

Deteksi *Cryptosporidium canis* pada Anjing di Kota Surabaya

(*CRYPTOSPORIDIUM CANIS DETECTION IN DOGS
IN THE CITY OF SURABAYA*)

Romy Muhammad Dary Mufa¹, Nunuk Dyah Retno Lastuti²,
Fedik Abdul Rantam³, Lucia Tri Suwanti^{2,4},
Endang Suprihati², Didik Handijatno³, Mufasirin^{2,4*}.

¹Mahasiswa Magister, Ilmu Penyakit dan
Kesehatan Masyarakat Veteriner,

²Departemen Parasitologi Veteriner,

³Departemen Mikrobiologi Veteriner,

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

⁴Institute of Tropical Disease, Universitas Airlangga

Kampus C Unair, Jalan Mulyorejo,

Kota Surabaya, Jawa Timur, Indonesia, 60115

Telepon +6281226094872, 5993016;

Faksimili +62315993015, *Email: mufasirin@fkh.unair.ac.id

ABSTRAK

Cryptosporidiosis adalah penyakit yang disebabkan oleh parasit protozoa *Cryptosporidium* spp. dan bersifat zoonosis. *Cryptosporidium canis* merupakan spesies utama yang menginfeksi anjing. Penularan *C. canis* pada anjing ke manusia sangat mungkin terjadi. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi infeksi *C. canis* secara mikroskopis berdasarkan morfologi dan molekuler menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) pada anjing di Kota Surabaya. Sebanyak 80 sampel feses anjing diare diambil dari rumah sakit hewan dan klinik hewan di beberapa wilayah di Kota Surabaya, kemudian ditambahkan kalium dikromat dan disimpan pada suhu -4°C. Deteksi dilakukan terhadap keberadaan ookista *Cryptosporidium* spp. secara mikroskopis yang selanjutnya dikonfirmasi dengan pemeriksaan secara molekuler menggunakan metode PCR. Hasil penelitian menunjukkan 40 sampel positif mengandung ookista *Cryptosporidium* spp. dengan ukuran 2-6 µm. Sebanyak 10 sampel dari total sampel positif ookista *Cryptosporidium* spp dengan pemeriksaan mikroskopis, dengan uji PCR terdapat tujuh sampel positif *C. canis*. Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa spesies penyebab *Cryptosporidiosis* pada anjing di Kota Surabaya adalah *C. canis*. Tingginya kasus *Cryptosporidiosis* pada anjing dapat menjadi peringatan agar dapat melakukan pencegahan terhadap infeksi *Cryptosporidium* spp., khususnya pada hewan peliharaan yang berpotensi sebagai reservoir dalam penyebaran penyakit.

Kata-kata kunci: anjing; *Cryptosporidium canis*; *Polymerase Chain Reaction*

ABSTRACT

Cryptosporidiosis is a disease caused by *Cryptosporidium* spp. protozoan parasites and are zoonotic. *Cryptosporidium canis* is the main species that infects dogs. Transmission of *C. canis* in dogs to humans is possible. This study aims to detect microscopic *C. canis* infection based on morphology and molecularly using the *Polymerase Chain Reaction* (PCR) in dogs in Surabaya City. A total of 80 diarrhea dog feces samples were taken from Animal Hospitals and animal clinics in several areas in the Surabaya City, then added potassium dichromate and stored at -4°C. Detection was made of the presence of *Cryptosporidium* spp. oocysts microscopically which is then confirmed by molecular examination using the PCR method. The results showed 40 positive samples containing *Cryptosporidium* spp., oocysts, with a size of 2-6 µm. Ten samples from the total positive sample of *Cryptosporidium* spp. oocysts by microscopic examination, with the PCR test there were seven positive samples of *C. canis*. Based on the results of the study it can be concluded

that the species that causes Cryptosporidiosis in dogs in Surabaya City is *C. canis*. The high cases of Cryptosporidiosis in dogs can be a warning to be able to prevent *Cryptosporidium* spp. infections, especially in pets that have the potential as a reservoir in spreading disease.

Key words: dogs; *Cryptosporidium canis*; Polymerase Chain Reaction

PENDAHULUAN

Anjing adalah salah satu hewan peliharaan yang tinggal di tempat yang sama dengan pemiliknya, oleh sebab itu peran anjing sangat potensial sebagai *reservoir* penyebaran penyakit zoonosis. Salah satu penyakit zoonosis yang ditularkan dari anjing adalah *Cryptosporidiosis*. Spesies yang penting penyebab *Cryptosporidiosis* pada anjing adalah *Cryptosporidium canis* (Chen *et al.*, 2002; Fayer dan Xiao, 2007). Penyakit ini digolongkan *waterborne diseases* (Nichol *et al.*, 2003), yaitu penyakit yang ditularkan antar makhluk hidup akibat adanya cemaran baik berupa mikroorganisme ataupun zat berbahaya melalui air (Kusnoputranto dan Susana, 2000). Data dari *World Health Organization* (WHO) menunjukkan *waterborne diseases* merupakan 4,1% dari total penyebab kematian atau sekitar 1,8 juta jiwa setiap tahunnya (WHO, 2006).

Anjing yang terinfeksi *C. canis* gejala klinis yang timbul adalah sakit perut yang ditandai dengan diare profus dengan bau feses yang tajam, bercampur dengan darah, lendir dan reruntuhan epitel usus (Fayer, 2000; Fayer dan Xiao, 2007). Diare dapat berakibat penderita mengalami kehilangan cairan berlebihan sehingga menyebabkan penurunan bobot badan dalam waktu singkat dengan tanda dehidrasi yang men-colok. Dehidrasi lebih dari 10% cairan tubuh dapat mengancam nyawa penderita dan dapat mengakibatkan kematian (WHO, 2006). *Cryptosporidiosis* pada manusia bersifat *self-limited* pada penderita imunokompeten sehingga dapat sembuh dengan sendirinya tanpa pengobatan (Juraneck, 2006; Bouzid *et al.*, 2013). Tidak ada pengobatan spesifik untuk *Cryptosporidiosis* dan dengan rehidrasi telah terbukti efektif mengurangi gejala penyakit. Pemberian antibiotik dan antibodi saat ini sedang dalam pengembangan penelitian. Terapi *antiretroviral* dapat diberikan agar sistem imun meningkat dan mengurangi gejala *Cryptosporidiosis* (Sinambela, 2008; Mohammed *et al.*, 2017).

Data hasil penelitian menunjukkan bahwa *Cryptosporidiosis* pada anjing bersifat zoonosis

(Fayer, 2004). Menurut Sinambela (2008), *Cryptosporidium* spp. penyebab utama diare pada manusia adalah *C. parvum* dan *C. hominis*. *Cryptosporidiosis* pada manusia dapat juga diakibatkan oleh spesies *Cryptosporidium* asal sapi, kucing dan anjing (Current *et al.*, 1983; Sandoval *et al.*, 2017). Fayer (2004) melaporkan beberapa *C. canis* dapat menginfeksi anjing, hewan lain dan manusia. Spesies *Cryptosporidium* spp. yang menginfeksi anjing antara lain adalah *C. canis*, *C. felis*, *C. parvum* dan *C. hominis* (Morgan *et al.*, 2000; Fayer dan Xiao, 2007). Anjing dapat terinfeksi oleh *Cryptosporidium* spp. dari anjing lain yang sakit, hewan lain dan manusia (Fayer, 2004). Infeksi *C. canis* di alam telah dilaporkan oleh Zhou *et al.* (2004) pada serigala (*Vulpes vulpes*), anjing hutan (*Canis latrans*) dilaporkan oleh Trout *et al.* (2006) dan lebih dari 30 orang di Inggris, Jamaika, Kenya, Peru, Thailand dan Amerika Serikat (Trout, 2006; Gatei *et al.*, 2008). Bowman dan Foster (2010) juga melaporkan infeksi *C. canis* dan *C. felis* pada kasus *Cryptosporidiosis* pada manusia di Amerika Serikat. Hal ini membuktikan bahwa *C. canis* dan *C. felis* bersifat zoonosis.

Penelitian *Cryptosporidiosis* di Indonesia terbatas pada manusia (Marzain *et al.*, 2018; Uli, 2018) dan hewan, seperti pada sapi (Eyspana, 2014) dan biawak (Prabayuda, 2017). Deteksi molekuler *C. canis* pada anjing dapat menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Penggunaan metode PCR dilakukan untuk mendeteksi mikroorganisme hingga ke level spesies (Yusuf, 2010).

Polymerase Chain Reaction dapat mengidentifikasi mikroorganisme secara detail hingga tingkat spesies bahkan strain yang tidak dapat dilakukan menggunakan sistem konvensional dengan pemeriksaan mikroskopis. Penggunaan PCR untuk mendeteksi spesies harus memperhatikan beberapa hal, terutama primer yang digunakan (Loeffelholz dan Deng, 2006).

Salah satu gen target yang dapat digunakan untuk mendeteksi *Cryptosporidium* spp. adalah gen 18S SSU rRNA. Gen tersebut memiliki laju evolusi yang lambat sehingga tepat digunakan untuk menganalisis divergensi. Gen 18S SSU rRNA sering digunakan dalam studi

filogenetik dan menjadi penanda penting dalam penentuan spesies (Meyer *et al.*, 2010).

Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi *C. canis* yang menginfeksi anjing di Rumah Sakit Hewan dan klinik hewan di beberapa wilayah di Kota Surabaya secara mikroskopis dan dikonfirmasi menggunakan PCR.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan 80 sampel feses anjing diare yang diperoleh dari Rumah Sakit Hewan dan klinik hewan di beberapa wilayah Kota Surabaya pada bulan April-Mei 2019 dan pemeriksaan sampel pada bulan Juni-Agustus 2019. Sampel sebanyak 5 g dikumpulkan dan dimasukkan ke dalam pot sampel yang berisi kalium dikromat ($K_2Cr_2O_7$) 2% sebagai pengawet protozoa. Setiap pot sampel diberi label atau penanda nomer sampel yang disesuaikan dengan data sampel yang meliputi nama anjing, jenis/ras anjing, waktu dan tempat pengambilan. Pot sampel disimpan pada suhu $-4^\circ C$.

Bahan untuk pemeriksaan mikroskopis adalah gula ($C_6H_{12}O_6$) 1,2% sebagai bahan utama untuk pemeriksaan dengan metode apung dan *oil immerse* sebagai bantuan dalam mengamati sampel menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000 kali.

Bahan untuk isolasi DNA adalah gSYNC™ DNA extraction kit yang meliputi larutan ddH₂O buffer GST, proteinase-K, buffer GSB, ethanol absolut, buffer W1, buffer wash dan buffer elution. Bahan untuk pemeriksaan dengan metode PCR antara lain, dua kali PCR Master mix Solution (i-Taq™) (Intron Biotechnology), free RNase, DNA template, primer *C. canis* F: 5' GCA GGC TTT TGC CTT GAA TA 3' 3' dan R: 5' GAT TTG TTA AAG ACA AAC TA 3' yang komplemen terhadap data *C. canis* di Gene Bank. Primer yang digunakan dalam penelitian diperoleh dari hasil rancangan peneliti menggunakan perangkat lunak primer3 0.4.0. berdasarkan sekuens referensi MK886593.1 pada Gene Bank yang representatif untuk *C. canis* (Koressaar *et al.*, 2007; Untergasser *et al.*, 2012). Bahan untuk elektroforesis antara lain agarose, buffer TBE, ethidium bromide dan marker DNA.

Pemeriksaan Mikroskopis *Cryptosporidium* spp.

Sampel yang telah dikumpulkan selanjutnya diperiksa di Laboratorium Protozoologi,

Departemen Parasitologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Unair. Terhadap Sampel dilakukan pemeriksaan mikroskopis menggunakan metode apung. Sampel dimasukkan ke dalam tabung sentrifuge dan tambahkan aquades, sentrifugasi dilakukan dengan kecepatan 1500 rpm selama lima menit untuk memisahkan feses dari larutan kalium dikromat 2% setelah itu supernatan dibuang. Tahap tersebut diulangi beberapa kali sampai supernatan terlihat jernih. Larutan gula 1,2% ditambahkan ke dalam tabung sampai tiga per empat tabung dan disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama lima menit. Tabung diletakkan di atas rak tabung dengan posisi tegak. Larutan di bagian permukaan tabung diambil, diteteskan pada objek *glass* dan ditutup menggunakan *cover glass* (Sabaa *et al.*, 2015). Pemeriksaan mikroskopis ookista *Cryptosporidium* spp. dilakukan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000 kali, kemudian diukur dan difoto menggunakan OptiLab®. Pengukuran diameter ookista menggunakan perangkat lunak Image Raster 4.0.5. Hasil pemeriksaan mikroskopis disesuaikan dengan morfologi *Cryptosporidium* spp. menurut Levine (1985) dan Fayer (2001). Ookista *Cryptosporidium* spp. mempunyai ukuran diameter 2-6 μm . Sepuluh sampel hasil pemeriksaan mikroskopis yang diambil secara acak kemudian diperiksa secara molekuler menggunakan metode PCR sebagai uji konfirmasi *Cryptosporidium* ke level spesies.

Pemeriksaan Molekuler dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Sejumlah 10 sampel yang positif secara mikroskopis ditemukan ookista *Cryptosporidium* spp. digunakan untuk uji konfirmasi dengan PCR. Sebanyak 200 μL larutan sampel yang positif *Cryptosporidium* spp. dilakukan ekstraksi DNA menggunakan *Geneaid* sesuai protokol (Geneaid, 2017).

Amplifikasi PCR terdiri dari denaturasi awal dilakukan pada suhu $94^\circ C$ selama lima menit, diikuti dengan 30 siklus dari denaturasi $94^\circ C$ selama dua menit, *annealing* pada $52^\circ C$ selama satu menit dan *elongasi* pada $72^\circ C$ selama 30 detik, serta *elongasi* tambahan selama tujuh menit. Produk PCR kemudian dilakukan elektroforesis. Gel elektroforesis dibuat dengan konsentrasi 2% yang telah ditambahkan ethidium bromide. Sebanyak 5 μL produk PCR termasuk *marker* (DNA ladder) dimasukkan ke dalam sumuran/*well*, selanjutnya dijalankan

dengan 100 V, 40 mA selama 30 menit. Produk PCR kemudian dibaca dengan *transluc illuminator*. Hasil positif apabila didapatkan pita DNA (*band*) dengan panjang 157 bp.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Pemeriksaan Mikroskopis *Cryptosporidium* spp.

Pemeriksaan mikroskopis sampel feses anjing diare di Kota Surabaya dilakukan secara konvensional menggunakan metode apung yang bertujuan untuk mendeteksi ookista *Cryptosporidium* spp. dengan mikroskop perbesaran 1000 kali. Sejumlah 40 dari 80 sampel yang diperiksa ditemukan ookista *Cryptosporidium* spp. Ookista berbentuk bulat dengan diameter berukuran 2-6 µm (Gambar 1). Di dalam ookista *Cryptosporidium* spp. terlihat bentukan sporozoit. Hal ini sesuai laporan Fayer dan Xiao (2007) dan Sinambela (2008) bahwa ukuran ookista *Cryptosporidium* spp. 2-6 µm dan memiliki bentuk bulat dengan empat sporozoit di dalamnya.

Pemeriksaan mikroskopis memiliki keterbatasan dengan bias yang cukup besar (*false negative*) terutama pada individu yang mempunyai gejala klinis yang sama. Morfologi ookista *Cryptosporidium* spp. memiliki ukuran sangat kecil, tidak memiliki ciri khas sehingga sulit dideteksi menggunakan pemeriksaan mikroskopis. Deteksi mikroskopis dapat dipermudah dengan menggunakan metode pewarnaan tahan asam. Pemeriksaan mikroskopis memiliki tingkat keakuratan lebih rendah dibandingkan dengan pemeriksaan molekuler. Bentukan ookista dapat dikelirukan dengan bentukan mikroorganisme lain seperti sel jamur, sel tumbuhan dan reruntuhan/*debris* sel yang menyerupai ookista. Menurut Nichol *et al.* (2003), deteksi *Cryptosporidium* spp. menggunakan metode PCR memiliki tingkat keakuratan yang jauh lebih tinggi daripada pemeriksaan secara mikroskopis.

Hasil Uji *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

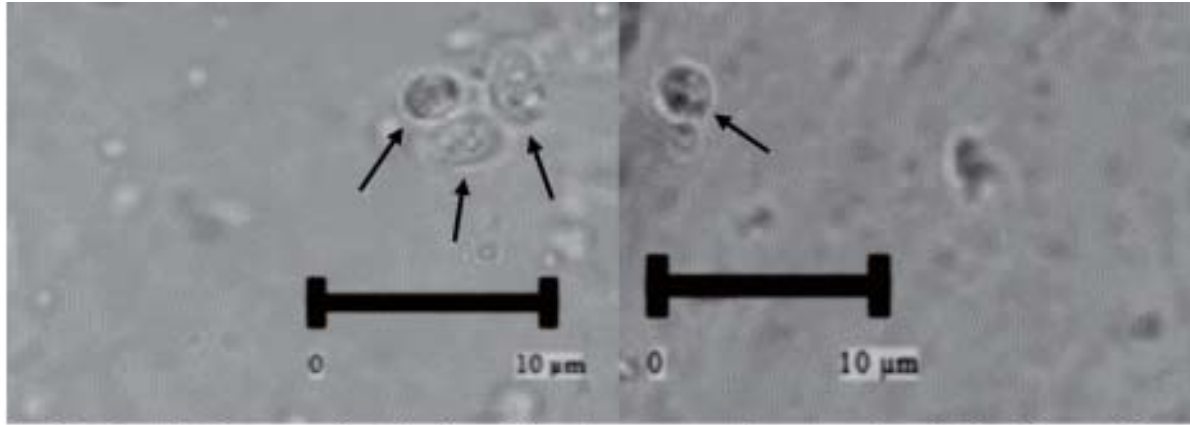
Uji PCR dilakukan bertujuan untuk mengkonfirmasi hasil positif *Cryptosporidium* spp. pada pemeriksaan mikroskopis. Hasil deteksi *C. canis* pada anjing di Kota Surabaya dengan menggunakan metode PCR dari 10 sampel didapatkan tujuh sampel positif dengan teramplifikasinya pita DNA sebesar 157 bp dan tiga sampel negatif. Hasil uji PCR dibaca pada

gel agarose 2% dengan metode elektroforesis (Gambar 2.). Tiga sampel negatif dapat diduga sebagai ookista spesies *Cryptosporidium* lain atau bukan ookista *Cryptosporidium* spp. Penelitian ini menggunakan reagen ekstraksi DNA yang dapat mengisolasi DNA dari beberapa material termasuk ookista *Cryptosporidium* spp., walaupun tidak secara khusus. Terdapat kemungkinan sampel yang mengandung sedikit ookista *Cryptosporidium* spp. tidak dapat terekstraksi dengan reagen tersebut. Faktor lain adalah zat-zat lain yang ada di feses (*impuritis*) dapat menghambat proses PCR.

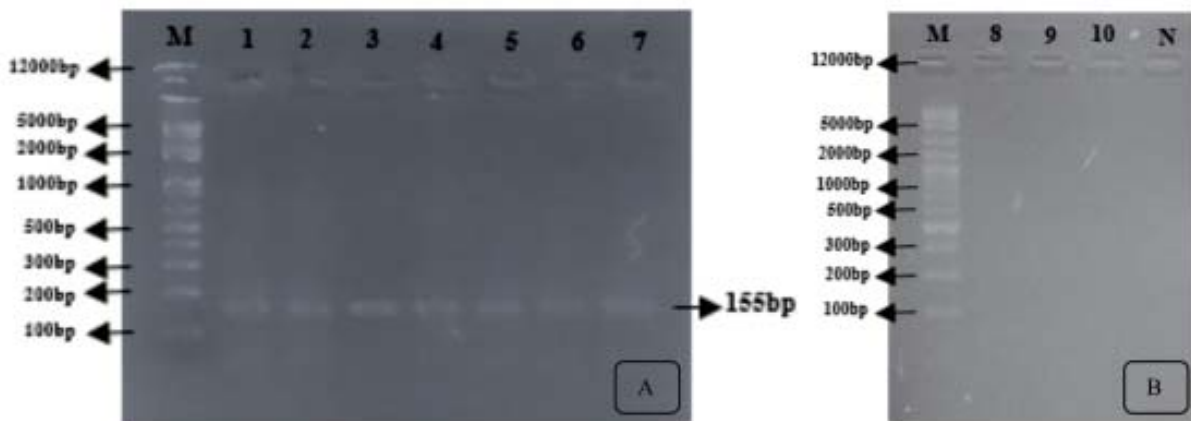
Uji PCR merupakan metode dalam pemeriksaan molekuler yang digunakan untuk mendeteksi *C. canis* berdasarkan primer yang komplemen terhadap gen 18S SSU rRNA *C. canis*. Pada penelitian ini digunakan primer spesifik *C. canis* yang terdiri dari F: 5' GCA GGC TTT TGC CTT GAA TA 3' 3' dan R: 5' GAT TTG TTA AAG ACA AAC TA 3'. Persentase spesifisitas dan sensitivitas PCR tergantung oleh primer yang ditentukan dari jumlah salinan homologi (*alignment*) primer dengan urutan target nukleotida.

Metode PCR mempunyai spesifisitas dan sensitivitas tinggi sehingga layak untuk dijadikan acuan konfirmasi deteksi mikroorganisme. *Polymerase Chain Reaction* melakukan amplifikasi DNA secara *in vitro*, sehingga hasil yang didapatkan lebih sensitif. Sintesis untai baru DNA bermula dengan terjadinya hibridisasi DNA primer secara spesifik pada bagian tertentu rangkaian DNA target (*template*), mengingat cetakan yang dibutuhkan berupa DNA untai ganda maka digunakan sepasang primer untuk menyalin kedua untai tersebut agar keduanya saling komplementer. Metode PCR memiliki keunggulan dapat mendeteksi mikroorganisme target secara spesifik hingga ke level spesies, namun metode PCR memiliki kekurangan, karena harganya yang relatif mahal dibandingkan dengan uji molekuler lainnya (Loeffelholz dan Deng, 2006).

Keberadaan *C. canis* pada anjing di Kota Surabaya tidak terlepas dari peran inang/*host* dan lingkungan anjing dipelihara. Anjing inang dengan gejala klinis diare memiliki potensi menularkan ke anjing sehat, hewan lain dan manusia. Lingkungan yang tercemar, termasuk pakan dan air minum dapat menjadi faktor utama penyebaran *Cryptosporidiosis*. *Cryptosporidiosis* digolongkan *waterborne*



Gambar 1. Gambaran mikroskopis ookista *Cryptosporidium* spp. (panah) berukuran 2-6 µm dengan metode apung (1000 kali)



Gambar 2. Visualisasi produk *Polymerase Chain Reaction* menggunakan elektroforesis, A) M: Marker DNA; 1-7: Sampel, B) M: Marker DNA; 8-10: Sampel; N: Kontrol Negatif

diseases (Nichols *et al.*, 2003), yaitu penyakit yang ditularkan antar makhluk hidup akibat adanya cemaran baik berupa mikroorganisma ataupun zat berbahaya melalui air (Kusnopranto dan Susana, 2000).

Setelah diidentifikasinya spesies *C. canis* di Kota Surabaya berdasarkan morfologi dan molekuler menggunakan PCR, diharapkan penularan *Cryptosporidiosis* pada anjing dapat dikendalikan melalui pengobatan dan pencegahan secara dini sehingga penularan pada hewan termasuk pada manusia dapat dicegah.

SIMPULAN

Hasil pemeriksaan mikroskopis 80 sampel feses anjing diare di Kota Surabaya didapatkan 40 sampel positif mengandung ookista *Cryptosporidium* spp. dengan bentuk

bulat berukuran 2-6 µm. Tujuh sampel dari 10 sampel positif yang mengandung ookista *Cryptosporidium* spp. dengan pemeriksaan molekuler menggunakan PCR dideteksi sebagai *C. canis*.

SARAN

Hasil penelitian *Cryptosporidiosis* pada anjing di Kota Surabaya menunjukkan adanya risiko penyebaran dan penularan pada anjing, hewan lain dan manusia. Perlu upaya pengendalian infeksi *Cryptosporidium* spp. yang melibatkan pemilik anjing, dokter hewan dan instansi terkait. Selain itu juga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut menggunakan primer yang komplemen terhadap spesies *Cryptosporidium* lain, serta dilanjutkan ke tahap

molekuler sekuensing DNA untuk mengetahui susunan nukleotida dan homologi *Cryptosporidium* spp. yang menginfeksi anjing di Kota Surabaya dengan spesies yang ada di dunia.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas kesempatan dapat mengikuti pendidikan Magister di Program Studi S2 Ilmu Penyakit dan Kesehatan Masyarakat Veteriner. Selain itu, ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Ibunda Dra Fatimah Subiyartiningsih, dan Adinda Ramy Inas Mahirah Mufa yang telah membantu banyak dalam penelitian ini hingga selesai.

DAFTAR PUSTAKA

- Bouزيد M, Hunter PR, Chalmers RM, Tylera KM. 2013. *Cryptosporidium* Pathogenicity and Virulence. *Am Soc Microbiol* 26(1): 115-134.
- Bowman DD, Forster AL. 2010. *Cryptosporidiosis* and *Giardiasis* in Dogs and Cats: Veterinary and Public Health Importance. *Exp Parasitol* 124: 121-127.
- Chen XM, Keithly JS, Paya CV, LaRusso NF. 2002. *Cryptosporidiosis*. *N Engl J Med* 346(22): 1723-1731.
- Current WL, Reese NC, Ernst JV, Bailey WS, Heyman MB, Weinstein WM. 1983. Human *Cryptosporidiosis* in Immunocompetent and Immunodeficient Persons – Studies of an Outbreak and Experimental Transmission. *N Eng J Med* 308: 1252-1257.
- Eyspana BD. 2014. Prevalence of Intestinal Pathogen Protozoa on Dairy Calves in Setia Kawan Dairy Cooperates Nongko-jajar Pasuruan. *Unair e-Repository* 1-12. <http://repository.unair.ac.id/55940/1/KH%20107-16%20Af%20d%20.pdf>.
- Fayer R, Morgan U, Upton SJ. 2000. Epidemiology of *Cryptosporidium*: Transmission, Detection and Identification. *Int J Parasitol* 30: 1305-1322.
- Fayer R, Trout JM, Xiao L, Morgant UM, Lal AA, Dubey JP. 2001. *Cryptosporidium canis* n. sp. from Domestic Dogs. *J Parasitol* 87(6): 1415-1422.
- Fayer R. 2004. *Cryptosporidium*: A Water-Borne Zoonotic Parasite. *Vet Parasitol* 126: 37-56.
- Fayer R, Xiao L. 2007. *Cryptosporidium* and *Cryptosporidiosis*. 2nd ed. France. CRC Press. Hlm. 1-42.
- Gatei W, Wamae CN, Mbae C, Waruru A, Mulinge E, Waithera T, Gatika SM, Kamwathi SK, Revathi G, Hart CA. 2006. *Cryptosporidiosis*: Prevalence, Genotype Analysis and Symptoms Associated with Infections in Children in Kenya. *Am J Trop Med Hyg* 75(1): 78-82.
- Geneaid. 2017. gSYNCTM DNA Extraction Kit. Instruction Manual Ver.02.10.17. Geneaid Biotech Ltd. Taiwan. Hlm. 7-8.
- Henricksen SA, Pohlenz JFL. 1981. Staining of *Cryptosporidia* by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta Vet Scand* 22: 594-596.
- Juraneck DD. 2006. *Cryptosporidiosis*. In Strickland GT: *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Disease*. 8th ed. Philadelphia. WB Saunders Company. Hlm. 595-600.
- Koressaar T, Remm M. 2007. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* 23(10): 1289-1291.
- Kusnoputranto H, Susana D. 2000. *Kesehatan Lingkungan*. Depok. Fakultas Kesehatan Masyarakat, Universitas Indonesia. Hlm. 26-35.
- Levine ND. 1985. *Veterinary Protozoology*. Ames. Iowa. Iowa State University Press. Hlm. 213-215.
- Loeffelholz M, Deng H. 2006. *PCR and its Variations. Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*. USA. Springer US. Hlm. 166-183.
- Marzain M, Novita E, Semiarty R. 2018. Identifikasi Protozoa Usus pada Pasien yang Sedang Menjalani Kemoterapi di RSUP Dr. M. Djamil, Padang. *Jurnal Kesehatan Andalas* 7(3): 364-369.

- Meyer A, Todt C, Mikkelsen NT, Lieb B. 2010. Fast Evolving 18S rRNA Sequences from *Solenogastres* (Mollusca) Resist Standard PCR Amplification and Give New Insights into Mollusk Substitution Rate Heterogeneity. *BMC Evol Biol* 10: 70-75.
- Mohammed A, Degefu H, Jilo K. 2017. *Cryptosporidium* and Its Public Health Importance: Review. *Int J Res Stu Microbiol Biotech* 3(4): 12-31.
- Morgan UM, Xiao L, Monis P, Fall A, Irwin PJ, Fayer R, Denholm KM, Limor J, Lal A, Thompson RCA. 2000. *Cryptosporidium* spp. in Domestic Dogs: The "Dog" Genotype. *Am Soc Microbiol* 66(5): 2220–2223.
- Nichol RAB, Campbell BM, Smith HV. 2003. Identification of *Cryptosporidium* spp. Oocysts in United Kingdom Noncarbonated Natural Mineral Waters and Drinking Waters by Using a Modified Nested PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Assay. *Appl Environ Microbiol* 69(7): 4183-4189.
- Nielsen CK, Ward LA. 1999. Enhanced detection of *Cryptosporidium parvum* in the acid-fast stain. *J Vet Diagn Invest* 11: 567–569.
- Prabayuda FD. 2017. Identifikasi Biomo-lekuler *Cryptosporidium* sp. pada Biawak Air (*Varanus salvator*) di Surabaya. *Unair e-Repository* 1-12. <http://repository.unair.ac.id/66735/>.
- Sabaa TM, Nida MS, Sura BK. 2015. Preparation Simplified Culture for Culturing Parasites. *Agriculture and Healthcare. J Biol* 5: 20-25.
- Sandoval MR, Delgado CA, Chavera CA, Choez AK, Garcia BC, Ruiz GL, Arevalo RI. 2017. High Mortality in Dairy Calves by Neonatal Diarrhea Caused by *Cryp-tosporidium* sp. Associated with Bacteremia in a Dairy Farm in Lima. *Revista de Invest Vet del Peru* 28(3): 757-763.
- Sinambela AH. 2008. *Cryptosporidiosis*. *USU e-Repository* 1-18. <http://repository.usu.ac.id/bitstream/123456789/3470/1/Adelina1.pdf>.
- Trout JM, Santin M, Fayer R. 2006. *Giardia* and *Cryptosporidium* Species and Genotypes in Coyotes (*Canis latrans*). *J Zoo Wildl Med* 37(2): 141-144.
- Uli M. 2018. Identifikasi Protozoa dan Pengukuran Parameter Kimia pada Air Kolam Renang. *USU e-Repository* 1-15. <http://repository.usu.ac.id/bitstream/handle/123456789/11038/150100173.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. 2012. Primer3 - New Capabilities and Interfaces. *Nucleic Acids Research* 40(15): e115.
- WHO (World Health Organization). 2006. Guidelines for Drinking Water Quality. *Cryptosporidiosis*. *Microbiol Environ Health* 9-119.
- Yusuf ZK. 2010. *Polymerase Chain Reaction* (PCR). *Saintek* 5(6): 1-6
- Zhou L, Fayer R, Trout JM, Ryan UM, Schaefer FW, Xiao L. 2004. Genotypes of *Cryptosporidium* Species Infecting Fur-Bearing Mammals Differ from Those of Species Infecting Humans. *Appl Environ Microbiol* 70(12): 7574-7577.