



DEKAN FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS GADJAH MADA

KEPUTUSAN DEKAN FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS GADJAH MADA

NOMOR : 2737 /UN1/FKH/KPT/SDM/2022

TENTANG

PENGANGKATAN PROMOTOR DAN KO-PROMOTOR  
BAGI SAUDARA TRI ANANDA ERWIN NUGROHO (21/484790/SKH/00131)  
PROGRAM STUDI DOKTOR SAIN VETERINER  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS GADJAH MADA

DEKAN FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS GADJAH MADA,

Menimbang : a. bahwa untuk kelancaran pelaksanaan pembimbingan disertasi/penyusunan disertasi bagi Saudara Tri Ananda Erwin Nugroho (21/484790/SKH/00131) pada Program Studi Doktor Sain Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, dipandang perlu mengangkat Promotor dan Ko-Promotor;

b. bahwa sebagaimana tersebut pada huruf a diatas, perlu menetapkan Keputusan Dekan;

Mengingat : 1. Undang-Undang Nomor 12 Tahun 2012 tentang Pendidikan Tinggi (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2012 Nomor 158, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 5336);

2. Peraturan Pemerintah Nomor 67 Tahun 2013 tentang Statuta Universitas Gadjah Mada (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2013 Nomor 165, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 5454);

3. Peraturan Pemerintah Nomor 4 Tahun 2014 tentang Penyelenggaraan Pendidikan Tinggi dan Pengelolaan Perguruan Tinggi (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2014 Nomor 16, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 5500);

4. Peraturan Pemerintah Nomor 26 Tahun 2015 tentang Bentuk dan Mekanisme Pendanaan Perguruan Tinggi Negeri Badan Hukum (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2015 Nomor 110, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 5699);

5. Peraturan Majelis Wali Amanat Universitas Gadjah Mada Nomor 4/SK/MWA/2014 tentang Organisasi dan Tata Kelola (*Governance*) Universitas Gadjah Mada sebagaimana telah diubah terakhir dengan Peraturan Majelis Wali Amanat Universitas Gadjah Mada Nomor 1 Tahun 2018 tentang Perubahan Keempat Atas Peraturan Majelis Wali Amanat Nomor 4/SK/MWA/2014 tentang Organisasi dan Tata Kelola (*Governance*) Universitas Gadjah Mada;

6. Keputusan Majelis Wali Amanat Universitas Gadjah Mada Nomor 2/SK/MWA/2015 tentang Struktur Organisasi Universitas Gadjah Mada;



7. Keputusan Rektor Universitas Gadjah Mada Nomor 6203/UN1.P/KPT/HUKOR/2021 tentang Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada Periode 2021-2026;

**MEMUTUSKAN :**

- Menetapkan :** KEPUTUSAN DEKAN TENTANG PENGANGKATAN PROMOTOR DAN KO-PROMOTOR BAGI SAUDARA TRI ANANDA ERWIN NUGROHO (21/484790/SKH/00131) PROGRAM STUDI DOKTOR SAIN VETERINER FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS GADJAH MADA.
- KESATU :** Mangangkat Promotor dan Ko-Promotor bagi Saudara Tri Ananda Erwin Nugroho (21/484790/SKH/00131) dengan susunan sebagai berikut:
1. Prof. Dr. drh. Ida Tjahajati, M.P.  
sebagai Promotor
  2. Prof. Dr. drh. Aris Haryanto, M.Si.  
sebagai Ko-Promotor I
  3. Dr. Nurdin, S.P., M.Si.  
sebagai Ko-Promotor II
- KEDUA :** Promotor dan Ko-Promotor bertugas membimbing Penelitian dan Penulisan Disertasi mahasiswa Program Studi Doktor Sain Veteriner sampai menyelesaikan studinya.
- KETIGA :** Biaya yang timbul akibat diterbitkannya keputusan ini dibebankan kepada RKAT Program Studi Doktor Sain Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada.
- KEEMPAT :** Keputusan ini berlaku mulai tanggal ditetapkan.

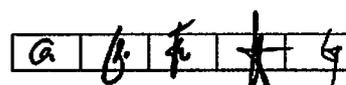
Ditetapkan di Yogyakarta  
pada tanggal 16 Agustus 2022

Dekan,

Prof. drh. Teguh Budipitojo, M.P., Ph.D.

**Tembusan :**

1. Pengelola Program Studi Doktor Sain Veteriner
2. Yang bersangkutan  
Di lingkungan FKH UGM





**KAJIAN MOLEKULER PROTOZOA DARAH PADA SAPI  
DI GORONTALO**



oleh

**Tri Ananda Erwin Nugroho**

**21/484790/SKH/00131**

**PROGRAM STUDI DOKTOR SAINS VETERINER  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS GADJAH MADA  
YOGYAKARTA  
2023**

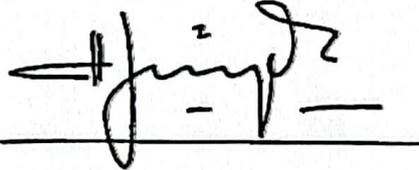
**HALAMAN PENGESAHAN PROPOSAL DISERTASI**  
**KAJIAN MOLEKULER PROTOZOA DARAH PADA SAPI**  
**DI GORONTALO**

Yang dipersiapkan dan disusun oleh :

Tri Ananda Erwin Nugroho 21/484790/SKH/00131

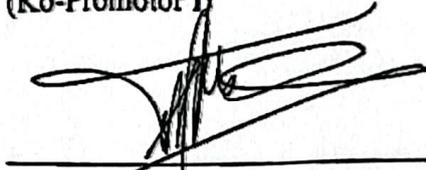
telah disetujui oleh :

Prof. Dr. drh. Ida Tjahajati, M.P.  
(Promotor)



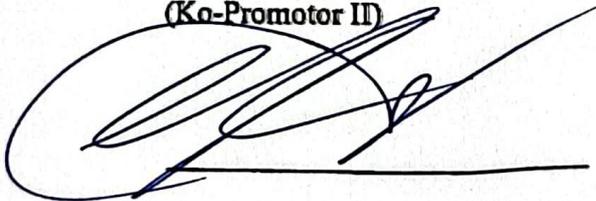
tanggal : 13 Februari 2023

Prof. Dr. drh. Aris Haryanto, M.Si  
(Ko-Promotor I)



tanggal : 14 Februari 2023

Dr. Nurdin, SP., M.Si  
(Ko-Promotor II)



tanggal : 15 Februari 2023

Ketua Program Studi Doktor Sain Veteriner

Dr. drh. Tri Untari, M.Si

## **PRAKATA**

Syukur Alhamdulillah penulis panjatkan kehadiran Allah SWT yang telah memberi karunia, akal, kesehatan, rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan proposal penelitian disertasi dengan judul “Kajian Molekuler Protozoa Darah Pada Sapi di Gorontalo” sesuai dengan waktu yang ditargetkan. Shalawat dan salam penulis sampaikan kepada Nabi Muhammad SAW yang telah membawa manusia ke alam yang lebih berilmu pengetahuan.

Telah selesainya penulisan proposal disertasi ini berkat bimbingan, bantuan, diskusi dan dukungan berbagai pihak. Dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terimakasih dan penghargaan setinggi-tingginya kepada yang terhormat :

1. Prof. Dr. drh. Ida Tjahajati, MP. sebagai promotor utama, yang telah mendorong, memberikan semangat, arahan, pertimbangan, bantuan dan bimbingan dalam penyusunan proposal ini.
2. Prof. Dr. drh. Aris Haryanto, M.Si sebagai ko-promotor I yang telah membimbing dan memfasilitasi untuk memperoleh pendanaan dalam penelitian Disertasi Doktor.
3. Dr. Nurdin, SP., M.Si sebagai ko-promotor II, yang telah banyak mengevaluasi, mengarahkan, membantu dalam penulisan proposal disertasi ini.
4. Dr. drh. Guntari Titik Mulyani, MP, Dr. drh. Dwi Priyowidodo, MP dan Dr. Muhammad Mukhtar, S.Pt, M.Agr.Sc sebagai tim penguji.

5. Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
6. Program Studi Doktor Sain Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
7. Dekan Fakultas Pertanian, Universitas Negeri Gorontalo
8. Ketua Jurusan Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Negeri Gorontalo
9. Direktorat Jendral Perguruan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional atas penyediaan dana melalui Penelitian Disertasi Doktor.
10. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan proposal ini.

Akhir kata, penulis mengharapkan evaluasi, masukan dan kritikan demi perbaikan penelitian dan disertasi yang dihasilkan.

Yogyakarta, 10 Februari 2023

Penulis,

## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL PENELITIAN .....	i
HALAMAN PENGESAHAN .....	ii
PRAKATA .....	iii
DAFTAR ISI .....	iv
DAFTAR GAMBAR .....	v
INTISARI .....	vi
I. PENGANTAR .....	1
1.1. Latar Belakang .....	1
1.2. Tujuan Penelitian .....	6
II. TINJAUAN PUSTAKA .....	7
2.1. Kajian Pustaka .....	7
a. Penyakit Parasit Darah Pada Sapi .....	7
b. Babesiosis, Theileriosis, Anaplasmosis .....	7
c. Polymerase Chain Reaction (PCR) .....	10
2.2. Landasan Teori .....	12
BAB III. METODE PENELITIAN .....	14
3.1. Populasi dan Sampel .....	14
3.2. Variabel Penelitian .....	16
a. Penelitian 1 : Pemeriksaan Ulas Darah Tipis .....	16
b. Penelitian 2 : Pemeriksaan Derajat Parasitemia .....	17
c. Penelitian 3 : Pemeriksaan Menggunakan Single PCR dan Multiplek PCR .....	18
1. Isolasi DNA Protozoa Darah .....	18
2. Desain Primer <i>Babesia sp.</i> , <i>Theileria sp.</i> , dan <i>Anaplasma sp.</i> .....	20
3. Diagnosa <i>Babesia sp.</i> , <i>Theileria sp.</i> , dan <i>Anaplasma sp.</i> Menggunakan Single PCR .....	24
4. Diagnosa <i>Babesia sp.</i> , <i>Theileria sp.</i> , dan <i>Anaplasma sp.</i> Menggunakan Multiplek PCR .....	24
5. Amplifikasi Hasil PCR .....	25
d. Penelitian 4 : Sequencing .....	25
DAFTAR PUSTAKA .....	26

## DAFTAR TABEL

Halaman

<b>Tabel 1.</b>	Beberapa kandidat gene protozoa darah yang digunakan dalam single dan multiplek .....	22
-----------------	---	----

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
<b>Gambar 1.</b> Siklus hidup dari <i>Babesia sp.</i> , <i>Theileria sp.</i> , dan <i>Anaplasma sp.</i> .....	8
<b>Gambar 2.</b> Peta lokasi pengambilan sampel darah sapi di 19 Kecamatan, Kabupaten Gorontalo, Provinsi Gorontalo .....	14
<b>Gambar 3.</b> Bagan alur penelitian kajian molekuler protozoa darah pada sapi di Gorontalo .....	15

## INTISARI

Tujuan penelitian yang dilakukan yaitu : 1) Menganalisis kesesuaian profil darah dan gambaran klinis patognomonis sapi yang mengalami parasitemia karena *Babesiosis*, *Theileriosis* dan *Anaplasmosis*, 2) Mendiagnosa secara molekuler *Babesia*, *Theileria* dan *Anaplasma* pada sapi di Gorontalo menggunakan *single PCR* dan *Multiplek PCR* dan 3) Mengkarakterisasi secara molekuler *Babesia*, *Theileria* dan *Anaplasma* pada sapi di Gorontalo untuk menilai karakteristik molekuler dengan protozoa darah pada sapi di daerah lain. Untuk mencapai tujuan tersebut maka metode penelitian yang digunakan yaitu meliputi 4 tahapan penelitian yaitu tahap ke-1 pemeriksaan ulas darah tipis, tahap ke 2 pemeriksaan derajat parasitemia, tahap ke-3 pemeriksaan menggunakan *single PCR* dan *multiplek PCR*, yang sebelumnya didahului dengan melakukan : 1) isolasi DNA protozoa darah, dan 2) desain primer. Penelitian terakhir atau tahap ke-4 melakukan *sequencing Babesia sp.*, *Theileria sp.*, dan *Anaplasma sp.* pada sapi isolat Gorontalo.

**Kata kunci** : parasite darah, babesia, theileria, anaplasma, sapi, PCR, gorontalo,

## 1. PENGANTAR

### 1.1 Latar Belakang

Protozoa darah seperti *Babesia*, *Theileria*, *Trypanosoma* dan *Anaplasma* merupakan agen penyakit yang berpredileksi dalam sel darah dan hidup sebagai parasit dalam tubuh host seperti sapi, kerbau dan kambing. Pada umumnya, agen penyakit tersebut akan mengakibatkan sel darah merah (*erythrocyt*) maupun sel darah putih (*leukosit*) mengalami kerusakan. Kerusakan pada sel darah merah akan berdampak secara klinis pada hewan, dimana hewan tersebut akan mengalami kekurangan sel darah merah (anemia). Komponen sel darah merah sangat penting peranannya dalam membawa nutrisi, oksigen, hormon dan zat lain yang diperlukan tubuh untuk melakukan metabolisme. Pada saat kondisi anemia, maka metabolisme nutrisi makanan dan hormon akan terganggu sehingga hewan yang terpapar protozoa darah tersebut akan mengalami kesulitan untuk tumbuh berkembang dan bereproduksi secara baik.

Sapi yang mengalami anemia pada saat diukur jumlah sel darah merahnya menggunakan alat *hematology analyzer* akan mengalami penurunan jumlahnya. Roland et al. (2014) menyatakan bahwa kisaran normal sel darah merah sapi bali berkisar  $4,9-10 \times 10^6 \mu\text{l}$ . Dalam pemeriksaan secara klinis sapi yang mengalami anemia bagian mukosa kelopak mata bagian dalam dan mukosa mulut akan terlihat putih pucat yang berbeda dengan sapi normal, mukosa akan terlihat kemerahan (Aziz et al., 2019).

Beberapa referensi menginformasikan bahwa agen penyakit tersebut akan mengakibatkan penyakit yang mengakibatkan peternak sapi menderita kerugian. *Babesiosis* merupakan penyakit oleh protozoa darah yang menimbulkan dampak kerugian ekonomi yang besar pada usaha ternak sapi dan menjadi salah satu penyakit parasit darah penting dibanding dengan penyakit parasit lainnya. *Babesiosis* menyebabkan *hemolitik anemia*, anoreksia, penyakit kuning, demam, gejala syaraf pusat, dan hemoglobinuria. Beberapa spesies sangat pathogen sehingga menyebabkan kematian akibat infeksi (Anbu et al., 2020).

*Anaplasmosis* yang disebabkan oleh *Anaplasma Marginale* sangat patogen terutama pada ternak muda sampai dengan umur dua tahun. Ternak penderita akan mengalami anemia dan kekuningan. Gejala klinis pada ruminansia berupa anemia, demam, kehilangan berat badan, kekuningan (jaundice), hemoglobinuria, penurunan produksi susu, abortus, dan akhirnya mengalami kematian. Whittier et al. (2019) menyatakan bahwa *Anaplasmosis* pada sapi potong dan sapi perah ditandai adanya demam, anemia, dan kekuningan.

*Theileriosis* menyebabkan kerugian ternak cukup besar, terutama peternakan di daerah sub tropis dan tropis, akibat penurunan berat badan, terlambatnya proses pencapaian target berat badan, penurunan produksi dalam satu generasi/ keturunan, penurunan kualitas daging, pengafkiran karkas atau organ, penurunan produksi susu dan kanker atau kerusakan kulit (Tretina et al., 2015). *Theileriosis* juga mengakibatkan anemia hemolitik, hipoksia dan vaskulitis (Fartashvand et al., 2013).

Penularan ketiga agen parasit tersebut diketahui dapat terjadi melalui perantara vektor mekanik maupun vektor biologi. Vektor mekanik misalnya melalui alat suntik, alat bedah dan vektor biologi bisa melalui ektoparasit seperti caplak. Keberadaan caplak sebagai vektor sangat berperan penting dalam penularan penyakit tersebut. Hasil penelitian tentang ragam ektoparasit pada sapi di Kabupaten Gorontalo Utara yang dilakukan oleh Solang (2015), telah menemukan adanya infestasi ektoparasit pada tubuh sapi disana. Dari hasil kegiatan pengabdian yang dilakukan oleh penulis juga telah menemukan dari 58 sapi yang diberikan pelayanan kesehatan hewan, 35 ekor sapi diantara terdapat infestasi ektoparasit baik di dada, telinga, gelambir maupun bagian tubuh lainnya.

Patut diduga adanya infestasi caplak tersebut telah membawa dan menularkan agen parasit darah. Pada tahun 2015 dan 2016, sebagai tindak lanjut dari hasil penelitian dan pengabdian, Sayuti dan Nugroho melakukan penelitian tentang situasi penyakit parasiter pada sapi di Gorontalo dan salah satu hasilnya telah menemukan adanya *Babesia sp.*, *Theileria sp.*, dan *Anaplasma sp.*, pada sapi di Gorontalo. Keberadaan protozoa darah pada sapi di Gorontalo tersebut, secara tidak langsung berpotensi menjadi salah satu faktor penghambat dalam pengembangan peternakan sapi di Gorontalo.

Upaya pengendalian penyakit oleh agen parasit darah pada sapi di Gorontalo perlu dilakukan. Hal ini penting, karena ternak sapi merupakan salah satu hewan ternak yang menjadi prioritas unggulan pemerintah Provinsi Gorontalo untuk dikembangkan dan diharapkan dapat meningkatkan kesejahteraan masyarakat Gorontalo.

Apabila ditinjau dari program pelayanan kesehatan hewan yang dilakukan oleh pemerintah daerah melalui dinas terkait, belum terlihat penanganan yang khusus di programkan dalam rangka melakukan eliminasi agen protozoa darah. Hal tersebut dapat terjadi karena tidak adanya data diagnosa laboratorium yang akurat terkait adanya penyakit protozoa tersebut pada sapi.

Program *surveilans* secara berkelanjutan merupakan salah satu upaya yang baik dalam upaya pencegahan secara dini munculnya penyakit parasit darah. *Surveilans* penyakit parasit darah salah satunya bisa dilakukan dengan melakukan pemeriksaan ulas darah tipis dengan mengamatinya langsung menggunakan alat bantu mikroskop. Pemeriksaan ulas darah mengalami kekurangan apabila parasitemia yang terjadi belum parah, sehingga hewan yang baru terpapar protozoa pada saat diperiksa akan diperoleh hasil negatif dan lolos dari program eliminasi. Perlu dilakukan upaya diagnosa yang memiliki sensitifitas dan spesifitas yang tinggi untuk mendeteksi adanya agen protozoa darah tersebut.

Secara molekular, diagnosa parasit darah dapat dilakukan dengan menggunakan metode pemeriksaan berbasis DNA parasit yaitu *Polimerase Chain Reaction* (PCR) dengan berbagai macam penanda molekular yang spesifik. Metode diagnosa ini dapat mengatasi kekurangan dari metode pemeriksaan ulas darah tipis. Sapi yang baru terinfeksi parasit darah, akan memerlukan waktu beberapa hari untuk mencapai parasitemia yang parah, sehingga sapi yang baru terinfeksi pada saat dilakukan pemeriksaan darah menggunakan ulas darah tipis sulit terdeteksi. Pengamatan *Anaplasma sp.*, pada sediaan ulas darah juga dapat

dikelirukan dengan *artifact* di preparat ulas darah sehingga berpotensi menghasilkan diagnosa negatif palsu.

Munculnya penyakit dapat dipengaruhi oleh tiga faktor yaitu host, agen dan lingkungan. Adanya perbedaan lingkungan secara bertahap akan menyebabkan host dan agen mengalami adaptasi. Adaptasi yang terjadi bisa mengakibatkan adanya perbedaan karakter di host dan agen antara daerah yang satu dengan daerah lainnya. Demikian halnya dengan kondisi sapi di Gorontalo, perbedaan lingkungan dan cara pemeliharaan ternak yang rata-rata masih bersifat ekstensif akan mengakibatkan adanya adaptasi dari sapi dan penyakit parasiter yang menyerangnya. Permasalahan yang sering muncul dalam pemeliharaan ternak sapi dilapangan yaitu sulit membedakan secara klinis seekor sapi yang menderita *Babesiosis*, *Theileriosis* maupun *Anaplasmosis*. Sapi yang mengalami kekurusan dan secara kasat mata terlihat bulu kusam, anemia dan terdapat infestasi ektoparasit belum bisa diketahui status kondisinya secara pasti. Oleh sebab itu, penelitian ini berusaha mengetahui beberapa permasalahan, yaitu:

- a. Bagaimana keseuaian profil darah dan gambaran klinis patognomonis sapi yang mengalami parasitemia karena *Babesiosis*, *Theileriosis* dan *Anaplasmosis* ?
- b. Bagaimana keberadaan *Babesia*, *Theileria* dan *Anaplasma* yang dikonfirmasi menggunakan *single PCR* dan *Multiplek PCR*?
- c. Bagaimana karakteristik molekuler dari *Babesia*, *Theileria* dan *Anaplasma* pada sapi di Gorontalo ?

## 1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian yang dilakukan yaitu :

- a. Menganalisis kesesuaian profil darah dan gambaran kinis patognomonis sapi yang mengalami parasitemia karena *Babesiosis*, *Theileriosis* dan *Anaplasmosis*.
- b. Mendiagnosa secara molekuler *Babesia*, *Theileria* dan *Anaplasma* pada sapi di Gorontalo menggunakan *single* PCR dan *Multiplek* PCR.
- c. Mengkarakterisasi secara molekuler *Babesia*, *Theileria* dan *Anaplasma* pada sapi di Gorontalo untuk menilai karakteristik molekuler dengan protozoa darah pada sapi di daerah lain.

## 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Kajian Pustaka

#### a. Penyakit Parasit Darah Pada Sapi

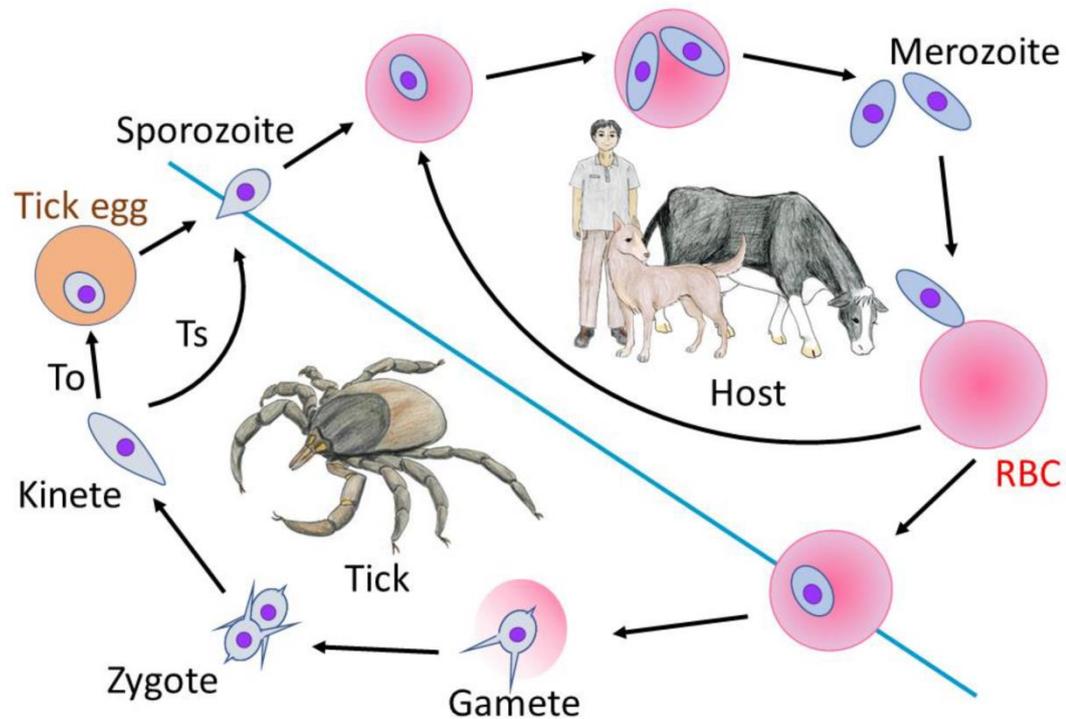
Penyakit parasit darah merupakan masalah kesehatan karena menimbulkan kerugian ekonomi pada ternak sapi. Kerugian tersebut berupa pertumbuhan yang terhambat, penurunan berat badan, penurunan daya kerja, penurunan daya reproduksi, penurunan produksi susu dan abortus. Apabila mengalami infeksi berat dan tidak dilakukan pengobatan, dapat menyebabkan kematian, terutama pada hewan muda. Beberapa penyakit parasit darah tersebut diantaranya adalah *Babesiosis*, *Theileriosis* dan *Anaplasmosis*.

#### b. *Babesiosis*, *Theileriosis* dan *Anaplasmosis*

*Babesiosis*, *Theileriosis* dan *Anaplasmosis* adalah penyakit menular pada sapi yang disebabkan oleh protozoa darah yang merusak sel darah merah dan sel darah putih sapi. Ketiga penyakit tersebut merupakan penyakit parasit penting di daerah tropis seperti Indonesia dan sering menyerang sapi-sapi yang dipelihara secara ekstensif seperti digembalakan lapangan, perkebunan padang rumput. Cara penularannya dapat melalui perantara gigitan caplak, alat suntik dan alat bedah.

Cara penularan ketiga penyakit ini memiliki kesamaan yaitu melalui hewan perantara atau vektor yang hidup bebas di tubuh sapi seperti caplak dan lalat. Infestasi caplak dan ektoparasit lainnya sangat mudah ditemui pada sapi-sapi yang dipelihara dengan cara melepasliarkan di padang penggembalaan, lapangan

perkebunan kelapa dan persawahan. Vektor tersebut dapat dengan mudah menularkan penyakit karena siklus hidup dari ketiga protozoa darah tersebut terdapat dalam tubuh vektor. Berdasarkan tahap reproduksinya, perkembangan protozoa darah ini dapat dibagi menjadi 3 kelompok, yaitu 1) *Gamogoni* (formasi dan fusi gamet di dalam usus caplak); 2) *Sporogoni* (reproduksi aseksual dalam kelenjar ludah); dan *Merogoni* (reproduksi aseksual pada inang vertebrata) seperti yang tersaji pada **Gambar 1**.



**Gambar 1.** Siklus hidup dari *Babesia sp.*, *Theileria sp.*, dan *Anaplasma sp* (Hakimi et al., 2021)

Siklus hidup dari ketiga protozoa darah ini hamper serupa, yaitu dimulai dari sporozoit yang berada di dalam kelenjar ludah vektor (caplak) akan berpenetrasi ke dalam sel darah merah host, selanjutnya protozoa ini akan berkembang di

dalam sel darah merah dan berubah menjadi bentuk tropozoit, yang kemudian berdiferensiasi dan bertunas dua atau empat membentuk merozoit. Bentuk merozoit yang telah tumbuh sempurna akan merusak sel darah merah dan pindah ke sel darah merah yang baru. Siklus ini terus berlanjut sampai tingkat parasitemianya tinggi dan menyebabkan kematian host. Siklus berikutnya terjadi di dalam tubuh vektor dimana sel darah host yang mengandung merozoit terhisap masuk kedalam tubuh vektor. Dalam tubuh vektor terjadi perubahan menjadi zygote, kinete dan terakhir menjadi sporozoit lagi yang siap menginfeksi host lain melalui perantara gigitan vektor.

Penelitian tentang protozoa darah tersebut pada sapi di Gorontalo pernah dilaporkan oleh Sayuti dan Nugroho (2018) pada tahun 2015. Hasil penelitian menemukan adanya *Babesiosis*, *Theileriosis* dan *Anaplasmosis* dengan prevalensi yang cukup tinggi. Pakaya (2016) melakukan penelitian tentang investigasi *Babesiosis* pada sapi di Kabupaten Gorontalo Utara dan hasil yang diperoleh menemukan adanya kasus penyakit tersebut dengan proporsi positif sebesar 73%. Nugroho et al. (2022) juga melaporkan adanya kasus *Theileriosis* pada sapi di Kabupaten Pohuwato dengan proporsi positif sebesar 31 %. Beberapa penelitian lain tentang penyakit protozoa darah di Indonesia juga pernah dilaporkan oleh Anggraini et al. (2019) yang melaporkan adanya kasus *Theileriosis* sebesar 0,5%, dan *Anaplasmosis* sebesar 11%.

Dari hasil beberapa laporan penelitian diatas, metode diagnosa penyakit yang digunakan yaitu melalui pemeriksaan ulas darah tipis yang selanjutnya diamati

menggunakan mikroskop pembesaran 1000 kali. Seiring kemajuan teknologi, diagnosa parasite darah berbasis DNA juga telah banyak dilakukan, contohnya seperti *Loop Mediated Isothermal Amplification* (LAMP) atau *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

### c. **Polymerase Chain Reaction (PCR)**

Dalam buku Teori dan Aplikasi *Polymerase Chain Reaction* (PCR) oleh Yuwono (2006), menjelaskan bahwa reaksi berantai polimerase (PCR) adalah suatu metode enzimatik untuk melipatgandakan secara eksponensial suatu sekuen nukleotida tertentu dengan cara *in vitro*. Metode PCR sangat sensitive. Sensitivitas tersebut membuatnya dapat digunakan untuk melipatgandakan satu molekul DNA. Kelebihan lain dari metode PCR adalah bahwa reaksi ini dapat dilakukan dengan menggunakan komponen dalam jumlah sangat sedikit, misalnya DNA cetakan yang diperlukan hanya sekitar 5 µg, oligonukleotida yang diperlukan hanya sekitar 1 mM dan reaksi ini biasa dilakukan dalam volume 50-100 µl. DNA cetakan yang digunakan juga tidak perlu dimurnikan terlebih dahulu sehingga metode PCR dapat digunakan untuk melipatgandakan suatu sekuen DNA dalam genom bakteri hanya dengan mencampurkan kultur bakteri di dalam tabung PCR.

Konsep asli teknologi PCR mensyaratkan bahwa bagian tertentu sekuen DNA yang akan dilipatgandakan harus diketahui terlebih dahulu sebelum proses

pelipatgandaan tersebut dapat dilakukan. Sekuen yang diketahui tersebut penting untuk menyediakan primer, yaitu suatu sekuen dalam reaksi berantai polimerase.

Prinsip dasar PCR memerlukan empat komponen utama pada prosesnya, yaitu 1) DNA cetakan, yaitu fragmen DNA yang akan dilipatgandakan, 2) Oligonukleotida primer, yaitu suatu sekuen oligonukleotida pendek (15-25 basa nukleotida) yang digunakan untuk mengawalisintesis rantai DNA, 3) deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP), terdiri atas dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dan 4) enzim DNA polimerase, yaitu enzim yang melakukan katalisis reaksi sintesis rantai DNA. Komponen lain yang juga penting adalah senyawa buffer.

Reaksi pelipatgandaan suatu fragmen DNA dimulai dengan melakukan denaturasi DNA template (cetakan) sehingga rantai DNA yang berantai ganda (*double stranded*) akan terpisah menjadi rantai tunggal (*single stranded*). Denaturasi DNA dilakukan dengan menggunakan panas ( $95^{\circ}\text{C}$ ) selama 1-2 menit, kemudian suhu diturunkan menjadi  $55^{\circ}\text{C}$  sehingga *primer* akan “menempel” (*annealing*) pada cetakan yang telah terpisah menjadi rantai tunggal. *Primer* akan terbentuk jembatan hidrogen dengan cetakan pada daerah sekuen yang komplementer dengan sekuen primer. Suhu  $55^{\circ}\text{C}$  yang digunakan untuk penempelan primer pada dasarnya merupakan kompromi. Amplifikasi akan lebih efisien jika dilakukan pada suhu yang lebih rendah ( $37^{\circ}\text{C}$ ), tetapi biasanya akan terjadi *mispriming* yaitu penempelan primer pada tempat yang salah. Pada suhu yang lebih tinggi ( $55^{\circ}\text{C}$ ), spesifitas reaksi amplifikasi akan meningkat, tetapi secara keseluruhan efisiensinya akan menurun. Seiring kemajuan teknologi PCR,

sekarang telah banyak berkembang metode dalam penggunaan PCR. Pengembangan itu salah satunya dengan melibatkan beberapa primer untuk diamplifikasi atau sering disebut dengan multiplex PCR. Multiplex PCR berisi berbagai macam set primer dengan campuran reagen PCR tunggal untuk memproduksi ampikon dari berbagai ukuran spesifik terhadap sekuens DNA yang berbeda dalam satu tube PSC secara bersamaan.

Beberapa hasil penelitian terkait penggunaan single PCR dan atau multiplex PCR dalam mendiagnosa *Babesiosis*, *Theileriosis* dan *Anaplasmosis* diantaranya dilakukan oleh Akbari et al. (2018) yang melakukan penelitian tentang deteksi rarasit darah pada sapi perah berdasarkan analisis PCR *Duplex*. Berikutnya Mappatunru (2021) melakukan deteksi *Theileria orientalis* dan *Anaplasma marginale* pada sapi perah di Pangalengan, Kabupaten Bandung dengan metode konvensional dan PCR *Duplex*. Penelitian tentang ketiga parasit darah menggunakan PCR dan multiplex PCR diluar negeri juga telah dilakukan oleh beberapa peneliti, diantaranya oleh Bilgic et al. (2010b); Bilgic et al. (2013a); Birkenheuer et al. (2003); D'Oliveira et al. (1995); Kakati et al. (2015); Kolte et al (2017); Kumar et al (2021); Peng et al (2020); dan Zhou et al (2016).

## **2.2 Landasan Teori**

Lama waktu yang diperlukan oleh protozoa darah dari mulai menginfeksi sampai terlihat diperedaran darah sekitar 7-10 hari. Oleh karena adanya periode waktu untuk mencapai parasitemia, sehingga pada periode hari ke-1 sampai

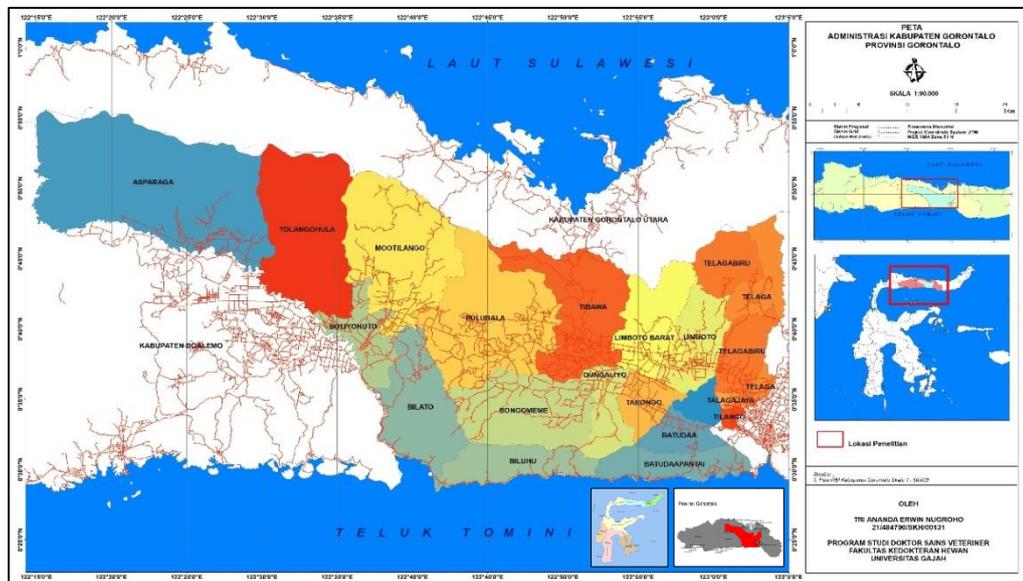
dengan hari ke-10, pada saat dilakukan pemeriksaan ulas darah tipis dan selanjutnya diamati menggunakan mikroskop, akan mengakibatkan hasil negatif. Selain hal tersebut, gejala klinis pada periode tersebut belum tampak. Lain hal apabila periode infeksi sudah berhari-hari atau bahkan lebih dan kondisi parasitemia sudah parah, kemungkinan gejala klinis akan muncul namun kondisi sapi tentunya sudah parah. Menghindari kondisi penyakit menjadi lebih parah dan menyebar, maka perlu upaya preventif dengan melakukan metode pemeriksaan yang memiliki sensitifitas dan spesifitas tinggi serta efisien dengan melakukan diagnosa menggunakan diagnosa molekuler yaitu multiplek PCR.

Adanya perbedaan lingkungan secara bertahap akan menyebabkan host dan agen mengalami adaptasi. Adaptasi yang terjadi bisa mengakibatkan adanya perbedaan karakter di host dan agen antara daerah yang satu dengan daerah lainnya. Demikian halnya dengan kondisi sapi di Gorontalo, perbedaan lingkungan dan cara pemeliharaan ternak yang rata-rata masih bersifat ekstensif akan mengakibatkan adanya adaptasi dari sapi dan penyakit parasiter yang menyerangnya. Berdasarkan hal tersebut maka akan dilakukan analisis sequen dari *Babesia sp.*, *Theileria sp.*, dan *Anaplasma sp.*, isolat Gorontalo.

### 3. METODE PENELITIAN

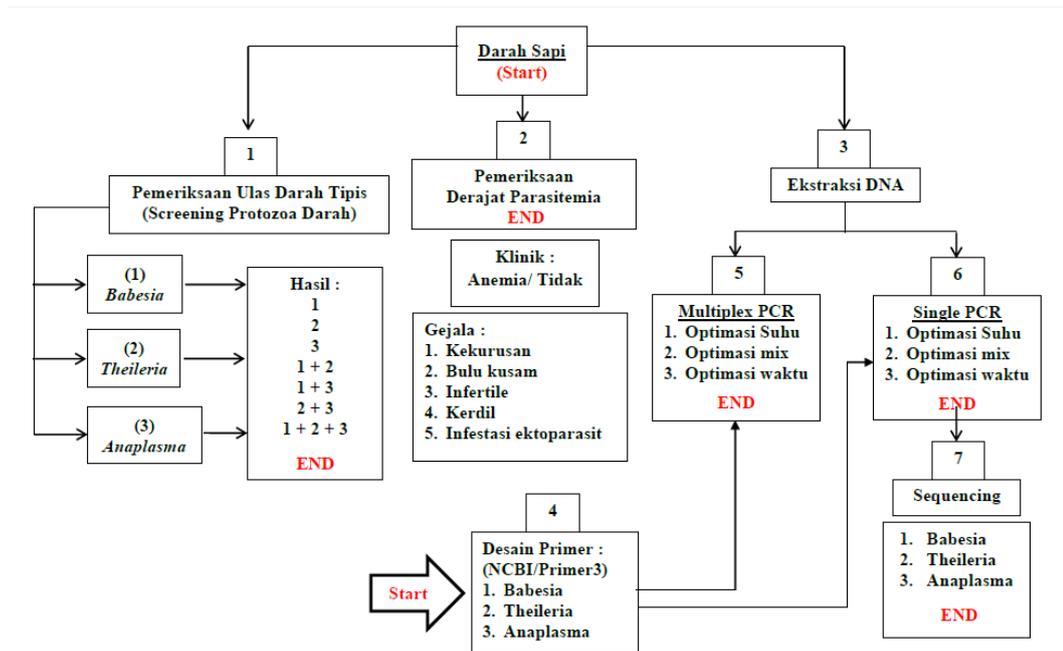
#### 3.1 Populasi dan Sampel

Berdasarkan data Badan Pusat Statistik Kabupaten Gorontalo tahun 2022, populasi ternak sapi di Kabupaten Gorontalo sebanyak 99.728 ekor yang tersebar di 19 Kecamatan (**Gambar 2**). Sementara itu, sampel ternak sapi akan diambil secara *accidental sampling* sebanyak 150 ekor.



**Gambar 2.** Peta lokasi pengambilan sampel darah sapi di 19 Kecamatan di Kabupaten Gorontalo.

Pelaksanaan penelitian dimulai bulan Maret sampai bulan Agustus 2023. Penelitian terdiri dari 4 tahapan yaitu : 1) pemeriksaan ulas darah tipis untuk periksa merozoit protozoa darah; 2) pemeriksaan derajat parasitemia; 3) pemeriksaan *single Polymerase Chain Reaction (PCR)* dan *Multiplek PCR*; 4) Sequencing *Babesia*, *Theileria* dan *Anaplasma* pada sapi isolat Gorontalo. Secara ringkas diagram alur penelitian ini disajikan pada **Gambar 3**.



**Gambar 3.** Bagan alur penelitian kajian molekuler protozoa darah pada sapi di Gorontalo

Pemilihan sampel sapi tidak dibedakan ras sapi, umur sapi dan jenis kelamin. Namun demikian, sapi yang akan diambil sampel darahnya dipilih dengan beberapa kriteria gejala klinis, yaitu : kekurangan, anemia, bulu kusam dan terlihat adanya infestasi ektoparasit tubuhnya. Sampel darah dari sapi yang sehat juga diambil sebagai data pembandingan.

Spesifikasi sampel yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah darah sapi yang diambil dari arteri *auricularis* dan vena *jugularis*. Sampel darah dari arteri *auricularis* digunakan untuk pembuatan preparat ulas darah tipis untuk keperluan melihat merozoit dari *Babesia*, *Theileria* dan *Anaplasma*. Sampel darah dari vena *jugularis* ditampung dalam tabung yang terdapat antikuagulan *Etilen Diamin Tetra Asetat* (EDTA). Selanjutnya, sampel ini akan digunakan untuk keperluan pemeriksaan molekuler yaitu menggunakan PCR.

## **a. Variabel Penelitian**

### **Penelitian 1 : Pemeriksaan Ulas Darah Tipis**

Penelitian tahap pertama ini menggunakan metode survei untuk mendapatkan merozoit dari *Babesia sp.*, *Theileria sp.*, dan *Anaplasma sp.* secara *accidental*. Bahan yang digunakan berupa darah sapi yang diambil arteri *auricularis*. Sebelum diambil darahnya, sapi terlebih dahulu dilakukan perlakuan "stressing" pada telinga seperti menyentil telinga sapi dan atau menjemur sapi ditempat panas pada beberapa menit. Selanjutnya, bahan yang digunakan dalam pembuatan preparat ulas darah tipis, meliputi: aquades, methanol, giemsa 10% dan minyak emersi. Sedangkan alat yang digunakan pada penelitian tahap ini, meliputi: objek glass, lancet atau jarum ukuran 25 untuk pengambilan darah kapiler, pipet, staining jar, kertas label, kotak preparat, mikroskop binokuler dan kamera digital.

Pembuatan preparat ulas darah tipis dilakukan sesaat setelah darah diambil dilokasi pengambilan sampel. Pembuatan preparat diawali dengan meneteskan darah yang diambil dari arteri *auricularis* pada ujung gelas objek pertama, dengan perlahan ujung tepian gelas objek yang kedua ditempelkan menyentuh darah yang diteteskan dan dikondisikan supaya merata. Setelah rata dengan tepian ujung, gelas objek kedua didorong membentuk sudut 45 derajat sehingga terbentuk ulas darah tipis. Sediaan ulas darah dikeringkan selama kurang lebih 1 menit dan selanjutnya difiksasi dengan menggunakan methanol selama 5 menit. Setelah di fiksasi, sediaan ulas darah dikeringkan, diberi label dan dimasukkan ke dalam kotak preparat untuk dibawa ke laboratorium untuk pewarnaan.

Pewarnaan ulas darah tipis menggunakan larutan giemsa 10% dengan melakukan perendaman di dalam larutan giemsa tersebut selama 30 menit. Setelah selesai direndam, preparat dicuci dengan aquades dan dikeringkan. Pemeriksaan merozoit dari parasit darah diawali dengan meneteskan minyak emersi ke bagian yang akan diamati menggunakan mikroskop. Selanjutnya pengamatan dilakukan dengan mikroskop pembesaran seribu dan hasilnya didokumentasikan menggunakan kamera digital dan analisis data dilakukan secara deskriptif. Hasil yang diperoleh dikelompokkan menjadi beberapa tipe yaitu :

1. Preparat sampel yang terdapat hanya merozoit *Babesia*
2. Preparat sampel yang terdapat hanya merozoit *Theileria*
3. Preparat sampel yang terdapat hanya merozoit *Anaplasma*
4. Preparat sampel yang terdapat hanya merozoit *Babesia* dan *Theileria*
5. Preparat sampel yang terdapat hanya merozoit *Babesia* dan *Anaplasma*
6. Preparat sampel yang terdapat hanya merozoit *Babesia*, *Theileria* dan *Anaplasma*
7. Preparat sampel yang terdapat hanya merozoit *Theileria* dan *Anaplasma*.

## **Penelitian 2 : Pemeriksaan Derajat Parasitemia**

Status berat-ringan penyakit yang disebabkan oleh agen parasit darah dapat diukur melalui pemeriksaan derajat parasitemia. Pemeriksaan ulas darah dilakukan dengan mikroskop pembesaran 1000 kali. Jumlah parasit intraseluler darah dihitung pada lima lapang pandang. Derajat parasitemia dihitung

berdasarkan jumlah sel darah merah yang terinfeksi merozoit dalam 200 sel darah dalam satu lapang pandang. Penelitian pada tahap ke dua ini dianalisis secara deskriptif.

### **Penelitian 3 : Pemeriksaan Menggunakan Single PCR dan Multiplek PCR**

Sebelum melakukan pemeriksaan menggunakan single PCR dan Multiplek PCR, maka terlebih dahulu dilakukan beberapa tahapan proses persiapan penelitian yaitu isolasi DNA agen *Babesia sp.*, *Theileria sp.*, dan *Anaplasma sp.* dan desain primer. Sampel darah yang digunakan untuk isolasi DNA protozoa diambil melalui vena jugularis sapi. Sampel darah diambil menggunakan jarum *venoject* steril yang terangkai dengan tabung yang berisi antikoagulan EDTA. Sebanyak 3 ml darah diambil dan sesaat setelah dilakukan pengambilan darah, tabung diputar membentuk angka delapan dengan tujuan melakukan homogenisasi darah dengan antikoagulan sehingga sel-sel darah yang kemungkinan ada merozoit protozoa tidak rusak. Tabung selanjutnya diberi label dan dimasukkan ke dalam box sampel yang didalamnya terdapat gel es dan selanjutnya dibawa ke laboratorium untuk dilakukan isolasi DNA.

#### **1. Isolasi DNA Protozoa Darah**

Isolasi DNA protozoa menggunakan gSYNC DNA Extraction Kit. Sebanyak 1,5 ml sampel darah diambil dan ditambahkan 200 ul PBS dan 20 ul proteinase K dan campurkan dengan menggunakan mikropipet. Kemudian inkubasi selama 5 menit pada suhu 60°C, setelah itu tambahkan 200 ul GSB Buffer dan

dihomogenkan dengan menggunakan vortex. Sampel tersebut kemudian diinkubasi selama 20 menit pada suhu 60°C. Setiap 5 menit tabung dibolak-balikkan. Selama inkubasi, masukkan 200 ul Elution Buffer ke dalam tabung 1,5 ml baru dan inkubasi pada 60°C. Sebanyak 200 ul etanol absolut ditambahkan ke dalam sampel dan dihomogenkan menggunakan vortex selama 10 detik.

Tahap berikutnya, letakkan GS Column ke dalam *collection tube*. Seluruh sampel dipindahkan ke dalam GS Column. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 14.000 xg. *Collection tube* beserta larutan di dalamnya dibuang. Letakkan GS column ke dalam *collection tube* baru. Sebanyak 400 ul W1 buffer ditambahkan ke dalam GS Column dan sentrifugasi dengan kecepatan 14.000 xg selama 30 detik selanjutnya cairan yang tertampung dalam *collection tube* dibuang, dan GS column di kembalikan ke *collection tube*. Tambahkan kembali W1 Buffer ke dalam GS Column sebanyak 600 ul dan sentrifugasi dengan kecepatan 14.000 xg selama 30 detik Cairan yang tertampung dalam *collection tube* dibuang lagi dan kembalikan GS column ke *collection tube*.

Selanjutnya GS column pack disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 xg selama 3 menit. Pindahkan GS column ke tabung 1,5 ml selanjutnya ditambahkan 40 ul *Elution Buffer* ke bagian tengah column. Biarkan pada suhu ruang selama 3 menit, Setelah 3 menit berselang, dilakukan sentrifugasi kembali dengan kecepatan 14.000 x g selama 30 detik. DNA yang berhasil diisolasi disimpan pada suhu -20°C. kualitas DNA hasil ekstraksi dianalisis dengan menggunakan gel agarose sebanyak 1%, kemudian divisualisasi menggunakan GelDoc.

## **2. Desain Primer *Babesia*, *Theileria* dan *Anaplasma***

Primer merupakan potongan DNA pendek utas tunggal (oligonukleotida), panjang primer yang umum digunakan hanya berkisar antara 20 sampai 25 basa. Primer merupakan salah satu bahan esensial yang diperlukan dalam PCR. Primer berfungsi untuk menginisiasi proses amplifikasi PCR. Juga berfungsi untuk membatasi daerah yang akan diamplifikasi pada reaksi PCR. Tanpa primer, reaksi PCR tidak akan terjadi meskipun enzim dan komponen lainnya sudah tersedia. Desain primer untuk reaksi PCR menggunakan NCBI atau Primer3Plus.

### **2.1. Tahapan Desain Primer menggunakan NCBI :**

- a) Membuka website blast dengan mengetikkan <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>
- b) Mencari menu Primer-BLAST dengan men-scroll tampilan utama, kemudian pilih Primer-BLAST.
- c) Muncul kolom-kolom yang akan digunakan dalam mencari desain primer DNA
- d) Mencari sekuen DNA salah satu spesies yang akan dicari desain primernya seperti pada Tabel 1.
- e) Memasukan sequens DNA yang akan digunakan dalam membuat primer pada kolom accession sequence. Pengaturan produk PCR disesuaikan supaya pada saat amplifikasi band yang muncul dari ketiga primer mudah dibedakan. Suhu  $T_m$  (suhu dimana strain DNA membuka separuhnya) menggunakan suhu standar.
- f) Tahapan akhir tekan ikon *Get Primer*.
- g) Muncul *Graphical view* menunjukkan proses sequencing (*Forward-reverse*) pada DNA.

- h) Scroll kebawah untuk mendapatkan hasil primer report yang menunjukkan urutan basa nitrogen yang berfungsi sebagai primer dari sequens DNA yang akan digunakan.

## 2.2.Tahapan Desain Primer menggunakan Primer3 :

- a) Sekuens nukleotida gen dari *Babesia*, *Theileria* dan *Anaplasma* diperoleh dengan cara melakukan pencarian pada database National Center for Biotechnology Information (NCBI) pada situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> menggunakan penelusuran di kotak pencaharian dengan kata kunci sesuai dengan gen protozoa darah.
- b) Sekuens nukleotida yang telah didapatkan di NCBI, disalin bagian “FASTA” dan dianalisis pemilihan kandidat primer forward dan reverse dengan menggunakan situs Primer3Plus, dengan alamat pada [http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3\\_plus.cgi](http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3_plus.cgi).
- c) Hasil yang diperoleh yaitu 5 kandidat primer forward dan reverse dengan susunan basa nukleotida yang berbeda-beda. Analisis Primer Forward dan Reverse dengan OligoAnalyzer 3.1 Hasil kandidat primer yang diperoleh kemudian dianalisa dengan mempertimbangkan kriteria primer di dalam program Integrated DNA Technologies (IDT) OligoAnalyzer 3.1 dengan menempelkan urutan primer ke dalam kotak urutan dan klik pada kotak Analyze, Hairpin: Cross-Dimer dan SelfDimer.

Dalam mendesain primer diperlukan urutan pendek dari gene yang akan digunakan. Beberapa gen dari protozoa darah tersaji dalam **Tabel 1**.

**Tabel 1.** Beberapa kandidat Gene protozoa darah yang digunakan dalam single dan multiplex PCR

No	Protozoa	Gene	Primer (5'-3')	Referensi
1	<i>B. bovis</i>	Bo(166var2A	CAA GCA TAC AAC CAG GTC ACC CCA GGC ACA TCC AGC TA	Akbari et al. (2018)
2	<i>T. Annulata</i>	Cytob 1 (312 bp)	ACT TTG GCC GTA ATG TTA AAC CTC TGG ACC AAC TGT TTG G'	Bilgiç et al. (2010a)
3	<i>T. orientalis</i>	MPSP	GAA GAG GGA TAC CGC ATC AA CAT CGG AAC CGA CGT AAA CT	Mappatunru (2021)
4	<i>A. Marginale</i>	MSP5	GCA TAG CCT CCG CGT CTT TC TCC TCG CCT TGG CCC TCA GA	Mappatunru (2021)
5	<i>T. annulata</i>	Tams-1 (846 bp)	TACTTGAAGCTTCCATGT TGTCCAGGACCAC ATCTTGCTCGAGAAGGAAG TAAAGGACTGATGA	Kolte et al. (2017)
6	<i>T. orientalis</i>	MPSP (776 bp)	CTTTGCCTAGGATACTT CCT ACGGCAAGTGGTGAGAA CT	Kakati et al. (2015)
7	<i>A. marginale</i>	MAR1bB2 (265 bp)	GCT CTA GCA GGT TAT GCG TC CTG CTT GGG AGA ATG CAC CT	Bilgiç et al. (2013b)
8	<i>B. bovis</i>	Bovar 2A (166 bp)	CAA GCA TAC AAC CAG GTGG ACC CCA GGC ACA TCC AGC TA	Bilgiç et al. (2013b)
9	<i>T. annulata</i>	Spm2 (313 bp)	ATGA GACA AAAG AAAG TAAA GACCA GAAG TTCC CTGG TTAT TTTG GTC	Kumar et al. (2021)
10	<i>B. bigemina</i>	Apocytochrome b (205 bp)	TTGGGCACTTCGTTATTTCC TGTTGCTCCCCAGTAACTCA	Kumar et al. (2021)
11	<i>A. marginale</i>	16S rRNA (422 bp)	GGGGTAATGGCCTACCAAG CTACGAATTTACCTCTACACTAGGA	Kumar et al. (2021)
12	<i>T. annulata</i>	30-kDa (721 bp)	GTA ACC TTT AAA AAC GT GTT ACG AAC ATG GGT TT	D'Oliveira et al. (1995)

13	<i>Babesia spp.</i>	18S rRNA (339 bp)	GTT GAT CCT GCC AGT AGT AAC CTT GTT ACG ACT TCT C	Birkenheuer et al. (2003)
14	<i>B. bigemina</i>	BiA (278 bp)	CAT CTA ATT TCT CTC CAT ACC CCT CC CCT CGG CTT CAA CTC TGA TGC CAA AG	Canever et al. (2014)
15	<i>B. bovis</i>	BoF BoR (356 bp)	CAC GAG GAA GGA ACT ACC GAT GTT GA CCA AGG AGC TTC AAC GTA CGA GGT CA	Canever et al. (2014)
16	<i>A. marginale</i>	1773F (1000 bp)	TGT GCT TAT GGC AGA CAT TTC C AAA CCT TGT AGC CCC AAC TTA TCC	Canever et al. (2014)
17	<i>A. phagocytophilum</i>	16S Rna (172 bp)	GAGTAATTGCAGCCAGGCACTCTAGTGCTGA ATGT GGGGATAATTTATCTCCGTG CTAATCTCCATGTCAAGGAGTGGTAAGGTTT	Peng et al. (2020)
18	<i>B. bigemina</i>	BbiRAP-1a		Zhou et al. (2016)
19	<i>T. annulata</i>	Tams-1		Zhou et al. (2016)
20	<i>T. orientalis</i>	ToMPSP		Zhou et al. (2016)
21	<i>A. marginale</i>	AmMSP4		Zhou et al. (2016)

### **3. Diagnosa *Babesia*, *Theileria* dan *Anaplasma* Menggunakan Single PCR**

*Polymerase Chain Reaction* (PCR) adalah suatu teknik sintesis dan amplifikasi DNA secara *in vitro*. Teknik PCR dapat digunakan untuk mengamplifikasi segmen DNA dalam jumlah jutaan kali hanya dalam beberapa jam. PCR dapat menggandakan jumlah molekul DNA pada target tertentu dengan cara mensintesis molekul DNA baru yang komplemen dengan DNA target tersebut melalui bantuan enzim dan oligonukleotida sebagai primer dalam suatu alat yang disebut *thermocycler*. Reaksi PCR membutuhkan bahan utama antara lain DNA template, DNA polymerase, primer, deoksinukleosida trifosfat (dNTPs), serta larutan buffer. Prinsip dasar metode PCR ada 3 yaitu denaturasi (pemutusan untai ganda DNA menjadi untai tunggal), annealing (penempelan primer pada daerah target), dan elongasi (proses pemanjangan rantai DNA target).

### **4. Diagnosa *Babesia*, *Theileria* dan *Anaplasma* Menggunakan Multiplex PCR**

Multiplex PCR adalah adaptasi dari teknik PCR yang memungkinkan amplifikasi secara simultan dari berbagai sekuen gen. Multiplex PCR berisi berbagai macam set primer dengan campuran reagen PCR tunggal untuk memproduksi amplikon dari berbagai ukuran yang spesifik terhadap sekuens DNA yang berbeda dalam satu tube PCR secara bersamaan. Dengan pentargetan gen sekaligus, informasi tambahan dapat diperoleh dari *running-test* tunggal yang tidak akan membutuhkan beberapa kali reagen dan lebih banyak waktu untuk melakukan. Temperatur pada tahapan annealing harus dioptimasi untuk tiap set

primer agar dapat bekerja dengan baik dalam suatu reaksi tunggal, serta ukuran ampikon. Dengan kata lain multiplex PCR akan lebih menghemat waktu, reagen dan sampel.

### **5. Amplifikasi Hasil PCR**

Sampel yang telah diuji PCR diambil 6  $\mu$ L kemudian ditambahkan dengan 1  $\mu$ L larutan *loading dye buffer*. Larutan dihomogenkan dan dimasukkan ke dalam sumur gel. Agarose gel 2% dielektroforesis dengan kondisi tegangan 100 V selama 45 menit. Produk PCR divisualisasikan pada Agarose gel dibawah sinar UV transilluminator. Pita DNA produk PCR dibandingkan dengan Marka ukuran DNA. Sampel dinyatakan positif jika terlihat pita DNA berukuran tertentu sesuai dengan referensi panjang fragmen DNA yang diamplifikasi.

### **Metode Penelitian 4 : Sequencing**

Sequencing *Babesia*, *Theileria* dan *Anaplasma* pada sapi isolat Gorontalo menggunakan metode sanger dan selanjutnya dilakukan analisis bioinformatika.

## DAFTAR PUSTAKA

- Akbari, R.A., R. Tiuria, A.H. Wardhana, and D.H. Savitri. 2018. Deteksi Parasit Darah pada Sapi Perah Berdasarkan Analisis Pcr Duplex. *Acta Vet. Indones.* 6(2): 48–55. doi: 10.29244/avi.6.2.48-55.
- Anbu, R.K.R., B. V Mangalanathan, S. Ganapathy, and K.S. Alagesan. 2020. Epidemiological Studies on Bovine Tick-Borne Haemoparasitic Diseases in Chennai. *Int. J. Livest. Res.* 10(2): 36–45. doi: 10.5455/ijlr.20191021101352.
- Anggraini, M., H. Primarizky, M. Mufasirin, L.T. Suwanti, P. Hastutiek, et al. 2019. Prevalence of Blood Protozoa Disease on Cattle and Buffalo in Moyo Hilir Sub-District, Sumbawa District West Nusa Tenggara. *J. Parasite Sci.* 3(1): 9–14. doi: 10.20473/jops.v3i1.16424.
- Aziz, N., M. Maksudi, and Y.A. Prakoso. 2019. Correlation between hematological profile and theileriosis in Bali cattle from Muara Bulian, Jambi, Indonesia. *Vet. World* 12(9): 1358. doi: 10.14202/VETWORLD.2019.1358-1361.
- Bilgic, H.B., T. Karagenc, B. Shiels, A. Tait, H. Eren, et al. 2010a. Evaluation of cytochrome b as a sensitive target for PCR based detection of *T. annulata* carrier animals. *Vet. Parasitol.* 174(3–4): 341–347. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.08.025.
- Bilgic, H.B., T. Karagenc, B. Shiels, A. Tait, H. Eren, et al. 2010b. Evaluation of cytochrome b as a sensitive target for PCR based detection of *T. annulata* carrier animals. *Vet. Parasitol.* 174(3–4): 341–347. doi: 10.1016/J.VETPAR.2010.08.025.
- Bilgiç, H.B., T. Karagenc, M. Simuunza, B. Shiels, A. Tait, et al. 2013a. Development of a multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Theileria annulata*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* in cattle. *Exp. Parasitol.* 133(2): 222–229. doi: 10.1016/J.EXPPARA.2012.11.005.
- Bilgiç, H.B., T. Karagenc, M. Simuunza, B. Shiels, A. Tait, et al. 2013b. Development of a multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Theileria annulata*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* in cattle. *Exp. Parasitol.* 133(2): 222–229. doi: 10.1016/j.exppara.2012.11.005.
- Birkenheuer, A.J., M.G. Levy, and E.B. Breitschwerdt. 2003. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. *J. Clin. Microbiol.* 41(9): 4172–4177. doi: 10.1128/JCM.41.9.4172-4177.2003.
- Canever, M.F., L.L. Vieira, C. Reck, L. Richter, and L.C. Miletti. 2014. First Evaluation of an Outbreak of Bovine Babesiosis and Anaplasmosis in Southern Brazil Using Multiplex PCR. *Korean J. Parasitol.* 52(5): 507–511. doi: 10.3347/KJP.2014.52.5.507.
- D'Oliveira, C., M. Van Der Weide, M.A. Habela, P. Jacquiet, and F. Jongejan. 1995. Detection of *Theileria annulata* in blood samples of carrier cattle by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33(10): 2665–2669. doi: 10.1128/jcm.33.10.2665-2669.1995.

- Fartashvand, M., M.G. Nadalian, M. Sakha, and S. Safi. 2013. Elevated Serum Cardiac Troponin I in Cattle with Theileriosis. *J. Vet. Intern. Med.* 27(1): 194–199. doi: 10.1111/jvim.12014.
- Hakimi, H., M. Asada, and S.I. Kawazu. 2021. Recent advances in molecular genetic tools for babesia. *Vet. Sci.* 8(10): 1–11. doi: 10.3390/vetsci8100222.
- Kakati, P., P.C. Sarmah, D. Ray, K. Bhattacharjee, R.K. Sharma, et al. 2015. Emergence of oriental theileriosis in cattle and its transmission through *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in Assam, India. *Vet. World* 8(9): 1099–1104. doi: 10.14202/vetworld.2015.1099-1104.
- Kolte, S.W., S.D. Larcombe, S.G. Jadhao, S.P. Magar, G. Warthi, et al. 2017. PCR diagnosis of tick-borne pathogens in Maharashtra state, India indicates fitness cost associated with carrier infections is greater for crossbreed than native cattle breeds. *PLoS One* 12(3): 1–17. doi: 10.1371/journal.pone.0174595.
- Kumar, P., A. Kumar, K. Sarma, P. Sharma, R.R. Kumari, et al. 2021. Development of Novel Multiplex PCR for Diagnosis of Co-infected Hemoparasites in Cattle. *Indian J. Anim. Res.* 55(12): 1504–1509. doi: 10.18805/IJAR.B-4695.
- Mappatunru, M.F. 2021. Deteksi *Theileria orientalis* dan *Anaplasma marginale* pada Sapi Perah di Pangalengan, Kabupaten Bandung dengan Metode Konvensional dan PCR Duplex. Tesis Magister Sains Vet. Univ. Gadjah Mada. <http://etd.repository.ugm.ac.id/penelitian/detail/207111> (accessed 17 February 2023).
- Nugroho, E.A.T., M. Sayuti, and E. Amuda. 2022. Kajian Theileriosis pada Sapi Di Kabupaten Pohuwato 1Tri. *Florea J. Biol. dan Pembelajarannya* 9(2): 153–157. doi: 10.25273/florea.v9i2.14437.
- Pakaya, N. 2016. Investigasi Babesiosis pada Sapi di Kabupaten Gorontalo Utara. Skripsi Fak. Pertan. Univ. Negeri Gorontalo 1(621411019). <https://repository.ung.ac.id/skripsi/show/621411019/investigasi-babesiosis-pada-sapi-di-kabupaten-gorontalo-utara.html> (accessed 17 February 2023).
- Peng, Y., S. Zhao, K. Wang, J. Song, Y. Yan, et al. 2020. A Multiplex PCR Detection Assay for the Identification of Clinically Relevant *Anaplasma* Species in Field Blood Samples. *Front. Microbiol.* 11(April): 1–9. doi: 10.3389/fmicb.2020.00606.
- Roland, L., M. Drillich, and M. Iwersen. 2014. Hematology as a diagnostic tool in bovine medicine. *J. Vet. Diagn. Invest.* 26(5): 592–598. doi: 10.1177/1040638714546490.
- Sayuti, M., and E.A.T. Nugroho. 2018. Theileriosis Prevalence on the Cattle in District Gorontalo Prevalensi Theileriosis pada Sapi di Kabupaten Gorontalo. 82 | Proc. of the 20th FAVA CONGRESS & The 15th KIVNAS PDHI. p. 82–83

- Sayuti, M. dan T. A. E. Nugroho. 2015. Situasi Penyakit Parasiter Pada Sapi di Gorontalo. Laporan Penelitian Fundamental Tahap I. Lembaga Penelitian Universitas Negeri Gorontalo.
- Sayuti, M. dan T. A. E. Nugroho. 2016. Situasi Penyakit Parasiter Pada Sapi di Gorontalo. Laporan Penelitian Fundamental Tahap II. Lembaga Penelitian Universitas Negeri Gorontalo.
- Solang, S. V. 2016. Ragam Ektoparasit Pada Tubuh Sapi di Kabupaten Gorontalo Utara. Skripsi. Fakultas Pertanian Universitas Negeri Gorontalo.
- Tretina, K., H.T. Gotia, D.J. Mann, and J.C. Silva. 2015. Theileria-transformed bovine leukocytes have cancer hallmarks. *Trends Parasitol.* 31(7): 306–314. doi: 10.1016/j.pt.2015.04.001.
- Whittier, D., N. Currin, and J.F. Currin. 2019. Anaplasmosis in Beef Cattle. *Emerg. Technol. Manag. Ruminants* 400(465): 243–248. doi: 10.1201/9780429035753-27.
- Yuwono, T. 2006. Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction: Panduan Eksperimen PCR untuk Memecahkan masalah biologi terkini. [http://library.fmipa.uny.ac.id/opac/index.php?p=show\\_detail&id=13831&keywords=](http://library.fmipa.uny.ac.id/opac/index.php?p=show_detail&id=13831&keywords=) (accessed 17 February 2023).
- Zhou, M., S. Cao, F. Sevinc, M. Sevinc, O. Ceylan, et al. 2016. Molecular detection and genetic identification of Babesia bigemina, Theileria annulata, Theileria orientalis and Anaplasma marginale in Turkey. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 7(1): 126–134. doi: 10.1016/j.ttbdis.2015.09.008.



UNIVERSITAS GADJAH MADA  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
PROGRAM STUDI DOKTOR SAIN VETERINER

Jl. Fauna No.2, Karangmalang, Yogyakarta, 55281, Telp-Faks. 0274 6411525, VoIP. 82389,  
email: [sainvet@ugm.ac.id](mailto:sainvet@ugm.ac.id)

Nomor : 110/UN1/FKH/Sain-Vet/PP/2023  
Hal : Seminar Proposal Program Doktor

20 Februari 2023

Yth,

1. Dekan / Penanggung jawab Program Studi Doktor Sain Veteriner
2. Prof. Dr. drh. Ida Tjahajati, M.P. (Promotor)
3. Prof. Dr. drh. Aris Haryanto, M.Si. (Kopromotor I)
4. Dr. Nurdin, SP., M.Si. (Kopromotor II)
5. Dr. drh. Guntari Titik Mulyani, M.P. (Penguji I)
6. Dr. drh. Dwi Priowidodo, M.P. (Penguji II)
7. Dr. Muhammad Mukhtar, S.Pt., M.Agr.Sc. (Penguji III)

Mengharap kehadiran Bapak/Ibu pada seminar proposal penelitian bagi Saudara Tri Ananda Erwin Nugroho (NIM : 21/484790/SKH/00131) dengan judul “Kajian Molekuler Protozoa Darah pada Sapi di Gorontalo” yang akan diselenggarakan secara *daring* pada :

Hari/Tanggal : Kamis, 23 Februari 2023  
Pukul : 13.30 WIB s/d Selesai  
Tempat : Daring *via* zoom  
Link : <http://ugm.id/SeminarProposalErwin>  
Meeting ID : 981 8283 5175, Passcode : sainvet  
Acara : Seminar proposal penelitian mahasiswa a.n Tri Ananda Erwin Nugroho (NIM : 21/484790/SKH/00131)

Atas perhatian dan kehadiran Bapak/Ibu diucapkan terima kasih.

Dekan/Penanggungjawab  
Program Studi Doktor Sain Veteriner

Prof. drh. Teguh Budipitojo, M.P., Ph.D.  
NIP. 196404181990031001 

Visi : Menjadi Program Studi Pascasarjana Sain Veteriner kelas Dunia berdasarkan Pancasila.

- Misi :
1. Menyelenggarakan, mengembangkan dan membina pendidikan Pascasarjana Sain Veteriner melalui kerjasama nasional dan Internasional.
  2. Menghasilkan sarjana Strata 3 yang mampu berkompetisi secara internasional, berjiwa Pancasila, dan mengabdikan kepada kesejahteraan manusia melalui kesehatan hewan.
  3. Mengembangkan ilmu pengetahuan melalui peningkatan mutu penelitian untuk mendukung pendidikan dan IPTEK Veteriner.





UNIVERSITAS GADJAH MADA  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
PROGRAM STUDI DOKTOR SAIN VETERINER

Jl. Fauna No.2, Karangmalang, Yogyakarta, 55281, Telp-Faks. 0274-6411525, VoIP. 82389, email:  
[sainvet@ugm.ac.id](mailto:sainvet@ugm.ac.id)

SUSUNAN ACARA SEMINAR PROPOSAL PENELITIAN PROGRAM DOKTOR

**Tri Ananda Erwin Nugroho**

Kamis, 23 Februari 2023

Waktu	Acara	Pelaksana
13.30-13.40	Pembukaan: Selamat datang Doa Pembacaan CV mahasiswa	Ketua Tim Penguji
13.40-13.55	Presentasi Proposal	Tri Ananda Erwin Nugroho
13.55-14.05	diskusi/tanya jawab dg mhs/audiens	Ketua Sidang
14.05-14.15	Evaluasi dan masukan dari Penguji III	Dr. Muhammad Mukhtar, S.Pt., M.Agr.Sc.
14.15-14.25	Evaluasi dan masukan dari Penguji II	Dr. drh. Dwi Priyowidodo, M.P.
14.25-14.35	Evaluasi dan masukan dari Penguji I	Dr. drh. Guntari Titik Mulyani, M.P.
14.35-14.45	Evaluasi dan masukan dari Ko Promotor 2	Dr. Nurdin, SP., M.Si.
14.45-14.55	Evaluasi dan masukan dari Ko Promotor 1	Prof. Dr. drh. Aris Haryanto, M.Si
14.55-15.05	Evaluasi dan masukan dari Promotor	Prof. Dr. drh. Ida Tjahajati, M.P.
15.05-15.15	Masukan dari Penanggung Jawab	Ketua Tim Penguji
15.15-15.20	Penutup	Ketua Tim Penguji

erwin nugroho

**Dr. Nurdin**

**Yulia Nelymali...**

Dr. Nurdin

Yulia Nelymalik Selan

David Ardiyanto

View

**ASOSIASI KEDOKTERAN INTERNA VETERINER INDONESIA**

**AKIVI**  
ASOSIASI KEDOKTERAN INTERNA VETERINER INDONESIA

**SPONSOR KEGIATAN :**

SEHAT  
Lila Kiki  
Klinik Hewan Jogja

**RUN!**

RSHP  
Ruang Saka Hewan Praktikum

SEHA

FIBS  
SCIENCE DIET

zoetis

Ida Tjahajati

Mute

Stop Video

Participants 18

Chat 5

Share Screen

Record

Reactions

Apps

Leave

**Participants (18)**

Find a participant

AS	Ari Setiainingsih (Co-host)		
YT	Yudy Tjahjono (Co-host)		
YN	Yulia Nelymalik Selan (Co-host)		
	Dr. Sami Ullah Khan - Faculty of...		
	Dwi Liliek Kusindarta		
DA	David Ardiyanto		
DN	Dr. Nurdin		
EN	Erwin Nugroho		
	Kuncoro Foe		
	Lalu Unsunnidhal		
S	sarmin sarmin		
TW	Tri Wahyu Pangestiningasih		
WO	Wa ode santa monica		

Invite

Mute Me

Video conference header area showing participant thumbnails and controls. From left to right: a woman with glasses, a woman wearing a blue face mask and a hijab, a man in a military uniform, and a man with a red mute icon. Logos for AKR/VI, JICA, and other organizations are visible in the background of the thumbnails. A blue arrow icon is on the right side of the header.

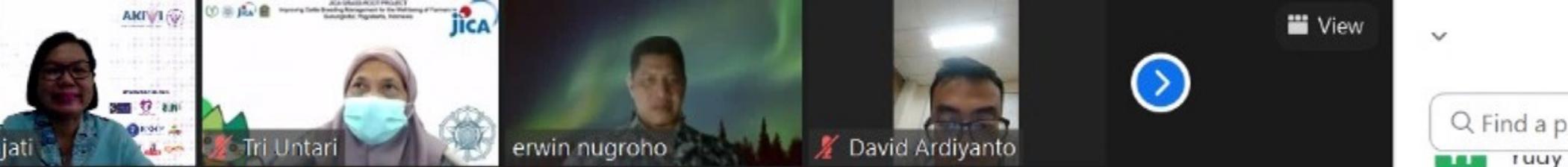
View

Find a participant



- Participant list on the right side of the screen, showing names and initials next to their profile pictures. Visible names include: Yulia, David, Dian b, Dr. Sar, Dwi Li, Erwin, Kunco, Lalu U, sarmin, Tri Wa, and Wa od.

Video conference control bar at the bottom. From left to right: Participants (19), Chat (5), Share Screen (green icon), Record (grey icon), Reactions (smiley face icon), Apps (grid icon), and a red Leave button.



- Q Find a p
- ruuy
  - YN Yulfia
  - DN Dr. N
  - DA David
  - DB Dian
  - Dr. Sa
  - Dwi L
  - EN Erwin
  - Kunco
  - Lalu U
  - S sarmi
  - TW Tri Wa
  - WO Wa o

Participants 19   Chat 5   Share Screen   Record   Reactions   Apps   Leave

Inv



UNIVERSITAS GADJAH MADA  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
PROGRAM STUDI DOKTOR SAIN VETERINER

Jl. Fauna No.2, Karangmalang, Yogyakarta, 55281, Telp-Faks. 0274-6411525, VoIP. 82389, email: [sainvet@ugm.ac.id](mailto:sainvet@ugm.ac.id)

HASIL PENILAIAN PROPOSAL PENELITIAN  
PROGRAM STUDI DOKTOR SAIN VETERINER

Nama: **Tri Ananda Erwin Nugroho**

Komentar	
1.	Secara umum proposal penelitian saudara Drh. T. A. E. Nugroho sudah cukup baik secara ilmiah dan research gap juga sudah ditonjolkan dengan berusaha berpedoman pada panduan penulisan proposal dan disertasi yang berlaku di PS Sain Veteriner UGM.
2.	Namun, masih ditemukan kesalahan pengetikan, penggalan kata dan pemaknaan kalimat serta paragraf yang harus diperbaiki lagi.
3.	Landasan <b>Ontologis</b> penelitian sudah cukup jelas yang berkaitan dengan obyek kajian, baik obyek kajian formal dan obyek kajian material.
4.	Landasan <b>Epistemologi</b> penelitian juga sudah tampak jelas yang berkaitan dengan bagaimana ilmu ini diperoleh (metodologi). Namun, analisis data yang diperoleh untuk mengeneralisasi temuan menjadi sebuah teori baru belum menggambarkan secara rinci, termasuk teknik pengujiannya.
5.	Landasan <b>Aksiologi</b> penelitian ini juga jelas dalam menjelaskan kemanfaatan ilmu ini untuk menyelesaikan masalah penyakit pada ternak sapi yang disebabkan protozoa dalam darah.
6.	Rujukan pustaka >80% dari jurnal, tetapi masih ditemukan rujukan dari skripsi, tesis.

Saran	
1.	Perlu dicermati kembali penyusunan daftar pustaka karena ditemukan pustaka ganda. Ditulisik lebih detil database pustaka di aplikasi mendeley atau zetero.
2.	Perlu percepatan penelitian untuk kepentingan publikasi ilmiah bereputasi dan klaim hasil temuan ( <i>novelty</i> ).
3.	Rasionalisasi pembiayaan penelitian yang efektif dan efisien sampai selesai.
4.	Skor TPA dan TOEFL masih harus ditingkatkan lagi.

No.	ASPEK YANG DINILAI	NILAI ANGKA
1.	Materi	3,90
2.	Cara Penyajian	3,95
3.	Penguasaan Materi dan diskusi	3,85
JUMLAH		11,70
RATA-RATA		3,90 (A)

Nilai :

3,76 - 4,00 = A

3,60 - 3,75 = A-

3,26 - 3,50 = A/B

3,01 - 3,25 = B+

2,76 - 3,00 = B

2,60 - 2,75 = B-

2,01 - 2,50 = B/C

1,01 - 2,00 = C

Nilai D = Tidak lulus

Yogyakarta, 23 Februari 2023

Penguji

(Dr. Nurdin, S.P., M.Si)



UNIVERSITAS GADJAH MADA  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
PROGRAM STUDI DOKTOR SAIN VETERINER

Jl. Fauna No.2, Karangmalang, Yogyakarta, 55281, Telp-Faks.0274-6411525, VoIP. 82389, email :  
[sainvet@ugm.ac.id](mailto:sainvet@ugm.ac.id)

**BERITA ACARA SEMINAR PROPOSAL  
PROGRAM DOKTOR**

Hari ini Kamis, tanggal 23 Februari 2023 telah dilaksanakan seminar proposal penelitian bagi:

Nama : Tri Ananda Erwin Nugroho  
Nomor Mahasiswa : 21/484790/SKH/00131  
Judul Penelitian : Kajian Molekuler Protozoa Darah pada Sapi di Gorontalo

Tim Penguji terdiri dari:

1. Dr. drh. Tri Untari, M.Si.	sebagai ketua
2. Prof. Dr. drh. Ida Tjahajati, M.P.	sebagai anggota
3. Prof. Dr. drh. Aris Haryanto, M.Si.	sebagai anggota
4. Dr. Nurdin, SP., M.Si.	sebagai anggota
5. Dr. drh. Guntari Titik Mulyani, M.P.	sebagai anggota
6. Dr. drh. Dwi Priyowidodo, M.P.	sebagai anggota
7. Dr. Muhammad Mukhtar, S.Pt., M.Agr.Sc.	sebagai anggota

Lama seminar : Jam  
Mulai : 13.30 WIB s/d  
Selesai : WIB  
Hasil :  
Catatan Lain :

Demikian berita acara ini dibuat untuk dapat dipergunakan seperlunya.

**Anggota Penguji**

Prof. Dr. drh. Ida Tjahajati, M.P.  
Prof. Dr. drh. Aris Haryanto, M.Si.  
Dr. Nurdin, SP., M.Si.  
Dr. drh. Guntari Titik Mulyani, M.P.  
Dr. drh. Dwi Priyowidodo, M.P.  
Dr. Muhammad Mukhtar, S.Pt., M.Agr.Sc.

**Tanda Tangan**

1.....  
2.....  
3.....  
4.....  
5.....  
6. Penguji.....

Yogyakarta, 23 Februari 2023  
Ketua Tim Penguji

Dr. drh. Tri Untari, M.Si.  
NIP. 196302221990032001