DOI: http://dx.doi.org/10.14334/Pros.Semnas.TPV-2017-p.693-701

Media Penyimpanan Telur, Larva dan Cacing Nematoda sebagai Media Uji *In Vitro*

(Storage Medium of Eggs, Larvae and Adult Nematode Worms as *In Vitro* Medium)

Ekawasti F, Suhardono, Sawitri DH, Dewi DA, Wardhana AH, Martindah E

Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl. RE Martadinata No. 30, Bogor 16114
fitrineekawasti@gmail.com

ABSTRACT

Gastrointestinal nematode worm infection is one of the factors inhibiting efforts to improve livestock productivity. The treatment is done by anthelmintic, but lately have been several cases of drug resistance worm. So that needs to be tested to determine the effectiveness of worm medicine. The test of effectiveness of drugs against worms can be done *in vitro* either on eggs, larvae and adult worms to chemical anthelmintics and herbs anthelmintics. Before performing the *in vitro* test, first need to know a good media *in vitro* test for use to the egg, larva and nematode worms can survive well beyond its natural condition. This study was aimed to test the good solvent medium for the storage of eggs, larvae and adult worms that can be used *in vitro* tests. Solvent medium or the test medium *in vitro* as the storage of eggs, larvae and adult worms commonly used is a solution of isotonic or a solution containing a substance, such as 0.9% NaCl, DMSO 1%, PBS 1%, CMC 1%, Tween 20 1%, and distilled water. Eggs and larvae are stored in the petridish that already contains six media with each of the three repetitions and time of observation for 24 and 48 hours, while the adult worms was observed every hour for 5 hours. Result showed that *in vitro* medium good for eggs and larvae was DMSO 1% and PBS 1%, while for adult worms NaCl 0.9% and PBS 1%. PBS is a good medium if the test will be conducted simultaneously using eggs, larvae and adult nematode worms.

Key Words: Nematodes, The Digestive Tract, Media, *In vitro*

ABSTRAK

Infeksi cacing nematoda saluran pencernaan merupakan salah satu faktor penghambat dalam meningkatkan produktivitas ternak. Pengobatannya dilakukan dengan pemberian obat cacing, tetapi akhir-akhir ini telah dilaporkan adanya kejadian resistensi obat cacing. Sehingga perlu dilakukan uji untuk mengetahui efektivitas obat cacing. Uji efektivitas terhadap obat cacing dapat dilakukan secara *in vitro* baik pada telur, larva dan cacing dewasa terhadap anthelmintik kimia maupun alami (herbal). Sebelum melakukan uji *in vitro* terlebih dahulu perlu diketahui media uji *in vitro* yang baik untuk digunakan agar telur, larva dan cacing nematoda dapat bertahan dengan baik di luar kondisi alamnya. Penelitian ini bertujuan untuk menguji media pelarut yang baik untuk penyimpanan telur, larva dan cacing dewasa agar dapat digunakan pada uji *in vitro*. Media pelarut atau media uji *in vitro* sebagai penyimpanan telur larva dan cacing dewasa yang biasa digunakan adalah berupa larutan isotonis atau larutan yang mengandung zat tertentu, seperti NaCl 0,9%, DMSO 1%, PBS 1%, CMC 1%, Tween 20 1%, dan akuades. Telur dan larva disimpan pada cawan petri yang telah berisi enam media tersebut dengan masing-masing 3 pengulangan dan waktu pengamatan selama 24 dan 48 jam sedangkan pada cacing dewasa dilakukan pengamatan tiap jam selama lima jam. Diperoleh hasil bahwa media *in vitro* yang baik untuk telur dan larva cacing adalah DMSO 1% dan PBS 1% sedangkan untuk cacing dewasa NaCl 0,9% dan PBS 1%. PBS merupakan media yang baik jika akan dilakukan uji bersamaan menggunakan telur, larva dan cacing nematoda dewasa.

Kata Kunci: Nematoda, Saluran Pencernaan, Media, *In Vitro*

PENDAHULUAN

Nematodiasis merupakan penyakit yang sering terjadi di Indonesia, dengan prevalensi tinggi di dunia yang menyebabkan penurunan produksi ternak secara signifikan (Beriajaya 2005). Penyakit ini disebabkan oleh cacing gilik/kelas Nemotoda (Jabbar et al. 2013). Dampak yang di timbulkan oleh penyakit ini adalah anemia berat, penurunan berat badan, dan gangguan pertumbuhan pada pedet sehingga sangat merugikan peternak (Sugama & Suyasa 2012). Cacingan merupakan salah satu dari 22 jenis penyakit hewan menular stretegis (PHMS) yang telah ditetapkan melalui Surat Keputusan Menteri Pertanian No. 4026/Kpts./OT.140/3/2013 (Menteri Pertanian RI 2013).

Nematoda memiliki siklus hidup langsung, sehingga tidak memerlukan inang antara dalam perkembangan hidupnya. Cacing betina dewasa bertelur dan mengeluarkan telur bersamaan dengan tinja, di luar tubuh telur akan berkembang. Larva infektif dapat masuk ke dalam tubuh ternak secara aktif, tertelan atau melalui gigitan vektor berupa rayap. Umumnya cacing usus menjalani stadium telur, larva, dan dewasa dengan berbagai variasi, tergantung pada spesiesnya. Penularan cacing dapat terjadi melalui feses (Natadisastra & Agoes 2005). Cacing ini umumnya menular melalui tanah, air dan makanan berupa hijauan pada saat ternak beraktivitas dan memperoleh makanan yang terkontaminasi oleh telur cacing nematoda. Telur yang dihasilkan oleh cacing nematoda dewasa akan mengalami maturasi di lingkungan manakala dikeluarkan bersama tinja. Siklus hidup sebagai parasit dimulai ketika inang definitif menelan telur infektif (L2) sampai menjadi dewasa dan bereproduksi menghasilkan telur. Peluang banyaknya kasus cacingan yang muncul berbanding lurus dengan banyaknya jumlah larva infektif di lingkungan tempat inang berada. Artinya semakin banyak jumlah larva infektif maka peluang munculnya kasus cacingan juga akan semakin besar dan begitu sebaliknya. Lingkungan yang sesuai memungkinkan telur-telur cacing yang keluar bersama feses menetas dan berkembang menjadi larva infektif yang akan menginfestasi inang baru (Akhira et al. 2013).

Penyakit parasitik yang penting pada ternak domba adalah *haemonchosis*. *Haemonchosis* disebabkan oleh cacing *Haemonchus contortus* yang mempunyai kebiasaan menghisap darah (Al-Khayat & Al-Jebory 2012). *H. contortus* merupakan jenis nematoda yang sering menyerang ternak ruminansia yang mengakibatkan keterlambatan pertumbuhan berat badan per hari sebanyak 40% pada sapi potong dan penurunan produksi susu sebesar 15% pada sapi perah (Siregar et al. 2013), serta menimbulkan berbagai dampak yang merugikan pada domba dan kambing terutama yang masih muda seperti malnutrisi yang mengakibatkan penurunan daya imunitas tubuh dan penyebab kematian terutama pada domba dan kambing yang masih muda sehingga dapat mengurangi pendapatan peternak (Jackson et al. 2009; Natadisastra & Agoes 2009; Papadopoulos et al. 2012).

Program pencegahan dan pengendalian nematodiasis pada ternak dilakukan dengan penggunaan obat cacing (*anthelmintic*), pemakaian jenis golongan obat cacing yang sama digunakan dalam waktu lama atau penyalahgunaan obat cacing dapat meningkatkan kejadian resistensi obat cacing nematoda gastrointestinal atau berkurangnya efektivitas obat cacing pada ternak (Kumara et al. 2010). Penggunaan obat cacing yang berlebihan telah dilaporkan menyebabkan resistensi pada anak sapi dan ruminansia kecil (Garg et al. 2007; Ram et al. 2007). Saat ini telah banyak dilaporkan kejadian resistensi cacing nematoda terhadap obat cacing di beberapa negara (Papadopoulos 2008; Nabukenya et al. 2014) termasuk Indonesia (Haryuningtyas & Beriajaya 2002). Sehingga untuk mengetahui efektivitas obat cacing terlebih dahulu dapat dilakukan uji *in vitro* efektivitas obat cacing terhadap telur, larva dan cacing dewasa.

Uji *in vitro* merupakan jenis pemeriksaan yang dilakukan dalam cawan petri/tabung reaksi yang dilakukan di luar tubuh mahluk hidup. Penelitian *in vitro* mensyaratkan adanya kontak antara bahan atau suatu komponen bahan dengan sel, enzim, atau isolasi dari suatu sistem biologik. Proses kontak dapat terjadi secara langsung, untuk mengetahui pengaruh suatu bahan terhadap genetik set. Metode uji dilakukan pada media buatan yang sesuai dengan lingkungan optimal yang diperlukan oleh sel untuk tumbuh dan berkembangbiak (Ikrom et al. 2014). Untuk melakukan uji *in vitro* efektivitas obat cacing, terlebih dahulu perlu diketahui media *in vitro* atau media penyimpan yang baik terhadap telur, larva dan cacing dewasa. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui media penyimpanan telur, larva dan cacing dewasa *H. contortus* yang dapat digunakan sebagai media uji *in vitro*.

MATERI DAN METODE

Preparasi feses

Pengambilan feses domba

Pengambilan feses berasal dari domba donor (domba yang telah diinfestasikan larva cacing nematoda). Sampel feses dikoleksi secara langsung dari rektum ternak dimasukkan dalam kantong plastik dan diikat sedemikian rupa sehingga tidak mengandung udara. Sampel feses disimpan pada suhu 4°C sampai siap diproses di laboratorium.

Pemeriksaan feses

Sebanyak 3 gram dilarutkan dengan air sebanyak 17 ml selama beberapa menit, setelah lunak lalu dihancurkan kemudian ditambah larutan garam jenuh sebanyak 40 ml untuk mengapungkan telur nematoda. Setelah itu, sambil diaduk larutan feses diambil dengan pipet yang dilengkapi saringan dan larutan tersebut dimasukkan pada kamar hitung Whitlock. Telur nematoda dihitung (dalam kamar hitung McMaster) dengan menggunakan mikroskop perbesaran 40 kali sehingga jumlahnya dikalikan 40. Pemeriksaan kuantitatif tersebut dimaksudkan untuk mengetahui banyaknya telur cacing setiap gram feses atau telur per gram (tpg) tinja yang menggambarkan berat ringannya derajat infeksi parasit.

Preparasi telur dan larva cacing

Purifikasi telur dari sampel tinja

Sebanyak 200 g tinja diberi air sedikit, kemudian diaduk sehingga merata. Untuk mengetahui jumlah telur cacing per gram tinja maka sampel tinja tersebut dihitung epg dengan metode Whitlock. Bila jumlah telur cacing cukup banyak (epg >100) maka dilanjutkan dengan penyaringan dengan menggunakan saringan ukuran 250, 180, 75 dan 25 μm. Untuk memisahkan telur dari kotoran maka digunakan gradien gula dengan konsentrasi 10, 25 dan 40%.

Pemupukan feses

Sampel yang positif mengandung telur nematoda selanjutnya disiapkan untuk pemupukan feses (kultur telur cacing). Kultur telur cacing dilakukan untuk mendapatkan larva cacing L3 dalam jumlah banyak. media kultur larva yang terbuat dari campuran feses dan vermikulit dengan perbandingan 1:1 diaduk hingga merata sambil diberi air secukupnya agar pupukan telur menjadi lembab tetapi tidak basah. Selanjutnya campuran

tersebut dimasukkan ke dalam botol kaca dan ditutup longgar agar tetap ada udara kemudian diberi label. Pupukan larva disimpan pada suhu kamar dan tidak kena sinar matahari langsung selama 7-9 hari, setiap 2-3 hari sekali pupukan larva tersebut diperiksa agar kelembabannya terjaga dan bila media pupukan terlihat agak kering maka dapat disemprotkan air secukupnya.

Panen larva cacing nematode dilakukan dengan cara menambahkan air kran ke dalam kultur dalam botol sampai penuh (tidak tumpah) rata dengan permukaan botol, kemudian ditutup dengan cawan petri dan balikkan sehingga posisinya terbalik. Selanjutnya ditambahkan air ke dalam cawan petri dan diinkubasi selama minimal empat jam pada suhu ruangan. Larva disimpan dalam lemari pendingim (4°C).

Preparasi cacing nematoda dewasa (*H. contortus*)

Cacing dewasa diperoleh dengan cara memotong domba donor (domba yang telah diinfestasikan larva cacing nematoda). Abomasum dibuka pada bagian kurvatura mayor. Isi abomasum ditampung di dalam ember plastik. Abomasum kemudian dicuci menggunakan air dan ditampung di dalam nampan. Cacing dikoleksi dengan menggunakan alat khusus seperti sonde/pinset untuk mempermudah dalam mengambil cacing yang terlihat. Cacing *Haemoncus contortus* yang diperoleh dari isi rumen abomasum dan yang terdapat pada bilasan dikumpulkan di cawan.

Pembuatan media uji *in vitro*

Media *in vitro* adalah media yang digunakan untuk uji *in vitro* yang dapat menyimpan objek uji dalam jangka waktu beberapa lama selama proses uji. Media adalah suatu substrat dimana mikroorganisme dapat tumbuh yang disesuaikan dengan lingkungan hidupnya. Beberapa larutan pengencer/ larutan fisiologis yang biasa digunakan adalah NaCl 0,9%; DMSO 1%; PBS 1%; Tween 20 1%; CMC 1% dan Aquades.

Uji daya tahan telur, larva dan cacing dewasa nematoda terhadap media penyimpanan/*in vitro*

Telur dan larva cacing

Uji dilakukan untuk mengetahui daya tahan telur cacing terhadap media penyimpanan di suhu ruang secara in vitro. Enam (6) media digunakan pada uji ini, yaitu NaCl 0,9%; PBS 1%; Tween 1%; CMC 1%; DMSO 1% dan Aquades. Pengujian ini dilakukan dengan 3 kali ulangan dan masing-masing media diisi dengan 200 telur/larva.

Cacing dewasa

Uji ini dilakukan untuk mengetahui daya tahan cacing selama berada di luar tubuh, saat berada pada suhu ruang dengan menggunakan media pelarut yang sesuai dibandingkan dengan kontrol. Enam media digunakan pada uji ini, yaitu NaCl 0,9%; PBS 1%; Tween 1%; CMC 1%; DMSO 1% dan akuades. Pengujian ini dilakukan dengan 3 kali ulangan dengan masing-masing media diisi dengan cacing *H. contortus* sebanyak lima ekor cacing.

Analisis data

Data yang diperoleh dari hasil pemeriksaan laboratorium ditabulasikan dengan grafik menggunakan program *microsoft excel* dan dianalisis secara deskriptif baik secara kualitatif maupun kuantitatif.

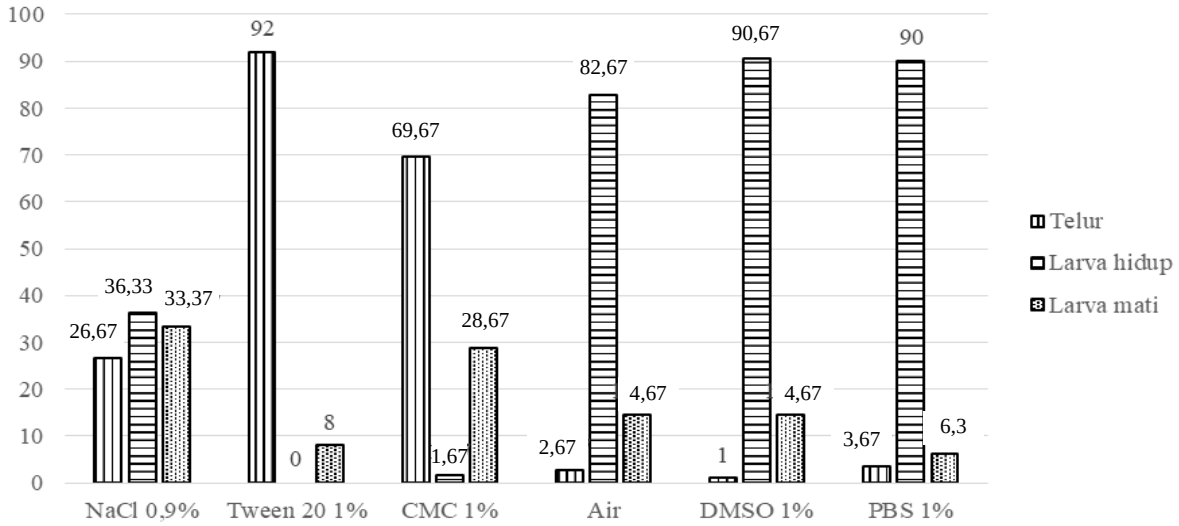
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil koleksi telur dan larva nematoda serta cacing dewasa *H. contortus*

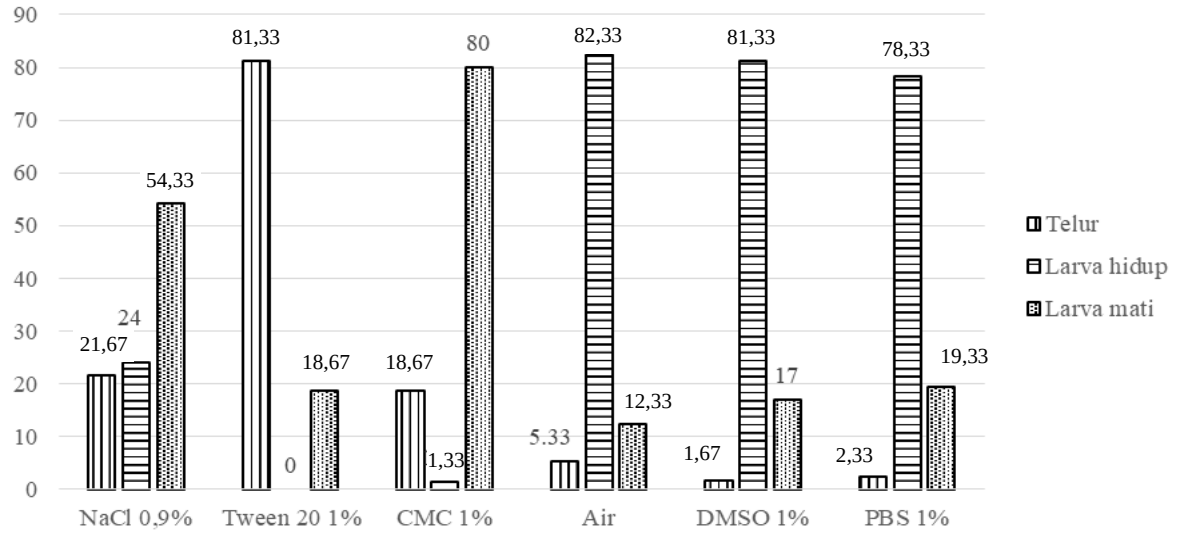
Telur dan larva yang digunakan sebanyak kurang lebih 200 telur atau larva pada masing-masing cawan petri, sedangkan cacing yang digunakan sebanyak 5 ekor cacing pada masing-masing cawan petri. Uji daya tahan telur cacing diluar tubuh inang dilakukan untuk dapat menentukan waktu pengamatan yang sesuai terhadap pengujian *in vitro* dan mengetahui media *in vitro* yang baik untuk dapat digunakan sebagai media penyimpan telur, larva dan cacing dewasa. Penyimpanan telur, larva dan cacing dewasa membutuhkan bahan pengencer yang dapat melindungi sel biologi dari suhu rendah dan memberikan sumber energi selama proses penyimpanan, karena tanpa adanya bahan pengencer sel akan rusak dan mati selama penyimpanan. Pengencer yang dibutuhkan dapat mensuplay nutrisi dan bersifat isotonik yang dapat mempertahankan tekanan osmotik dan keseimbangan elektrolit yang sesuai, sehingga sel dapat bertahan hidup (Kurniawan et al. 2013). Telur, larva dan cacing akan bertahan pada kondisi basah (lingkungan berair) sebab air mempunyai fungsi penting dari sistem hidup sel karena bagian terbesar dari tiap sel adalah air dan kebanyakan materi kimiawi yang ada larut di dalamnya sehingga terjadi reaksi. Maka sebagai media penyimpan dapat digunakan media penyimpan yang bersifat cairan DMSO, PBS, NaCl, Tween, CMC dan aquades.

Menurut Beriajaya & Copeman (2006), telur cacing dapat bertahan hingga 48 jam di suhu ruang dalam keadaan baik. Uji *in vitro* terhadap telur cacing adalah persentase telur cacing yang menetas selama 48 jam (Manurung & Beriajaya 2004). Uji *in vitro* terhadap larva L3 adalah persentase larva yang dapat bertahan (hidup) motil selama 48 jam, sedangkan pada cacing dewasa (*H. contortus*) dilihat persentase daya tahan (hidup) cacing selama kurang lebih empat jam. Hal ini dikarenakan perkiraan proses masuknya obat cacing ke dalam organ pencernaan ternak khususnya abomasum sekitar empat jam.

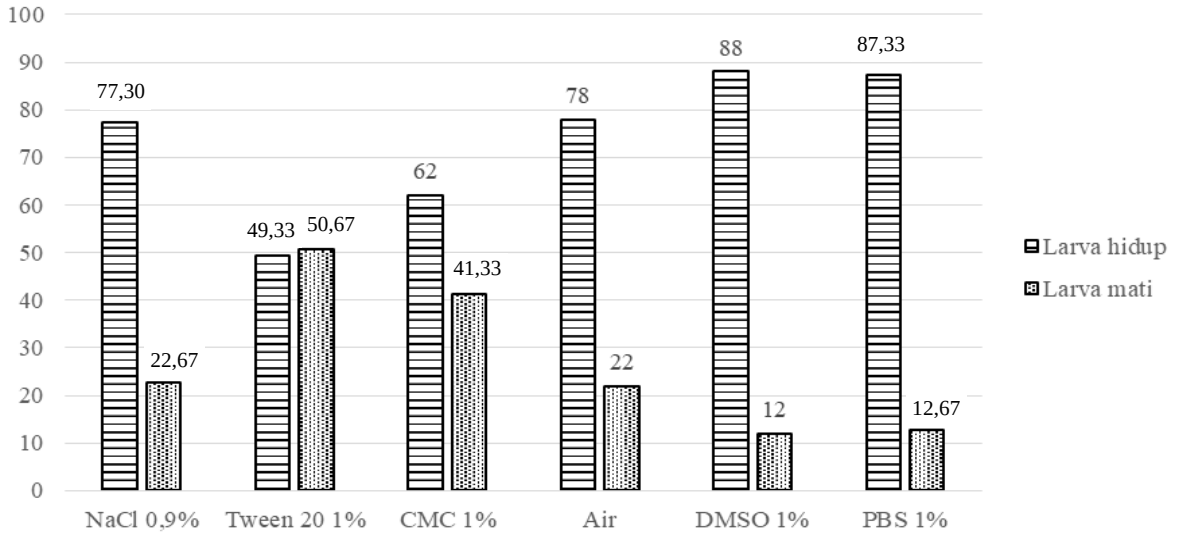
Berdasarkan grafik hasil uji daya tahan telur nematoda pada penyimpanan 24 dan 48 jam di beberapa media pelarut (Gambar 1 dan 2), terlihat bahwa telur cacing nematoda yang masih bertahan dalam keadaan baik yaitu menetas menjadi larva pada pelarut DMSO 1% (90,67%) dan pada PBS 1% (90%) dengan kontrol air akuades yang pada umumnya digunakan sebagai media penyimpan telur cacing (82,67%) pada pengamatan 24 jam. Begitu pula saat mencapai pengamatan 48 jam DMSO 1% (81,33%) dan PBS 1% (78,33%) serta kontrol akuades (82,33%). Dalam melakukan uji *in vitro* diperlukan media penyimpan sekaligus media pelarut yang dapat digunakan sebagai penyimpan telur dan pelarut bagi ekstraksi (obat tertentu) yang dapat melarutkan ekstraksi tersebut dengan baik. Pada hasil pengamatan 48 jam terhadap uji daya tahan telur nematoda dengan menggunakan akuades (air) menunjukkan hasil yang lebih baik dibandingkan dengan DMSO dan PBS. Tetapi jika kita menggunakan media untuk melarutkan ekstrak yang akan diuji terhadap telur nematoda, dapat digunakan DMSO 1% dan PBS 1%.



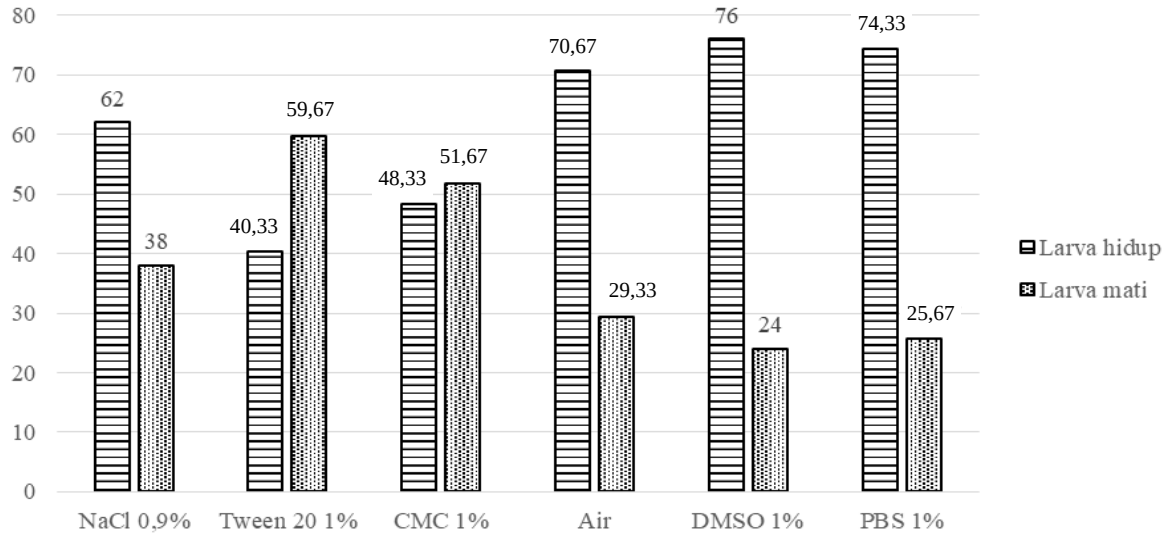
Gambar 1. Daya tahan telur nematoda pada media *in vitro* selama 24 jam (%)



Gambar 2. Daya tahan telur nematoda pada media *in vitro* selama 48 jam (%)



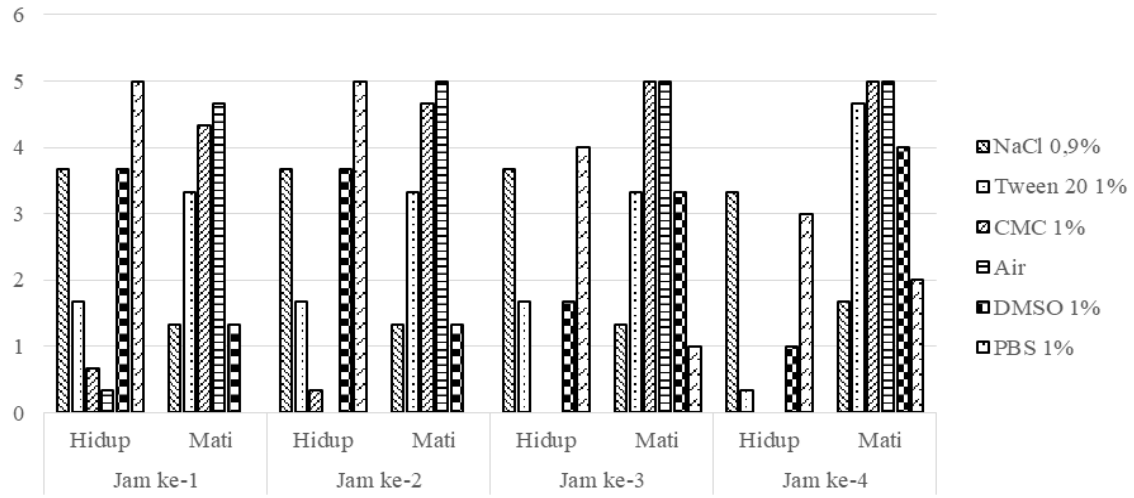
Gambar 3. Daya tahan larva nematoda pada media *in vitro* selama 24 jam (%)



Gambar 4. Daya tahan larva nematoda pada media *in vitro* selama 48 jam (%)

Hasil uji daya tahan larva nematoda terhadap media penyimpan dan media pelarut dalam penggunaanya untuk uji in vitro, menunjukkan hasil yang sama dengan uji terhadap telur nematoda yaitu pada pengamatan 24 dan 48 jam daya tahan larva nematoda yang masih aktif bergerak terdapat pada media DMSO 1% dan PBS 1%.

DMSO mulai diteliti secara ekstensif di industri kimia di Jerman (Caprotti & Caprotti 2012). DMSO telah digunakan sebagai obat, pelarut dan dapat pula sebagai *enhancer* dalam proses absorbsi obat, baik secara oral maupun transdermal, sebagai bahan obat, serta memiliki efek anti inflamasi, analgetik dan sebagai antioksidan (Damayanti & Yuwono 2013). DMSO 1% merupakan emulsifier yang baik untuk melarutkan ekstrak (obat kimia atau obat herbal) yang kemudian dicampur dengan telur/larva nematoda untuk uji *in vitro*. *Phospat Buffered Saline* (PBS) merupakan larutan fisiologis yang umum digunakan sebagai pelarut dalam penelitian biologi sel hidup (osmolaritas yang benar untuk menjaga sel-sel dalam keadaan isotonik), berbasis air garam yang mengandung natrium klorida, natrium fosfat, dan (dalam beberapa formulasi) klorida kalium dan fosfat kalium. *Buffer* tersebut yang nantinya membantu sel dalam mempertahankan konsistensi pH sehingga sel dapat bertahan hidup (Medicago 2010).



Gambar 5. Daya tahan cacing dewasa *Haemonchus contortus* pada media *in vitro*

Larutan garam fisiologi merupakan larutan isotonis yang memiliki banyak kegunaan dalam bidang medis dan laboratorium, dan umumnya memiliki kisaran konsentrasi 0,9% (b/v) memberi sifat *buffer*, mempertahankan pH dalam suhu kamar, bersifat isotonis dengan cairan sel. Media penyimpan NaCl fisiologis merupakan media yang baik untuk penyimpanan cacing nematoda *H. contortus* hingga penyimpanan pada jam ke empat. NaCl juga baik digunakan sebagai pengencer sel biologi (sperma) dalam mempertahankan kualitas spermatozoa sebab komposisi kimianya relatif isotonis dengan cairan tubuh dan plasma semen (Ridwan 2009). NaCl fisiologis merupakan salah satu bahan pengencer yang dapat melindungi sel biologi (cacing) selama proses penyimpanan karena bersifat isotonis dan dapat mempertahankan tekanan osmotik dan keseimbangan elektrolit yang sesuai.

KESIMPULAN

Dari keenam media penyimpan (DMSO 1%; PBS 1%; NaCl 0,9%; akuades; CMC 1% dan tween 20) yang biasa digunakan sebagai media uji *in vitro* terhadap telur dan larva cacing nematoda serta dan cacing dewasa *H. contortus*, memiliki kemampuan daya simpan yang berbeda terhadap masing-masing objek penelitian *in vitro*. Pada telur dan larva cacing nematoda dapat menggunakan media *in vitro* DMSO 1% dan PBS 1%, sedangkan pada cacing dewasa *H. contortus* dapat menggunakan NaCl 0,9% dan PBS 1%. PBS merupakan media yang baik jika akan dilakukan uji bersamaan menggunakan telur, larva dan cacing nematoda dewasa.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Bapak Dr. drh. Suhardono MVSc. yang telah membimbing dalam pelaksanaan penelitian ini, dan kepada bapak Soedrajat, Farlin Nepho, Suharyanta, Zaenal Kosasih dan Sukatma yang telah membantu secara teknis di laboratorium.

DAFTAR PUSTAKA

Akhira D, Yudha Fahrimal, M. Hasan. 2013. Identifikasi parasit nematoda saluran pencernaan anjing pemburu (*Canis familiaris*) di Kecamatan Lareh Sago Halaban Provinsi Sumatera Barat. J Med Vet. 7:42-45.

Al-Khayat DA, Al-Jebory ZE. 2012. The effect of *Haemonchus contortus* infection on productive performance of awassi sheep and black Iraqi Goats. J Adv Biomed Pathobiol Res 2:25-29.

Beriajaya SD, Copeman DB. (2006). *Haemonchus contortus* and *Trichostrogylus colubriformis* in pen-trails with Javanese thin tail sheep and Kacang cross Etawah goats. Vet Paras. 135:315-323.

Beriajaya. 2005. Gastrointestinal nematode infections on sheep and goats in West Java, Indonesia. JITV. 10:293-304.

Capriotti, Capriotti. 2012. Dimethyl sulfoxide. J Clin Aestet Derm. 5:24-26.

Damayanti RA, Yuwono T. 2013. Dimetilsulfoksid sebagai *enhancer* transpor transdermal teofilin sediaan gel. J Ilm Kefarm. 3:61-69.

Garg R, Kumar RR, Yadav CL, Banerjee PS. 2007. Duration of anthelmintic effect of tree formulations of ivermectin (oral, injectable and pour-on) against multiple anthelmintic-resistant *Haemonchus contortus* in sheep. Vet Res Commun. 31:749-755.

Haryuningtyas D, Beriajaya. 2002. Metode deteksi resistensi terhadap antelmintika pada domba dan kambing. Bogor (Indonesia): Balai Penelitian Veteriner.

Ikrom, Denok Asih TR, Reni Wira A, Bintang Perkasa B, Rafika Tiara N, Wasito. 2014. Studi *in vitro* ekstrak etanol daun Kamboja (*Plumeria alba*) sebagai anti *Aeromonas hydrophila*. JSV 32:105-116.

Jabbar A, Campbell AJD, Charles JA, Gasser RB. 2013. First report of anthelmintic resistance in *Haemonchus contortus* in alpacas in Australia. Parasites Vectors. 6:243.

Jackson F, Bartley D, Bartley Y, Kenyon F. 2009. Worm control in sheep in the future. Small Rumin Res. 86:40-45.

Kumara WAVS, Karunarathne GMCR, Gamika A, Prathapsinghe GA. 2010. Evaluation of most suitable dan effective anthelminthics for internal parasites of the goat. Wayamba J Anim Sci. 30-33.

Kurniawan IY, Basuki F, Susilowati T. 2013. Penambahan air kelapa dan gliserol pada penyimpanan sperma terhadap motilitas dan fertilitas spermatozoa ikan mas (*Cyprinus carpio* L). J Aquac Manag Technol. 2:51-65.

Manurung J, Beriajaya. 2004. Uji *in vitro* ekstrak daun dan kulit buah nanas (*Ananas comosus*) terhadap daya tetas telur dan mortalitas cacing *Haemanchus contortus*. Bogor (Indonesia): Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan.

Medicago AB. 2010. Phospate buffered saline spesification sheet.

Menteri Pertanian RI. 2013. Surat Keputusan Menteri Pertanian No. 4026/Kpts./OT.140/3/2013. Jakarta (Indonesia): Kementerian Pertanian.

Nabukenya, Rubaire-Akiiki C, Olila D, Muhangi D, Höglund J. 2014. Anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes in goats and evaluation of FAMACHA diagnostic marker in Uganda. Vet Parasitol. 205:666–675.

Natadisastra D, Agoes R. 2009. Parasitologi kedokteran ditinjau dari organ tubuh yang diserang. Jakarta (Indonesia): EGC Penerbit Buku Kedokteran.

Papadopoulos E, Gallidis E, Ptochos S. 2012. Anthelmintic resistance in sheep in Europe: A selected review. Vet Parasitol. 189:85-88.

Papadopoulos E. 2008. Anthelmintic resistancein sheep nematodes. Small Rumin Res. 76:99-103.

Ram H, Rasool TJ, Sharma AK, Meena HR, Singh SK. 2007. Comparative effecacy different anthelmintic against fenbendazole resistant nematodes of Pashmina Goat. Vet Res Commun. 31:719-723.

Siregar TN, Siregar IK, Armansyah T, Syafruddin, Sayuti A, Hamdani. 2013. Tampilan reproduksi kambing lokal hasil induksi superovulasi dengan ekstrak pituitary. J Vet. 14:75-79.

Sugama N, Suyasa. N. 2012. Keragaan infeksi parasit gastrointestinal pada sapi bali model kandang Simantri. Denpasar (Indonesia): Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Bali.

Ridwan. 2009. Pengaruh pengencer semen terhadap abnormalitas dan daya tahan hidup spermatozoa kambing lokal pada penyimpanan suhu 5ºC. J Agroland. 16:187-192.