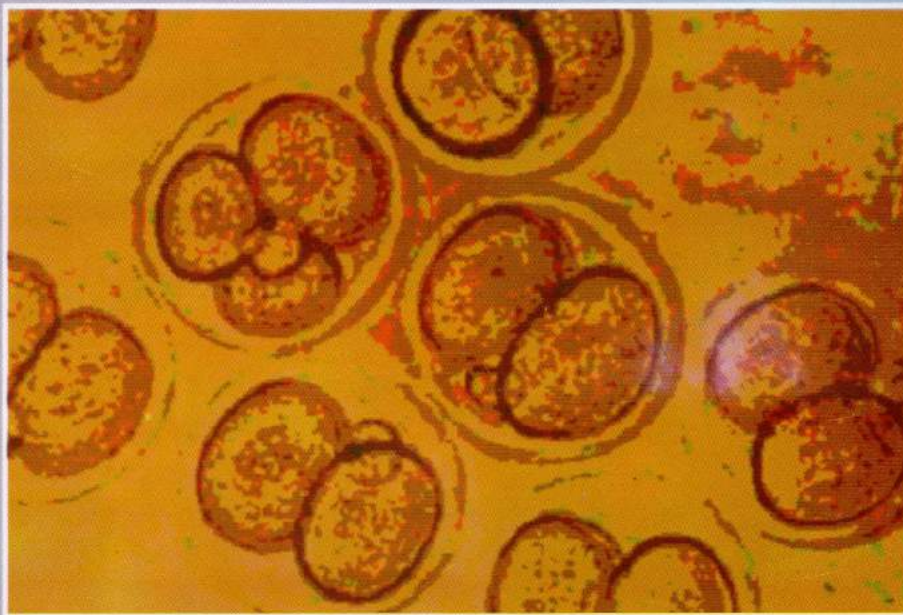


ISSN 2015-8930

MEDIA

Kedokteran Hewan

Veterinary Medicine Journal



Dr. Agus Sumarno

MKH (Vet.Med.J.)	Vol. 22	No. 3	Hal 136-207	Surabaya, Sep 2006	ISSN 2015-8930
------------------	---------	-------	-------------	--------------------	----------------

Akreditasi Dirjen Dikti No. 23a/Dikti/Kep/2004

Media Kedokteran Hewan

Vol. 22, No. 3, September 2006

Media Kedokteran Hewan memuat tulisan ilmiah dalam bidang Kedokteran Hewan dan
Pernakan

Terbit pertama kali tahun 1985 dengan frekuensi terbit tiga kali satu tahun pada bulan
Januari, Mei dan September

Susunan Dewan Redaksi

Ketua Penyunting :

Imam Mustofa

Sekretaris :

Epy Muhammad Luqman

Bendahara, Iklan, Langganan :

Diah Kusumawati Gali

Penyunting Pelaksana :

Sri Subekti Bendryman Soedjoko

Mas'ud Hariadi

Iwan Willyanto

Fedik Abdul Rantam

Suwarno

Penyunting Teknik :

Kusnoto

Thomas Valentinus Widiyatno

Erma Safitri

Tata Usaha :

Berty Ferijanti

Alamat: Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga
Kampus "C" Unair, Mulyorejo Surabaya 60115
Telp. (031) 5992785; 5993016; Fax. (031) 5993015
e-mail: mkh_ua@yahoo.com

Rekening: Tahapan BCA - No. 01-4018-9375 (Dr. Diah Kusumawati G.)

Media Kedokteran Hewan diterbitkan oleh **Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga.**
Akreditasi Dirjen Dikti No. 23a/Dikti/Kep/2004.

Media Kedokteran Hewan

Vol. 22, No. 3, September 2006
Ketentuan untuk Penulisan Naskah

1. Ketentuan Umum
 - a. Media Kedokteran Hewan memuat tulisan ilmiah dalam bidang Kedokteran Hewan dan Peternakan, berupa hasil penelitian, artikel ulasan balik (*review*) dan laporan kasus baik dalam Bahasa Indonesia maupun Bahasa Inggris.
 - b. Naskah / makalah harus orisinal dan belum pernah diterbitkan. Apabila diterima untuk dimuat dalam Media Kedokteran Hewan, maka tidak boleh diterbitkan dalam majalah atau media yang lain.
2. Standar Penulisan
 - a. Makalah diketik dengan jarak 2 spasi, kecuali Judul, Abstrak, Judul tabel dan tabel, Judul gambar, Daftar Pustaka, dan Lampiran diketik menurut ketentuan tersendiri.
 - b. Alinea baru dimulai 3 (tiga) ketukan ke dalam atau (*First line 0.3"*) dari format paragraf.
 - c. Huruf standar untuk penulisan adalah Book Antiqua 11.
 - d. Memakai kertas HVS ukuran kuarto (8,5 x 11").
 - e. Menggunakan bahasa Indonesia atau bahasa Inggris.
 - f. Tabel / Ilustrasi / Gambar harus amat kontras, juga menyertakan *file scanning* (foto) terpisah dengan makalah dengan format file JPG. Keterangan Tabel, Gambar atau Penjelasan lain dalam Lampiran diketik 1 (satu) spasi.
3. Tata cara penulisan naskah / makalah ilmiah
 - a. Tebal seluruh makalah sejak awal sampai akhir 12-14 halaman.
 - b. Penulisan topik (Judul, Nama Penulis, Abstrak, Pendahuluan, Metode dst.) tidak menggunakan huruf kapital (*setence*) tetapi menggunakan *Title Case* dan diletakkan di pinggir (sebelah kiri).
 - c. Sistematika penulisan makalah adalah Judul (Bahasa Indonesia dan Inggris), Nama Penulis dan Identitas, Abstrak dengan Key words, Pendahuluan, Metode Penelitian, Hasil dan Pembahasan, Kesimpulan, Ucapan Terima Kasih (bila ada), Daftar Pustaka dan Lampiran (bila ada).
 - d. Judul harus pendek, spesifik, tidak boleh disingkat dan informatif, yang ditulis dalam bahasa Indonesia dan bahasa Inggris.
 - e. Nama penulis di bawah judul, identitas dan instansi penulis harus jelas, tidak boleh disingkat dan ditulis di bawah nama penulis.
 - f. Abstrak maksimal terdiri dari 200 (dua ratus) kata, diketik 1 (satu) spasi dalam bahasa Indonesia dan Inggris.
 - g. Kata kunci (*key words*) maksimum 5 (lima) kata setelah abstrak.
 - h. Metode Penelitian memuat peralatan / bahan yang digunakan (terutama yang spesifik), prosedur penelitian dan analisis statistik (bila ada).
 - i. Daftar Pustaka disusun secara alfabetik tanpa nomor urut. Singkatan majalah/jurnal berdasarkan tata cara yang dipakai oleh masing-masing jurnal. Diketik 1 (satu) spasi dengan paragraf *hanging 0.3"* dan before 3.6 pt. Proporsi daftar pustaka, Jurnal/Majalah Ilmiah (60%), dan *Text Book* (40%). Berikut contoh penulisan daftar pustaka berturut-turut untuk *Text Book* dan Jurnal.
 Roitt, I., J. Brostoff, and D. Male. 1996. *Immunology*. 4th Ed. Black Well Scientific Pub. Oxford.
 Staropoli, I., J.M. Clement, M.P. Frenkiel, M. Hofnung and V. Deuble. 1996. Dengue-1 virus envelope glycoprotein gene expressed in recombinant baculovirus elicits virus neutralization antibody in mice and protects them from virus challenge. *Am.J. Trop. Med. Hygi*; 45: 159-167.
4. Pengiriman makalah dapat dilakukan setiap saat dalam bentuk cetakan (*print out*) sebanyak 3 (tiga) eksemplar. Setelah ditelaah oleh Tim Editor MKH, makalah yang telah direvisi penulis segera dikembalikan ke redaksi dalam bentuk cetakan 1 (satu) eksemplar dengan menyertakan makalah yang telah direvisi dan 1 (satu) disket 3.5" (Progam MS Word/IBM Compatible) dikirim ke alamat redaksi: **Media Kedokteran Hewan, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Kampus C Unair, Jalan Mulyorejo, Surabaya 60115, Telepon 031-599.2785; 599.3016; Fax. 031-599.3015; e-mail : mkh_ua@yahoo.com**
5. Ketentuan akhir

Terhadap naskah/makalah yang dikirim, redaksi berhak untuk:

 - a. memuat naskah/makalah tanpa perubahan
 - b. memuat naskah/makalah dengan perubahan
 - c. menolak naskah/makalah
6. Redaksi tidak bertanggung jawab atas isi naskah/makalah.
7. Makalah yang telah dimuat dikenai biaya penerbitan dan biaya pengiriman.
8. Penulis / pelanggan dapat mengirimkan biaya pemuatan makalah / langganan lewat **transfer-bank** pada **Dr. Diah Kusumawati G.**, dengan nomor rekening **Tahapan BCA No. 01-4018-9375**.
9. Semua keputusan redaksi tidak dapat diganggu gugat dan tidak diadakan surat menyurat untuk keperluan itu.

Media Kedokteran Hewan

Vol. 22, No. 3, September 2006

Terbit tiap 4 bulan sekali, pada bulan Januari, Mei dan September

UCAPAN TERIMA KASIH

Redaksi, penulis dan pembaca *Media Kedokteran Hewan* memberikan penghargaan dan terimakasih yang setinggi-tingginya kepada para pakar di bawah ini, selaku mitra bestari yang telah menelaah semua tulisan baik yang dimuat maupun yang ditolak sesuai rekomendasi yang disampaikan pada redaksi dalam edisi September 2006.

Dr. Aulanni'am, DES, drh. (FMIPA Unibraw)

Bambang Pontjo Priosoerjanto, drh. M.Sc., Ph.D (FKH IPB)

Dr. Heru Setijanto, drh. (FKH IPB)

Prof. Dr. Mohd Zamri Saad, DVM., M.Sc., Ph.D. (UPM Malaysia)

Ir. Mulyoto Pangestu, M.Reprod.Sc., Ph.D. (Monash University)

Prof. Dr. Siti Isrina Oktavia Salasia, drh. (FKH UGM)

Dr. Sri Muharsini, drh. (Balitvet)

Media Kedokteran Hewan

Vol. 22, No. 3, September 2006

Terbit tiap 4 bulan sekali, pada bulan Januari, Mei dan September

DAFTAR ISI

		Halaman
25	GnRH and LH Challenge-Test in Male Dogs Treated with a GnRH Agonist Implants Aris Junaidi and Peter Williamson	136 - 141
26	Isolasi dan Karakterisasi <i>Staphylococcus aureus</i> Asal Susu Kambing Peranakan Ettawa Agus Purnomo, Hartatik, Khusnan, Siti Isrina Oktavia Salasia, dan Soegiyono	142 - 147
27	Evaluasi Morfologis Vena Cephalica Cryopreservasi yang Diautotransplantasi- kan pada Sirkulasi Arterial Babi Bambang Sektiari Lukiswanto	148 - 153
28	Pelacakan Antigen Virus Penyakit Jembrana pada Limfosit Darah Tepi dengan Antibodi Monoklonal Nyoman Mantik Astawa, Nining Hartaningsih, Luh Putu Agustini, Wayan Masa Tenaya, Ketut Berata, dan Luh Putu Manik Widiyanti	154 - 161
29	Deteksi Protein <i>Haemonchus</i> sp pada Domba dan Kambing dengan Uji <i>Dot Blot</i> Menggunakan Antibodi Poliklonal Protein Ekskresi dan Sekresi <i>Haemonchus</i> <i>contortus</i> Nunuk Dyah Retno Lastuti, Mufasirin, dan Iwan Syahrial Hamid	162 - 167
30	Respons Imun Seluler Plasenta terhadap Infeksi <i>Toxoplasma gondii</i> pada Berbagai Umur Kebuntingan Mencit (<i>Mus musculus</i>) Lucia Tri Suwanti	168 - 173
31	Uji Efek Samping Formula Pakan Komplit terhadap Fungsi Hati dan Ginjal Pedet Sapi Frisian Holstein Retno Sri Wahjuni, dan Retno Bijanti	174 - 179
32	Perkembangan Embrio Kambing Asal Rumah Potong Hewan dalam <i>Tissue</i> <i>Culture Medium 199</i> (TCM199) sebagai Model Penyelamatan Plasma-nutfah Ruminansia Kecil Husni Anwar	180 - 185
33	Pengaruh Pemberian Inhibitor TLR LY294002 dan PD98059 In-vivo terhadap Reaksi Alergi pada Mencit Balb/c yang Disensitisasi Ovalbumin Anang Endaryanto, Suwarno, dan Kusnoto	186 - 193
35	Karakteristik <i>Escherichia coli</i> Isolat Asal Cairan Asites Ayam Potong terhadap Reaksi Hemolisin, Hemaglutinin dan Kepekaan Antibiotika Khusnan, Siti Isrina Oktavia Salasia dan Soegiyono	194 - 199
34	Potensi Ekstrak Mengkudu (<i>Morinda citrifolia</i>) terhadap Sekresi Nitric Oxide (NO) dalam Darah Hiperkolesterolemia Lilik Maslachah, Rahmi Sugihartuti, dan Mohamad Sukmanadi	200 - 204
	Indek Penulis.....	205
	Indek Subyek	207

Deteksi Protein *Haemonchus* sp pada Domba dan Kambing dengan Uji *Dot Blot* Menggunakan Antibodi Poliklonal Protein Ekskresi dan Sekresi *Haemonchus contortus*

Detection of *Haemonchus* sp Protein on Sheep and Goat Using Dot Blot Test with Polyclonal Antibody of Excretion and Secretion Protein of *Haemonchus contortus*

Nunuk Dyah Retno Lastuti ¹, Mufasirin ¹, dan Iwan Syahril Hamid ²

¹) Bagian Parasitologi Veteriner, ²) Bagian Ilmu Kedokteran Dasar Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo, Surabaya-60115
Tel. +62-031-5992785 Ext. 203, Fax. +62-031-5993015, e-mail : nunuk_dyah@unair.ac.id

Abstract

The aim of this research was to detect *Haemonchus* sp protein in blood circulation on sheep and goats with dot blot test using polyclonal antibody from specific protein (33 kDa) of *Haemonchus contortus*. The research method was conducted by taking blood samples from 50 of both goats and sheep in Surabaya slaughter house. The amount of 5 µl sera were dropped to nitrocellulose membrane paper and added by polyclonal antibody from specific protein of *H. contortus* which were stained by Western Blue Ready. The positive reaction will be shown by a dot of protein which have more clearly appeared from the negative control. As the positive control was *H. contortus* excretion and secretion protein. Based on the research from 50 blood samples of goats and sheep in slaughter house showed that 27 samples (54%) positive of *H. contortus* protein.

Key words: *Haemonchus contortus*, antigenic protein, goat, sheep.

Pendahuluan

Haemonchosis merupakan penyakit cacing saluran pencernaan yang disebabkan oleh *Haemonchus* sp pada domba dan kambing yang menyebabkan kerugian ekonomi yang sangat besar. Kerugian ekonomi yang ditimbulkan meliputi kerugian penurunan produksi daging, susu dan wol baik secara kuantitatif maupun kualitatif serta kematian ternak. Indonesia dengan jumlah ternak ruminansia kecil sekitar 126 juta ekor merupakan sumber protein hewani, selain itu juga merupakan pendapatan peternak kecil dimana 25% pendapatan berasal dari sumber tersebut (Knox, 1990). Pada tahun 1984 terjadi kerugian akibat haemonchosis sebesar 16,6 juta US\$ pertahun (Fabiyyi, 1986). Kerugian ekonomi tersebut pada kambing dan domba meliputi kematian, pertumbuhan terhambat dan gangguan reproduksi.

Haemonchus contortus merupakan parasit yang patogenik, luas penyebaran dan tingkat infeksiya dapat mencapai 80%. Kambing dan domba mudah terkena infeksi cacing saluran pencernaan ini karena

Indonesia yang beriklim tropis basah sangat menguntungkan kelangsungan hidup dan mempermudah penularannya.

Patogenitas haemonchosis tergantung jumlah larva yang menginfeksi, hal tersebut tampak pada domba muda yang terinfeksi sebanyak 1500 sampai 2500 larva infeksi akan terjadi kematian, sedangkan pada domba dewasa jika terinfeksi 3000 sampai 6000 larva cacing *H. contortus*. Telah dilaporkan bahwa infeksi hiperakut terjadi kematian pada domba dan ditemukan sebanyak 20.000 sampai 50.000 cacing di dalam abomasum (Colin, 1999). Kerugian yang ditimbulkan selain kematian juga menyebabkan terhambatnya pertumbuhan dan produksi karena sifat cacing adalah menghisap darah yang mengakibatkan anemia hemoragik dengan ditandai penurunan jumlah eritrosit dan PCV. Infeksi kronis dapat berjalan lama karena masih adanya sejumlah cacing, jika disertai nutrisi jelek maka berakibat penurunan berat badan dan disertai penurunan protein dalam tubuh.

Pengendalian infeksi oleh parasit cacing dilakukan dengan cara mengurangi kontaminasi oleh parasit serta memberikan pengobatan dengan anthelmintik untuk mengeluarkan parasit dari dalam tubuh induk semang, akan tetapi anthelmintik sendiri memberikan dampak negatif yakni dapat mengkontaminasi daging, susu dan telur disamping parasit cacing memiliki kemampuan genetika untuk mengembangkan sifat kebal terhadap anthelmintik sehingga menimbulkan "drug resistant" (Molento and Prichard, 1999; Zajac and Gibson, 2000). Telah dilaporkan bahwa sejak tahun 1964 terjadi resistensi terhadap anthelmintik pada ruminansia kecil di seluruh dunia, namun di Asia Tenggara baru dilaporkan mulai tahun 1990 seperti di Malaysia, Philipina, sedangkan di Indonesia mulai tahun 1995 telah diteliti bahwa *H. contortus* pada domba resisten dengan benzimidazole (Chandrawathani *et al.*, 1999). Semakin berkembangnya resistensi parasit terhadap beberapa anthelmintik maka terjadi perubahan paradigma penelitian yang semula hanya ingin mengetahui bagaimana cara menanggulangi parasit atau melakukan pengobatan cacing sekarang beralih menjadi bagaimana cara mengatasi kerugian ekonomi karena terjadinya resistensi terhadap anthelmintika akibat infeksi parasit, sehingga banyak penelitian ke arah molekuler untuk mengantisipasi problem ekonomi tersebut misalnya pengembangan diagnostik dan vaksin yang ramah lingkungan.

Diagnosis terhadap haemonchosis sampai saat ini masih secara konvensional melalui pemeriksaan tinja dengan metode konsentrasi maupun apung, selain itu keberadaan telur cacing dalam feses pada kasus haemonchosis sering dikelirukan dengan telur cacing *Strongylus* sp. dan cacing sejenis lainnya karena mempunyai morfologi yang hampir sama. Pengembangan penelitian biologi molekuler untuk nematoda khususnya *Haemonchus contortus* telah banyak dilakukan yang bertujuan untuk pengembangan diagnosis secara molekuler (Newland *et al.*, 1999; Skuce *et al.*, 1999).

Diagnosis haemonchosis secara serologis menggunakan antibodi poliklonal untuk mendeteksi infeksi *Haemonchus* pada domba dan kambing sampai saat ini di Indonesia belum ada laporan. Penelitian yang dilakukan oleh Kodyman *et al.* (2000) menunjukkan antigen dari produk ekskresi dan sekresi cacing *H. contortus* yang mengandung protein 15 dan 24 kDa merupakan protein yang sangat imunogenik sehingga bisa dikembangkan sebagai vaksin sub unit untuk haemonchosis. Mufasirin dkk. (2002) telah memproduksi antibodi poliklonal spesifik terhadap protein ekskresi dan sekresi dengan berat molekul sebesar 33 kDa dari cacing *H. contortus* isolat lokal dari kambing dan domba. Antibodi yang didapatkan dapat digunakan untuk mendeteksi protein *H. contortus*

dalam sirkulasi darah sehingga antibodi tersebut dapat dikembangkan untuk diagnosis haemonchosis pada ternak kambing dan domba.

Berdasarkan permasalahan tersebut di atas, maka perlu adanya penelitian lanjutan untuk menggunakan produk antibodi poliklonal spesifik terhadap protein spesifik 33 kDa cacing *H. contortus* untuk mendeteksi protein (antigen) beredar dalam sirkulasi darah domba dan kambing. Diharapkan hasil deteksi tersebut dapat digunakan untuk menentukan haemonchosis pada kambing dan domba sehingga pengendalian haemonchosis dapat dilakukan dengan tepat.

Metode Penelitian

Penelitian ini diawali dengan melakukan isolasi protein ekskresi dan sekresi dari *H. contortus* yang dikultivasi semalam, kemudian ditambah amonium jenuh sama banyak serta diinkubasi pada suhu 4°C dan disentrifus 10.000 rpm selama 10 menit dengan temperatur 4°C. Pelet yang didapat dicuci dengan PBS sampai tiga kali, kemudian dilarutkan dalam PBS sebanyak 1-2 ml. Hasil larutan protein digunakan untuk imunisasi pada kelinci dengan cara sebagai berikut: kelinci jantan dewasa sehat diinjeksi dengan dosis 50-100 µg yang sebelumnya ditambah adjuvant *complete* dengan perbandingan sama banyak sehingga mencapai volume 500 µl. Injeksi diulang dengan protein yang sama dengan penambahan adjuvant *incomplete* (Sigma) pada 2 minggu setelah penyuntikan pertama. Penyuntikan ulang berikutnya dengan protein yang sama hingga mencapai titer antibodi yang tinggi, kemudian dianalisis dengan ELISA.

Metode ELISA dilakukan sebagai berikut: setiap sumuran plat mikro diisi sebanyak 100 µl larutan protein dengan konsentrasi 10 µg/ml dalam buffer karbonat dan diinkubasi pada suhu 37°C semalam. Plat mikro dicuci 3 kali dengan buffer pencuci dan kemudian tiap sumuran ditambahkan 200 µl *blocking solution*. Setelah diinkubasi pada suhu 37°C selama 1-2 jam, dilakukan 3 kali pencucian. Setiap sumuran kemudian diisi dengan 100 µl serum mencit yang telah diencerkan (pengenceran berseri), dan diinkubasikan pada 37°C selama 1 jam. Selanjutnya setiap sumuran diisi dengan 100 µl konjugat (Santa Cruz, USA) dan diinkubasi selama 1 jam, diikuti 3-4 kali pencucian. Sebanyak 150 µl substrat 4 nitrophenil (Sigma, USA) dimasukkan tiap sumuran, diinkubasikan pada 37°C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 50 µl larutan asam oksalat 2%, kemudian titer antibodi dibaca dengan ELISA reader.

Karakterisasi *whole* protein dengan Elektroforesi SDS-PAGE, dilakukan dengan cara sebagai berikut:

running gel dibuat dan dimasukkan ke dalam plate kaca, setelah mengeras pada bagian atasnya dimasukkan *stacking gel* yang telah disiapkan. Susunan *running gel* dan *stacking gel* dibuat dengan mencampurkan Acrylamid, Tris, SDS 0,8%, Temed, APS dan aquades dalam beker gelas. Sebanyak 10 µg sampel ditambahkan *laemly buffer* dengan perbandingan 2:1 dilakukan perebusan pada 100°C selama 5 menit, setelah itu dimasukkan ke dalam kolom cetakan yang terletak pada *stacking gel* dan *running* pada chamber yang telah diisi *Electrode Buffers IX* dengan 100 volt, 40 mA. Gel dimasukkan ke dalam larutan pencuci yang terdiri dari methanol 25 ml, asam asetat 3,7 ml dan aquades ad 100 ml yang digoyang di atas shaker selama 30 menit. Pencucian dilakukan ulang dengan larutan yang sama dengan pengurangan komposisi ethanol dan penambahan asam asetat setengah dari sebelumnya selama 30 menit. Pencucian berikutnya dengan larutan glutaraldehid 10% dan aquades selama 30 menit, kemudian gel diwarnai dengan AgNO₃ selama 15 menit dan dilakukan pencucian ulang dengan aquades dua kali masing-masing selama 2 menit serta diberikan pengembang warna yang terdiri dari formaldehid 3,7%, Zitronsauc 5% dan aquades. Setelah pita-pita protein tampak maka reaksi dihentikan dengan menambahkan asam asetat 10%, hasil gel disimpan dalam larutan gliserol 10% untuk didokumentasikan.

Antigen sekresi dan ekskresi dari *H.contortus* direaksikan dengan antibodi poliklonal dengan menggunakan metode *Western Blott*. Hasil SDS-PAGE ditransfer ke membran nitroselulose, selanjutnya membran diblokir dengan BSA 1% selama semalam pada suhu 4°C dan dilanjutkan pencucian dengan 0,05% Tween 100 dalam TBS selama 10 menit, dan pencucian diulang 3 kali, selanjutnya membran dimasukkan ke dalam larutan antibodi poliklonal dalam PBS (1:50) dan diinkubasi 1 jam pada temperatur ruang dengan *shacker* dan pencucian dengan 0,05% Tween 100 dalam TBS selama 10 menit. Pencucian diulang 4 kali dengan cara yang sama. Selanjutnya membran diinkubasi dalam larutan konjugat (1:3000) (Santa Cruz, USA) selama 1 jam pada temperatur kamar dengan *shacker* dan diikuti dengan pencucian 5 kali dengan 0,05% Tween dalam TBS dan 1 kali tanpa Tween. Membran diwarnai dengan substrat *Western Blue Ready*. Reaksi dihentikan apabila sudah terlihat pita protein dengan cara menambah aquades, kemudian membran dikeringkan pada kertas Whatman dan siap untuk didokumentasikan. Penghitungan berat molekul yang imunogenik dilakukan dengan membandingkan pita protein yang tampak dengan standar marker yang diwarnai dengan perak nitrat.

Uji *dot blot* menggunakan sampel darah dari 50 ekor kambing dan domba yang dipotong di Rumah Potong Hewan Kota Surabaya, setiap ekor kambing atau domba diambil darahnya dua mililiter. Darah yang didapatkan kemudian dipisahkan serumnya dengan cara disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit, serum yang didapat kemudian digunakan untuk uji *dot blot*. Setiap sampel diambil sebanyak 5 µl (mikro-liter) serum diteteskan pada kertas membran nitroselulose menggunakan mikropipet. Sebagai kontrol positif digunakan protein ekskresi-sekresi *H. Contortus* dengan berat molekul 33 kDa hasil produksi poliklonal antibodi. Tetesan sampel dikeringkan pada suhu ruang selama 15 menit dan selanjutnya dilakukan *blocking* menggunakan 1% BSA dalam TBS dan diinkubasi pada suhu 4°C selama semalam (*overnight*).

Hasil *blocking* kemudian dilakukan pencucian dengan menggunakan 0,05% Tween TBS selama 10 menit dengan *shacker*. Pencucian diulang sampai 5 kali dengan cara yang sama. Membran selanjutnya dimasukkan ke dalam larutan antibodi poliklonal terhadap protein 33 kDa dari ekskresi dan sekresi *H.contortus* yang diproduksi dari kelinci dengan pengenceran 1:50 dan diinkubasikan 1 jam pada temperatur ruang dengan *shacker* dan dilakukan pencucian dengan 0,05% Tween TBS selama 10 menit. Pencucian diulang 5 kali dengan cara yang sama. Selanjutnya membran diinkubasikan dalam larutan konjugat *goat IgG anti rabbit* (1:3000) (Santa Cruz, USA) selama 1 jam pada temperatur kamar dengan *shacker* dan diikuti dengan pencucian 5 kali dengan 0,05% Tween TBS, selanjutnya membran diwarnai dengan substrat *Western Blue Ready* (Sigma). Reaksi dihentikan apabila sudah terlihat titik protein dengan cara menambahkan *aquabides deionized* (Mufasirin, 1999), kemudian membran dikeringkan pada kertas Whatman dan siap untuk didokumentasikan serta dilakukan analisis. Sampel dinyatakan positif jika menunjukkan reaksi warna (titik pusat lingkaran pada sampel) dengan kualitas lebih tebal dibandingkan dengan kontrol negatif menggunakan pengaturan kontras secara bersamaan pada program photoshop.

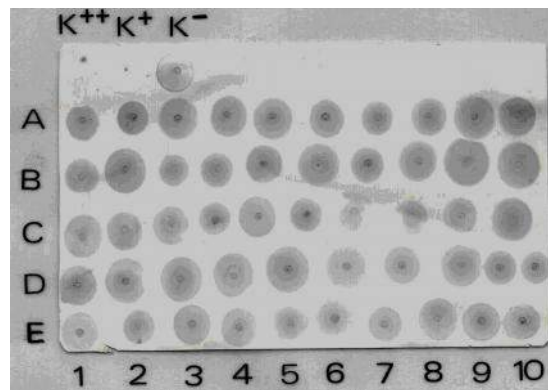
Hasil dan Pembahasan

Berdasarkan pemeriksaan dari 50 sampel darah domba dan kambing yang dipotong di Rumah Potong Hewan Kota Surabaya dengan uji *dot blot*, menunjukkan bahwa 27 sampel (54%) positif terinfeksi oleh *H.contortus*. Hasil uji *dot blot* sampel selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 1 dan interpretasinya pada Gambar 2.

Prevalensi *H. contortus* pada penelitian ini sebesar 54% atau dengan uji *Dot Blot* dapat mendeteksi protein spesifik dari cacing *H. contortus* yang menginfeksi domba maupun kambing sebesar 54%. Tingkat prevalensi dari hasil penelitian ini lebih rendah dibanding dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Knox (1990) di mana tingkat infeksi *H. contortus* dapat mencapai 80% terutama pada musim hujan. Indonesia yang beriklim tropis dengan tingkat kelembaban tinggi sekitar 80% sangat menentukan kelangsungan hidup cacing dan mempermudah penularan untuk penyakit cacing dari ternak satu ke ternak lainnya. Selama penelitian berlangsung, pengambilan sampel dilakukan pada bulan Juni 2003 yang merupakan musim kemarau sehingga kurang menunjang siklus hidup cacing. Kejadian haemonchosis berhubungan dengan siklus hidup dari *Haemonchus* sp khususnya perkembangan telur sampai menjadi larva stadium III yang siap menginfeksi ternak kambing maupun domba. Menurut Soulsby (1986), faktor yang mempengaruhi

kehidupan cacing di luar tubuh induk semang antara lain adalah suhu dan kelembaban. Suhu dan kelembaban sangat berpengaruh terhadap penetasan telur cacing sampai menjadi larva stadium III (stadium infeksi). Kehidupan larva akan dipengaruhi oleh cuaca panas dan lingkungan yang kering, di mana larva stadium I tidak dapat berkembang menjadi stadium ke II maupun ke III karena tempat kehidupan larva yang berada pada rumput atau tanah yang kering tidak menunjang siklus hidup larva sehingga larva infeksi tidak mampu untuk menginfeksi domba dan kambing.

Menurut Donald (2003), prevalensi *H. contortus* sebesar 98,8% pada kambing dan domba di Ethiopia, di mana prevalensi banyak dipengaruhi oleh faktor manajemen seperti manajemen pakan, manajemen pengendalian yaitu pencegahan dan pengobatan serta manajemen pemeliharaan termasuk model kandang dan faktor sosial seperti kurangnya kesadaran masyarakat khususnya peternak untuk melakukan pencegahan.



Gambar 1. Hasil uji *Dot Blot* serum darah domba dan kambing menggunakan antibodi poliklonal terhadap protein spesifik *H. Contortus*.

	K ⁺⁺	K ⁺	K ⁻							
A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+
C	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-
D	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+
E	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

Gambar 2. Hasil interpretasi uji *Dot Blot* serum darah domba dan kambing menggunakan antibodi poliklonal terhadap protein spesifik *H. Contortus*. Keterangan: A sampai E, 1 sampai 10 = Kode sampel; K⁻ = Kontrol negatif; K⁺⁺ = Kontrol positif tinggi; + = Sampel positif; K⁺ = Kontrol positif rendah, - = Sampel negatif.

Hasil penelitian sebesar 54% termasuk angka yang cukup tinggi, hal ini karena cacing *H. contortus* betina dewasa mempunyai daya reproduksi yang tinggi dengan mengeluarkan sekitar 5000 sampai 10.000 telur cacing setiap hari dan memerlukan waktu yang pendek sampai menjadi dewasa sekitar 17-21 hari (Soulsby, 1986), sehingga penularan pada ternak yang beresiko lebih mudah terjadi.

Ternak kambing dan domba yang dipotong di Rumah Potong Hewan Pegirian Surabaya berasal dari berbagai daerah khususnya daerah Jawa Timur yang rata-rata merupakan ternak rakyat dengan sistem pemeliharaannya masih relatif tradisional dengan cara digembalakan. Pakan ternak biasanya diberikan rumput yang didapat dari lapangan atau hasil dari rumput yang disabit oleh peternak, sehingga asal rumput yang diambil sangat menentukan tingkat infeksi *H. contortus*. Rumput yang diambil dari lingkungan dimana kambing atau domba dipelihara kemungkinan besar tercemar dengan larva cacing baik tercemar langsung dengan feses ternak atau terkontaminasi melalui air yang tercemar.

Selain faktor-faktor di atas, umur hewan yang dipotong juga sangat berpengaruh terhadap infeksi cacing. Sampel yang diambil berasal dari domba dan kambing dewasa yang di potong di Rumah Potong Hewan rata-rata berumur lebih dari satu tahun yang secara klinis tidak menunjukkan gejala penyakit. Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan prevalensi haemonchus cukup tinggi, hal tersebut bisa disebabkan infeksi *H. contortus* dapat berjalan kronis pada hewan dewasa dimana ternak pernah terinfeksi pada umur muda.

Hasil uji *dot blot* menunjukkan kualitas warna yang berbeda-beda dibandingkan dengan kontrol negatif. Kualitas warna tersebut menunjukkan tingkat infeksi penyakit dimana pada uji *dot blot* terjadi reaksi antara antigen dan antibodi. Infeksi yang tinggi didapatkan kualitas warna yang lebih gelap hal ini berkaitan dengan jumlah antigen yang beredar dalam darah ternak lebih banyak pada infeksi berat dibandingkan dengan infeksi yang ringan. Tujuan penelitian ini untuk mendeteksi antigen beredar (dalam darah) menggunakan antibodi poliklonal terhadap protein ekskresi dan sekresi *H. Contortus* dengan berat molekul 33 kDa dan selanjutnya dapat ditentukan prevalensi penyakitnya. Antibodi dapat mendeteksi antigen yang dikeluarkan cacing pada saat menghisap darah induk semang sehingga jumlah antigen yang beredar dalam darah dapat diekspresikan dengan warna yang lebih gelap yang dapat dilihat pada Gambar 1. Antigen yang beredar dalam darah bisa berasal dari hasil sekresi dan ekskresi dari bagian oesophagus dan usus cacing larva stadium tiga seperti yang dilakukan oleh Lopez *et al* (1999).

Antibodi yang digunakan dalam penelitian ini adalah antibodi poliklonal spesifik yang hanya mengenal protein dengan berat molekul 33 kDa (hasil ekskresi dan sekresi) dari cacing *H. contortus* sehingga protein yang mempunyai berat molekul 33 kDa yang dikeluarkan cacing pada saat menghisap darah induk semang dapat terdeteksi. Antibodi yang digunakan dalam penelitian ini diproduksi pada kelinci dimana sifat dari antibodi yang dihasilkan dari hewan tersebut mudah bereaksi dengan antigen yang mirip termasuk antigen yang ada dalam darah induk semang, hal ini dapat dilihat pada kontrol serum negatif terhadap *H. contortus*.

Metode *dot blot* ini belum pernah dilakukan untuk uji prevalensi haemonchosis melalui deteksi protein spesifik tetapi uji ini sering digunakan pada penyakit lain seperti toksoplasmosis yang dilakukan oleh Mufasirin (2002) yang menguji prevalensi toksoplasmosis pada telur ayam buras. Uji *dot blot* ini terbatas secara kualitatif untuk menentukan apakah hewan tersebut terinfeksi *H. contortus* atau tidak. Untuk lebih memastikan hewan terinfeksi oleh *H. contortus* perlu dilakukan uji pembandingan dengan uji ELISA dimana secara kuantitatif dapat menunjukkan berat ringannya infeksi.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil uji *dot blot* dengan menggunakan antibodi poliklonal protein ekskresi dan sekresi dengan berat molekul 33 kDa dari cacing *Haemonchus contortus* didapatkan 27 (54%) sampel positif mengandung protein *H. contortus*.

Daftar Pustaka

- Arifin, M.Z. 1991. Pengaruh infeksi khronis *Haemonchus contortus* terhadap patologi tulang domba jantan lokal. MKH ; 7 (1) : 8-14.
- Chandrawathani, P., M. Adnan, and P.J. Waller. 1999. Anthelmintic Resistance in sheep and goat farms on Peninsular Malaysia. Vet. Parasitol; 82 (4):305-310.
- Colin, J. 1999. Parasites and Parasitic Disease of Domestic Animals. University of Pennsylvania. June.28
- Donald, A.K. 2003. Epidemiology and Seasonal Dynamics of Gastrointestinal Helminthoses of Small Ruminants in Eastern and Southern Semi Aridzones of Ethiopia. <http://www1.vetmed.fu-berlin.de/ip-4donald.html>.
- Fabiyi, J.P. 1986. Production Losses and Control of Helminths Ruminant of Tropical Regions. Proc. Sixth International Congr. Parasitol. Canberra, Aust. Acad.Sci : 435-442.

- Knox, M.R. 1990. Future prospects for controlling parasitic gastrointestinal Nematodes in small ruminants in Indonesia in Indonesia. MPI; 3: 85-89.
- Kodyman, F.N., H.D. Scallig., M.A. Vanleuwen., S. MacKella, and J.F. Huntley. 2000. Protection in Lambs Vaccinated with *H.contortus* antigens is age Related and Corellates with IgE rather than IgG1 Antibody. Parasite. Immunol ; 22(1):13-20
- Lopez de Mendoza, M.E., R.H. Durtis, and S. Gowen.1999. Identification and Characterization of Excreted-secreted Products and Surface Coat Antigens of Animal and Plant Parasitic Nematodes. Parasitology, 118(4) : 397-405
- Molento, M.B. and R.K. Prichard. 1999. Effect of Multi-drug Resistance Reversing Agents Verapamil and Cl 347,099 on The Efficacy of Ivermectin against unselected and drug selected Strains of *H.contortus* in Jirds. Parasitol. Res ; 85(12):1007-1011.
- Mufasirin. 1999. Kloning dan sintesis cDNA gen yang menyandi Protein membran *T. gondii* isolat Bogor. Tesis. Pasca Sarjana UGM. Yogyakarta.
- Mufasirin, N.D.R. Lastuti, dan I.S. Hamid. 2002. Identifikasi dan produksi antibodi poliklonal protein spesifik ekskresi-sekresi cacing *Haemonchus contortus* untuk diagnosis haemonchosis pada domba dan kambing. Laporan Penelitian DUE-Like Batch III tahun 2002, FKH, Unair. Surabaya.
- Newland, G.F., P.J. Skuce., D.P. Knox., S.K. Smith, and W.D. Smith. 1999. Cloning and characterization of a B galactosidase binding protein (galactine) from the gut of the gastrointestinal nematode parasites *H. contortus*. J. Parasitol ; 119(5): 483-490.
- Skuce, P.J., D.L. Redmond., S. Lindell., E.M. Stewart., W.D. Smith, and D.P. Knox. 1999. Molecular cloning and characterization of gut derived cysteine proteinases associated with a host protective extract from *Haemonchus contortus*. J. Parasitol ; 119 (4) : 405-412.
- Soulsby, E.J.L. 1986. Helminths, Arthropods and Protozoa Of Domesticated Animals. 7th. Ed. Bailliere Tindall. London.
- Subekti, S., R.S. Wahyuni, dan H. Puspitawati. 2000. Pengaruh pemberian rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) dan temu hitam (*Curcuma aeruginosa*) dalam urea molases block pada gambaran darah dan fungsi hati dan ginjal domba yang diinfeksi dengan cacing *Haemonchus contortus*. MKH ; 16 (1) : 1-8.
- Zajac, A.N. and T.A. Gibson. 2000. Multiple anthelmintic resistance in goat herd. Vet. Parasitol; 87 (2-3): 163-172.



**KOMISI ETIK PENELITIAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
*Animal Care and Use Committee (ACUC)***

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
“ ETHICAL CLEARENCE ”**

No : 8.KE.008.03.2006

**KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS AIRLANGGA SURABAYA,
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA :**

PENELITIAN BERJUDUL : Deteksi Protein Haemonchus sp pada Domba dan Kambing dengan Uji Dot Blot Menggunakan Antibodi Poliklonal Protein Ekskresi dan Sekresi Haemonchus contortus

PENELITI UTAMA : Iwan Sahrial Hamid

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT PENELITIAN : Program Studi
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Surabaya, Maret 2006

Mengetahui
Dekan FKH-Unair,

Prof. Romziah Sidik, drh, Ph. D
NIP. 195312161978062001

Ketua,

Dr. Nusdianto Triakoso, M.P., Drh.
NIP. 196805051997021001