

SKRIPSI .

IR PERPUSTAKAAN UNIVERISTAS AIRLANGGA

Drs. J. Djoni Pamb

JK 212

*0
8*

DARWAGIANI

BOTULISMUS PADA HEWAN TERNAK



**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
1982**

BOTULISMUS
PADA HEWAN TERNAK

SKRIPSI

DISERAHKAN KEPADA FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS
AIRLANGGA UNTUK MEMENUHI SEBAGIAN SYARAT GUNA
MEMPEROLEH GELAR DOKTER HEWAN

OLEH

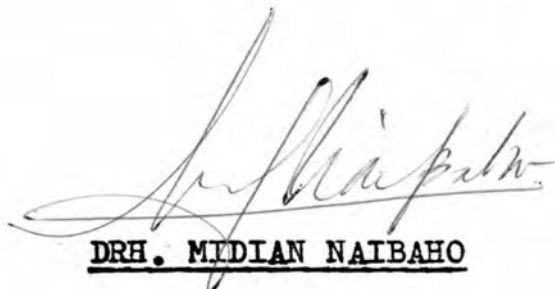
DARWAGIANI

BOGOR - JAWA BARAT



DRH. NY. RINI SOEHARTOJO

PEMBIMBING KEDUA



DRH. MIDIAN NAIBAHO

PEMBIMBING UTAMA

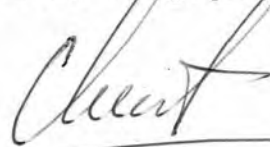
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN

UNIVERSITAS AIRLANGGA

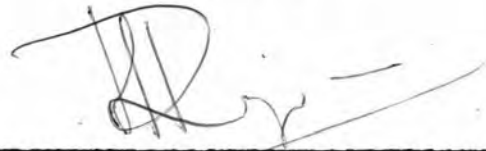
JUNI - 1982

Setelah mempelajari dan menguji dengan sungguh-sungguh, kami berpendapat bahwa tulisan ini baik scope maupun kualitasnya dapat diajukan sebagai skripsi untuk memperoleh gelar DOKTER HEWAN.

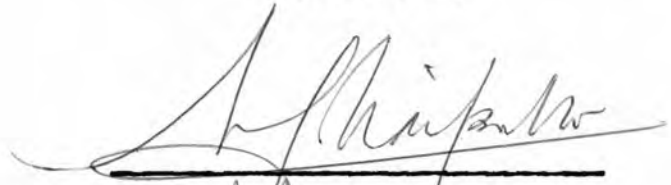
Penitias Penguji :



Ketua



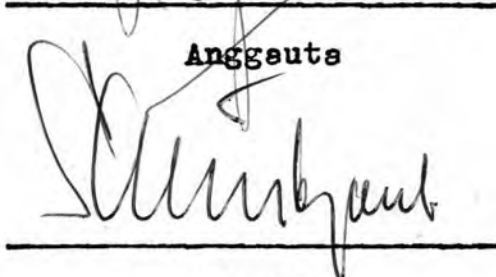
Sekretaris



Anggauta



Anggauta



Anggauta

KATA PENGANTAR

Skripsi ini disusun dengan maksud untuk memenuhi persyaratan kurikuler dalam menempuh ujian Dokter Hewan pada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

Ucapan terima kasih yang sebesar besarnya penulis sampaikan kepada Bapak Drh. Midian Naibaho (Kepala Bagian Mikrobiologi), Drh. Ny. Rini Soehartojo (Kepala Bagian Veteriner Public Health), Bapak bapak Dosen serta Assisten pada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga yang telah banyak membantu penulis, baik bimbingan, petunjuk, saran saran serta nasehat nasehat maupun bantuan konsultasi yang telah diberikan pada penulis sehingga dapat menyelesaikan skripsi ini.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna, tetapi mudah mudahan dapat bermanfaat bagi perkembangan Ilmu Kedokteran Hewan di Indonesia.

Sureabaya, J u l i 1982

Penyusun.

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	ii
DAFTAR ISI	iii
BAB I : PENDAHULUAN	1
BAB II : ETIOLOGI	4
1. Sejarah Penyakit	4
2. Morphologi dan Sifat Pewarnaan ...	7
3. Sifat sifat Biakan	8
4. Sifat sifat Biokimiawi	9
5. Resistensi	10
6. Struktur Antigenik dan Toksin	10
BAB III : PATOGENESE	12
BAB IV : DIAGNOSA	14
1. Gejala Klinis	14
2. Pemeriksaan Laboratoris	17
3. Perubahan perubahan Pathologis Ana tomis	25
BAB V : DIAGNOSA BANDING	26
BAB VI : PENGENDALIAN PENYAKIT	30
1. Pencegahan dan Pemberantasan	30
2. Pengobatan	31
BAB VII : HUBUNGAN DENGAN KESEHATAN MASYARAKAT	33
BAB VIII : R I N G K A S A N	34
DAFTAR KEPUSTAKAAN	37

BAB I

PENDAHULUAN

Bahan makanan yang mempunyai kualitas baik dan kuantitas yang memadai bagi kebutuhan masyarakat, merupakan salah satu faktor untuk tercapainya suatu bangsa yang kuat dan cerdas. Makanan yang berkualitas baik adalah makanan yang mengandung hidrat arang, protein, lemak, air, mineral dan vitamin. Diantara unsur unsur makanan tersebut yang lebih menonjol peranannya dalam tubuh adalah protein. Adanya pendapat bahwa protein hewani menunjang kehidupan dan kecerdasan bangsa, maka sudah pada saatnya dan tidak diragukan lagi protein harus ditingkatkan persediaannya sebagai bahan makanan masyarakat. Hal ini juga mengingat akan kebutuhan minimal protein hewani untuk orang Indonesia menurut standart gizi yang ditetapkan dalam workshop on food (Nas LIPI) 1968, adalah 5 gram protein perkepita perhari atau equivalent dengan daging 8,1 kg, telur 2,2 kg dan susu 2,2 kg perkepita pertahun (1).

Untuk menanggulangi kekurangan protein hewani, dapat dilakukan dengan meningkatkan produktivitas hewan ternak. Dalam usaha mempercepat peningkatan produktivitas hewan ternak dilaksanakan dengan mengadakan kawin suntik (Inseminasi Bustan), mendatangkan bibit unggul dari luar negeri, meningkatkan produksi mutu makanan ternak, pengamenan ternak dan mengadakan kursus beternak (2).

Dalam usaha meningkatkan produksi mutu makanan ternak, khususnya untuk sapi dan kuda, di Indonesia saat ini telah dilakukan dengan cara pengawetan makanan hijauan yang disebut silase. Pada prinsipnya pembuatan silase ialah dengan jalan membuat keadaan hampa udara dan asam di dalam tempat penyimpanan rumput. Jika pembuatan silase tidak sempurna yaitu masih terdapatnya genangan air maka *Clostridium botulinum* dapat tumbuh dan membentuk toksin. Silase yang tercemar toksin *Clostridium botulinum* dapat menimbulkan penyakit botulismus pada sapi dan kuda yang memakannya.

Pada unggas dapat pula terjadi botulismus yang berasal dari makanan yang tersimpan dalam keadaan hampa udara dalam waktu yang lama atau makanan kaleng dan bangkai ikan yang sudah membusuk yang dimakan oleh unggas tersebut (7, 31).

Clostridium botulinum dapat berkembang biak dalam makanan dan dapat mencemari makanan, baik dengan jalan mengeluarkan toksinnya keluar tubuh kuman maupun karena autolysis (18).

Botulismus adalah suatu penyakit bakterial yang bukan karena infeksi kumannya, tetapi karena absorpsi hasil metabolik yang berupa toksin dari kuman *Clostridium botulinum* dalam saluran pencernaan penderita, atau disebut juga penyakit akibat keracunan (7, 9, 31).

Botulismus pada sapi dikenal dengan nama "Lamziekte" di Afrika Selatan, "Loin disease" di Texas (7), "Midland cattle disease" di Tasmania dan "Dry bible" atau impaction paralysis di negara-negara bagian dari Australia (21).

Botulismus pada ayam dikenal dengan nama "Limberneck" dan pada itik "Western duck sickness" dimana kedua nama tersebut sudah dikenal di Amerika (8, 22, 25).

Botulismus pada kuda di Australia dikenal sebagai cerebrospinal meningitis, staggers, toxemic paralysis atau forge poisoning (21).

Clostridium botulinum bersifat anaerobe, membentuk spora dan biasanya dapat ditemukan dalam tanah. Botulismus kerap kali menimbulkan kematian (5, 25).

Toksin *Clostridium botulinum* selain menyerang hewan ternak juga dapat menyerang manusia.

Ada tujuh type *Clostridium botulinum* yang diberi simbol A sampai G, dan untuk type C dapat dibagi lagi menjadi subtype C_a dan C_b (7, 26, 31).

BAB II

E T I O L O G I

1. Sejarah Penyakit.

Botulismus tersebar hampir diseluruh dunia. Penyelidikan tentang kejadian botulismus telah banyak dilakukan, terutama di negara negara dimana industri makanan telah maju dengan pesat.

Kejadian botulismus pada manusia pertama kali di temukan oleh Muller (1870). Agent yang menyebabkan botulismus dipelajari oleh Van Ermengem (1896-1897), setelah adanya suatu kejadian dimana beberapa orang anggota suatu klub musik di desa Ellezeles (Belgia) jatuh sakit dan 3 orang dari mereka meninggal setelah satu minggu. Penyakitnya terbatas pada mereka yang memakan ham yang diasap (smoked ham) yang tidak baik cara penyimpanannya. Van Ermengem memberi nama agent penyebab penyakit botulismus adalah *Clostridium botulinum*, dan sebagai sinonimnya adalah *Bacillus botulinus*. Van Ermengem menjelaskan bahwa ham yang terkontaminasi oleh *Clostridium botulinum* berwarna pucat, konsistensinya lunak dan serba tengik (7, 26, 31).

Buckley dan Shippen (1917) menemukan botulismus pada kuda di Amerika Serikat. Grahm et al (1919) mengisolir *Clostridium botulinum* dari ensilage jagung

yang menyebabkan keracunan makanan pada kuda.

Menurut Graham dan Schwarze (1921) botulismus biasanya menyerang sapi yang berumur antara 6 bulan - 2 tahun dan kematian dapat mencapai 2 sampai 10 %. Seddon (1922 - 1927) melaporkan botulismus pada sapi di Tasmania. Theiler et al (1926, 1927) menyelidiki tentang lamziekte di Afrika Selatan (7, 31).

Wilkins dan Dutcher (1920) menyatakan bahwa botulismus pada unggas dapat berasal dari larva lalat *Lucilia caesar*, oleh karena dalam tubuh larva lalat ini salah satu type *Clostridium botulinum* (type C_g) dapat membentuk toksin (30).

Bengston (1922, 1923) adalah orang yang pertama mengisolir *Clostridium botulinum* type C_g dari larva lalat *Lucilia caesar*, yang bila toksinnya diberikan pada unggas dapat menimbulkan gejala gejala botulismus (11, 17, 31).

Menurut Meyer dan Dubovsky (1922) botulismus pada unggas dapat berasal dari buncis kaleng hasil industri kecil ("Home canned string beans") yang diberikan pada unggas (23).

Graham et al (1923) membuktikan adanya toksin *Clostridium botulinum* dalam isi ventriculus dan tractus intestinal dari unggas yang mati karena botulismus (13, 30, 31).

Botulismus pada itik dan unggas lain yang kesenangannya hidup di air, terjadi tiap tahun di daerah-daerah danau tertentu dan dataran yang berlumpur di-negara-negara bagian sebelah barat Amerika Serikat, Kanada, Argentine, Mexico, Uruguay, Australia, Jerman dan Afrika Selatan. Kejadian dapat berjelema hebat, antara lain pada tahun 1932 terdapat 250.000 burung mati di Great Salt Lake di Utah sebagai akibat botulismus (5, 13, 31).

Menurut Levine, botulismus dapat menyerang ayam, itik, mentok, kalkun, angsa, burung kua dan burung unta. Menurut Kalmbach burung nesar resisten terhadap botulismus (19).

Meyer (1956) menyatakan bahwa ada 2 type Clostridium botulinum yaitu type A dan type B. Di Amerika Utara spora type A banyak ditemukan sebelah barat dari Rocky Mountains, dan type B di sebelah timur dari Amerika Serikat. Di Eropa spora type B lebih banyak dari type A. Spora type A dan type B tidak banyak ditemukan di Inggris dan Swedia. Type C pernah menyerang unggas yang kesenangannya hidup di air di negeri Belanda, Spanyol dan Inggris. Pada umumnya type B lebih banyak terdapat dari pada type C dan E, kecuali di Norfolk Broods, Clostridium botulinum type B, C dan E hampir sama jumlahnya, sehingga menyebabkan kejadian bo-

tulismus yang hebat pada unggas yang terjadi selama musim panas dari tahun 1975 hingga 1976. Type D jarang dan type A tidak terdapat di Norfolk Broads (5, 10, 25).

Di Australia dapat ditemukan type A, B, C dan D, tetapi ternyata hanya type B dan C yang menyebabkan botulismus, dan kejadian terbanyak disebabkan oleh type C. Type E tidak diketemukan di Australia (21).

Blandford, Roberts dan Ashton (1969) menyatakan bahwa seekor musang (*Mustela putorius*) dapat menderita botulismus setelah diberi makan bangkai itik Mallard dari kolam yang tercemar *Clostridium botulinum* type C (14).

Kambing, babi, anjing dan kucing resisten terhadap botulismus (7).

2. Morphologi dan Sifat Pewarnaan.

Clostridium botulinum adalah kuman yang berbentuk batang berukuran besar, lebarnya 0,9 - 1,2 mikron dan panjangnya antara 4 - 6 mikron dengan ujung yang membulat (14, 23, 24).

Clostridium botulinum biasanya terletak sendiri-sendiri atau bergerombol, kadang kadang membentuk rantai pendek. Spora *Clostridium botulinum* berbentuk oval, biasanya diameter lebih besar dari pada diameter sel kuman, terletak subterminal, tetapi dapat juga sen-

triel. Pada pupukan muda bersifat Gram positif dan beberapa sel kuman berbeda beda dalam kekuatan menyerap zat warna (17, 26, 28).

Clostridium botulinum dapat bergerak dengan 4 - 6 peritrichus flagella, panjang flagella 2,06 mikron (16, 17).

3. Sifat sifat Biotik.

Clostridium botulinum adalah kuman yang bersifat anaerobe mutlak, tumbuh baik pada suhu 25° sampai 30°C, tetapi pada suhu 37°C pertumbuhannya kurang subur. *Clostridium botulinum* tumbuh baik pada kebanyakan media umum, tetapi jika ditambah dengan 0,5 % glucose dan 0,5 % K_2HPO_4 dalam kaldu jantung sapi atau media peptic digest liver broth pertumbuhan adalah lebih baik. Besar koloni *Clostridium botulinum* pada permukaan agar tidak teratur, cenderung menjadi besar, transparan, putih keabu abuan sampai kuning kecoklat coklatan dengan tepi yang tidak rata (17, 26).

Pada agar darah, koloni *Clostridium botulinum* cenderung diameternya menjadi besar sampai 15 mm. Hemolise biasanya jelas terlihat sekitar koloni, tetapi tidak semua strain *Clostridium botulinum* menghasilkan hemolisin (26).

4. Sifat sifat Biokimiawi.

Strain yang berbeda dari Clostridium botulinum mempunyai kemampuan fermentasi yang berbeda dalam media karbohidrat dan protein (17, 26).

Type A menghasilkan asam dan gas dari glucose, maltosa, fructose, dextrin dan glycerol. Type B dan C tidak memfermentasikan selicin, sedangkan type C tidak memfermentasikan glycerol. Tidak satupun dari strain-strain Clostridium botulinum yang memfermentasikan rafinosa, inulin, mannitol, dulcitol, galactosa, xylosa, rhaminosa dan arabinosa (6, 17).

Susu litmus dikoagulasikan dan dirubah menjadi alkalis oleh strain dari type A, B dan C. Medium daging yang telah direbus dapat dicernakkan hingga menjadi hitam oleh type A dan B, tetapi tidak dirubah oleh type C, D dan E, karena type A dan B jauh lebih bersifat proteolytik dari pada type C dan D (17, 26).

Bengtson mengemukakan bahwa semua type Clostridium botulinum yang dapat mencairkan medium putih telur yang telah dikoagulasi dengan sempurna digolongkan type "proteolytik" ialah Clostridium parabotulinum dan yang termasuk type ini ialah type A dan B (strain Amerika) dan type A (strain Eropa). Yang dapat mencairkan medium putih telur yang telah dikoagulasi tetapi kurang sempurna disebut type "non-proteolytik" ialah Clostri-

dium botulinum type B (strain Eropah), semua type C dan type D (7, 17).

Semua type Clostridium botulinum dapat mencairkan gelatin. Reaksi biokimiawi lainnya yang sama dari semua type Clostridium botulinum adalah reaksi NH_3 positif, H_2S positif kuat, Indol negatif, reduksi nitrat negatif, M.R. negatif, V.P. negatif, reduksi methylen blue negatif dan reaksi katalase negatif (17).

5. Resistensi.

Clostridium botulinum bentuk vegetatif beserta toksinnya mudah dirusak oleh pengaruh panas. Spora Clostridium dapat dibunuh pada suhu 100°C selama 5 jam, 105°C selama 2 jam, 110°C selama $1\frac{1}{2}$ jam, 115°C selama 40 menit atau 120°C selama 10 menit (7, 17, 26).

Toksin Clostridium botulinum rusak pada pemanasan 80°C selama 6 menit. Toksin type C dan D relatif resisten terhadap panas dibandingkan dengan toksin type A, B dan E. Toksin yang kuat hanya dapat diperoleh pada medium khusus. Makanan yang mengandung toksin Clostridium botulinum memerlukan waktu untuk merebusnya selama beberapa menit untuk merusak toksin itu (26).

6. Struktur Antigenik dan Toksin.

Antigen Clostridium botulinum adalah bersifat he-

terogen. Mendis (1952) menyatakan bahwa ada 3 kelompok *Clostridium botulinum* secara serologis dengan reaksi aglutinasi, dan tidak ada hubungan antara type type toksin dan struktur antigeniknya. Bahan makanan tertentu adalah cocok untuk pertumbuhan spora dan pembentukan toksin, antara lain : daging, ikan yang diasap atau yang dibumbui, buncis dan bayam. Bush dan sayuran yang masam kurang cocok untuk pertumbuhan *Clostridium botulinum*. Strain strain yang merupakan penghasil toksin yang banyak, dapat kehilangan kemampuannya untuk menghasilkan toksin dengan memupukkannya berulang ulang pada 1 macam media buatan (7, 26).

Toksin *Clostridium botulinum* bersifat "neurotoksik" sehingga gejala gejala botulismus baik pada manusia maupun pada hewan bermanifestasi pada gangguan syaraf (7).

Toksin dikeluarkan oleh *Clostridium botulinum* yang sedang dalam pertumbuhan dan akan meningkatkan daya racunnya apabila sel kuman mengalami autolysis. Toksin dari type A dan D dapat dipisahkan secara murni dan merupakan protein yang daya toxisitasnya sangat kuat. Toksin dari type D lebih kurang 20.000 kali lebih kuat dari pada toksin type A, mempunyai daya sebesar 4×10^{12} dosis lethal tikus putih per milligram nitrogen (26).

BAB III P A T H O G E N E S E

Type Clostridium botulinum yang berbeda mempunyai keganasan yang berbeda secara relatif untuk suatu species hewan. Hewan yang peka terhadap toksin Clostridium botulinum adalah tikus putih, marmut. Sedangkan kelinci, kucing, anjing dan tikus besar relatif lebih resisten (7, 26).

Toksin Clostridium botulinum dari type A, B, E dan F terutama sebagai penyebab botulismus pada manusia. Type C dibagi lagi menjadi sub type C_a dan C_b. Sub type C_a adalah sebagai penyebab utama botulismus pada burung liar, burung yang kesenangannya hidup di air dan ayam, tetapi type A, B dan E juga dapat mengakibatkannya. Sub type C_b umumnya menyerang sapi, domba yang memakan makanan yang terkontaminasi. Sub type C_b juga menyebabkan suatu type keracunan makanan pada kuda di Australia dan Amerika Serikat. Type D menyebabkan oedema pada sapi di Afrika Selatan.

Toksin Clostridium botulinum masuk tubuh induk semang melalui saluran pencernaan atau luka, tetapi gangguan yang disebabkan hampir seluruhnya pada system syaraf. Gangguan pada syaraf perifer lebih berat dari pada susunan syaraf pusat (7).

Clostridium botulinum berkembang biak dan menghasilkan toksinnya dalam bahan makanan atau bangkai yang busuk. Bahan makanan yang sudah tercemar toksin *Clostridium botulinum* apabila dimakan oleh hewan ternak maka akan sampai di usus, kemudian menembus mucosa usus masuk ke dalam darah dan limfe. Toksin *Clostridium botulinum* dapat juga masuk tubuh melalui luka kemudian sampai ke dalam darah dan limfe. Melalui aliran darah kemudian masuk ke dalam system syaraf perifer, dimana toksin terikat pada neuromuscular junction. Toksin ini memblokir pelepasan acetylcholine, pada presynaptic, sehingga menyebabkan kelumpuhan dari serat syaraf perifer (7, 26, 29).

Fungsi dari pada acetylcholine adalah untuk meningkatkan kontraksi otot, sehingga apabila dihambat pelepasannya mengakibatkan kelumpuhan (7).

Apabila toksin masuk ke dalam system syaraf pernafasan, maka menyebabkan kelumpuhan otot otot pernafasan kemudian anoxia dan akhirnya penderita mati (7).

Payling Wright (1955) menyatakan bahwa toksin *Clostridium botulinum* tidak mempunyai pengaruh langsung yang menimbulkan luka pada otak atau jaringan syaraf tulang punggung (26, 29).

BAB IV

D I A G N O S A

Untuk menentukan adanya botulismus pada hewan ternak dapat ditentukan berdasarkan :

1. Gejala Klinis
2. Pemeriksaan Laboratoris
3. Perubahan perubahan Pathologis Anatomis.

1. Gejala Klinis.

Masa inkubasi botulismus antara 12 sampai 36 jam dengan variasi antara 6 jam sampai 8 hari (30).

a. Botulismus Pada Kuda.

Jelannya penyakit botulismus pada kuda dibedakan menjadi 4 bentuk : perakut, akut, subakut dan khronis.

Pada kejadian perakut dan akut masa inkubasinya berlangsung pendek antara 18 - 48 jam, terlihat adanya inkoordinasi gerak, lidah menjulur dan paralyse dari otot otot pengunyah. Kulit penderita hypothermi dan tidak mengadakan reaksi atau kurang bereaksi terhadap rangsangan. Pupil melebar (mydrissis) dan tidak memberikan reaksi terhadap cahaya, tidak dapat minum, sehingga penderita mengalami dehidrasi. Kematian dapat terjadi antara 24

sampai 48 jam setelah timbulnya gejala klinis.

Pada kejadian subakut dan khronis penderita dapat tetap berdiri, tetapi sekali merebahkan diri sukar untuk berdiri lagi. Adanya inkoordinasi gerak, pulsus lemah, pernafasan dangkal, defikasi terhenti karena atoni dari usus, mukosa ikterus, kematian disebabkan paralyse otot otot pernafasan (20).

b. Botulismus Pada Sapi.

Masa inkubasi botulismus pada sapi antara 4 - 6 hari, sehingga sukar untuk mengetahui sumbernya toksin. Gejala gejala klinis yang terlihat ialah kelemahan, hypothermi, kesulitan menelan karena paralyse bibir, lidah dan pharynx, inkoordinasi gerak, laktasi terhenti pada sapi perah, kepala ditundukkan, kemudian merebahkan diri dan tidak mampu lagi untuk bangun dengan terus mengadakan gerakan seperti mengayuh sepeda. Faeces penderita keras dan sering tertinggal didalam usus, mukosa pucat, pulsus lemah dan lambat. Pada kejadian akut dapat terjadi kematian setelah 3 - 5 hari dari mulai nampak gejala klinisnya (20).

c. Botulismus pada domba.

Mula mula terlihat ekor penderita dikibas kibaskan, kemudian jslennya kaku dan tidak dapat ber-

gerak, kepala ditundukkan dan hyperselyvasi, kadang kadang lidah menjulur keluar. Nafsu makan hilang, memamah biak terhenti dan mengalami konstipasi. Kaki belakang mengalami paralyse sehingga tidak dapat berdiri. Kesulitan pernafasan dan gerakan pernafasan abdominal. Kematian dapat terjadi setelah 2 - 3 hari dari timbulnya gejala klinis (20).

d. Botulismus pada unggas.

Gejala klinis yang tersifat adalah paralyse, yang mula mula meliputi otot otot sayap, kemudian kaki dan akhirnya leher. Sayap penderita menggantung, dan tidak mampu untuk terbang seperti biasanya. Pada kejadian melanjut nampak seperti mengantuk, akhirnya otot otot leher menjadi lumpuh dan tidak mampu untuk menunjang kepalanya. Membrana nictitans bereaksi lambat, dan kemudian reflex membrana corneal terhenti. Penderita dapat mengalami diarrhoe.

Pada kejadian berat, bila penderita disentuh tetap diam saja, tetapi bulu bulu lehernya berdiri dan mudah rontok.

Kematian disebabkan asphyxia sebagai akibat kelumpuhan otot otot pernapasan dan kegagalan fungsi jantung (15, 22, 26).

Pada kejadian ringan, terlihat kehilangan nafsu ma-

kan, kelemahan dan sukar menelan (22).

2. Pemeriksaan Laboratoris.

Material pemeriksaan dapat diambil dari bahan makanan atau isi saluran pencernaan hewan ternak yang diduga menderita botulismus (11, 24, 29).

Material dari bahan makanan yang akan diperiksa digerus bersama pasir kuarsa dalam mortir yang steril, kemudian dicampurkan ke dalam NaCl fisiologis, lalu disaring dengan kain kasa dan supernatannya diambil untuk pemeriksaan.

Material dari isi saluran pencernaan hewan ternak yang diduga menderita botulismus dicampur dengan NaCl fisiologis, lalu disaring dengan kain kasa. Supernatannya diambil untuk pemeriksaan (17, 30).

Material dapat diperiksa dengan berbagai cara :

a. Pemeriksaan mikroskopis.

Beberapa cara pewarnaan dapat dilakukan untuk mempelajari morfologi clostridium, antara lain :

a.1. Pewarnaan Methylene blue.

Dengan pewarnaan methylene blue maka secara cepat dapat diketahui bentuk kumannya. Pada pemeriksaan dibawah mikroskop dengan pembesaran 1000 kali maka kuman tampak berbentuk batang dan berwarna

biru.

a.2. Pewarnaan Gram.

Dengan pewarnaan Gram dapat dipelajari sifat *Clostridium botulinum*. Setelah dilakukan pewarnaan, kemudian diperiksa dibawah mikroskop dengan pembesaran 1000 kali, maka kuman tampak berwarna violet, karena *Clostridium botulinum* tergolong kuman Gram positif (17).

b. Pemupukan *Clostridium botulinum*.

Clostridium botulinum adalah kuman yang bersifat anaerobe, dimana kuman ini dapat hidup dan berkembang biak dalam keadaan tanpa adanya zat asam bebas.

Pemupukan kuman anaerobe dapat dilakukan pada media khusus yang mengandung suatu bahan yang bersifat mereduksi atau dalam media biasa yang diberi susunan anaerobe (17).

Media khusus untuk kuman anaerobe :

b.1. Liver bouillon atau Terazzi.

Bouillon yang mengandung potongan potongan hati, dapat mengabsorpsi zat asam dan mereduksi, sehingga menimbulkan lingkungan yang anaerobe. Sebelum pemupukan, media direbus sampai mendidih 20 menit untuk membebaskan zat asam yang terda-

pet dalam bouillon. Setelah pemupukan bouillon atau tarazzi diberi lapisan paraffin atau vaselin diatasnya sehingga zat asam dari udara tidak masuk.

b.2. Medium semi-solid, mengandung agar agar 0,2 - 0,4 %.

Sebelum pemupukan medium direbus 20 menit. Kedalam medium ini dibubuhkan substansia yang bersifat mereduksi, pepton dan gula natrium thioglucolat. Kadang kadang juga ditambah serum.

Medium anaerobe dalam cawan petri :

b.3. Pyrogallol - KOH 10 %.

Pyrogallol mempunyai daya mereduksi yang kuat dan suasana alkalis (KOH) sangat efektif dalam mengabsorpsi zat asam (17).

b.4. Biologik (Forther-Platte).

Didalam forther-platte yang berisi agar darah (nutriet agar), dibelahan pertama dipupuk kuman yang absolut aerobe, misalnya *Serratia marcescens* dan pada belahan kedua dipupuk kuman anaerobe. Plat agar ditutup rapat dengan lak atau cello-tip, lalu dieramkan dalam inkubator. Mula mula akan tumbuh *Serratia marcescens* yang memerlukan zat asam, dua

sampai tiga hari kemudian atau setelah zat asam terserap akan tumbuh kuman anaerobe yang dipupuk pada belahan kedua dari plat agar.

Setelah pemupukan pada medium khusus tersebut, lalu diteruskan dengan test biokimia dan test fermentasi terhadap gula gula (17).

Pada test biokimia dilakukan :

b.a. Indol test dengan menggunakan medium semisolid agar.

Dengan menggunakan needle isolat kuman dipupuk secara stab pada medium indol yang semisolid. Lalu diinkubasikan 24 jam pada 37°C. Untuk mengetahui adanya pembentukan indol, maka digunakan reagentia kovsc dengan bantuan chloroform. Medium semisolid agar juga dapat digunakan untuk mengetahui motilitas kuman. Kuman yang motil, terlihat pertumbuhannya seperti sikat disekeliling tempat tusukan, sedang yang non motil, tidak menembus kedalam semisolid agar (17).

b.b. Medium Triple Sugar Iron Agar.

Dengan menggunakan needle isolat kuman dipupuk secara steak pada permukaan yang miring dan sisanya dipupuk secara stab pada bagian agar tegak, lalu diinkubasikan pada 37°C sele

ma 18 - 24 jam. Clostridium botulinum membentuk gas dan H_2S serta warna kuning pada bagian bawah medium yang berarti kuman memfermentasikan glucose (17).

b.c. Media Methyl Red - Voges Proskauer (M.R. - V.P. Medium).

Sepasang tabung M.R. - V.P. media dipupuk kuman dengan needle isolat, dieramkan dalam inkubator $37^{\circ}C$. Untuk uji M.R. medium dieramkan selama 5 hari dan untuk uji V.P. medium dieramkan 3 hari.

Pengamatan pada uji Methyl Red.

Kedalam 5 ml medium yang sudah dipupuk, ditambahkan 5 tetes larutan Methyl red. Reaksi positif ditandai dengan timbulnya warna merah, menandakan reaksi asam sebagai hasil fermentasi dextrose.

Pengamatan pada uji Voges Proskauer :

Kedalam 5 ml medium yang sudah dipupuk ditambahkan larutan alpha naptol dan $NaOH$ 40%. Reaksi positif ditandai oleh terbentuknya warna merah. Hasil dari Clostridium botulinum pada M.R. dan V.P. adalah negatif (17).

b.d. Test Urea.

Kuman dalam tabung urea medium dipupuk dengan needle isolat, lalu dieramkan dalam inkubator 37°C selama 24 jam. Reaksi positif ditandai oleh terbentuknya warna merah muda pada medium. Pada reaksi negatif warna medium tetap kuning. Untuk mukan *clostridium botulinum* test urea positif (17).

b.e. Test Nitrat.

Kedalam tabung nitrat medium dipupuk kuman dengan needle isolat, lalu dieramkan dalam inkubator 37°C selama 24 jam. Reaksi positif terlihat warna merah setelah diberi H₂SO₄.

Test Nitrat untuk kuman *Clostridium botulinum* adalah negatif (17).

Test Fermentasi :

Untuk test fermentasi digunakan media gula gula. Media gula gula berbentuk cair dan diisi-kan kedalam tabung sebanyak lebih kurang 5 ml, lalu kuman dipupuk dan diinkubasikan 24 - 72 jam pada temperatur 37°C. Reaksi positif akan menyebabkan perubahan warna media gula gula menjadi kuning.

Clostridium botulinum mampu memfermentasikan glucose, maltose, fructose, dextron. *Clostridium botulinum* tidak memfermentasikan laktose, saccharose, raffinose, inulin, mannitol, dulcitol, galactose, xylose, rhaminose dan erabinose (17).

c. Penyuntikan pada hewan percobaan.

Hewan percobaan untuk *Clostridium botulinum* adalah marmut, tikus atau kerbau.

Behan mekenan ternak yang dicurigai sebagai penyebab botulismus digerus bersama pasir kuarsa dalam mortir yang steril lalu didiamkan selama 24 jam dalam NaCl fisiologis. Pada hari berikutnya campuran kemudian dicentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit. Lalu setengah dari cairan supernatan dipanaskan selama 10 menit pada temperatur 100°C. Marmut yang akan digunakan dibagi dalam 2 grup. Grup pertama disuntik dengan bagian yang telah dipanaskan sedang grup kedua disuntik dengan yang tidak dipanaskan. Marmut yang disuntik hendaknya dilindungi terhadap kuman anaerobe lainnya yang pathogen dengan memberikan penicillin atau antiserum khusus. Pada grup kedua bila terdapat toksin dalam cairan supernatan yang disuntikkan, maka marmut tersebut mati dengan gejala-gejala paralyse, sedang grup pertama te-

tap hidup karena toksinnya sudah rusak pada waktu pemanasan (12).

d. Pemeriksaan Serologis.

Pemeriksaan serologis dilakukan berdasarkan ditemukannya toksin didalam bahan makanan, isi saluran pencernaan atau dalam darah penderita. Lemanna adalah orang yang pertama kali menggunakan reaksi H.I. test (Haemagglutination Inhibition test) untuk mengklasifikasikan masing masing type dari Clostridium botulinum. Lemanna menyatakan bahwa toksin dari type A dapat mengagglutinasikan butir butir darah merah ayam, marmut, domba dan manusia. Haemagglutinasia ini adalah spesifik yang dapat dinetralsisir oleh antitoksin type A, tetapi tidak oleh antitoksin type B, C, D dan E. Haemagglutinasia dari masing masing type toksin Clostridium botulinum hanya dapat dinetralsisir oleh antitoksin yang homolog. Jadi dengan H.I. test dapat dibedakan type type Clostridium botulinum satu dengan yang lain. Toksin dari kedua subtype C_a dan C_b adalah homolog dimana antitoksin dari subtype C_a dapat menetralisir kedua toksin dari subtype C_a dan C_b , sedang antitoksin dari subtype C_b hanya dapat menetralisir toksin dari subtype C_b . Toksin dari type E hanya dapat dinetralsisir oleh antitoksin dari type E (26).

3. Perubahan perubahan Pathologis dan Anatomis.

Pada penderit botulismus tidak terdapat kelainan yang spesifik pada necropsi. Tetapi pada kejadian akut pada kuda terdapat muco-enteritis. Pada kuda dan ruminantia didalam rongga mulut sering terdapat gumpalan makanan yang terletak diantara gigi dan pipi, sebagai akibat dari paralyse otot untuk menelan. Kadang kadang gumpalan makanan tersebut didapatkan dalam oesophagus. Lidah menjulur keluar, karena mengalami paralyse. Omasum pada sapi dan domba mengembung dan membungkus erat bahan makanan yang kering, ini merupakan penyebab pemberian nama sehari hari "dry bible" yang berkenaan dengan penyakit botulismus pada ruminantia di Australia (21).

Pada unggas biasanya saluran pencernaan kosong, karena pada kejadian ringan unggas kehilangan nafsu makan dan mengalami kesulitan menelan. Anus serta bulu bulu ekornya dikotori dengan diarrhoe yang kehijau hijauan (5).

Oesophagus itik penderit botulismus umumnya mengembung karena berisi makanan yang baru dimakan, dan cloacanya penuh dengan bahan yang cair, karena tidak mampu untuk mengeluarkan urine. Pada burung burung yang dicurigai menderit botulismus ventriculusnya harus diperiksa, karena beberapa dari material yang toksik (deging atau ulat ulat) umumnya terdapat didalamnya (21).

BAB V

DIAGNOSA BANDING

Botulismus pada hewan ternak kadang kadang dapat dikelirukan dengan penyakit penyakit lain yang mempunyai gejala klinis serupa, misalnya :

Pada Kuda : Equine encephalomyelitis.

Penyebab penyakit ini adalah virus, sedang botulismus disebabkan oleh toksin Clostridium botulinum. Pada equine encephalomyelitis ada demam, sedang botulismus tidak ada. Persamaan kedua penyakit ini adalah adanya kepala yang ditundukkan, hyperselivasi dan inkoordinasi gerak (20).

Pada Sapi :

1. Listeriosis.

Penyebabnya adalah Listeria monocytogenesis. Perbedaannya dengan botulismus adalah adanya radang mata dan abortus sedang persamaannya adalah adanya paralysa dan inkoordinasi gerak (20).

2. Melkziekte (Milkfever).

Penyakit ini disebabkan oleh hypocalcemia dan hypoglycemia. Penyakitnya terbatas pada hewan yang baru melahirkan. Seding botulismus terutama menyerang hewan yang sedang dalam produksi penuh , karena pada

hewan ini diberikan banyak makanan yang diawetkan (silase). Persamaannya dengan botulismus adalah kepala ditundukkan, bagian belakang lemah sehingga berbaring saja (21).

3. Rabies.

Penyakit ini disebabkan oleh virus. Perbedaannya dengan botulismus adalah sebelum paralyse ada stadium eksitasi. Persamaannya adalah inkoordinasi gerak, susah menelan dan paralyse.

Pada Unggas.

1. New Castle Disease (N.C.D.).

Penyebab NCD adalah virus, sedangkan botilismus disebabkan oleh toksin *Clostridium botulinum*. NCD terutama menyerang ayam ayam muda, sedangkan botulismus menyerang ayam segala umur. Penderita NCD kedudukan kepala sering miring kesamping belakang, sedangkan penderita botulismus lehernya lemas, karena tonus otot-otot leher berkurang (3).

2. Cholera Ayam (Fowl cholera).

Penyebab penyakit ini adalah kuman *Pasteurella multocida*. Umumnya menyerang ayam ayam yang masih muda dan dewasa. *Pasteurella multocida* bersifat Gram negatif, hidup secara aerobe. Persamaannya dengan botu-

lismus adalah adanya diarrhæ yang kehijau hijauan dan paralyse leher. Tetapi paralyse leher pada penderita Cholera ayam bukan merupakan tanda-tanda klinis yang khas (3, 4).

3. Blue comb (Pullet Disease, Avian Monocytosis).

Penyebabnya mungkin suatu virus. Umumnya menyerang unggas muda pada masa permulaan bertelur, tetapi juga menyerang unggas yang lebih tua. Persemaannya dengan botulismus adalah diarrhæ dan kematian secara tiba-tiba. Pada blue comb tidak dijumpai adanya paralyse (3, 4).

4. Fowl typhoid (Typhus ayam).

Penyebabnya adalah kuman *Salmonella gallinarum*, yang merupakan penyakit pada saluran pencernaan dan pada umumnya menyerang ayam muda. *Salmonella gallinarum* bersifat Gram negatif, tidak membentuk spora dan hidup secara aerobe. Persemaan dengan botulismus adalah adanya diarrhæ kehijau hijauan dan bulu-bulu sekitar cloaca penuh oleh faeces dan kadang-kadang ayam mati sebelum terlihat gejala-gejala penyakit. Kedua kuman ini dapat berkembang biak dalam makanan dan dapat mencemari makanan. Perbedaannya bahwa pada Fowl typhoid tidak ada gejala paralyse (3).

5. Infectious serositis (Anatipestifer infectious).

Penyebabnya adalah kuman *Pasteurella anatipestiver*. Terutama menyerang itik muda berumur antara 1 - 8 minggu. Kuman ini bersifat Gram negatif, tidak membentuk spora dan hidup secara aerobe. Persamaannya dengan botulismus pada itik adalah adanya diarrhae yang kehijau hijauan dan paralyse.

Perbedaannya bahwa pada infectious serositis terdapat batuk ringan dan bersin, paralyse yang dimulai dengan terlihatnya inkoordinasi gerak tremor kepala dan leher. Pada Infectious serositis juga terlihat keluarnya cairan fibrinous dari mata dan hidung (4, 20).

BAB VI

PENGENDALIAN PENYAKIT

1. Pencegahan dan Pemberantasan.

Pencegahan terhadap botulismus dapat dilakukan dengan beberapa cara, antara lain :

- a. Makanan ternak hendaknya dihindari dari material yang tercemar oleh toksin *Clostridium botulinum*.
- b. Sisa makanan yang terdapat didalam peternakan, berupa daging atau sayur sayuran yang membusuk harus segera dibuang.
- c. Bangkai ternak dari peternakan hendaknya dimusnahkan dan jangan sampai ada yang tertinggal untuk menjadi busuk.
- d. Penderita diisolir dan faeces penderita harus segera dimusnahkan (21, 22).
- e. Makanan yang mempunyai pH kurang dari 4,6 atau lebih dari 9,0 dapat diswetkan tanpa pemanasan, karena spore *Clostridium botulinum* tidak dapat tumbuh pada media yang sangat asam atau sangat alkalis. Keasaman yang diperlukan dapat dicapai dengan menggunakan asam asetat 2 % atau asam sitrat.
- f. Untuk memusnahkan spore dapat dilakukan dengan pemanasan, tetapi pemakaian Chlorine lebih efektif.

- g. Bila kaleng menggelembung, terdapat gelembung gelembung gas pada waktu dibuka, makanan menjadi hancur atau bau yang tengik maka bahan makanan tersebut tidak boleh dimakan baik oleh manusia maupun ternak (31).
- h. Dalam menangani makanan yang dicurigai, hendaknya harus berhati hati, agar jangan sampai menyentuh luka luka iris atau kulit yang lecet (26).

2. Pengobatan.

Unggas yang menderita botulismus ringan dapat ditolong dengan memberikan campuran dedak basah satu kali sehari selama 2 - 3 hari dengan 1 pound garam epsom untuk 75 ekor atau diberi garam epsom dalam air minum rata rata 1 pound untuk 100 ekor. Antitoksin dapat digunakan juga, tetapi mahal harganya (19, 22).

Menurut Burke et al (1921) dapat pula dilakukan dengan cara cara lain untuk menetralisir toksin dalam saluran pencernaan dengan campuran sama banyak air sabun dan minyak zaitun melalui anus. Air sabun menetralisir toksin dan minyak zaitun mencegah penyerapannya (31).

Dengan memberikan air segar yang banyak, dimaksudkan untuk mengencerkan dan mengeluarkan toksin yang ada dalam saluran pencernaan (5).

Guanidin hydrochlorid telah pula dipergunakan dalam penyembuhan botulismus karena efeknya meningkatkan pelepasan acetylcholine dari ujung ujung syaraf. Guanidin hydrochlorid dan monoacetat bekerja pada sebagian postsynaptic untuk meningkatkan tonus otot (7).

BAB VII

HUBUNGANNYA DENGAN KESEHATAN MASYARAKAT

Semua kejadian botulismus pada manusia berasal dari makanan-makanan yang diawetkan dengan berbagai cara pengawetan, khususnya yang dikalengkan.

Jenis bahan makanan yang menjadi sumber botulismus adalah yang berasal dari hasil-hasil pertanian, peternakan, ikan atau hasil-hasil laut lainnya yang diawetkan. Tidak ada kejadian botulismus yang berasal dari bahan makanan segar atau yang telah direbus terlebih dahulu sebelum dikonsumsi.

Diantara kejadian-kejadian botulismus, pada hewan ternak yang ada hubungannya dengan makanan-makanan kaleng, ialah botulismus pada ayam (31).

Untuk menghindari kejadian botulismus pada manusia, hendaknya semua bahan makanan yang diawetkan, khususnya yang dikalengkan, sebelum dikonsumsi, dipanaskan terlebih dahulu pada suhu air mendidih selama kira-kira 10 menit.

BAB VIII

R I N G K A S A N

Botulismus merupakan penyakit keracunan makanan pada hewan dan manusia, dimana penyebabnya adalah toksin dari *Clostridium botulinum* yang terdapat dalam bahan makanan yang sudah membusuk.

Clostridium botulinum adalah mikroorganisme berbentuk batang, berspora yang bersifat anaerobe.

Clostridium botulinum beserta toksinnya mudah rusak oleh pengaruh panas, tetapi sporenya mempunyai daya tahan panas yang tinggi.

Toksin *Clostridium botulinum* bersifat "neuro-toksik" jadi gejala botulismus baik pada manusia maupun pada hewan bermanifestasi pada gejala gangguan syaraf.

Berdasarkan sifat toksikogeniknya, *Clostridium botulinum* dapat dibagi menjadi beberapa type yaitu type A, type B, type C (subtype C_a dan C_b), type D, type E, type F dan type G. Masing masing type ini adalah spesifik pathogen terhadap manusia atau jenis hewan ternak tertentu (7, 27).

Penentuan diagnosa berdasarkan atas gejala klinis, pemeriksaan laboratoris dan perubahan perubahan pa-

thologis anatomicis.

Gejala klinis botulismus pada kuda dibagi menjadi 4 bentuk : perakut, akut, subakut dan khronis. Pada kejadi an perakut dan akut terlihat inkoordinasi gerak. Lidah lemah dan paralyse otot otot pengunyah. Kulit terasa dingin dan tidak atau kurang bereaksi terhadap rangsangan. Pupil lebar dan tidak mengadakan reaksi terhadap cahaya. Pada kejadian subakut dan khronis terdapat inkoordinasi gerak, pola lemah, pernafasan dangkal, konstipasi selaput lendir ikterus, kemudian cyanosis (20).

Gejala klinis pada sapi terlihat kelemahan, hypothermi, kesulitan menelan, laktasi terhenti, jalannya tidak stabil, kepala ditundukkan. Faeces keras, selaput lendir pucat, pola lemah dan lambat (20).

Pada domba terlihat kepala ditundukkan, hypersalivasi, nafsu makan hilang, memamah biek ditahan dan konstipasi. Paralyse kaki belakang, sulit bernafas (20).

Gejala klinis pada unggas adalah paralyse yang mula mula meliputi otot otot sayap, kemudian kaki dan akhirnya leher. Membrana nictitans bereaksi lambat dan kemudian reflex corneal membran terhenti. Penderita mengalami diarrhoe dan bulu mudah rontok. Pada kejadian ringan terlihat kehilangan nafsu makan, kelemahan dan kesukaran menelan (15, 22, 23).

Pemeriksaan laboratoris berdasarkan pemeriksaan mikroskopis, pemupukan kuman, penyuntikan pada hewan percobaan dan pemeriksaan serologis.

Perubahan perubahan pathologis anatomis tidak spesifik, hanya pada anus dan bulu bulu ekornya dikotori dengan diarrhae yang kehijau hijauan pada unggas, pada kuda terdapat muco-enteritis pada kejadian skut, pada sapi dan domba omasum menggembung (5, 20).

Diagnose banding yang penting adalah dengan penyakit Equine encephelomyelitis pada kuda, Listeriosis, Melkziekte, Rabies pada sapi, NCD, Cholera ayam, Blue comb, Fowl typhoid dan Infectious serositis (3, 4, 20).

Pencegahan dan pemberantasan dapat dilakukan dengan beberapa cara, antara lain yang terpenting adalah bangkai ternak, bahan makanan yang sudah membusuk serta faeces dari penderita harus segera dimusnahkan, supaya tidak menulari hewan lainnya (31).

Pengobatan hanya dapat dilakukan dengan pemberian antitoksin atau zat zat yang dapat menetralisir toksin dalam saluran pencernaan, antara lain air minum yang banyak dan campuran sama banyak air sabun dan minyak zaitun yang dimasukkan lewat anus dan juga dengan Guanidin hydrochlorid dan monosetat (5, 7, 19, 22, 31).

DAFTAR KEPUSTAKAAN

1. Anonim, P.U.S.P. Direktorat Jendral Peternakan. Jakarta. Hal. 1.
2. Anonim, 1982. Kebutuhan daging meningkat 6,4 %. Surabaya Post. 4 Februari. Surabaya. Hal. 8.
3. Anonim. Petunjuk Beternek Ayam dan Program Pencegahan Penyakit. P.T. Pfizer Indonesia, Jakarta. Hal. 19, 26, 27, 28.
4. Ardle, A.A. Mc., Angus and Robertson. 1972. Poultry Management and Production. New.ed. Halstead Press. Sydney. p. 619.
5. Borland, E.D. 1977. Avian Botulismus and the high prevalence of Clostridium botulinum in the Norfolk Broads. Vet. Rec. 100 : 106 - 109.
6. Breed, R.S., Murray, E.G.D., Smith, N.R. 1957. Bergey's Manuel of Determinative Bacteriology. 7th ed. The Williams and Wilkins Compeny. Baltimore. p. 654 - 656.
7. Bruner, D.W. and J.H.Gillespie. 1981. Hegan's Infectious Disease of Domestic Animals. 6th ed. Cornell Univ. Press. Ithaca and London. p. 203 - 207.
8. Daykin, P.W. 1960. Veterinary Applieds Pharmacology and Thersapeutics. Bailliere, Tindell & Cox. London p. 686 - 687.

9. Frobisher, M., Hinsdill, R.D., Crabtree, K.T., Googheart, C. 1974. Fundamentals of Microbiology. 9th ed. Toppan Company, Limited. Tokyo, Japan. p.544-546.
10. Graham, J.M. and G.R. Smith. 1978. Avian Botulismus in winter and spring and the stability of Clostridium botulinum type C toxin. Vet. Rec. 102 : 40 - 41.
11. Graham, J.M. 1978. Clostridium botulinum type C and its toxin in fly larvae. Vet. Rec. 102 : 242 - 243.
12. Gunnison, J.B. and K.F. Meyer. 1930. The Journal of Infectious Disease. San Fransisco, California. Vol. 46. p. 335 - 340.
13. Gunnison, J.B. and G.E. Coleman. 1932. The Journal of Infectious Disease. San Fransisco, California. Vol. 51. p. 543 - 551.
14. Harrison, S.G. and Borland. 1973. Deaths in Ferrets (Mustela putorius) Due to Clostridium botulinum type C. Vet. Rec. 93 : 576 - 577.
15. Jull, M.A. 1958. Poultry Husbandry 3rd ed. Tata Mc. Graw-Hill. Publishing Company LTD. Bombay, New Delhi. p. 366.
16. Leifson, E. 1960. Atlas of Bacterial Flagellation. Academic Press. New York and London. p. 132,138.

17. Merchant, I.A. and R.A. Packer. 1956. Veterinary Bacteriology and Virology. 5th ed. Iows State Univ. Press. Ames Iowa. p. 470 - 472, 496 - 501.
18. Parsus Ngurah. 1980. Bacteria yang mencemari makanan. Majalah Pertanian dan Peternekan. Feb. ed. Jakarta. Hal. 18 - 19.
19. Petrak, M.L. 1969. Disease of Cage and Aviary Birds. Lea and Febiger. Philadelphia. p. 368.
20. Ressang, A.A. 1963. Patologi Khusus Veteriner. Archipel, Bogor. p. 467, 479 - 485, 515 - 516.
21. Seddon, H.R. and H.E. Albiston. 1965. Disease of Domestic Animals in Australia. 2nd ed. Commonwealth of Australia. p. 54 - 69.
22. Seneviratne, P. 1969. Disease of Poultry. 2nd ed. John Wright and Sons LTD. Bristol. p. 70 - 71.
23. Smith, H.A. and T.C. Jones. 1958. Veterinary Pathology. Lea and Febiger. Philadelphia. p. 351.
24. Smith, G.R. and R.A. Milligan. 1977. Clostridium botulinum type D in Britain. Vet. Rec. p. 121 - 122.
25. Smith, G.R. 1978. Botulismus, Waterfowl and Mud. The British Vet. Jour. Vol. 134 (5). Bailliere Tindall, London. p. 407 - 411.

26. Soltys, M.A. 1963. Bacteria and Fungi Pathogenic to Man and Animals. London. p. 214 - 219.
27. Stewart, C.P., A.Stolman. 1960. Toxicology (Mechanisme and Analytical Methods). Vol. 2. Academic Press. New York and London. p. 833.
28. Stokes, E.J. 1960. Clinical Bacteriology. 2nd ed. Edward Arnold (Publisher) LTD. London. p. 122.
29. Willis, A.T. 1977. Anaerobic Bacteriology and Laboratory Practice. 3rd ed. p. 315 - 323.
30. Wilson, G.S. and A.Miles. 1975. Topley and Wilson's. Principles of Bacteriology, Virology and Immunity. 6th ed. Vol. 1. The Williams and Wilkins Company. Baltimore. p. 1109 - 1127; 1135 - 1138.
31. Wilson, G.S. and A.Miles. 1975. Topley and Wilson's. Principles of Bacteriology, Virology, and Immunity. 4th ed. Vol. 2. The Williams and Wilkins Company. Baltimore. p. 2075 - 2111.

"-----oooo0 tot Ooooo-----"