

TULISAN PENDEK

Deteksi Chytridiomycosis dengan Menggunakan Koleksi Museum Zoologicum Bogoriense Pada Katak Asal Taman Nasional Gede-Pangrango, Jawa Barat (Chytridiomycosis detection by using Museum Zoologicum Bogoriense's frog specimens that were originally collected from Gede-Pangrango National Park, West Java)

Hellen Kurniati & Ni Luh Putu Rischa Phadmacanty

Pusat Penelitian Biologi-LIPI, Gedung Widyasatwaloka,
Jalan Raya Cibinong Km 46, Cibinong 16911, Jawa Barat. Email: hkurniati@yahoo.com

Memasukkan: September 2012, **Diterima** November 12

Chytridiomycosis merupakan penyakit yang disebabkan oleh jamur chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) yang menginfeksi jaringan kulit amfibia; pada banyak kasus terjadi pada kelompok katak. Jamur ini menyerang permukaan kulit katak yang mengakibatkan rusaknya lapisan keratin pada kulit. Stadium lanjut dari infeksi chytridiomycosis yaitu jamur akan mengeluarkan substansi toksik yang kemudian akan mengganggu sistem respirasi katak dan berakibat pada kematian katak. Kasus chytridiomycosis ditemukan pada tahun 1998 di Amerika Tengah dan Australia sehubungan dengan kematian amfibi mereka (<http://trushin.wordpress.com/2011/07/28/batrachochytrium-dendrobatidis-frog-killer>). Selain di Australia, jamur ini juga ditemukan sudah menyebar di Afrika, Amerika, Eropa, New Zealand, Oceania dan Asia dan sebagai penyebab kematian massal, penurunan populasi dan kepunahan jenis-jenis amfibi di seluruh dunia (Bergera dkk 1998; Catenazzi dkk 2011; Krieger & Hero 2007; Kriger dkk 2007; Toledo dkk 2006; Une dkk 2008).

Indonesia memiliki banyak jenis katak yang hidup di dataran tinggi maupun di dataran rendah. Jamur Chytrid umumnya hidup di daerah dataran tinggi karena jamur ini sensitif pada panas dan cahaya ultra violet; suhu lingkungan yang

tinggi membuat jamur ini mati, akibatnya jamur ini hidup subur pada daerah dataran tinggi; oleh sebab itu infeksi *Chytridiomycosis* biasanya terjadi pada jenis-jenis katak yang hidup di dataran tinggi. Pada tahun 2006 dan 2007, Kusri dkk (2008) mendapatkan beberapa jenis katak yang dijumpai di Taman Nasional Gede-Pangrango sudah terinfeksi *Bd* (Tabel 1). Penemuan ini bertanda bahwa penyebaran jamur *Bd* sudah meluas sampai kepada dataran tinggi di Jawa. Untuk mengetahui kapan jamur *Bd* masuk ke Indonesia, khususnya pulau Jawa, maka dilakukan sayatan histologi kulit katak yang berasal dari daerah Cibodas dan sekitarnya (termasuk Taman Nasional Gede-Pangrango) dengan menggunakan koleksi yang disimpan di Museum Zoologicum Bogoriense (MZB). Pengamatan dengan menggunakan spesimen museum terbukti dapat mendeteksi kapan jamur *Bd* masuk pertama kali ke dalam suatu negara (Cheng dkk 2011).

Dalam penelitian ini dipakai contoh kulit katak yang hidup di dataran tinggi. Contoh kulit katak diambil dari koleksi MZB dari tahun 1918 sampai 1955 yang berasal dari daerah dataran tinggi Cibodas, Taman Nasional Gede-Pangrango. Contoh kulit katak tahun 1918 yang tersedia pada koleksi MZB adalah jenis *Huia masonii*, *Megophrys montana* dan *Hylarana chalconota*

Tabel 1. Jenis-jenis kodok yang terinfeksi *Bd* di Gunung Gede-Pangrango berdasarkan Kusri dkk (2008) dengan menggunakan tes PCR.

Jenis	Sex/tahap umur	SVL (mm)	Berat (g)	Setara Zoospora/ contoh	Jumlah sumuran	Tanggal koleksi
Telaga Biru						
<i>Rhacophorus javanus</i>	Jantan	41.66	7.15	385	3	1-1-2007
<i>Rana chalconota</i>	Juvenil	42.60	2.50	72	3	1-1-2007
Ciwalen						
<i>Leptobrachium hasseltii</i>	Berudu	-	-	22	3	17-1-2007
<i>Limnonectes microdiscus</i>	Juvenil	19.62	0.75	3	3	17-1-2007
Cibeureum						
<i>Leptophryne cruentata</i>	Juvenil	23.72	1.30	=1	1	31-12-2006

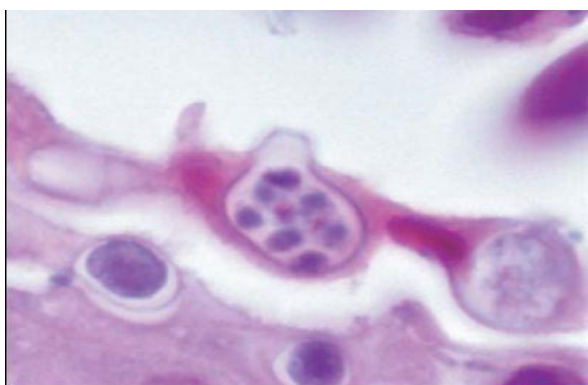
masing-masing satu individu; contoh kulit tahun 1930 meliputi dua individu *H. chalconota*, contoh kulit tahun 1952 meliputi *M. montana* dan *Limnonectes microdiscus* masing-masing satu individu, contoh kulit tahun 1954 meliputi *Polypedates leucomystax* dan *Rhacophorus margaritifer* masing-masing satu individu, dan contoh kulit tahun 1955 meliputi *R. margaritifer* dan *M. montana* masing-masing satu individu.

Bagian kulit katak yang dipakai sebagai contoh adalah bagian abdomen, sebab bagian ini merupakan bagian yang paling mudah terinfeksi oleh jamur chytrid, karena langsung bersentuhan dengan substrat habitat katak. Bagian kulit abdomen disayat dengan ukuran 1x1 cm, kemudian proses pembuatan preparat histologi sampai pada pewarnaan jaringan dilakukan dengan memodifikasi metode yang dilakukan Kiernan (1990). Pertama kali sayatan kulit difiksasi didalam larutan alkohol 70%, setelah itu dilakukan pencucian dengan menggunakan alkohol 70% lalu didehidrasi dengan menggunakan alkohol bertingkat yaitu alkohol 80%-absolut masing-masing selama 12 jam. Setelah proses dehidrasi, contoh kulit direndam dalam larutan xilene selama 24 jam, setelah itu dilakukan proses infiltrasi dalam oven pada suhu 56°C, lalu direndam dalam larutan campuran xilene-parafin dengan perbandingan 1:1, setelah itu contoh kulit direndam dalam larutan

parafin 1, kemudian parafin 2 dan terakhir parafin 3 masing-masing selama satu jam, kemudian contoh kulit ditanam dalam parafin beku dengan orientasi untuk potongan melintang. Parafin beku yang berisi contoh kulit dipotong dengan ketebalan 5 µm dengan menggunakan mikrotom; hasil potongan lalu direkatkan pada gelas preparat; kemudian potongan contoh tersebut diwarnai dengan hematoxilin-eosin. Proses pewarnaan diawali dengan proses deparafinasi, yaitu merendam potongan contoh kulit didalam larutan xilene selama 1 jam; setelah itu dilanjutkan dengan proses hidrasi dengan alkohol bertingkat yaitu dari alkohol absolut 96% hingga alkohol 70%, kemudian dilanjutkan dengan perendaman di dalam aquades selama satu menit, kemudian dicelupkan dalam larutan hematoxilin selama 30 detik, lalu contoh kulit direndam dalam air mengalir selama minimal 10 menit atau setelah contoh kulit terlihat berwarna keunguan. Proses selanjutnya contoh kulit dicelupkan dalam aquades dan alkohol 70%, setelah itu dilanjutkan dengan proses pewarnaan menggunakan larutan eosin dengan cara dicelup selama 10 detik, kemudian contoh kulit dicuci dalam alkohol 70%, dan dilakukan didehidrasi dalam alkohol bertingkat hingga alkohol absolut 96%. Perlakuan pembersihan preparat dengan merendamnya dalam larutan xilene selama minimal 15

menit. Setelah itu dilakukan proses *mounting* pada preparat, ditutup dengan kaca penutup, dan diletakkan di atas *hot plate* hingga kering. Preparat kemudian diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400 kali. Preparat diamati untuk menentukan struktur kulit yang normal dan terinfeksi oleh jamur chytrid. Adanya infeksi dapat diketahui melalui kerusakan pada bagian *stratum korneum* epidermis kulit katak (Gambar 1).

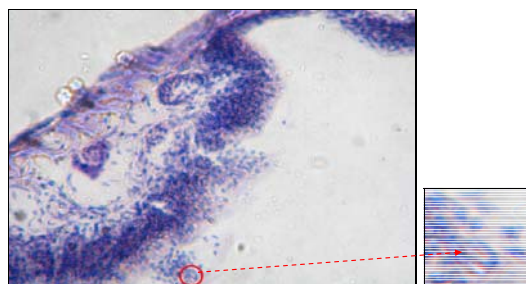
Hasil sayatan histologi pada enam jenis katak asal dataran tinggi Cibodas membuktikan bahwa jamur *B. dendrobatidis* sudah menginfeksi katak jenis *R. margaritifera* pada koleksi MZB yang diambil tahun 1954 dan 1955 (Tabel 2); dari



Gambar 1. Epidermis kulit katak yang terinfeksi jamur chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*). Sel berbentuk pundi adalah spora jamur *Bd* (Pessier & Mendelson 2010).

hasil sayatan histologi kulit perut tersebut terlihat spora jamur ini yang berbentuk pundi (Gambar 2).

Jenis kodok *Rana catesbeiana* adalah penyebar utama jamur *Bd* di dunia (Garner *et al.* 2006); perdagangan kodok secara internasional juga memberi andil meluasnya penyebaran jamur ini (Fisher & Garner 2007). Penyebaran *Bd* di Jawa Barat kemungkinan besar dibawa oleh kodok *R. catesbeiana* (Kusrini dkk 2008) yang masuk tahun 1982 sebagai program pemerintah Indonesia untuk meningkatkan ekspor daging kodok. Bila melihat hasil histologi dari spesimen MZB, jenis *R. margaritifera* yang dikoleksi tahun 1954 telah terinfeksi jamur *Bd*; bukti ini mengindikasikan



Gambar 2. Spora *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) yang berbentuk pundi (lingkaran dan panah merah) pada kulit perut katak *R. margaritifera* yang dikoleksi dari Cibodas, Taman Nasional Gunung Gede-Pangrango pada tahun 1954 (Amph. 351). (kiri pembesaran 100 kali dan kanan pembesaran 400 kali).

Tabel 2. Jenis-jenis katak dari koleksi MZB asal Cibodas, Taman Nasional Gede-Pangrango, Jawa barat yang diambil sayatan histologi kulit abdomen. (+) terinfeksi *Bd*; (-) tidak terinfeksi *Bd*.

Nomor koleksi MZB	Jenis katak	Lokasi	Tahun koleksi	Positif infeksi <i>Bd</i> (+)
Amph.94	<i>Hyla masonii</i>	Cibodas, Gunung Gede Pangrango	1918	-
Amph.230	<i>Megophrys montana</i>	Cibodas, Gunung Gede Pangrango	1918	-
Amph.689	<i>Hylarana chalconota</i>	Cibodas, Gunung Gede Pangrango	1918	-
Amph.680	<i>Hylarana chalconota</i>	Cibodas, Gunung Gede Pangrango	1930	-
Amph.684	<i>Hylarana chalconota</i>	Cibodas, Gunung Gede Pangrango	1930	-
Amph.315	<i>Megophrys montana</i>	Cibodas, Gunung Gede Pangrango	1952	-
Amph.305	<i>Limnonectes microdiscus</i>	Cibodas, Gunung Gede Pangrango	1952	-
Amph.331	<i>Polypedates leucomystax</i>	Cibodas, Gunung Gede Pangrango	1954	-
Amph.333	<i>Rhacophorus margaritifer</i>	Cibodas, Gunung Gede Pangrango	1954	+
Amph.351	<i>Rhacophorus margaritifer</i>	Cibodas, Gunung Gede Pangrango	1955	+
Amph.346	<i>Megophrys montana</i>	Cibodas, Gunung Gede Pangrango	1955	-

jamur *Bd* telah menyebar di Jawa Barat sebelum tahun 1982. Berdasarkan Kusri dkk (2008), prefalensi infeksi jamur *Bd* pada kodok *R. margaritifera* paling tinggi dari pada empat jenis lainnya, tetapi hasil sayatan histologi dari koleksi MZB dengan hasil tes PCR yang dilakukan Kusri dkk (2008) tidak dapat dibandingkan, karena tes PCR lebih akurat dibandingkan sayatan histologi dari spesimen MZB yang sudah lama disimpan. Beberapa jenis kodok mempunyai ketahanan tubuh terhadap infeksi jamur *Bd* (Woodhams *et al.* 2007), yang mana metode tes PCR adalah yang paling akurat, sedangkan metode sayatan dari koleksi museum tidak dapat mendeteksi hal tersebut.

Keberadaan jamur *Bd* di daerah Taman Nasional Gunung Gede-Pangrango pada tahun 1954 merupakan tanda tanya; mungkin spora jamur ini dibawa oleh pengunjung taman nasional atau mungkin ada faktor lain sebagai pembawa. Hossack *et al.* (2009) mengutarakan bahwa, keberadaan jamur *Bd* pada perairan tidak independen, tetapi jamur ini mengikuti perairan di mana perairan tersebut merupakan habitat kodok.

DAFTAR PUSTAKA

- Bergera, L., R. Spearea, P. Daszard, DE. Greene, AA. Cunningham, CL. Gogging, R. Slocombeh, MA. Ragani, AD. Hyattb, KR. McDonaldj, H. Hinesk, KR. Lipsl, G. Marantellim & H. Parkesb. 1998. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *PNAS* 95(15): 9031-9036.
- Catenazzi, A., E. Lehr, LO. Rodriguez & VT. Vredenburg. 2011. *Batrachochytrium dendrobatidis* and the collapse of anuran species richness and abundance in the upper Manu National Park, Southeastern Peru. *Conservation Biology* 25(2): 382-391.
- Cheng, TL., SM. Rovitob, DB. Wakeb & VT. Vredenburga. 2011. Coincident mass extirpation of neotropical amphibians with the emergence of the infectious fungal pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *PNAS* (early edition): 1-6.
- Fisher, MC & TWJ. Garner. 2007. The relationship between the emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the international trade in amphibians and introduced amphibian species. *Fungal Biology Reviews*. 21: 2-9.
- Garner, TWJ., MW. Perkins, P. Govindarajulu, D. Seglie, S. Walker, AA. Cunningham & MC. Fisher. 2006. The emerging amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* globally infects introduced populations of the North American bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Biology Letter* 2(3): 455-459.
- Hossack, BR., E. Muths, CW. Anderson, JD. Kirshtein & PS. Corn. 2009. Distribution Limits of *Batrachochytrium dendrobatidis*: A Case Study in the Rocky Mountains, USA. *Journal of Wildlife Diseases* 45(4): 1198-1202.
- Kiernan, JA. 1990. *Histological & Histochemical Method Theory and Practice*. Pergamon Press. Oxford.
- Kruger, KM & JM. Hero. 2007. The chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* is non-randomly distributed across amphibian breeding habitats. *Diversity and Distributions* 13(6): 781-788.
- Kruger, KM., F. Pereoglou, JM. Hero. 2007. Latitudinal variation in the prevalence and intensity of chytrid (*Batrachochytrium dendrobatidis*) infection in eastern Australia. *Conservation Biology* 21(5):1280-1290.
- Kusri, MD., LF. Skerratt, S. Garland, L. Berger

- & W. Endarwin. 2008. Chytridiomycosis in frogs of Mount Gede Pangrango, Indonesia. *Diseases of Aquatic Organisms* 82: 187–194.
- Pessier, AP. & JR. Mendelson (eds.). 2010. *A Manual for Control of Infectious Diseases in Amphibian Survival Assurance Colonies and Reintroduction Programs*. IUCN/SSC Conservation Breeding Specialist Group: Apple Valley, MN.
- Toledo, LF., CFB. Haddad, ACOQ. Carnaval and F.B. Britto. 2006. A Brazilian anuran (*Hylodes magalhaesi*: Leptodactylidae) infected by *Batrachochytrium dendrobatidis*: a conservation concern. *Amphibian and Reptile Conservation* 4(1):17-21.
- Une, Y., S. Kadekaru¹, K. Tamukai, K. Goka, & T. Kuroki. 2008. First report of spontaneous chytridiomycosis in frogs in Asia. *Diseases of Aquatic Organisms* 82: 157–160.
- Woodhams, DC., K. Ardipradja, RA. Alford¹, G. Marantelli, L. K. Reinert & LA. Rollins-Smith. 2007. Resistance to chytridiomycosis varies among amphibian species and is correlated with skin peptide defenses. *Animal Conservation*: 1–9.