksi oleh sel interstitial dan adrenal.

kelenjar. Hormon androgen pada hewan jantan dapat merangsang pertumbuhan, dan juga pertumbuhan cepat pada masa pubertas sebagian disebabkan oleh efek anabolik protein dari androgen sehingga hewan jantan bisa lebih besar dari betina [17]. Salah satu steroid androgen yang memengaruhi hormon pertumbuhan adalah testosteron yang memiliki kemampuan anabolisme protein untuk merangsang produksi hormon pertumbuhan dari hipofisis [18].

Hormon pertumbuhan pada sapi betina juga terlibat dalam proses diferensiasi dan pubertas seksual serta berperan dalam steroidogenesis gonad, gametogenesis, dan ovulasi [19]. Hormon seks betina, seperti estrogen yang diproduksi oleh ovarium umumnya memiliki sedikit atau tidak ada efek pada protein dan sintesis kerangka, tetapi efektif dalam meningkatkan pembentukan lemak tubuh. Oleh karena itu, betina berhenti tumbuh lebih cepat daripada jantan [20].

Proses ini secara langsung mempengaruhi aktivitas hormon pertumbuhan di kelenjar hipofisis [21]. Hormon pertumbuhan juga bekerja pada gonad, plasenta, dan kelenjar susu hewan betina [22]. Hal ini menyebabkan pertumbuhan jantan lebih cepat daripada betina terutama setelah ciri-ciri jenis kelamin sekunder muncul di mana pertumbuhan hewan jantan lebih tinggi daripada hewan betina pada usia yang sama [23].

Pemberian hormon etinil estradiol dan progesteron yang dikombinasikan dengan mineral pada sapi muda ($P < 0,05$) lebih tinggi ($264,94 \pm 74,42$ g / ml) dibandingkan pada sapi dewasa ($239,59 \pm 14,05$ g / ml) (Tabel 1). Tingkat hormon pertumbuhan sapi bali mulai meningkat secara signifikan sejak usia muda (6-18 bulan), tetapi pada usia dewasa (18 bulan) tidak ada peningkatan hormon pertumbuhan. Ini karena pada usia muda (6-18 bulan) asupan nutrisi cattleneeds untuk periode pertumbuhan, protein digunakan untuk membangun jaringan tubuh yang membentuk otot, kuku, sel darah dan tulang sehingga hormon pertumbuhan berperan penting dalam komposisi tubuh, metabolisme otot, tulang, dalam fungsi organ

untuk mempertahankan homeostasis, sehingga ada juga perubahan kenaikan berat badan. Pada saat pertumbuhan tingkat hormon pertumbuhan dalam kondisi optimal sehingga untuk mencapai kinerja biologis yang sangat baik dan berbagai organ tubuh dapat bekerja dengan baik [24].

Bahwa pemberian mineral untuk sapi bali secara signifikan lebih tinggi ($P < 0,05$) lebih tinggi (266,97 ± 74,15 pg / ml) dibandingkan tanpa mineral (237,56 ± 11,05 pg / ml) (Tabel 1). Secara geografis pertanian Mupu Amerta terletak di Kabupaten Bangli, Provinsi Bali, yang merupakan daerah dataran tinggi. Kondisi agroekosistem (curah hujan, karakteristik tanah, suhu dan kelembaban) dari ketinggian lokasi pemeliharaan secara tidak langsung mempengaruhi ketersediaan pakan ternak baik dari segi kualitas dan kuantitas [25].

Pakan sangat berpengaruh pada kadar hormon pertumbuhan. Hormon pertumbuhan ini diproduksi oleh somatotrop (bagian dari sel asidofilik) yang ada di kelenjar hipofisis. Secara tidak langsung, hormon pertumbuhan bekerja melalui IGF-1 yang diproduksi oleh berbagai jaringan sebagai respons terhadap hormon pertumbuhan [26]. Hormon ini bekerja melalui perantara peptida yang disebut somatomedin. Somatomedin adalah produksi utama di hati yang juga dipengaruhi oleh usia dan makanan. Somatomedin adalah apa yang akan mengikat reseptor dalam sel-sel tubuh untuk merangsang pertumbuhan melalui kista protein, metabolisme karbohidrat, metabolisme lemak dan metabolisme mineral. Kadar kalsium, magnesium, dan fosfat yang tinggi akan merangsang pertumbuhan panjang tulang keras dan pertumbuhan tulang rawan terutama pada usia muda. Mineral dan protein akan meningkatkan level IGF-1 dalam tubuh dan pada gilirannya, kekurangan mineral dan protein dapat menurunkan level IGF-1.

Pakan ternak sangat berpengaruh pada tingkat hormon pertumbuhan (hormon pertumbuhan). Secara tdk langsung, hormon

pertumbuhan bekerja melalui IGF-1 yang diproduksi oleh berbagai jaringan sebagai respons terhadap hormon pertumbuhan [28]. Salah satu faktor penting dalam mengatur IGF-1 adalah pakan. Mineral dan protein akan meningkatkan kadar IGF-1 di dalam tubuh dan pada gilirannya, kekurangan mineral dan protein dapat menurunkan kadar IGF-1, menghasilkan penurunan sekresi hormon pertumbuhan yang berakhir dengan penurunan kadar hormon pertumbuhan. Selain IGF-1, yang lain Faktor yang mempengaruhi sekresi hormon pertumbuhan adalah ghrelin. Ghrelin adalah salah satu hormon pertumbuhan Releasing Hormone (GHRH) yang dilepaskan dari perut. Dalam mensekresi hormon pertumbuhan, ghrelin pertama kali diatur oleh pakan ternak sehingga ghrelin mampu menginduksi pelepasan hormon pertumbuhan di kelenjar hipofisis. Keadaan defisiensi pakan akan mempengaruhi pelepasan hormon pertumbuhan [29].

Pemberian hormon etinil estradiol dan progesteron pada sapi bali secara signifikan lebih tinggi ($P < 0,05$) lebih tinggi (263,31) 74,80 g / ml dibandingkan tanpa hormon etinil estradiol dan progesteron ($241,22 \pm 14,80$ g / ml) (Tabel 1). Hormon yang memainkan peran penting dalam pertumbuhan, yaitu somatotropin, tiroksin, androgen, kombinasi estrogen dan progesteron, dan glukortikoid [30] [31]. Dalam hal hormon pertumbuhan lebih dari satu organ menjadi target karena hormon pertumbuhan mempengaruhi jaringan di dalam tubuh. Hormon etinil estradiol dan progesteron dapat meningkatkan profil hormon pertumbuhan dengan menstimulasi sel-sel tubuh untuk mempercepat pertumbuhan sehingga pertumbuhan vena jantan cenderung lebih besar daripada betina. Kondisi ini yang menyebabkan ukuran tubuh secara keseluruhan dipengaruhi oleh jenis kelamin [32].

Hormon pertumbuhan yang diproduksi oleh kelenjar hipofisis pertama kali mengalir melalui pembuluh darah ke hati. Di hati, hormon pertumbuhan diubah menjadi IGF-1 (Insulin like Growth Factor-1). Kemudian melalui sirkulasi darah IGF-1 mengalir ke seluruh organ

dalam tubuh. IGF-1 bertanggung jawab untuk mempertahankan semua organ dalam tubuh [33]. Faktor lain yang diketahui juga mempengaruhi sekresi hormon pertumbuhan adalah jenis kelamin, usia, pakan, dan hormon lainnya.

IV. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan sebagai berikut:

- h) Usia dan jenis kelamin mempengaruhi tingkat hormon pertumbuhan sapi bali sejalan dengan pemberian hormon etinil estradiol dan progesteron yang dikombinasikan dengan pemberian mineral.
- i) Pemberian hormon etinil estradiol dan progesteron yang dikombinasikan dengan pemberian mineral secara signifikan ($P < 0,05$) dapat meningkatkan profil hormon pertumbuhan sapi bali muda.

SARAN

Pemberian hormon etinil estradiol dan progesteron pada sapi bali harus dikombinasikan dengan mineral sehingga dapat meningkatkan kadar hormon pertumbuhan (growth hormone), dan penelitian lebih lanjut diperlukan untuk menentukan kandungan residu dalam darah dan daging.

PENGAKUAN

Penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada Rektor Pusat Studi Sapi CQ Bali Universitas Udayana atas dukungan biaya untuk penelitian ini, serta kepada mereka yang telah membantu dalam proses penelitian di Laboratorium Bioteknologi di Veterinary Center Denpasar.

REFERENSI

- [1]. Oka IGL. 2010. *Conservation and Genetic Improvement of Bali Cattle. Proc. Conservation and Improvement of World Indigenous Cattle.* 110-117.

- [2] Gardner, D.G., Shoback, D. 2007. *Greenspan's Basic and Clinical Endocrinology*. Eighth Edition. San Fransisco: The Mc Graw-Hill Company.
- [3] Thissen, J.P., Ketelslegers, J.M., Underwood, L.E. 1994. *Nutritional Regulation of the Insulin-Like Growth Factors*. *Endocr. Rev*, 15: 80–101.
- [4] Robson, H., Siebler, T., Shalet, S.M., Williams, G.R. 2002. Interactions Between GH, IGF-I, Glucocorticoids, and Thyroid Hormones During Skeletal Growth. *Pediatric Research*, 52:137-147.
- [5] Leung KC, Johannsson G, Leong GM, Ho KK. 2004. *Estrogen regulation of growth hormone action*. *Endocr. Rev.* 25, 693–72110.1210/er.2003-0035.
- [6] Lawrie, R, A. 2003. *IlmuDaging(Meat Science)*. (Parakkasi, A., Pentj). Edisi ke-5. Jakarta: UI Press.
- [7] Zhong, S., Wei-Ping, Y., Feng, E., Shu-Hong, L., Jie-Yu, L., Leong, J., Ma, C., Lin, Y.C. 2011. Serum Derivate from Zeranol-Implanted ACI Rats Promotes The Growth of Human Breast Cancer In Vitro. *Anticancer Research*,31(3): 481-486.
- [8] Khadijah, S. 2012. Analisis Residu Zeranol Dalam Daging Sapi Yang Diimpor Dari Australia dan Selandia Baru Melalui Pelabuhan Tanjung Priok (*tesis*). Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- [9] Milfa S, Suwiti NK, Tenaya IWM. 2015. Profil Hormon Pertumbuhan Sapi Bali Betina Pada Tiga Tipe Lahan Pemeliharaan Di Provinsi Bali. *Buletin Veteriner Udayana*, Volume 7 No. 1: 1-8 p-ISSN: 2085-2495.
- [10] Glory Science. 2017. *Bovine Growth Hormone (GH) ELISA Kit*. Catalog #: D8569.
- [11] Sampurna IP. 2012. Analisis Regresi Non-Linier Terapan Dengan SPSS. Pelawa Sari. Denpasar.
- [12] Sampurna IP, Nindhia TS. 2008. *Analisis Data dengan SPSS dalam Rancangan Percobaan*. Udayana University Press. Denpasar.
- [13] Herd, D.B., Sprott, L.R. 1986. *Body Condition, Nutrition, and Reproduction of Beef Cows*. *Texas Agric. Ext. Ser. Bull*, No. B-1526.
- [14] Irvin, R., Trenkle, A. 1971. Influences of Age, Breed and Sex on Plasma Hormones in Cattle. *J ANIM SCI*, 32:292-295.
- [15] Shimon, I., Taylor, J.E., Dong, J.Z. 1997. *Somatostatin Receptor Subtype Specificity in Human Fetal Pituitary Cultures*. Differential Role of SSTR2 and SSTR5 for 55. Growth Hormone, Thyroid-Stimulating Hormone, and Prolactin Regulation. *J. Clin. Invest*, 99: 789-798.
- [16] Turner, C.D., Bagnara, J.T. 1976. W.B. *A Course Manual in Nutrion and Growth*Australian Vice-Chancellors- Commite, Melbourne. General Endocrinology. Sixth Editon. p. 28: 561 – 597.
- [17] Kay M. and R.Hausseman. 1997. *The Influence of Sex on Meat Production InMeat*. Edited by Cook DJ, Lawrie RA. London. Butterworth.
- [18] Vestergaard, M., Purup, S., Henckel, P., Tonner, E., Flint, D.J., Jensen, L.R., Sejrsen,K. 1995. *Effects of GH and Ovariectomy on Performance, Serum Hormones, IGH Binding Proteins, and Muscle Fibre Properties of Prepubertal FriesianHeifers*. *J. Anim. Sci.* 73: 3574-3584.
- [19] Hull, K.L., Harvey, S. 2001. *Growth Hormone: Rolesin Female Reproduction*. Department of Physiology, University of Alberta. Edmonton, Canada.

- [20] Nasrul, L. 2012. Pertumbuhan dan Perkembangan Otot dan Jaringan Karkas. Prinsip dan Konsep dari Pertumbuhan dan Perkembangan.
- [21] Sharara, F.I., Giudice, L.C. 1997. *Role of Growth Hormone in Ovarian Physiology and Onset of Puberty. Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, 4:2–7.
- [22] Lawrence, T.L.J., Fowler, V.R. 2002. *Growth of Farm Animals*. Walling Ford: CABI International. New York. USA.
- [23] Irvin, R., Trenkle, A. 1971. Influences of Age, Breed and Sex on Plasma Hormones in Cattle. *J ANIM SCI*, 32:292-295.
- [24] Misitahari M. I. 2011. Pemberian Growth Hormone Menurunkan Kadar Tumor Necrosis Factor-A (Tnf-A) pada Tikus Jantan yang Dislipidemia. Disertasi tidak diterbitkan. Denpasar: Universitas Udayana Denpasar.
- [25] Gregory, K.E. 1961. Improvement of Beef Cattle Through Breeding Methode. *Regional Publication 120*. USDA.
- [26] Gardner, D.G., Shoback, D. 2007. *Greenspan's Basic and Clinical Endocrinology*. Eighth Edition. San Fransisco: The Mc Graw-Hill Company.
- [27] Thissen, J.P., Ketelslegers, J.M., Underwood, L.E. 1994. *Nutritional Regulation of the Insulin-Like Growth Factors*. *Endocr. Rev*, 15: 80–101.
- [28] Pangkahila W. 2007. *Anti-Aging Medicine: Memperlambat Penuaan Meningkatkan Kualitas Hidup*. Cetakan ke-1. Jakarta: Penerbit Buku Kompas.
- [29] Kojima, M., Hosoda, H., Matsuo, H., Kangawa, K. 2001. *Ghrelin: Discovery of the Natural Endogenous Ligand for the Growth Hormone Secretagogue Receptor*. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 12:118–122.
- [30] Robson, H., Siebler, T., Shalet, S.M., Williams, G.R. 2002. Interactions Between GH, IGF-I, Glucocorticoids, and Thyroid Hormones During Skeletal Growth. *Pediatric Research*, 52:137-147.
- [31] Leung KC, Johannsson G, Leong GM, Ho KK. 2004. *Estrogen regulation of growth hormone action*. *Endocr. Rev.* 25, 693–72110.1210/er.2003-0035.
- [32] Kay M. and R.Hausseman. 1997. *The Influence of Sex on Meat Production In Meat*. Edited by Cook DJ, Lawrie RA. London. Butterworth.
- [33] Thissen, J.P., Ketelslegers, J.M., Underwood, L.E. 1994. *Nutritional Regulation of the Insulin-Like Growth Factors*. *Endocr. Rev*, 15: 80–101.

Kosakonia sp. BAKTERI PROTEOLITIK YANG DIISOLASI DARI RUMEN DAN RETIKULUM SAPI ACEH

Safika^{1*}, Wenny Novita Sari², Gressha Vionalle Ademi³, Ulfy Widi Arsih³, dan Darmawi⁴

¹Departemen Penyakit Menular Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas IPB, Bogor, Indonesia

²Program Studi Doktoral Matematika dan Ilmu Pengetahuan Terapan, Universitas Syiah Kuala, Darussalam, Banda Aceh, Indonesia

³Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Syiah Kuala, Darussalam, Banda Aceh, Indonesia

⁴Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh, Indonesia

*Penulis yang sesuai: fikaghan@yahoo.com

ABSTRAK

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi bakteri proteolitik dari cairan ruminal dan retikulum sapi aceh berdasarkan gen 16S rRNA. Sampel yang digunakan adalah cairan ruminal dan retikulum sapi aceh yang disebelih di RPH Aceh Besar. Sampel diencerkan dan dikultur ke dalam media Agar Susu Skim pada usia 39°C selama 48 jam. Morfologi pertumbuhan koloni bakteri dalam medium diamati. Koloni menghasilkan zona bening terbesar diisolasi dan digunakan untuk isolasi Asam Deoksiribonukleat (DNA), amplifikasi dan sekuensing gen 16S rRNA. Hasil penelitian menunjukkan bahwa morfologi koloni dominan adalah warna putih kekuningan, bentuk bulat, posisi pada permukaan agar. Hasil analisis filogenetik isolat RS1 dan ReS2 yang diisolasi dari cairan rumen dan retikulum sapi aceh masing-masing memiliki hubungan keluarga yang dekat dan termasuk dalam kelompok bakteri Kosakonia. Homologi sekuens menunjukkan isolat RS1 dan ReS2 mungkin merupakan spesies Enterobacteriaceae baru atau spesies yang belum dikonfirmasi. Zona Halo yang diproduksi oleh bakteri ruminal memiliki diameter lebih lebar (25 mm vs 20 mm) daripada yang disebabkan oleh bakteri retikulum. Berdasarkan hasil, RS1 (bakteri dalam rumen) dan ReS2 (bakteri dalam retikulum) termasuk jenis yang serupa, yaitu Kosakonia sp. dengan aktivitas proteolitik. Agaknya, bakteri ini berasal dari rumen yang memasuki retikulum dengan pakan terdegradasi.

Kata kunci: Sapi Aceh, kosakonia, retikulum, rumen

PENGANTAR

Sapi Aceh adalah salah satu sapi lokal yang ada di Indonesia. Mereka memiliki ketahanan yang baik terhadap lingkungan yang buruk seperti krisis pakan, krisis ketersediaan air, makanan berserat tinggi, penyakit parasit, lingkungan bersuhu tinggi dan sistem pengembalaan tradisional yang luas (Abdullah et al., 2007; Safika et al., 2018a), postpartum pendek periode dan mampu beradaptasi dengan baik dengan lingkungan baru (Martojo, 2003). Meskipun produksinya lebih rendah dari ternak impor, sapi lokal harus dilestarikan dan dikembangkan. Dengan demikian, plasma nutfah Indonesia tidak hilang (Mohamad et al., 2012).

Produksi dan kesehatan ternak sangat bergantung pada proses pencernaan pakan. Ini lebih kompleks daripada proses pencernaan ternak lainnya. Berdasarkan studi fisiologi ternak ruminansia, rumen dan retikulum sering dianggap sebagai organ tunggal yang disebut reticulocorum di mana pakan dapat mengalir dari rumen ke retikulum dan sebaliknya. Di rumen dan retikulum sebanyak 60-90% dari pakan yang masuk terdegradasi menjadi bentuk-bentuk sederhana oleh mikroba seperti bakteri, protozoa, jamur dan Archaea. Selain itu, metabolisme mikroba dalam rumen ditentukan oleh total dan laju degradasi karbohidrat dan protein (Colville dan Bassett, 2014).

Bakteri proteinolitik ditemukan dalam sistem pencernaan sapi. Mereka mampu mendegradasi protein karena enzim ekstraselulernya. Protease mengkatalisis terminasi ikatan peptida dalam protein, menjadi asam amino (Desiandura et al., 2014). Ketersediaan dan kemampuan bakteri dalam mendegradasi protein akan mempengaruhi jumlah asam amino yang masuk ke aliran darah (Genzebu dan Tesfay, 2015).

Bakteri proteinolitik yang ditemukan dalam rumen sapi telah diidentifikasi sebagai *Bacteroides amylophilus*, *Clostridium sporogenes*, *Bacillus licheniformis*, *Prevotella ruminicola*, *Ruminobacter amylophilus*, *Clostridium aminophilum*, *Clostridium aminophilum*, *Clostridium aminofilum Lachonospira multiparus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus mojavensis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Tatumella*, dan *Pseudomonas* (Kamra, 2005; Alnahdi, 2012; Das dan Qin, 2012; Petri et al., 2013; Vijayaraghavan dan Vincent, 2013; Peng et al., 2015; Safika et al., 2018b).

Saat ini, tidak ada laporan mengenai jenis bakteri proteolitik yang ditemukan di rumen dan retikulum sapi Aceh. Sementara itu, data penting sebagai informasi dasar untuk meningkatkan produktivitas sapi Aceh berdasarkan efisiensi proses pencernaan. Dengan demikian, penting untuk melakukan penelitian tentang identifikasi bakteri proteolitik yang ditemukan dalam rumen dan retikulum sapi aceh berdasarkan gen 16S rRNA mereka.

BAHAN DAN METODE

Koleksi Sampel

Sampel yang digunakan adalah konten ruminal dan cairan retikulum yang dikumpulkan dari 5 sapi Aceh yang disembelih di Rumah Pemotongan Hewan Lambaro, Aceh Besar. Konten ruminal dikumpulkan dalam rangkap tiga yaitu dari bagian kiri, kanan, dan tengah rumen. Ini bertujuan untuk membuat sampel menjadi homogen. Semua sampel dibawa dalam kondisi es ke Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala untuk diperiksa.

Isolasi Bakteri Proteolitik

Sampel aliquot (1 mL) disebarluaskan ke dalam cawan Petri steril, ditambah dengan 20 mL media Skim Milk Agar menggunakan metode tuang, dan diinkubasi pada suhu 39°C selama 48 jam. Diameter zona halo yang muncul diukur dan metode pewarnaan gram dilakukan. Koloni murni dengan zona bening terluas dikultur menjadi media cair dan diinkubasi selama 48 jam. Pelet sel bakteri diperoleh dengan memusatkan campuran pada 7000x g selama 5 menit dan digunakan untuk ekstraksi Asam Deoksiribonukleat (DNA).

Ekstraksi DNA

Total DNA diekstraksi menggunakan kit Bakteri (Geneaid) Presto TM Mini sesuai protokol yang disediakan oleh pabrik. Proses dimulai dengan penambahan buffer ekstraksi 180 µL dan Proteinase-K 20 µL ke dalam mikrotube steril yang berisi pelet sel bakteri. Setelah langkah inkubasi pada usia 60 tahun° C selama 10 menit, campuran dicampur dengan 200 µL buffer GB, diinkubasi pada 70°C selama 24 jam, dan ditambahkan dengan 200 µL etanol absolut. Seluruh campuran dituangkan ke dalam kolom spin (dalam tabung koleksi) dan disentrifugasi pada 14000-16000x g selama 1 menit. Kolom ditambahkan dengan 400 µL Buffer W1 dan disentrifugasi pada 14000-16000x g selama 30 detik. Setelah membuang aliran melalui, kolom ditambahkan dengan 600 µL buffer W2 dan disentrifugasi pada 14000-16000x g selama 30 detik, diikuti dengan membuang aliran melalui. Kolom ditambahkan dengan 30-50 µL buffer elusi, dan diinkubasi pada suhu kamar selama 3-5 menit, dan disentrifugasi pada 14000-16000x g selama 1 menit.

Analisis filogenetik

Pengurutan gen 16S rRNA dilakukan oleh Macrogen Inc. (Korea) hasilnya dibandingkan dengan gen referensi menggunakan Pencarian Alignment Dasar Lokal Program Alat (BLAST) di NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> sedangkan homologi dari urutan gen 16S rRNA dianalisis menggunakan data dalam GeneBank. Pohon filogenetik dibangun

menggunakan matriks model tetangga-bergabung dari MEGA 7.0 (Kumar et al., 2016), dengan metode substitusi Maximum Composite Likelihood (Sari et al., 2017) dan analisis bootstrap 1000 ulangan set data.

HASIL DAN DISKUSI

Morfologi bakteri Proteolitik

Isolasi bakteri proteolitik yang dikumpulkan dari isi ruminal dan cairan retikulum sapi Aceh dilakukan pada medium SMA yang merupakan media agar selektif untuk bakteri proteolitik. Ini bertujuan untuk mengisolasi bakteri strain murni yang diinginkan dan menghambat pertumbuhan strain bakteri lain yang tidak diinginkan. Koloni yang tumbuh pada media SMA ditunjukkan pada Gambar 1. Pengamatan morfologis menunjukkan bahwa koloni umumnya memiliki bentuk lingkaran, cembung, halus dengan seluruh margin, warna putih kekuningan dan zona halo.

Perbedaan morfologis dan diameter zona halo menunjukkan bahwa bakteri tersebut berasal dari spesies yang berbeda. Dapat juga diasumsikan bahwa enzim yang diproduksi oleh masing-masing bakteri memiliki sifat yang berbeda. Selanjutnya, RS1 dan ReS2 dikarakterisasi dengan pewarnaan Gram. Ini menunjukkan bahwa mereka adalah bakteri gram negatif berbentuk basil (Gambar 2). RS1 dan ReS2 adalah bakteri gram negatif berbentuk basil yang tidak membentuk spora, batang motil dengan flagela peritrichous. Sementara negatif untuk produksi indol, bakteri positif untuk fruktosa, galaktosa, glukonat, glukosa, gliserol, laktosa, malat, maltosa, manitol, mannosa, sorbitol, dan sukrosa.

Bakteri proteolitik adalah bakteri yang mensekresi protease, yang menghasilkan enzim mereka pada media tumbuh. Mereka membentuk zona halo di sekitar koloni karena enzim yang dihasilkan mampu mendegradasi kasein dalam Skim Milk Agar dengan memutus ikatan peptida CO-NH. Lingkaran cahaya ona yang dihasilkan oleh bakteri rumen dan retikulum masing-masing berkisar antara 10-25 mm dan 0,9-20 mm. Selain itu, RS1 yang dikumpulkan dari rumen sapi aceh memiliki zona bening terlebar di antara bakteri rumen sekitar 25 mm, sedangkan ReS2 yang dikumpulkan dari retikulum memiliki zona bening terlebar 20 mm.

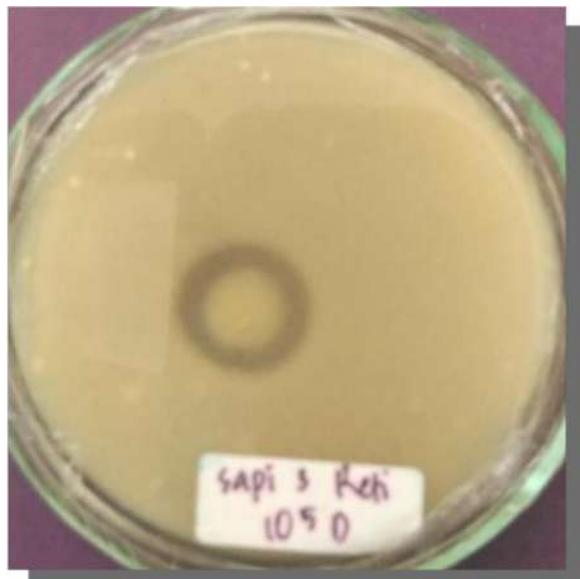
Makanan hijauan serat tinggi tanpa sumber protein tambahan mengurangi keberadaan bakteri proteolitik atau mikroba dalam rumen ternak. Menurut Jones et al. (1994) dan McSweeney et al. (1999) pakan polongan mengandung kompleks protein-tanin (polifenol). Ini mengurangi ketersediaan nitrogen dalam rumen dan menghambat pertumbuhan bakteri dominan dalam rumen terutama bakteri proteolitik karena kurangnya nitrogen.

Bakteri RS1 dan ReS2 memiliki jenis yang sama, yaitu Kosakonia sp., Mungkin bakteri ini berasal dari rumen dan memasuki retikulum dengan pakan terdegradasi. Berdasarkan penelitian, zona halo yang muncul oleh bakteri rumen memiliki diameter yang lebih luas daripada yang disebabkan oleh bakteri retikulum. Rumen adalah tempat awal di mana protein terdegradasi oleh proteinase. Enzim mengubah protein menjadi peptida dan asam amino, yang dapat dimanfaatkan secara langsung oleh mikroflora. Selain

itu, peptida dan asam amino juga dapat terdegradasi oleh enzim peptidase dan deaminase menjadi asam lemak rantai pendek dan amonia. Lipatan retikulorumen adalah bagian yang menghubungkan rumen dan retikulum. Dengan demikian, bolus makanan dapat mengalir dari rumen ke retikulum atau sebaliknya. Pakan yang belum dicerna dalam rumen akan dicerna di retikulum. Protein yang dikonsumsi oleh ruminansia adalah tidak sepenuhnya terdegradasi dalam rumen dan akan membutuhkan waktu lebih lama untuk mencerna



(Sebuah)

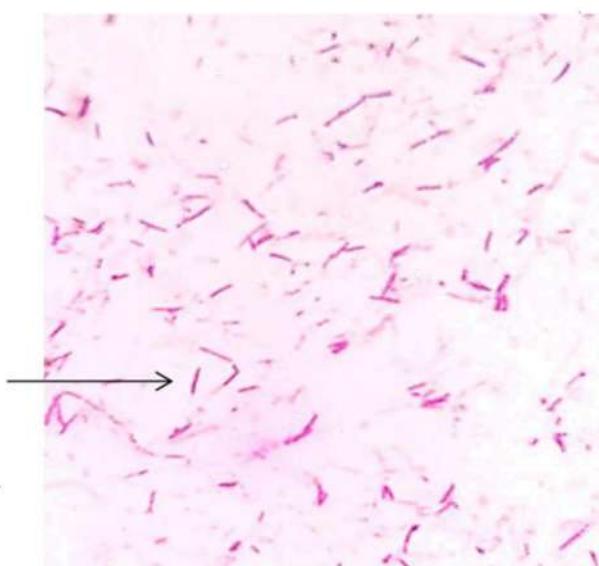


(b)

Gambar 1. Koloni-koloni yang tumbuh pada medium Skim Milk Agar memiliki zona halo yang jelas. A = Bakteri dikumpulkan dari rumen, b = Retikulum cairan ternak aceh

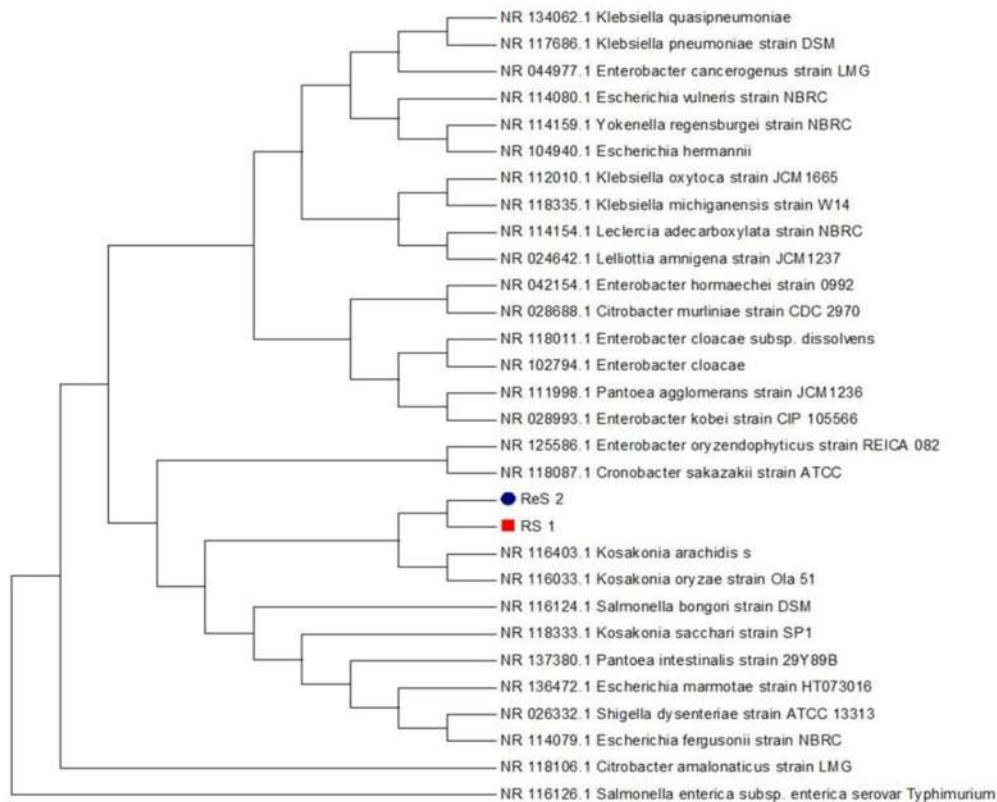


(Sebuah)



(b)

Angka. 2. Hasil uji pewarnaan Gram dengan perbesaran 1000x. A = RS1, bakteri yang dikumpulkan dari kandungan ruminal sapi Aceh, b = ReS2, bakteri yang dikumpulkan dari cairan retikulum sapi Aceh



Gambar 3. Pohon filogenetik RS1 (bakteri dikumpulkan dari kandungan rumen) dan ReS2 (bakteri dikumpulkan dari cairan retikulum). Sebagai outgroup adalah *Salmonella enterica*

semuanya di dalamnya. Oleh karena itu, protein yang tidak tercerna akan dibawa ke retikulum untuk diproses lebih lanjut (Safika et al., 2017).

Homologi urutan DNA dan Analisis filogenetik

Penyelarasan telah dilakukan menggunakan program BLASTN. Homologi urutan DNA dan referensi DNA dalam GenBank dapat ditentukan dengan menyelaraskan urutan DNA dengan data nukleotida di Pusat Informasi Bioteknologi Nasional (NCBI) online melalui <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. (Ghasemi et al., 2011).

Urutan data yang diambil dari GenBank memiliki ukuran yang berbeda. Sekuens DNA dengan ukuran dan posisi gen yang sama digunakan untuk mendapatkan analisis yang benar. Untuk mendapatkan posisi yang benar, penyelarasan DNA dilakukan menggunakan ClustalW diikuti dengan analisis filogenetik menggunakan MEGA 7.0. Meskipun program Blast menunjukkan hasil yang berbeda, RS1 dan ReS2 memiliki hubungan keluarga yang dekat. Selain itu, mereka memiliki hubungan keluarga yang dekat dengan *Kosakonia arachidis* dan *Kosakonia oryzae* (Gambar 3).

Skor kesamaan yang berkisar antara 97% -100% menunjukkan bahwa gen berasal dari spesies yang sama. Dengan cara yang berbeda, skor kesamaan yang kurang dari 97% menunjukkan bahwa gen tersebut berasal dari spesies yang berbeda (Vandamme et al., 1996; Janda dan Abbot, 2007). Analisis homologi menunjukkan bahwa RS1 (nomor akses:MH900180) memiliki skor kesamaan 96% dengan

Kosakonia arachidis (nomor tambahan: NR_116403.1). Sementara itu ReS2 (nomor tambahan: MH922844) memiliki skor kesamaan 91% dengan strain *Kosakonia radicincitans* DSM (nomor tambahan:NR 117704.1). Ini menunjukkan bahwa RS1 dan ReS2 berasal dari spesies baru atau spesies yang tidak dapat dikonfirmasi. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk menentukan apakah isolat adalah spesies baru, seperti analisis hibridasi DNA-DNA, kandungan GC dan analisis asam lemak bebas.

Sebelumnya, *Kosakonia* milik gen Enterobacter tetapi dipisahkan menjadi kelompok spesifik berdasarkan analisis urutan multilokus dari gen pengkode protein seperti gen rpoB (RNA polimerase β subunit), gyrB (gen gyrase subunit B gen B), infB dan gen atpD (Brady et al., 2013). Ini adalah bakteri gram negatif berbentuk batang, motil dengan flagela peritrichous, dan bakteri non-spora yang dapat hidup secara mesofilik pada suhu optimum 28°C dan pH 7. Bakteri memiliki reaksi positif terhadap L-alanin, D-selobiosa, sitrat, D-fruktosa, D-galaktosa, D-glukosa, gliserol, maltosa, D-manitol, dan mannosa-D. Perbedaan antara *Kosakonia* dan *E. cloacae* adalah dalam pemanfaatan D-arabitol dan L-fucose (Madhaiyan et al., 2010; Chen et al., 2014). Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa Enterobacter penghasil-selulase juga ditemukan pada sapi aceh (Sari et al., 2017).

Metabolisme nitrogen terutama dihasilkan oleh aktivitas metabolisme bakteri proteolitik ruminal seperti *Kosakonia*. Meskipun *Kosakonia* dikenal sebagai a

Bakteri pengikat nitrogen, mampu mengubah nitrogen menjadi amonia dalam rumen. Efisiensi nitrogen makanan yang lolos dari degradasi rumen adalah sumber utama protein dan kebutuhan asam amino ternak.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil, RS1 (bakteri dalam rumen) dan RS2 (bakteri dalam retikulum) memiliki jenis yang sama, yaitu, Kosakonia sp. memiliki aktivitas proteolitik. Agaknya, bakteri ini berasal dari rumen yang memasuki retikulum dengan pakan terdegradasi. Zona Halo yang dimodifikasi oleh bakteri rumen memiliki diameter lebih lebar (25 mm) dibandingkan dengan yang disebabkan oleh bakteri retikulum (20 mm).

UCAPAN TERIMA KASIH

Para penulis sangat berterima kasih kepada Direktorat Jenderal Penguatan Penelitian dan Pengembangan Republik Indonesia, untuk pendanaan hibah kerja dari Fundamental (No. 305 / SP2H / PL / Dit.Litabmas / II / 2015).

REFERENSI

- Abdullah, M.A.N., R.R. Noor, S.H. Martojo, D.D. Solihin, and E. Handiwirawan. 2007. Phenotypic diversity of Aceh cattle in Nangroe Aceh Darussalam. *J. Indon. Trop. Anim. Agric.* 32(1):11-12.
- Alnahdi, H.S. 2012. Isolation and screening of extracellular proteases produced by new isolated *Bacillus* sp. *J. Appl. Pharmaceut. Sci.* 2(9):71-74.
- Baker, G.C., J.J. Smith, and D.A. Cowan. 2003. Review and re-analysis of domain specific 16S primers. *J. Microbiol. Meth.* 55:541-555.
- Brady, C., I. Cleenwerck, S. Venter, T. Coutinho, and P. De Vos. 2013. Taxonomic evaluation of the genus Enterobacter based on multilocus sequence analysis (MLSA): Proposal to reclassify *E. nimiripressuralis* and *E. amnigenus* into *Lelliottia* gen. nov. as *Lelliottianimiripressuralis* comb. nov. and *Lelliottiannigena* comb. nov., respectively, *E. gergoviae* and *E. pyrinus* into *Pluralibacter* gen. nov. as *Pluralibactergergoviae* comb. nov. and *Pluralibacterpyrinus* comb. nov., respectively, *E. cowanii*, *E. radicincitans*, *E. oryzae* and *E. arachidis* into *Kosakonia* gen. nov. as *Kosakoniacionawai* comb. nov., *Kosakoniadaradicincitans* comb. nov., *Kosakoniaoryzae* comb. nov. and *Kosakoniaarachidis* comb. nov., respectively, and *E. turicensis*, *E. helveticus* and *E. pulveris* into *Cronobacter* as *Cronobacterzurichensis* nom. nov., *Cronobacterhelveticus* comb. nov. and *Cronobacterpulveris* comb. nov., respectively, and emended description of the genera *Enterobacter* and *Cronobacter*. *Syst. Appl. Microbiol.* 36(5):309-319.
- Chen, M., B. Zhu, L. Lin, L. Yang, Y. Li, and Q. An. 2014. Complete genome sequence of *Kosakonia sacchari* type strain SP1. *Stand. Genomic. Sci.* 9:1311-1318.
- Colville, T. and J.M. Bassett. 2014. *Clinical Anatomy and Physiology of Veterinary Technician*. 3rd ed. Elsevier. Canada.
- Das, K.C. and W. Qin. 2012. Isolation and characterization of superior rumen bacteria of cattle (*Bos taurus*) and potential application in animal feedstuff. *Open J. Anim. Sci.* 2(4):224-228.
- Desiandura, K., M.A.A. Arif, A.Azmijah. 2014. The potential of biofermentor to crude fiber, organic matter and Fe content of rambutan (*Nephelium lappaceum*) peels alternative feed stuff. *Agroveteriner*.2(2):110-117.
- Genzebu, D. and G. Tesfay. 2015. The role of bacteria in nitrogen metabolism in the rumen with emphasis of cattle. *Res. J. Agric. Env. Manage.* 4(7):282-290.
- Ghasemi, Y., S.R. Amini, A. Ebrahimnejad, A. Kazemi, M. Shahbazi, and N. Talebnia. 2011. Screening and isolation of extracellular protease producing bacteria from the maharloosalt lake. *Iranian J. Pharmaceut. Sci.* 7(3):175-180.
- Janda, J.M. and S.M. Abbott. 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pulses, perils, and pitfalls. *J. Clin. Microbiol.* 45(9):2761-2764.
- Jones, G.A., T.A. McAllister, K.J. Cheng, and A.D. Muir. 1994. Effect of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop) on growth and proteolysis by four strains of rumen bacteria: Resistance of *Prevotella* (*Bacteroides*) ruminicola B14. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1374-1378.
- Kamra, D.N. 2005. Rumen microbial ecosystem. *Curr. Sci.* 89(1):124-135.
- Kumar, S., G. Stecher, and K. Tamura. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger data sets. *Mol. Biol. Evol.* 33:1870-1874.
- Madhaiyan, M., S. Poonguzhali, J.S. Lee, V.S. Saravanan, K.C. Lee, and P. Santhanakrishnan. 2010. *Enterobacter arachidis* sp. nov., a plant growth promoting diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of groundnut. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60:1559-1564.
- Martojo, H. 2003. Indigenous Bali cattle: **The Best Suited Cattle Breed for Sustainable Small Farms in Indonesia**. Laboratory of Animal Breeding and Genetics. Faculty of Animal Science. Bogor Agricultural University. Indonesia.
- Mcsweeney, S.C., B. Palmer, R. Bunch, and O.D. Krause. 1999. Isolation and characterization of proteolytic ruminal bacteria from sheep and goats fed the tannin-containing shrub legume *Calliandra calothrysus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(7):3075-3083.
- Mohamad, K., M. Olsson, G. Andersson, B. Purwantara, H.T.A. van Tol, H.R. Martinez, B. Colenbrander, and J.A. Lenstra. 2012. The origin of Indonesian cattle and conservation genetics of the bali cattle breed. *Reprod. Domest. Anim.* 47:18-20.
- Peng, S., J. Yin, X. Liu, B. Jia, Z. Chang, H. Lu, N. Jiang, and Q. Chen. 2015. First insights into the microbial diversity in the omasum and reticulum of bovine using Illumina sequencing. *J. Appl. Genet.* 56:393-401.
- Petri, R.M., T. Schwaiger, G.B. Penner, K.A. Beauchemin, R.J. Forster, J.J. McKinnon, and T.A. McAllister. 2013. Characterization of the core rumen microbiome in cattle during transition from forage to concentrate as well as during and after an acidotic challenge. *Plos One*. 8(12):1-15.
- Safika, Darmawi, F.S. Ramadhan, Nurhaspika, and Moliwati. 2018. Total bacteria and identification of proteolytic ruminal and reticulum bacteria from local kacang goat. *J. Kedokt. Hewan.* 12(1):17-22.
- Safika, S.W. Matondang, Darmawi, M. Abrar, Erina, and M. Jalaluddin. 2017. Total colony of cellulolytic bacteria in the rumen of aceh cattle. *J. Med. Vet.* 11(1):51-58.
- Safika, W.N. Sari, Darmawi, Y. Fahrimal, and S.F. Sentosa. 2018. Isolation and identification of a cellulolytic *Bacillus* from rumen of aceh's cattle. *Asian J. Microbiol. Biotech. Env. Sci.* 20(3):99-105.
- Safika, M. Fida, A. Pingkan, and Akhmaloka. 2013. Succession culture independent bacterial during manure composting process. *J. Pure Appl. Microbiol.* 7(13):269-276.
- Sari, W.N., Safika, Darmawi, and Y. Fahrimal. 2017. Isolation and identification of a cellulolytic *Enterobacter* from rumen of Aceh cattle. *Vet. World*. 10(12):1515-1520.
- Tamura, K., P. Daniel, P. Nicholas, S. Glen, N. Masatoshi, and K. Sudhir. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28(10):2731-2739.
- Vandamme, P., B. Pot, M. Gillis, and P. Vos De. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* 60:407-438.
- Vijayaraghavan, P.S. and G.P. Vincent. 2013. A simple method for the detection of protease activity on agar plates using bromocresolgreen dye. *J. Biochem. Tech.* 4(3):628-629.

Pengaruh Antibodi Ibu terhadap Histopatogenesis Virus Penyakit Newcastle pada Ayam Broiler

I Made Galih Diparayoga¹, Nyoman Mantik Astawa², Anak Agung Ayu Mirah Adi³

¹Dokter Hewan di Klinik Dokter Hewan Bali, Badung

²Laboratorium Virologi Hewan, Fakultas Kedokteran Hewan,
Universitas Udayana, Denpasar, Bali, Indonesia

¹²⁰ Laboratorium Patologi Hewan, Fakultas Kedokteran Hewan,
Universitas Udayana, Denpasar, Bali, Indonesia.
alamat yang sesuai: galihdiparayoga@gmail.com

ABSTRAK

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh antibodi ibu terhadap perubahan histopatologis dan distribusi antigen virus pada ayam broiler yang ditantang dengan virus ND APMV-1. Sebanyak 100 ayam dialokasikan menjadi 3 kelompok perlakuan yang terdiri dari kelompok I (titer antibodi $<2^3$ Unit HI), grup (titer antibodi $2^3 - 2^4$ Unit HI) dan kelompok III (antibodi titer $> 2^4$ Unit HI). Semua kelompok I, II dan III diinokulasi dengan isolat virus ND tipe viscerotropic velogenic dengan dosis 1000 TCID₅₀. Perubahan histopatologis yang diamati dalam sistem saraf adalah endotelium dan pemborgol perivaskular. Pewarnaan imunohistokimia menunjukkan bahwa sel-sel yang terinfeksi NDV ditemukan di sebagian besar organ baik di sel-sel inflamasi dan di sel epitel banyak organ terutama dalam sistem saraf, pernapasan dan pencernaan. Gejala neurologis dan lesi saraf tertinggi pada kelompok II (titer antibodi $2^3 - 2^4$ Unit HI).

Kata kunci: antibodi ibu, penyakit newcastle, histopatologis, imunohistokimia

PENGANTAR

Genus Avulavirus milik keluarga Paramyxoviridae dan ditetapkan sebagai avian paramyxovirus tipe 1 (APMV-1), salah satu dari 12 serotype APMV yang teridentifikasi (Alexander, 2000). Tes serologis adalah alat yang berguna dalam diagnosis infeksi. Tes inhibisi hemagglutinasi (HI) adalah tes yang paling umum digunakan untuk mendeteksi respon imun pada burung yang terkena dampak (Alexander dan Senne, 2008^b). Newcastle Disease (ND) menyebabkan kerugian ekonomi yang sangat besar bagi peternak unggas komersial di seluruh dunia (Qin et al., 2008). Agen etiologi dari ND adalah strain virulen dari avian paramyxovirus-1 (Yu et al., 2001). Penyakit ini ditandai oleh gangguan pernapasan, gangguan sistem saraf, masalah pencernaan dan reproduksi (Alexander dan Senne, 2008). Tabbu (2000) melaporkan bahwa anak ayam dari orang tua yang diimunisasi memiliki tingkat antibodi yang diturunkan secara maternally (MDA) yang melindungi mereka dari virulen dan vaksin virus. Dilaporkan juga bahwa MDA adalah pelindung dan menetralisir virus vaksin jika ada

anak-anak ayam divaksinasi di hadapan MDA tingkat tinggi. Untuk merumuskan jadwal vaksinasi yang tepat dan langkah-langkah pengendalian, status serologis NDV di antara ayam perlu dijelaskan. Sebagian besar spesies burung tampaknya rentan terhadap infeksi dengan APMV-1 baik virulensi tinggi dan rendah untuk ayam, meskipun tanda-tanda klinis terlihat pada burung yang terinfeksi sangat bervariasi dan tergantung pada faktor-faktor seperti: virus, spesies inang, usia inang, infeksi dengan organisme lain, tekanan lingkungan dan status kekebalan (Kencana, 2012).

Titer MDA secara alami memiliki efek pada patogenesis ND pada ayam terutama pada terjadinya gejala neurologis ND .. Tingkat sub-protektif MDA yang tidak dapat mencegah ayam dari infeksi NDV tetapi mencegah dari kematian, sering menyebabkan infeksi kronis yang berkepanjangan. Infeksi kronis yang berkepanjangan seperti itu sering menyebabkan penyebaran virus ke otak. Akibatnya, tanda-tanda klinis neuronal sering diamati dengan kerusakan otak permanen. Sebuah studi kemudian dilakukan untuk

menyelidiki efek antibodi ibu dalam serum pada terjadinya tanda-tanda neuronal pada ayam yang ditantang dengan galur NDV yang ganas.

BAHAN DAN METODE

Ini adalah penelitian eksperimental dengan desain acak. Sebanyak 100 ayam dialokasikan menjadi 3 kelompok perlakuan sesuai dengan titer antibodi ibu mereka terhadap NDV: kelompok I (titer antibodi $<2^3$ Unit HI), kelompok II (antibodi titer $2^3 - 2^4$ Unit HI) dan kelompok III (antibodi titer $>2^4$ Unit HI). Grup I, II dan & ditantang dengan virus ND velogenik pada 1000 TCID₅₀per ayam. Dua minggu setelah infeksi, ayam-ayam necropsied dan spesimen dari masing-masing organ disiapkan untuk pewarnaan histopatologis dan imunohistokimia.

Satu ml darah dikumpulkan dari vena brakialis dan dibiarkan semalam pada jam 4^{Hai}C . Serum dipisahkan dari bekuan darah dengan sentrifugasi pada 2000 rpm selama 5 menit. Serum kemudian dicampurkan dalam tabung eppendorf dan disimpan pada -20^{Hai}C .

Tes HI dilakukan untuk menentukan titer antibodi ibu pada setiap ayam. Serial pengenceran serum dua kali lipat dari masing-masing ayam disiapkan. Empat unit HA NDV kemudian ditambahkan ke dalam setiap pengenceran serum dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar. Suspensi 1% sel darah merah ayam ditambahkan, dikocok dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu kamar. Titer antibodi ditentukan sebagai antilog dari pengenceran serum tertinggi yang mampu sepenuhnya menghambat virus untuk hemagglutinate sel darah merah dan dinyatakan sebagai unit HI.

Pada umur 12 hari, ayam dikelompokkan sesuai dengan titer antibodi mereka dan semua ayam ditantang dengan 1000 TCID₅₀virus NDV velogenik yang sebelumnya telah dititrasi dalam kultur sel embrio fibroblast ayam. Virus tantangan pertama kali dititrasi dalam kultur sel embrio fibroblast ayam. Virus diencerkan untuk mendapatkan 1000 TCID₅₀per 0,1 ml. Prosedur tantangan dilakukan dengan inokulasi 1000 TCID₅₀ intraokular menjadi kedua mata. Ayam yang ditantang diamati untuk adanya tanda-

tanda klinis dan kematian ND. Ayam mati dengan tanda-tanda klinis ND tidak didekati pemeriksaan histopatologis dan imunokimia. Ayam yang bertahan selama 2 minggu setelah uji tantangan, baik dengan atau tanpa tanda-tanda klinis ND juga dikorbankan untuk pemeriksaan histopatologis dan imunokimia.

Pemeriksaan Histopatologis dan Imunokimia.

Organ-organ dari semua ayam yang dikorbankan menjadi sasaran pemrosesan jaringan untuk menyiapkan jaringan tertanam parafin sesuai prosedur rutin. Jaringan dalam blok parafin dipotong pada ketebalan 4 mikron dan dilapisi pada slide mikroskop yang dilapisi poli-L-lisin. Untuk pemeriksaan histopatologis, jaringan diwarnai dengan hematoxyline dan eosin (HE) sesuai dengan prosedur rutin. Untuk pewarnaan imunohistokimia, jaringan pada slide mikroskop pertama-tama dideparinasi dengan xylene (2 x 5 menit), direhidrasi dengan etanol absolut (2 x 5 menit), dan dicuci dengan PBS (2 x 2 menit). Pengambilan antigen dilakukan dengan memanaskan jaringan pada 95^{Hai}C selama 20 menit dalam buffer sitrat pH 6,0. Peroksidase endogen diaktifkan oleh jaringan yang dirawat dengan 3% H₂HAI₂ selama 20 menit pada suhu kamar. Setelah dua kali dicuci dengan PBS, 100 µl antibodi monoklonal terhadap NDV (diencerkan 1:20 dalam PBS dengan susu skim 2% ditambahkan dan diinkubasi untuk semalam pada jam 4^{Hai}C). IgG anti-tikus terkonjugasi dengan biotin kemudian ditambahkan (Biocare USA) dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar. Streptavidin-HRP (Biocare) kemudian ditambahkan dan diinkubasi selama 20 menit pada suhu kamar. Setelah pencucian ekstensif (4 x 5 menit) dengan PBS, diazinobenzidine (DAB) kemudian ditambahkan selama 5 menit pada suhu kamar. Sel-sel dalam jaringan diimbangi dengan hematoklin Mayer dan didehidrasi dengan etanol (2 x 5 menit), dibersihkan dengan xylene (2 x 5 menit) dan dipasang dengan entellan. Sel-sel yang mengandung antigen NDV diamati pada mikroskop cahaya.

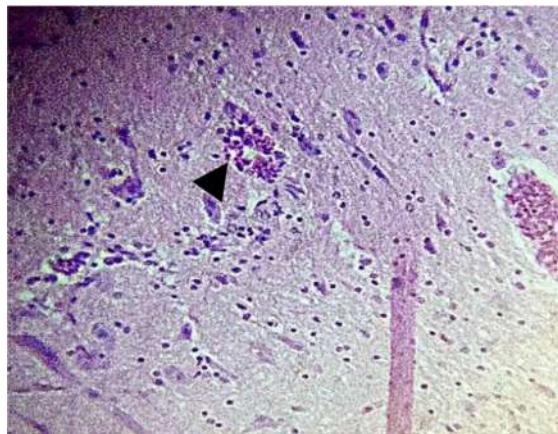
HASIL DAN DISKUSI

Masa Inkubasi dan Durasi Tanda-Tanda Klinis Pasca-Tantangan

Mengikuti tes tantangan dengan 0,1 ml 1000 TCID₅₀ dengan inokulasi intraokular pada mata kiri dan kanan, berbagai tanda klinis diamati. Masa inkubasi adalah 1-6 hari dengan rata-rata 3,33 hari. Durasi penyakit adalah 1-9 hari dengan rata-rata 4,76 hari.

Pengaruh Titer Antibodi Ibu pada Masa Inkubasi, Kelangsungan Hidup dan Tanda-Tanda Klinis

Pada ayam dengan antibodi ibu titer <2³, rata-rata masa inkubasi adalah 3,47



Gambar 1. Ditemukan Endotheliosis, pembesaran perivaskular dan edema perbesaran perivaskular (panah) 400 X (Titer AB 2³ - 2⁴)

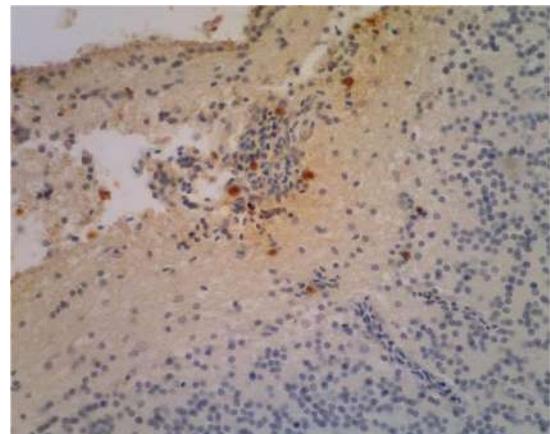
Pengaruh Titer Antibodi Ibu terhadap Distribusi Virus di Otak, Paru-paru dan Usus

Di otak ayam dengan titer antibodi ibu 2³-2⁴ Satuan HI, tingkat rata-rata infeksi virus ND adalah 3,86. Ini secara signifikan lebih tinggi daripada pada ayam dengan titer antibodi ibu <2³ (2.48) dan 126 2⁵(1,50). Pada organ usus, tingkat infeksi paling tinggi pada kelompok ayam dengan titer antibodi ibu <2³ (2.86) dan tingkat infeksi terendah adalah

hari dan lama sakit adalah 4,36 hari. Pada ayam dengan antibodi ibu titer 2³-2⁴, rata-rata periode inkubasi dan lamanya penyakit adalah 8,1 hari dan 5,7 hari masing-masing. Sementara itu, pada ayam dengan titer antibodi ibu 2⁵, periode inkubasi rata-rata dan durasi penyakit masing-masing adalah 6 hari dan 8 hari.

Perubahan Histopatologis Otak, Paru-Paru dan Usus

Perubahan histopatologis otak pada 3 kelompok perlakuan ayam dilakukan perivaskular dengan tingkat yang berbeda. Cuffing perivaskuler yang paling luas ditemukan di otak ayam dengan antibodi titer 2³-2⁴ (Gambar 1 dan 2).



Gambar 2. Sel-sel positif yang mengandung antigen virus yang ditemukan dalam sel-sel inflamasi ND (panah) pembesaran 400 X (Titer AB 2³ - 2⁴)

tercatat pada kelompok ayam dengan titer antibodi ibu > 2⁵ (1,00).

Peran Antibodi Ibu dalam Tanda-Tanda Klinis ND

Pada anak ayam berumur 12 hari ketika uji tantangan dilakukan, titer antibodi ibu terhadap virus ND pada ayam sebagian besar di bawah tingkat perlindungan. Tingkat perlindungan antibodi terhadap ND minimum dilaporkan 2⁵ Unit HI (Suryana, 2006). Namun, masih ada beberapa ayam

titer antibodi di atas tingkat perlindung (2^5 Unit HI). Ayam dengan titer antibodi ibu $<2^3$ Unit HI umumnya meninggal dengan tanda-tanda klinis khas pasca tantangan ND. Titer antibodi perlindung terhadap virus ND pada infeksi ayam adalah $> 2^4$ Unit HI. Suryana (2006) melaporkan bahwa ayam dengan titer antibodi rata-rata minimal 2^5 Unit HI memiliki tingkat perlindungan 100%, ayam dengan titer antibodi ibu

[20]. 2^4 Unit HI memiliki tingkat perlindungan 60%, dan mereka dengan titer antibodi ibu $> 2^3$ Unit HI memiliki perlindungan 40%. Sementara pada kelompok kontrol ayam yang tidak divaksinasi, tingkat perlindungannya adalah 0%. Kusmaedi (2001) dan Allan (1978) menyatakan bahwa uji menantang ND, ayam mengandung antibodi $<2^2$ Unit HI mengakibatkan 100% meninggal. Titer antibodi antara 2^2 - 2^4 angka kematian unit mencapai 10%, tetapi titer antibodi 2^5 - 2^6 Unit HI menghasilkan angka kematian 0%.

Tabel 1. Rata-Rata Skor Antigen Virus ND Immunohistokimia dalam Organ-Organ Otak, Paru-paru dan Usus

Kelompok ibu titer antibodi	Otak	Paru-paru	Usus
Grup I ($<2^3$ HAI Satuan)	2.48	2.76	2.86
Grup II (2^5 - 2^4 Unit HI)	3.86	2.43	2,00
Kelompok III ($> 2^4$ HAI Satuan)	1,50	2,00	1,00

Pengaruh Titer Antibodi Ibu terhadap Tingkat Infeksi Virus pada Otak dan Organ Lain.

Virus ND velogenik di Indonesia adalah viscerotropik atau viscerotropik velogenik (Adi et al., 2010). Salah satu fenomena yang coba diungkapkan dalam penelitian ini adalah munculnya gejala neurologis pada ayam yang terinfeksi dengan virus ND. Hasil pewarnaan imunohistokimia dari jaringan otak menunjukkan bahwa ayam dengan titer antibodi ibu 2^3 - 2^4 Unit HI memiliki skor tertinggi infeksi virus ND dibandingkan dengan pada ayam dengan titer antibodi ibu 2^5 Unit HI dan $<2^3$ Unit HI. Hasil perubahan histopatologis menunjukkan bahwa ayam yang terinfeksi dengan gejala neurologis juga menderita endotheliosis, perivaskular cuffing dan edema perivaskular di otak. Ini

hasilnya mirip dengan yang dilaporkan oleh Bhaiyat et al., (1994) bahwa perivaskular cuffing pada infeksi akut, limfosit kapiler dan edema vena telah dikaitkan dengan proses infeksi virus ND. Kerusakan neurologis virus Newcastle yang terinfeksi ditemukan oleh (Ecco et al., 2011). Virus ND yang terinfeksi tidak merusak sel-sel neurologis tetapi hanya kerusakan pada hipertrofi ditandai endotel vaskular, vaskulitis khusus otak kecil (Nakamura et al., 2008).

Distribusi virus ND di organ saraf yang dilaporkan oleh Ecco et al. (2011) ditemukan pada ayam yang terinfeksi dengan viscerotropik imunopositif velogen terisolasi dan reaksi virus ND adalah sel-sel inflamasi dan astrogliosis. Namun, infeksi NDV pada ayam dapat mengakibatkan gejala neurologis yang bertahan lama setelah infeksi. Peran titer antibodi subprotektif telah disarankan dari beberapa penelitian. Ketika titer antibodi pada ayam terhadap virus ND berada pada tingkat subprotektif, ia tidak dapat mencegah infeksi, tetapi dapat melindungi ayam dari kematian setelah infeksi. Studi ini menunjukkan bahwa tingkat antibodi meternal pada anak ayam memainkan peran penting dalam melindungi terhadap infeksi virus ND yang menular. Titer $> 2^4$ Unit HI, tampaknya memberikan perlindungan terbaik, oleh karena itu program vaksinasi pada unggas produktif harus dievaluasi secara berkala.

REFERENSI

- AdiAAA, Astawa NM, Putra NM, Hayashi KSA, Matsumoto Y. 2010. Isolasi dan karakterisasi virus penyakit patogen Newcastle dari kasus alami di Indonesia. J Dokter Hewan Med Sci. 72 (3): 313-319.
- Alexander DJ. 2000 Penyakit Newcastle dan paramyxovirus unggas lainnya. JRev Sci Techs. 19 (2): 443-462.
- Alexander DJ, Senne DA. 2008. Penyakit Newcastle, paramyxovirus unggas lainnya, dan infeksi pneumovirus. Dalam Penyakit Unggas, J Gen Virol. 80 (2): 75-116.
- Alexander DJ, Senne DA. 2008b. Penyakit Newcastle dan pramyxovirus unggas lainnya. Dalam: Manual laboratorium untuk isolasi, identifikasi dan karakterisasi

- avianpathogens, Dufour-Zavala L. Asosiasi Ahli Patologi Burung Amerika. 7 (2): 135–141.
- AllanWH, LancasterJE, TothB. 1978. Vaksin penyakit Newcastle - produksi dan penggunaannya. Produksi hewan dan seri kesehatan FAO, 25 (10): 1-13.
- Bhaiyat MI, Ochiai K, Itakura C, Islam MA, Kida H. 1994. Lesi otak pada ayam broiler muda secara alami terinfeksi dengan strain mesogenik dari virus penyakit Newcastle. Avian Pathol. 23 (4): 693-708.
- EccoR, Susta L, Afonso CL, Miller PJ, Brown C. 2011. Lesi neurologis pada ayam secara eksperimental terinfeksi dengan isolat virus penyakit Newcastle yang ganas. Avian Pathol. 40 (2): 145-152.
- Kencana GAY. 2012. Virus Unggas Virus. Press Universitas Udayana. Denpasar.
- Kusmaedi. 2001. Teknik Uji Penghambatan Hemagglutinasi Untuk Mengukur Tingkat Kekebalan Terhadap Newcastle: 224-232.
- Nakamura K, Ohta Y, Abe Y, Imai K, Yamada. 2010 Patogenesis dari konjungtivitis yang disebabkan oleh virus penyakit Newcastle pada ayam bebas patogen tertentu, Avian Pathol. 33 (3): 371-376.
- Qin ZM, Tan LT, Xu HY, Ma B, Wang YL, Yuan XY, Liu WJ. 2008. Patotipikal karakterisasi dan epidemiologi molekuler isolat virus penyakit Newcastle dari berbagai inang di Cina dari tahun 1996 hingga 2005. J. Clin. Mikrobiol. 46 (2): 601-611.
- Suryana N. 2006. Pengamatan perlindungan ayam pasca vaksinasi penyakit Newcastle dengan uji tantang. Temu Teknis Nasional Tenaga Fungsional Pertanian. Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan. 21 (37): 35 - 39
- Tabbu CR. 2000. Penyakit Ayam dan Penanggulangannya: Penyakit Bakterial, Mikal, dan Viral. Kanisius, Yogyakarta.
- Yu L, Wang Z, Jiang Y, Chang L, Kwang J. 2001. Karakterisasi isolat virus penyakit Newcastle yang baru muncul dari Republik Rakyat Tiongkok dan Taiwan. J. Clin. Mikrobiol. 39 (10): 3512 - 35

JURNAL ASLI (DOKUMEN SUMBER)

Cultivated Pastures Affect Nutrient Intake and Feeding Behavior of Sheep

J. V. Emerenciano Neto^{a,*}, G. S. Difante^b, H. R. Medeiros^c, E. M. Aguiar^c, L. S. Fernandes^d, T. F. M. Trindade^c, M. G. Bezerra^e, H. C. B. Oliveira^c, & R. C. P. Galvão^c

^aFederal University of Vale do São Francisco, Academic Collegiate of Animal Science, Petrolina, Brazil

^bFederal University of Mato Grosso do Sul, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Sciences, Campo Grande, Brazil

^cFederal University of Rio Grande do Norte, Specialized Academic Unit in Agrarian Sciences, Macaíba, Brazil

^dFederal University of Paraíba, Center of Agrarian Sciences, Areia, Brazil

^eFederal University of the Semi-Arid Region, Program in Soil and Water Management, Mossoró, Brazil

*Corresponding author: joao_neto@zootecnista.com.br

(Received 03-10-2019; Revised 11-12-2019; Accepted 21-01-2020)

ABSTRACT

Cultivated pastures may increase the meat production of sheep, but it is necessary to understand the plant-animal relationships in a pastoral environment. This study aimed to assess the effect of forage cultivars on the intake and feeding behavior of sheep. Four treatments were evaluated, consisted of the cultivars *Panicum maximum* cvs. Aruana and Massai and *Brachiaria brizantha* cvs. Marandu and Piatã. Twenty-four sheep, male of the Santa Inês genotype, were used with six replications per treatment. Daily forage and nutrient intakes were evaluated in addition to time in grazing, rumination, and leisure activities. The animals in the pasture of Aruana grass demanded the most extended times of grazing and rumination ($p<0.05$). The leisure time was higher ($p<0.05$) in the animals kept in pastures of Piatã grass. The highest intakes of dry matter and crude protein in g/day ($p<0.05$) were found in the animals kept in the pasture of Marandu grass, and a smaller intake was found in the animals kept in the pasture of Massai grass. Intake of leaf blades was higher ($p<0.05$) in the animals kept in pastures of Massai and Marandu. The neutral detergent fiber intake did not differ among the cultivars. It is concluded that pasture structure and chemical composition of tropical forage cultivars influence the nutrient intake and feeding behavior of sheep. The low leaf blade offer of the pasture of the Aruana grass negatively affects the feeding behavior of the sheep, but the crude protein in forage of this cultivar favors the nutrient intake, feed conversion, and performance of sheep.

Keywords: *Brachiaria brizantha*; grazing; LIPE®; *Panicum maximum*; rumination

INTRODUCTION

In grazing livestock systems in tropical South American environments, the monoculture of perennial grasses of the genera *Brachiaria* and *Panicum* predominates with a forage production, concentrated in the rainy season (Sbrissia *et al.*, 2017). The use of cultivated pastures is a valuable tool to increase the productivity of sheep but should be considered as a technology that requires knowledge of plant-animal interrelationships. The efficiency of the productive system of grazing animals is affected by changes in the feeding behavior under conditions that limit pasture intake due to the inability to maintain a high rate of dry matter intake (Galli *et al.*, 1996). The understanding of feeding behavior of grazing animals makes it possible to define adequate pasture and animal management strategies and provides the ability to interfere positively with production results.

The composition of forage selected by grazing animals depends on several factors, including the composition of available forage species, the grazing season, the

growth stage, the pasture structure, and the individual preferences of the animals. The grazing pattern of the animal determines the quality of the diet consumed, in which dry matter intake is essential for animal performance by determining the nutrient intake, considering as the main protein and the energy needed for the care of maintenance and production requirements (Fontenelle *et al.*, 2011).

The understanding of the relationship between plants and animals in grazing systems becomes indispensable for success in livestock, as there is a direct effect between feeding behavior, consumption, and animal performance. However, the measurement of herbage intake of grazing animals is difficult; there are no smooth and precise methodologies. Some research has used techniques to estimate herbage intake and nutritional parameters in grazing cattle such as external and internal markers (Azevedo *et al.* 2014), these types of sheep surveys are rare. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of forage cultivars on forage and nutrient intake, as well as the feeding behavior of sheep in *Brachiaria* and *Panicum* pastures.

MATERIALS AND METHODS

The experiment was conducted in an area of the Research Group in Forage (GEFOR), located at the Academic Unit Specialized in Agricultural Sciences – the Federal University of Rio Grande do Norte - UFRN, in Macaíba, Rio Grande do Norte, Brazil. The geographical coordinates of the experimental area are latitude 5° 53' 35.12" south and longitude 35° 21' 47.03" Westland 160 m of altitude.

Animals, Experimental Design, and Diets

The experimental area of 2.88 ha was split into two lots of 1.44 ha, with four modules of 0.36 ha for each cultivar, which were subdivided into six paddocks of equal area (0.06 ha). The evaluation period was from April to September 2017, the rainy season in the region with an average monthly rainfall of 164 mm.

The treatments consisted of 4 tropical kinds of grass, two cultivars of *Panicum maximum*: Aruana and Massai grasses; and two of *Brachiaria brizantha*: Marandu and Piatã grasses. Pastures were managed by intermittent stocking. The pasture rest periods were 52 days, the time necessary for the height of the canopy to reach 50 cm. The occupation period of each paddock was 52 days, and the time was required so that approximately 50% of the available mass could be removed. To ensure the goals of height, we used the variable stocking rate according to the grass growth and the amount of available forage.

Samples were collected through manual grazing simulation during the evaluation periods of pasture availability. Morphological components (leaf blade and stem) were pre-dried at 55 °C, ground in a Wiley mill to 1 mm, and subsequently analyzed (Table 1).

The chemical composition of samples were analyzed according to AOAC (2005): dry matter (DM) was determined by drying in an oven at 105°C for 16 hours (method 973.18); ashes by burning at 600°C for 4 hours (method 942.05); the crude protein (CP) was estimated indirectly from total nitrogen (N) determined by Kjeldahl method (method 984.13), and acid detergent lignin (ADL) was determined with acid detergent fiber residue treated with 72% sulfuric acid (method 973.18). Neutral detergent fiber (NDF) and acid detergent fiber

(ADF) were determined according to Van Soest *et al.* (1991), using 16 microns polyester bags in Ankom 220 Fibre Analyzer (ANKOM Technology, Inc., NY, USA). We determined the *in vitro* dry matter digestibility (IVDMD) of the WCR varieties using the two-stage technique described by Tilley & Terry (1963) for a period of 72 hr using Ankom II Daisy Incubators (ANKOM Technologies, Inc.).

To evaluate the chemical composition of the forage (Table 1), samples were collected through manual grazing simulation during the evaluation periods of pasture availability. Twenty-four 90-day-old castrated male Santa Ines weaned lambs with average live weights of 23.8 ± 1.6 kg were used for evaluation kept in the pasture during the day (from 7 a.m. to 4 p.m.) and housed in a shed with collective stalls during the night with access to water and mineral salt *ad libitum*. Gastrointestinal nematode infestation was monitored weekly by counting the number of eggs per gram of feces (EPG), where ever reached 500 eggs/g of feces was realized oral anthelmintic application.

Sampling and Measurement

The forage allowance (FA) was calculated by dividing forage mass (FM) available in pre-grazing by the occupation period (OP) with stocking rate (SR), expressed in kg DM/ 100 kg live weight on each day (FA= (FM/ OP)/SR), according to Sollenberger *et al.* (2005). The animals were weighed weekly, and the average daily gain (ADG, g/day) was calculated by the difference between the weight of the animals at the beginning and the end of the experiment divided by the experiment days.

During the experiment, four periods (every two months) of marker delivery and feces collection were performed during two occupation stages. Those were the first and last days of the paddock occupation, to estimate the fecal output of DM (FO; g/animal/day) using LIPE® as an external marker (Saliba *et al.*, 2015). Capsules containing 250 mg of LIPE® were orally introduced for seven days (one capsule per animal per day) at 8 a.m. Feces were collected directly from the rectal bulb during the 5-day collection period, once a day. Feces started to be collected two days after the start of marker administration so that homogenization could occur throughout the entire digestive tract. Afterward, the

Table 1. Chemical composition of the morphological components in tropical pastures

Component of tropical pastures	Chemical composition (g/kg DM)						
	DM	CP	MM	NDF	ADF	ADL	IVDMD
Marandu grass (leaf blade)	245	150	77	618	319	41	684
Marandu grass (stem)	212	84	78	726	444	61	603
Piatã grass (leaf blade)	273	120	71	656	331	38	668
Piatã grass (stem)	241	67	68	746	445	58	580
Massai grass (leaf blade)	307	97	78	744	416	52	602
Massai grass (stem)	288	45	67	810	498	72	549
Aruana grass (leaf blade)	236	162	86	707	369	60	650
Aruana grass (stem)	238	85	73	767	474	73	557

Note: DM= dry matter, MM= mineral matter, CP= crude protein, NDF= Neutral detergent fiber, ADF= acid detergent fiber, ADL= acid detergent lignin, IVDMD= *in vitro* dry matter digestibility.

fecal samples were homogenized, dried (55°C for 72 h), and ground (1 mm) for further analysis.

LIPE® concentration in feces was determined using infrared spectroscopy in the Simoes and Saliba laboratory. The fecal output was estimated based on the ration of the amount of marker administrated to marker concentration in feces:

$$FO_{(g/\text{animal/day})} = (MAO / MCF) \times 100$$

where FO is the fecal output, MAO is the marker amount offered (LIPE®), and MCF is the marker concentration in feces (g/kg DM). The DMI estimate was obtained using the following equation:

$$DMI_{(\text{g/day DM})} = FO \times MCF / MCFO$$

where FO is the fecal output (g/day DM), MCF is the marker concentration in feces (g/kg DM), and $MCFO$ is the marker concentration in forage (g/day DM). Intake of the leaf blade and stem (g/day) was estimated by the proportion of the mass of each morphological component disappeared from the picket during grazing, and this proportion was applied in the dry matter consumption, once the base diet was pasture only. The nutrient intake was estimated by the sum of the ingested amount in each morphological component.

Evaluations of the intake pattern were conducted by observations, which were made in 24-hour shifts, and the animals' activities were recorded every 5 minutes. The animals were evaluated visually for feeding behavior, with three test animals for each observer. The biting rate was calculated from the time required for animals to perform 20 bites, then transformed into bites per minute (Hodgson, 1985). The observed activities were grazing, rumination, and idle times. All observations for the day were added up for each variable and expressed in h/day. Feeding and rumination efficiency (g_{DM}/h and g_{NDF}/h) were obtained by dividing the mean daily DM and NDF intake by the total time spent in grazing and rumination in 24 hours, respectively (Burger *et al.*, 2000).

Statistical Analysis

The experimental design was a randomized block design (possible effect of the area), the data were analyzed for variance and the averages compared by the Tukey test at 5% significance, using the statistical program SISVAR 5.6 (Ferreira, 2011). The model for data analysis was as follows:

$$Y_{ijk} = \mu + F_i + C_j + e_{ijk}$$

where Y_{ijk} is the dependent variable, μ is the overall mean, F_i is the effect of the cultivar (Marandu grass, Massai grass, Aruana grass, and Piatã grass), C_j is the effect of the block, and e_{ijk} is the error term.

Correlations were obtained by Pearson's correlation analysis and the t-test, considering significance at $p < 0.05$. The criterion for the classification of the correlation coefficient was $r \geq 0.80$ meaning a strong association and $0.50 < r \leq 0.70$ indicating a moderate correlation.

RESULTS

The lowest forage and leaf blade allowance were observed in the Aruana grass pastures (Table 2), while Massai pastures displayed the lowest stem allowance ($p < 0.05$). The highest dry matter intake (DMI) as g/day was observed in the animals kept in Marandu grass pastures and the lowest in those kept in Massai grass pastures ($p < 0.05$). The dry matter intake in %LW did not differ according to the cultivars ($p > 0.05$); the average intake was 2.43% of their live weights in dry forage.

The highest intake of leaf blades was observed in the animals kept in pastures of Massai and Marandu grass ($p < 0.05$) and the highest intake of the stem in the animals kept in Aruana grass pasture. The highest crude protein intake (CPI) as g/day and % LW ($p < 0.05$) were obtained by the animals kept in Marandu grass pastures and the lowest in Massai grass pastures (Table 3). Intake of mineral matter (MMI), neutral detergent fiber (NDF), and acid detergent fiber (ADF) in % LW did not differ according to cultivars ($p > 0.05$), followed the same behavior of DMI in % LW. The highest ADFI in g/day and acid detergent lignin (ADLI) as g/day and % LW were observed in the animals in Aruana grass. The MMI in g/day was higher in the animals kept in Marandu grass pastures. NDFI did not differ according to the cultivars ($p > 0.05$), with an average intake of 474.23 g/day of NDF.

The animals kept in Aruana grass pastures demanded the most extended ($p < 0.05$) grazing time (Table 4). The highest bit rates ($p < 0.05$) were observed in the animals kept on Marandu and Aruana grasses pastures and the lowest in Massai and Piatã pastures (Table 4). The highest time spent on rumination, and the shortest leisure time was observed in the sheep kept in the Aruana grass pastures ($p < 0.05$). The animals kept in Aruana grass pastured continuously as long as they

Table 2. Forage supply and dry matter intake by sheep in pastures of tropical pastures

Variables	Forages				CV (%)
	Marandu	Piatã	Massai	Aruana	
Forage allowance (kg DM/ 100 kg LW)	47.51 ^a	47.80 ^a	46.79 ^a	38.33 ^b	14.03
Leaf blade allowance (kg DM/ 100 kg LW)	26.35 ^b	27.98 ^b	34.01 ^a	18.14 ^c	17.57
Stem allowance (kg DM/ 100 kg LW)	21.16 ^a	19.82 ^a	12.78 ^b	20.20 ^a	14.89
Dry matter intake (g/day)	730.92 ^a	698.90 ^b	623.65 ^d	655.23 ^c	2.17
Dry matter intake (%LW)	2.66	2.59	2.29	2.21	12.03
Leaf blade intake (g/day)	543.76 ^a	514.81 ^b	546.16 ^a	360.33 ^c	2.26
Stem intake (g/day)	187.15 ^b	184.09 ^b	77.48 ^c	294.90 ^a	2.20

Note: DM= dry mater, LW= live weight, Means in the same row with different superscripts differ significantly ($p < 0.05$).

Table 3. Intake of nutritional components by sheep in pastures of tropical pastures

Variables	Forages				CV (%)
	Marandu	Piatã	Massai	Aruana	
Crude protein intake (g/day)	97.29 ^a	74.11 ^c	56.46 ^d	83.44 ^b	2.12
(%LW)	0.35 ^a	0.27 ^b	0.21 ^c	0.28 ^b	11.44
Mineral matter intake (g/day)	56.47 ^a	49.07 ^c	47.79 ^c	52.52 ^b	2.14
(%LW)	0.21	0.18	0.18	0.18	11.49
Neutral detergent fiber intake (g/day)	471.92	475.05	469.11	480.94	2.18
(%LW)	1.72	1.76	1.72	1.63	11.75
Acid detergent fiber intake (g/day)	256.56 ^{bc}	252.32 ^c	265.79 ^b	272.74 ^a	2.16
(%LW)	0.94	0.94	0.98	0.92	11.73
Acid detergent lignin intake (g/day)	33.71 ^b	30.24 ^c	33.98 ^b	43.15 ^a	2.10
(%LW)	0.12 ^b	0.11 ^b	0.13 ^b	0.15 ^a	11.36

Note: LW= live weight, means in the same row with different superscripts differ significantly ($p<0.05$).

Table 4. Time of grazing, rumination, and leisure of sheep kept on grasses of tropical grasses

Variables	Forages				CV (%)
	Marandu	Piatã	Massai	Aruana	
Grazing time (h/day)	8.26 ^b	7.38 ^c	8.10 ^b	9.00 ^a	3.84
Biting rate (bit/min)	47.17 ^a	36.24 ^b	35.57 ^b	44.10 ^a	21.77
Rumination time (h/day)	7.13 ^b	7.10 ^b	7.81 ^b	8.81 ^a	7.89
Leisure time (h/day)	8.41 _{ab}	9.26 ^a	8.03 ^b	6.22 ^c	9.62

Note: LW= live weight, means in the same row with different superscripts differ significantly ($p<0.05$).

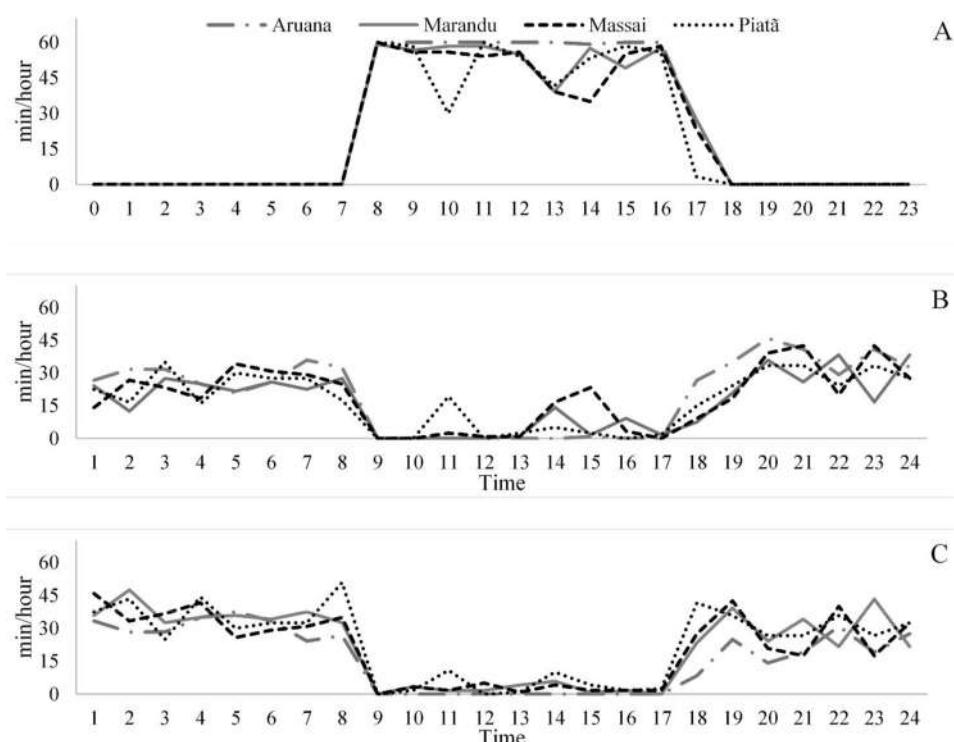


Figure 1. Grazing (A), rumination (B) and leisure/idle (C) activities of sheep on pastures of tropical grasses according to the time. Aruana (●), Marandu (□), Massai (△), Piatã (◇).

remained in the pasture (7 a.m. to 4 p.m.), the animals kept in the other cultivars reduced the time of grazing in the period between 1 p.m. and 3 p.m. (Figure 1A). After the grazing period, these animals divided their time into rumination and leisure activities, with predominance

for rumination in the period between 5 p.m. and 11 p.m. (Figure 1B) and for leisure between 11 p.m. and 07 a.m. of the following day (Figure 1C).

The highest feed efficiency (g_{DM}/h and g_{NDF}/h) was observed in the animals kept in Piatã pastures ($p<0.05$)

Table 5. Efficiency of feed and rumination, average daily gain, feed conversion of sheep on pastures of tropical grasses

Variables	Forages				CV (%)
	Marandu	Piatã	Massai	Aruana	
Efficiency of feed (gDM/h)	88.50 ^b	94.89 ^a	77.06 ^c	72.80 ^c	4.24
Efficiency of feed (gNDF/h)	57.15 ^{bc}	64.50 ^a	57.96 ^b	53.44 ^c	8.94
Efficiency of rumination (gDM/h)	103.16 ^a	99.25 ^a	80.31 ^b	74.57 ^b	9.12
Efficiency of rumination (gNDF/h)	66.60 ^a	67.46 ^a	60.40 _{ab}	54.73 ^b	8.94
Average daily gain (g/day)	46.97 _{ab}	41.36 ^b	42.63 ^b	65.15 ^a	35.75
Feed conversion	15.70 ^a	16.89 ^a	14.63 ^a	10.06 ^b	14.61

Note: DM= dry matter, NDF= neutral detergent fiber, means in the same row with different superscripts differ significantly ($p<0.05$).

Table 6. Correlation coefficients between variables of feeding behavior, intake and feed conversion of sheep on pastures of tropical grasses

	GT	RT	LT	LBI	SI	ADLI	FE	RE	FC
GT	-	0.66*	-0.87*	0.70*	0.53*	0.87*	-0.82*	0.84*	-0.51*
RT	-	-	-0.94*	0.58*	0.40 _{NS}	0.71*	-0.75*	0.81*	-0.31 _{NS}
LT	-	-	-	-0.67*	-0.50*	-0.83*	0.82*	-0.92*	0.40 _{NS}
LBI	-	-	-	-	-0.85*	-0.87*	-0.71*	0.57*	0.39 _{NS}
SI	-	-	-	-	-	0.70*	-0.17 _{NS}	0.73*	-0.22 _{NS}
ADLI	-	-	-	-	-	-	-0.75*	0.82*	-0.56*
FE	-	-	-	-	-	-	-	-0.58*	0.55*
RE	-	-	-	-	-	-	-	-	0.55*
FC	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Note: GT= grazing time, RT= rumination time, LT= leisure time, LBI= leaf blade intake, SI= stem intake, ADLI= Acid detergent lignin intake, FE= feed efficiency, RE= rumination efficiency, FC= feed conversion, NS= (Not significant), * $= (p<0.05)$.

(Table 5). The pastures of Marandu and Piatã grasses provided the greater ($p<0.05$) rumination efficiency (gDM/h and gNDF/h) than the Aruana grass. The highest average daily gain (ADG) and the lowest feed conversion (FC) were observed in the Aruana grass pasture animals when compared to those maintained on pastures of Massai and Piatã grasses (Table 5). The main variables that showed significant correlations ($p<0.05$), and moderate to high magnitude are presented in Table 6.

DISCUSSION

Forage and morphological components allowance were the result of the volumetric density of these components in the pasture structure, since all the pastures were 50 cm high in the pre-grazing. The highest leaf blade and lowest stem supply observed in Massai pastures can be a result of the high density of tillers of this cultivar (Luna *et al.*, 2014). The highest supply of stem in the other cultivars can be explained by the forage supply above 20 kg DM/100 kg LW. According to Gómez *et al.* (2010), in intermittent stocking, from this value occurs excessive accumulation of stems and dead material, which also causes a decrease in the quality of the forage offered.

The DMI (g/day) was directly related to the neutral detergent fiber content of the cultivars (Table 1), the animals that grazed forage with lower NDF obtained higher intake of dry matter. According to Bosa *et al.* (2012), the concentration of NDF in fodder is inversely related to dry matter intake by the animal. That is, the higher the NDF content, the lower the total intake. The DMI

was lower than the 3.62% of LW observed by Pereira *et al.* (2018), for sheep in feedlot fed hay of Massai grass. The highest intake obtained by the authors was a result of the use of a protein concentrate, which allows an additive effect on total intake (Mabrouk *et al.*, 2008). This effect was also observed by Jochims *et al.* (2010), who observed a lower intake of total DM in animals kept exclusively in millet pasture, and this was only 67% of the total intake of the animals that received supplements.

The animals kept in Massai and Marandu pastures displayed the highest intake of leaf blades ($p<0.05$). Although the highest intake of total forage (g/day) was observed in the animals that consumed Marandu grass, the greater supply of leaf blades observed in the Massai grass (Table 2) enabled a greater selection of this component by the animals. The lower ingestion of stem by the animals kept in the Massai grass supports this observation. The same reasoning explains the higher intake of stem by the animals kept in grasses of Aruana grass confirmed by the high and negative correlation (Table 6) between leaf blade and stem consumption. Usually, the animals prefer the leaves instead of the stems, because they are more digestible and nutritious; mature plants are also rejected. However, in pastures with less forage supply, the animals also consume the other parts of the plants (Tarazona *et al.* 2012).

The CPI was directly related to the CP concentration observed in the morphological components of the cultivars (Table 1). Although the highest CP concentration in the leaf was observed in the Aruana grass cultivar, the lower intake of this component by the animals in this cultivar made the CPI intermediate between

Marandu and Massai grasses. Pereira *et al.* (2018) observed CPI of 0.48% LW in sheep fed with Massai hay and concentrated in the ratio (2:1). The difference in intake between the studies can be attributed to the use of concentrated supplements. The intake of this nutrient is the variable that most affects animal performance (Goes *et al.*, 2018). Supplementation can be viable and important in the periods of the seasonality of pastures (Sousa *et al.*, 2018).

The observed NDFI may indicate that this nutrient has limited forage intake. The lower intake of this nutrient (413.76 g/day of NDF) by Santa Inês sheep was also observed by Fontenele *et al.* (2011), who infer that food intake was limited by filling the ruminal compartment. According to Harper & McNeill (2015), increased intake of NDF may limit a ruminant's ability to consume sufficient feed to meet his or her needs. In forage-based diets, rumen filling and fade rate usually control the ingestion. The highest ADLI observed in the animals kept in Aruana grasses can be attributed to the higher stem intake by these animals. These variables have a high and positive correlation (Table 6). Besides this, cultivar has a higher concentration of ADL in the stem (Table 1).

The animals kept in Aruana grasses remained in grazing activity during all the time that they had access to the pasture (9h), without performing any other activity in this period. This result is probably due to the lower supply of leaf blades observed in this cultivar (Table 2), according to that the animals spent more time searching for leaves to meet their daily requirement of forage intake. According to Pellegrini *et al.* (2011), sheep respond to a decrease in the percentage of available green leaves, increasing grazing time, to try to compensate for the reduction in diet quality, since the accessibility of leaves and the degree of maturity of the plant are closely related to the nutritive value of forage plants.

The higher bit rates resulted in higher DMI (g/day) in Marandu pastures, and the lower supply of leaf blades in Aruana pastures (Table 2) justify the high rates. The increase in the bit rate can be caused by the reduction in DM availability and by the morphological composition of the pasture (Pedroso *et al.*, 2004). The animals kept in Aruana pastures used the behavioral strategy in which the animals compensate for the reduction in pasture intake with the increase of grazing time. Consequently, this strategy implies an increase in the time of rumination, proved by the moderate correlation obtained between these variables (Table 6). Pompeu *et al.* (2009) observed 9.9 h of pasture for sheep in Tanzania pastures, the highest time obtained is the result of the absence of animal restraint, where only 9 hours of stay of the animals in the pasture was available in this work, this may have restricted the DMI.

The rumination time, independent of the grazed forage crop, was higher than the 6.6 h/day observed by Silva *et al.* (2016) in sheep kept on tropical pastures in the dry season. Even the quality of the forage was lower, the use of 1.5% LW of the concentrate supplement significantly improved the quality of the total diet of these animals. If the amount of concentrate is considered concerning the weight of the total intake obtained in this

work (Table 2), it represents more than 60% of the animals' diet. The higher demand for time in grazing and rumination explains the less leisure time of the animals kept in Aruana grass pastures, with a high negative correlation between these activities (Table 6). Similar behavior was observed by Emerenciano Neto *et al.* (2018) for sheep in the pasture of Massai grass under different canopy heights. According to Pellegrini *et al.* (2011), the greater participation of the structural components in the pasture affected the increase in grazing time and the reduction in the leisure time of the animals.

The distribution of idle and rumination activities according to the schedule was similar to the results of Pompeu *et al.* (2009), with higher leisure frequencies between 11 p.m. and 5 a.m. and no grazing in the period from 2 a.m. to 5 a.m. for sheep in Tanzania pastures. The authors point out that primitive behaviors as protection of predators still causes the animals to prefer daytime grazing, even with high temperatures. The same period is also used for rumination. Feeding efficiency of the animals kept in Piatã pastures was a result of lower acid detergent lignin intake and grazing time (Table 3 and Table 4), with a high negative correlation between these activities (Table 6). The increase in rumination efficiency occurred when there was a greater supply of leaf blades, which allowed a higher rate of feed passage (Pereira *et al.*, 2018). According to Carvalho *et al.* (2004), rumination efficiency is an essential mechanism in controlling the use of low digestibility foods.

With Aruana forage, the animal showed a higher daily weight gain and a more favorable feed conversion index. The higher crude protein intake with Aruana (that, however, was lower than that fed with Marandu) could have contributed to these results. But the other factor should be considered, as the longer grazing time. According to the longer time spent grazing, the sheep distributed their herbage intake (which was intermediate in comparison with the other forages) over a long grazing time. This condition could happen because they ate continuously and also permitted to slow the feed transit in gastro-intestinal tract, thus improve digestibility and, as a consequence, the efficiency of forage utilization and the growth performance.

The lowest feed conversion (FC) of animals kept in Aruana pastures was a result of the highest acid detergent lignin intake, and these variables showed a moderate negative correlation (Table 6). Higher forage intake is not always the most appropriate and should be observed with caution (Cabral *et al.*, 2008), as conversion depends on the quality of forage intake. Therefore, food efficiency is an essential tool in livestock production systems, since an only high weight gain is not sufficient, these animals must also be efficient, with adequate intake and compatible performance.

CONCLUSION

Pasture structure and chemical composition of cultivars affect the nutrient intake, feeding behavior, and performance of sheep. The low leaf blade offer of the pasture of the Aruana grass negatively affects the

feeding behavior of the sheep, but the crude protein in forage of this cultivar favors the nutrient intake, feed conversion, and performance of sheep.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest with any financial, personal, or other relationships with other people or organizations related to the material discussed in the manuscript.

ACKNOWLEDGEMENT

We thank CNPq and CAPES for financial support in developing the study and the scholarships granted. We also thank GEFOR (Grupo de Estudos em Forragicultura -UFRN) for assistance in executing this study.

REFERENCES

- AOAC (Association of Official Analytical Chemists).** 2000. Official methods of analysis. 17th edition. Washington, DC, USA.
- Azevedo, E. B., C. H. E. C. Poli, D. B. David, G. A. Amaral, L. Fonseca, P. C. F. Carvalho, V. Fischer, & S. T. Morris.** 2014. Use of faecal components as markers to estimate intake and digestibility of grazing sheep. *Livest. Sci.* 165: 42-50. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2014.04.018>
- Bosa, R., C. Faturi, H. G. R. Vasconcelos, A. M. Cardoso, A. F. O. Ramos, & J. C. Azevedo.** 2012. Intake and apparent digestibility with different inclusion levels of coconut meal for sheep feeding. *Acta Sci. Anim. Sci.* 34: 57-62. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v34i1.11936>
- Burger, P. J., J. C. Pereira, A. C. Queiroz, J. F. C. Silva, S. C. Valadares Filho, P. R. Cecon, & A. D. P. Casali.** 2000. Ingestive behavior in Dutch calves fed diets containing different levels of concentrate. *R. Bras. Zootec.* 29: 236-242. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982000000100031>
- Cabral, L. S., J. W. Santos, J. T. Zervoudakis, J. G. Abreu, A. L. Souza, & R. C. Rodrigues.** 2008. Intake and feeding efficiency in feed-lot lambs. *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.* 9: 703-714.
- Carvalho, C. G. G. P., A. J. V. Pires, F. F. Silva, C. M. Veloso, R. R. Silva, H. G. O. Silva, P. Bonomo, & S. S. Mendonça.** 2004. Ingestive behavior of dairy goats fed on cocoa meal or palm cake. *Pesq. Agropec. Bras.* 39: 919-925. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2004000900012>
- Emerenciano Neto, J. V., G. S. Difante, A. M. Q. Lana, H. R. Medeiros, E. M. Aguiar, D. B. Montagner, & J. S. Souza.** 2018. Forage quality and performance of sheep in Massai grass pastures managed at pre-grazing canopy heights. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 48: 1073-1081. <https://doi.org/10.4314/sajas.v48i6.10>
- Ferreira D. F.** 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciênc. Agrotec.* 35: 1039-1042. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001>
- Fontenelle, R. M., E. S. Pereira, M. S. S. Carneiro, P. G. Pimentel, M. J. D. Cândido, & J. G. L. Regadas Filho.** 2011. Nutrient intake and ingestive behavior of Santa Inês lambs fed diets with different levels of metabolizable energy. *R. Bras. Zootec.* 40: 1280-1286. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982011000600017>
- Galli, J. R., C. A. Cangiano, & H. H. Fernández.** 1996. Ingestive behavior and consumption of grazing cattle. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 16: 119-142.
- Goes, R. H. T. B., M. M. Y. Carneiro, M. P. Osmari, K. A. Souza, R. T. Oliveira, & C. J. S. Souza.** 2018. Intake, digestibility, performance and carcass characteristics of ewes fed crambe replacing soybean meal in the diet. *Acta Sci. Anim. Sci.* 40: e37171. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v40i1.37171>
- Gómez, J. M. D., V. Fischer, C. H. E. C. Poli, P. C. F. Carvalho, E. J. Pegoraro, & E. Macari.** 2010. Effects of forage supply, grazing method, days of evaluation and breed on sheep behavior and temperament. *R. Bras. Zootec.* 39: 1840-1848. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982010000800029>
- Harper, K. J., & D. M. Mcneill.** 2015. The Role iNDF in the Regulation of Feed Intake and the Importance of Its Assessment in Subtropical Ruminant Systems (the Role of iNDF in the Regulation of Forage Intake). *Agriculture* 5: 778-790. <https://doi.org/10.3390/agriculture5030778>
- Hodgson, J.** 1985. The control of herbage intake in the grazing ruminant. *Proc. Nutr. Soc.* 44: 339-346. <https://doi.org/10.1079/PNS19850054>
- Jochims, F., C. C. Pires, L. Griebler, A. M. S. Bolzan, F. D. Dias, & D. B. Galvani.** 2010. Feeding behavior and forage intake of ewe lambs on pearl millet pasture with or without supplementation. *R. Bras. Zootec.* 39: 572-581. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982010000300017>
- Luna, A. A., G. S. Difante, D. B. Montagner, J. V. Emerenciano Neto, I. M. M. Araújo, & L. E. C. Oliveira.** 2014. Accumulation of forage and morphogenic responses in forage grass by cutting. *Biosci. J.* 30: 1803-1810.
- Mabrouk, C., N. Moujahed, R. Ouzrout, & C. Kayouli.** 2008. Effects of supplementation on pasture intake by ewes in South-eastern of Algeria. *Livest. Res. Rural Dev.* 20: e43.
- Pedroso, C. E. S., R. B. Medeiros, M. A. Silva, J. B. J. Jornada, J. C. Saibro, & J. R. F. Teixeira.** 2004. Sheep behavior at the pregnancy and at the lactation grazing on different phenological stages of annual ryegrass. *R. Bras. Zootec.* 33: 1340-1344. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982004000500028>
- Pellegrini, L. G., A. L. G. Monteiro, M. Neumann, P. C. F. Carvalho, A. L. P. Silva, S. B. C. Lustosa, & A. C.R. S. Pellegrin.** 2011. Behavior of lambs in ryegrass grazing (*Lolium multiflorum*) in different phenological phases submitted to nitrogen fertilization. *Rev. Ceres* 58: 329-335. <https://doi.org/10.1590/S0034-737X2011000300013>
- Pereira, G. F., P. O. Lima, L. C. S. L. C. Assis, & J.V. Emerenciano Neto.** 2018. Nutrient intake, feeding behavior and performance of sheep fed hay of tropical grasses at different cutting intervals. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 70: 897-904. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9775>
- Pompeu, R. C. F. F., M. C. P. Rogério, M. J. D. Cândido, J. N. M. Neiva, J. L. L. Guerra, & J. S. Gonçalves.** 2009. Nutrient intake, ingestive behavior and performance of ovine fed grasses of tropical grasses at different intervals between cuts. *R. Bras. Zootec.* 38: 374-383. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982009000200022>
- Saliba, E. O., E. P. Faria, N. M. Rodriguez, G. R. Moreira, I. B. M. Sampaio, J. S. Saliba, L. C. Gonçalves, I. Borges, & A. L. C. C. Borges.** 2015. Use of Infrared Spectroscopy to Estimate Fecal Output with Marker Lipe®. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 4: 1-10. <https://doi.org/10.1080/2326-3350-SI04001>
- Sbrissia, A. F., P. G. D. Duchini, J. R. Echeverria, T. Miqueloto, A. Bernardon, & L. F. Américo.** 2017. Animal production on cultivated pasturelands in regions of temperate climate of Latin America. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.*, 25: 47-60.
- Sollenberger, L. E., J. E. Mooreb, V. G. Allenc, & C. G. S. Pedreira.** 2005. Reporting Forage Allowance in Grazing Experiments. *Crop Sci.* 45: 896-900. <https://doi.org/10.2135/cropsci2004.0216>
- Sousa, S. V., M. J. Araújo, T. P. D. Silva, C. A. T. Marques, J. N. C. Torreão, L. R. Bezerra, I. S. S. Lima, & F. P. Gottardi.** 2018. Dietary supplementation for Santa Inês hair ewes

- on pasture at pre- and postpartum periods: dry matter intake, digestibility, milk production, and mineral metabolism. *Trop. Anim. Health. Pro.* 50: 1903-19012. <https://doi.org/10.1007/s11250-018-1643-2>
- Silva, L. F. N., G. S. Difante, L. S. Fernandes, I. M. M. Araujo, J. V. Emerenciano Neto, M. G. Costa, & N. R. O. Felisberto.** 2016. Ingestive behavior of sheep in *Panicum* and *Brachiaria* pastures in dry season. *Biosci. J.* 32: 1018-1024. <https://doi.org/10.14393/BJ-v32n4a2016-32945>
- Tarazona, A. M., M. C. Ceballos, J. F. Naranjo, & C. A. Cuartas.** 2012. Factores que afectan el comportamiento de consumo y selectividad de forrajes en rumiantes. *Rev. Colom. Cienc. Pecua.* 25: 473-487.
- Tilley, J. M. A. & R. A. Terry.** 1963. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *J. Br. Grassl. Soc.* 18: 104-111. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.1963.tb00335.x>
- Van Soest, P. J., J. D. Robertson, & B. A. Lewis.** 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74: 3583-3597. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)



Colostrogenesis: Mass transfer of immunoglobulin G₁ into colostrum

C. R. Baumrucker,¹ A. M. Burkett, A. L. Magliaro-Macrina, and C. D. Dechow

Department of Dairy and Animal Science, The Pennsylvania State University, University Park 16802

ABSTRACT

Bovine IgG₁ is thought to be specifically transported by a process of transcytosis across the mammary epithelial cells during colostrogenesis. Mammary IgG₁ appearance in cow colostrum has typically been reported as a concentration and shows IgG₁ concentration to be extremely variable because of animal variation, colostrum milking time, and water dilution effects. To identify animal IgG₁ transfer capacity and separate it from the other effects, our objective was to determine first colostrum IgG₁ total mass. We collected 214 samples of totally milked first colostrum with recorded colostrum weights from 11 Pennsylvania dairy farms that participated in Pennsylvania Dairy Herd Improvement Association, analyzed colostrum for IgG₁ by ELISA, and calculated total IgG₁ mass. Median and mean concentrations of IgG₁ were 29.4 mg/mL and 37.5 ± 30.2 mg/mL, respectively, with a range of 9 to 166 mg/mL. However, total mass of IgG₁ had a median of 209.1 g, mean of 291.6 ± 315.8 g, and a range of 14 to 2,223 g. Colostrum IgG₁ concentration showed no relationship with colostrum volume, but IgG₁ mass had a positive relationship with volume. Colostrum IgG₁ mass was related to IgG₁ concentration ($R^2 = 0.58$). Using DHIA records for 196 animals, we established milk production for these animals to a 15-d equivalent. An established milk secretion relationship to mammary parenchyma tissue (secretory tissue) was calculated and showed no relationship of IgG₁ mass with mammary parenchyma tissue. In addition, we show that approximately 10% of the sampled animals had IgG₁ mass greater than 1 standard deviation above the mean (high mass transfer) and represented all parities tested (1–7). Whereas first-lactation animals showed less overall calculated parenchyma tissue when compared with other parities, approximately 10% of the first-lactation group animals were capable of high mass transfer, with one transporting 2,029 g into first colostrum. Concentration variance of IgG₁ can be attributed to water inclusion, whereas mass transfer provides a clear indication of animal IgG₁

transfer capacity. The specific mechanism of bovine mammary IgG₁ transfer is not clear, but secretory tissue mass does not explain the variation observed. We hypothesize that the animal variation is attributable to endocrine regulation or genetic variation of the transporter(s).

Key words: lactation, mammary, colostrogenesis, colostrum

INTRODUCTION

The success of commercial dairies depends on a reliable supply of replacement heifer calves with good potential for milk production. Although calf management practices have evolved over the years to reduce calf morbidity and mortality, the current level of neonatal calf disease remains at 9% of preweaned heifers (USDA, 2002). Calf diarrhea (scours) and other digestive diseases accounted for >62% of all preweaned heifer mortality.

Maternal passive transfer of immunity in neonates varies among species, specifically with the IgG antibodies (Butler, 1974). In cattle, transfer of IgG₁ to the neonate is accomplished solely by the ingestion of colostrum because in utero transfer does not occur. The mammary transport of Ig into colostrum is very specific, concentrating IgG₁ but not IgG₂ (Larson et al., 1980). Immunoglobulin G₁ is thought to be transported across mammary epithelial cells by the Fc receptor of the neonate (bFcRn) by a process termed transcytosis (Ghetie and Ward, 2000) and in the calf intestinal tract by passive transfer (Weaver et al., 2000).

The concentrations of IgG₁ and IgG₂ in serum (approximately equal at ~10–12 mg/mL), colostrum, and milk indicate very selective transfer of IgG₁ accounting for a 10-fold enhancement in colostrum concentration followed by a similar decrease in mature milk, both relative to serum concentrations (Sordillo et al., 1987). It is important to note that this concentration effect does not occur with IgG₂. Studies have shown a large variation in the concentration of IgG₁ in first milked colostrum. A recent study by Kehoe et al. (2007) showed a wide range of 10 to 79 mg/mL, with an average of 39.5 mg/mL in first colostrum collected from 58 Pennsylvania dairy farms. Part of this variation has been attributed to the timing of milking of the colostrum,

Received December 1, 2009.

Accepted March 17, 2010.

¹Corresponding author: crb@psu.edu

because copious quantities of milk components appear en masse with delayed milking following parturition. Osmotic molecules such as lactose begin to incorporate more water that has a diluting effect on IgG₁ concentration. Thus, such water inclusion induces potential variation in each animal colostrum sample but would not be expected to affect colostrum total mass of IgG₁. The literature provides no information concerning the possible reabsorption of IgG₁ into the mammary cell once it has been secreted.

Thus, total mass of IgG₁ transferred by a mammary gland would be independent of water influx and more useful in establishing animal variation in transport capacity and perhaps transport mechanisms that are present during dairy cow colostrogenesis. We hypothesized that differential mass transfer could be associated with 1) a set amount of transcytosis capacity per mammary cell and more or less cells; 2) differential expression of the transcytosis capacity per cell; or 3) differential expression of transcytosis variants that have different capacities to move serum IgG₁ to mammary secretions.

The objective of this study was to establish the animal variation of IgG₁ mass transfer associated with first milked colostrum and compare these findings with IgG₁ concentration, estimates of mammary secretory tissue mass, and other available information in an attempt to answer hypothesis 1 above.

MATERIALS AND METHODS

Collection of Colostrum

The Pennsylvania State University Institutional Animal Care and Use Committee approval number 28889 was obtained for colostrum sample collection. We asked 11 commercial dairy farms in Pennsylvania to collect all of the colostrum from the first milking and record colostrum weights. A 50-mL tube was provided for the colostrum sample, animal identification, and colostrum weight. Colostrum was frozen by farm personnel until sample pick-up dates that never exceeded 4 wk. The frozen colostrum was allowed to thaw at refrigeration temperatures and a subsample of the collected volume was centrifuged at 3,500 × g for 15 min at ambient temperature. The surface fat was removed by aspiration and the remaining supernate above any pellet was collected and frozen at -20°C until analysis.

Milk Yield at 15 d and Calculation of Parenchyma Tissue

Test-day milk weights ($n = 196$) were obtained from DHIA. Herds were enrolled in monthly milk testing with first test-days generally occurring between calving

and 30 d, so records were standardized to the midpoint of that interval. Weights were analyzed with a model that included fixed parity number, herd-test-date, and random milk yield curve effects specific to each cow. Solutions were used to estimate milk yield on d 15 of lactation for all cows. The correlation between d 15 estimate of yield and the nearest test-day yield was 0.98. For lactating goats, it has been determined that approximately 1.0 g of parenchyma tissue is needed to produce 1.9 mL of milk/d (Linzell, 1966). This estimate is supported by more recent studies with dairy cows (Dewhurst et al., 1993; Knight and Dewhurst, 1994; Magaña-Seville and Sandoval-Castro, 2003). Parenchyma tissue is a measure of secretory cells in the mammary gland that provide the volume of milk.

Analysis of IgG₁

Samples were analyzed by an ELISA specific for bovine IgG₁ (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX; catalog no. E10-116). The capture antibody was prepared at a 1:100 dilution in a total volume of 100 µL for each well. Unknown samples were serially diluted and initially 2 duplicates each of 2 dilutions (5×10^{-5} and 5×10^{-6}) were tested for assay range sensitivity and correlation. After establishment, we found that a 5×10^{-5} dilution factor was best for most samples, although some samples that had very low or very high IgG₁ concentration required repeats at different dilutions. A Microtek microtiter plate (Hsinchu, Taiwan) read horseradish peroxidase (Bethyl Laboratories Inc.) reduction of tetramethyl benzidine (TMB, Rockland Immunochemicals Inc., Gilbertsville, PA) at 450 nm after final incubation for 10 min at ambient temperature. Inter- and intraassay coefficients of variation were 9.26 and 3.73%, respectively.

pH Analysis of the Colostrum Sample

After subsampling and centrifugation, the remaining refrigerated colostrum sample (~50 mL) was rapidly warmed to 37°C in a water bath and immediately tested for pH with a combination Phresh refillable flow-on-demand electrode (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA). This electrode provides a means to flush highly viscous or dirty samples such as colostrum from the junction after each measure to prevent clogging. Duplicate measures were conducted with frequent (after every 5 samples) restandardization of the electrode to ensure accuracy.

Determination of Colostrum Lactose

Samples were selected to represent average pH ($n = 10$) and low pH ($n = 5$) to measure lactose content of

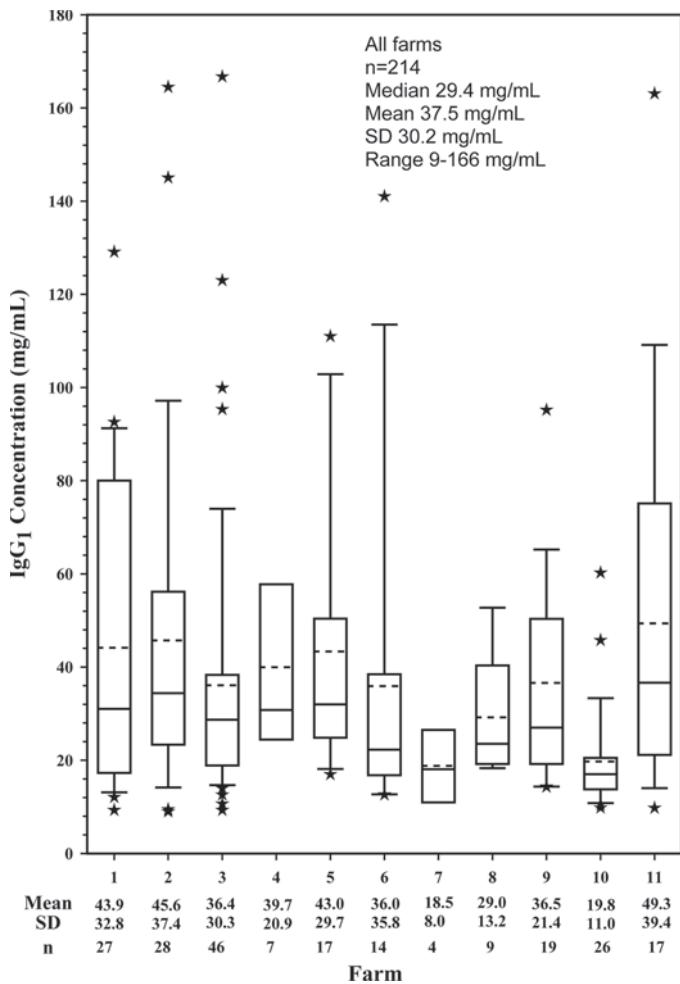


Figure 1. Immunoglobulin G₁ concentration in first milked colostrum. Data are a box plot from 11 Pennsylvania dairy farms and represent 214 colostrum samples. Analysis was by ELISA. Data are the median (—), mean (....), and whisker (error bars) that represent 10th and 90th percentiles, with individual cow concentrations plotted (star shape) when they fall below the 10th and above the 90th percentiles. The x-axis shows farm mean, standard deviation, and animal number.

the colostrum. Lactose was analyzed using a Lactose Assay Kit (K624-100, BioVision, Mountain View, CA). Samples were assayed in duplicate after experimentation to determine appropriate dilutions of the centrifuged colostrum samples. Data were expressed as milligrams of lactose per milliliter of centrifuged sample.

Statistics

Data were plotted with Sigma Plot (Systat Software Inc., Chicago, IL) and linear regression was computed by least squares means and the coefficient of determination (R^2) was determined (Systat Software Inc.). Immunoglobulin G₁ relationships were determined using PROC CORR in SAS (SAS Institute, Cary, NC). When

correlations had P -values <0.1 , the variables were determined by PROC GLM in SAS.

RESULTS

Figure 1 shows the overall IgG₁ concentration median, mean, and standard deviation of the 214 collected samples. The figure also shows the farm, sample number, farm IgG₁ means, and standard deviations and the variation plot. The overall median and mean for all farms and animals were 29.4 and 37.5 mg/mL, respectively, with a range of 9 to 166 mg/mL. Fourteen animals had concentrations above the 90th percentile, whereas 13 had concentrations below the 10th percentile. The median concentration being lower than the mean indicates that most farms have some high IgG₁ transfer animals that increase the mean.

Figure 2 shows the overall IgG₁ mass median, mean, and standard deviation of the 214 collected samples. The figure also shows the farm, sample number, farm IgG₁ mass, and standard deviation and the variation plot (10th and 90th percentiles; error bars) of IgG₁ mass from the individual farm samples. The overall median and mean for all farm and animal IgG₁ mass were 209.1 and 291.6 g, respectively, with a range of 14 to 2,223 g. Fourteen animals had a mass above the 90th percentile and 14 had a mass below the 10th percentile. The lower median mass value for each farm again shows that most farms have animals that transfer high quantities of IgG₁ mass and serve to increase the mean.

Figure 3 compares both IgG₁ concentration and mass to colostrum volume. Figure 3A shows that there is no significant correlation of IgG₁ concentration with colostrum volume ($P = 0.65$), whereas Figure 3B indicates a mass versus volume relationship ($R^2 = 0.234$; $P < 0.0001$).

Figure 4 shows that total colostrum IgG₁ mass is related to colostrum concentration ($R^2 = 0.58$; $P < 0.0001$). Arrows on the y-axis indicate the mean of 291 g and where plus 1 standard deviation would occur (606 g), above which we considered to be high IgG₁ mass transfer. High mass transfer animals ($n = 14$) represented 6.5% of the animals tested. All farms except 2 had at least 1 high mass transfer animal. Farms 7 and 8 likely did not show this type of animal because few animals were sampled ($n = 4$ and 9, respectively).

Figure 5 shows no relationship ($R^2 = 0.01$; $P = 0.62$) of total colostrum mass of IgG₁ when plotted against calculated parenchyma tissue mass for 196 animals. Parenchyma tissue mass was calculated from DHIA production records as described in Materials and Methods.

Figure 6 shows that among first-lactation cows, which had generally less calculated parenchyma tissue

than high parity animals, there were 4 animals that we considered to be high mass transfer animals. All parities tested (1–7) had some animals that fell into the high transfer capacity category.

Figure 7 shows no relationship of colostrum pH when compared with total colostrum IgG₁ mass ($P = 0.92$). Surprisingly, the average pH of colostrum measured at 37°C was 6.03 ± 0.33 , with a range of 4.85 to 6.85. Low pH has been attributed to fermentation of lactose and fatty acids (Polzin et al., 1977). Because we depended upon the participating farms to quickly freeze the colostrum samples after collection, we wished to test for lactose in a subset of average and low pH colostrum samples. If colostrum samples had remained at warmer temperatures for an extended period of time, fermentation would reduce the lactose content. Lactose concentration in the 15 analyzed colostrum samples averaged 1.2 ± 0.5 mg/mL. The 10 (pH 6.16 ± 0.09) samples representing average pH had a lactose concentration of 1.0 ± 0.457 mg/mL, whereas the 5 (pH 5.22 ± 0.133) samples representing low pH had a lactose concentration of 1.578 ± 0.448 mg/mL.

DISCUSSION

The classes of Ig in ruminants are generally the same as in other mammalian species. Their concentrations in serum, colostrum, and milk have been documented to indicate very selective transfer of IgG₁, accounting for a 10-fold enhancement in colostrum followed by an equivalent decrease in mature milk relative to serum concentrations (Sordillo et al., 1987). It is important to note that this concentration effect does not occur with IgG₂ (Butler, 1974; Sasaki et al., 1976; Larson et al., 1980). Whereas concentration indicates the specific transport of IgG₁, it does not provide information concerning the mass transfer capacity of the process. This latter concept is important because at the time of colostrum delivery (first milking) after parturition, the mammary gland is already in transition to mature milk production. This process appears to end the selective IgG₁ transfer to colostrum and the induction of copious quantities of milk components and has been described as the transition between lactogenesis I (secretory differentiation: colostrum formation) and lactogenesis II (secretory activation: beginning of copious milk secretion; Nguyen and Neville, 1998). Among mature milk components, lactose (milk sugar) is the major osmole, but small ions also appear to contribute (Ontsouka et al., 2003). Thus, around the time of parturition and thereafter, milk lactose is rapidly added to the secretion while tight junctions form to retain the lactose (Nguyen and Neville, 1998), resulting in the inclusion of more water. Water increases colostrum volume and decreases

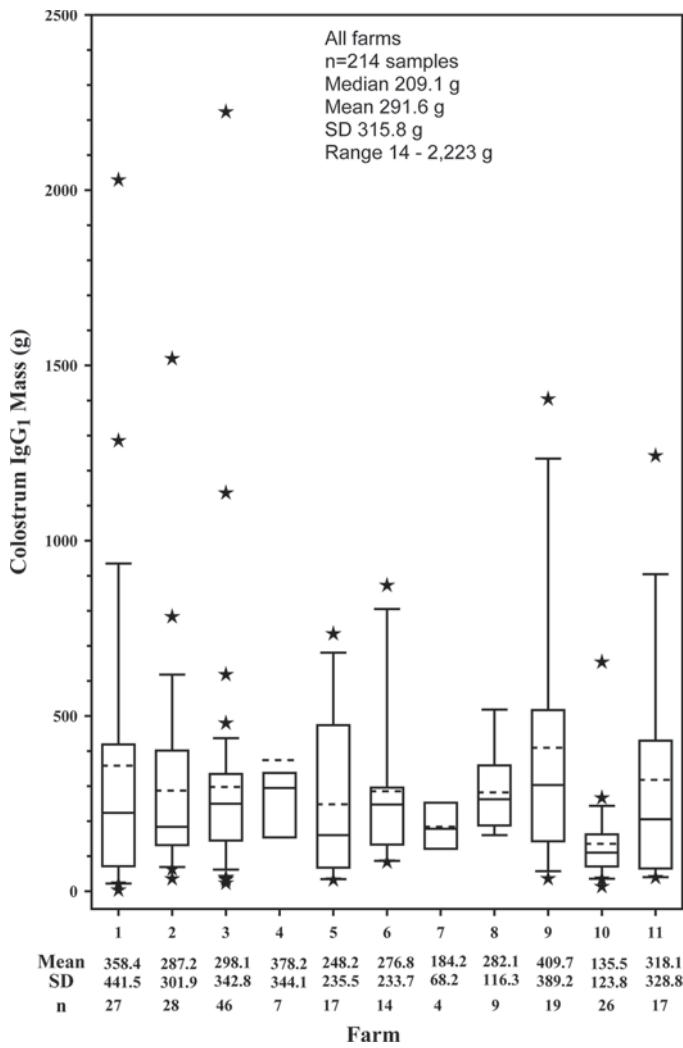


Figure 2. Immunoglobulin G₁ mass in first milked colostrum. Data are a box plot from 11 Pennsylvania dairy farms and represent 214 colostrum samples. Analysis was by ELISA. Data are the median (—), mean (....), and whisker (error) bars that represent 10th and 90th percentiles, with individual cow concentrations plotted (star shape) when they fall below the 10th and above the 90th percentiles. The x-axis shows farm mean, standard deviation, and animal number. Mass was calculated from first colostrum volume and IgG₁ concentration shown in Figure 1.

colostrum component concentrations. Thus, secretory activation variation in each animal and the timing of colostrum removal (on-farm milking) following parturition contributes to colostrum concentration variation but should not affect colostrum mass of IgG₁. We show that total mass of IgG₁ transferred by a cow mammary gland establishes the animal IgG₁ transfer capacity during colostrogenesis.

Interestingly, Figure 3 showed no significant relationship when we plotted IgG₁ concentrations against colostrum volume, yet a relationship was observed when IgG₁ mass was plotted against volume. This clearly is a reflection of the water dilution effect that occurs with

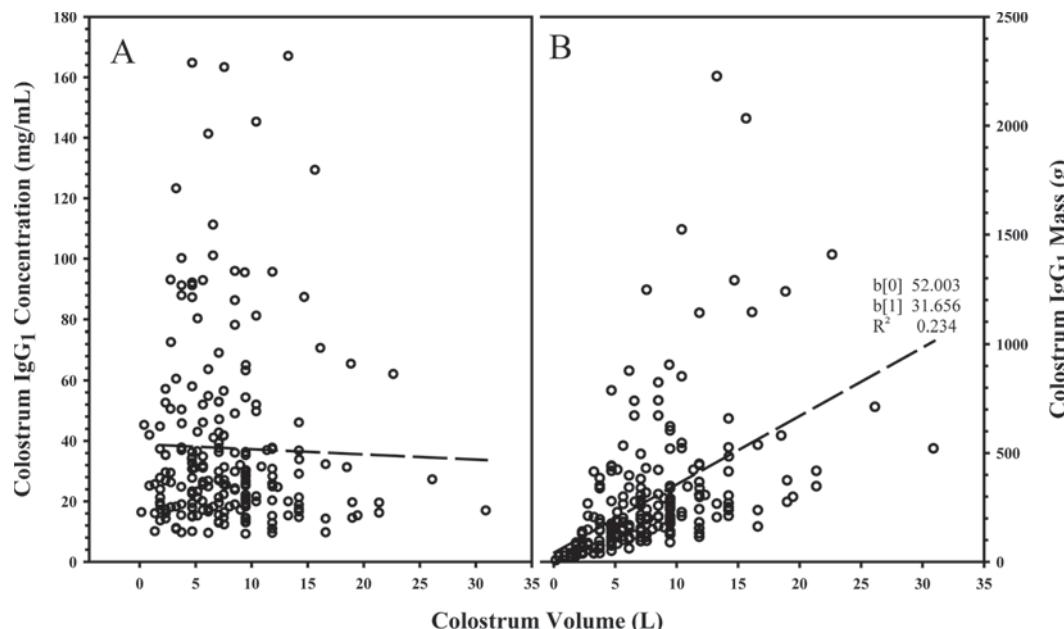


Figure 3. Relationships of immunoglobulin G₁ A) concentration and B) mass to colostrum volume. Lines on figures indicate linear relationship ($R^2 = 0.234$; $P < 0.0001$).

a concentration calculation; total mass is not affected by this parameter. Nevertheless, volume explains only a part of mass transfer. Plotting IgG₁ mass against IgG₁ concentration clearly shows a strong relationship ($R^2 = 0.58$), indicating that animals that can concentrate more IgG₁ in their colostrum will likely have greater mass.

The mean IgG₁ concentration in our study of 214 colostrum samples was 37.5 ± 30.2 mg/mL. This finding is generally in agreement with other reports ranging from 48.2 ± 28.9 mg/mL (Pritchett et al., 1991) to a recent report of 39.5 ± 12.2 mg/mL (Kehoe et al., 2007). Our findings showed a wide variance with almost all farms having some cows with very low and high IgG₁ colostrum concentrations. Although it is clear that colostrum phase mammary cells have leaky tight junctions (Nguyen and Neville, 1998; Stelwagen et al., 1998), the selectivity for IgG₁, high mass, and high concentration obtained by some animals cannot be explained by leakiness. Tight junction leakiness would not allow concentrations above that of the blood and would not exclude IgG₂ from colostrum. Research indicates that nutrition does not affect colostrum IgG content (Halliday et al., 1978), so the capacity to transfer high IgG₁ concentrations into colostrum must be dependent upon mechanisms in the mammary gland.

The main objective of this study was to determine total mass transfer of IgG₁ in dairy cows. Our analysis revealed a mean IgG₁ mass of 291.6 ± 315.8 g for the 214 colostrum samples collected from Pennsylvania dairy farms. The reported concentration variance for

colostrum IgG₁ (Pritchett et al., 1991; Kehoe et al., 2007) is likely attributable, in part, to the inclusion of water resulting in lower values. Mammary secretory parenchyma tissue mass is related to the capacity to produce milk volume during lactation. Generally, the quantity of tissue is reflected by the amount of DNA (cells) in the mammary gland during lactation (Miller et al., 2006). During the prepartum colostrum phase, fewer mammary cells would be expected to be present when compared with the secretory cells present during peak lactation (Capuco et al., 2003; Annen et al., 2007). We extrapolated available DHIA milk production records to obtain milk production at d 15 of lactation to place each animal at an equal stage of lactation. Although it is clear that d 15 parenchyma tissue would be greater than that observed any time during the colostrum phase, we assumed that this early period of lactation would be representative of the tissue mass present during colostrogenesis. Using the d 15 parenchyma tissue calculations, we showed that there is no relationship ($R^2 = 0.01$; $P = 0.608$) between IgG₁ mass and d 15 parenchyma tissue mass. These data indicate that more mammary secretory tissue mass (secretory cells), although providing more milk during lactation, does not equate to transcytosis of more IgG₁ into colostrum. This may be explained by the fact that milk secretion encompasses many mechanisms for components and pathways of secretion whereas transcytosis of IgG₁ during colostrogenesis is clearly more focused (less pathways) and perhaps more flexible for regulation.

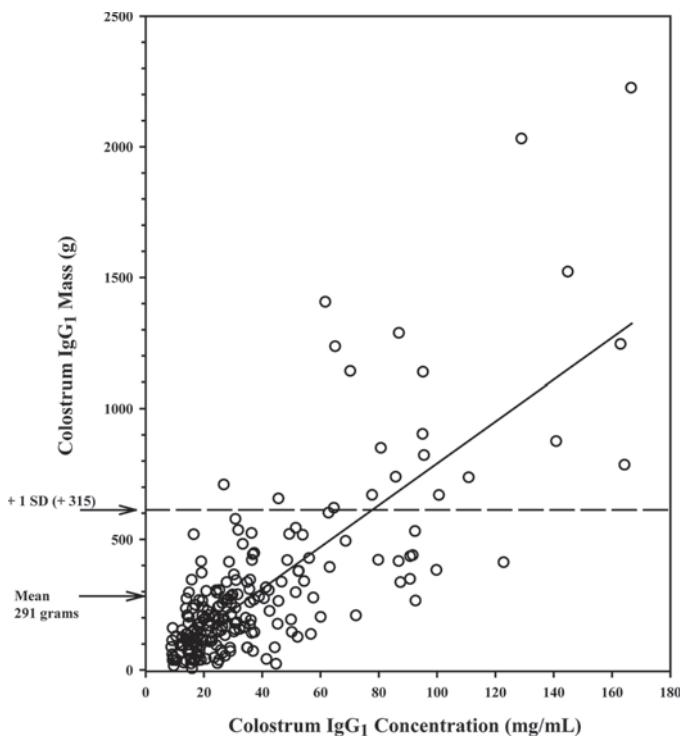


Figure 4. Immunoglobulin G₁ mass relationship with IgG₁ concentration in colostrum. Broken line shows where +1 SD occurs; solid line is linear relationship ($R^2 = 0.58$; $P < 0.0001$).

Colostrum pH values of 6.2 and 6.32 have been reported by McIntyre et al. (1952), Nonnecke and Smith (1984), and Foley and Otterby (1978). Whereas freezing colostrum does not alter the composition or pH (Carlson and Muller, 1977), fermentation of colostrum decreases the pH. Polzin et al. (1977) attributed this decrease to VFA production and not to changes in lactic acid. We asked the 11 participating farmers to quickly freeze the colostrum samples for our later pick-up; however, we had no control over the timing of this process. All samples were obtained frozen from the farms. Our analysis of the lactose content of selected average pH and low pH colostrum samples did not indicate that the low pH colostrum samples had been subjected to fermentation.

Failure of passive transfer of IgG₁ is strongly associated with increased calf mortality caused by infectious disease (McGuire et al., 1976). The industry has set a guideline of feeding high quality colostrum (>50 mg/mL of IgG) within the first hours of birth in attempt to reach a calf serum IgG concentration of ≥ 13.4 mg/mL (Tyler et al., 1996, 1999). There are 2 specific reasons for this concentration and timing. First, there is a colostrum concentration problem partially caused by delayed first milking. However, we show a mass problem that is not likely affected by water inclusion, suggesting an IgG₁ transcytosis problem. Cow colostrum shows

extremely high animal-to-animal variation in IgG₁ mass (14–2,223 g). The hypothesized causes of this variation are endocrine (Casey and Plaut, 2007) and genetic (Doleschall et al., 2005; Mayer et al., 2005).

Studies have been conducted in vivo and in vitro in an attempt to understand the initiation and termination of colostrogenesis. The process has been reported to be detected at 2 wk prepartum (Brandon et al., 1971) when circulating 17 β -estradiol is increasing and progesterone is decreasing (Convey, 1974; Tucker, 1979, 1981). The artificial induction of lactation clearly establishes 17 β -estradiol and progesterone as critical components of this initiation (Smith et al., 1971; Smith and Schanbacher, 1973; Willett et al., 1976; Barrington et al., 2000).

Studies conducted around the time of parturition have indicated that both prolactin (Barrington et al., 1999) and glucocorticoids (Brandon et al., 1971; Winger et al., 1995), part of the lactogenic complex (Tucker, 1979, 1981), appear to inhibit the colostrogenesis process and

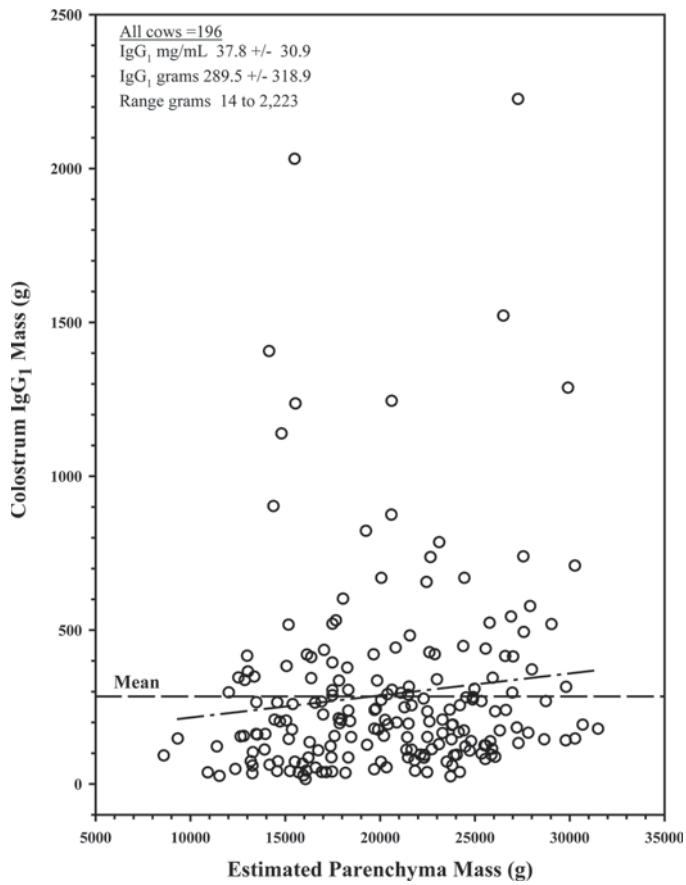


Figure 5. Immunoglobulin G₁ mass relationship with calculated mammary parenchyma tissue mass. Broken line shows mass mean; broken-dotted line is linear relationship. Parenchyma mass was estimated for d 15 of lactation from DHIA records. (Broken-dotted line: $R^2 = 0.01$; $P = 0.62$.)

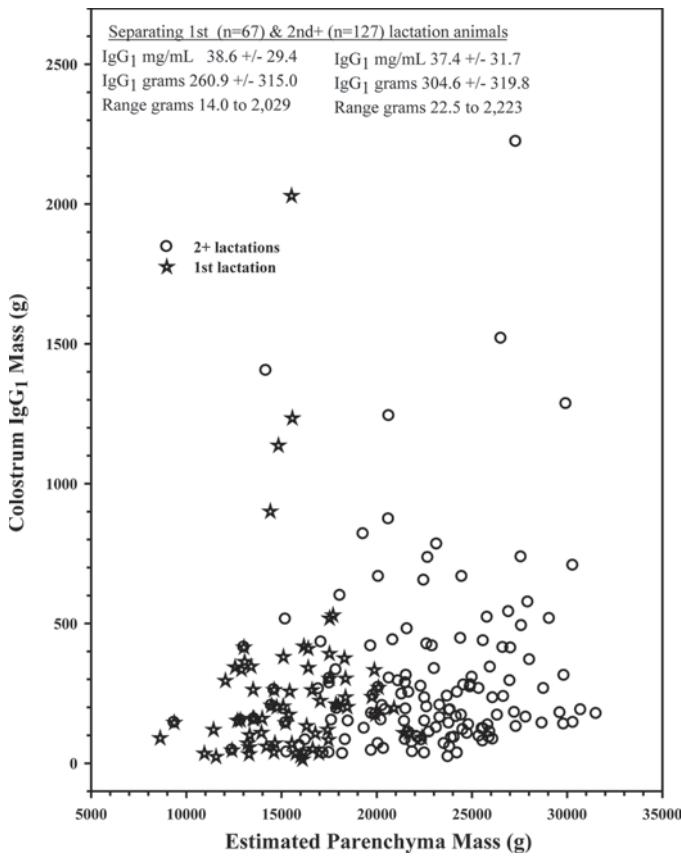


Figure 6. Immunoglobulin G₁ colostrum mass of first lactation contrasted within greater parities when plotted against calculated mammary parenchyma tissue mass. Star shapes are 67 colostrums from animals in lactation 1; open circles are 127 colostrums from animals in lactation ≥ 2 . Parenchyma mass was estimated for d 15 of lactation from DHIA records.

induce copious milk production. It is important to note that the proposed IgG₁ transporter (bFcRn), when expressed in mammary tissue of lactating mice, has been reported to only recycle IgG₁ (Cianga et al., 1999; Lu et al., 2007) and not conduct epithelial transfer by transcytosis (appearance in rodent milk). Thus, some doubt about bFcRn role in bovine IgG₁ transcytosis during colostrum formation has been suggested (Cervenak and Kacskovics, 2009). However, because endocrine regulation of the bFcRn may control the transcytosis/recycling mechanisms and the testing was conducted during lactation (Lu et al., 2007), the capacity of the bFcRn to conduct transcytosis was not adequately tested with the transgenic mice.

CONCLUSIONS

We show that the mass transfer of IgG₁ during colostrogenesis is variable and is a better descriptor of IgG₁ biological transfer that is not influenced by water inclusion. The lack of IgG₁ mass relationship with the mass

of parenchyma tissue indicates that mass transfer is not dependent on the amount of mammary gland secretory tissue. That all lactation parities, including first lactation, have animals with high capacity to transfer IgG₁ mass supports this finding. That bovine colostrum pH is low in first milked colostrum is difficult to reconcile with established mechanistic criteria of IgG₁ transcytosis by the bFcRn receptor. However, the timing of IgG₁ transfer to colostrum has not been established and the mass may be transcytosed early in colostrogenesis when colostrum pH is more neutral. Nevertheless, whatever mechanism of transfer occurs, some cows have enormous differential capacity to transfer IgG₁ mass during colostrogenesis that has health effects on the bovine neonate.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors recognize the contribution of J. M. Daubert, Penn State University, in the collection of the colostrum samples from Pennsylvania dairy farms. This research was supported by CSREES-2008-34437-19335, USDA, and The Pennsylvania State University Experiment Station, Penn State University.

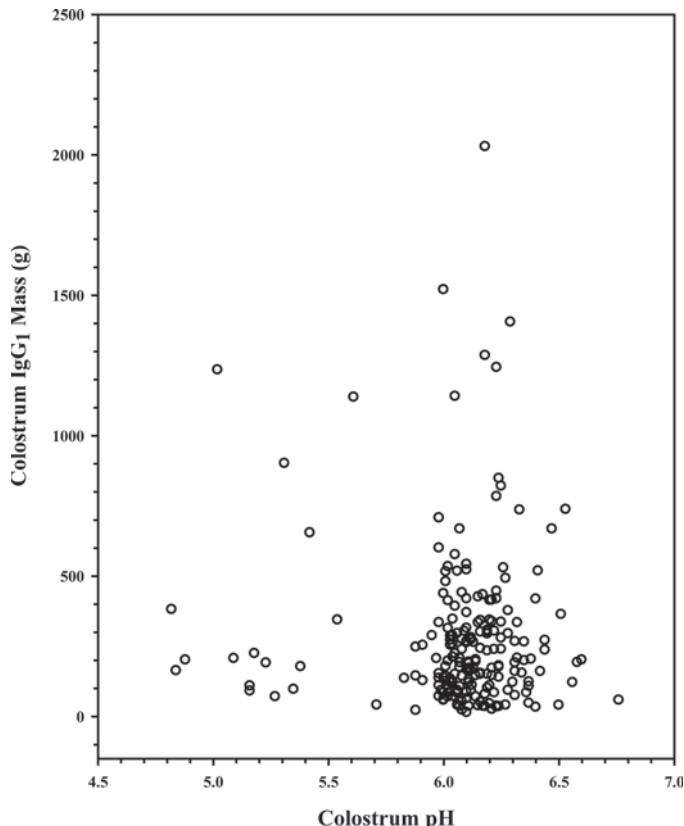


Figure 7. Immunoglobulin G₁ mass relationship with colostrum pH. Data are measured pH at 37°C for individual colostrum samples. Mean was 6.03 \pm 0.33.

REFERENCES

- Annen, E. L., A. C. Fitzgerald, P. C. Gentry, M. A. McGuire, A. V. Capuco, L. H. Baumgard, and R. J. Collier. 2007. Effect of continuous milking and bovine somatotropin supplementation on mammary epithelial cell turnover. *J. Dairy Sci.* 90:165–183.
- Barrington, G. M., T. E. Besser, C. C. Gay, W. C. Davis, J. J. Reeves, T. B. McFadden, and R. M. Akers. 1999. Regulation of the immunoglobulin G1 receptor: Effect of prolactin on in vivo expression of the bovine mammary immunoglobulin G1 receptor. *J. Endocrinol.* 163:25–31.
- Barrington, G. M., B. S. McEwen, M. T. Huyler, and T. E. Besser. 2000. Regulation of colostrogenesis in cattle. *Livest. Prod. Sci.* 70:95–104.
- Brandon, M. R., D. L. Watson, and A. K. Lascelles. 1971. The mechanism of transfer of immunoglobulins into mammary secretion of cows. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 49:613–623.
- Butler, J. E. 1974. Immunoglobulins of the mammary secretions. Pages 217–256 in *Lactation: A Comprehensive Treatise*. B. L. Larson, ed. Academic Press, New York, NY.
- Capuco, A. V., S. E. Ellis, S. A. Hale, E. Long, R. A. Erdman, X. Zhao, and M. J. Paape. 2003. Lactation persistency: Insights from mammary cell proliferation studies. *J. Anim. Sci.* 81(Suppl. 3):18–31.
- Carlson, S. M. A., and L. D. Muller. 1977. Compositional and metabolic evaluation of colostrum preserved by four methods during warm ambient temperatures. *J. Dairy Sci.* 60:566–571.
- Casey, T. M., and K. Plaut. 2007. The role of glucocorticoids in secretory activation and milk secretion, a historical perspective. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 12:293–304.
- Cervenak, J., and I. Kacskovics. 2009. The neonatal Fc receptor plays a crucial role in the metabolism of IgG in livestock animals. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 128:171–177.
- Cianga, P., C. Medesan, J. A. Richardson, V. Ghetie, and E. S. Ward. 1999. Identification and function of neonatal Fc receptor in mammary gland of lactating mice. *Eur. J. Immunol.* 29:2515–2523.
- Convey, E. M. 1974. Serum hormone concentrations in ruminants during mammary growth, lactogenesis, and lactation: A review. *J. Dairy Sci.* 57:905–917.
- Dewhurst, R. J., M. Mitton, and C. H. Knight. 1993. Calibration of a polyurethane foam casting technique for estimating the weight of bovine udders. *Anim. Prod.* 56:444. (Abstr.)
- Doleschall, M., Y. Zhao, B. Mayer, L. Hammarstrom, and I. Kacskovics. 2005. Isolation of the gene encoding the bovine neonatal Fc receptor. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 108:145–150.
- Foley, J. A., and D. E. Otterby. 1978. Availability, storage, treatment, composition, and feeding value of surplus colostrum: A review. *J. Dairy Sci.* 61:1033–1060.
- Ghetie, V., and E. S. Ward. 2000. Multiple roles for the major histocompatibility complex class I-related receptor FcRn. *Annu. Rev. Immunol.* 18:739–766.
- Halliday, R., A. J. Russel, M. R. Williams, and J. N. Peart. 1978. Effects of energy intake during late pregnancy and of genotype on immunoglobulin transfer to calves in suckler herds. *Res. Vet. Sci.* 24:26–31.
- Kehoe, S. I., B. M. Jayarao, and A. J. Heinrichs. 2007. A survey of bovine colostrum composition and colostrum management practices on Pennsylvania dairy farms. *J. Dairy Sci.* 90:4108–4116.
- Knight, C. H., and R. J. Dewhurst. 1994. Once daily milking of dairy cows: Relationship between yield loss and cisternal milk storage. *J. Dairy Res.* 61:441–449.
- Larson, B. L., H. L. Heary Jr., and J. E. Devery. 1980. Immunoglobulin production and transport by the mammary gland. *J. Dairy Sci.* 63:665–671.
- Linzell, J. L. 1966. Measurement of udder volume in live goats as an index of mammary growth and function. *J. Dairy Sci.* 49:307–311.
- Lu, W., Z. Zhao, Y. Zhao, S. Yu, Y. Zhao, B. Fan, I. Kacskovics, L. Hammarstrom, and N. Li. 2007. Over-expression of the bovine FcRn in the mammary gland results in increased IgG levels in both milk and serum of transgenic mice. *Immunology* 122:401–408.
- Magaña-Seville, H., and C. A. Sandoval-Castro. 2003. Technical note: Calibration of a simple udder volume measurement technique. *J. Dairy Sci.* 86:1985–1986.
- Mayer, B., M. Doleschall, B. Bender, J. Bartyik, Z. Bosze, L. V. Frenyo, and I. Kacskovics. 2005. Expression of the neonatal Fc receptor (FcRn) in the bovine mammary gland. *J. Dairy Res.* 72(Spec no):107–112.
- McGuire, T. C., N. E. Pfeiffer, J. M. Weikel, and R. C. Bartsch. 1976. Failure of colostral immunoglobulin transfer in calves dying from infectious disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 169:713–718.
- McIntyre, R. T., D. B. Parrish, and F. C. Fountaine. 1952. Properties of the colostrum of the dairy cow. VII. pH, buffer capacity and osmotic pressure. *J. Dairy Sci.* 35:356–362.
- Miller, N., L. Delbecchi, D. Petitclerc, G. F. Wagner, B. G. Talbot, and P. Lacasse. 2006. Effect of stage of lactation and parity on mammary gland cell renewal. *J. Dairy Sci.* 89:4669–4677.
- Nguyen, D. A., and M. C. Neville. 1998. Tight junction regulation in the mammary gland. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 3:233–246.
- Nonnecke, B. J., and K. L. Smith. 1984. Biochemical and antibacterial properties of bovine mammary secretion during mammary involution and at parturition. *J. Dairy Sci.* 67:2863–2872.
- Ontsouka, C. E., R. M. Bruckmaier, and J. W. Blum. 2003. Fractionized milk composition during removal of colostrum and mature milk. *J. Dairy Sci.* 86:2005–2011.
- Polzin, H. W., D. E. Otterby, and D. G. Johnson. 1977. Responses of calves fed fermented or acidified colostrum. *J. Dairy Sci.* 60:224–234.
- Pritchett, L. C., C. C. Gay, T. E. Besser, and D. D. Hancock. 1991. Management and production factors influencing immunoglobulin G1 concentration in colostrum from Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 74:2336–2341.
- Sasaki, M., C. L. Davis, and B. L. Larson. 1976. Production and turnover of IgG1 and IgG2 immunoglobulins in the bovine around parturition. *J. Dairy Sci.* 59:2046–2055.
- Smith, K. L., L. A. Muir, L. C. Ferguson, and H. R. Conrad. 1971. Selective transport of IgG1 into the mammary gland: Role of estrogen and progesterone. *J. Dairy Sci.* 54:1886–1894.
- Smith, K. L., and F. L. Schanbacher. 1973. Hormone induced lactation in the bovine. I. Lactational performance following injections of 17 β -estradiol and progesterone. *J. Dairy Sci.* 56:738–743.
- Sordillo, L. M., S. C. Nickerson, R. M. Akers, and S. P. Oliver. 1987. Secretion composition during bovine mammary involution and the relationship with mastitis. *Int. J. Biochem.* 19:1165–1172.
- Stelwagen, K., D. C. van Espen, G. A. Verkerk, H. A. McFadden, and V. C. Farr. 1998. Elevated plasma cortisol reduces permeability of mammary tight junctions in the lactating bovine mammary epithelium. *J. Endocrinol.* 159:173–178.
- Tucker, H. A. 1979. Endocrinology of lactation. *Semin. Perinatol.* 3:199–223.
- Tucker, H. A. 1981. Physiological control of mammary growth, lactogenesis, and lactation. *J. Dairy Sci.* 64:1403–1421.
- Tyler, J. W., D. D. Hancock, S. M. Parish, D. E. Rea, T. E. Besser, S. G. Sanders, and L. K. Wilson. 1996. Evaluation of 3 assays for failure of passive transfer in calves. *J. Vet. Intern. Med.* 10:304–307.
- Tyler, J. W., D. D. Hancock, J. G. Thorne, C. C. Gay, and J. M. Gay. 1999. Partitioning the mortality risk associated with inadequate passive transfer of colostral immunoglobulins in dairy calves. *J. Vet. Intern. Med.* 13:335–337.
- USDA. 2002. Reference of Dairy Health and Management Practices in the United States. APHIS, Fort Collins, CO.
- Weaver, D. M., J. W. Tyler, D. C. VanMetre, D. E. Hostetler, and G. M. Barrington. 2000. Passive transfer of colostral immunoglobulins in calves. *J. Vet. Intern. Med.* 14:569–577.
- Willett, L. B., K. L. Smith, and F. L. Schanbacher. 1976. Hormone induced lactation in the bovine III. Dynamics of injected and endogenous hormones. *J. Dairy Sci.* 59:504–514.
- Winger, K., C. C. Gay, and T. E. Besser. 1995. Immunoglobulin G1 transfer into induced mammary secretions: The effect of dexamethasone. *J. Dairy Sci.* 78:1306–1309.

The Number and Types of Bacteria in the Bali Cattle's Vagina during Estrus and Pregnant

Ketut Tono P.G¹, Putu Henrywaesa Sudipa², I Gusti Ketut Suarjana³

¹Veterinary Bacteriology and Mycology laboratory, Veterinary Pathobiological Department,
Faculty of Veterinary Medicine, Udayana University, Bali, Indonesia
E.mail : ketut_tono@unud.ac.id

²Veterinary Bacteriology and Mycology laboratory, Veterinary Pathobiological Department,
Faculty of Veterinary Medicine, Udayana University, Bali, Indonesia
E.mail : henrywaesa@unud.ac.id

³Veterinary Bacteriology and Mycology laboratory, Veterinary Pathobiological Department,
Faculty of Veterinary Medicine, Udayana University, Bali, Indonesia
E.mail : kt_suarjana@unud.ac.id

Corresponding Author: ketut_tono@unud.ac.id

Abstract. Bali cattle have very good potential for meat and calf supply, because they have good adaptability with good quality reproductive properties. However, good reproductive nature is threatened by diseases caused by bacteria. This study aims to determine the number and types of bacteria in the vagina of Bali cattle that are estrus and pregnant. Sample using vaginal swabs from 30 cows. The sample consisted of 10 swabs from non-estrus and not pregnant (control / normal) cattle, 10 swabs from estrus cows, and 10 swabs from pregnant cows. After the swab is carried out using a cotton bud, the results of the swab are stored in Stuart transport media. Samples planted in blood media to be identified and the number of colonies counted, then followed by Gram staining and biochemical tests then the results were presented descriptively. The result is the highest number of estrous cow colonies (1034 colonies), compared to non-estrous and non-pregnant cows (407 colonies) and pregnant (376 colonies). This type of bacteria is dominated by *Klebsiella sp.* (42.85%), *Escherichia coli* (28.7%), *Streptococcus sp.* (14.28%) and *Bacillus sp.* (14.28%).

Keywords: Bacteria, Bali Cattle, Vagina Swab

I. INTRODUCTION

Bali cattle (*Bos sondaicus*, *Bos javanicus*, *Bos / Bibos banteng*) are one type of cattle that is important for the

development of the industry to support tourism in Bali and Indonesia in general. This is because Bali cattle have very good potential for the supply of meat and calf because they have good adaptability with

good quality reproductive properties [7]. However, this good reproductive nature is threatened by diseases caused by bacteria. One result of a bacterial infection is abortion. Abortion is a major problem for farmers due to loss of foetus which is sometimes followed by diseases of the uterus and prolonged sterility. According to [9], the causative agents of abortion are classified into several groups, namely physical, genetic, nutritional, chemical, drug, poisoning, hormonal, and disease. While the disease is generally caused by bacteria, viruses, fungi and protozoa. Bacterial infection is very detrimental to Bali cattle, in this case the bacteria in the reproductive tract of female cows, at the time of estrus where the cow is ready to be mated and when pregnant which is capable of causing abortion. Therefore, it needs to be investigated in this case the number of bacteria and what types of bacteria are in the reproductive tract of female cows, so that prevention and treatment can be done early so that bacterial infections during estrus and pregnancy can be addressed.

II. MATERIALS AND METHODS

The research was starting in May 2019, samples were taken at Sobangan

Village, Badung, Bali. Then the samples were examined at the Laboratory of Bacteriology and Mycology in the Faculty of Veterinary Medicine, Udayana University. Samples using vaginal swabs from 30 cows. The sample consisted of 10 swabs from non-estrus and not pregnant (control / normal) cattle, 10 swabs from estrus cows, and 10 swabs from pregnant cows. After the swab is carried out using a cotton bud, the results of the swab are stored in Stuart transport media. Samples planted in blood media to be identified and the number of colonies counted, then followed by Gram staining and biochemical tests then the results were presented descriptively.

III. RESULTS AND DISCUSSION

The number of colonies that grows most is atestrus cows, this is inversely proportional to the revelation [6], where the results of the study show that during estrus where the hormone estrogen dominates during the follicular phase, there is an increase in leukocyte migration to the uterine lumen thereby increasing bactericidal activity. But the opposite results were obtained in the study [2], where the bacteria isolated during the follicular phase (proestrus and estrus) only 22.47% compared to the luteal phase

(metestrus and diestrus) which is 77.53% of the total number of bacteria in the normal estrous cycle.

Table1.The Number of Colonies Growthin a Media Taken from a Normal Cow and not Estrus (Control)

No. Sample	Number of Colonies
A1	33
A2	99
A3	40
A4	10
A5	10
A6	95
A7	39
A8	20
A9	93
A10	31
Total Colony	470
Average	47

Table 2. The Number of Colonies Growth in a Media Taken from The Pregnant Cow

No. Sample	Number of Colonies
B1	36
B2	12
B3	33
B4	29
B5	54
B6	11
B7	6
B8	36
B9	60
B10	99
Total Colony	376
Average	37,6

Table 3. The Number of Colonies Growth in a Media Taken from Anestrus Cow

No. Sample	Number of Colonies
E1	11
E2	55
E3	181
E4	110
E5	60
E6	47
E7	176
E8	106
E9	190
E10	98
Total Colony	1034
Average	103,4

Table 4. Type of Bacteria and Percentage of Bacteria on Sample

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

The smallest number of bacterial colonies in this study was shown by pregnant Bali cows, this is consistent with the study [6], where cows that have 3 months gestational age were successfully isolated by bacteria only 12.94% of the total bacterial isolate, then the greater the gestational age, the number of bacteria that were successfully isolated was less where at 6 months gestation age, only 11.18% were successfully isolated and by age of 9 month

only 8.82% of the total isolate was successfully isolated. This was added by [6] where the number of isolates that were successfully isolated was more obtained at the age of early pregnancy (42.08%) compared to the age of late pregnancy (15.83%).

The four types of bacteria that grow are bacteria that are often found in the vaginal area of a cow, according to [4] Microbial flora of the healthy cow's

reproductive tract consists of a combination of aerobic microorganisms, facultative anaerobes, and mandatory anaerobes. *Lactobacilli* is found to be present in low amounts in bovine vaginal microbiota; in addition, *Enterobacteriaceae* is among the dominant population [5]. This is consistent with the results of research conducted which is *Klebsiella* sp. *Enterobacteriaceae*, and the number is most dominant among other bacteria. Then the dominant bacteria found in addition to *Klebsiella* sp. is *E.Coli*, which according to the study of [1] *E. Coli* is a normal flora that most commonly found in cattle. This is not surprising because sanitation, environmental conditions, the breeding system and general conditions of animals influence the colonization of the bacterial ratio of the vagina [8].

According to [6] at follicular phase (proestrus dan estrus) the most commonly isolated bacteria were *Bacillus* Spp. (22.58%) followed by *Corynebacterium* Spp., *Staphylococcus* Spp. and *Streptococcus* Spp. (masing-masing 19.35%), *E. coli* and *Salmonella* (masing-masing 6.45%), and *Micrococcus* and vaginal fungi (3.23% each), shows the results of bacteria that were successfully isolated 18.24 % from 170 isolated bacteria. At luteal phase

(metestrus and diestrus) the most dominant bacteria were *Staphylococcus* Spp. (19.05%) followed by *Corynebacterium* Spp. (14.29%), *Bacillus* Spp., *E. coli* and *Streptococcus* Spp. (11.90% each), *Micrococcus* (9.52%), *Salmonella* (7.14%), and *Klebsiella*, *Proteus* and vaginal fungi (4.76% each), the bacteria were successfully isolated 24.71 % from total of 170 bacteria isolate. [3] was successfully isolated *E. coli* (17.7%), *Klebsiella* Spp. (5.81%), *Staphylococcus* (12.79%), and *Bacillus* Spp. (9.30%) from 40 pregnant cow sample. The result of our research is some of the bacteria that we successfully isolated showed the same result at research from [6] and [3], where we managed to isolated *Klebsiella* sp. for 42,85%, followed by *Eschericia coli* for 28,7%, and each from *Streptococcus* sp.type and *Bacillus* sp. 14,28% from 30 sample, all of these bacteria always appear when viewed from several other studies.

V. CONCLUSION

The largest number of colonies grew on media whose specimens were taken from estrus Balicow vaginal swabs, totaling 1034 colonies, with an average of 103.4 colonies per sample. The number of colonies that

grow sometimes varies with each study, but in general bacteria that can be isolated in the follicular phase (proestrus and estrus) are less than the luteal phase (metestrus and diestrus) or can be said in the not pregnant and estrous phases, then the number of bacteria that can be isolated in pregnant cows decreases with increasing gestational age.

The bacteria that grew dominates by *Klebsiella sp.* for 42,85% from 30 sample, followed by *Eschericia colifor* 28,7%, and each from *Streptococcus sp.* type and *Bacillus sp.* for 14,28%. From several studies that have been done, the same bacteria also appear, but with different percentages.

REFERENCE

- [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-Macías 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, Dhami 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 ternaksapi dan kerbau". Jakarta (Indonesia): Universitas Indonesia Press.

The Ovarian Hypofunction: A Case in Cow Management Therapy

Herry Agoes Hermadi, Mas'ud Hariadi and and Suherni Susilowati

Infertility Laboratory, Department of Reproduction

Veterinary Faculty, Airlangga University

ABSTRACT

There were two FH (Friesian Holstain) cows in Lani Dairy Farm Surabaya that suffered from ovarian hypofunction after therapy as follows: In the case of ovarian hypofunction, management problems were solved by improving feeding systems for increasing body condition score, which was expected to increase more than twofold by providing green feed 10% of body weight per day. Natural recovery will occur if the cow is given with 17% protein concentrate provided 2% of the BW per day for one month. Impaired function of the anterior pituitary gland can cause, among others, ovarian hypofunction with smooth surface of the ovaries because there was no follicle and corpus luteum growth, although the size is normal. This is because the decrease in FSH and LH in the blood was very low, the food was less, poor sanitation and the animals were too long in the cow shed. Diagnosis can be made by rectal palpation and ultrasonography. To stimulate estrus and ovulation, we used a combination of gonadotropin preparations with CIDR (Control Internal Drug Release), PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin) Folligon intervet 500 IU by intramuscular, PGF2 alpha (Lutalyse). After the BCS more than 2. In conclusion ovarian hypofunction can be treated if body score condition less than 2 and improve feeding management as soon as possible to obtain BCS of more than 2

Keywords: ovarian hypo function, BCS, PMSG, CIDR and PGF2 alpha

INTRODUCTION

Improvement of living standards, intellect and welfare of the people is the goal of national development. Development and improvement of livestock production is one of the factors supporting the achievement of those goals. Various activities have been carried out to improve the productivity of livestock. However, rapid population growth and increased purchasing power of the people cause the demand for meat and milk becomes beyond their production. In the decade of the 80s, cattle population decreased 1.46% per year. It was because the slaughter rate, especially the slaughter of productive female cattle and livestock deaths due to disease was higher than the birth rate. Low birth rates and a decline in livestock population is the mainly influenced by the low level of livestock fertility and perinatal death. Birth rates and population growth is the problem of livestock reproduction or livestock breeding (Adjid. 2004). In the dairy industry worldwide, reproductive disorders are a major cause of economic losses and a challenge to scientists and technicians. In recent decades, declining fertility and increasing milk production have been widely reported in dairy cattle. In this article, the relationships between milk productions, ovarian disorders and fertility in high producing dairy herds are briefly described. We carried out a retrospective study of 23204

lactations included in a reproductive control program, a geographical area experiencing both warm and cool conditions. (Yániz, et al, 2008).

Actually, if we look at the cases of reproductive disorders and report the results of insemination in East Java, there are cases that are important to know but has never been reported, that is the incidence of repeated mating or "repeat breeding". Until now there are no exact data on the percentage of "repeat breeders" cows, although there are a lot of complaints about the failure of artificial insemination breeder or a new pregnancy occurs after a few times of artificial insemination. One of the difficulties encountered in the field is that the breeder is not carrying artificial insemination card, so he does not know or forgets the time and frequency of insemination. The next difficulty is that cattle brought are not often cattle with reproductive disorder complaints, or in the other words, it was not on target, in addition to inadequate facilities. Two main objectives of the program of artificial insemination in cattle are to improve the genetic quality of the local livestock and prevent or eliminate sexually transmitted diseases. When compared to natural mating, artificial insemination is much more efficient in saving the stud, and the breadth and speed of deployment of superior cattle breeds produced. Beside these advantages, artificial insemination also contains a very high risk if the selection of bulls is less well in frozen semen production process, or the handling and distribution in the field is not done genuinely. The potential damage is doubled since sexually transmitted diseases and genetic defects descent are fast and widespread both nationally and internationally (Frost et al, 1981). Artificial insemination has been carried out in our country for about half a century. However, the results from the ability of artificial insemination in the doubling superior descent are doubtful. Our livestock population increase is still very slow and cannot meet domestic demand. This paper discusses some of the many kinds of reproductive problems found in the field and some sexually transmitted diseases that can spread through artificial insemination. Furthermore, we will outline in this paper some cases of the results of Reproductive Disorders Control team in several districts in East Java, and some kind of diseases in cattle that can be transmitted through artificial insemination.(Putro, 1991).

Reproductive Disorders Cases in East Java

Cooperation between East Java Provincial Animal Husbandry and Veterinary Medicine Faculty of Airlangga University has pioneered since the 1970s, specifically for the prevention of reproductive disorders, formed the "Sterility Eradication" team. Until now the team has been renamed several times, among others, "Sterility Control Team" and others, and now better known as the team of "Reproductive Disorders Management". In handling cases in the field of reproductive disorders, the role of Veterinary Medicine Faculty of Airlangga University' is still regarded as lacking, because it has only limited roles in making a diagnosis, whereas it does not participate in the treatment and monitoring treatment outcomes. Veterinary Medicine Faculty of Airlangga University in its role in the field from year to year, especially in the diagnosis of reproductive disorders, reached only less than 10% of the expected target. Table 1 contains the results of the examination of reproductive disorders in East Java in 2009 and 2010.

Table 1. Reproductive Disorders Examination Results in Cows in East Java in 2009 and 2010

No.	Type of Cases	Number of Cases		%	
		2009	2010	2009	2010
1.	Ovarian hypofunction	1220	1131	4.7	6.28
2.	Ovarian atrophy	206	228	0.8	1.3
3.	Ovarian cysts	197	350	0.7	1.94
4.	Persistent CL	926	1032	3.6	5.73
5.	Endometritis	432	492	1.7	2.73
6.	Pyometra	98	77	0.4	0.43
7.	Uterine tumor	12	3	0.05	0.03
8.	Others	116	-	0.45	-
	Total cases	3207	3310	12.35	22.72
	Total examined cows	26	17		

From the results of these reproductive disorders (Table 1), ovarian hypofunction case occupies the highest position followed by the corpus luteum and later persistent endometritis. Theoretically the cases above will be discussed in the next sub chapter. (Hariadi et al.2010)

MATERIALS AND METHODS

Treatment of Ovarian Hypofunction

Two FH (Friesian Holstain) cows were present at Lani Farmer Dairy Farm Surabaya that suffered from ovarian hypofunction after therapy as follows: In the case of ovarian hypofunction, management problems were solved by improved feeding systems for improved body condition score, which was expected to increase more than twofold by providing feed. Management system improvement should be done to identify the mistake and feeding was improved with the provision of green feed 10% of body weight per day. Natural recovery will occur if the cow is given with 17% protein concentrate provided 2% of the BW per day for 1 month. There were two FH (Friesian Holstain) cows in Lani Farmer Dairy Farm Surabaya that suffered from ovarian hypofunction after therapy as follows: In the case of ovarian hypofunction, management problems were solved by improved feeding systems for improved body condition score, which was expected to increase more than twofold by providing green feed 10% of body weight per day. Natural recovery will occur if the cow is given with 17% protein concentrate provided 2% of the BW per day for 1 month. Impaired function of the anterior pituitary gland can cause, among others, ovarian hypofunction with slippery surface because there was no follicle and corpus luteum growth, although the size was normal. It was because the decrease in FSH and LH in the blood was very low, the food was less, sanitation was poor and the animals were too long in the cage.(Hariadi et al.2011; Morrow, 1980; Eaglesome, and Garcia, 1997)

Diagnosis could be made by rectal palpation and ultrasonography. Impaired function of the anterior pituitary gland could cause, among other things, ovarian hypofunction. Ovarian surface was slippery because there was no growth of the follicle and corpus luteum at this state of the normal ovary. It was due to deep decrease in FSH and LH in the blood, bad sanitation and animals were too long in the cage with feeding of poor quality and quantity. The apparent clinical symptom was anestrus. If body condition was poor and feed shortage was taking place in a long time, ovarian hypofunction will turn into ovarian atrophy. Atrophic

ovaries were ovaries smaller than normal and with a slippery surface because the follicles do not grow so the reproduction process was not running at all. Livestock body condition was poor with clinical symptoms of very long anestrus. Practical applications of ultrasound in bovine reproduction include imaging of the ovary as a diagnostic aid, examination and confirmation of ovarian cysts, early pregnancy detection, and identification of infertility. Although rectal palpation was the established method for conducting reproductive examinations, the information gathering capabilities of ultrasonic imaging far exceed those of rectal palpation. Assessment of pregnancy status and fetal viability early post breeding could significantly improve reproductive efficiency. Such methods can play a key role in reproductive management to rapidly return open animals to the breeding program. Early pregnancy detection was only useful when techniques have a high-level of accuracy for detection of infertility. (Alemayehu. 2013). The symptom of ovarian hypofunction was anestrus. Subordinate follicles did not develop into dominant follicle, BCS < 2, once reproduced or having offspring. The cause of ovarian hypofunction was failed management factors, such as overpopulation, environmental factors, and the cage was too hot and crowded. The differential diagnosis of ovarian hypofunction was ovarian hypoplasia in which the animal was obese, infertile since being calf, and small vulva and genitalia due to genetic factors. If HP was not treated, the ovaries will shrink, which was designated as atrophy (Toelihere , 1981).

RESULTS

Diagnosis could be made by rectal palpation and ultrasonography. To accelerating estrus and ovulation LH and FSH preparation in combination with PMSG Folligon intrevet500 IUnit IM and CIDR progesterone preparation. Ovarian atrophy can be distinguished from ovarian hypoplasia caused by genetic factor. In the state of hypoplasia, the ovary was similar to the state of ovarian atrophy, which was very small, but the physical state of the body was much fatter. Treatment of ovarian hypo function could be done it by improving the feed quality, cages should be cleaned frequently and the cattle should be frequently grazed. When the condition has improved, the preparations PMSG could be given by intramuscular.(Darrel and Kesler 2002, Opsomer et al. 2000).We used ultrasonography with typical of sononet with linear probe that should be inserted into rectal palpation for knowing the surface of the ovary and follicle condition. There was no growth of subordinate follicles that would become predominant follicles due to FSH and LH deficiency. The subordinate follicles structure included measurement around less than 5 ml, the color of follicles solution was black or hypoechogenic.After 30-day management therapy we injected PMSG Folligon 500 IU by intramuscular 2 days thereafter. The echo texture was a terminology used in USG to describe tissue structure relative to the surrounding tissue. After the injection of Folligon (PMSG), the figure changed. The follicles became predominant with the diameter around 14 mm, which would be ovulated with hypoechogenic.The sign of estrus would show as soon as ovulation takes place and we straightly carried out insemination, and finally we found that the cattle was successfully pregnant. Then, 30 days later we identified the foetus with vertebrae, which was hyperechogenic, the heat in isoechoic, and the water amnion with black color in hypoechogenic.

DISCUSSION

Ovarian Hypofunction and Atrophy

Impaired function of the anterior pituitary gland can cause, among other things, ovarian hypofunction. Ovarian surface is smooth because there is no growth of the follicle and corpus luteum at this state of the normal ovary. This is due to FSH and LH decrease in the blood. Animals are too long in the cage with feeding of poor quality and quantity (Radostits 0 M and Blood D C, 1985). Clinical symptom seen is anestrus. If poor body condition and feed shortage in a long time, ovarian hypofunction will turn into ovarian atrophy. Atrophic ovaries are ovaries smaller than normal and with a slippery surface because the follicles do not grow so the reproduction process is not running at all. Livestock body condition is thin with clinical symptom of very long anestrus. Diagnosis can be made by rectal palpation and ultrasonography. Management system needs to be improved to find the location of faults and to improve the quality. If the BCS had increased more than 2, rectal palpation should be done to observe the structure and development of the ovary. Then, in order to quickly put the cattle back into the cycle and to stimulate the onset of estrus and ovulation, the animal were supplied with FSH and LH preparations of progesterone (C1DR or PRID) can help (McDougall and Compton, 2005; Pemayun, 2009.). Ovarian atrophy can be distinguished from ovarian hypoplasia caused by genetic factors. Ovarian hypoplasia circumstances are similar to the circumstances of ovarian atrophy, in which the ovaries are very small but the physical state of the body is much fatter. Ovarian hypoplasia is a condition where one or both ovaries did not grow from birth to adulthood, so the ovaries cannot be found. If the ovaries are not present, they look like just a thickening of the soft head of a pin. Females who suffer from this disorder are completely sterile. (Valyushkin and Gukov.1980).

CONCLUSION

Ovarian hypofunction could be treated if body score condition was less than 2 and feeding management was improved as soon as possible to obtain BCS of more than 2.

REFERENCES

- Abdul Adjid RM. 2004. Strategi Alternatif Pengendalian penyakit Reproduksi Menular untuk Meningkatkan Efisiensi Reproduksi SapiPotong. Wartazoa 14(3):125-132.
- Alemayehu L. 2013. The Role of Trans-Rectal Ultrasonography in Artificial Insemination Program .Additional information is available at the end of the chapter.<http://dx.doi.org/10.5772/52721>
- Morrow DA, 1980. Current therapy in theriogenology; Diagnosis, treatment and prevention of reproductive disease in animal.W.B.Saunders Company Philadelphia.London-Toronto.
- Darrel J and Kesler,2002. Review of estrous synchronization systems: CIDR inserts Proceedings, The Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle Workshop, September 5-6, 2002, Manhattan, Kansas,
- Eaglesome MD and MM Garcia. 1997. Disease risks to animal health from artificial insemination with bovine semen. Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz. 16(1), 215-225.

Frost A J, Holroyd R G, Ladds, P W, and Williamson P E, 1981. Reproductive Diseases and Their Prevention. Australian Vice Chancellors Committee.

Hariadi.M, Harjopranyoto, Wurlina, Herry Agoes and Budi U, Reproductive Disorders Examination Results in Cows in East Java in 2009 and 2010 .Veterinarian Faculty Airlangga.University

Hariadi.M, Harjopranyoto, Wurlina Herry Agoes Budi U, Indah Norma and Hermin R.2011.Buku Ajar Ilmu Kemajiran pada Ternak. Departemen reproduksi Veteriner. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

McDougall,S. and C. Compton, 2005. *Reproductive Performance of Anestrous Dairy Cows Treated with Progesterone and Estradiol Benzoate*.J. Dairy Sci. 88:2388

Opsomer, G., Y. T. Grohn, J. Hertl, M. Coryn, H. Deluyker, and A. de Kruif. 2000. Risk factors for post partum ovarian dysfunction in high producing cows in Belgium: A field study. Theriogenology 53:841–857.

Radostits O M and Blood D C, 1985. Herd Health. W.B. Saunders Company. London Roberts S J, 1971. Veterinary Obstetrics and Genital Diseases. Edwards Brother Inc. Ann Arbor. Michigan.

Pemayun, T.G.O., 2009. *Induction of Oestrus with PMSG and Gn-RH in the Postpartum Anoestrus Dairy Cow*. Diakses pada <http://www.bulletinveteriner.com/induksi-estrus-dengan-pmsg-dan-gn-rh-pada-sapi-perah-anestrus-postpartum/tanggal 11 Januari 2012>

Putro, P.P., 1991. *The treatment of anoestrus and sub oestrus in dairy cattle using a progesterone controlled internal drug release (CIDR) or a synthetic Gonadotrophin-Releasing hormone Gn-RH*. Buletin FKH- UGM. Vol.10 no2.

Toelihere M R, 1981. Ilmu Kemajiran PadaTernak Sapi. Edisi Pertama. Institut Pertanian Bogor.

Valyushkin K.D and GukovF.D.1980 . Vitamin A in hypofunction of ovary [dairy cattle, chemotherapeuticants- other, Byelorussian SSR]]. [Russian []Vitebskij Veterinarnyj Inst. (Byelorussian SSR) Ecole Nationale Veterinaire de Toulouse, 31 (France).

Yániz J¹, López-Gatius F, Bech-Sàbat G, García-Isprierto I, Serrano B, and Santolaria P. 2008. Relationships between milk production, ovarian function and fertility in high-producing dairy herds in north-eastern Spain.



Review Article

An Overview on Functional Causes of Infertility in Cows

Fitsum Abraham*

Department of Veterinary Medicine, Wolaita Sodo University, Wolaita Sodo, SNNRG, Ethiopia

Abstract

Although problems in animal breeding are innumerable, infertility is one of the major bottlenecks in livestock production. In this paper functional causes of infertility like luteal deficiency due to abnormal pattern of LH pulses, cystic ovarian disease, and ovulatory defects, persistent corpus luteum, infertility associated with anestrus, non-detected estrus and repeat breeder are presented with respect to cow. It has been documented that in the management of cow, there are many times when the manipulation of normal cyclic activity ensures optimum production or is convenient for the owner by use of hormones to manipulate ovarian cyclic activity. Epitomizing under the prevailing condition increased productivity of the cow can only be achieved through success in minimizing infertility problems associated with functional cause through early diagnosis and treatment in addition to improvement of animal nutrition, health and genetic makeup.

Keywords: Cow; Diagnosis; Hormone; Infertility; Treatment

Introduction

Reproductive performance is one of the most important factors affecting dairy farm profitability and the development of national economy, as well as the living standard of rural and urban societies. Because, it directly or indirectly influences the yield of milk, reproductive culling rate and the cost for breeding and calf sales [1]. Dairy cows should calve one time every year to maximize economic efficiency. Cows that have been highly selected for milk production in recent decades have suffered a decline in cow fertility, fertility is a multi-factorial trait and its deterioration has been caused by a network of genetic, environmental and managerial factors and their complex interactions make it difficult to determine the exact reason for this decline [2].

The ovaries play the key roles in reproduction and any impairment in their functions can result in either sterility or infertility. The term fertility is applied to the cow denotes the desire and ability to mate, the capacity to conceive and to nourish the embryo and finally the power to expel a normal calf and fetal membrane. Sterility means an absolute inability to produce, whereas infertility denotes a degree of reduced fertility which results in failure to produce or delay in producing the normal live calf. Most forms of functional infertility results in anoestrus that means a failure of cows to display estrus [3].

Embryo survival is a major factor affecting production and economic efficiency in all systems of meat and milk production by ruminants [4]. In beef cattle, estimates indicate that fertilization rate for oocytes is 90%, whereas average calving rates to a single service are between 40% and 55%, suggesting a rate of embryonic/fetal mortality (excluding fertilization failure) of about 35% to 50% [5]. The majority of embryonic loss (70-80%) occurs in the first 3 weeks of pregnancy particularly between days 7 and 16 of pregnancy [6].

Hormones of reproduction are classified in to two groups according to their modes of action; primary hormones and secondary (metabolic) hormones. Primary hormones are involved in various aspects of reproduction, implantation and maintenance of gestation, parturition, lactation, maternal behavior and spermatogenesis. Primary hormones include FSH, LH and prolactin from anterior pituitary gland and oxytocin from posterior pituitary gland. Secondary hormones are necessary for the general wellbeing, metabolic state and growth of the cattle. Permit the full effect of the primary hormones indirectly related to reproduction. Secondary hormones are secreted by the pituitary, thyroid, parathyroid, adrenal cortex, uterus and

pancreas. These hormones include Thyroid Stimulating Hormone, Adrenocorticotropic Hormone, Anti-diuretic Hormone, Human Chorionic-Gonadotrophic Hormone and insulin [7].

Progesterone produced by the CL prevents cyclicity by acting on the anterior pituitary in a negative feedback fashion; therefore, decreasing the release of FSH and LH. It prepares the uterus for reception of fertilized ova and subsequent pregnancy. It also helps the cow maintain pregnancy by suppressing uterine contractions and promoting development of the uterine lining [8]. prostaglandin $F_{2\alpha}$ (PGF $_{2\alpha}$) is secreted by the endometrial of the uterus and also affects structures on the ovary, helping to initiate ovulation by causing the demise of the CL, which results in withdrawal of progesterone's negative feedback mechanism. High circulating concentrations of progesterone stimulate the production and release of PGF $_{2\alpha}$ from the uterus [9].

The postpartum period plays a pivotal role in Cow's reproduction. The duration of postpartum anoestrus has an important influence on reproductive performance. During the last few years, several studies have been attempted to treat the prolonged postpartum anestrus in cows by using hormonal treatments such as gonadotropin releasing hormone (GnRH), estrogen, prostaglandin (PG F2 α) and progesterone [10-12].

Therefore, the objectives of this paper are:

- To give an overview on functional causes of infertility in cows.
- To highlight treatments for those functional causes of infertility in cows.

Follicular and Hormonal Dynamics during the Estrus Cycle

The estrus cycle is divided into different phases, (follicular phase, estrus, and luteal phase) and is regulated by hormones secreted by the

*Corresponding author: Fitsum Abraham, Department of veterinary medicine, Wolaita Sodo University, Wolaita Sodo, SNNRG, Ethiopia, Tel: +251916542492; E-mail: bubu77960@gmail.com

Received June 27, 2017; Accepted July 31, 2017; Published August 07, 2017

Citation: Abraham F (2017) An Overview on Functional Causes of Infertility in Cows. JFIV Reprod Med Genet 5: 203. doi: [10.4172/2375-4508.1000203](https://doi.org/10.4172/2375-4508.1000203)

Copyright: © 2017 Abraham F. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

hypothalamus (GnRH), anterior pituitary gland (follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH), ovary (estradiol and progesterone), and uterus (prostaglandin F2 α (PGF2 α). The preceding hormones serve as chemical messengers that travel in the blood to specific target tissues which contain receptors that are hormone specific and regulate the phases of the estrus cycle. The combination of hormone secretion and metabolism (liver, kidneys and lungs) maintain the correct hormonal balance during the follicular phase, estrus, and luteal phase of the cycle. A pre-ovulatory follicle and the subsequently formed corpus luteum are the two primary ovarian structures that regulate the estrus cycle through secretion of estradiol and progesterone, respectively [13].

Proestrus, the first phase of the estrus cycle which is building up phase, during this phase the ovarian follicle (under the influence of FSH and LH) enlarges and begins to secret estrogen. Starts in a day or two of regression of the corpus luteum from the previous cycle. Late in proestrus the vaginal wall thickens and external genitalia will increase in vascularity in preparation for copulation.

Estrus, the period of sexual receptivity, is primarily initiated by the elevation in estrogens from mature follicles just prior to ovulation. In most cases ovulation occurs within a day or two after the onset of behavioral estrus.

Metaestrus, postovulatory phase dominated by corpus luteum function. During this period serum estrogen decreases and progesterone increases [14].

Functional Causes of Infertility in Cows

As a rule the functional causes of infertility tend to affect individual animals within a herd but in the aggregate they constitute an important cause of infertility; furthermore when they affect a large number of a particular sub group in a herd they frequently reflect some other problem, especially nutrition. Most functional aberrations occur because of some endocrinological abnormality which is frequently difficult to specify even with current methods of hormone assay, particularly when single, spot samples of blood or milk are examined. The abnormalities occur as a result of inherited factors; nutritional deficiencies or excess social influence which may arise from modern husbandry methods, for instance the grouping of large numbers of cows thus interfering with the establishment of a stable social hierarchy; and the stress of production [3].

Some of the common causes are elaborated as follows:

- a) Non detected estrus(silent estrus)
- b) Anoestrus
- c) Ovulatory defects
- d) Persistent corpus luteum
- e) Cystic ovaries
- f) Luteal Deficiency
- g) Repeat Breeder

Non-detected estrus/silent estrus

The cow show estrus but there is no one who can follow the cow. After the onset of puberty, cyclic ovarian activity should be maintained continuously through the cow's life except during pregnancy and for a short period in the puerperium. The only way that the herd's man knows that, this is occurring when the sign of estrus at approximately 21 days intervals. It is possible that there are signs but those they one not being observed; in this case it is a management problem [15].

The results of studies of the timing of estrus behavior were inconsistent with simple diurnal patterns and probability should be explained in terms of the periods of times for which cows were left undisturbed by other farm activities. Non-detected estrus can be confirmed by identification of cow's, provision of adequate lighting, heat mount detectors and other aids to the detection of mounting and daily follow up of the cow [16].

Anoestrus

Anoestrus is failure of cows to exhibit overt estrus but is more commonly a problem with estrus detection. Some cows exhibit overt estrus for a very short time, have few mounts or show signs of estrus in the middle of the night making estrus detection in these animals difficult. The estrus detection rate on many farms is less than 50%, being a very limiting factor to reproductive efficiency. Many factors, such as footing, management and milk production level, will affect demonstration of estrus. While these cows are not observed in estrus, they have normal estrous cycles and will respond well to ovulation synchronization programs [17].

True anoestrus: It can be defined as the ovaries may be quiescent and inactive; this is referred to as a true anoestrus. The reasons for the failure of normal activity may be insufficient release or production of gonadotropins to cause folliculogenesis, or it may reflect the failure of the ovaries to respond [18]. Clinical rectal palpation will reveal small ovaries which are usually flat and smooth, absence of corpus luteum, either developing, mature or regressing cow in true anestrus will have virtually unchanged ovaries whilst a cow in late dioestrus or early dioestrus (metaestrus) will have a distinctly palpable corpus luteum [19]. Equine chorionic gonadotropin hormone can be used to stimulate ovarian activity, it can induce follicular growth and estrus; at a dose rate of 3000-4500 IU. GnRH, Progesterone and estrogen has been used successfully to treat anoestrus in dairy cows [20].

Sub estrus or silent heat: There may be normal cyclic ovarian activity but the cow is not showing the normal behavioral signs; this is described as sub estrus or silent heat. The first and second ovulations post-partum is frequently not preceded by behavioral signs of estrus and is thus truly 'silent heat'. After the second estrus it is unlikely, that may result in true 'silent heats' to occur. When ovulation occurs in the absence of observed estrus it is more likely to be result of a failure of observation due to the short duration of behavior than to poor detection [3].

Diagnosis of the condition is made on the clinical history and rectal palpation of the genital system, no differentiation can be made from non-observed estrus, since the clinician will be checking for evidence of cyclic ovarian activity as demonstrated by a palpable corpus luteum. Determination of progesterone in milk or blood is a useful aid. In respect of treatment, if a mature corpus luteum is present and the cow is not pregnant, PGF_{2 α} analogue followed by fixed time insemination is indicated. If the corpus luteum is at refractory stage double injection of prostaglandin regimen at an 11 day interval be used. Alternatively other progesterone implant could be used followed by fixed time insemination [21].

Ovulatory defects

Ovulation in the cow is a typical since it occurs 10-12 h after the end of behavioral estrus and 18-26 h after the ovulatory LH peak. During estrus and after the end of estrus several follicles undergo development but usually only one or occasionally two, ovulate; the other follicles regress and become atretic. The consequences for fertility of anovulatory defect are two-fold: either the oocyte is not liberated

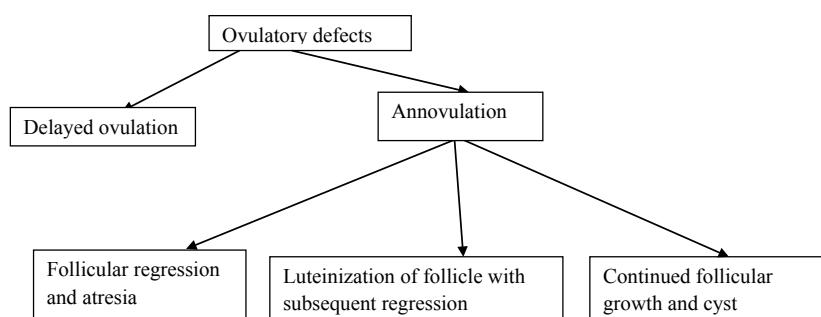


Figure 1: Ovulatory defects [3].

too late so that the spermatozoa are now incapable of fertilization, or else the oocyte has aged and is not capable of normal development. Ovulatory defects can occur due to two causes: endocrine deficiency or imbalance and mechanical factors. It is a complex interaction between ovarian hormones, the anterior pituitary and the hypothalamus. Thus if the quantity of pituitary hormone released is insufficient or its timing is incorrect (this is particularly true of LH), then ovulation is delayed or fails to occur [22] (Figure 1).

Delayed ovulation: The hormone which is important for delayed ovulation is delayed LH surge which plays a big function for the failure of fertilization. If ovulation had not occurred by 24 h after service, the cow should be re-inseminated.

Diagnosis of the condition is difficult since it requires sequential rectal palpation of the ovaries which might self-intervene with the ovulation and may cause premature rupture. It has been recommended that diagnosis can be made if the single follicle can be detected in the same ovary on two successive examinations, one at peak estrus and another 24–36 h later. Delayed ovulation is generally assumed to be one of the causes of failure of conception in cyclic non breeders [15]. Treatment has consisted of using those hormones that might hasten the timing of ovulation. GnRH Administration causes a rapid rise FSH and LH concentrations peak within 30 to 60 min and return to pre injection values within 4 h. The pattern of release of LH resembles the pre-ovulatory one observed during late estrus in normal cyclical animals [21].

Anovulation: Anovulation has been defined as the absence of ovulation which leads to both true anoestrus or to cystic ovarian disease. Sometimes anovulation is observed before the onset of a period of anovulatory anoestrus with follicle regressing and becoming atretic. If cows are examined per rectum during the first few weeks after calving, a number of enlarged ovulatory follicles can often be detected. They are incorrectly described as being cysts, but they are transient and don't persist even if no treatment is given [23].

Diagnosis of anovulation can only be made retrospectively by noting on rectal palpation or Ultrasonography that a follicle persists longer than one would have suspected. Treatment is directed towards ensuring that ovulation occurs at the next estrus, hence GnRH administered as described or delayed ovulation are indicated [24].

Persistent corpus luteum: Anything that interferes with the production or release of endogenous luteolysin, results in persistent corpus luteum. Pregnancy is the condition which most frequently results in the persistence of corpus luteum, but in the presence of uterine infection and inflammation of the tissues there is interference with the production or the release of luteolysin. There is little firm

evidence that persistence of the corpus luteum can occur in the absence of uterine lesions [25].

Cystic ovaries: Ovarian dysfunctions like cysts occur most often during the early postpartum period when there is a transition from the non-cyclic condition during pregnancy to the establishment of regular cyclicity. It is generally accepted that cystic follicles develop due to a dysfunction of the hypothalamic pituitary-ovarian axis. This dysfunction has a multi factorial etiology, in which genetic, phenotypic and environmental factors are involved [26,27]. When discussing the pathogenesis of COF, a distinction may be made between a primary defect in the hypothalamus-pituitary and a primary defect at the level of the ovary in the follicle itself. However, COF formation may result from defects in ovary/follicle and the hypothalamus/pituitary as well [28].

The most widely accepted hypothesis explaining the formation of a cyst is that LH released from the hypothalamus-pituitary is altered: the pre-ovulatory LH-surge is either absent, insufficient in magnitude or occurs at the wrong time during dominant follicle maturation, which leads to cyst formation. It is believed that an altered feedback mechanism of estrogens on the hypothalamus- pituitary can result in an abnormal GnRH/LH release and cyst formation. A GnRH/ LH surge occurring prematurely during follicle growth, i.e., when no follicle capable of ovulation is present, can trigger the hypothalamus to be unresponsive to the feedback of oestradiol which results in the formation of ovarian cysts [29].

Follicular cyst: There are several definitions used to describe ovarian follicular cysts and the traditionally accepted definition is that they are “follicular structures of 2.5 cm or larger that persist for a variable period in the absence of a corpus luteum”. We can consider ovarian follicular cysts to be any follicular structure on the ovary in the absence of luteal tissue, larger than normal follicular size that persists for a significant period of time and affects the estrus cycle of the animal [30].

Though we cannot determine the exact cause of ovarian follicular cysts, we can recognize that they “develop when one or more follicles fail to ovulate and subsequently do not regress but maintain growth and steroidogenesis” [31]. It has also been determined that follicular cysts are anovulatory structures so, as long as they persist, cow Will remain infertile [30]. Cystic ovarian disease is the “most common endocrine pathology to be found in dairy cows,” and incidence is “believed to vary from 1 to 30% depending on herd and breed conditions”. Holsteins are the most susceptible to develop a cystic condition compared to other breeds, and the most likely time of diagnosis is 30-60 days after parturition in high-yielding dairy cows [28].

Follicular cysts, when compared to other ovarian cystic conditions,

are characterized by thin walls and produce very small amounts of progesterone. Occasionally, a persistent condition can lead to increased testosterone levels, causing some cows to exhibit masculine aggressive and sexual behavior. However, most cystic cows will remain in anoestrous as long as the condition persists. The fluid in follicular cysts contains many components, including hormones like estradiol, progesterone, and insulin [31].

One proposed explanation for the development of follicular cysts is that “the positive feedback of estradiol on release of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) is compromised” [32]. This would not interfere with the ability of the pituitary gland to release luteinizing hormone (LH) in cystic animals, but the overall function of the hypothalamic pituitary- ovarian axis would be altered, and the pre-ovulatory LH surge that normally induces ovulation does not occur. In cystic animals, despite the failure of ovulation by the pre-ovulatory follicle, a surge of follicle-stimulating hormone (FSH) would occur, and under conditions of low progesterone concentrations and high LH concentrations, dominant follicles would be caused to grow to a larger size. These oversized follicles are termed follicular cysts that produce high concentrations of estradiol and inhibin, cause a delay in follicular turnover and are responsible for the persistent cystic condition [32,33].

Luteal cyst: Luteal cystic ovarian disease is characterized by enlarged ovaries with one or more cysts, the walls of which are thicker than those of follicular cysts because of a lining of luteal tissue [34]. Cysts with thicker walls produce high levels of progesterone. In appearance, they are smooth and rounded, with a spherical cavity that is lined by a layer of fibrous tissue surrounded by the luteinized cells [35]. “Luteal cysts are considered anovulatory cysts and are associated with infertility and muco metra in cattle” [24]. When compared to follicular cysts, luteal cysts are more likely to persist over long periods of time and can lead to nymphomania in some animals [36].

Luteal cysts “develop when ovulation fails to occur and the theca undergoes luteinization” [35]. The luteal cyst occurs when the cells of the follicular cyst (granulosa and theca) become luteinized and start producing progesterone. Luteal cyst incidence increases with age and most often affects cows with high milk production [37].

Luteal deficiency: Progesterone is necessary for the maintenance of pregnancy until 150-200 days of pregnancy and perhaps in some cases to term. The main source of the hormone is the CL so that if this is not completely formed or it is not functioning adequately then insufficient progesterone is produced and the pregnancy fails. Luteal deficiencies have been suspected of causing infertility for many years and, although proof is difficult, cyclic non breeders or repeat breeders are frequently treated on this assumption [29].

It is impossible on rectal palpation to differentiate between a normal and abnormal CL; there is a natural variation in luteal size and the position of the CL within the ovary. It is variable and thus makes estimation of its size very difficult. By determining progesterone concentrations in blood or milk it has been possible to make some assessment of luteal function. Arthur et al. [38] found that in 50% of cows that ovulated, yet failed to conceive, the plasma progesterone values six or more days after ovulation were lower than in the group that conceived. Extended low progesterone concentrations during the early luteal phase have been reported in 2% of cows [1] and 18% of cows [19] although some of the individuals which had this pattern conceived. In a study in 91 cow's post-partum the plasma progesterone values during the first dioestrus after calving were 34% lower in 10% of the cows than during the second cycle. In the same study the progesterone

levels were similar in both pregnant and non-pregnant cows up to 11 days of the cycle [11].

Repeat breeder: The term repeat breeder or repeat breeder syndrome was created to describe cows that failed to conceive after 3 or 4 inseminations in Cows those are cyclically normal with no clinical abnormalities. Repeat breeder females return to service repeatedly after being bred with a fertile male. The factors which are responsible for these abnormalities are multiple, but the major ones are anatomical, hormonal, managemental and infectious and vary from herd to herd and animal to animals [39]. Repeat breeder cow's exhibit normal signs of estrus every 18 to 24 days but require more than 3 services to become pregnant [40].

In practice, some will have been inseminated at the wrong time, others may have pathological changes in the bursa or oviduct that are difficult to palpate or undiagnosed uterine infections.

Signs of estrus every 18 to 24 days but require more than 3 services to become pregnant [40]. Some of these cases may be associated with early embryonic deaths, failure of fertilization, poor semen quality and most of the embryonic losses in cows occur much earlier in pregnancy than previously believed. Diagnosis of repeat breeder relies on the animal records, rectal palpation, ultrasonography, and vaginal examination [41].

Ovulation is initiated by the increase of the luteinizing hormone (LH), which results in the rupture of the follicle and release of an egg. After ovulation there is a short period during which the egg can be fertilized. Since the period between the first signs of estrus and ovulation occurs at 72 h or later, the cows that ovulate later should be inseminated daily until rectal detection of ovulation is confirmed. Delayed ovulation should not be confused with repeat breeder syndrome (repeat breeders). These cows, if not inseminated daily until ovulation, can also return to service repeatedly after artificial insemination while showing normal signs of estrus every 18 to 24 days.

Treatment of Different Signs of Endocrine Disturbances

Cystic ovarian diseases like follicular cyst is treated with hCG at a dose 3000 to 4500 IU, GnRH at a dose of 100-250 µg for luteinization, at a dose of 0.5 µg for ovulation. GnRH applications more than 80% of the cows come in to estrus within 18 to 24 days. For luteal cyst use Progesterone at a dose of 100 mg in oil intra-muscularly on three consecutive occasions at 48 h interval. PGF_{2α} and its analogue at a dose of 25 mg [30].

Anoestrus is treated with PMSG at a dose of 3000 to 4500 IU to stimulate the ovarian activities and induce follicular growth and ovulation, GnRH at a dose of 0.5 mg to stimulate LH release. But in suckled cows second injection after 10 days is important after transient raise in progesterone to initiate normal cycle [42]

Sub-estrus/silent heat is treated with PGF_{2α}. If there is matured CL, one dose of PGF_{2α} can stimulate LH secretion, If there is no matured CL, double administration of PGF_{2α} the first dose for maturation of CL and the second for progesterone release [43]. GnRH is the best treatment for ovulatory defects and also it improves pregnancy rate, because it can raise FSH and LH rapidly [3].

Uterine lavage with a PGF_{2α} application and without an antibiotic application may be a preferable treatment method for repeat breeder cows. A gonadotropin-releasing hormone (GnRH) application significantly increases the conception rate in repeat breeders. Therefore, GnRH must be considered in the hormone treatment for repeat breeders [42].

Conclusion and Recommendations

Animal production contributes much to the development of the national economy and to the better living standards of the rural and urban area as well. Reproductive performance is the one that can influence the profitability of the dairy farms in terms of increasing or decreasing milk yield, reproductive culling rate and market price of dairy cows. It can be affected by a network of genetic (hereditary), environmental and managerial factors (malnutrition, lack of intensive follow ups and stress) and their complex interactions.

Functional causes of infertility are secondary to the basic nutritional, hereditary, stress and work factors. As we know the functional causes of infertility usually affect individual animals within a herd but in the aggregate they constitute an important cause of infertility; but in a wide range effect, when this problem affects a large number of a particular group in a herd they frequently reflect some other problem, especially nutritional problems.

Fertility is a multi-factorial character and its deterioration has been caused by those factors listed above. In order to increase the production and productivity, adequate data are required with respect to the functional and also other causes of infertility in cows.

Since the past few years, In order to treat those reproductive aberrations, hormonal treatments and managemental advancements were some of the corrections given by the veterinarians and farm owners to improve the reproductive performance of their animals.

Based on the above conclusive statements, the following recommendations are forwarded:

- Adequate diagnostic facilities for reproductive problems are needed.
- There should be a means for frequent and detailed examination of reproductive organs.
- Awareness among farmers regarding management of reproductive disorders due to nutrition leading to imbalance or inadequate hormonal levels should be created.

References

1. Plaizier JC, Lissemore KD, Kelton D, King GJ (1998) Evaluation of overall reproductive performance of dairy herds. *J Dairy Sci* 81: 1848-1854.
2. Walsh SW, Williams EJ, Evans AC (2011) A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Anim Reprod Sci* 123: 127-138.
3. Arthur GH, Noakes DE, Pearson H (1992) Arthur's veterinary reproduction and obstetrics. (6th edn), Great Britain, pp: 352-366.
4. Diskin MG, Morris DG (2008) Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reprod Domest Anim* 43: 2260-267.
5. Diskin MG, Murphy JJ, Sreenan JM (2006) Embryo survival in dairy cows managed under pastoral conditions. *Anim Reprod Sci* 96: 297-311.
6. Berg DK, van Leeuwen J, Beaumont S, Berg M, Pfeffer PL (2010) Embryo loss in cattle between day 7 and 16 of pregnancy. *Theriogenology* 73: 250-260.
7. Hafez ESE (1993) Reproduction in farm animals. (6th ed), Philadelphia, pp: 59-104.
8. Millar RP, Lu ZL, Pawson AJ, Flanagan CA, Morgan K et al. (2004) Gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocr Rev* 25: 235-75.
9. Charlton H1 (2008) Hypothalamic control of anterior pituitary function: A history. *J Neuroendocrinol* 20: 641-646.
10. Metwally KK (2001) Postpartum anoestrus in buffalo and cows: Causes and treatment. Proceedings of the sixth scientific congress Egyptian society for cattle diseases, Egypt, Assuit University, pp: 259-267.
11. Singh C (2003) Response of anoestrus rural buffaloes (*Bubalus bubalis*) to intravaginal progesterone implant and PG F2a injection in summer. *J Vet Sci* 4: 137-141.
12. Edwell SM, Slawomir Z, Tomasz J (2004) Comparative study on the efficacy of hormonal and non-hormonal treatment methods in ovarian function affected dairy cows. *Vet Inst Pulawy* 48: 265-267.
13. Garverick HA, Smith MF (1993) Female reproductive physiology and endocrinology of cattle: *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, Saunders Co, Philadelphia, pp: 223-247.
14. Husveth F (2011) Physiological and reproduction aspects of animal production.
15. Pearson H, England GCW (1993) Veterinary reproduction and obstetrics, Bailliere Tindall: Great Britain 270-278.
16. Albright JL, Arave CW (1997) The behavior of cattle. CAB International, Wallingford, pp: 13-15.
17. Wiltbank MC, Gümen A, Sartori R (2002) Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. *Theriogenology* 57: 21-52.
18. Dransfield MBG, Nebel RL, Pearson RE, Warnick LD (1998) Current therapy in theriogenology. 81: 1874.
19. Peters AR, Ball HJH (1995) Reproduction in dairy cattle. (2nd ed), Black well science ltd, London, UK, pp: 23-61,89-105.
20. Cuppus PT (1991) Current veterinary therapy, Philadelphia, WB Saunders, pp: 692-695.
21. Cunningham JG (2002) Text book of Veterinary Physiology. (3rd ed), Saunders Company, pp: 692-695.
22. Espey LL (1994) Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. *Biol Reprod* 50: 233-238.
23. Nielsen TC (1995) Studies on reproduction in cows, Tokyo: Japan Racing Association, pp: 238-239.
24. Foley GL (1996) Pathology of the corpus luteum of cows. *Theriogenology* 45: 1413-1428.
25. Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK, McIntosh EW (2000) Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol Rev* 80: 1-29.
26. Peter AT (2004) An update on cystic ovarian degeneration in cattle. *Reprod Domest Anim* 39: 1-7.
27. Garverick HA1 (1997) Ovarian follicular cysts in dairy cows. *J Dairy Sci* 80: 995-1004.
28. Yoshioka K, Iwamura S, Kamomae H (1996) Ultrasonic observations on the turnover of ovarian follicular cysts and associated changes of plasma LH, FSH, progesterone and oestradiol in cows. *Res Vet Sci* 61: 240-244.
29. Gumen A, Sartori R, Costa FMJ, Wiltbank MC (2002) A GnRH/LH surge without subsequent progesterone exposure can induce development of follicular cysts. *J Dairy Sci* 85: 43-50.
30. Youngquist RS, Threlfall WR (2007) Ovarian follicular cysts: Current therapy in large animal theriogenology, Saunders Elsevier, pp: 379-383.
31. Vanholder T1, Opsomer G, de Kroon A (2006) Aetiology and pathogenesis of cystic ovarian follicles in dairy cattle: A review. *Reprod Nutr Dev* 46: 105-119.
32. Bartolome JA, Thatcher WW, Melendez P, Risco CA, Archbald LF (2005) Strategies for the diagnosis and treatment of ovarian cysts in dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc* 227: 1409-1414.
33. Kaneko H, Todoroki J, Noguchi J, Kikuchi K, Mizoshita K, et al. (2002) Perturbation of estradiol-feedback control of luteinizing hormone secretion by immune neutralization induces development of follicular cysts in cattle. *Biol Reprod* 67: 1840-1845.
34. Kahn CM (2010) Cystic ovary disease: The Merck Veterinary Manual. (10th ed), Whitehouse Station 243-1247.
35. Schlafer DH (2007) Pathology of the ovary (No developmental Lesions). *Pathology of Domestic Animals* 3: 444-450.
36. Ball PJH, Peters AR (2004) Reproductive problems: Reproduction in cattle. Oxford, Blackwell Publications, UK, pp: 172-175.

37. Peter AT, Levine H, Drost M, Bergfelt DR (2009) Compilation of classical and contemporary terminology used to describe morphological aspects of ovarian dynamics in cattle. *Theriogenology* 71: 1343-1357.
38. Arthur GH, Noakes DE, Pearson H (2003) Veterinary reproduction and obstetrics, Bailliere Tindac, Great Britain, pp: 383-386.
39. Singh J, Dadarwal D, Honparkhe M, Kumar A (2008) Incidence of various etiological factors responsible for repeat breeding syndrome in cattle and buffalos. *IJVM* 6:1.
40. Parkinson TJ (1996) Infertility: Veterinary reproduction and obstetrics. Saunders Company, USA 463-464.
41. Stevenson SJ, Call EP, Scobey RK (1990) Double insemination and gonadotropin-releasing hormone treatment of repeat breeding dairy cattle. *J Dairy Sci* 73: 1766-1772.
42. Vadakkadath Meethal S, Atwood CS (2005) The role of hypothalamic-pituitary-gonadal hormones in the normal structure and functioning of the brain. *Cell Mol Life Sci* 62: 257-261.
43. Hafez ESE (1993) Reproduction in Farm Animals, Philadelphia, pp: 59-104.

The Growth Hormone Level of Bali Cattle's Post Treatment with Ethinil Estradiol and Progesteron Hormones in Combination with Mineral

Aletha Yuliana Mandala^{1*}, Ni Ketut Suwiti², I Wayan Suardana²

¹Student of Veterinary Postgraduate Udayana University

²Biotechnology Laboratory of Veterinary Center Denpasar, Bali
Denpasar-Bali

*Corresponding Author: mandalaaletha@gmail.com

Abstract. This study aims to find out the growth hormone level of bali cattle's post giving of ethinyl estradiol and progesterone hormones combined with mineral. The total sample of 64 bali cattle is divided into 4: Group I (Control) is not given hormone ethinyl estradiol, progesterone and mineral. Group II is given the hormone ethinyl estradiol and progesterone, without mineral. Group III was not given ethinyl estradiol and progesterone hormones, with mineral administration. Group IV is given hormone ethinyl estradiol, progesterone and mineral. At the end of the study, measurements were performed to determine the growth hormone level using ELISA method. The data of the research were analyzed by the analysis of variance. The result showed that male cattle growth hormone (268.281 ± 73.13 pg/ml) was higher than females (236.250 ± 13.79 pg/ml). The growth hormone level of young cattle was higher (264.94 ± 74.42 pg/ml) than adult (239.59 ± 14.05 pg/ml). Level of growth hormone of bali cattle with highest minerals (266.97 ± 74.15 pg/ml) compared without minerals (237.56 ± 11.05 pg/ml). The growth hormone level of bali cattle with higher levels of ethinyl estradiol and progesterone hormone (263.31 ± 74.81 pg/ml) compared with no ethinyl estradiol and progesterone hormone (241.22 ± 18.8 pg/ml). The results are age and sex effect on growth hormone level with hormone ethinyl estradiol and progesterone combined with mineral. Giving ethinyl estradiol and progesterone hormones combined with significant mineral ($P < 0.05$) may increase the growth hormone level of young male bali cattle.

Keywords: Growth hormone, bali cattle, ethinyl estradiol and progesterone hormone, minerals, ELISA.

I. INTRODUCTION

Bali cattle is one of the local cattle in Indonesia besides the cattle of Aceh, coastal, and Madura. Bali cattle have a high fertility rate (80% -82%), good adaptability to marginal environments. They also are easily farmed almost in every region in Indonesia and even abroad for instance Malaysia, Philippines and Australia [1].

Its activity in growth depends on several factors that involve food supplies, genetic potential, and environment. Fodder

also greatly affects the growth hormone level. Indirectly, growth hormone works through the hormone insulin-like growth factor 1 (IGF-1) which is produced by various tissues in response to growth hormone [2]. One important factor in regulating IGF-1 is fodder. Minerals and proteins will increase the IGF-1 levels in cattle's body and otherwise mineral and protein deficiencies can lower IGF-1 levels, resulting in a decrease in growth hormone secretion that ends in a decrease in growth hormone level [3]. The use of hormones also

affects the growth hormone level. There are several hormones play an important role in growth phase, such as somatotropin, thyroxine, androgen, a combination of estrogen and progesterone, and glucocorticoid [4][5]. Ethynodiol diacetate and progesterone can stimulate the growth hormone secretion of the pituitary gland and cause increased levels of insulin in the blood so as to facilitate the metabolism of carbohydrates and amino acids, the need for energy is fulfilled, and amino acids for muscle formation proteins due to increased concentrations of somatotropin and IGF-1 so that blood growth hormone levels increase [6][7][8].

Giving ethynodiol diacetate and progesterone combined with minerals can influence the growth hormone level that can be measured by using ELISA method [9]. This study aims to determine the growth hormone level of bali cattle both males and females in young and post adulthood post-adduction of ethynodiol diacetate and progesterone hormones combined with mineral administration.

II. RESEARCH METHOD

Research Materials

This study used a Bovine Growth Hormone ELISA kit consisting of microplate 96 well, standard, A (Biotin conjugated antibody specific) and B (Avidin conjugated Horse Radical Peroxidase), substrate (Tetramethyl benzidine), wash buffer, paper plate, standard diluent, diluent assays A and B, stop solution, PBS, and distilled water.

The target population in this study was 64 bali cattle that were kept intensive at Mupu Amerta farm in Bangli Regency, Bali Province. The 64 samples were divided into 16 young cattle, 16 adult cattle, 16 young cattle and 16 adult female cattle, grouped into 4: Group I (Control Group) which not

given ethynodiol diacetate, progesterone and mineral hormones. Group II was given ethynodiol diacetate and progesterone hormones, without mineral supplements. Group III was not given ethynodiol diacetate and progesterone hormones, with mineral supplements. Group IV was given ethynodiol diacetate, progesterone and mineral hormones.

Serum samples were obtained from blood collection using a venoject needle, through a jugular vein that take around 10 ml of blood. Serum is placed at room temperature for 10-20 minutes, then it centrifuge at a speed of 2000-3000 rpm for 20 minutes to avoid sedimentation.

Measurement of Growth Hormone Level

The ELISA test procedure used in this study refers to Glory Science [10] methods. This test is performed based on the standard operating procedure Bovine Growth Hormone (GH) ELISA Kit.

The research procedure begins with standard dilution done by mixing the standard with the standard dilution. Firstly, prepared 5 ependorf tubes, then taken 50 μ l standard dilution to fill in each ependorf tube, then taken as 100 μ l standard (5400pg / ml) and inserted into the first tube. A total of 100 μ l of the solution (standard mixture of dilution and standard) is taken from the first tube and put into the second tube. A total of 50 μ l of solution from the second tube is taken and inserted into the third tube. In this third stage this process repeated until the fifth tube so that the standard concentration is worth 300pg / ml.

The first test procedure was prepared well for blanks and samples, but in the well blank no samples were added and Horseradish Peroxidase (HRP) - Conjugate. Subsequently, 40 μ l dilution samples were added to each well and 10 μ l samples were added to the test plate. After that the incubation process is begin using adhesive

strip for 30 minutes at 37°C. At the time, dilution wash solution used 1: 20 ratio and wash solution diluted 30 times by distilled water. The result OD wash solution are used during the washing process. At the time of washing, the adhesive strip is opened, the solution in the well is removed, then add washing buffer at every well for 30 seconds, after which it is dried. This washing process is done for 5 times. Added HRP-Conjugate reagent 50µl in each well except well blank. Then incubated after lid with adhesive strip for 30 minutes at 37°C. After 30 minutes, it has been washed for 30 seconds for 5 repetitions. After the washing process continued with staining by adding Chromogen Solution A and Chromogen Solution B 50 µl at each well for 15 min at 37 ° C. After 15 minutes, stop reaction is done by adding stop solution 50µl in every well, in this reaction process will change the color from blue to yellow and we have to wait for 15 minutes. After 15 minutes an absorbance reading was performed using a 450nm ELISA reader with a blank well of zero value.

The growth hormone level of the sample was determined using the $Y = e^{a+bx}$ [11]

equation, where Y was the growth hormone level in the cattle serum, a is the ratio between growth hormone level concentration and O.D, x is O.D, and b is the coefficient.

Data analysis

Research data has been analyzing with analysis of variance, and if the result is real difference then in will continue with the LSD test (Least significant differences). The analytical procedures will follow the instructions of Sampurna and Nindhia [12], using the SPSS (Statistical product and service solutions) program.

III. RESULTS AND ANALYSIS

The results of the test against the serum samples from the four treatments are optical density (O.D) values. The growth hormone level was determined by the equation $Y=e^{5.261 + 1.199x}$ with X as the value of O.D. The mean analysis of growth hormone level of male and female cattle after giving ethinyl estradiol and progesterone hormone combined with mineral is presented in Table 1.

TABLE 1. AVERAGE LEVELS OF GROWTH HORMONE BALI CATTLE

Variables	Average Levels of Growth Hormone (pg/ml)	Notation
Female	236.25±13.79	a
Male	268.28±73.13	b
Adult	239.59±14.05	a
Young	264.94±74.42	b
No Minerals	237.56±11.05	a
Minerals	266.97±74.15	b
No Hormone	241.22±14.80	a
Hormone	263.31±74.80	b

Information: The mean growth hormone level is the mean ± SEM value. The values with the letters (a) show no significant difference ($P > 0.05$), while the values with the letters (b) show significantly different ($P < 0.05$).

The administration of ethinyl estradiol and progesterone hormones combined with

minerals in cattle significantly ($P < 0.05$) was higher than in female cattle.

The administration of ethinyl estradiol and progesterone hormones combined with minerals in young cattle was significantly higher ($P < 0.05$) than in adult cattle.

Provision of minerals in bali cattle significantly ($P < 0.05$) higher than without mineral administration.

The provision of ethinyl estradiol and progesterone hormones in bali cattle was

significantly ($P < 0.05$) higher than without the administration of ethinyl estradiol and progesterone hormones.

The mean analysis of growth hormone levels of male and female calves, young and adult age, ethinyl estradiol and progesterone and mineral hormones is presented in Table 2.

TABLE 2. AVERAGE LEVELS OF GROWTH HORMONE BALI CATTLE MALE AND FEMALE, YOUNG AND MATURE, ETHINYL ESTRADIOL AND PROGESTERONE, AND MINERALS

Sex	Age	Minerals	Ethinyl Estradiol and Progesterone	Average Levels of Growth Hormone (pg/ml)	Notation
Male	Young	M0	H0	252.75±11.33	a
			H1	243.25±2.63	a
	Adult	M1	H0	262.75±5.66	a
			H1	417.75±139.33	b
Female	Young	M0	H0	242.50±13.63	a
			H1	231.50±4.50	a
		M1	H0	243.75±14.22	a
			H1	252.00±21.19	a
	Adult	M0	H0	232.50±10.34	a
			H1	235.25±2.75	a
		M1	H0	228.75±4.34	a
			H1	246.50±27.97	a

Information: The mean growth hormone rate is the mean \pm SEM. The values with the same letters show no significant difference ($P > 0.05$), whereas values with different letters show significantly different ($P < 0.05$). M0 = No Minerals. M1 = Mineral. H0 = No Hormones. H1 = Hormones.

The provision of ethinyl estradiol and progesterone and minerals in young male bali cattle was significantly higher ($P < 0.05$) than adult bali cattle, young female cattle

and adult females. The average rate of bovine growth hormone in four treatments is presented in Figure 1.

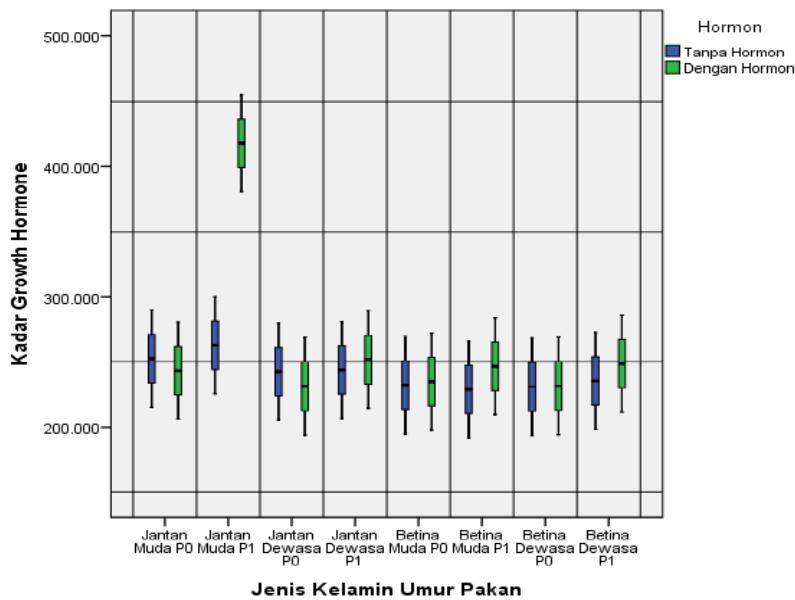


Figure 1. Mean of Bali Cattle Growth Hormone Level in Four Treatments

Figure 1. shows that boxplots did not intersect were significantly different ($P < 0.05$) in which young cattle post-hormone ethinyl estradiol and progesterone combined with minerals produced the highest growth hormone level (417.75 ± 139.33 pg / ml). Whereas the intersecting boxplot was not significantly different ($P > 0.05$) in which adult cattle, young and adult cattle without and post-hormonal administration of ethinyl estradiol and progesterone combined with minerals produced an insignificant growth hormone level. The growth hormone level of the four treatments varied (Table 2.), the mean \pm highest cattle SEM (417.75 ± 139.33 pg / ml) in young cattle administered ethinyl estradiol and progesterone hormones combined with administration minerals, while the lowest ($231,000 \pm 14.90$ pg / ml) in adult female cattle without the administration of ethinyl estradiol, progesterone and mineral hormones. This situation is due to the growth of livestock that is directly affected by their natural habitat (external) and genetic (internal). External factors that affect growth are the places of maintenance associated with feed

conditions, while the internal factors that affect growth are growth hormones [13].

Table 1 shows that the administration of ethinyl estradiol and progesterone hormones combined with minerals in males cattle significantly ($P < 0.05$) was higher (268.28 ± 73.13 pg / ml) than in female cattle (236.25 ± 13.79). Similar results have also been performed by [14], namely the average growth hormone level in male angus cattle (20.8 ± 2.2 ng / ml), females (14.9 ± 1.8 ng / ml), cattle hereford male (15.7 ± 3.4 ng / ml), female (11.8 ± 2.7 ng / ml), male shorthorn cattle (15.9 ± 5.8 ng / ml), females (12.1 ± 3.8 ng / ml), male crossbred cattle (17.4 ± 2.3 ng / ml), females (12.7 ± 2.7 ng / ml). This is due to gender affecting in growth hormone secretion [15]. The same idea is also expressed by [16] that growth hormone is influenced by sex thus causing differences in weight gain in cattle.

The high growth hormone level of cattle is due to androgen hormones. Male animals grow faster than females at the same age as having testosterone one of the androgen steroids, which is the growth hormone produced by interstitial cells and adrenal

glands. Androgen hormones in male animals can stimulate growth, and also rapid growth at puberty is partly due to the anabolic effects of proteins from androgens so that male animals can be larger than females [17]. One of the androgen steroids that affects growth hormone is testosterone that has the ability of protein anabolism to stimulate growth hormone production from hypophysis [18].

Growth hormone in female cattle is also involved in the process of sexual differentiation and puberty and has a role in the steroidogenesis of gonads, gametogenesis, and ovulation [19]. Female sex hormones, such as estrogen produced by ovaries generally have little or no effect on protein and skeletal synthesis, but are effective in increasing body fat formation. Therefore, females stop growing faster than males [20].

This process is directly affects growth hormone activity in the pituitary gland [21]. Growth hormone also works on gonads, placentas, and mammary glands of female animals [22]. This is causing the growth of males faster than females especially after secondary sex traits arise where male animal growth is higher than female animals of the same age [23].

The administration of ethinyl estradiol and progesterone hormones combined with minerals in young cattle ($P < 0.05$) was higher ($264.94 \pm 74.42 \text{ pg/ml}$) than in adult cattle ($239.59 \pm 14.05 \text{ pg/ml}$) (Table 1). The growth hormone level of bali cattle began to increase significantly from a young age (6-18 months), but in adulthood (18 months) there was no increase in growth hormone. This is because at a young age (6-18 months) the cattle needs nutrient intake for the growing period, the protein used to build the body's tissue that is forming muscles, nails, blood cells and bones so that growth hormone plays an important role in body composition, muscle metabolism,

bone, in the function of organs to maintain homeostasis, so there is also a change in weight gain. At the time of growing the growth hormone levels are in optimal condition so as to achieve excellent biological performance and various organs of the body can work well [24].

That giving minerals for bali cattle was significantly higher ($P < 0.05$) higher ($266.97 \pm 74.15 \text{ pg/ml}$) compared with no mineral ($237.56 \pm 11.05 \text{ pg/ml}$) (Table 1). Geographically Mupu Amerta farm is located in Bangli Regency, Bali Province, which is a highland area. Agroecosystem conditions (rainfall, land characteristics, temperature and humidity) from the height of the maintenance site indirectly affect the availability of forage fodder in terms of both quality and quantity [25].

Feed is very influential on growth hormone levels. This growth hormone is produced by somatotrop (part of the acidophilic cells) present in the pituitary gland. Indirectly, growth hormone works through IGF-1 produced by various tissues in response to growth hormone [26]. This hormone works through the intermediation of a peptide called somatomedin. Somatomedin is the main production in the liver is also affected by age and feed. Somatomedin is what will bind to receptors in the body's cells to stimulate growth through protein catabolism, carbohydrate metabolism, fat metabolism and mineral metabolism. High levels of calcium, magnesium and phosphate will stimulate long growth of hard bone and cartilage growth especially at young age. Minerals and proteins will increase IGF-1 levels in the body and in turn, deficiency of minerals and proteins can lower IGF-1 levels, resulting in a decrease in growth hormone secretion that ends in the decline in growth hormone level [27].

Fodder is very influential on the growth hormone level (growth hormone). Indirectly,

growth hormone works through IGF-1 produced by various tissues in response to growth hormone [28]. One important factor in regulating IGF-1 is feed. Minerals and proteins will increase IGF-1 levels in the body and in turn, deficiency of minerals and proteins can lower IGF-1 levels, resulting in a decrease in growth hormone secretion that ends in the decline in growth hormone level. Besides IGF-1, another factor that affects the secretion of growth hormone is ghrelin. Ghrelin is one of the growth hormone Releasing Hormone (GHRH) released from the stomach. In secreting growth hormone, ghrelin is first regulated by fodder so that ghrelin is able to induce the release of growth hormone in the pituitary gland. The state of fodder deficiency will affect the release of growth hormone [29].

The provision of ethinyl estradiol and progesterone hormones in bali cattle was significantly higher ($P < 0.05$) higher ($263.31 \pm 74.80 \text{ pg / ml}$) than without ethinyl estradiol and progesterone hormones ($241.22 \pm 14.80 \text{ pg / ml}$) (Table 1). Hormones that play an important role in growth, namely somatotropin, thyroxine, androgens, a combination of estrogen and progesterone, and glucocorticoid [30][31]. In the case of growth hormone more than one organ becomes the target because growth hormone affects the tissues in the body. The ethinyl estradiol and progesterone hormones can enhance the growth hormone profile by stimulating the body's cells to accelerate growth so that the growth of the male vein is likely to be greater than the females. This condition that causes overall body size is affected by gender [32].

The growth hormone produced by the pituitary gland first flows through the blood vessels to the liver. In the liver, growth hormone is converted to IGF-1 (Insulin like Growth Factor-1). Then through the blood circulation IGF-1 is flow throughout the organs in the body. IGF-1 is responsible for

maintain all the organs in the body [33]. Other factors that are known also affect the secretion of growth hormone are gender, age, fodder, and other hormones.

IV. CONCLUSION

Based on the results of research that has been done, can be concluded as follows:

1. Age and sex affect the growth hormone levels of bali cattle in line with the provision of hormones ethinyl estradiol and progesterone combined with the provision of minerals.
2. Giving hormone ethinyl estradiol and progesterone combined with the provision of minerals significantly ($P < 0.05$) can increase the growth hormone profile of young bali cattle.

SUGGESTION

Giving hormone ethinyl estradiol and progesterone in bali cattle should be combined with minerals so as to increase the levels of growth hormone (growth hormone), and further research is needed to determine the residual content in blood and meat.

ACKNOWLEDGMENT

The authors would like to thank the Rector of CQ Bali Cattle Study Center of Udayana University for the support of the cost for this research, as well as to those who have assisted in the research process at the Biotechnology Laboratory of Veterinary Center Denpasar.

REFERENCES

- [1] Oka IGL. 2010. *Conservation and Genetic Improvement of Bali Cattle. Proc. Conservation and Improvement of World Indigenous Cattle.* 110-117.

- [2] Gardner, D.G., Shoback, D. 2007. *Greenspan's Basic and Clinical Endocrinology*. Eighth Edition. San Fransisco: The Mc Graw-Hill Company.
- [3] Thissen, J.P., Ketelslegers, J.M., Underwood, L.E. 1994. *Nutritional Regulation of the Insulin-Like Growth Factors*. *Endocr. Rev*, 15: 80–101.
- [4] Robson, H., Siebler, T., Shalet, S.M., Williams, G.R. 2002. Interactions Between GH, IGF-I, Glucocorticoids, and Thyroid Hormones During Skeletal Growth. *Pediatric Research*, 52:137-147.
- [5] Leung KC, Johannsson G, Leong GM, Ho KK. 2004. *Estrogen regulation of growth hormone action*. *Endocr. Rev*. 25, 693–72110.1210/er.2003-0035.
- [6] Lawrie, R. A. 2003. *IlmuDaging(Meat Science)*. (Parakkasi, A., Pentj). Edisi ke-5. Jakarta: UI Press.
- [7] Zhong, S., Wei-Ping, Y., Feng, E., Shu-Hong, L., Jie-Yu, L., Leong, J., Ma, C., Lin, Y.C. 2011. Serum Derivate from Zeranol-Implanted ACI Rats Promotes The Growth of Human Breast Cancer In Vitro. *Anticancer Research*, 31(3): 481-486.
- [8] Khadijah, S. 2012. Analisis Residu Zeranol Dalam Daging Sapi Yang Diimpor Dari Australia dan Selandia Baru Melalui Pelabuhan Tanjung Priok (*tesis*). Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- [9] Milfa S, Suwiti NK, Tenaya IWM. 2015. Profil Hormon Pertumbuhan Sapi Bali Betina Pada Tiga Tipe Lahan Pemeliharaan Di Provinsi Bali. *Buletin Veteriner Udayana*, Volume 7 No. 1: 1-8 p-ISSN: 2085-2495.
- [10] Glory Science. 2017. *Bovine Growth Hormone (GH) ELISA Kit*. Catalog #: D8569.
- [11] Sampurna IP. 2012. Analisis Regresi Non-Linier Terapan Dengan SPSS. Pelawa Sari. Denpasar.
- [12] Sampurna IP, Nindhia TS. 2008. *Analisis Data dengan SPSS dalam Rancangan Percobaan*. Udayana University Press. Denpasar.
- [13] Herd, D.B., Sprott, L.R. 1986. *Body Condition, Nutrition, and Reproduction of Beef Cows*. Texas Agric. Ext. Ser. Bull, No. B-1526.
- [14] Irvin, R., Trenkle, A. 1971. Influences of Age, Breed and Sex on Plasma Hormones in Cattle. *J ANIM SCI*, 32:292-295.
- [15] Shimon, I., Taylor, J.E., Dong, J.Z. 1997. *Somatostatin Receptor Subtype Specificity in Human Fetal Pituitary Cultures*. Differential Role of SSTR2 and SSTR5 for 55. Growth Hormone, Thyroid-Stimulating Hormone, and Prolactin Regulation. *J. Clin. Invest*, 99: 789-798.
- [16] Turner, C.D., Bagnara, J.T. 1976. *W.B. A Course Manual in Nutrion and Growth*Australian Vice-Chancellors-Committee, Melbourne. General Endocrinology. Sixth Editon. p. 28: 561 – 597.
- [17] Kay M. and R.Hausseman. 1997. *The Influence of Sex on Meat Production InMeat*. Edited by Cook DJ, Lawrie RA. London. Butterworth.
- [18] Vestergaard, M., Purup, S., Henckel, P., Tonner, E., Flint, D.J., Jensen, L.R., Sejrsen,K. 1995. *Effects of GH and Ovariectomy on Performance, Serum Hormones, IGH Binding Proteins, and Muscle Fibre Properties of Prepubertal FriesianHeifers*. *J. Anim. Sci*. 73: 3574-3584.
- [19] Hull, K.L., Harvey, S. 2001. *Growth Hormone: Roles in Female Reproduction*. Department of Physiology, University of Alberta. Edmonton, Canada.

- [20] Nasrul, L. 2012. Pertumbuhan dan Perkembangan Otot dan Jaringan Karkas. Prinsip dan Konsep dari Pertumbuhan dan Perkembangan.
- [21] Sharara, F.I., Giudice, L.C. 1997. *Role of Growth Hormone in Ovarian Physiology and Onset of Puberty*. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, 4:2–7.
- [22] Lawrence, T.L.J., Fowler, V.R. 2002. *Growth of Farm Animals*. Walling Ford: CABI International. New York. USA.
- [23] Irvin, R., Trenkle, A. 1971. Influences of Age, Breed and Sex on Plasma Hormones in Cattle. *J ANIM SCI*, 32:292-295.
- [24] Misitahari M. I. 2011. Pemberian Growth Hormone Menurunkan Kadar Tumor Necrosis Factor-A (Tnf-A) pada Tikus Jantan yang Dislipidemia. Disertasi tidak diterbitkan. Denpasar: Universitas Udayana Denpasar.
- [25] Gregory, K.E. 1961. Improvement of Beef Cattle Through Breeding Methode. *Regional Publication 120*. USDA.
- [26] Gardner, D.G., Shoback, D. 2007. *Greenspan's Basic and Clinical Endocrinology*. Eighth Edition. San Fransisco: The Mc Graw-Hill Company.
- [27] Thissen, J.P., Ketelslegers, J.M., Underwood, L.E. 1994. *Nutritional Regulation of the Insulin-Like Growth Factors*. *Endocr. Rev*, 15: 80–101.
- [28] Pangkahila W. 2007. *Anti-Aging Medicine*: Memperlambat Penuaan Meningkatkan Kualitas Hidup. Cetakan ke-1. Jakarta: Penerbit Buku Kompas.
- [29] Kojima, M., Hosoda, H., Matsuo, H., Kangawa, K. 2001. *Ghrelin: Discovery of the Natural Endogenous Ligand for the Growth Hormone Secretagogue Receptor*. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 12:118–122.
- [30] Robson, H., Siebler, T., Shalet, S.M., Williams, G.R. 2002. Interactions Between GH, IGF-I, Glucocorticoids, and Thyroid Hormones During Skeletal Growth. *Pediatric Research*, 52:137-147.
- [31] Leung KC, Johannsson G, Leong GM, Ho KK. 2004. *Estrogen regulation of growth hormone action*. *Endocr. Rev*. 25, 693–72110.1210/er.2003-0035.
- [32] Kay M. and R.Hausseman. 1997. *The Influence of Sex on Meat Production In Meat*. Edited by Cook DJ, Lawrie RA. London. Butterworth.
- [33] Thissen, J.P., Ketelslegers, J.M., Underwood, L.E. 1994. *Nutritional Regulation of the Insulin-Like Growth Factors*. *Endocr. Rev*, 15: 80–101.

Kosakonia sp. PROTEOLYTIC BACTERIA ISOLATED FROM RUMEN AND RETICULUM OF ACEH CATTLE

Safika^{1*}, Wenny Novita Sari², Gressha Vionalle Ademi³, Ulfy Widi Arsih³, and Darmawi⁴

¹Department of Veterinary Infectious Diseases and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, IPB University, Bogor, Indonesia

²Doctoral Study Program of Mathematics and Applied Sciences, Syiah Kuala University, Darussalam, Banda Aceh, Indonesia

³Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Syiah Kuala, Darussalam, Banda Aceh, Indonesia

⁴Laboratory of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh, Indonesia

*Corresponding author: fikaghan@yahoo.com

ABSTRACT

The aim of this study was to identify proteolytic bacteria from the ruminal and reticulum fluids of aceh cattle based on the 16S rRNA gene. Samples used were ruminal and reticulum fluids of aceh cattle slaughtered in abattoir of Aceh Besar. Samples were diluted and cultured into Skim Milk Agar medium at 39°C for 48 hours. The morphology of bacterial colonies growth in the medium was observed. Colonies resulted in the largest clear zone were isolated and used for Deoxyribonucleic Acid (DNA) isolation, 16S rRNA gene amplification and sequencing. The results showed that morphology of dominant colonies was yellowish white color, round shape, position on the agar surface. The results of phylogenetic analysis of RS1 and ReS2 isolates isolated from rumen and reticulum fluids of aceh cattle respectively had a close familial relationship and belonged to the bacterial group of Kosakonia. Sequence homology showed isolate RS1 and ReS2 are probably either new Enterobacteriaceae species or unconfirmed species. Halo zone produced by ruminal bacteria had a wider diameter (25 mm vs 20 mm) than that caused by reticulum bacteria). Based on the results, RS1 (bacterium in the rumen) and ReS2 (bacterium in the reticulum) belong to similar type, namely *Kosakonia* sp. with a proteolytic activity. Presumably, these bacteria originate from the rumen that enters the reticulum with degraded feed.

Key words: Aceh cattle, kosakonia, reticulum, rumen

ABSTRAK

Tujuan dari penelitian ini adalah mengidentifikasi bakteri proteolitik dari rumen dan cairan retikulum sapi aceh berdasarkan gen 16S rRNA. Sampel dikumpulkan dari rumen dan cairan retikulum sapi aceh di Rumah Potong Hewan Aceh Besar. Sampel diencerkan dan dibiakkan ke dalam media Agar Susu Skim pada suhu 39°C selama 48 jam. Morfologi koloni diamati, koloni bakteri dengan zona bening terbesar diambil untuk isolasi Deoxyribonucleic Acid (DNA), amplifikasi dan sekruensi gen 16S rRNA. Hasil penelitian menunjukkan bahwa morfologi dominan koloni berwarna putih kekuningan, berbentuk bulat, dengan posisi pada permukaan agar. Hasil analisis filogenetik isolat RS1 dalam cairan rumen dan isolat ReS2 dalam cairan retikulum sapi aceh memiliki hubungan kekerabatan yang dekat dan termasuk dalam kelompok bakteri Kosakonia. Tingkat homologi sekruensi yang diperoleh menunjukkan bahwa isolat RS1 dan ReS2 mungkin merupakan spesies baru Enterobacteriaceae atau spesies yang belum dikonfirmasi. Diameter zona bening yang dihasilkan oleh bakteri rumen memiliki diameter lebih lebar (25 mm vs 20 mm) dibandingkan dengan yang disebabkan oleh bakteri retikulum. Berdasarkan hasil, RS1 (bakteri dalam rumen) dan ReS2 (bakteri dalam retikulum) memiliki jenis yang sama, yaitu *Kosakonia* sp. yang memiliki aktivitas proteolitik. Disimpulkan bahwa bakteri ini berasal dari rumen yang memasuki retikulum dengan pakan terdegradasi.

Kata kunci: sapi aceh, kosakonia, reticulum, rumen

INTRODUCTION

Aceh cattle are one of the local cattle that exist in Indonesia. They have a good resistance to bad environments such as feed crises, water availability crises, high fiber fodder, parasitic diseases, high temperature environments and extensive traditional grazing systems (Abdullah *et al.*, 2007; Safika *et al.*, 2018a), short postpartum periods and able to adapt well to a new environment (Martojo, 2003). Although the production is lower than imported livestock, the local cattle should be preserved and developed. Thus, the Indonesian germ plasma is not lost (Mohamad *et al.*, 2012).

Production and health of the cattle highly depend on digestive process of feed. It is more complex than other livestock digestive processes. Based on the physiology studies of ruminant livestock, rumen and reticulum are often regarded as a single organ called reticulocorum where feed can flow from the rumen to the reticulum and vice versa. In the rumen and reticulum as much as

60-90% of incoming feed is degraded into its simple forms by microbes such as bacteria, protozoa, fungi and Archaea. In addition, microbial metabolism in the rumen is determined both by the total and the rate of degradation of carbohydrates and proteins (Colville and Bassett, 2014).

Proteolytic bacteria are found in digestive system of cattle. They are able to degrade proteins because of their extracellular enzymes. Protease catalyzes the termination of peptide bonds in proteins, into amino acids (Desiandura *et al.*, 2014). The availability and ability of the bacteria in degrading proteins will affect to the amount of amino acids that enter the bloodstream (Genzebu and Tesfay, 2015).

Proteolytic bacteria found in the rumen of cattle have been identified as *Bacteroides amylophilus*, *Clostridium sporogenes*, *Bacillus licheniformis*, *Prevotella ruminicola*, *Ruminobacter amylophilus*, *Clostridium bif fermentans*, *Clostridium aminophilum*, *Clostridium locheadi*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Streptococcus bovis*, *Selenomonas ruminantium*,

Lachonospira multiparius, *Bacillus cereus*, *Bacillus stathermophilus*, *Bacillus mojavensis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Tatumella*, and *Pseudomonas* (Kamra, 2005; Alnahdi, 2012; Das and Qin, 2012; Petri et al., 2013; Vijayaraghavan and Vincent, 2013; Peng et al., 2015; Safika et al., 2018b).

Currently, there are no reports on types of proteolytic bacteria found in the rumen and reticulum of Aceh cattle. Meanwhile, the data is important as basic information in order to increase productivity of Aceh cattle based on digestion process efficiency. Thus, it is important to conduct a research on identification of proteolytic bacteria found in the rumen and reticulum of aceh cattle based on their 16S rRNA gene.

MATERIALS AND METHODS

Sample Collection

Samples used were ruminal content and reticulum fluids collected from 5 Aceh cattle slaughtered at the Abattoirs of Lambaro, Aceh Besar. Ruminal content was collected in triplicate namely from the left, right, and middle parts of the rumen. This aimed to make the sample homogeneous. All samples were brought in ice condition to the Laboratory of Microbiology of Faculty of Veterinary Medicine of Universitas Syiah Kuala for examination.

Isolation of Proteolytic Bacteria

Sample aliquot (1 mL) was spread into a sterile Petri dish, added with 20 mL of Skim Milk Agar medium using pour plate method, and incubated at 39° C for 48 hours. Diameter of halo zones that emerged was measured and gram staining method was performed. Pure colonies with the widest clear zone were cultured into liquid medium and incubated for 48 hours. Bacterial cell pellets was obtained by centrifuging the mixture at 7000x g for 5 minutes and used for Deoxyribonucleic Acid (DNA) extraction.

DNA Extraction

Total DNA was extracted using a Presto TM Mini gDNA Bacteria kit (Geneaid) according to protocol provided by the manufacture. The process was started by the addition of 180 µL of extraction buffer and 20 µL of Proteinase-K to a sterile microtube containing bacterial cell pellet. After an incubation step at 60° C for 10 minutes, the mixture was mixed with 200 µL of GB buffer, incubated at 70° C for 24 h, and added with 200 µL of absolute ethanol. The entire mixture was poured into a spin column (in a collection tube) and centrifuged at 14000-16000x g for 1 minute. The column was added with 400 µL of Buffer W1 and centrifuged at 14000-16000x g for 30 seconds. After discarding the flow through, the column was added with 600 µL buffer W2 and centrifuged at 14000-16000x g for 30 seconds, followed by discarding the flow through. The column was added with 30-50 µL of elution buffer, and incubated at room temperature for 3-5 min, and centrifuged at 14000-16000x g for 1 min.

The pure DNA was stored -20° C until used for Polymerase Chain Reaction (PCR).

Amplification of 16S rRNA Gene

The amplification of bacterial 16S rRNA gene was done by PCR method using BactF and UniB primers. The BacF is complement to conserve region in the bacterial gene whereas UniB is complement to 16S rRNA gene of *E. coli* (Baker et al., 2003). The PCR condition used (25 cycles) was denaturation at 94° C for 1 minute, annealing at 50° C for 1 minute and elongation at 72° C for 2 minutes, followed by a final elongation at 72° C for 8 minutes (Safika et al., 2013). The product was detected using 1% agarose gel electrophoresis and 1x TAE buffer (40 mM Tris HCl, 40 mM acetate, 1.0 mM EDTA), and visualized under gel Doc (Biorad) using Gel red DNA staining.

Phylogenetic Analysis

Sequencing of the 16S rRNA gene was carried out by Macrogen Inc. (Korea) results were compared with referent genes using the Local Basic Alignment Search Tool (BLAST) program at NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> while the homology of 16S rRNA gene sequences was analyzed using data in GeneBank. Phylogenetic tree was constructed using a neighbor-joining model matrix from MEGA 7.0 (Kumar et al., 2016), with the Maximum Composite Likelihood substitution method (Sari et al., 2017) and bootstrap analysis 1000 replicate data sets.

RESULTS AND DISCUSSION

Morphology of Proteolitik bacteria

Isolation of proteolytic bacteria collected from ruminal content and reticulum fluid of Aceh cattle was performed on SMA medium which is a selective medium agar for proteolytic bacteria. It aimed to isolate the desired pure strain bacteria and inhibit the growth of other undesirable bacterial strains. The colonies grown on the SMA medium are showed in Figure 1. Morphological observations showed that the colonies generally have a circular, convex, smooth shape with entire margins, yellowish white color and halo zones.

Morphological differences and halo zone diameter indicated that the bacteria belong to different species. It can also be assumed that the enzymes produced by each bacterium have different properties. Furthermore, RS1 and ReS2 were characterized by Gram staining. It showed that they are bacilli shaped-negative gram bacteria (Figure 2). RS1 and ReS2 are bacilli shaped-negative gram bacteria non-spore forming, motile rod with peritrichous flagella. While negative for indole production, the bacteria were positive for fructose, galactose, gluconate, glucose, glycerol, lactose, malate, maltose, mannose, sorbitol, and sucrose.

Proteolytic bacteria are protease-secreting bacteria, which produce their enzyme on the growing medium. They form halo zones around the colonies because the enzyme produced is able to degrade casein in Skim Milk Agar by breaking the peptide bond CO-NH. Halo

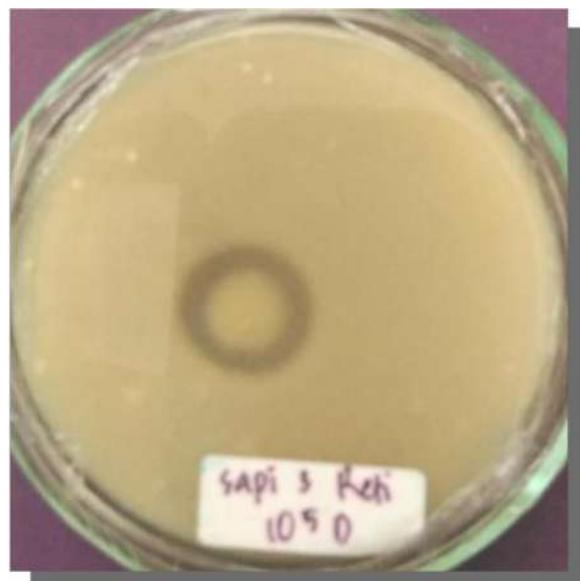
zone that resulted in by the rumen and reticulum bacteria ranged from 10-25 mm and 0.9-20 mm, respectively. In addition, RS1 that was collected from the rumen of aceh cattle had the widest clear zone among the rumen bacteria that was about 25 mm, whereas ReS2 that collected from reticulum had the widest clear zone of 20 mm.

High fiber forage feeding without additional protein sources decreases the presence of proteolytic bacteria or microbes in the rumen of cattle. According to Jones *et al.* (1994) and McSweeney *et al.* (1999) leguminous feed contains a protein-tannin complex (polyphenols). It reduces the availability of nitrogen in the rumen and inhibits the growth of dominant bacteria in the rumen especially proteolytic bacteria due to the lack of nitrogen.

RS1 and ReS2 bacteria have similar types, namely *Kosakonia* sp., presumably these bacteria originate from the rumen and enters the reticulum with degraded feed. Based on the study, halo zone that was emerged by rumen bacteria had a wider diameter than that of caused by reticulum bacteria. Rumen is a starting place where protein is degraded by proteinase. The enzyme converts proteins into peptides and amino acids, which can be utilized directly by microflora. Furthermore, peptides and amino acids also can be degraded by peptidase and deaminase enzymes into short chain fatty acids and ammonia. Reticulo-ruminal fold is a part that connects rumen and reticulum. Thus, the bolus of food can flow from rumen to reticulum or vice versa. Feed that has not been digested in the rumen will be digested in the reticulum. Proteins consumed by ruminants are



(a)

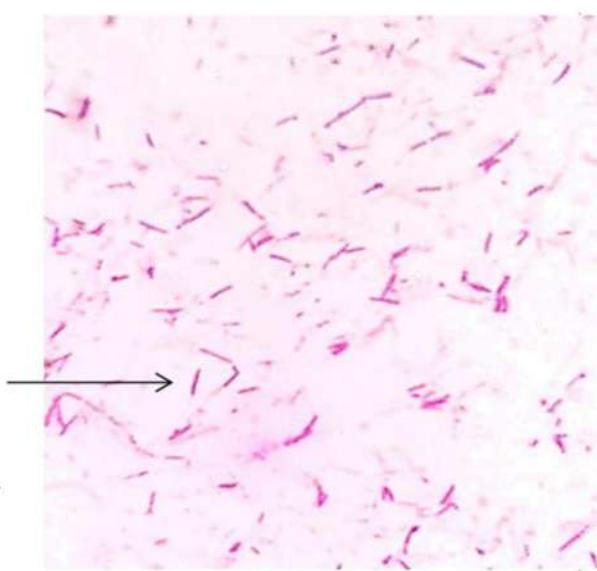


(b)

Figure 1. The colonies grown on Skim Milk Agar medium have a clear halo zone. A= Bacteria collected from rumen, b= Reticulum fluid of aceh cattle



(a)



(b)

Figure 2. Results of Gram staining test with 1000x magnification. A= RS1, bacteria collected from ruminal content of Aceh cattle, b= ReS2, bacteria collected from reticulum fluid of Aceh cattle

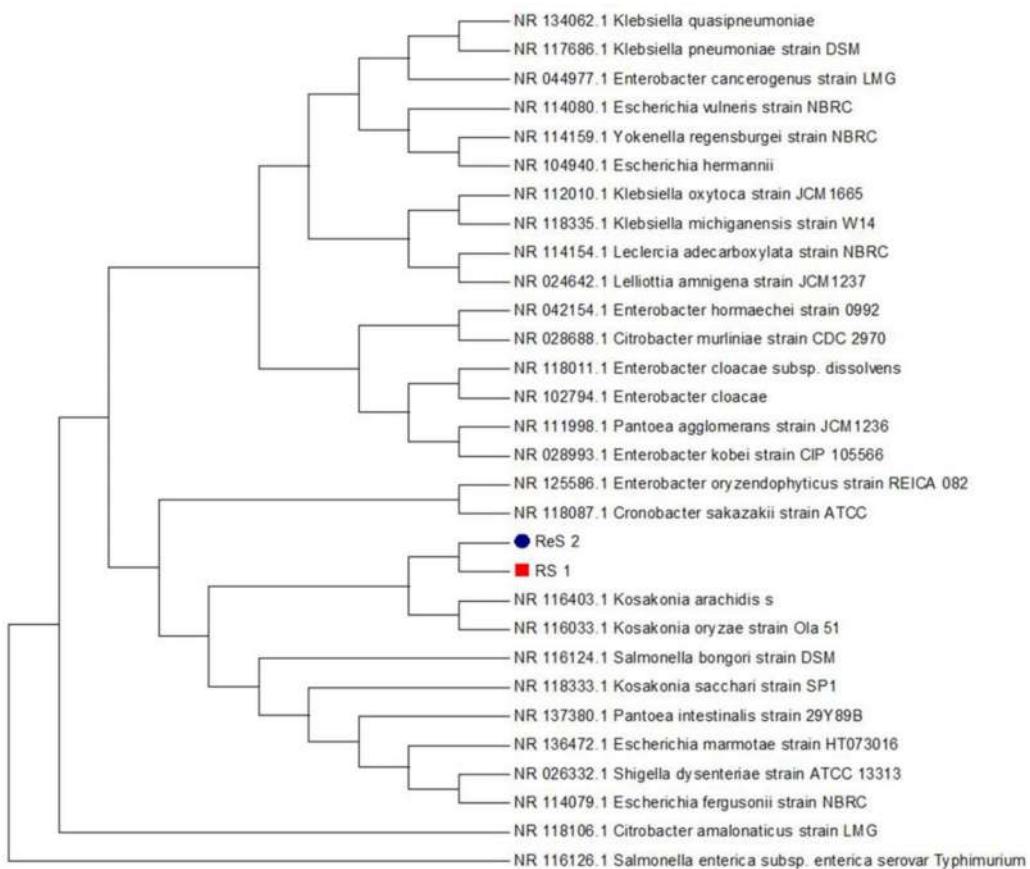


Figure 3. Phylogenetic tree of RS1 (bacterium collected from ruminal content) and ReS2 (bacterium collected from reticulum fluid). As an outgroup is *Salmonella enterica*

not entirely degraded in the rumen and will take longer time to digest all of them in it. Therefore, the undigested proteins will be brought to the reticulum for further processing (Safika et al., 2017).

Homology of DNA sequence and Phylogenetic Analysis

Alignment had been done using BLASTN program. Homology of the DNA sequence and DNA references in the GenBank can be determined by aligning DNA sequence with nucleotide data at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) online via <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. (Ghasemi et al., 2011).

Data sequences taken from the GenBank have different sizes. DNA sequences with the same size and position of the gene is used to obtain the correct analysis. To get the correct position, alignment of the DNA was done using ClustalW followed by phylogenetic analysis using MEGA 7.0. Although Blast program showed different results, RS1 and ReS2 have a close familial relationship. Moreover, they have a close familial relationship with *Kosakonia arachidis* and *Kosakonia oryzae* (Figure 3).

Similarity score which ranged between 97%-100% indicates that the genes come from the same species. In a different way, similarity score that was less than 97% indicate that the gene comes from different species (Vandamme et al., 1996; Janda and Abbot, 2007). Homology analysis showed that RS1 (accesion number: MH900180) had similarity score of 96% with

Kosakonia arachidis (accession number: NR_116403.1). Meanwhile ReS2 (accession number: MH922844) had similarities score of 91% with *Kosakonia radicincitans* strain DSM (accession number: NR_117704.1). It showed that RS1 and ReS2 are from a new species or species that cannot be confirmed. Further research is needed to determine whether the isolates are new species, such as DNA-DNA hybridization analysis, GC content and free fatty acid analysis.

Formerly, *Kosakonia* belonged to the *Enterobacter* genus but separated into a specific group based on multilocus sequence analysis of protein coding genes such as *rpoB* gene (RNA polymerase β subunit), *gyrB* (DNA gyrase gen subunit B), *infB* and *atpD* genes (Brady et al., 2013). It is a rod shaped-negative gram bacterium, motile with peritrichous flagella, and non-spores bacterium that can live mesophilically at optimum temperature of 28° C and pH 7. Bacteria have positive reactions to L-alanine, D-selobiose, citrate, D-fructose, D-galactose, D-glucose, glycerol, maltose, D-mannitol and D-mannose. The difference between *Kosakonia* and *E. cloacae* is in utilization of D-arabitol and L-fucose (Madhaiyan et al., 2010; Chen et al., 2014). Previous research showed that *Enterobacter* producing-cellulase is also found in aceh cattle (Sari et al., 2017).

Nitrogen metabolism is mainly resulted by metabolic activity of ruminal proteolytic bacteria such as *Kosakonia*. Although *Kosakonia* is known as a

nitrogen-fixing bacterium, it is capable of converting nitrogen to ammonia in the rumen. The efficiency of dietary nitrogen that escapes ruminal degradation is the major sources of protein and amino acid requirements of cattle.

CONCLUSION

Based on the results, RS1 (bacteria in the rumen) and RS2 (bacteria in the reticulum) have similar types, namely, *Kosakonia* sp. has proteolytic activity. Presumably, these bacteria originate from the rumen that enters the reticulum with degraded feed. Halo zone that was modified by rumen bacteria has a wider diameter (25 mm) than that caused by reticulum bacteria (20 mm).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are highly thankful to Directorate General of Research and Development Strengthening Republic Indonesia, for funding of the work grant from the Fundamental (No. 305/SP2H/PL/Dit.Litabmas/II/2015).

REFERENCES

- Abdullah, M.A.N., R.R. Noor, S.H. Martojo, D.D. Solihin, and E. Handiwirawan. 2007. Phenotypic diversity of Aceh cattle in Nanggroe Aceh Darussalam. *J. Indon. Trop. Anim. Agric.* 32(1):11-12.
- Alnahdi, H.S. 2012. Isolation and screening of extracellular proteases produced by new isolated *Bacillus* sp. *J. Appl. Pharmaceut. Sci.* 2(9):71-74.
- Baker, G.C., J.J. Smith, and D.A. Cowan. 2003. Review and re-analysis of domain specific 16S primers. *J. Microbiol. Meth.* 55:541-555.
- Brady, C., I. Cleenwerck, S. Venter, T. Coutinho, and P. De Vos. 2013. Taxonomic evaluation of the genus Enterobacter based on multilocus sequence analysis (MLSA): Proposal to reclassify *E. nimipressuralis* and *E. amnigenus* into *Lelliottia* gen. nov. as *Lelliottianimipressuralis* comb. nov. and *Lelliottiamnigena* comb. nov., respectively, *E. gergoviae* and *E. pyrinus* into *Pluralibacter* gen. nov. as *Pluralibactergergoviae* comb. nov. and *Pluralibacterpyrinus* comb. nov., respectively, *E. cowanii*, *E. radicincitans*, *E. oryzae* and *E. arachidis* into *Kosakonia* gen. nov. as *Kosakoniacionvani* comb. nov., *Kosakoniadaradicincitans* comb. nov., *Kosakoniaoryzae* comb. nov. and *Kosakoniaarachidis* comb. nov., respectively, and *E. turicensis*, *E. helveticus* and *E. pulveris* into *Cronobacter* as *Cronobacterzurichensis* nom. nov., *Cronobacterhelveticus* comb. nov. and *Cronobacterpulveris* comb. nov., respectively, and emended description of the genera *Enterobacter* and *Cronobacter*. *Syst. Appl. Microbiol.* 36(5):309-319.
- Chen, M., B. Zhu, L. Lin, L. Yang, Y. Li, and Q. An. 2014. Complete genome sequence of *Kosakonia sacchari* type strain SP1. *Stand. Genomic. Sci.* 9:1311-1318.
- Colville, T. and J.M. Bassett. 2014. *Clinical Anatomy and Physiology of Veterinary Technician*. 3rd ed. Elsevier. Canada.
- Das, K.C. and W. Qin. 2012. Isolation and characterization of superior rumen bacteria of cattle (*Bos taurus*) and potential application in animal feedstuff. *Open J. Anim. Sci.* 2(4):224-228.
- Desiandura, K., M.A.A. Arif, A.Azmijah. 2014. The potential of biofermentor to crude fiber, organic matter and Fe content of rambutan (*Nephelium lappaceum*) peels alternative feed stuff. *Agroveteriner*. 2(2):110-117.
- Genzebu, D. and G. Tesfay. 2015. The role of bacteria in nitrogen metabolism in the rumen with emphasis of cattle. *Res. J. Agric. Env. Manage.* 4(7):282-290.
- Ghasemi, Y., S.R. Amini, A. Ebrahimnejad, A. Kazemi, M. Shahbazi, and N. Talebian. 2011. Screening and isolation of extracellular protease producing bacteria from the maharloosalt lake. *Iranian J. Pharmaceut. Sci.* 7(3):175-180.
- Janda, J.M. and S.M. Abbott. 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pulses, perils, and pitfalls. *J. Clin. Microbiol.* 45(9):2761-2764.
- Jones, G.A., T.A. McAllister, K.J. Cheng, and A.D. Muir. 1994. Effect of sainfoin (*Onobrychis viciifolia Scop*) on growth and proteolysis by four strains of rumen bacteria: Resistance of *Prevotella* (*Bacteroides*) ruminicola B14. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1374-1378.
- Kamra, D.N. 2005. Rumen microbial ecosystem. *Curr. Sci.* 89(1):124-135.
- Kumar, S., G. Stecher, and K. Tamura. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger data sets. *Mol. Biol. Evol.* 33:1870-1874.
- Madhaiyan, M., S. Poonguzhalai, J.S. Lee, V.S. Saravanan, K.C. Lee, and P. Santhanakrishnan. 2010. *Enterobacter arachidis* sp. nov., a plant growth promoting diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of groundnut. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60:1559-1564.
- Martojo, H. 2003. Indigenous Bali cattle: **The Best Suited Cattle Breed for Sustainable Small Farms in Indonesia**. Laboratory of Animal Breeding and Genetics. Faculty of Animal Science. Bogor Agricultural University. Indonesia.
- Mcsweeney, S.C., B. Palmer, R. Bunch, and O.D. Krause. 1999. Isolation and characterization of proteolytic ruminal bacteria from sheep and goats fed the tannin-containing shrub legume *Calliandra calothyrsus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(7):3075-3083.
- Mohamad, K., M. Olsson, G. Andersson, B. Purwantara, H.T.A. van Tol, H.R. Martinez, B. Colenbrander, and J.A. Lenstra. 2012. The origin of Indonesian cattle and conservation genetics of the bali cattle breed. *Reprod. Domest. Anim.* 47:18-20.
- Peng, S., J. Yin, X. Liu, B. Jia, Z. Chang, H. Lu, N. Jiang, and Q. Chen. 2015. First insights into the microbial diversity in the omasum and reticulum of bovine using Illumina sequencing. *J. Appl. Genet.* 56:393-401.
- Petri, R.M., T. Schwaiger, G.B. Penner, K.A. Beauchemin, R.J. Forster, J.J. McKinnon, and T.A. McAllister. 2013. Characterization of the core rumen microbiome in cattle during transition from forage to concentrate as well as during and after an acidotic challenge. *Plos One*. 8(12):1-15.
- Safika, Darmawi, F.S. Ramadhan, Nurhaspika, and Moliwati. 2018. Total bacteria and identification of proteolytic ruminal and reticulum bacteria from local kacang goat. *J. Kedokt. Hewan.* 12(1):17-22.
- Safika, S.W. Matondang, Darmawi, M. Abrar, Erina, and M. Jalaluddin. 2017. Total colony of cellulolytic bacteria in the rumen of aceh cattle. *J. Med. Vet.* 11(1):51-58.
- Safika, W.N. Sari, Darmawi, Y. Fahrimal, and S.F. Sentosa. 2018. Isolation and identification of a cellulolytic Bacillus from rumen of aceh's cattle. *Asian J. Microbiol. Biotech. Env. Sci.* 20(3):99-105.
- Safika, M. Fida, A. Pingkan, and Akhmaloka. 2013. Succession culture independent bacterial during manure composting process. *J. Pure Appl. Microbiol.* 7(13):269-276.
- Sari, W.N., Safika, Darmawi, and Y. Fahrimal. 2017. Isolation and identification of a cellulolytic Enterobacter from rumen of Aceh cattle. *Vet. World*. 10(12):1515-1520.
- Tamura, K., P. Daniel, P. Nicholas, S. Glen, N. Masatoshi, and K. Sudhir. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28(10):2731-2739.
- Vandamme, P., B. Pot, M. Gillis, and P. Vos De. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* 60:407-438.
- Vijayaraghavan, P.S. and G.P. Vincent. 2013. A simple method for the detection of protease activity on agar plates using bromocresolgreen dye. *J. Biochem. Tech.* 4(3):628-629.

Effect of Maternal Antibodies on Histopathogenesis of Newcastle Disease Virus in Broiler Chickens

I Made Galih Diparayoga¹, Nyoman Mantik Astawa², Anak Agung Ayu Mirah Adi³

¹Veterinarian in Bali Vet Clinics, Badung

²Laboratory of Veterinary Virology, Faculty of Veterinary Medicine,
Udayana University, Denpasar , Bali , Indonesia

³Laboratory of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Medicine,
Udayana University, Denpasar , Bali , Indonesia.
corresponding address : galihdiparayoga@gmail.com

ABSTRACT

The aims of this research were to overview the effect of maternal antibodies on the histopathological changes and viral antigen distribution of the broiler chickens challenged with ND APMV-1 virus. A total of 100 chicken were allotted into 3 treatment groups consisting of group I (titer antibodies< 2^3 HI Unit), group II (titer antibodies 2^3 – 2^4 HI Unit) and group III (titer antibodies> 2^4 HI Unit). All group I, II and III were inoculated with ND virus isolates of type viscerotropic velogenic at the dose of 1000 TCID₅₀. The histopathological changes observed in nervous system were endotheliosis and perivascular cuffing. Immunohistochemistry staining showed that NDV infected cells were found in most organs both in inflammatory cells and in epithelial cell of many organs mainly in nervous, respiratory and digestive systems. Neurological symptoms and neural lesions were highest in group II (titer antibodies 2^3 – 2^4 HI Unit).

Key words: maternal antibodies, newcastle disease, histopathological, immunohistochemistry

INTRODUCTION

Avulavirus genus belongs to the family of Paramyxoviridae and is designated as avian paramyxovirus type 1 (APMV-1), one of 12 identified APMV serotypes (Alexander, 2000). Serological tests are useful tools in diagnosis of infection. Hemagglutination inhibition (HI) test is the most common test used for detection of immune response in affected birds (Alexander and Senne, 2008^b). Newcastle Disease (ND) causes huge economic losses to the commercial poultry farmers around the world (Qin *et al.*, 2008). Etiological agents of ND are virulent strains of avian paramyxovirus-1 (Yu *et al.*, 2001). The disease is characterized by respiratory, nervous system impairment, gastrointestinal and reproductive problems (Alexander and Senne, 2008). Tabbu (2000) reported that chicks from immunized parents had high level of maternally derived antibodies (MDA) which protect them from virulent and vaccine viruses. It was also reported that MDA are protective and neutralize vaccine virus if the

chicks are vaccinated in the presence of high level of MDA. In order to formulate appropriate vaccination schedule and control measures, the serological status of NDV among chickens need to be elucidated. The vast majority of bird species appear to be susceptible to infection with APMV-1 of both high and low virulence for chickens, although the clinical signs seen in infected birds vary widely and are dependent on factors such as: the virus, host species, age of host, infection with other organisms, environmental stress and immune status (Kencana, 2012).

The titer of MDA naturally has an effect on the pathogenesis of ND in chickens especially on the occurrence of neurological symptoms of ND.. The subprotective levels of MDA which cannot prevent chickens from NDV infection but prevent from death, often causes prolonged chronic infection. Such prolonged chronic infection often cause the spread of the virus into the brain. As a result, neuronal clinical signs are often observed with permanent brain damages. A study was then

conducted to investigate the effect of maternal antibodies in serum on the occurrence of neuronal signs in chickens challenged with virulent strain of NDV.

MATERIALS AND METHODS

This was an experimental study with randomized design. A total of 100 chickens was allotted into 3 treatment groups according to their maternal antibodies titer against NDV: group I (titer antibodies < 2^3 HI Unit), group II (titer antibodies $2^3 - 2^4$ HI Unit) and group III (titer antibodies > 2^4 HI Unit). Group I, II and III were challenged with velogenic ND virus at 1000 TCID₅₀ per chicken. Two weeks post infection, chickens were necropsied and specimens from each organ were prepared for histopathological and immunohistochemical staining.

One ml blood was collected from the brachial vein and was left overnight at 4°C. Serum was separated from blood clot by centrifugation at 2000 rpm for 5 minutes. Serum was then aliquoted in eppendorf tubes and stored at -20°C.

HI test was performed to determine the maternal antibodies titer in each chicken. Serial two-fold dilution of serum from each chicken was prepared. Four HA units NDV were then added into each serum dilution and incubated for 30 minutes at room temperature. Suspension of 1% chicken red blood cells was added, shaken and incubated for 15 minutes at room temperature. The antibodies titer was determined as antilog of the highest dilution of serum which was capable to completely inhibit virus to hemagglutinate red blood cells and was expressed as HI units.

On the age of 12 days, chickens were grouped according to their antibody titer and all chickens were challenged with 1000 TCID₅₀ the velogenic NDV virus that had previously been titrated in chicken embryo fibroblast cell culture. The challenge virus was firstly titrated in chicken embryo fibroblast cell culture. The virus was diluted to obtain 1000 TCID₅₀ per 0.1 ml. The challenge procedure was conducted by inoculation of 1000 TCID₅₀ intraocularly into

both eyes. The challenged chickens were observed for the presence of ND clinical signs and mortality. Chickens died with clinical signs of ND were necropsied for histopathological and immunochemistry examinations. Chickens that survived for 2 weeks following the challenge test, either with or without ND clinical signs were also sacrificed for histopathological and immunochemistry examination.

Histopathological and Immunochemistry Examination.

Organs from all sacrificed chickens were subjected for tissue processing to prepare paraffin embedded tissue according to routine procedures. The tissue in paraffin block were cut at 4 micron thin and was layered on poly-L-lysine coated microscope slides. For histopathological examination, the tissues were stained with hematoxyline and eosin (HE) according to the routine procedures. For immunohistochemistry staining, tissues on microscope slides were firstly deparaffinized with xylene (2 x 5 minutes), rehydrated with absolute ethanol (2 x 5 minutes), and washed with PBS (2 x 2 minutes). Antigen retrieval was conducted by heating the tissues at 95°C for 20 minutes in citrate buffer pH 6.0. Endogenous peroxidase was inactivated by treated tissues with 3% H₂O₂ for 20 minutes at room temperature. After twice washed with PBS, 100 µl monoclonal antibodies against NDV (diluted 1:20 in PBS with 2% skim milk was added and incubated for overnight at 4°C. Anti-mouse IgG conjugated with biotin was then added (Biocare USA) and incubated for 30 minutes at room temperature. Streptavidin-HRP (Biocare) was then added and incubated for 20 minutes at room temperature. Following extensive washes (4 x 5 minutes) with PBS, diazinobenzidine (DAB) substrate was then added for 5 minutes at room temperature. Cells in tissues were counterstained with Mayer hematoxyline and dehydrated with ethanol (2 x 5 minutes), cleared with xylene (2 x 5 minutes) and mounted with entellan. The cells bearing NDV antigen were observed on light microscope.

RESULTS AND DISCUSSION

Incubation Period and the Duration of Clinical Signs Post-Challenge

Following the challenge test with 0.1 ml of 1000 TCID₅₀ by intraocular inoculation on the left and right eyes, various clinical signs were observed. The incubation period was 1-6 days with an average of 3.33 days. The duration of illness was 1-9 days with an average of 4.76 days.

Effect of Maternal Antibodies Titers on the Incubation Period, Survival and Clinical Signs

In chickens with maternal antibodies titer of $<2^3$, the average incubation period was 3.47

days and the duration of illness were 4.36 days. In chickens with maternal antibodies titer $2^3 - 2^4$, average incubation period and duration of illness was 8.1 days and 5.7 days respectively. Meanwhile, in chickens with maternal antibodies titer of 2^5 , the average incubation period and duration of illness were 6 days and 8 days respectively.

Histopathological Changes of Brain, Lung and Intestine

Histopathological changes of brain in 3 treatment groups of chickens were perivascular cuffing with different levels. The most extensive perivascular cuffing was found in the brain of chickens with titer antibodies $2^3 - 2^4$ (Figure 1 and 2).

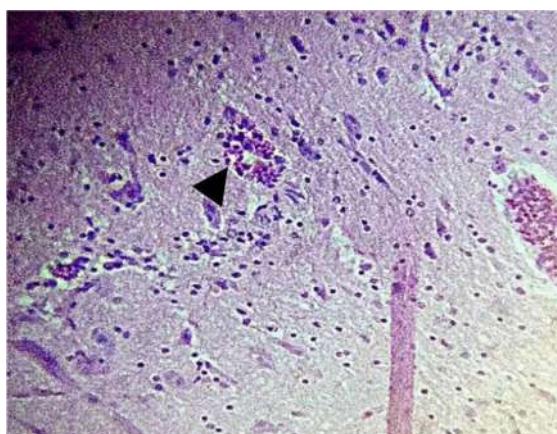


Figure 1. Found Endotheliosis, perivascular cuffing and edema perivascular (arrow) magnification 400 X (Titer AB $2^3 - 2^4$)

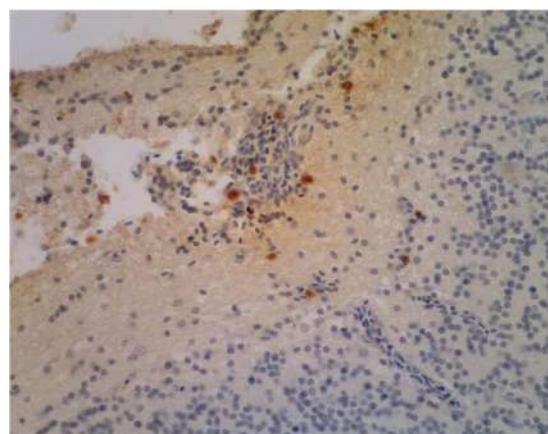


Figure 2. Positive cells containing viral antigen found in inflammatory cells ND (arrow) magnification 400 X (Titer AB $2^3 - 2^4$)

Effect of Maternal Antibodies Titer on the Distribution of Virus In Brain, Lungs and Intestines

In the brain of chickens with maternal antibodies titer of $2^3 - 2^4$ HI units, the average degree of ND virus infection was 3.86. This was significantly higher than those in chickens with maternal antibodies titer of $<2^3$ (2.48) and $> 2^5$ (1.50). In the intestinal organs, the degree of infection were highest in the group of chickens with maternal antibodies titer $<2^3$ (2.86) and the lowest degrees of infection was

noted in the group of chickens with maternal antibodies titer $> 2^5$ (1.00).

Role Maternal Antibodies in Clinical Signs of ND

At 12 days old chicks when the challenge test was conducted, the titer of maternal antibodies against ND virus in chickens was mostly below the protective level. The protective level of antibodies against ND minimum was reported 2^5 HI Units (Suryana, 2006). However, several chickens still had

antibodies titer above the protective level (2^5 HI units). Chickens with maternal antibodies titer of $<2^3$ HI units generally died with typical clinical signs of ND post challenge. Protective antibodies titers against ND virus in chickens infection was $> 2^4$ HI Unit. Suryana (2006) reported that chickens with average antibodies titer minimum 2^5 HI Unit had 100% protection rate, chickens with maternal antibodies titer of $> 2^4$ HI units had 60% protection rate, and those with maternal antibodies titer of $> 2^3$ HI units had 40% protection. While in the control group of unvaccinated chickens, protection rate was 0%. Kusmaedi (2001) and Allan (1978) stated that challenged test ND, chickens contained antibodies $<2^2$ HI Unit resulted 100% died. Antibodies titers between 2^2 - 2^4 units mortality rate reached 10%, but antibody titer 2^5 - 2^6 HI Unit resulted in 0% mortality.

Table 1. Average Score Immunohistochemistry ND Virus Antigen in Organs of the Brain, Lungs and Intestines

Group of maternal antibodies titers	Brain	Lungs	Intestines
Group I ($<2^3$ HI Unit)	2.48	2.76	2.86
Group II (2^5 - 2^4 HI Unit)	3.86	2.43	2.00
Group III ($> 2^4$ HI Unit)	1.50	2.00	1.00

The Effect of Maternal Antibodies Titer on the Degree of Viral Infection in Brain and Other Organ.

Velogenic ND virus in Indonesia has been viscerotropic or velogenic viscerotropic (Adi et al., 2010). One phenomenon attempted to disclose in this study was the appearance of neurological symptoms in chickens infected with ND virus. The results of immunohistochemistry staining of the brain tissue showed that chickens with maternal antibodies titer of 2^3 - 2^4 HI units had the highest score of ND virus infection as compared to those in chickens with maternal antibodies titer of 2^5 HI units and $<2^3$ HI units. The results of histopathological changes indicated that chickens infected with neurological symptoms also suffered endotheliosis, perivascular cuffing and edema perivascular in the brain. These

results were similar to that reported by Bhaiyat et al., (1994) that perivascular cuffing in acute infection, lymphocytes capillary and venous edema had been associated with ND virus infection process. Newcastle diseases virus neurological damages infected were found by (Ecco et al., 2011). Infected ND virus did not damage the neurological cells but only damage in vascular endothelial marked hypertrophy, vasculitis specifically cerebellum (Nakamura et al., 2008).

Distribution ND virus in nervous organ reported by Ecco et al. (2011) found in chickens infected with isolated velogenic imunopositive viscerotropic and reaction ND virus would be inflammatory cells and astrogliosis. However, the infection of NDV in chickens could resulted in neurological symptoms which persist for prolonged period after infection. The role of subprotective antibodies titers had been suggested from several studies. When antibodies titer in chickens against ND virus is at subprotective level, it cannot prevent infection, but can protect chickens from death following infection. This study demonstrated that the level of meternal antibodies in chicks played important ruler in protecting against infectious ND virus infection. The titer of $> 2^4$ HI Unit, seemed to give the best protection, therefore vaccination program in productive poultry should be evaluated regularly.

REFERENCES

- Adi AAA, Astawa NM, Putra NM, Hayashi KSA, Matsumoto Y. 2010. Isolation and characterization of a pathogenic Newcastle disease virus from a natural case in Indonesia. J Vet Med Sci. 72(3):313-319.
- Alexander DJ. 2000. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. J Rev Sci Techs. 19(2): 443-462.
- Alexander DJ, Senne DA. 2008. Newcastle disease, other avian paramyxoviruses, and pneumovirus infections. In Diseases of Poultry, J Gen Virol. 80(2):75-116.
- Alexander DJ, Senne DA. 2008b. Newcastle disease and other avian pramyxoviruses. In: A Laboratory manual for the isolation, identification and characterization of

- avian pathogens, Dufour-Zavala L. American Association of Avian Pathologists. 7(2): 135–141.
- Allan WH, Lancaster JE, Toth B. 1978. Newcastle disease vaccines-their production and use. FAO animal production and health series, 25(10): 1-13.
- Bhaiyat MI, Ochiai K, Itakura C, Islam MA, Kida H. 1994. Brain lesions in young broiler chickens naturally infected with a mesogenic strain of Newcastle disease virus. *Avian Pathol.* 23(4):693-708.
- Ecco R, Susta L, Afonso CL, Miller PJ, Brown C. 2011. Neurological lesions in chickens experimentally infected with virulent Newcastle disease virus isolates. *Avian Pathol.* 40(2):145-152.
- Kencana GAY. 2012. Penyakit Virus Unggas. Udayana University Press. Denpasar.
- Kusmaedi. 2001. Teknik Uji Hemagglutination Inhibition Untuk Mengukur Tingkat Kekebalan Terhadap Newcastle: 224-232.
- Nakamura K, Ohta Y, Abe Y, Imai K, Yamada. 2010. Pathogenesis of conjunctivitis caused by Newcastle disease viruses in specific-pathogen-free chickens, *Avian Pathol.* 33(3):371-376.
- Qin ZM, Tan LT, Xu HY, Ma B., Wang YL, Yuan XY, Liu WJ. 2008. Pathotypical characterization and molecular epidemiology of Newcastle disease virus isolates from different hosts in China from 1996 to 2005. *J. Clin. Microbiol.* 46(2):601-611.
- Suryana N. 2006. Pengamatan daya proteksi ayam post vaksinasi newcastle disease dengan uji tantang. Temu Teknis Nasional Tenaga Fungsional Pertanian. Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan. 21(37) :35 - 39
- Tabbu CR. 2000. Penyakit Ayam dan Penanggulangannya: Penyakit Bakterial, Mikal, dan Viral. Kanisius, Yogyakarta.
- Yu L, Wang Z, Jiang Y, Chang L, Kwang J. 2001. Characterization of newly emerging Newcastle disease virus isolates from the People's Republic of China and Taiwan. *J. Clin. Microbiol.* 39(10): 3512 - 3519.