

**SKRIPSI**

**PROFIL PROTEIN *EXCRETORY-SECRETORY* (ES)  
CACING *Fasciola gigantica*  
ISOLAT RPH PEGIRIAN  
SURABAYA**



Oleh :

**RENDY TRI DHARMAWAN LAKSANA**  
TULUNGAGUNG - JAWA TIMUR

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2005**

**Profil Protein *Excretory-Secretory* (ES)  
Cacing *Fasciola gigantica*  
Isolat RPH Pegirian  
Surabaya**

Skripsi sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

Pada

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

Oleh:

Rendy Tri Dharmawan Laksana

NIM. 069912651

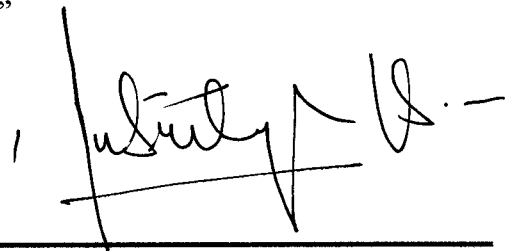
Menyetujui,

Komisi Pembimbing,



**Prof. Dr. H. Setiawan Koesdarto, M.Sc., drh.**

Pembimbing Pertama



**Prof. Dr. Ir. Hj. Kusningrum, R.S., M.S.**

Pembimbing Kedua

Setelah mempelajari dan menguji dengan sungguh-sungguh, kami berpendapat bahwa tulisan ini baik ruang lingkup maupun kualitasnya dapat diajukan sebagai skripsi untuk memperoleh gelar **Sarjana Kedokteran Hewan**.

Menyetujui,  
Panitia Penguji

Dr. Fedik Abdul Rantam, drh.

Ketua

Halimah Puspitawati, M.Kes., drh.

Sekretaris

Sri Mumpuni S, M.Kes., drh.

Anggota

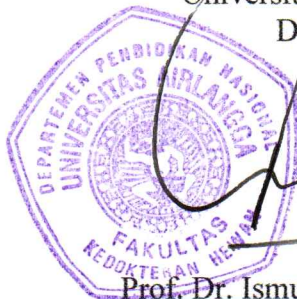
Prof. Dr. H. Setiawan Koesdarto, M.Sc., drh.

Anggota

Prof. Dr. Ir. Hj. Kusri Nugrum, R.S., M.S.

Anggota

Surabaya, 21 April 2005  
Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Airlangga  
Dekan,



Prof. Dr. Ismudiono, MS., Drh.

NIP. 130687297

**Profil Protein *Excretory-Secretory* (ES)  
Cacing *Fasciola gigantica*  
Isolat RPH Pegirian  
Surabaya**

**Rendy Tri Dharmawan Laksana**

**ABSTRAK**

Penelitian ini merupakan penelitian eksploratif laboratorik yang bersifat diskriptif, dilakukan untuk mengetahui gambaran protein *Excretory-Secretory* (ES) cacing muda (*juvenile*) dan protein ES cacing dewasa (*adult*) *F. gigantica* yang dinyatakan dalam massa molekul relatif (MR).

Tujuan penelitian ini untuk mengetahui MR protein cacing *F. gigantica* yang dapat digunakan sebagai bahan penelitian selanjutnya mengenai spesifisitas protein imunogenik *F. gigantica* untuk keperluan diagnosis fasciolosis dini secara imunologis.

Cacing muda dan cacing dewasa dikoleksi dari pembedahan organ hati sapi penderita fasciolosis. Kemudian dilakukan isolasi terhadap cacing muda dan cacing dewasa untuk mendapat ES protein dengan menggunakan medium RPMI dan *homogenat* dengan teknik sonikasi. Analisis protein ES cacing muda dan ES cacing dewasa *F. gigantica* dilakukan dengan teknik SDS-PAGE.

Hasil preparasi protein ES cacing muda dan cacing dewasa *F. gigantica* yang dilakukan dengan teknik SDS-PAGE terdapat 16 macam protein yang terbentuk pada ES *F. gigantica* cacing muda dan dewasa serta dibandingkan dengan *homogenat* cacing dewasa *F. gigantica*. Adapun 16 macam protein yang diperoleh dengan MR sebesar 145 kDa; 108 kDa; 91 kDa; 74 kDa; 58 kDa; 52 kDa; 45 kDa; 40 kDa; 35 kDa; 32 kDa; 28 kDa; 27 kDa; 25 kDa; 18 kDa; 15 kDa dan 8 kDa. Pada ES cacing dewasa terdapat 15 macam pita protein yaitu; 145 kDa; 108 kDa; 91 kDa; 74 kDa; 58 kDa; 45 kDa; 40 kDa; 35 kDa; 32 kDa; 28 kDa; 27 kDa; 25 kDa; 18 kDa; 15 kDa dan 8 kDa sedangkan pada ES cacing muda terdapat 9 macam pita protein yaitu 145 kDa; 58 kDa; 52 kDa; 45 kDa; 40 kDa; 35 kDa; 28 kDa; 27 kDa dan 8 kDa, dari semua pita protein yang didapatkan tersebut, ada delapan pita protein yang sama antara cacing muda dan cacing dewasa *F. gigantica* yaitu protein dengan MR 145 kDa, 58 kDa, 45 kDa, 40 kDa, 35 kDa, 28 kDa, 27 kDa dan 8 kDa. Berdasarkan penelitian tersebut, disarankan melakukan penelitian lebih lanjut guna mengetahui protein spesifik imunogenik cacing *F. gigantica*.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kehadiran Allah SWT, yang telah memberikan rahmat dan hidayah yang berlimpah kepada penulis untuk dapat menyelesaikan tulisan ini yang merupakan salah satu syarat memperoleh gelar sarjana Kedokteran Hewan pada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Dalam penulisan yang berjudul “Profil Protein *Excretory-Secretory* (ES) Cacing *Fasciola gigantica* Isolat RPH Pegirian Surabaya” bertujuan mengetahui profil protein cacing *F. gigantica* berdasarkan massa molekul relatif dengan menggunakan teknik SDS-PAGE. Upaya ini merupakan langkah awal sebagai acuan untuk mendapatkan antigen spesifik dari cacing *F. gigantica*.

Keberhasilan dalam penulisan ini tidak lepas dari bimbingan dan bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu dengan kerendahan hati, penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada yang terhormat:

1. Prof. Dr. Ismudiono, M.S., drh. selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga beserta staf pimpinan.
2. Prof. Dr. H. Setiawan Koesdarto, M.Sc., drh. sebagai dosen pembimbing pertama dan Prof. Dr. Ir. Hj. Kusningrum, R.S., M.S. sebagai dosen pembimbing kedua yang senantiasa dengan penuh kesabaran dan ketulusan membimbing penulis hingga terselesaikannya tulisan ini.

3. Rr. Ratih Ratnasari, S.U., drh. sebagai dosen wali dan seluruh dosen Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga yang telah memberikan ilmu kepada penulis selama perkuliahan.
4. Kusnoto, MSi., drh. sebagai pendukung dan pembimbing penelitian yang dengan penuh keikhlasan hati membantu penyempurnaan tulisan ini, Prof. Dr. Sri Subekti Bendryman, DEA., drh., Sri Mumpuni S, M.Kes., drh. dan Halimah Puspitawati M.Kes., drh. yang telah banyak membantu dan mendukung pelaksanaan penelitian di Laboratorium Helminologi FKH Unair.
5. Prof. Dr. Yoes Prijatna Dachlan, M.Sc., dr. dan seluruh staf Laboratorium *Tissue Culture Tropical Disease Center (TDC)* Universitas Airlangga yang telah mengizinkan penulis untuk melakukan penelitian di Laboratorium tersebut.
6. Tim penguji yang telah memberikan kritik dan saran yang membangun.
7. Tim penelitian Mukhlis, Rahmi, dan Lamia yang senantiasa mendukung, serta rekan mahasiswa angkatan '99 FKH Universitas Airlangga.
8. Seluruh keluarga yang sangat penulis cintai: Ayahanda Ghufron, Ibunda Emilia Umami, atas segala pengorbanan seluruh jiwa dan raga yang tak ternilai. Kakak AKP. R. Kurniawan Prasetyo dan adik Pungky Dewi Amelia yang setiap saat mendoakan, mendukung dan menyemangati.
9. Yossy, Arie, Kholik dan teman-teman kos Wisma Permai DD2 lainnya, rekanku A. Nadif, SKH., Syailin, SKH., Sri Yunani W., SKH dan Sri Danar, sahabatku Inkai Dasa Wahono dan Mangestingtyas, SKH. atas dukungan moral yang diberikan.

10. Staf Kerumahtanggaan atas bantuan dan kerjasama dalam mempersiapkan ruang ujian seminar dan skripsi.
11. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang telah memberikan bantuan langsung maupun tak langsung demi penyempurnaan makalah ini.

Penulis menyadari bahwa tulisan ini masih jauh dari sempurna, karena keterbatasan kemampuan yang dimiliki penulis. Oleh karena itu kritik, masukan dan saran yang bersifat membangun sangat penulis harapkan dari pembaca.

Akhirnya penulis hanya mampu memohon kepada Allah SWT semoga amal kebaikan yang tak ternilai tersebut, mendapat balasan yang setimpal dari Allah SWT. Semoga tulisan ini bermanfaat bagi pembaca. Amin.

Surabaya, April 2005

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
Daftar Isi .....	i
Daftar Gambar .....	iii
Daftar Tabel .....	iv
Daftar Lampiran .....	v
BAB I. Pendahuluan .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Perumusan Masalah .....	3
1.3 Landasan Teori .....	4
1.4 Tujuan Penelitian .....	5
1.5 Manfaat Penelitian .....	5
BAB II. Tinjauan Pustaka .....	6
2.1 Tinjauan <i>F. gigantica</i> .....	6
2.1.1 Klasifikasi .....	6
2.1.2 Morfologi dan Habitat .....	6
2.1.3 Siklus Hidup dan Penularan .....	7
2.1.4 Gejala Klinik .....	9
2.1.5 Diagnosis .....	10
2.2 Tinjauan Antigen Parasit .....	11
2.3 Tinjauan Analisis Protein dengan Teknik <i>Sodium Dodecyle Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)</i> .....	14
BAB III. Materi dan Metode .....	16



3.1 Jenis Penelitian .....	16
3.2 Waktu dan Tempat Penelitian .....	16
3.3 Materi Penelitian .....	16
3.3.1 Bahan Penelitian .....	16
3.3.2 Alat-alat Penelitian .....	17
3.4 Metode Penelitian .....	17
3.4.1 Pembuatan Medium RPMI .....	17
3.4.2 Pemeriksaan Feses dan Koleksi Cacing <i>F. gigantica</i> .....	18
3.4.3 Cara Mendapatkan Protein <i>Excretory-Secretory</i> (ES) Cacing <i>F. gigantica</i> .....	19
3.4.4 Cara Mendapatkan Homogenat Cacing <i>F. gigantica</i> .....	20
3.4.5 Analisis Protein dengan Teknik <i>Sodium Dodecyle Sulphate</i> <i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> (SDS-PAGE) .....	20
3.5 Pengolahan Hasil Analisis Protein .....	22
3.6 Kerangka Operasional .....	23
BAB IV. Hasil Penelitian .....	24
BAB V. Pembahasan .....	28
BAB VI. Kesimpulan dan Saran .....	32
Ringkasan .....	34
Daftar Pustaka.....	37
Lampiran .....	40

**DAFTAR GAMBAR**

	Halaman
Gambar 2.1 Telur cacing dan cacing dewasa <i>F. gigantica</i> .....	7
Gambar 2.2 Skema siklus hidup <i>Fasciola spp.</i> .....	9
Gambar 3.1 Bagan alur penelitian protein ES cacing <i>F. gigantica</i> .....	23
Gambar 4.1 Hasil analisis protein dengan teknik SDS-PAGE <i>running</i> pertama .....	24
Gambar 4.2 Hasil analisis protein dengan teknik SDS-PAGE <i>running</i> kedua .....	25
Gambar 4.3 Kurva hubungan antara Log y Da dengan Rf .....	27

## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1 Hasil penghitungan massa molekul relatif (MR) protein antigen cacing <i>F. gigantica</i> pada gel SDS-PAGE dengan persamaan regresi .....	27

## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Analisis regresi untuk menentukan hubungan nilai Rf pada SDS-PAGE dengan massa molekul relatif (MR) protein .....	40
Lampiran 2 Teknik pembuatan PBS .....	42
Lampiran 3 Teknik koleksi cacing <i>F. gigantica</i> dari <i>hepar</i> sapi .....	43
Lampiran 4 Alat-alat yang digunakan dalam penelitian .....	45

## BAB I

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

Pengamanan dan penanganan ternak dalam sub sektor peternakan merupakan bagian penting bagi tercapainya peningkatan populasi ternak dan produknya. Usaha pengembangan peternakan tanpa diikuti dengan adanya langkah-langkah pengamanan meliputi kegiatan pengamatan, penolakan, pencegahan, pengobatan dan pemberantasan penyakit serta penanganan kesehatan masyarakat veteriner adalah mustahil untuk mencapai sasaran yang diharapkan (Hutasoit, 1982).

Pengembangan ternak akan memberikan sumbangan yang sangat berarti bagi kesejahteraan manusia dalam memenuhi kebutuhan protein hewani. Demikian pula dengan peningkatan kualitas kesehatan hewan ternak, terutama potensi ternak terhadap serangan penyakit parasit pada umumnya dan cacing hati *Fasciola spp.* yang merupakan penyebab fasciolosis atau distomatosis (Levine, 1978).

Cacing *Fasciola spp.* dapat menular terhadap mamalia, terutama hewan ternak. *Fasciola spp.* banyak menyebabkan kerugian. Kerugian-kerugian pada hewan ternak diantaranya berupa penurunan produksi karkas dan organ hati yang diafkir karena tidak layak konsumsi hingga kematian ternak (Merial, 2004).

Perlu diketahui bahwa infeksi fasciolosis terhadap ternak khususnya sapi, kerbau, kambing dan domba dapat mengakibatkan kerugian yang signifikan, terhadap peternak secara langsung hingga terhadap perekonomian sebuah negara. Sebagai contoh menurut data Departemen Pertanian Amerika Serikat tahun 1965, kasus fasciolosis di Amerika telah mengakibatkan kerugian karena kematian ternak (sapi dan domba) sebesar U\$ 3.002.000,00 ditambah U\$ 1.657.000,00 karena disebabkan hati yang diafkir pada sapi dan U\$ 98.000,00 pada domba (Levine, 1978).

Indonesia sebagai negara yang beriklim tropis merupakan lingkungan yang baik bagi perkembangbiakan *Fasciola spp.*, sehingga fasciolosis merupakan salah satu kendala bagi usaha peternakan di Indonesia. Berdasarkan hasil pengamatan Departemen Pertanian Republik Indonesia dalam hal ini adalah Direktorat Jenderal Bina Produksi Usaha Peternakan (1990), pada 31 lokasi di Indonesia dinyatakan bahwa kerugian akibat fasciolosis mencapai 513,6 milyar rupiah per tahun atau setara dengan 2,31 triliun rupiah pada tahun 2005. Hasil survei di lima Rumah Potong Hewan (RPH) di pulau Jawa, dari 50 ekor sapi dan 50 ekor kerbau yang dipotong setiap hari menunjukkan rata-rata infeksi fasciolosis sebesar 64,4 % dengan bagian organ hati yang diafkir 2,3kg/ekor (dari hewan yang positif menderita fasciolosis). Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari 87 ekor sapi yang dipotong di RPH di Jakarta, 64,4 % positif mengandung

cacing hati di dalam organ hatinya dan 50,6 % positif terdapat telur cacing di dalam fesesnya (Balitvet, 2003).

Sebagai antisipasi, diperlukan tindakan-tindakan lebih lanjut untuk memberantas dan mengendalikan penyebaran parasit tersebut, salah satunya dengan mengadakan penelitian terhadap antigen spesifik cacing tersebut. Selama ini sedikit diketahui tentang gambaran protein antigen spesifik dari *F. gigantica*, maka dari itu dalam penelitian ini bertujuan mengetahui profil protein antigen cacing *F. gigantica*.

Berdasar alasan tersebut, maka perlu dilakukan analisis protein *Excretory-Secretory* (ES) cacing *F. gigantica* dengan teknik *Sodium Dodecyle Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) sehingga dapat diketahui profil protein cacing *F. gigantica* dengan harapan dapat dijadikan acuan untuk penelitian selanjutnya tentang spesifisitas protein imunogenik *F. gigantica* untuk diagnosis secara imunologis pada kasus fasciolosis.

## 1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang penelitian ini, maka dapat dirumuskan masalah, yaitu bagaimanakah profil protein cacing *F. gigantica* yang dinyatakan dengan massa molekul relatif (MR)?

### 1.3 Landasan Teori

Secara spesifik infeksi parasit merangsang lebih dari satu mekanisme pertahanan imunologis, yaitu respon imun humoral dan seluler, namun yang menonjol ditentukan oleh jenis parasit tersebut. Cacing *F. gigantica* mempunyai siklus hidup, inang perantara, penyebaran geografis yang spesifik. Semakin besar parasit yang menyerang, semakin banyak pula jenis antigen yang akan membangkitkan respon imun tubuh. Antigen yang dimiliki oleh beberapa parasit tergantung pada tahapan siklus hidupnya (Subowo, 1993). Perbedaan struktur morfologi pada generasi *Fasciola spp.* memiliki macam antigen yang berbeda menyebabkan perbedaan imunogenitas dalam memicu terbentuknya antibodi (Subronto dan Tjahayati, 2001).

Berdasarkan hal tersebut maka pengamatan terhadap protein antigen cacing tersebut dapat dilakukan terhadap telur, cacing muda (*juvenile*) dan cacing dewasa (*adult*). Pada telur cacing, protein antigen dapat diperoleh dari kulit telur, *membrane vitelline* dan *granular layer*. Sedangkan pada stadium cacing muda dan cacing dewasa yang sering digunakan adalah antigen ES, *surface* antigen dan antigen somatik (*homogenat*) (Estuningsih, 2003).



#### **1.4 Tujuan Penelitian**

Penelitian ini bertujuan mengetahui profil MR protein cacing hati *F. gigantica* sehingga bisa bermanfaat bagi penelitian lanjutannya, yaitu penelitian untuk mengetahui gambaran antigen spesifik sebagai bahan uji imunologis terhadap fasciolosis pada sapi atau hewan ternak.

#### **1.5 Manfaat Penelitian**

Berdasar perumusan masalah, penelitian ini berguna untuk: 1) Dapat dijadikan acuan untuk penelitian selanjutnya dalam mencari protein spesifik imunogenik cacing *F. gigantica*; dan 2) Bisa dikembangkan pada penelitian selanjutnya untuk pembuatan *diagnostic kit*.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Tinjauan *F. gigantica*

##### 2.1.1 Klasifikasi

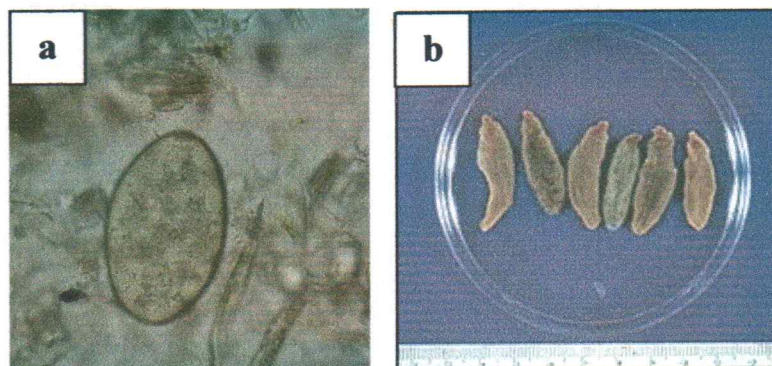
Klasifikasi cacing *F. gigantica* menurut Levine (1978), adalah sebagai berikut :

Filum:	<i>Platyhelminthes</i>
Kelas:	<i>Trematoda</i>
Sub Kelas:	<i>Digeneasida</i>
Ordo:	<i>Echinostomorida</i>
Sub Ordo:	<i>Echinostomorina</i>
Famili:	<i>Fasciolidae</i>
Genus:	<i>Fasciola</i>
Spesies:	<i>Fasciola gigantica</i>

##### 2.1.2 Morfologi dan Habitat

Warna tubuh keabu-abuan, panjang cacing *F. gigantica* mencapai 7,5 cm dengan lebar 1,2 cm, tidak mempunyai bahu yang menonjol seperti yang terdapat pada *F. hepatica*. Ciri khusus pada cacing *F. gigantica* adalah ujung anterior yang tidak sama lebar dengan bagian tubuh lainnya dan membentuk semacam kerucut, disebut kerucut anterior (Gambar 2.1.b). Telurnya sedikit lebih besar daripada *F. hepatica*, ukuran telurnya

mencapai 197 x 104  $\mu\text{m}$  dan mempunyai operkulum pada ujung telur yang lebih lancip (Gambar 2.1.a) (Dunn, 1978; Merial, 2004).



Gambar 2.1. Telur cacing (a) dan cacing dewasa *F. gigantica* (b) (Sumber: Merial, 2004).

Cacing dewasa *F. gigantica* biasanya ditemukan pada saluran empedu dalam organ hati dan kadang pada kantung empedu ruminansia khususnya sapi, kambing dan domba dewasa. Pada organ hati biasanya ditemukan di bagian yang mengalami pengapuran dengan konsistensi organ yang lebih keras daripada organ hati pada hewan yang sehat (Merial, 2004).

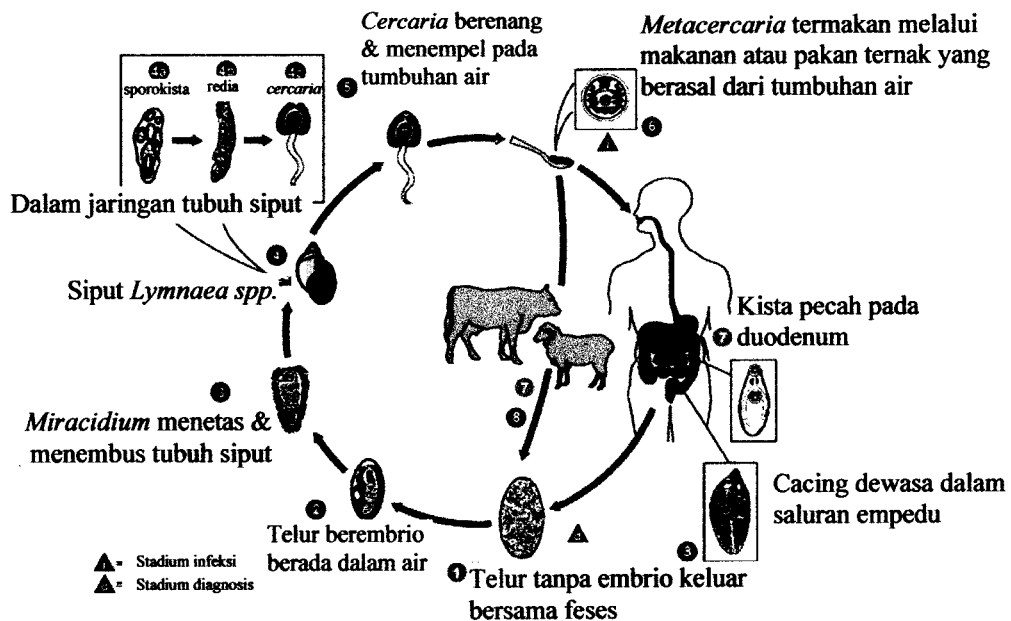
### 2.1.3 Siklus Hidup dan Penularan

Cacing *Fasciola spp.* termasuk *two host stage*, yaitu memerlukan inang antara dan inang definitif dalam perkembangannya. Penularan *Fasciola spp.* terjadi secara per oral, yaitu tertelannya *metasercaria* bersama-sama pakan atau air minum (Subronto dan Tjahayati, 2001).

Di tempat hangat, lembab dan basah, telur *F. gigantica* tumbuh menjadi *miracidium* dalam waktu kurang lebih 2 minggu, *operculum* akan membuka dengan bantuan enzim proteolitik yang terdapat dari dalam telur

(Subronto dan Tjahayati, 2001). *Miracidium* yang telah keluar dari telur akan berenang selama beberapa jam, kemudian menempel dan menembus tubuh siput *Lymnaea sp.* Di dalam tubuh siput tersebut, *miracidium* akan berkembang menjadi *sporocyst* dan dengan pembiakan aseksual akan dihasilkan *redia* generasi pertama dan kedua. *Cercaria* yang keluar dari tubuh siput merupakan *redia* generasi kedua, selanjutnya *cercaria* menempel pada permukaan daun rerumputan dan membentuk kista. *Cercaria* yang telah membentuk kista disebut *metacercaria*, *metacercaria* bisa bertahan sampai berbulan-bulan dalam bentuk kista yang melindunginya dari cuaca dan lingkungan. *Metacercaria* diselubungi oleh kista yang digunakan sebagai pertahanan terhadap cuaca dan lingkungan, bila tertelan oleh inang definitif maka kista tersebut akan pecah dalam saluran pencernaan oleh peristaltik otot-otot saluran pencernaan dan enzim-enzim pencernaan, kemudian cacing muda (*juvenile*) melakukan migrasi ke dalam rongga perut dengan menerobos dinding duodenum dalam waktu  $\pm$  24 jam setelah infeksi. Pada hari ke 4-6 pasca infeksi, cacing muda sudah mencapai pembungkus organ hati dan bermigrasi ke dalam parenkim organ hati selama 6-7 minggu. Kemudian cacing muda melakukan migrasi dalam saluran empedu baik yang terdapat dalam organ hati maupun di luar organ hati setelah minggu ke-7. Di dalam saluran empedu, cacing muda tumbuh dan berkembang. Cacing muda akan tumbuh menjadi cacing dewasa (*adult*) dan menghasilkan telur. Pembuahan sel telur terjadi dalam tubuh cacing, telur yang dikeluarkan

dari *uterus* akan terbawa cairan empedu ke dalam usus dan dikeluarkan bersama-sama feses. Periode prepaten berlangsung antara 2-3 bulan (Dunn, 1978; Soulsby, 1986; Subronto dan Tjahayati, 2001).



Gambar 2.2. Skema siklus hidup *Fasciola* spp.  
(Sumber: Tolan, 2003).

#### 2.1.4 Gejala Klinik

Gejala klinik (GK) khas pada kasus fasciolosis terhadap hewan adalah adanya *bottle jaw*, tapi hal ini juga terjadi pada kasus haemonchosis sehingga sering dikelirukan (Levine, 1978).

Fasciolosis pada sapi, kerbau, domba dan kambing dapat berlangsung secara akut, sub akut maupun kronis. Fasciolosis akut dan sub akut terjadi karena invasi cacing muda yang berlangsung secara masif dalam jangka waktu 2-6 minggu setelah infeksi, merusak parenkim organ hati, gangguan fungsi organ hati dan perdarahan dalam rongga perut

(Urquhart, Armour, Duncan, Dunn dan Jennings, 1985). Pada pemeriksaan darah ditemukan perubahan antara lain; anemia normokromik, *eosinofilia* dan *hipoalbuminemia*. Bila diikuti infeksi sekunder oleh *Clostridium novyi* dapat mengakibatkan *Black Water Disease* dan kematian yang terjadi akibat infeksi sekunder ini biasanya kurang dari 24 jam (Subronto dan Tjahayati, 2001).

Sedangkan dalam bentuk kronis, fasciolosis berlangsung dalam waktu antara 4-5 bulan, disebabkan oleh aktifitas cacing dewasa di dalam saluran empedu dalam organ hati dan di luar organ hati. Mengakibatkan *cholangitis*, obstruksi saluran empedu, *fibrosis* dan kerusakan organ hati. Pada pemeriksaan darah ditemukan pula perubahan yaitu anemia hipokromik karena cacing dewasa menghisap darah, makrositik, *hipoproteinemia*, *hipoalbuminemia* serta hilangnya persediaan zat besi. Perubahan pasca mati akibat fasciolosis biasanya ditandai *hidremis*, *ascites*, *hidrothoraks*, *hidropericard*, *ikterus*, anemia, organ hati membengkak, keras, rapuh dan penebalan saluran empedu. Pada kejadian *fasciolosis* akut biasanya diikuti keluarnya eksudat purulen dan darah dari hidung dan anus (Subronto dan Tjahayati, 2001; Urquhart *et al.*, 1985).

### 2.1.5 Diagnosis

Metode diagnosis yang paling sederhana terhadap hewan ternak yang diduga terinfeksi *Fasciola spp.* adalah pemeriksaan mikroskopis pada feses, akan tetapi terdapat kelemahan pada metode ini, yaitu tidak

ditemukan telur cacing pada kasus infeksi dini atau kasus fasciolosis akut. Diagnosis berdasar gejala klinik sulit disimpulkan karena gejala klinik yang tampak tidak spesifik. Sehingga dalam usaha diagnosis pada setiap kasus fasciolosis diperlukan metode diagnosis yang lebih akurat, yaitu diagnosis secara imunologis dengan teknik ELISA maupun pengembangannya dan Cat-L yang terdapat dalam ES merupakan antigen yang sangat potensial digunakan sebagai bahan ujinya (Estuningsih dkk, 2003).

## 2.2 Tinjauan Antigen Parasit

Antigen adalah substansi yang dapat dikenali sistem imun tubuh sebagai benda asing (*non self*) yang diukur berdasarkan keberhasilan mengikat antibodi, agar bersifat antigenik maka molekul harus besar, dan kimiawi kompleks, walaupun molekul kecil dapat berlaku sebagai antigen tetapi molekul besar jauh lebih baik (Tizard, 1982).

Makromolekul dengan struktur yang kompleks seperti protein merupakan antigen yang jauh lebih baik daripada polimer besar sederhana, misalnya lemak, karbohidrat, dan asam nukleat maupun polimer satu asam amino. Protein merupakan antigen yang terbaik karena ukuran dan kerumitan strukturnya, hampir semua protein dengan massa molekul relatif (MR) lebih besar dari 1000 Dalton adalah antigen (Tizard, 1982).

Imunogen adalah antigen yang diukur berdasarkan kemampuannya dalam memicu sistem imun untuk menghasilkan antibodi, biasanya

molekul dikatakan bersifat imunogenik apabila terjamin keasingannya dan mempunyai berat molekul lebih dari 5000 Dalton (Abbas, Lichtman, Pober, 2000). Sedangkan molekul yang lebih kecil dikatakan imunogenik bila terkait pada makromolekul sebagai karier (Tizard, 1982).

Antigen parasit akan menjadi imunogen apabila dikenali sebagai *non self* (benda asing) dengan berat molekul tertentu. Secara kimiawi, zat imunogen parasit dapat berupa protein, lipida, karbohidrat, glikoprotein dan glikolipida yang masing-masing mempunyai karakteristik ukuran, susunan rantai dan jumlah determinan yang mungkin berbeda (Anders, 1982 dikutip oleh Pratiwi, 1998).

Keistimewaan dari antigen yang berasal dari parasit adalah arti antigen tersebut terhadap hospes maupun parasit itu sendiri. Sebagian antigen yang dihasilkan oleh parasit dapat memicu respon imun hospes (*host protective antigen*) tetapi sebagian lagi justru untuk pertahanan parasit tersebut terhadap pengenalan oleh hospes (*parasite protective antigen*), hal ini sesuai dengan pendapat Tizard (1982) yang menyebutkan bahwa keberhasilan menginfeksi dari suatu parasit tidak diukur dari gangguan yang ditimbulkan pada hospes melainkan berdasarkan kemampuan untuk menyesuaikan dan atau menyatukan diri dengan lingkungan di dalam tubuh hospes. Ditinjau dari segi imunologis, suatu parasit dikatakan berhasil bila mampu menyatukan diri dengan hospes sehingga tidak dianggap asing.



Jenis antigen parasit dapat diketahui dari sumber dan lokasi serta populasi dan siklus hidup parasit. Berdasarkan sumber dan lokasi parasit, antigen terbagi menjadi: 1) *Exoantigen* terlarut yang berasal dari parasit hidup atau dalam media buatan merupakan produk ekskresi berupa metabolit; 2) *Somatic antigen* terlarut yang berasal dari cacing stadium dewasa atau larva yang hancur atau dari sel permukaan tubuh parasit; dan 3) Parasit yang mati atau fragmen-fragmen larva cacing. Sedangkan berdasarkan stadium dan siklus hidup antigen terbagi menjadi: 1) Spesifikasi genus, spesies, strain dan stadium hidup; dan 2) Parasit yang mengalami perubahan bentuk (el-Massry, 1999 dikutip oleh Kusnoto, 2003).

Perlu diperhatikan bahwa pada setiap stadium hidup selalu terdapat protein yang tetap selain beberapa protein lain yang berbeda, hal ini disebabkan oleh profil protein pada setiap stadium hidup parasit umumnya mempunyai perbedaan dan persamaan, tergantung stadium hidupnya (Patterson, 1989). Protein yang tetap atau selalu ditemukan pada setiap stadium hidup disebut sebagai protein dominan (*predominantly protein*) (Kooyman *et al*, 2000).

Karena siklus hidup *Fasciola spp.* yang kompleks, maka pengamatan antigen dapat dilakukan terhadap protein telur, cacing muda dan cacing dewasa. Pada cacing dewasa yang sering digunakan sebagai antigen untuk melakukan vaksinasi pada hewan coba, domba dan sapi adalah *whole somatic extract* dan ES.

*Cathepsin-L* protease didapat dari dalam ES *Fasciola spp.* karena *Fasciola spp.* menghasilkan enzim proteolitik khususnya dari ES material. ES material mudah dikoleksi dari cacing dewasa secara *invitro*. Cat-L protease berukuran antara 27-28 KDa, protein ini dihasilkan cacing *Fasciola spp.* dewasa sebagai enzim pencernaan. Beberapa literatur menyebutkan bahwa Cat-L merupakan antigen yang potensial (Spithill *et al.*, 1999; Cornevale *et al.*, 2001; Estuningsih, 2003).

### 2.3 Tinjauan Analisis Protein dengan Teknik *Sodium Dodecyle Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE).

SDS-PAGE merupakan standar metode pengujian terhadap berat molekul protein, struktur sub unit dan kemurnian protein. Protein adalah molekul yang mengandung kedua grup karboksil negatif dan grup amino positif. *Isoelectric point* (pI) adalah pH pada protein yang tidak mempunyai jaringan elektrik. Hal itu yang menjadi ukuran dari sejumlah protein grup positif dan negatif, dan merupakan jalan yang tepat untuk membedakan secara relatif protein antigen (Rantam, 2003).

SDS mempunyai rumus kimia  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_4\text{Na}^+$  (Lodish *et al.*, 1995). Prinsip dasar SDS-PAGE adalah denaturasi protein oleh *sodium dodecyle sulphate* dilanjutkan dengan separasi molekul berdasarkan massa molekul relatif (MR) dengan metode elektroforesis menggunakan gel *polyacrilamide*. Metode ini dapat mengikat atau mendeteksi protein berdasarkan berat molekulnya tetapi tidak spesifik terhadap jenis protein tertentu (Davis *et al.*, 1994). Selama elektroforesis, SDS dan protein

komplek berpisah melalui gel *polyacrylamide*. Protein yang berukuran kecil bergerak melalui pori gel dengan lebih mudah dan cepat daripada protein yang berukuran besar. Protein yang terpisah akan terlihat seperti pita (Lodish *et al.*, 1995).

Beberapa keuntungan elektroforesis dengan gel adalah: 1) Dapat digunakan untuk pemisahan sampel yang besar jumlahnya khususnya untuk senyawa makromolekul; 2) Komposisi matrik gel dapat diubah-ubah sesuai kebutuhan. Gel dengan kadar yang rendah membuat matrik mempunyai pori yang besar dengan demikian dapat digunakan untuk memisahkan molekul yang besar serta mengurangi gesekan antara molekul dan pori gel atau bekerja sebagai anti konveksi. Sebaliknya matrik dengan gel dengan kadar yang tinggi akan membentuk pori yang kecil ini berguna sebagai penyaring makromolekul (Wongsosupantio, 1989/1990).

## BAB III

### MATERI DAN METODE

#### 3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksploratif yang bersifat diskriptif, bertujuan untuk memaparkan gambaran protein cacing *F. gigantica*. Penelitian ini dimaksudkan untuk menjawab pertanyaan tentang bagaimanakah gambaran protein cacing *F. gigantica* berdasarkan massa molekul relatif.

#### 3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama empat bulan, dimulai pada bulan Juli sampai dengan bulan November 2004 bertempat di Laboratorium Helmintologi Bagian Parasitologi dan Laboratorium *Tissue Culture* (TC), *Tropical Disease Centre* (TDC) Universitas Airlangga Surabaya.

#### 3.3 Materi Penelitian

##### 3.3.1 Bahan Penelitian

Unit analisis penelitian ini adalah *Excretory-Secretory* (ES) cacing *F. gigantica*. Cacing *F. gigantica* didapatkan dari organ hati sapi penderita fasciolosis yang diambil dari Rumah Potong Hewan (RPH) Pegirian, Surabaya. Bahan-bahan kimia yang digunakan adalah: aquades, larutan

sukrosa pekat, *phosphate buffer saline* (PBS), kloroform, formalin 10 %, N-lauroilsarkosin, RPMI-1640. Sedangkan pada analisis protein dengan teknik SDS PAGE, bahan-bahan kimia yang digunakan adalah: *butanol*, *polyacrylamide*, *ammonium persulphate*, TEMED, Tris-HCL, *sodium dodecyl sulphate*, *methanol*, asam asetat, *glutaraldehyde*, NaOH, NH<sub>3</sub>, AgNO<sub>3</sub>, *formaldehyde*, *citroenzuur*.

### 3.3.2 Alat-alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah: *waterbath*, termometer, gelas piala, botol *Schott*, tabung plastik 50 ml, cawan petri, tabung reaksi, sonikator, *electrophoresis equipment* (SDS-PAGE), pinset, pisau skalpel, gunting bedah, nampan aluminium, inkubator dan freezer - 70°C.

## 3.4 Metode Penelitian

### 3.4.1 Pembuatan Medium RPMI

Bahan-bahan yang dibutuhkan antara lain antibiotik (10 µg/ml Gentamycine dan 2 µg/ml Fungizone); RPMI-1640 dengan L-glutamine; dH<sub>2</sub>O. Alat-alat yang digunakan yaitu gelas Beker; Mikrofilter; Kamar steril; Syringe steril; Bunsen; Aluminium Foil; Botol *Schott*. Teknik pembuatan, pastikan bahwa semua alat dan bahan dalam keadaan steril. Tambahkan 10 µg/ml Gentamycine dan 2 µg/ml Fungizone dalam RPMI-1640 dengan L-glutamine, kemudian tambahkan dH<sub>2</sub>O sampai volume

menjadi 1000 ml (penambahan dH<sub>2</sub>O sesuai dengan yang tercantum pada kemasan RPMI-1640). Simpan dalam botol steril pada suhu -5 °C (Sumber: Balitvet, 2003).

#### 3.4.2 Pemeriksaan Feses dan Koleksi Cacing *F. gigantica*

Metode pemeriksaan yang dilakukan pada sampel feses sapi yang diduga terinfeksi fasciolosis yaitu: 1) Pemeriksaan natif, dengan ujung gelas pengaduk kecil ambil sedikit tinja lalu oles pada objek gelas. Beri satu-dua tetes air dan ratakan, tutup dengan *cover glass*. Periksa di bawah mikroskop pembesaran 100x. 2) Metode sedimentasi, buat suspensi tinja dengan perbandingan 1 bagian tinja dengan 10 bagian air. Saring suspensi dengan saringan dan filtratnya ditampung dengan gelas plastik lalu disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 2-5 menit. Buang supernatan, kemudian endapan ditambah air, disentrifugasi lagi, ulang sampai supernatan jernih. Supernatan dibuang dan sisakan sedikit, diaduk dan ambil sedikit dengan pipet, letakkan pada gelas obyek tutup dengan *cover glass*, periksa dengan mikroskop pembesaran 100x.

Cacing *F. gigantica* didapatkan dengan cara melakukan pembedahan organ hati pada sapi penderita fasciolosis. Diagnosis yang dilakukan antara lain dengan cara pemeriksaan mikroskopis secara natif dan sedimentasi pada feses untuk memperkuat diagnosis, pemeriksaan *ante mortem* terhadap ciri fisik tubuh seperti bulu kusut dan kusam, badan kurus, serta adanya *bottle jaw*, pemeriksaan *post mortem* pada *hepar* sapi

yang diduga menderita fasciolosis yaitu adanya perkapurannya dan terdapat cacing dalam saluran empedu maupun kantung empedu. Cacing yang diperoleh kemudian dicuci dengan aquades dan dimasukkan ke dalam *petri dish* berisi PBS.

### 3.4.3 Cara Mendapatkan Protein *Excretory-Secretory* (ES) Cacing *F. gigantica*.

Untuk mendapatkan antigen ES cacing *F. gigantica* dilakukan pembedahan organ hati sapi penderita fasciolosis yang dipotong di RPH Pegirian Surabaya dan mengkoleksi cacing *F. gigantica* yang masih hidup dalam larutan PBS.

Cacing dewasa *F. gigantica* biasanya ditemukan pada saluran empedu dalam organ hati dan kadang pada kantung empedu ruminansia khususnya sapi, kambing dan domba. Pada organ hati biasanya ditemukan di bagian yang mengalami perkapurannya dengan konsistensi organ yang lebih keras daripada organ hati pada hewan yang sehat. Sedangkan *juvenile* biasanya ditemukan dalam parenkim organ hati dan saluran empedu kecil yang terdapat dalam organ hati (Merial, 2004).

Setiap 50 ekor cacing dimasukkan ke dalam 100 ml PBS, kemudian diinkubasi dalam *waterbath* pada suhu 37 °C selama 15-20 menit. Larutan PBS diganti dengan medium RPMI-1640 yang mengandung antibiotik tanpa *Foetal Calf Serum* (FCS), lalu diinkubasikan dalam *waterbath* pada suhu 37 °C selama 4 jam. Setelah 4 jam, cacing dipindahkan pada wadah lain, sedangkan cairan yang tertinggal merupakan

protein ES, dikoleksi dan disimpan pada suhu  $-70^{\circ}\text{C}$ , selanjutnya akan digunakan untuk *running electrophoresis*.

#### 3.4.4 Cara Mendapatkan *Homogenat* Cacing *F. gigantica*.

Cacing dewasa *F. gigantica* dikoleksi dari organ hati sapi penderita fasciolosis yang dipotong di RPH Pegirian Surabaya. Cacing dihancurkan secara manual dengan mortar, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi 10 ml dan disuspensi dengan 2 ml PBS, selanjutnya dilakukan sonikasi dengan frekwensi 35 kHz sebanyak 3 x 60 detik dengan interval istirahat 60 detik. Suspensi tersebut kemudian dihancurkan lagi dengan bantuan 10% deterjen garam natrium N-lauroilsarkosin dan disentrifugasi pada 5000 rpm selama 15 menit. Supernatan diambil dan disentrifugasi lagi pada 35000 rpm selama 25 menit. Pelet dan supernatan dipisahkan, pelet yang terbentuk merupakan *homogenat*. Selanjutnya pelet disimpan pada suhu  $-70^{\circ}\text{C}$  untuk bahan analisis protein (Kusnoto, 2003).

#### 3.4.5 Analisis Protein dengan Teknik *Sodium Dodecyle Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE).

Analisis terhadap protein antigen *Excretory-Secretory* (ES) cacing *F.gigantica* dilakukan dengan teknik *Sodium Dodecyle Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) dengan komposisi: 1). *Separating gel* (gel pemisah) 12% (2,5 ml *acrylamide*; 1,2 ml Tris-HCL pH 8,8; 1,2 ml SDS 0,5%; 1,1 ml akuades; 5  $\mu\text{l}$  TEMED dan 30  $\mu\text{l}$



Amonium persulfat (APS) 10%) 2). *Stacking gel* 12% (0,66 ml *acrylamide*; 0,8 ml Tris-HCL pH 6,8; 0,8 ml SDS 0,5%; 0,74 ml aquades; 4 µl TEMED dan 20 µl APS 10%). Larutan *separating gel* 12% dimasukkan pada gel *plate* dengan posisi vertikal, lalu di atasnya diberi *butanol* sampai mengeras, kemudian *butanol* dibuang dan dibersihkan dengan PBS dan dikeringkan dengan kertas Whatman. Selanjutnya ditambahkan *stacking gel* dan setelah itu dimasukkan *comb* dan ditunggu sampai benar-benar *set*. *Plate* berisi gel kemudian dipasang pada *Minigel Twin G-42 slab* dan dituangkan *electrophoresis buffer* (30,29 g *Tris aminomethan*; 144,13 g glisin; 10g SDS dalam 1000 ml akuades). Masing-masing sebanyak 15 µl sampel berupa antigen *Excretory-Secretory* (ES) cacing muda dan cacing dewasa *F. gigantica* diberi *Laemmli buffer* sama banyak. Lalu sampel didenaturasi dengan *Laemmli buffer* (Tris-HCL pH 6,8 1 ml; gliserin 0,8 ml; SDS 10% 1,6 ml; *bromfenolblue* 0,5 % 0,4 ml; *merkptoetanol* 5% 50 µl; aquades 3,8 ml) pada pemanasan 100 °C selama 5 menit dan dimasukkan ke dalam sumuran *stacking gel*. Sebagai marker digunakan protein dengan MR pada kisaran 6,5-200 kDa. Elektroforesis dinyalakan dengan tegangan 40 V dengan kuat arus 10 mA dan ditingkatkan menjadi 125 V, 40 mA ketika sampel telah melewati *stacking gel* kira-kira selama 1 jam.

Pencucian terhadap gel hasil *running* dilakukan dalam tiga tahap, antara lain: 1) Pencucian I menggunakan 25 ml metanol 50%; 3,75 ml asam asetat 7,5% dan 71,25 ml aquades selama 30 menit; 2) Pencucian II

menggunakan 2,5 ml metanol 5%; 3,75 ml asam asetat 7,5% dan 93,75 ml akuades selama 20 menit; dan 3) Pencucian III menggunakan 10 ml *glutaraldehida* 10% dan 90 ml akuades selama 25 menit. Gel kemudian diwarnai dengan teknik pewarnaan perak (1,6 g AgNO<sub>3</sub> dalam 8 ml aquades; 42 ml NaOH 0,36 %; 2,8 ml NH<sub>3</sub> 25% dalam 147 ml aquades) selama 15 menit, dilanjutkan pencucian 2 x 2 menit dengan 100 ml akuades dan kemudian ditambahkan larutan pengembang warna (200 µl asam sitrat 5%; 100 µl formaldehid 37% dalam akuades 200 ml) dan dilakukan pencucian kembali selama 2 x 2 menit dalam 100 ml akuades. Setelah gel terwarnai kemudian dimasukkan dalam larutan asam asetat 10% untuk menghentikan proses pengecatan, selanjutnya gel dapat disimpan pada larutan gliserin 10% (Harlow dan Lane, 1988; Suwarno, Rantam, dan Yoes, 2000).

### 3.5 Pengolahan Hasil Analisis Protein

Cara pembacaan hasil SDS-PAGE, menurut Rantam (2003) massa molekul relatif antigen dapat dicari dengan menghitung nilai Rf (*Retardation factor*) dari masing-masing pita dengan rumus:

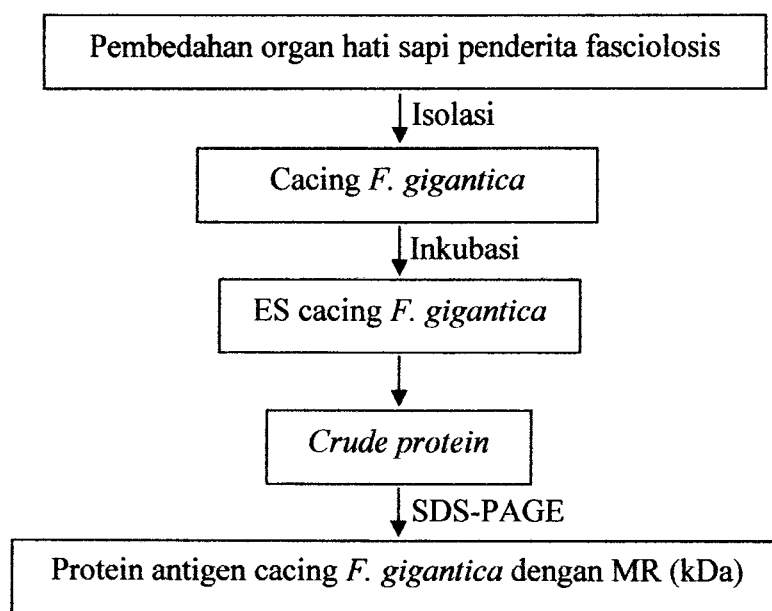
$$Rf = \frac{\text{Jarak pergerakan protein dari tempat awal gel preparasi}}{\text{Jarak pergerakan warna dari tempat awal gel preparasi}}$$

Kemudian nilai Rf diolah dengan persamaan regresi (Sudjana, 2001), dengan rumus:  $Y = a + bx$

Keterangan : Y = MR sampel (dalam log y Da)

X = Rf sampel

### 3.6 Kerangka Operasional

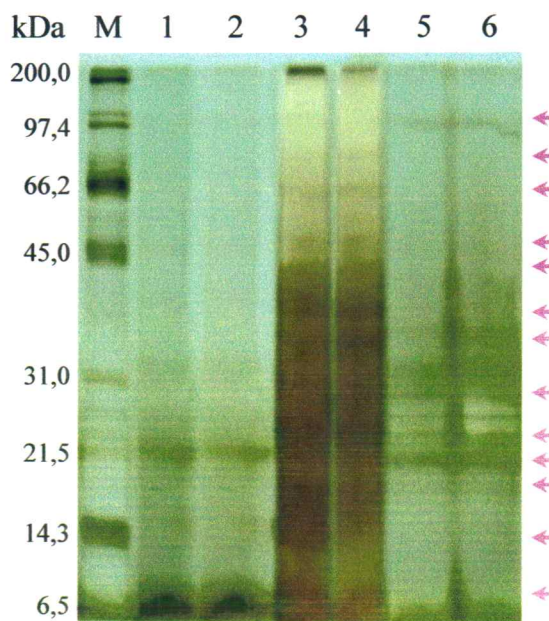


Gambar 3.1. Bagan alur penelitian protein ES cacing *F. gigantica*

## BAB IV

### HASIL PENELITIAN

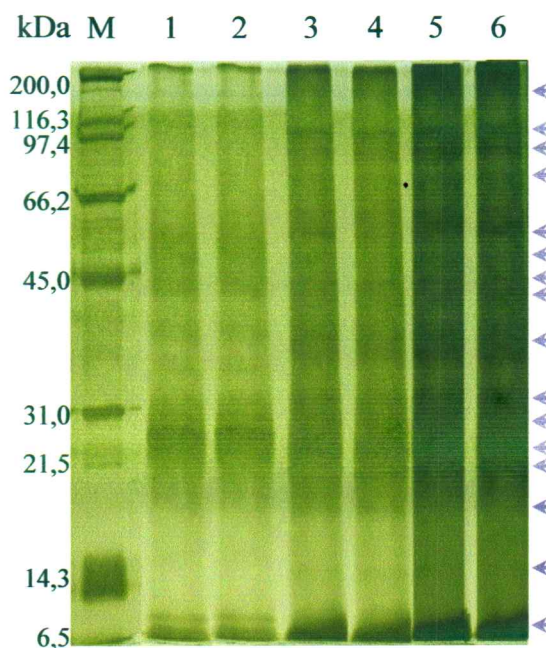
Dari analisis protein *Excretory-Secretory* (ES) *F. gigantea* dengan menggunakan teknik SDS-PAGE pada *running* pertama diperoleh hasil berturut-turut dari atas kebawah tiga belas buah pita protein pada cacing dewasa, selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Hasil analisis protein dengan teknik SDS-PAGE *running* pertama. Keterangan: kolom M, marker (Sigma); kolom 1-2, *Excretory-Secretory* cacing muda (*juvenile*) *F. gigantea*; kolom 3-4, *homogenat protein F. gigantea* dewasa; kolom 5-6, ES *F. gigantea* dewasa (*adult*).

Hasil *running* pertama memperlihatkan pita protein yang sangat tipis pada kolom 1, 2, 5 dan 6, sedangkan pada kolom 3 dan 4 terlihat sangat tajam sehingga secara keseluruhan pita yang terbentuk kurang jelas. Keadaan ini berhubungan dengan kadar protein spesimen dan

kandungan zat lain selain protein sehingga mempengaruhi ketebalan dan kejelasan pita yang terbentuk (Kusnoto, 2003).



Gambar 4.2. Hasil analisis protein dengan teknik SDS-PAGE *running* kedua. Keterangan: kolom M, marker (Sigma); kolom 1-2, ES cacing muda *F.gigantica*; kolom 3-4, ES *F. gigantea* dewasa; kolom 5-6, homogenat cacing *F. gigantea* dewasa.

Pada *running* kedua teknik SDS-PAGE didapat hasil yang lebih baik, pita protein yang terbentuk terlihat lebih jelas seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.2. Untuk menentukan berat molekul atau massa molekul relatif (MR) protein-protein tersebut, dilakukan perhitungan menggunakan persamaan regresi antara nilai Rf dan  $^{10}\log$  MR (Da) (Lampiran 1) dan didapatkan 16 macam protein yang terbentuk pada homogenat cacing *F. gigantea* dewasa dan ES cacing muda dan cacing dewasa *F. gigantea*. Adapun 16 macam protein yang diperoleh adalah; diantara Marker 200 kDa dan 116,3 kDa terdapat satu pita protein dengan MR sebesar 145 kDa; antara Marker 116,3 kDa dengan 97,4 kDa juga

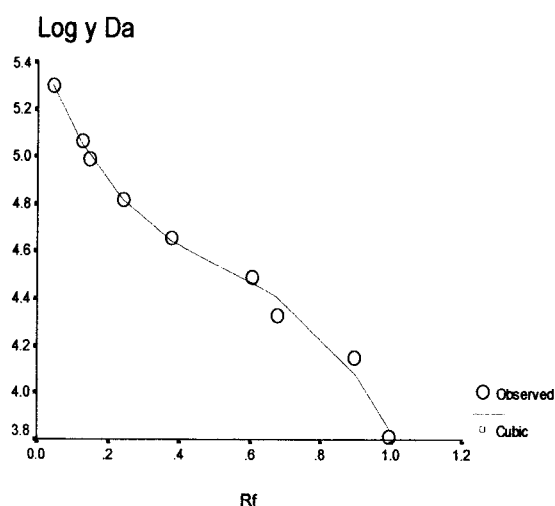
terdapat satu pita protein yaitu 108 kDa; terdapat dua pita protein diantara Marker 97,4 kDa dan 66,2 kDa, yaitu 91 kDa dan 74 kDa; antara Marker 66,2 kDa dan 45 kDa terdapat tiga protein, antara lain 58, 52 dan 45 kDa; terdapat tiga pita protein yaitu 40, 35 dan 32 kDa; di antara Marker 45 kDa dan 31 kDa; antara Marker 31 dan 21,5 kDa juga terdapat tiga pita protein, antara lain 28, 27 dan 25 kDa; dibawah Marker 21,5 kDa berturut-turut terdapat tiga pita protein yaitu 18, 15 dan 8 kDa. Pada ES cacing dewasa terdapat 15 macam pita protein yaitu; 145 kDa; 108 kDa; 91 kDa; 74 kDa; 58 kDa; 45 kDa; 40 kDa; 35 kDa; 32 kDa; 28 kDa; 27 kDa; 25 kDa; 18 kDa; 15 kDa dan 8 kDa sedangkan pada ES cacing muda terdapat 9 macam pita pita protein yaitu 145 kDa; 58 kDa; 52 kDa; 45 kDa; 40 kDa; 35 kDa; 28 kDa; 27 kDa dan 8 kDa, dari semua pita protein yang didapatkan tersebut, ada delapan pita protein yang sama antara cacing muda dan cacing dewasa *F. gigantica* yaitu protein dengan MR 145 kDa, 58 kDa, 45 kDa, 40 kDa, 35 kDa, 28 kDa, 27 kDa dan 8 kDa.

Semua jenis protein tersebut, protein dengan MR 27 dan 28 kDa terlihat lebih dominan diantara protein yang lain, sedangkan protein lainnya terlihat dengan bentuk yang lebih tipis dan intensitas warna yang berkurang. Secara lengkap hasil penghitungan MR fraksi protein hasil *running* SDS-PAGE cacing *F. gigantica* tersaji pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1. Hasil penghitungan massa molekul relatif (MR) protein cacing *F. gigantica* pada gel SDS-PAGE dengan persamaan regresi.

No	Jarak (mm)	Rf	Log y (Da)	MR (Da)	MR (kDa)
1	10.0	0.088	5.163	145545.90	145
2	15.5	0.136	5.032	107646.50	108
3	19.0	0.167	4.960	91201.10	91
4	24.0	0.211	4.869	73960.50	74
5	31.0	0.272	4.766	58344.50	58
6	35.0	0.307	4.718	52239.60	52
7	41.5	0.364	4.652	44874.50	45
8	47.0	0.412	4.606	40364.50	40
9	55.0	0.482	4.550	35481.30	35
10	63.0	0.553	4.500	31622.80	32
11	70.5	0.618	4.452	28313.90	28
12	73.0	0.640	4.435	27227.00	27
13	78.0	0.684	4.396	24888.60	25
14	92.0	0.807	4.249	17741.90	18
15	97.5	0.855	4.169	14757.10	15
16	110.0	0.965	3.922	8356.00	8

Berdasarkan perhitungan regresi dapat diketahui bahwa terdapat hubungan negatif sangat erat antara nilai Rf dengan MR protein pada marker (Gambar 4.3), koefisien korelasi (r) sebesar  $-0,99662$  dengan persamaan regresi  $y = 5,462 - 3,906x + 5,964x^2 - 3,7x^3$ .



Gambar 4.3. Kurva hubungan antara Log y Da dengan Rf

## BAB V

### PEMBAHASAN

Secara spesifik infeksi parasit merangsang lebih dari satu mekanisme pertahanan imunologis, yaitu respon imun humoral dan seluler, namun yang menonjol ditentukan oleh jenis parasit tersebut. Cacing *F. gigantica* mempunyai siklus hidup, inang perantara, penyebaran geografis yang spesifik. Perbedaan struktur morfologi pada generasi *Fasciola spp.* memiliki macam antigen yang berbeda, menyebabkan perbedaan imunogenitas dalam memicu terbentuknya antibodi (Subronto dan Tjahayati, 2001). Pengamatan terhadap protein cacing *F. gigantica* dilakukan terhadap cacing muda (*juvenile*) dan cacing dewasa (*adult*). Stadium cacing muda dan cacing dewasa yang sering digunakan adalah antigen ES, *surface* antigen dan antigen somatik (*homogenat*) (Estuningsih, 2003).

Perlu diketahui alasan dipilihnya *juvenile* dan cacing dewasa sebagai isolat pada penelitian ini yaitu antara lain: 1) Tingkat kesulitan mendapatkan isolat rendah; dan 2) Tingkat keasingan proteinnya terhadap hospes lebih baik.

Teknik untuk mendapatkan antigen ES cacing *F. gigantica* dilakukan koleksi cacing *F. gigantica* dari organ hati sapi penderita fasciolosis dan diinkubasi dengan larutan PBS dan medium RPMI-1640 yang mengandung antibiotik tanpa *Foetal Calf Serum* (FCS). Cairan hasil



inkubasi merupakan ES, selanjutnya akan digunakan untuk *running* SDS-PAGE.

Setelah didapatkan protein ES cacing muda dan cacing dewasa, masing-masing dilakukan analisis protein dengan teknik SDS-PAGE dengan menentukan perbedaan letak pita pada gel dibandingkan dengan marker protein. Untuk mendapatkan massa molekul relatif yang tepat diperhitungkan dengan marker protein yang berkisar antara 6.500-200.000 Da. Prinsip dasar metode SDS-PAGE adalah denaturasi protein oleh *sodium dodecyl sulphate* dilanjutkan dengan separasi molekul berdasarkan massa molekul relatifnya dengan metode elektroforesis menggunakan gel *polyacrilamide*. Metode ini dapat mengikat atau mendeteksi protein berdasarkan massa molekul relatifnya tetapi tidak spesifik terhadap jenis protein tertentu (Davis *et al.*, 1994).

Cara pembacaan hasil SDS-PAGE, menurut Rantam (2003) berat molekul atau massa molekul relatif antigen dapat dicari dengan menghitung nilai Rf (*Retardation factor*) dari masing-masing pita. Nilai Rf diolah dengan persamaan regresi (Sudjana, 2001).

Hasil analisis protein ES cacing muda dan cacing dewasa *F.gigantica* yang dilakukan dengan teknik SDS-PAGE didapatkan 16 macam pita protein yang terbentuk pada ES cacing muda dan cacing dewasa *F. gigantea* serta dibandingkan dengan homogenat cacing *F.gigantica* dewasa. Adapun 16 macam protein yang diperoleh dengan MR sebesar 145 kDa; 108 kDa; 91 kDa; 74 kDa; 58kDa; 52 kDa; 45 kDa;

40 kDa; 35 kDa; 32 kDa; 28 kDa; 27 kDa; 25 kDa; 18kDa; 15 kDa dan 8 kDa. Pada ES cacing dewasa terdapat 15 macam pita protein yaitu; 145 kDa; 108 kDa; 91 kDa; 74 kDa; 58 kDa; 45 kDa; 40 kDa; 35 kDa; 32 kDa; 28 kDa; 27 kDa; 25 kDa; 18 kDa; 15 kDa dan 8 kDa sedangkan pada ES cacing muda terdapat 9 macam pita pita protein yaitu 145 kDa; 58 kDa; 52 kDa; 45 kDa; 40 kDa; 35 kDa; 28 kDa; 27 kDa dan 8 kDa.

Dari semua pita protein yang didapatkan tersebut, ada delapan pita protein yang sama antara cacing muda dan cacing dewasa *F. gigantica* yaitu protein dengan MR 145 kDa, 58 kDa, 45 kDa, 40 kDa, 35 kDa, 28 kDa, 27 kDa dan 8 kDa. Dari delapan pita protein tersebut, protein dengan MR 28 kDa dan 27 kDa terlihat lebih dominan diantara protein yang lain, sedangkan protein yang lain terlihat diekspresikan dengan bentuk yang lebih tipis dan intensitas warna yang rendah. Hal ini terjadi kemungkinan besar karena tingkat kemurnian yang baik dan adanya konsentrasi yang cukup pada protein (Kusnoto, 2003).

Berdasarkan hasil pengamatan terhadap hasil *running* SDS-PAGE menunjukkan bahwa keberhasilan *running* tersebut dipengaruhi beberapa hal antara lain kebersihan isolat, tingkat kemurnian isolat, dan kadar protein dalam homogenat. Kebersihan isolat mempengaruhi kualitas pita protein yang terbentuk pada gel, pita terlihat tajam dan gel terang, sehingga memudahkan analisis protein dan dokumentasi. Isolat yang murni dan kadar protein homogenat yang baik akan menghasilkan pita

protein yang baik dan jelas sehingga dapat memudahkan analisis massa molekul relatif (MR) pada pita yang terbentuk (Kusnoto, 2003).

Kadar protein optimal untuk homogenat cacing baik dalam bentuk telur, larva, dan dewasa yang dapat menghasilkan pita protein yang baik adalah lebih dari 1000 µg/ml. Kadar protein yang cukup di samping memberikan hasil yang baik pada preparasi protein, juga lebih efisien saat melakukan imunisasi pada pembuatan antibodi poliklonal (Kusnoto, 2003).

## BAB VI

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil preparasi protein ES cacing muda dan cacing dewasa *F. gigantica* yang dilakukan dengan teknik SDS-PAGE didapatkan 16 pita protein yang terbentuk pada ES *F.gigantica* cacing muda dan cacing dewasa serta pada homogenat cacing *F. gigantica* dewasa sebagai perbandingan. Adapun 16 macam protein yang diperoleh dengan MR sebesar 145 kDa; 108 kDa; 91 kDa; 74 kDa; 58kDa; 52 kDa; 45 kDa; 40 kDa; 35 kDa; 32 kDa; 28 kDa; 27 kDa; 25 kDa; 18kDa; 15 kDa dan 8 kDa. Pada ES cacing dewasa terdapat 15 macam pita protein yaitu; 145 kDa; 108 kDa; 91 kDa; 74 kDa; 58 kDa; 45 kDa; 40 kDa; 35 kDa; 32 kDa; 28 kDa; 27 kDa; 25 kDa; 18 kDa; 15 kDa dan 8 kDa sedangkan pada ES cacing muda terdapat 9 macam pita pita protein yaitu 145 kDa; 58 kDa; 52 kDa; 45 kDa; 40 kDa; 35 kDa; 28 kDa; 27 kDa dan 8 kDa. Dari semua pita protein yang didapatkan tersebut, terdapat delapan pita protein dengan MR yang sama antara cacing muda dan cacing dewasa *F. gigantica* yaitu protein dengan MR 145 kDa, 58 kDa, 45 kDa, 40 kDa, 35 kDa, 28 kDa, 27 kDa dan 8 kDa.

#### 6.2 Saran

Saran yang dapat diberikan dari penelitian ini adalah perlu adanya penelitian lebih lanjut dari delapan pita protein yang sama tersebut agar

dapat diketahui imunogenitas, antigenitas, sensitifitas dan spesifisitas masing-masing serta perlu dilakukan pengujian secara spektrofotometri sebelum dilakukan *running* elektroforesis untuk mengetahui kebersihan sampel dari kontaminan.

## RINGKASAN

**Rendy Tri Dharmawan Laksana. “Profil Protein *Excretory-Secretory* (ES) Cacing *Fasciola gigantica* Isolat RPH Pegirian Surabaya”.** Penelitian ini dilaksanakan dibawah bimbingan Prof. Dr. H. Setiawan Koedarto, MSc., drh. sebagai pembimbing pertama dan Prof. Dr. Ir. Hj. Kusningrum, R.S., MS. sebagai pembimbing kedua.

Fasciolosis umumnya menyerang ternak, terutama ruminansia. Fasciolosis merupakan penyakit zoonosis, pada manusia dan menyebabkan kerusakan jaringan organ hati. Masalah yang kemudian timbul yaitu untuk melakukan diagnosis fasciolosis secara dini terutama yang disebabkan oleh *F. gigantica* bila hanya dengan cara konvensional yaitu dengan cara menemukan telur dalam feses dianggap tidak efektif, karena pada infeksi dini dan kasus fasciolosis akut tidak ditemukan adanya telur pada pemeriksaan feses Demikian juga bila diagnosis berdasarkan gejala klinik akan sulit dilakukan karena gejala kliniknya sangat bervariasi.

Untuk itu diperlukan pengujian yang lebih spesifik terhadap *F. gigantica*, salah satunya adalah dengan uji serologis untuk mengetahui ikatan antigen-antibodi. Sehingga penting untuk dilakukan analisis terhadap massa molekul relatif protein. Sebagai sumber protein dapat digunakan bahan yang berasal dari cacing muda (*juvenile*) dan cacing dewasa (*adult*) *F. gigantica*.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui dan mendapatkan profil berdasarkan massa molekul relatif (MR) protein *Excretory-Secretory* (ES) yang terdapat pada cacing *F. gigantica*. Cacing didapatkan dari pembedahan organ hati penderita fasciolosis, kemudian dilakukan isolasi terhadap ES protein. Analisis terhadap *crude protein* dari ES tersebut dilakukan dengan teknik SDS-PAGE (*sodium dodecyle sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*). SDS-PAGE adalah suatu proses pemurnian dan pemisahan protein berdasarkan MR.

Hasil preparasi protein ES cacing muda dan cacing dewasa *F. gigantica* yang dilakukan dengan teknik SDS-PAGE didapatkan 16 macam protein yang terbentuk pada ES cacing muda dan cacing dewasa *F. gigantica* serta homogenat *F. gigantica* dewasa. Adapun 16 macam protein yang diperoleh dengan MR sebesar 145 kDa; 108 kDa; 91 kDa; 74 kDa; 58kDa; 52 kDa; 45 kDa; 40 kDa; 35 kDa; 32 kDa; 28 kDa; 27 kDa; 25 kDa; 18 kDa; 15 kDa dan 8 kDa. Pada ES cacing dewasa terdapat 15 macam pita protein yaitu; 145 kDa; 108 kDa; 91 kDa; 74 kDa; 58 kDa; 45 kDa; 40 kDa; 35 kDa; 32 kDa; 28 kDa; 27 kDa; 25 kDa; 18 kDa; 15 kDa dan 8 kDa sedangkan pada ES cacing muda terdapat 9 macam pita protein yaitu 145 kDa; 58 kDa; 52 kDa; 45 kDa; 40 kDa; 35 kDa; 28 kDa; 27 kDa dan 8 kDa, dari semua pita protein yang didapatkan tersebut, ada delapan pita protein yang sama antara cacing muda dan cacing dewasa *F. gigantica* yaitu protein dengan MR 145 kDa, 58 kDa, 45 kDa, 40 kDa, 35 kDa, 28 kDa, 27 kDa dan 8 kDa. Berdasarkan penelitian tersebut, disarankan untuk melakukan penelitian lebih lanjut guna mengetahui protein spesifik imunogenik cacing *F. gigantica*.

Kadar protein optimal untuk homogenat cacing baik dalam bentuk telur, larva, dan dewasa yang dapat menghasilkan pita protein yang baik adalah lebih dari 1000  $\mu\text{g/ml}$ . Kadar protein yang cukup disamping memberikan hasil yang baik pada preparasi protein, juga lebih efisien saat melakukan imunisasi pada pembuatan antibodi poliklonal (Kusnoto, 2003).



## DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., and Pober, J.S.. 2000. *Cellular and Molecular Immunology*. 4<sup>th</sup> ed. Saunders Company. Philadelphia
- Balivet. 2003. Simposium Sehari: Teknologi Veteriner Dalam Peningkatan Kesehatan Hewan dan Produknya. Bogor. hal. 5-8.
- Cornevale, S, Rodriguez, M.I., Guarnera, E.A., Carmona, C., Tanos, T., and Angel S.O. 2001. Immunodiagnosis of Fasciolosis Using Recombinant pro Cathepsin-L Cystein Protease. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 41(1-2):43-49.
- Davis, L., M. Kuehl and Battey. 1994. *Basic Molecular In Biology*. Appleton. and Lange Press. Connecticut. 616-689
- Dunn, A.M. 1978. *Veterinary Helmintology*, 2<sup>nd</sup>Ed. William Heinemann Medical Books Ltd. London.
- Estuningsih, S.E., Adiwinata, G., Widjajanti, S. dan Pienrafita, D. 2003. Pengembangan teknik *capture* ELISA Fasciolosis pada sapi dengan antibodi monoclonal. *Buletin Ilmu Veteriner*. Balai Penelitian Veteriner. Bogor
- Estuningsih, S.E., 2003. Antigen *Fasciola gigantica*. Workshop Pengembangan Diagnostik Fasciolosis dengan ELISA untuk deteksi Cathepsin-L. Balai Penelitian Veteriner. Bogor.
- Harlow, E.N., D. Lane. 1988. *Antibodies. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory. USA.
- Hutasoit, J.H. 1982. Peranan Dokter Hewan Dalam Pembangunan Khususnya Mengisi Repelita IV. Ditjen Peternakan Departemen Pertanian, Jkt. hal. 16.
- Kooyman F.N., Schallig, H.D., Van Leeuwen, M.A., Mac Kellar, A., Huntly, J.F., Cornelissen, A.W., Vervelde, L. 2000. Protection in lambs vaccinated *Haemonchus contortus* antigens is age related, and correlates with IgE rather than IgG<sub>1</sub> antibody. *Parasite Immunol*;22(1):13-20.
- Kusnoto, 2003 Isolasi dan Karakterisasi Protein Immunologi Larva Stadium II *Toxocara cati* Isolat Lokal. **Tesis**. Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga. Hal. 3: 11-13: 14

- Levine, N.D. 1978. Textbook of Veterinary. Burgers Publishing Company. Diterjemahkan oleh: Ashadi G. 1990. Wardiato Ed. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Lodish, H., D. Baltimore, A. Berk, S.C. Zapusky, P. Matsudaria and Darnel. 1995. Molecular Cell Biology. 3<sup>th</sup> Edition. Scientific American Book. New York
- Merial Australia com Producers Sheep Disease Information.html, *Fasciola gigantica* fresh.html, 2004.
- Patterson R.M. 1989. The Immune Respons to Helminth Parasites. In: ELISA Technology in Diagnosis and Research. Graham and Burgers Eds. James Cook University of North Queensland, Australia. pp: 279-297.
- Pratiwi, T. 1998. Penentuan Protein Immunogen Larva *Toxocara vitulorum* sebagai usaha menentukan metode imunodiagnosis dini *Toxocariasis* pada induk sapi. **Disertasi**. Program Pascasarjana Universitas Airlangga. Hal. 1-3 : 10-16: 27-28 : 61-66
- Rantam, F.A. 2003. Metode Imunologi. Airlangga University Press. Surabaya
- Soulsby, E.J.L. 1986. Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals 7<sup>th</sup>Ed. Bailliere Tindall. London.
- Spithill, T.W., Smooker, P.M., Sexton, D.L., Bozas, E., Morrison, C.A., Creaney, J., and Parson J.C. 1999. Development of vaccines against *Fasciola hepatica*. In: Fasciolosis (J.P. Dalton Ed) CAB International.
- Subowo. 1993. Imunologi Klinik. Angkasa. Bandung. Hal. 138-139.
- Subronto, Tjahayati I. 2001. Ilmu Penyakit Ternak II. Gajah Mada University Press. Jogjakarta. hal. 76-82.
- Sudjana, M.A., 2001. *Metode Statistika*. Tarsito. Bandung. Hal 310-342
- Suwarno, Rantam. F.A., dan Yoes P. D. 2000. Identifikasi Karakter Protein PRM Virus Dengue-3 Isolat Surabaya sebagai Bahan Diagnostik. Laporan Penelitian Dosen Muda. Lemlit. Universitas Airlangga.
- Tizard Ian R. 1982. An Introduction of Veterinary Immunology. WB Saunders Company. Diterjemahkan oleh Masduki Partadiredja dan Soehardjo Hardjosworo. 1987. Airlangga University Press. Hal 303-324
- Tolan. 2003. Fascioliasis. eMedicine Instant Access to the Minds of Medicine.

Urquhart, G.M., Armour, J., Duncan, J.L., Dunn, A.M., Jennings, F.W. 1985. Veterinary Parasitology. The University of Glasgow. Scotland. pp: 100-109

Wongsosupantio S. 1989/1990. Pedoman Kuliah Elektroforesis Gel Protein. Pusat Antar Universitas-Bioteknologi UGM. Yogyakarta. Hal 8-26.

### Lampiran 1. Analisis regresi untuk menentukan hubungan nilai Rf pada SDS-PAGE dengan massa molekul relatif (MR) protein.

Panjang gel pada *running* kedua adalah 114 mm. Pengukuran jarak antara gel preparasi dan pita yang terbentuk (nilai Rf) dapat dilihat pada tabel berikut.

5.0000	0.0440	200.0000	200000.0	5.3010
14.5000	0.1270	116.3000	116300.0	5.0660
16.5000	0.1450	97.4000	97400.00	4.9890
27.5000	0.2410	66.0000	66000.00	4.8200
43.0000	0.3770	45.0000	45000.00	4.6530
69.0000	0.6050	31.0000	31000.00	4.4910
77.0000	0.6750	21.5000	21500.00	4.3320
102.0000	0.8950	14.3000	14300.00	4.1550
113.0000	0.9910	6.5000	6500.000	3.8130

### Curve Fit

MODEL: MOD\_1.

Dependent variable.. LOGYMR

Method.. CUBIC

Listwise Deletion of Missing Data

Multiple R .99662  
R Square .99325  
Adjusted R Square .98920  
Standard Error .04938

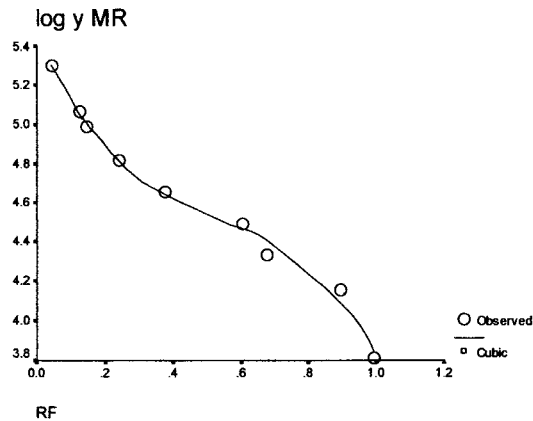
Analysis of Variance:

	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	3	1.7946144	.59820482
Residuals	5	.0121938	.00243875

F = 245.29108 Signif F = .0000

----- Variables in the Equation -----

Variable	B	SE B	Beta	T	Sig T
RF	-3.905645	.591888	-2.870936	-6.599	.0012
RF**2	5.963641	1.344548	4.596238	4.435	.0068
RF**3	-3.701280	.847274	-2.786718	-4.368	.0072
(Constant)	5.461692	.062664		87.158	.0000



Berdasarkan perhitungan regresi dapat diketahui bahwa terdapat hubungan negatif sangat erat antara nilai Rf dengan MR protein pada marker, koefisien korelasi (r) sebesar  $-0,99662$  dengan persamaan regresi  $y = 5,462 - 3,906x + 5,964x^2 - 3,7x^3$ . Persamaan ini digunakan untuk menghitung MR protein sampel sebagai berikut.

No	jarak (mm)	Rf	Log y (Da)	y (Da)	y (kDa)
1	10.0	0.088	5.163	145545.90	145
2	15.5	0.136	5.032	107646.50	108
3	19.0	0.167	4.960	91201.10	91
4	24.0	0.211	4.869	73960.50	74
5	31.0	0.272	4.766	58344.50	58
6	35.0	0.307	4.718	52239.60	52
7	41.5	0.364	4.652	44874.50	45
8	47.0	0.412	4.606	40364.50	40
9	55.0	0.482	4.550	35481.30	35
10	63.0	0.553	4.500	31622.80	32
11	70.5	0.618	4.452	28313.90	28
12	73.0	0.640	4.435	27227.00	27
13	78.0	0.684	4.396	24888.60	25
14	92.0	0.807	4.249	17741.90	18
15	97.5	0.855	4.169	14757.10	15
16	110.0	0.965	3.922	8356.00	8

**Lampiran 2. Teknik pembuatan PBS.****2. Teknik Pembuatan PBS**

Bahan: 10 g NaCl; 0,25 g KCl; 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,25 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; H<sub>2</sub>O

Alat: Timbangan; Gelas Beker 1000 ml steril; Stirer.

Teknik:

Masukkan semua bahan ke dalam gelas Beker, tambahkan H<sub>2</sub>O sampai volume 1000 ml. Aduk dengan stirer sampai homogen. Simpan dalam botol steril pada suhu -5 °C (Sumber: Balitvet, 2003).

**Lampiran 3. Teknik koleksi cacing *F. gigantica* dari hepar sapi.**

**Bahan :** hepar sapi; air

**Alat-alat :** baki plastik; pisau; talenan; botol plastik; gunting; pinset; saringan 250 $\mu$ m dan 700 $\mu$ m; timbangan; kertas milimeter blok.

**Cara kerja :**

1. Hepar dan kantong empedu dikeluarkan dari dalam tubuh sapi dan ditimbang.
2. Kantong empedu dipisahkan dari hepar dan dibuka, kemudian cairan empedu disaring dengan saringan 250  $\mu$ m, untuk mencari kemungkinan adanya cacing hati dewasa dalam kantong empedu. Bila ada cacing hati, dikumpulkan dalam botol plastik berisi air dan botol tersebut diberi nomor/label sesuai dengan nomor sapi.
3. Hepar dicuci dengan air bersih sambil disaring dengan saringan bertingkat (ukuran 711  $\mu$ m di atas ukuran 250  $\mu$ m), untuk menahan cacing yang kemungkinan keluar dari saluran empedu hati. Cacing yang ada dikumpulkan dalam botol yang sama.
4. Hepar diletakkan pada baki plastik, kemudian kondisi hepar terhadap infeksi cacing hati dinilai berdasar nilai 0, 1, 2, 3 dan 4 sesuai dengan derajat keparahannya. Semakin buruk kondisi hepar maka semakin tinggi nilainya.
5. Hepar dibersihkan dari lemak dan jaringan lain yang menempel dan dengan menggunakan gunting, saluran empedu yang besar pada hepar dibuka dan dicari cacingnya. Bila ada cacing dalam saluran tersebut, cacing diambil dengan pinset dan dikumpulkan dalam botol yang sama.

6. *Hepar* dipotong menjadi 2 bagian dengan pisau dan masing-masing bagian dipotong lagi menjadi 2 atau 3 bagian. Tiap potongan ditekan-tekan untuk mengeluarkan cacing hati yang ada di dalam saluran empedu yang kecil sambil dibuka saluran empedunya. Cacing yang ditemukan dikumpulkan dalam botol yang sama.
7. Bila dengan cara tersebut sudah tidak ditemukan cacing hati maka *hepar* dipotong-potong dengan ketebalan  $\pm 1$  cm, kemudian potongan-potongan tersebut ditekan-tekan untuk mendapat cacing yang tersisa. Bila ditemukan cacing hati maka cacing tersebut dikumpulkan dalam botol yang sama.
8. Potongan-potongan *hepar* tersebut lalu dicuci dengan air bersih sambil disaring dengan saringan bertingkat sampai *hepar* dan cairannya berwarna bening, tidak merah lagi. Serpihan *hepar* yang tertampung pada saringan 250  $\mu\text{m}$  dibilas dengan air bersih dan ditampung pada baki plastik. Semua cacing hati yang utuh (muda dan dewasa), potongan bagian kepala dan ekor cacing dikumpulkan di dalam botol yang sama.
9. Cacing yang telah terkumpul, dihitung sesuai dengan kondisi cacing (cacing utuh, hanya potongan bagian kepala atau ekor saja) dan dicatat untuk pengolahan data lebih lanjut.
10. Cacing yang utuh diukur panjangnya menggunakan kertas milimeter blok. Bila jumlah cacing kurang dari 50 ekor, maka semua cacing diukur panjangnya, tapi bila lebih dari 50 ekor maka yang diukur panjangnya hanya 50 ekor saja. Hasil pengukuran dicatat untuk pengolahan data lebih lanjut.  
(Sumber: Balitvet, 2003)



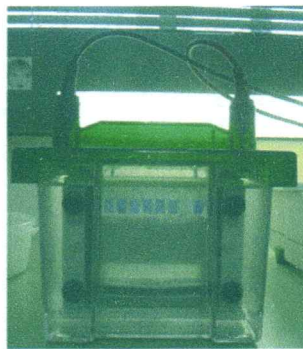
#### Lampiran 4. Alat-alat yang digunakan dalam penelitian

1.



Keterangan: *Laminar Flow Hood* yang digunakan untuk pembuatan suspensi medium RPMI

2.



Keterangan: *Electroforesis apparatus* yang digunakan pada teknik SDS-PAGE protein ES *F. gigantica*

3.



Keterangan: *Shaker* yang digunakan untuk pencucian dan pewarnaan pada teknik SDS-PAGE.

4.



Keterangan: Sonikator yang digunakan untuk mendapatkan *homogenat*.