Neuropatologi Keracunan Organofosfat pada Sapi

YULVIAN SANI dan INDRANINGSIH

Balai Besar Penelitian Veteriner
Jl. R.E. Martadinata 30 – Bogor 16114

(Diterima dewan redaksi 3 Agustus 2006)

ABSTRACT

SANI, Y. and INDRANINGSIH. 2007. Neuropathology of organophosphate poisoning in dairy cattle. *JITV* 12(1): 74-85.

The purpose of this study is to investigate pathological changes in brain tissues of Frisien Holstein dairy cattle affected by organophosphate (OP). The study was directed to anticipate spongiform encephalopathy. Samples consisted of animal feeds, sera and brain tissues were collected from Lembang, West Java. Animal feeds (fodders and commercial feed) were collected directly from the dairy farms around Lembang. Sera (31 samples) were from dairy cattle owned by the local farmers and brain tissues were from the local animal slaughter house. Pesticide residues were analysed following a standard procedure using gas chromatography (GC). There was an interaction between pesticide residues in animal feeds, residue level of pesticides in sera and brain tissues to cause encephalopathy in dairy cattle. Pesticide contamination in animal feeds was regarded as the source of encephalopathy in dairy cattle. The total average of OP residues (16.8 ppb) were lower than organochlorines/OC (18.7 ppb) in fodder, showing that pesticides were originated from the contaminated soils. On the other hand, the total average of OP residues in commercial feeds (12.0 ppb), sera (85.6 ppb) and brain tissues (22.7 ppb) were higher than OC (1.8; 16.7; and 5.1 ppb). The OP appears more frequently used for dairy farm activity as insecticides. Histopathological examination for brain tissues of dairy cattle showed that most cattle were diagnosed as encephalopathy with microscopic changes of vacuolation, neuronal necrosis, chromatolysis of neurons and nucleolysis of neurons. The encephalopathy was confirmed in rats intoxicated with chlorpyrifos methyl as severe brain damage with spongiform-like lesions.

Key Words: Encephalopathy, Organophosphates, Cattle

ABSTRAK

SANI, Y. dan INDRANINGSIH. 2007. Neuropatologi organofosfat pada sapi. *JITV* 12(1): 74-85.

Tujuan penelitian ini adalah mempelajari kelainan patologis pada organ otak sapi perah jenis Frisien Holstein yang disebabkan oleh pestisida golongan organofosfat (OP). Penelitian ini dilakukan dalam rangka mengantisipasi kejadian *spongioform encephalopathy*. Sampel analisis terdiri dari pakan, serum dan jaringan otak sapi perah asal Lembang, Jawa Barat. Pakan ternak terdiri dari hijauan dan konsentrat yang dikoleksi langsung dari lokasi peternakan di kawasan Lembang. Serum berasal dari sapi perah (31 ekor) milik peternak setempat dan otak dikoleksi dari rumah potong hewan. Analisis residu pestisida dilakukan mengikuti prosedur baku dengan menggunakan kromatografi gas (GC). Hasil analisis menunjukkan bahwa terdapat interaksi antara cemaran pestisida pada pakan ternak (hijauan dan konsentrat), tingkat residu pestisida dalam serum dan jaringan otak yang dapat menimbulkan encephalopathy dimana pencemaran pestisida pada pakan ternak merupakan sumber kejadian encephalopathy pada sapi perah. Rataan total residu OP (16,8 ppb) lebih rendah daripada residu organokhlorin/OC (18,7 ppb) pada hijauan yang menunjukkan bahwa pestisida berasal dari kontaminasi pada tanah dimana tanaman dikembangbiakan. Sebaliknya rataan total residu OP pada konsentrat (12,0 ppb), serum (85,6 ppb) dan otak (22,7 ppb) lebih tinggi dibandingkan dengan16,7; dan 5,1 ppb). Pestisida golongan OP lebih banyak dimanfaatkan dalam kegiatan peternakan sebagai pembasmi lalat dan rayap. Pemeriksaan histopatologis pada jaringan otak sapi menunjukkan bahwa sebagian besar sapi mengalami encephalopathy dengan kelainan berupa vakuolisasi, nekrosis neuron, khromatolysis neuronal dan lysis dari inti sel syaraf. Kelainan mikroskopis yang sama juga dijumpai pada tikus percobaan yang diintoksikasi dengan khlorpirifos metil, berupa kerusakan parah pada otak seperti lesio spongioform-like encephalopathy.

Kata Kunci: Encephalopathy, Organofosfat, Sapi

PENDAHULUAN

Bovine Spongioform Encephalopathy (disingkat BSE atau dikenal sebagai penyakit sapi gila/*mad cow*), menjadi perhatian masyarakat di berbagai negara mengingat penyakit ini dapat menular ke manusia akibat mengkonsumsi pangan asal ternak yang terinfeksi. Penyakit BSE merupakan penyakit degeneratif pada *central nervous system* (CNS) ruminansia dengan gejala klinis berupa gangguan syaraf pusat dan bahkan dapat menimbulkan kematian ternak. Pada sapi, umumnya menyerang sapi dewasa berumur 2–8 tahun.

Bovine spongioform encephalopathy pertama kali terdeteksi secara klinis di Inggris pada tahun 1985 dan dikonfirmasi secara mikroskopis setahun kemudian (WELLS *et al.*, 1987; BRADLEY and WILESMITH, 1993). Sejak tahun 1986, lebih dari 25.000 ekor sapi di Inggris terserang penyakit BSE dan kemudian dalam waktu yang tidak lama menyebar ke beberapa negara lainnya seperti Irlandia, Oman, Switzerland dan Perancis (DAVIS *et al.*, 1991). Selanjutnya pada awal tahun 2000, wabah penyakit BSE kembali melanda Inggris, Irlandia, Belanda dan Perancis.

Wabah penyakit BSE ternyata mempengaruhi industri peternakan sapi di Inggris dan beberapa negara Eropa yang mengakibatkan kerugian ekonomi cukup signifikan bagi industri peternakan akibat kehilangan pasar ekspor ternak dan produknya. Etiologi penyakit BSE masih dalam perdebatan sampai saat ini, sehingga penyebab utamanya belum dapat diketahui dengan pasti atau masih dalam hipotesis. Studi epidemiologi yang dilakukan oleh WILESMITH *et al.* (1988; 1991) dan BRADLEY dan WILESMITH (1993) melaporkan bahwa kasus BSE berawal dari pemaparan sapi terhadap agen *scrapie-like* yang terdapat dalam pakan ternak berupa tepung daging dan tepung tulang dimana sapi lebih peka terhadap agen *scrapie-like* terutama jenis Frisien Holstein (BRADLEY dan WILESMITH, 1993). Akibat laporan ini maka industri pakan berbahan tepung tulang mengalami kesulitan dalam pemasarannya. Pakan konsentrat komersial berupa *meat and bone meal* (MBM) diduga sebagai penyebab timbulnya BSE. Akan tetapi terdapat variasi kejadian BSE secara geografis (antara dataran tinggi dan rendah) yang tidak konsisten dengan penggunaan lemak di dalam pakan ternak.

Kemudian *fibre* dan fibril protein (PrP) diduga sebagai penyebab penyakit BSE (WELLS *et al.*, 1987; SCOTT *et al.*, 1990; BRADLEY dan WILESMITH, 1993). Fibril yang sama dengan penyakit *scrapie* dan *scrapie-like* dari spesies hewan lain pernah terdeteksi pada sapi terinfeksi BSE (WELLS *et al.*, 1987; SCOTT *et al.*, 1990). Fibril tersebut lebih mudah terdeteksi pada pangkal otak dan basal nuclei dari cereberum daripada cerebellum atau cortex cerebralis (DAVIS *et al.*, 1991). Tingkat kejadian fibril berhubungan langsung dengan tingkat keparahan terbentuknya vakuolisasi sel pada pangkal otak dan cerebellum (SCOTT *et al.*, 1990). Sementara itu agen *scrapie-like* ini berkaitan erat dengan membran sel terutama pada jaringan syaraf. Agen ini berhubungan erat pula dengan penyakit prion isoform spesifik yang resisten terhadap protease K sehingga disebut dengan PrP^{res} (prion) (BRADLEY dan WILESMITH, 1993). Sebaliknya pada sapi normal, protein yang mempunyai sekuen yang sama dengan protein ini peka terhadap proteinase K dan dijumpai pada sel otak sapi sehat (KATZ *et al.*, 1995). Sementara itu, PrP dianggap sebagai bagian dari MBM daripada lemak, sehingga hipotesis berkembang bahwa penyebab BSE disebabkan akibat pemaparan pada sapi peka oleh agen *scrapie-like* dalam jumlah yang cukup yang terdapat di dalam MBM.

Pada tahun 1996 hipotesis tentang konsumsi MBM asal sapi terinfeksi diragukan perannya dalam kejadian penyakit BSE (PURDEY, 1996). Selama lima tahun terakhir, terjadi pergeseran dalam perdagangan MBM dunia. Sebagai contoh, Cina dan Meksiko telah menggantikan posisi Uni Eropa sebagai importir utama untuk tallow. Indonesia dan Cina berkembang menjadi importir MBM sedangkan Polandia dan Jepang telah menghentikan impor produk tersebut (RUDBECK, 2002). Meskipun pakan MBM terkontaminasi telah dikeluarkan dari mata rantai pakan dan penggunaan MBM sebagai pakan suplemen telah dilarang di Inggris dan Eropa daratan, ternyata wabah BSE masih tetap timbul dengan kasus kejadian yang cukup tinggi. PURDEY (1996) menambahkan bahwa munculnya penyakit BSE di Inggris disebabkan karena pemerintah Inggris mengharuskan peternak mengobati ternaknya dengan pestisida golongan organofosfat yang dikenal dengan phosmet pada dosis yang lebih tinggi daripada yang digunakan negara lain. Selanjutnya berkembang hipotesa baru bahwa pemaparan embrio sapi dengan dosis tinggi formula spesifik lipofilik dari organofosfat, seperti phthalimide dosis tinggi yang mengandung organofosfat phosmet, sebagai pemicu utama terjadinya deformasi prion protein dan munculnya BSE. Metabolit pengikat berbagai lokasi (*multisites*) dari organofosfat mempenetrasi fetus, bersamaan dengan proses fosforilasi berbagai lokasi aktif pada prion protein foetus. Kejadian yang sama juga pernah dilaporkan bahwa pengobatan dermatitis dengan hexachlorophene pada manusia menimbulkan absorpsi pada janin sehingga menimbulkan gejala vacuolar encephalopathy yang mirip dengan BSE (BOOTHBY, 1988).

Beberapa laporan menunjukkan bahwa terdapat kemungkinan perubahan histopatologis otak akibat kejadian neurotoksik oleh beberapa pestisida golongan organofosfat seperti khlorpirifos dan metil paration (SHERMAN, 1999). Dosis tunggal dari dimethoat, dikhlorfos dan metil paration yang masing-masingnya sebanyak 1/5 LD_{50} diberikan secara intraperitoneal kepada tikus putih dapat menunjukkan gejala klinis yang sama berupa eksitasi hebat (DESI *et al.*, 1998). COOKSON (2000) melaporkan bahwa organofosfat yang mencemari pakan dapat menimbulkan gangguan otak sehingga lebih peka terhadap prion.

Encephalopathy dapat disebabkan oleh banyak faktor, antara lain keracunan organofosfat (SHERMAN, 1999; COOKSON, 2000; PURDEY, 1992), gangguan metabolisme seperti "*milk fever*" (FORSLUND *et al.*, 1983), tanaman beracun (SEAWRIGHT *et al.*, 1998), *chronic wasting disease* (STEGELMEIER, *komunikasi pribadi*), Kuru, Creutzfeldt-Jakob's disease, Parkinson's dan Alzheimer's (LIBERSKI *et al.*, 1990)

dan agen mikroorganisme (virus, bakteri dan parasit) seperti penyakit *scrapie*. Prion (PrP) merupakan indikator utama untuk mendeteksi kejadian BSE. Prion (PrP^c) adalah prion protein isoform normal yang terdapat di dalam sel tubuh. PrP^c dapat berubah menjadi infeksius bila mengalami mutasi menjadi PrP^{sc} maupun PrP^{res} yang umumnya terdapat pada hewan mengalami spongioform encephalopathy (HOPE *et al.*, 1987; BRADLEY dan WILESMITH, 1993). Dari beberapa kelainan encephalopathy, prion (PrP^{sc} dan PrP^{res}) pernah dideteksi dari hewan yang mengalami keracunan organofosfat, *chronic wasting disease*, keracunan tanaman, *milk fever*, penyakit Kuru, dan CJD (PURDEY, 1992).

Indonesia sampai saat ini dinyatakan bebas dari penyakit BSE yang masih dikategorikan sebagai penyakit eksotik. Wabah penyakit BSE di Eropa (Inggris, Belanda dan Perancis) khususnya Inggris yang merupakan salah satu pemasok utama ternak dan produknya serta pakan bagi Indonesia. Oleh karena itu, agen penyakit BSE dikhawatirkan dapat terikut masuk ke wilayah Indonesia bila pengawasan tidak dilakukan secara baik. Disamping etiologi penyakit belum diketahui, petugas kesehatan hewan di Indonesia belum berpengalaman dalam mendiagnosa penyakit ini. Oleh karena itu perlu mempelajari penyakit secara komprehensif sehingga pengawasan dini penyakit dapat dilakukan dengan baik. Deteksi dini BSE adalah penting karena akan memudahkan pengendalian dan pemberantasan penyakit sesegera mungkin. Surveilans yang efektif tergantung kepada petugas lapang dan diagnosis laboratorium yang telah terbiasa dengan perubahan-perubahan klinis dan mikroskopis dari penyakit BSE serta laporan-laporan terhadap kasus-kasus yang mencurigai terhadap BSE.

MATERI DAN METODE

Koleksi sampel otak, serum dan pakan ternak

Sampel otak sapi perah betina dewasa umur 7–8 tahun dikoleksi sebanyak 30 (tiga puluh) buah dari rumah potong hewan setempat di Lembang, Jawa Barat. Koleksi sampel otak dilakukan selama 14 hari sesuai dengan jumlah sapi yang dipotong setiap harinya. Sampel otak selanjutnya dimasukkan ke dalam tabung plastik khusus untuk sampel patologi dan difiksasi dengan larutan 10% *buffered neutral formalin* (BNF, v/v) untuk diproses lebih lanjut.

Sampel serum dikoleksi dari sapi milik peternak setempat sebanyak 31 buah. Serum dikoleksi menggunakan venoject dan dimasukkan ke dalam tabung steril tanpa bahan pengawet. Selanjutnya dibiarkan terpisah dari butir darah pada suhu kamar dan serum dimasukkan ke dalam tabung steril sampai dilakukan analisa lebih lanjut.

Sampel pakan dikoleksi dari gudang koperasi peternakan sapi perah setempat dan beberapa lokasi peternakan di Lembang Jawa Barat. Sampel pakan terdiri dari pakan konsentrat dan hijauan pakan. Sampel dimasukkan ke dalam kantong sampel plastik dan dibawa langsung ke laboratorium untuk analisis lebih lanjut.

Analisis residu kimiawi pada sampel jaringan otak

Sampel jaringan otak dianalisis terhadap residu pestisida khususnya golongan organofosfat, untuk mengetahui penyebab terjadinya encephalopathy pada sapi perah. Analisis residu pestisida dilakukan dengan mengikuti metoda yang diterangkan oleh SCHENCK *et al.* (1996). Sebanyak 2,5 g sampel otak dihomogenasikan dengan menggunakan blender khusus dan dilarutkan ke dalam pelarut organik 25 ml asetonitril. Selanjutnya homogenat disentrifuse pada kecepatan 3000 rpm selama 5 menit. Supernatan dimurnikan melalui kolom mini Sep Pack C_{18} dan florisil, dielusi dengan 2% dietil eter dalam petroleum benzena, dievaporasi dengan rotavapor Büchii sampai 0,5 ml volume, dan kemudian dilarutkan kembali dengan heksan sampai volume 5 ml. Larutan sampel (analit) siap untuk diinjeksikan ke dalam GC-ECD masing-masing sebanyak 5 µl.

Analisis cemaran kimiawi pada sampel pakan

Sampel pakan sapi perah sebanyak 19 sampel terdiri dari bahan konsentrat (dedak, polar, tepung ikan dan pakan jadi) dan hijauan pakan ternak (rumput, daun-daunan dan limbah sayuran). Analisis cemaran pestisida dilakukan mengikuti metoda yang dikembangkan oleh CASANOVA (1996). Sampel sebanyak 10 gram diekstraksi dengan larutan aseton, dimurnikan melalui kolom SepPak C_{18} dan kembali dilarutkan ke dalam aseton. Ekstrak pakan yang dihasilkan dievaporasi dengan rotavapor Büchii, dielusi dengan larutan aseton dan etil asetat (50:50), dan selanjutnya dimurnikan kembali ke dalam kolom florisil yang telah dikondisikan dalam larutan petroleum eter. Elusi lebih lanjut untuk analit dilakukan dengan menggunakan campuran larutan diklorometan, asetonitril dan heksan. Eluan tersebut dievaporasi hingga kering (0,5 ml volume) dan diencerkan dengan 2 ml heksan untuk diinjeksikan ke dalam *gas chromatography – electron capture detector* (GC-ECD).

Analisis residu pestisida dalam serum sapi perah

Analisis residu pestisida dalam serum sapi perah bertujuan untuk mengetahui status kontaminasi pestisida khususnya golongan organofosfat pada ternak sapi perah di sekitar kawasan pengamatan. Analisis residu pestisida dalam serum sapi perah dilakukan dengan menggunakan *gas chromatography* (GC) dan mengikuti metoda yang dikembangkan oleh BURSE *et al.* (1990). Serum diekstraksi dengan pelarut organik metanol dan dimurnikan melalui kolom florisil. Analit dielusi dengan larutan dietil eter dalam petroleum eter yang diikuti evaporasi sampai kering (0,5 ml volume). Selanjutnya eluen diencerkan dengan 2 ml heksan untuk diinjeksikan ke dalam GC-ECD.

Gambaran histopatologi neuropatologi pada otak sapi

Sampel organ otak sebanyak 26 buah yang telah difiksasi dalam larutan 10% *buffred neutral formalin* diiris secara melintang pada ketebalan 3–5 mm untuk di*embedding* ke dalam larutan parafin *wax*. Jaringan otak yang telah di*embedding* kemudian disayat halus hingga ketebalan 5–7 µm dengan menggunakan mikrotom. Pewarnaan dilakukan dengan menggunakan pewarnaan rutin hematoksilin eosin (HE) dan perubahan mikroskopis diamati di bawah mikroskop cahaya.

Neuropatologi pada tikus percobaan

Tujuan percobaan ini adalah mempelajari gambaran patologi pada susunan syaraf pusat yang diakibatkan oleh intoksikasi pestisida golongan organofosfat (klorpirifos metil) pada tikus. Sebanyak 72 ekor tikus putih betina dewasa dari jenis Wistar dengan kisaran bobot hidup 100–150 g dibagi sama banyak menjadi tiga kelompok. **Kelompok-1**: diintoksikasi dengan klorpirifos metil pada dosis 1/8 LD_{50}; **Kelompok-2**: diintoksikasi dengan klorpirifos metil pada dosis 1/5 LD_{50}; **Kelompok-3**: merupakan hewan kontrol tanpa intoksikasi. Tikus percobaan diintoksikasi dengan klorpirifos metil secara intraperitoneal sebanyak 2 kali setiap minggu dalam kurun waktu 6 minggu berturut-turut.

Nekropsi dilakukan terhadap seluruh tikus percobaan baik yang dijumpai mati dalam masa intoksikasi maupun yang diterminasi pada akhir percobaan. Tikus diterminasi setiap minggu selama 6 minggu pertama pada saat intoksikasi dan pada hari ke-0, 1, 3, 5, 7, 14 dan 21 setelah intoksikasi terakhir dilakukan untuk pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis. Kelainan patologis keracunan organofosfat (OP) dipelajari melalui pemeriksaan gejala klinis, perubahan patologi anatomis dan histopatologis terhadap masing-masing tikus percobaan. Gejala klinis dan pertambahan bobot hidup diamati dan dicatat setiap hari untuk menetapkan diagnosa.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis residu pestisida pada pakan, serum dan jaringan otak

Encephalopathy merupakan kelainan fungsi sistem syaraf pusat (secara klinis maupun patologis) yang dapat disebabkan oleh berbagai faktor. Salah satu penyebabnya adalah penyakit BSE, akan tetapi etiologinya masih dalam perdebatan. Hipotesis penyebab BSE berawal dari laporan WILESMITH *et al.* (1988; 1991) dan BRADLEY dan WILESMITH (1993) yang menyampaikan bahwa kasus BSE berasal dari pemaparan sapi terhadap agen *scrapie-like* yang terdapat dalam bahan pakan berupa tepung daging dan tepung tulang. Sapi Frisien Holstein lebih peka terhadap agen *scrapie-like* (BRADLEY dan WILESMITH, 1993). Namun kemudian diketahui terdapat variasi kejadian BSE secara geografis (antara dataran tinggi dan rendah) yang tidak konsisten dengan penggunaan lemak di dalam pakan.

Prion diduga sebagai agen infektif yang menyebabkan timbulnya penyakit BSE adalah suatu senyawa proteinaceous tanpa kandungan asam nukleat tetapi karena suatu hal mampu bermultiplikasi dalam tubuh hospes setelah bergabung dengan prion protein yang secara normal terdapat di dalam syaraf, dikenal sebagai "PrP" (HUGE *et al.*, 1987). Prion diperkirakan membentuk fiber kecil atau fibril yang merupakan ciri dari jaringan otak terinfeksi BSE. Prion (PrP^{c}) adalah prion protein isoform normal yang terdapat di dalam sel tubuh, dan dapat berubah menjadi infeksius bila mengalami mutasi menjadi PrP^{sc} maupun PrP^{res} yang umumnya terdapat pada hewan mengalami spongioform encephalopathy (HOPE *et al.*, 1987; BRADLEY dan WILESMITH, 1993). Meningkatnya jumlah pemotongan sapi dengan gejala BSE di Inggris ternyata negatif terhadap BSE setelah dilakukan pemeriksaan *post mortem* karena tidak ditemukannya fibril tersebut (PURDEY, 1992).

Sebagaimana disampaikan sebelumnya bahwa encephalopathy dapat disebabkan oleh banyak faktor, antara lain keracunan organofosfat (SHERMAN, 1999; COOKSON, 2000; PURDEY, 1992), gangguan metabolisme seperti "*milk fever*" (FORSLUND *et al.*, 1983), tanaman beracun (SEAWRIGHT *et al.*, 1998), *chronic wasting disease* (STEGELMEIER, *personal communication*), Kuru, Creutzfeldt-Jakob's disease, Parkinson's dam Alzheimer's (LIBERSKI *et al.*, 1990) dan agen mikroorganisme (virus, bakteri dan parasit) seperti penyakit *scrapie*. Dari penyebab encephalopathy, prion (PrP^{sc} dan PrP^{res}) pernah

terdeteksi dari hewan yang mengalami keracunan organofosfat, *chronic wasting disease*, keracunan tanaman, *milk fever*, penyakit Kuru, dan CJD (PURDEY, 1992). Sementara itu Indonesia masih dinyatakan bebas dari penyakit BSE, tetapi antisipasi terhadap kemungkinan munculnya penyakit ini perlu dilakukan mengingat pengawasan kesehatan hewan lapangan belum berpengalaman dalam mendeteksi penyakit BSE. Oleh karena itu penelitian ini dilakukan untuk mempelajari kejadian encephalopathy pada ternak ruminansia sebagai titik awal dalam mempelajari penyakit spongioform encephalopathy pada ternak.

Berdasarkan laporan yang disampaikan oleh KOMPAS (2003) bahwa telah terjadi kematian sapi perah sebanyak 400 ekor tanpa diketahui penyebabnya antara bulan Nopember 2002 sampai Maret 2003 di Lembang, Jawa Barat, maka kunjungan lapang dan analisis laboratorium dilakukan untuk mengetahui penyebab kematian sapi perah tersebut. Hasil pengamatan lapangan ternyata hanya 223 ekor sapi perah yang mangalami kematian selama 7 bulan antara September 2002 sampai Maret 2003 (DINAS PETERNAKAN JAWA BARAT, *komunikasi pribadi*). Sementara itu, 167 ekor sapi lainnya dilaporkan akibat potong paksa pada ternak produktif. Hasil diagnosa yang dilakukan oleh Dinas Peternakan Propinsi Jawa Barat terhadap 223 ekor sapi perah yang dilaporkan mati tertera pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil diagnosa penyebab kematian sapi perah selama bulan September 2002 – Maret 2003*

Diagnosa	Jumlah kematian (ekor)	Mortalitas (%)
Displasia abomasum	49	21,99
Tympani	36	16,15
Milk fever	29	13,00
Abses	24	10,77
Keracunan	22	9,82
Ketosis	11	4,94
Lain-lain*)	52	23,33
Jumlah	223	100

Keterangan:
*)Termasuk enteritis, gastritis, gastroenteritis, pericarditis dan lain - lain yang masing-masing berjumlah 1 – 6 ekor
Data diolah dari Laporan Dinas Peternakan Jawa Barat

Tabel 1 menunjukkan bahwa kematian 223 ekor sapi perah disebabkan oleh gangguan fungsi abomasum (21,99%), tympani (16,15%), milk fever (13%), abses (10,77%), keracunan (9,82%), ketosis (4,94%) dan lainnya (23,33%) yang terdiri dari ketosis, fraktura, distokia, sepsis, pneumonia, mati bangkar, perikarditis, gastritis, hematuria, torsio, hypofungsi ovarium dan paralisis. Dari sejumlah penyebab kematian sapi tersebut terdapat beberapa penyakit yang dapat menimbulkan gangguan syaraf pusat yaitu *milk fever* (13%), keracunan (9,82%) dan ketosis (4,94%). Dua diantaranya pernah dilaporkan terdeteksi prion penyebab BSE yaitu *milk fever* (13%) dan keracunan (9,82%).

Sehubungan dengan laporan tentang kasus kematian dan potong paksa ternak produktif pada sapi perah tersebut dengan tingginya angka kejadian penyakit *milk fever* dan keracunan, maka analisis kontaminasi dan residu pestisida pada pakan, serum dan jaringan otak dilakukan untuk mempelajari kemungkinan timbulnya gangguan syaraf pusat (encephalopathy) pada ternak di Lembang, Jawa Barat. Sampel yang terdiri dari pakan (konsentrat dan hijauan), serum dan jaringan otak dikoleksi dari lokasi peternakan setempat dimana asal ternak yang mati dan atau dipotong paksa dipelihara sebelumnya. Hasil analisis kontaminasi dan residu pestisida pada pakan, serum dan jaringan otak terlihat pada Tabel 2 dan 3.

Hasil analisis residu pestisida dalam pakan (Tabel 2) menunjukkan bahwa kedua golongan pestisida (OC dan OP) terdeteksi pada seluruh sampel pakan yang terdiri dari hijauan dan pakan jadi. Rataan total residu pestisida dalam pakan hijauan (35,5 ppb) terlihat lebih tinggi dibandingkan dengan pakan jadi (13,8 ppb). Pada pakan hijauan, total residu pestisida golongan OC (18,7 ppb) lebih tinggi dibanding OP (16,8 ppb). Sebaliknya pada pakan jadi, residu OP (12,0 ppb) lebih tinggi dari OC (1,8 ppb). Lindan merupakan cemaran pestisida (84,2%) yang paling banyak terdeteksi pada sampel pakan hijauan yang kemudian diikuti oleh heptakhlor (42,1%). Sementara itu, pakan jadi lebih banyak terkontaminasi oleh ronnel (100%), lindan (100%) dan diazinon (83,3%). Hasil ini menunjukan bahwa OC lebih banyak mencemari hijauan dibanding OP, yang kemungkinan disebabkan telah terjadinya pencemaran pada tanah di lingkungan peternakan mengingat senyawa ini sulit mengalami degradasi. Sementara itu OP lebih banyak dijumpai pada pakan jadi dimana OP tersebut digunakan sebagai pembasmi rayap.

Dari analisis cemaran kimiawi pada pakan baik berupa hijauan maupun konsentrat, maka dikhawatirkan bahwa kesehatan ternak di sekitar kawasan peternakan sapi perah di Lembang dapat terpengaruh. Oleh karena itu, status kesehatan ternak terhadap cemaran pestisida dipelajari dengan melakukan analisis residu pestisida pada serum dan jaringan otak sapi perah untuk mengetahui penyebab kematian dan atau potong paksa sapi perah beberapa waktu yang lalu. Sebanyak 25 sampel serum dikoleksi dari 9 peternakan sapi perah dan 31 sampel jaringan otak dikoleksi dari rumah potong setempat.

Hasil analisis pestisida pada serum dan jaringan otak (Tabel 3) menunjukkan bahwa residu kedua

golongan pestisida terdeteksi dari serum dan jaringan otak sapi perah asal Lembang, Jawa Barat. Rataan total residu pestisida golongan OP (85,6 dan 22,7 ppb) terlihat lebih tinggi dari golongan OC (16,7 dan 5,1 ppb) pada serum dan jaringan otak tersebut. Secara umum, konsentrasi pestisida yang terdeteksi dari serum masih dalam batas aman untuk kesehatan ternak karena masih berada dibawah nilai LD_{50} (SEAWRIGHT, 1989). Berdasarkan distribusi pencemarannya, residu pestisida golongan OC lebih luas (12,9%-93,5%) dibandingkan dengan OP (9,7%-41,9%) dari 31 sampel serum yang dianalisis. Secara berurutan distribusi pencemaran residu golongan OC adalah heptaklor (93,5%), lindan (90,3%), aldrin (25,8%) dan endosulfan (12,9%) pada golongan OC dan golongan OP adalah diazinon (41,9%) dan CPM (9,7%). Terdapat satu sampel serum yang tercemar oleh residu pestisida OC melebihi nilai LD50 yaitu heptakhlor (178,4 ppb) dan dua sampel serum oleh golongan OP yaitu diazinon (594,6 ppb) dan CPM (420,7 ppb). Untuk ketiga sapi tersebut perlu mendapatkan perhatian karena akan terjadinya keracunan pestisida yang dapat menimbulkan gangguan sistem syaraf pusat maupun perubahan patologis lainnya.

Residu pestisida dalam serum berkaitan erat dengan distribusinya di dalam jaringan tubuh dan tingkat cemaran pestisida dalam pakan dan air minum yang bertindak sebagai sumber pencemaran pestisida bagi kesehatan ternak dan produknya. Selanjutnya pestisida di dalam serum akan didistribusikan ke berbagai organ tubuh melalui sistem sirkulasi dan terakumulasi pada berbagai organ tubuh termasuk jaringan otak. Pestisida golongan OC bersifat larut dalam lemak (lipofilik) tetapi tidak larut dalam air. Kebanyakan golongan OC tidak dimetabolisasi dengan cepat di dalam tubuh tetapi akan terakumulasi di dalam jaringan lemak (adiposa). Oleh karena itu, senyawa ini sering terdeteksi dari jaringan lemak dan hati. Kedua jaringan tersebut sering digunakan sebagai indikator untuk mendiagnosa keracunan pada hewan. Efek toksik OC tidak terjadi secara akut, melainkan secara kronis karena sulit didegradasi baik di dalam tubuh maupun alam bebas. Organoklorin cenderung bereaksi dengan serabut syaraf motor dan sensori sehingga yang sering menimbulkan gejala tremor otot halus (RADELEFF, 1970). Gejala klinis keracunan umumnya meliputi stimulasi dan depresi sistem syaraf pusat yang dikenal dengan tipe neuromuskuler (SEAWRIGHT, 1989).

Tabel 2. Konsentrasi total residu pestisida dalam pakan sapi perah di Lembang, Jawa Barat

Parameter	Hijauan (*n = 19*)			Pakan jadi (*n = 6*)		
	Total residu per golongan		Total residu	Total residu per golongan		Total residu
	Organokhlorin	Organofosfat		Organokhlorin	Organofosfat	
n-positif	16	9	16	6	6	6
χ-positif	22,2	35,5	57,7	1,8	12,0	13,8
Rata-rata	18,7	16,8	35,5	1,8	12,0	13,8
Kisaran	0 - 133,9	0 - 106,8	0 -172.9	0,2 - 3,9	1 – 32,5	1,2 – 35,3

Tabel 3. Konsentrasi total residu pestisida dalam serum dan jaringan otak sapi perah di Lembang, Jawa Barat

Parameter	Serum (*n = 31*)			Otak (*n = 25*)		
	Total residu per golongan		Total residu	Total residu per golongan		Total residu
	Organokhlorin	Organofosfat		Organokhlorin	Organofosfat	
n-positif	30 (96,8%)	16 (51,6%)	30	17 (68%)	9 (36%)	18
χ-positif	17,3	165,9	183,2	7,6	63,1	70,7
Rata-rata	16,7	85,6	102,3	5,1	22,7	27,8
Kisaran	0,6 - 189,1	1,7 - 594,6	0,6 – 611,2	0,006-37,5	11,6 - 222,4	0,006-259,9

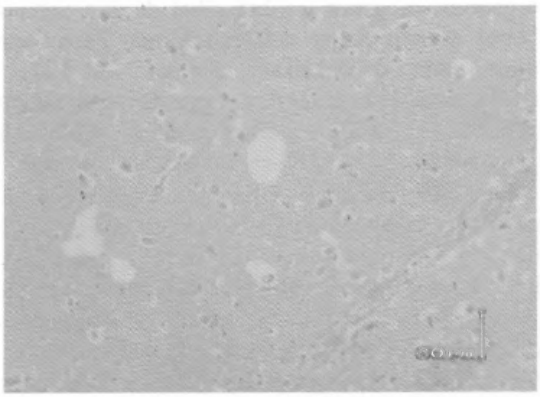
Sebaliknya golongan OP sangat cepat dimetabolisme dan diekskresikan, sehingga keracunan subakut dan kronik jarang terjadi. Sehubungan dengan terjadinya hambatan pada enzim asetilkolin esterase, maka pengaruh OP dapat bersifat kumulatif akibat pemaparan yang berlangsung lama. Efek toksik golongan OP terjadi pada susunan syaraf pusat melalui hambatan pelepasan enzim esterase yang dapat menimbulkan hidrolisa pada asetilkolin (SEAWRIGHT, 1989). Pada Tabel 3 terlihat bahwa rataan total residu OP (85,6 ppb) lebih tinggi daripada residu OC (16,7 ppb). Meskipun sebaran distribusi residu OP hanya mencapai 51,6% dari 31 sampel serum yang lebih rendah dibanding residu OC (96,8%), kandungan residu OP terlihat cukup tinggi berkisar antara 1,7 – 594,6 ppb. Dalam hal ini terdapat 11 ekor sapi perah yang memiliki kandungan residu OP cukup tinggi (101,5 – 594,6 ppb) di dalam serumnya dan dua ekor sapi perah diantaranya memiliki kandungan residu OP yang melebihi nilai LD50 yaitu diazinon (594,6 ppb) dan CPM (420,7 ppb). Kedua ekor sapi tersebut dikhawatirkan akan mengalami keracunan pestisida golongan OP. Tingginya kandungan residu OP pada serum sapi menunjukkan bahwa pestisida golongan OP tersebut lebih sering digunakan secara langsung di dalam kegiatan peternakan baik sebagai pengendali hama pada pakan ternak maupun pengusir lalat.

Meskipun distribusi residu pestisida maupun efek toksik pestisida telah banyak dilaporkan (INDRANINGSIH *et al.*, 1993; CORRIGAN dan SENEVIRATNA, 1990), residu pestisida dan perubahan histopatologis pada jaring otak belum pernah dilaporkan di Indonesia. Oleh karena itu dalam penelitian ini dipelajari perubahan-perubahan keracunan pestisida pada jaringan otak. Rataan konsentrasi total residu OP (22,7 ppb) lebih tinggi dibandingkan dengan OC (5,1 ppb) pada jaringan otak. Tingkat rataan total residu pestisida yang terdeteksi dari jaringan otak diperkirakan tidak menimbulkan gejala keracunan mengingat setiap jenis pestisida yang terdeteksi masih berada dibawah nilai LD_{50} (SEAWRIGHT, 1989). Pestisida golongan OP memiliki sifat kimiawi yang mudah terdegradasi oleh suhu, pH dan cahaya (COULIBALY and SMITH, 1993; 1994). Tingginya kandungan residu OP pada jaringan tubuh hewan menunjukkan bahwa pestisida jenis OP ini lebih banyak dimanfaat secara langsung di lingkungan peternakan sapi perah untuk *dipping* dan pengusir lalat. Namun demikian terdapat tiga ekor sapi perah yang memiliki rataan total residu OP yang cukup tinggi pada jaringan otak dengan kisaran antara 51,9 – 222,4 ppb. Ketiga sapi tersebut dikhawatirkan mengalami keracunan pestisida golongan OP dan kemungkinan terjadi kerusakan patologis pada jaringan otaknya.

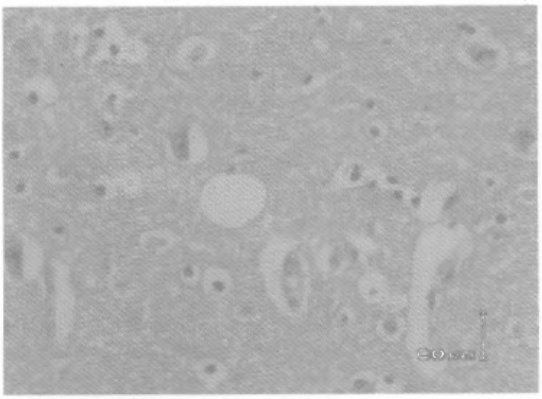
Gambaran neuropatologi pada sapi perah

Sebanyak 26 sampel otak sapi perah jenis Frisien Holstein dewasa dikoleksi secara acak dari rumah potong hewan setempat di Lembang, Jawa Barat. Pemotongan sapi perah dikarenakan sapi memasuki usia non-produktif, hewan afkir, untuk memenuhi kebutuhan keluarga atau karena alasan tertentu lainnya. Secara makroskopis tidak ditemukan kelainan spesifik yang menunjukkan sapi mengalami gangguan fungsi system syaraf pusat. Secara mikroskopis terdapat beberapa kelainan histologis jaringan otak pada beberapa sampel jaringan yang diamati. Perubahan mikroskopis umumnya terdiri dari vakuolisasi jaringan ekstraseluler otak; fokal nekrosis; perdarahan; dilatasi basement membrane pada pembuluh darah; khromatolysis, pyknosis dan lysis sel neuron; pyknosis dan lysis dari inti sel neuron dan myelinasi. Kerusakan jaringan otak tidak diikuti dengan infiltrasi sel radang, sehingga kerusakan otak dapat diperkirakan akibat agen non-infeksius. Hasil pemeriksaan mikroskopis tertera pada Tabel 4.

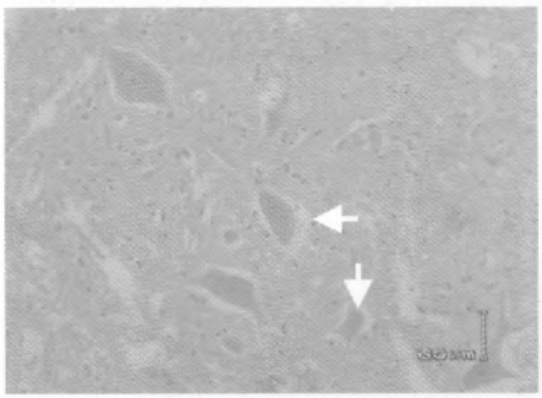
Hasil tersebut mengindikasikan bahwa sebagian besar sapi perah mengalami kerusakan jaringan otak berupa encephalopathy. Encephalopathy disebabkan karena pencemaran pestisida, karena hampir seluruh sampel yang diamati tidak menunjukkan adanya infiltrasi sel radang seperti sel limfosit, eosinofil maupun neutrofil (Gambar 1, 2, 3 dan 4). Kerusakan sel neuron berupa nukleolysis, khromatolysis dan vakuolisasi menjadi indikasi bahwa telah terjadi spongioform pada ternak-ternak yang terpapar pestisida. Kelainan otak yang sama pernah pula dilaporkan oleh WELLS *et al.* (1987) bahwa spongioform encephalopathy ditemukan pada beberapa ekor sapi perah FH yang diduga disebabkan oleh penyakit BSE. Vakuolisasi pada *grey matter* dan neuron merupakan perubahan histopatologis yang konsisten yang ditemukan pada jaringan otak sapi tersebut. Untuk mengetahui keterkaitan encephalopathy pada penelitian ini terhadap kemungkinan ditemukannya penyakit BSE, maka penelitian lebih lanjut perlu dilakukan dengan menerapkan berbagai teknik pewarnaan histologis, imunohistokima dan indentifikasi keberadaan prion abnormal. Penelitian ini merupakan penelitian pendahuluan dalam rangka mempelajari keberadaan penyakit yang disebabkan prion (*Prion Diseases*) yang meliputi BSE, *transmissible spongioform encephalopathy*, CWD dan lain-lain.



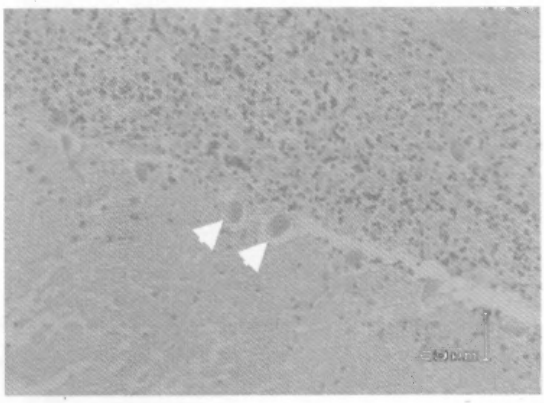
Gambar 1. Perubahan histopatologis jaringan otak sapi perah (1=vakuolasi; 2=nekrosis jaringan otak; 400x, HE)



Gambar 2. Perubahan histopatologis jaringan otak sapi perah (1= vakuolisasi; nekrosis neuron; 400x, HE)



Gambar 3. Perubahan histopatologis berupa nekrosis neuronal pada jaringan otak sapi perah (400x, HE)



Gambar 4. Perubahan histopatologis pada sel Purkinje berupa nekrosis pada jaringan otak (400x, HE)

Prion protein seluler normal secara alami dapat ditemui pada banyak jaringan, termasuk ortak dan jaringan syaraf lainnya, tetapi fungsi prion normal ini tidak diketahui pasti. Prion protein normal tersebut dapat berubah dan saling bergabung untuk menimbulkan penyakit penyebab prion (KAPLAN, 2005). Teori yang berkembang saat ini adalah prion berubah bentuk dan berganda menjadi bentuk abnormal yang berakumulasi di dalam otak dan menimbulkan lesio pada otak. Jika prion abnormal tersebut ditransmisikan dari hewan terserang ke hospes baru, prion tersebut dapat merangsang prion yang terdapat pada hospes baru untuk berlipat-ganda secara abnormal (KAPLAN, 2005). Pada saat ini terdapat tiga jenis penyakit prion pada ternak yaitu Scrapie yang menyerang domba dan kambing, *Transmissible Mink Encephalopathy* yang menyerang mink dan *Chronic Wasting Disease* (CWD) adalah TSE pada rusa dan elk.

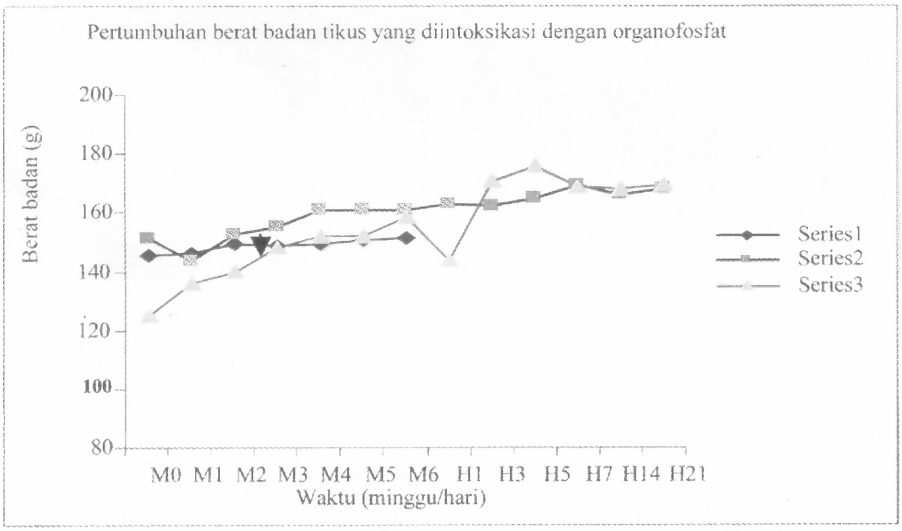
PURDEY (1992) melaporkan bahwa penyebab timbulnya penyakit BSE dapat disebabkan oleh faktor lingkungan dan hambatan genetik. Keracunan akut oleh organofosfat mengakibatkan syaraf menjadi tidak terkendali karena keluarnya asetilkholin secara berlebihan pada synapsis (percabangan syaraf). Sementara itu keracunan akut umumnya berlangsung secara cepat hanya dalam beberapa jam setelah pemaparan, beberapa tipe organofosfat diketahui menimbulkan pengaruh neurotoksik kronik pada mamalia sering dalam beberapa minggu, bulan dan bahkan tahunan setelah pemaparan. Kejadian keracunan kronik dicirikan dengan paralisis pada syaraf ascendent. Pola degenerasi syaraf ini pada keracunan organofosfat mirip dengan beberapa tipe penyakit motor neuron seperti ataksia dan sklerosis.

Neuropatologi keracunan organofosfat pada tikus percobaan

Berdasarkan pengamatan histopatologis, kelainan patologis pada otak sapi perah asal Lembang, Jawa Barat yang terdiri dari degenerasi dan nekrosis otak (encephalopathy), dapat disebabkan karena tingginya

kandungan residu pestisida golongan OP dalam jaringan otak tersebut. Untuk mempelajari lebih lanjut mengenai kejadian encephalopathy akibat keracunan pestisida OP, maka sebanyak 72 ekor tikus betina dewasa diintoksikasi dengan klorpirifos metil. Gambar 5 menunjukkan bahwa intoksikasi dengan klorpirifos metil sebanyak dua kali setiap minggu tidak menimbulkan pengaruh yang nyata terhadap kenaikan bobot hidup (bb) tikus. Perlakuan dengan CPM sebesar 1/5 LD_{50} (18,75 mg/kg BH) mengakibatkan penurunan laju pertumbuhan bobot hidup selama minggu pertama penyuntikan dan kembali tumbuh normal pada minggu berikutnya. Sebaliknya kelompok kontrol tumbuh secara normal.

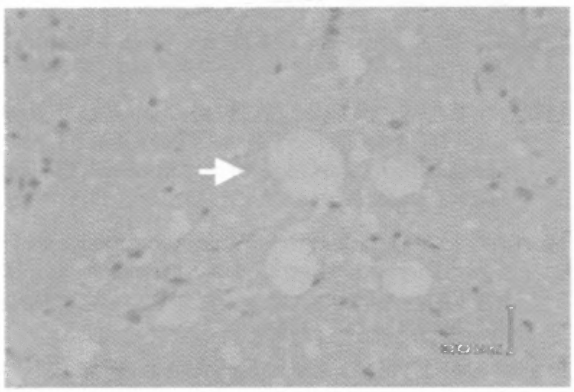
Kelompok kontrol tidak menunjukkan gejala klinis, kelainan patologis-anatomis maupun histopatologis yang spesifik terhadap keracunan pestisida golongan organofosfat. Tikus terlihat sehat dengan pertambahan bobot normal tanpa kelainan klinis. Pada kelompok tikus yang diintoksikasi dengan 1/8 LD_{50} CPM (**Kelompok-1**) selama 6 minggu berturut-turut terjadi penurunan bobot hidup harian setiap setelah penyuntikan tikus. Sebanyak 14 dari 24 ekor dalam kelompok tersebut ditemukan mati sebelum penyuntikan dihentikan pada minggu ke-6. Gejala klinis umumnya berupa kekurusan, lemah, ataksia, kyposis, bulu kusam dan berdiri, serta bintik putih dan/atau warna putih pada bola mata. Setelah intoksikasi dihentikan terlihat adanya pertambahan bobot hidup normal pada tikus yang dapat bertahan hidup selama perlakuan. Secara klinis, kerusakan mata mulai terjadi pada minggu-1 setelah dua kali penyuntikan CPM dan semakin parah hingga minggu-6 dimana terjadi ruptur (kerusakan) dan keputihan pada retina bola mata.



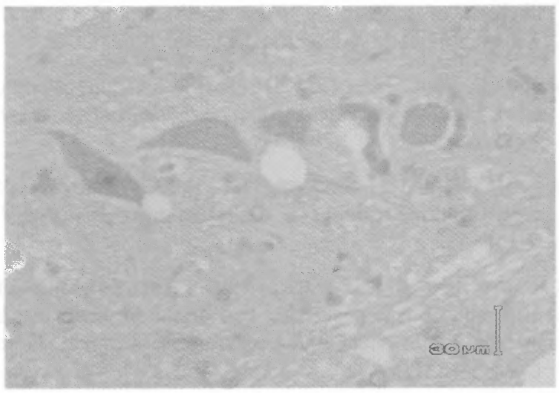
Gambar 5. Pertambahan bobot hidup tikus selama intoksikasi dengan organofosfat (M = minggu pemberian pakan uji; H = hari setelah pergantian pemberian pakan uji; series 1 = kontrol; series 2 = kelompok 1; series 3 = kelompok)

Keputihan retina mata mulai menghilang 3 hari setelah penghentian intoksikasi. Perubahan patologis anatomis terlihat pada organ hati, ginjal, otak dan mata berupa pembengkakan limpa, pembengkakan hati, kerapuhan dan nekrosis bagian permukaan hati, hiperemia dan petichiae pada ginjal, hiperemia otak, dan nekrosis bola mata. Secara mikroskopis kerusakan jaringan umumnya terjadi pada hati, ginjal, mata dan otak. Hati mengalami fokal koagulatif nekrosis sel hati, kongesti, dilatasi sinusoid dan hemoragi. Ginjal mengalami nekrosis tubular proximalis, kongesti, protein cast dan nephrosis. Otak mengalami encephalopathy dengan perubahan mikroskopis berupa vakuolisasi, fokal nekrosis, hemoragi, nekrosis sel neuron dan chromatolysis. Sedangkan mata mengalami nekrosis tunika muskularis, nekrosis sel mukosa mata, nekrosis bola mata, desquamasi sel epitel mukosa, dan infiltrasi sel eosinofil. Kelainan mikroskopis jaringan otak terlihat pada Tabel 4.

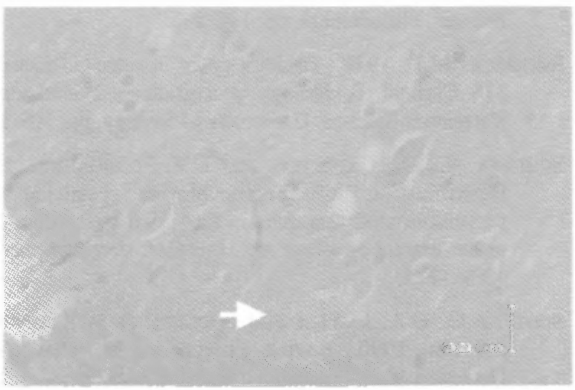
Gejala klinis dan kelainan patologis yang sama terlihat pula pada kelompok tikus yang diintoksikasi dengan 1/5 LD_{50} CPM (**Kelompok-2**). Kerusakan bola mata dapat terjadi secara simetrik pada kedua sisi yang terdiri dari bintik putih, nekrosis, pembengkakan bola mata dan secara mikroskopis menunjukkan kelainan yang sama dengan kelompok-1.



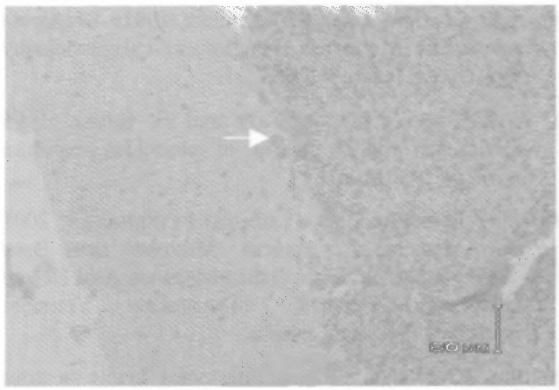
Gambar 6. Vakuolisasi jaringan otak tikus putih yang diintoksikasi dengan klorpirifos metil (400x, HE)



Gambar 7. Perubahan histopatologis jaringan otak tikus putih yang diintoksikasi dengan klorpirifos metil (1= vakuolisasi; 2=nekrosis neuron; 400x, HE)



Gambar 3. Nekrosis neuron pada otak tikus putih yang diintoksikasi dengan klorpirifos metil (400x, HE)



Gambar 4. Perubahan histopatologis pada sel Purkinje berupa nekrosis pada jaringan otak tikus putih (400x, HE)

KESIMPULAN

Hasil pengamatan histopatologis pada jaringan otak menunjukkan bahwa pestisida golongan OP dapat menimbulkan kerusakan pada jaringan otak yang mengakibatkan timbulnya encephalopathy dengan gejala spongioporm encephalopathy. Kelainan histopatologis pada jaringan otak yang sama juga dijumpai pada jaringan otak sapi perah yang dikoleksi dari lapangan di Lembang, Jawa Barat. Dengan demikian, encephalopathy yang ditemukan pada sampel jaringan otak sapi tersebut diperkirakan akibat terjadinya keracunan pestisida golongan organofosfat yang mencemari lingkungan peternakan, pakan dan air minum. Namun demikian indikasi spongioform encephalopathy pada sapi tersebut perlu diwaspadai dan menjadi perhatian mengingat masih terdapat kemungkinan lain penyebab timbulnya encephalopathy pada ternak.

DAFTAR PUSTAKA

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST. 1978. In Official Methods of Analysis. Edited by W. Hoewitz. Association of Official Analytical Chemist. Washington.

BOOTHBY, C.B. 1988. Bovine spongioform encephalopathy: Possible toxicty link?. *Vet. Rec.* 122: 95.

BRADLEY, R. and J.W. WILESMITH. 1993. Epidemiology and control of bovine spongioform encephalopathy (BSE). *Brit. Med. Bull.* 49: 932–959.

BURSE, V.W., S.L. HEAD, M.P. KORVER, P.C. MCCLURE and J.F. DONAHUE. 1990. Determination of selected

organochlorine and polychlorinated biphenyls in human serum. *J. Anal. Toxicol.* 14: 137–142.

CASANOVA, J.A. 1996. Use of solid phase extraction disks for analysis of moderately polar and nonpolar in high moisture foods. *J. AOAC International* 79: 936-940.

COOKSON, C. 2001. Mad Cow Disease: Where did it come from. *http//www.sheepandgoat.com/antheltable.html* (18 Juli 2006).

CORRIGAN, P.J. and P. SENEVIRATNA. 1990. Occurrence of organochlorine residues in Australian meat. *Aust. Vet. J.* 67: 56–58.

COULIBALY, K. and J.S. SMITH. 1993. Thermostability of organophosphate pesticides and some of their major metabolites in water and beef muscle. *J. Agric. Food Chem.* 41: 1719-1723.

COULIBALY, K. and J.S. SMITH, 1994. Effect of pH and cooking temperature on the stability of organophosphate pesticides in beef cattle. *J. Agric. Food Chem.* 42: 2035-2039.

DAVIS, A.J., A.L. JENNY and L.D. MILLER, 1991. Diagnostic characteristic of bovine spongioform encephalopathy. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7: 266–271.

DESI, T., L. LAGIMATEYI, A. PAPP and H. SHULZ. 1996. Experimental model studies of pesticides exposure. *Neurology* 19: 611–616.

DIREKTORAT JENDERAL BINA PRODUKSI PETERNAKAN. 2001. Batas Maksimum Cemaran Mikroba dan Batas Maksimum Residu dalam Bahan Makanan Asal Hewan. Direktorat Kesehatan Masyarakat Veteriner, Departemen Pertanian. Jakarta.

FORSLUND, K. *et al.* 1983. Cholinesterase levels in cows suffering from parturient paresis. *Acta. Vet. Scand.* 24: 185–199.

GOEBEL, H., S. GORBACH, W. KAUF, R.H. RIMPAU and H. HUTTENBACH. 1982. Properties, effects, residues and analytics of insecticides endosulfan. *Residues Review.* 83: 56-88.

HOPE *et al.* (1987). The molecular Biology of Scrapie. *Trends in Neurosciences* 10: 149–151.

ILYAS, L., K. WIDODO, I. PRANAYA dan K. SUPARNO. 1986. Penelitian kadar residu pestisida dalam susu sapi perah dari daerah Jawa Tengah. *Medika* 12: 1097-1100.

INDRANINGSIH, C.S. MCSWEENEY and P.W. LADDS. 1993. Residues of endosulfan in the tissues of lactating goats. *Aust. Vet. J.* 70: 59-62.

INDRANINGSIH dan Y. SANI. 2004. Residu pestisida pada produk sapi: Masalah dan alternatif penanggulangannya. *Wartazoa* 14: 1-13.

KATZ, J.B., A.L. SHAFER and J.M. MILLER. 1995. Production of antiserum for the diagnosis of scrapie and bovine spongioform encephalopathy using a baculovirus expressed prion protein antigen. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7: 245–247.

KAPLAN, K. 2005. TSEs touch off ARS research. In Northern Plains Area 2004 Research Highlights. United State Department of Agriculture – Agricultural Research Service 2005. pp: 26–31.

KOMPAS. 2003. Kematian massal sapi perah di Lembang. 7 April 2003.

LIBERSKI, P.P., R. YANAGIHARA, D.M. ASHER, C.J. GIBBS JR. and D. CARLETON. 1990. Reevaluation of the ultrastructural pathology of experimental Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain* 113: 121-137.

MOFFETT, J. 2003. RE-WHO Warns About Dangers of Mad Cow Disease (Urgent data pertaining to USA). http://www.vegsource.com/talk/madcow/messages/9912466. html. (18 Juli 2006).

PURDEY, M. 1996. Organophosphate theory of BSE. *Med. Hypotheses* 46: 445–454.

RUDBECK, J. 2002. Changing pattern in world tallow and meat and bone meal trade. *The Bulletin.* pp. 5–6.

RADELEFF. 1970. Veterinary Toxicology. 2nd ed. Lea and Febiger, Philadelphia. pp. 198-206.

RAISBECK, M.F. 1998. Toxicology of residues. Proceeding 318 Clinical Toxicology. Postgraduate Foundation in Veterinary Science. University of Sydney. pp. 109-116.

SCHENCK, F.J., L. CALDERON and L.V. PODHORNICK. 1996. Determination of organochlorine pesticide and polychlorinated residues in fatty fish by tandem solid phase extraction clean up. *J. AOAC International* 79: 1209-1213.

SCOTT, A.C., G.A.H. WELLS, M.J. STACK, H. WHITE and M. DAWSON. 1990. Bovine spongioform encephaliopathy: Detection and quantification of fibrils, fibril protein (PrP) and vacuolation in brain. *Vet. Microbiol.* 23: 295-304.

SEAWRIGHT, A.A. 1989. Animal Health in Australia. Volume 2. Chemical and Plant Poisons. pp. 211–216.

SEAWRIGHT, A.A., O.B. OERLICHS, J.C. NG, Y. SANI and C.C. NOLAN. 1998. The toxicity of the Australian cycad Bowenia serrulata to cattle. In: *Toxic Plants and Other Natural Toxicants.* Ed. Garland, T and C. Barr. CAB International. pp. 447–452.

SHERMAN, J.D. 1999. Chlorpyrifos associated birth defect : report of four cases. *Arch. Environ. Health* 54: 141-143.

SIMMONS, M.M., P. HARRIS, M. JEFFREY, S.C. MEEK, I.W.H. BLAMIRE and G.A.H. WELLS. 1996. BSE in Great Britain: Consistency of the neurohistopathological findings in two random annual samples of clinically suspected cases. *Vet. Rec.* 138: 175–177.

THE CATTLE WEBSITE EXPERTS. 2003. BSE or Mad Cow disease. *http://www.cattletoday.info/diseases/bovine_spongioform_encephalopath.htm.* (18 Juli 2006).

VARSHEYA, C., H.S. BAGHGA and L.D. SHARMA. 1988. Effect of insecticide on humoral immune response in cockerels. Short Communication. *Bri. Vet. J.* 144: 610-612.

WALDRON, A.C., dan D.L. COLEMAN, 1987. Pesticide user's guide. The Ohio State University. *Bulletin* 745: 1-12.

WELLS, G.A.H., A.C. SCOTT, C.T. JOHNSON, R.F. GUNNING, R.D. HANCOCK, M. JAFFREY, M. DAWSON and R. BRADLEY. 1987. A novel progressive spongioform encephalopathy in cattle. *Vet. Rec.* 121: 419 – 420.

WILESMITH, J.W., J.B.M. RYAN and M.J. ATKINSON, 1991. Bovine spongioform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. *Vet. Rec.* 128 : 199 – 203.

WILESMITH, J.W., G.A.H. WELLS, M.P. CRANWELL and J.B.M., 1988. Bovine spongioform encephalopathy: epidemiological studies. *Vet. Rec.* 123 : 638 – 644.

WINTER, M.H., B.M. ALDRIDGE, R.R. SCOTT and M. CLARK. 1989. Occurrence or 14 cases of bovine spongioform encephalopathy in a closed dairy herd. *Br. Vet. J.* 145: 191 – 194.