

SKRIPSI

IDENTIFIKASI FRAKSI WHOLE PROTEIN CACING *Haemonchus contortus* DEWASA



Oleh :

KURNIAWATI AMRIHASIH
SURABAYA - JAWA TIMUR

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2003**

IDENTIFIKASI FRAKSI *WHOLE PROTEIN* CACING *Haemonchus contortus* DEWASA

Skripsi sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

pada

Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

Oleh

KURNIAWATI AMRIHASIH

NIM : 069812510

Menyetujui

Komisi Pembimbing



Nunuk Dyah Retno L., MS., Drh.
Pembimbing Pertama



Poedji Hastutiok, Msi., Drh.
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.

Mengetahui

Panitia penguji,



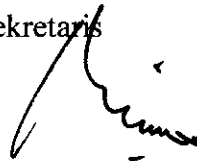
Sri Mumpuni S., M.Kes., drh.

Ketua



Iwan Sahrial Hamid, MSi., drh.

Sekretaris



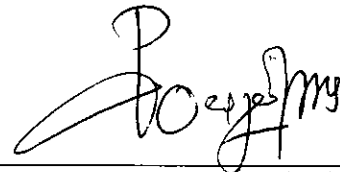
Nunuk Dyah Retno L., MS., drh.

Anggota



Ir. Wahyu Tjahjaningsih, M.Si

Anggota



Poedji Hastutiek, MSi., drh

Anggota

Surabaya, 2 November 2004

Fakultas kedokteran hewan

Universitas airlangga

Dekan,



Prof. Dr. Ismudiono, MS., drh

NIP. 130 687 297

IDENTIFIKASI FRAKSI *WHOLE PROTEIN* CACING *Haemonchus contortus* DEWASA

Kurniawati Amrihasih

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi fraksi *whole protein* dari cacing *Haemonchus contortus* dewasa yang dinyatakan dalam berat molekul dan diharapkan sebagai protein yang imunogenik sebagai bahan vaksin subunit dalam penanggulangan Haemonchiosis.

Cacing *Haemonchus contortus* diisolasi dari abomasum kambing dan domba yang dipotong di RPH (Rumah Potong Hewan) Surabaya, kemudian diekstraksi dengan tehnik sonikasi. Identifikasi fraksi *whole protein H. contortus* dilakukan dengan proses Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE).

Hasil penelitian didapatkan 9 fraksi protein yaitu: 49,0 kDa; 47,1 kDa; 35,7 kDa; 30,1 kDa; 25,3 kDa; 23,4 kDa; 18,6 kDa; 16,7 kDa; 14,8 kDa. Fraksi protein cacing *H. contortus* yang tercat tebal adalah 30,1 kDa. Supaya didapatkan pita protein yang jelas disarankan agar dilakukan pemurnian protein sebelum dielektroforesis, selain itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mendapatkan fraksi protein yang imunogenik yang nantinya digunakan sebagai bahan vaksin subunit.

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa yang telah melimpahkan rahmatNya sehingga penulis dapat menyelesaikan laporan penelitian dengan judul “Identifikasi Fraksi *Whole Protein* Cacing *Haemonchus contortus* Dewasa” ini.

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Prof.Dr.Ismudiono,M.S.,drh selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
2. Ibu Nunuk Dyah Retno L.,M.S.,drh., Bapak Mufasirin,M.Si.,drh., Bapak Iwan Sahrial Hamid, M.Si.,drh. yang telah memberi kepercayaan dalam menyelesaikan penelitian ini.
3. Ibu Poedji Hastutiek,M.Si.,drh. dan Ibu Nunuk Dyah Retno L.,M.S.,drh. selaku dosen pembimbing yang telah memberikan bimbingan serta pengarahan dalam penulisan skripsi hingga selesai.
4. Ibu Sri Mumpuni S.,M.Kes.,drh., Bapak Iwan Sahrial Hamid,M.Si.,drh., dan Ibu Wahyu Tjahjaningsih,M.Si.,Ir. selaku dosen penguji yang telah memberikan bimbingan serta pengarahan.
5. Bapak Suwarno, karyawan Lab. Helminthologi dan karyawan perpustakaan Fakultas Kedokteran Hewan UNAIR yang telah membantu penulis dalam pengumpulan sampel dan materi penelitian sehingga penelitian dan penulisan ini selesai.

6. Teman-teman seperjuangan dan seangkatan yang telah memberikan dukungannya baik moril maupun spiritual, Artha, Feny, Dwi, Rosita, Dira, Irlan, Andi, Louis, Nikmah, Etik, Lala, M' Hetty, M' Vira, serta teman-teman yang lain yang tidak bisa penulis sebutkan satu persatu.
7. Keluarga yang telah memberikan dorongan dan dukungan yang telah diberikan selama awal kuliah hingga akhir penulisan skripsi ini.

Pada akhir kata, penulis berharap supaya tulisan yang singkat ini kiranya dapat bermanfaat bagi pembaca dan bermanfaat untuk penelitian yang lebih lanjut.

Surabaya, Mei 2003

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
Halaman Judul.....	i
Lembar Persetujuan.....	ii
Abstrak.....	iii
Ucapan Terima Kasih.....	iv
Daftar Isi.....	vi
Daftar Gambar.....	viii
Daftar Lampiran.....	ix
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang Penelitian.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat penelitian.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Morfologi.....	4
2.2 Klasifikasi.....	5
2.3 Siklus Hidup.....	6
2.4 Patogenesa.....	7
2.5 Gejala Klinis.....	7
2.6 Diagnosa.....	8
2.7 Pengendalian.....	8
2.8 Respon Imun.....	9

BAB III	METODE PENELITIAN	
3.1	Waktu dan Tempat Penelitian.....	11
3.2	Alat dan Bahan.....	11
3.3	Metode Penelitian.....	12
BAB IV	HASIL PENELITIAN.....	14
BAB V	PEMBAHASAN.....	15
BAB VI	KESIMPULAN DAN SARAN.....	18
	RINGKASAN.....	19
	DAFTAR PUSTAKA.....	21
	LAMPIRAN.....	24

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
1. Hasil Fraksinasi Whole Protein cacing <i>H. contortus</i> Dengan SDS-PAGE.....	14

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Kurva Hubungan RF dengan Log. BM Protein Standard.....	24
2. Cara kerja SDS-PAGE 12%.....	27
3. Gambar cacing <i>H. contortus</i> jantan dan betina.....	30

BAB I
PENDAHULUAN

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Penelitian

Ternak ruminantia khususnya kambing dan domba merupakan hewan ternak yang mudah berkembang biak, sehingga sangat potensial untuk dikembangkan di pedesaan. Ternak tersebut punya arti strategis yang penting dalam pemenuhan kebutuhan protein hewani. Salah satu hambatan yang perlu diperhitungkan dalam usaha ini adalah adanya infeksi parasit.

Infeksi parasit yang sering muncul adalah penyakit cacing. Cacing saluran pencernaan menyebabkan kerugian produksi. Kerugian itu diantaranya penurunan berat badan, penurunan produksi susu, daging, kualitas kulit, wool dan terhambatnya pertumbuhan hewan muda baik secara kuantitatif dan kualitatif serta kematian ternak. Banyak faktor yang mempengaruhi penyebaran parasit cacing antara lain keadaan iklim, manajemen, lingkungan dan pakan. Jumlah ternak ruminantia kecil di Indonesia sekitar 126 juta ekor dimana 25% pendapatan berasal dari sumber tersebut. (Knox, 1990)

Salah satu faktor utama dalam mortalitas dan penurunan produksi ternak adalah parasit Nematoda gastrointestinal khususnya cacing *Haemonchus contortus*. Cacing ini merupakan parasit yang patogenik, luas penyebarannya dan tingkat infeksi dapat mencapai 80%. Iklim Indonesia adalah tropis basah maka sangat menguntungkan hidup cacing dan mempermudah penularannya.

Cara mendiagnosa Haemonchosis secara tepat masih harus dilakukan dengan cara lama yaitu dengan pemeriksaan feses dengan metode apung, nekropsis dan dilanjutkan dengan cara pemupukan tinja untuk mengidentifikasi stadium larva sehingga bisa ditentukan spesiesnya, cara seperti ini memakan waktu yang lama dan hasilnya kurang memuaskan. Diagnosis secara serologis untuk menentukan spesies secara tepat dan cepat sampai saat ini di Indonesia belum ada laporan.

Parasit cacing memiliki kemampuan genetika untuk mengembangkan sifat kebal terhadap anthelmetik sehingga menimbulkan “drug resistant” (Molento dan Prichard, 1999^a dan Molento *et al*, 1999^b; Zayac, 2000). Sejak tahun 1995 di Indonesia telah diteliti bahwa *Haemonchus contortus* pada domba resisten dengan benzimidazol (Chandrawathani *et al*, 1999). Hal ini terjadi karena seringkali obat yang dipakai tidak pada sasaran yang tepat hanya pada permukaan mukosa sedangkan habitat *H. contortus* menembus lapisan mukosa

Banyak penelitian yang mengarah ke vaksin molekular untuk mengantisipasi problem yang ditimbulkan oleh cacing. Penelitian yang dilakukan menggunakan antigen dari produk ekskresi untuk pengembangan vaksin seperti penggunaan antigen dari produk ekskresi dan sekresi cacing *H. contortus* mengandung protein yang imunogenik dengan berat molekul 15 dan 24 kDa (Kodyman *et al*, 2000).

Protein cacing *H. contortus* berasal dari sel somatik, kutikula, intestine, uterus, dan sekresi-ekskresi. Menurut Kodyman *et al* (2000) antigen dari produk ekskresi-sekresi cacing *H. contortus* yang mengandung protein 15 dan 24 kDa

merupakan protein yang sangat imunogenik. Dalam penelitian Lastuti dkk (2001) melaporkan ada 7 fraksi protein yang dominan dari 13 fraksi protein yang didapatkan pada intestine *H. contortus*.

1.2 Rumusan masalah

Berdasarkan permasalahan tersebut diatas dapat dirumuskan :

Berapa banyak fraksi whole protein cacing *Haemonchus contortus* dewasa dan berapa besar berat molekulnya .

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan fraksi-fraksi protein yang dinyatakan dalam berat molekul dan yang nantinya akan digunakan untuk penelitian biologi molekuler untuk pembuatan bahan diagnostik dan vaksin.

1.4 Manfaat Penelitian

Diharapkan penelitian ini dapat memberikan informasi ilmiah hasil fraksi-fraksi protein yang dapat menunjang penanggulangan Haemonchosis, dan dapat memberikan landasan ilmiah yang kuat dalam penelitian biologi molekuler untuk pengembangan metode diagnostik dan pembuatan vaksin dalam pencegahan Haemonchosis.

BAB II
TINJAUAN PUSTAKA

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Morfologi

Haemonchosis adalah suatu penyakit cacing dari genus *Haemonchus* yang menyerang ruminan terutama kambing dan domba. Cacing ini habitatnya pada abomasum sehingga sering disebut “stomach worm” (cacing lambung), “barber pole worm” atau “ Twisted wire worm “, cacing kawat. Nama contortus diberikan karena cacing betina terlihat intestin berwarna merah terbelit oleh uterus yang berwarna putih berselang-seling yang melingkar sepanjang tubuhnya. Kepalanya kecil, rongga mulutnya hanya merupakan celah yang dilengkapi dengan sebuah lancet dorsal. Bursa kapulatorik terdiri dari dua lobus lateral yang simetris dan satu lobus dorsal yang tidak simetris. Lobus dorsal ditunjang oleh jari-jari yang berbentuk huruf Y. Vulva ditutup dengan gelambir yang bentuknya seperti lidah di sebut “vulvar flup”, letaknya 3-4 mm dari ujung posterior (Soulsby,1986).

Cacing jantan dan betina dapat dibedakan dengan melihat warna dan morfologi tubuhnya. Cacing jantan memiliki ukuran 19-22 mm dan cacing betina berukuran 25-34 mm. Cacing jantan mempunyai spikula dan bursa kopulatrik. Telurnya berukuran panjang 62-90 mikron dan lebar 39-50 mikron. Telur dikeluarkan bersama tinja inangnya sudah mengandung embrio yang berisi 16-31 sel. Cacing jantan mempunyai bursa copulatrik besar, lobus lateral memanjang, raysnya silindris. Lobus dorsalis kecil terletak asimetris terhadap lobus lateral sinistra dan

ditopang oleh rays yang berbentuk huruf “Y”. Panjang spikula cacing jantan 0,46-0,50 mm yang masing-masing dilengkapi dengan duri kecil pada ujungnya. Cacing betina mempunyai ciri khas yaitu adanya warna selang seling merah putih, selain itu juga didapatkan bentukan “vulvar flap” yaitu vulva yang ditutupi oleh tonjolan bibir yang biasanya besar dan sangat menonjol tetapi dapat pula mengecil seperti sebuah titik (Sri Subekti dkk,2000).

Penyebaran penyakit melalui padang penggembalaan yaitu melalui rumput yang terkontaminasi larva infeksi stadium III (L3), dimana larva tersebut sangat tahan terhadap lingkungan luar dengan temperatur diatas 10°C dengan curah hujan diatas 50 mm per bulan (Soulsby,1986).

2.6 Klasifikasi

Taksonomi dari *H. Contortus* menurut Urquhart et al (1988) adalah sebagai berikut:

Phyllum	:	Nemanthelminthes
Class	:	Nematoda
Ordo	:	Strongylida
SuperFamili	:	Trichostrongyloidea
Famili	:	Trichostronglidae
Genus	:	<i>Haemonchus</i>
Spesies	:	<i>Haemonchus contortus</i>

2.3 Siklus Hidup

Telur dikeluarkan bersama tinja induk semang yang berembrio, selanjutnya dimulai stadium bebas dari parasit tersebut, kemudian menetas menjadi larva stadium I dalam waktu 14 sampai 19 jam dengan kondisi optimal. Larva I akan berkembang menjadi larva stadium II pada suhu 25-26°C, waktu kurang lebih 4 hari mengalami moulting sebanyak dua kali dan menjadi larva stadium III yang sudah infeksi. Larva infeksi mempunyai selubung dan ekor yang cukup panjang serta bergerak aktif dan tahan terhadap kekeringan dan pembekuan (Sri Subekti dkk,2000).

Kehidupan parasit di luar tubuh hewan ternak sangat dipengaruhi cuaca, saat udara lembab dan hangat sangat membantu larva infeksi naik ke daun rumput. kejadian infeksi pada pagi hari lebih besar daripada sore hari. Penularan secara peroral oleh karena termakannya larva infeksi bersama rumput, larva yang tertelan oleh kambing atau domba masuk saluran pencernaan (abomasum), mengalami perkembangan lebih lanjut menjadi larva stadium IV dan dalam waktu dua hari setelah larva menuju ke lamina propria selaput lendir abomasum dan larva mulai menghisap darah induk semang. Larva menjadi dewasa dalam waktu lebih kurang 18 hari, setelah hari ke 18 sampai 21 pasca infeksi telur yang berembrio mulai dikeluarkan oleh induk semang bersama kotoran (Soulsby,1986)

2.4 Patogenesis

Patogenitas haemonchosis tergantung jumlah larva yang menginfeksi, cacing dewasa dan toksin yang dihasilkan. Cacing Nematoda ini pada saluran pencernaan kambing dan domba dapat menyebabkan kerusakan pada dinding abomasum dan usus halus dengan cara memasukkan dorsal lancetnya untuk menghisap darah. Cacing ini juga mengeluarkan zat anti pembekuan darah dalam luka yang ditimbulkan, sehingga mukosa tersebut menjadi terinfeksi.

Kerugian yang ditimbulkan selain kematian pada infeksi hiperakut dengan menelan larva infeksi dalam jumlah besar, juga terhambatnya pertumbuhan dan produksi karena sifat cacing adalah menghisap darah akibatnya terjadi anemia hemorrhagic yang ditandai adanya penurunan jumlah eritrosit dan PCV. Berdasar percobaan dikemukakan bahwa domba yang terinfeksi ringan oleh *Haemonchus* dapat kehilangan darah sekitar 0,6 liter setiap minggu. Kematian juga disebabkan oleh toksin yang dihasilkan cacing. Infeksi khronis dapat berjalan lama karena masih adanya sejumlah cacing juga disertai nutrisi yang jelek yang berakibat penurunan berat badan disertai penurunan serum protein sehingga tidak tersedianya asam amino yang diperlukan untuk sintesa baik dalam plasma maupun haemoglobin. (Colin, 1999)

2.5 Gejala Klinis

Gejala klinis *H. Contortus* terbagi dalam 2 bentuk yaitu akut dan kronis, tetapi sebagian besar kronis. Menurut Sood (1981) yang dikutip oleh Heryanto

(2000) adanya infeksi cacing ini akan mengganggu pencernaan dan absorpsi protein, kalsium dan fosfor, meningkatkan keasaman lambung dan abomasitis, sehingga domba akan menderita hipoproteinemia. Haemonchosis yang kronis ditandai dengan kekurusan dan pertumbuhan yang lambat serta produksi yang menurun, anemia, terlihat suatu pembengkakan yang oedematus yang disebut "Bottle Jaw" atau "Wateri Poke", hewan cepat sekali menjadi lemah dan langkahnya sempoyongan. Haemonchosis yang akut terjadi anemia secara cepat dan hewan mati tanpa menunjukkan gejala yang lain selain hydraemia (Sri Subekti dkk,2000).

2.6 Diagnosa

Diagnosis adanya cacing *H. contortus* dengan melihat tanda-tanda klinisnya, untuk diagnosa lebih lanjut dengan pemeriksaan feses hanya dapat melihat cacing kelompok Trichostrongilidae dan untuk menentukan spesies yang tepat dengan pemupukan larva sehingga didapatkan penyebab yang lebih jelas, tetapi proses ini memakan waktu yang lama (Levine,1990).

2.7. Pengendalian

Agar ternak ruminan tidak terkena haemonchiosis maka pencegahan perlu dilakukan yaitu dengan pemberian pakan yang memenuhi nutrisi hewan, melakukan rotasi padang penggembalaan, dengan cara ini dapat memutuskan siklus hidup parasit, karena anak ruminan masih rawan terkena penyakit maka

harus segera dipindahkan dari induknya dan diberi tempat untuk merumput yang lebih bersih. Selain pencegahan yang diatas, tanah yang lembab juga dapat menyebabkan penyakit parasit lebih mudah berkembang. Selain itu pemberian obat cacing yang dicampur dengan makanan dapat mencegah untuk sementara waktu. Usaha pengendalian yang lain dapat dengan vaksinasi untuk anak kambing dan domba dengan larva *Haemonchus*. Telah dilaporkan bahwa pengendalian *H. contortus* dengan vaksinasi produk ekskresi-sekresi yang mengandung protein 15 dan 24 kDa dapat menstimulir IgE tetapi tidak menstimulir IgG1 (Kodyman, *et al.*,2000).

2.8 Respon Imun

Kambing dan domba yang mengalami infeksi haemonchosis, biasanya menunjukkan reaksi pertahanan tubuh yang disebut *self cure reaction* atau *self cure protection*. Hal ini dibuktikan dengan adanya penurunan populasi *Haemonchus* di abomasum pada hari kesepuluh sampai empat belas, diduga dikarenakan timbulnya kekebalan dari induk semang. Kekebalan induk semang di dalam menahan haemonchosis tergantung berbagai faktor seperti hubungan antigen dengan larva cacing, dimana lokasi larva menginfeksi (Soulsby,1986).

Antigen adalah bahan yang dapat merangsang respon imun atau bahan yang dapat bereaksi dengan antibodi yang sudah ada (Karnen, 2000), yang secara umum dapat didefinisikan sebagai substansi yang dapat dikenali sebagai benda asing oleh sistem imun tubuh. Antigen yang berasal dari parasit akan menjadi

imunogen apabila dikenali sebagai benda asing dalam berat molekul tertentu. Secara kimiawi zat imunogen parasit dapat berupa protein, karbohidrat, glikoprotein dan glikolipida. Masing-masing komponen kimiawi tersebut mempunyai karakteristik ukuran, susunan rantai dan jumlah determinan yang mungkin berbeda (Anders,1982, dikutip oleh Kusnoto,2002)

Berbagai jenis antigen yang berasal dari parasit dapat dirinci berdasarkan sumber dan lokasi parasit maupun populasi dan siklus hidup parasit. Berdasarkan sumber dan lokasi parasit terdiri dari: 1) exoantigen terlarut, berasal dari parasit hidup atau parasit dalam media buatan; 2) somatik antigen terlarut, berasal dari cacing stadium dewasa atau larva yang hancur atau dari sel permukaan tubuh parasit; 3) parasit yang mati atau fragmen-fragmen tubuhnya; 4) parasit yang hidup secara utuh; 5) cairan tubuh nematoda; 6) cairan larva cacing pita. Adapun berdasarkan stadium dan siklus hidup parasit terdiri dari: 1) spesifikasi genus, spesies, strain dan stadium hidup; dan 2) parasit yang mengalami perubahan bentuk (el-Massry,1999; Page *et al.*,1991; Tizard,1982).

Banyak antigen cacing lebih merangsang produksi Ig E walaupun produksi Ig E dan alergi yang disebabkan dianggap oleh sebagian orang sebagai sesuatu yang mengganggu, kenyataannya bermanfaat untuk pengendalian jumlah cacing. Cacing yang berada dalam selaput lendir usus dan abomasum mengeluarkan antigen selama ekdisis ketiga yang berlaku sebagai alergen (Tizard,1982).

Pada stadium dewasa yang paling sering digunakan adalah ekskresi-sekresi antigen, disamping itu ada juga beberapa sumber antigen yang dipakai,

misalnya antigen somatik (el-Massry,1999), *surface antigen* (Kennedy *et al.*, 1987;Bowman *et al.*,1987 dikutip oleh Pratiwi, 1998), dan ekstrak cacing dewasa (Abdel-Rahman and Megeed, 2000; Safar *et al.*,1992).

BAB III

METODE PENELITIAN

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan mulai bulan Juni 2002 dan berakhir bulan November 2002. Sampel cacing *H. contortus* diambil di Rumah Potong Hewan Pegirikan Surabaya. Penelitian dilakukan di Laboratorium Entomologi dan Protozologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dan Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas kedokteran Hewan Universitas Airlangga .

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat-Alat Penelitian

Elektroforesis whole protein dengan SDS-PAGE dan isolasi identifikasi meliputi peralatan utama elektroforesis lengkap dengan pengatur voltase, mikropipet, pipet tip, *shaker*, *water bath*, peralatan gelas lainnya, mikroskop, cawan Petri, bak, stir berkait, *falcon*, *eppendorf* dan peralatan penunjang lainnya.

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan yaitu cacing *H. contortus* betina dewasa. Bahan kimia yang diperlukan antara lain: Acrylamid, Tris HCl pH8,8 , Tris HCl pH 6,8 , SDS 0,5 %, Aquadest, Temed, APS 10 % 4°C, E buffer, Methanol 50 %, Methanol 5 %, Acetic acid/asam asetat 7,5 %, Glutaraldehyd 10 %, NaOH 0,36 %, NH₃, AgNO₃, Zitronensourc 5 %, Butanol.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Kultivasi dan Isolasi *H. contortus* invitro

Menurut Soulsby (1986) identifikasi cacing *H. contortus* jantan dan betina secara makroskopis dengan membedakan adanya bursa kopulatorik dan vulvar flap. Sebanyak ± 100 ekor cacing *H. contortus* betina dewasa diisolasi dari abomasum domba dan kambing yang dipotong di RPH Surabaya, kemudian dilakukan pencucian dengan Phosphat Buffer Saline (PBS) sampai bersih dari kotoran abomasum. Cacing diinkubasi dalam 10 ml Phosphat Buffer Saline (PBS) pada cawan petri dengan temperatur 37°C selama semalam.

3.2.2 Pembuatan Protein whole dari cacing *H. contortus* dewasa

Ekstraksi protein dilakukan dengan tehnik Sonikasi, cacing *H. contortus* betina dewasa yang sudah dicuci dengan PBS disentrifugasi dengan kecepatan 16.000 rpm selama 5 menit dan supernatan dibuang. Pelet dicuci dengan PBS sebanyak dua kali dan kemudian disonikasi selama 30 menit pada 45 W, kemudian disentrifugasi 16.000 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil dan siap digunakan untuk proses selanjutnya (Axelsen, 1983).

3.2.3 Karakterisasi Protein

3.2.3.1 Elektroforesis Protein Ekskresi-Sekresi dengan SDS - PAGE

Bahan yang diperlukan disiapkan kemudian dibuat running gel dan dimasukkan ke dalam plate kaca, setelah mengeras pada bagian atasnya dimasukkan stacking gel yang telah dipersiapkan. Sebanyak 10µg sampel protein ditambah *lamely buffers* dengan perbandingan 2:1 dilakukan perebusan pada 100°C selama 5 menit. Setelah dilakukan perebusan dimasukkan ke dalam ke lubang pada stacking gel yang tersedia dan dilakukan *running* dengan 100 volt, 40 mA pada *chamber* yang telah diisi *Electrode Buffer* 1X. Setelah *running*, gel dimasukkan ke larutan pencuci. Setelah dicuci gel diwarnai dengan AgNO₃ selama 15 menit dengan sambil digoyang, kemudian dilakukan pencucian dengan aquades 100 ml sebanyak dua kali selama 2 menit, kemudian diberikan larutan pengembangan warna. Setelah pita protein terlihat maka dapat dihentikan dengan penambahan asam acetat 10%, kemudian dicuci dengan aquades 100 ml sebanyak dua kali. Hasil gel yang telah tampak disimpan dalam larutan gliserol 10% (Meyer, 1987). Penghitungan berat molekul dilakukan dengan membandingkan standart marker.

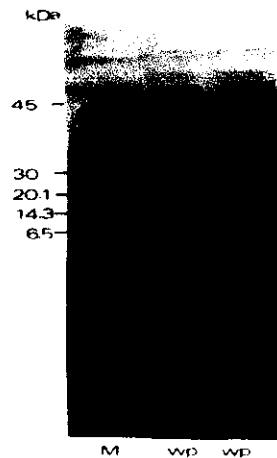
BAB IV

HASIL PENELITIAN

BAB IV

HASIL PENELITIAN

Pada penelitian untuk mengidentifikasi fraksi whole protein cacing *Haemonchus contortus*, telah dilakukan analisis dengan tehnik SDS-PAGE sehingga didapatkan hasil yang dinyatakan dalam berat molekul yaitu: 49,0 kDa; 47,1 kDa; 35,7 kDa; 30,1 kDa; 25,3 kDa; 23,4 kDa; 18,6 kDa; 16,7 kDa; 14,8 kDa.



Gambar 1 : Hasil fraksinasi whole protein cacing *H. contortus* dengan SDS-PAGE

Keterangan: M = marker
Wp = whole protein

BAB V

PEMBAHASAN

BAB V

PEMBAHASAN

Elektroforesis dengan Acrylamid (PAGE) merupakan metode standard untuk memisahkan, identifikasi, karakterisasi dan purifikasi dari molekul DNA/RNA. Teknik ini lazim digunakan karena sederhana, murah, sampel yang digunakan relatif sedikit, serta lokasi DNA tersebut dapat langsung diamati dengan menggunakan Perak Nitrat sebagai zat warna. Pemisahan protein dengan menggunakan SDS-PAGE bertujuan menentukan jumlah relatif dari protein dalam sampel yang dinyatakan dalam berat molekul dan dalam fraksi apa saja protein tersebut dapat ditemukan.

Prinsip dasar metode SDS-PAGE ini adalah denaturasi protein oleh sodium dodecyl sulphate dilanjutkan dengan separasi molekul berdasarkan berat molekulnya dengan metode elektroforesis yang menggunakan gel, dalam hal ini yang digunakan adalah polyacrylamide. Metode ini dapat mengikat atau mendeteksi protein berdasarkan berat molekulnya tetapi tidak spesifik terhadap jenis protein tertentu.

Zat lain yang digunakan dalam elektroforesis adalah Temed sebagai inisiator terjadinya polimerisasi, dan APS sebagai katalisator. Pemberian Temed dan APS harus disesuaikan dengan kebutuhan karena apabila terlalu banyak selain dapat menyebabkan teroksidasinya protein, juga dapat menyebabkan perubahan pada buffer, sedangkan untuk pemakaian APS yang terlalu sedikit dapat

memperlambat reaksi sehingga polimerasi akan berjalan lambat, selain itu pemilihan konsentrasi gel yang tepat menentukan keberhasilan pemisahan fraksi protein karena konsentrasi gel menentukan besar pori-pori matriks gel, makin tinggi konsentrasi gel maka pori yang terbentuk semakin kecil. Pemakaian *lamely buffer* dalam penelitian ini bertujuan agar fraksi protein cacing *H. contortus* saat di running dapat terpisah dengan sempurna. Pencucian dengan E buffer bertujuan untuk menghantarkan listrik agar cairan sampel dapat turun ke bawah. Pemberian asam asetat diperlukan untuk menghentikan reaksi agar pewarnaan tidak terlalu gelap sehingga dapat terbaca.

Hasil elektroforesis dengan SDS-PAGE didapatkan beberapa fraksi protein *H. contortus* dewasa, yaitu: 49,0 kDa; 47,1 kDa; 35,7 kDa; 30,1 kDa; 25,3 kDa; 23,4 kDa; 18,6 kDa; 16,7 kDa dan 14,8 kDa. Protein-protein tersebut kemungkinan berasal dari sel somatik tubuh cacing, intestine cacing, hasil metabolisme cacing, dan hasil ekskresi-sekresi cacing.

Menurut penelitian yang telah dilakukan oleh Lastuti dkk (2001) terhadap intestine *H. contortus*, didapatkan 13 fraksi protein yaitu: 46 kDa; 41,2 kDa; 36 kDa; 27,4 kDa; 24 kDa; 19,6 kDa; 14,9 kDa; 11,4 kDa; 9 kDa; 7 kDa; 4 kDa; 3,8 kDa dan 3,6 kDa, dan yang dominan adalah: 19,6 kDa; 14,9 kDa; 11,4 kDa; 9 kDa; 4 kDa; 3,8 kDa; 3,6 kDa. Dari hasil penelitian ini dapat dikatakan bahwa kemungkinan fraksi protein 47,1 kDa; 35,7 kDa; 25,3 kDa; 23,4 kDa; 18,6 kDa; 14,8 kDa berasal dari intestine cacing *H. contortus*. Fraksi protein 35,7 kDa disamping merupakan protein intestine juga merupakan protein capthesin B-like

proteinase, hal tersebut dilaporkan oleh Skuce *et al.*(1999) yang telah mengklon protein 35 kDa sebagai protein cathepsin B-like cystein proteinase

Kodyman *et al.*(2000) telah meneliti keberadaan protein 15 kDa dan 24 kDa hasil sekresi-ekskresi *H. contortus* dapat digunakan sebagai vaksin pada domba. Dari hasil tersebut dapat kita simpulkan bahwa protein 25,3 kDa; 23,4 kDa; 16,7 kDa; 14,8 kDa kemungkinan berasal dari sekresi-ekskresi cacing *H. contortus*.

Hasil fraksinasi protein cacing *H. contortus* didapatkan beberapa pita yang tercatat tebal yaitu: 47,1 kDa; 30,1 kDa; 23,4 kDa; 16,7 kDa. Tebal atau tipisnya pita yang didapat merupakan gambaran ekspresi suatu protein oleh gen penghasil protein tersebut. Semakin tebal pita protein, semakin banyak protein yang diekspresikan oleh gen tersebut (Lastuti, 2001).

Hasil elektroforesis pada gambar terlihat kurang jelas dan masih didapatkan smear, hal ini terjadi karena protein yang dipakai belum dilakukan pemurnian, kemungkinan masih ada fraksi protein yang belum tampak selain yang diatas.

Dari hasil penelitian diatas perlu dilakukan uji lanjutan seperti immunoblotting, diharapkan protein yang bersifat imunogenik dapat dikembangkan lebih lanjut untuk pengembangan bahan diagnostik atau vaksin.

Protein dengan berat molekul yang lebih besar kemungkinan bersifat lebih imunogenik dan dapat digunakan sebagai antigen, tetapi tidak menutup kemungkinan bahwa yang tipis dapat bersifat imunogenik. Tizard (1982) menyatakan bahwa salah satu faktor yang menentukan antigenitas suatu zat

adalah besar molekul, struktur molekul. Menurut Bellanti (1993) zat yang imunogenik selalu antigenik, tetapi antigen tidak selalu imunogenik.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil fraksinasi whole protein cacing *H. contortus* dengan metode SDS-PAGE didapatkan 9 fraksi protein yaitu: 49,0 kDa; 47,1 kDa; 35,7 kDa; 30,1 kDa; 25,3 kDa; 23,4 kDa; 18,6 kDa; 16,7 kDa; 14,8 kDa. Fraksi protein cacing *H. contortus* yang tercatat tebal adalah: 30,1 kDa.

6.2 Saran

Saran yang dapat disampaikan dari hasil penelitian diatas adalah perlunya dilakukan pemurnian protein dan perlu penelitian lebih lanjut dengan imunobloting untuk mengetahui protein yang antigenik .

RINGKASAN

Haemonchiosis merupakan salah satu penyakit parasit yang banyak menyerang ruminant khususnya kambing dan domba. Upaya pengobatan yang banyak dilakukan belakangan ini masih memakai cara yang konvensional, hal ini dapat menyebabkan *drug resistance* dan cacing yang ingin diberantas tidak tercapai. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan fraksi protein yang terkandung dalam cacing *H. contortus* yang dinyatakan dalam berat molekul dan yang nantinya akan digunakan untuk penelitian biologi molekuler untuk pembuatan bahan diagnostik dan vaksin.

Cacing *H. contortus* sebanyak ± 100 ekor diisolasi dari abomasum kambing dan domba yang didapat dari RPH Surabaya, kemudian dicuci dengan PBS sampai bersih. Cacing diinkubasi semalam dengan temperature 37°C. Ekstraksi protein dilakukan dengan sonikasi. Identifikasi fraksi whole protein *H. contortus* dilakukan dengan metode Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE), yang kemudian dinyatakan dalam berat molekul.

Hasil penelitian didapatkan 9 fraksi protein yaitu: 49,0 kDa; 47,1 kDa; 35,7 kDa; 30,1 kDa; 25,3 kDa; 23,4 kDa; 18,6 kDa; 16,7 kDa; 14,8 kDa. Protein-protein tersebut dapat berasal dari somatik tubuh cacing, intestine cacing,

ekskresi-sekresi cacing, kutikula cacing, ovarium cacing. Dari hasil fraksinasi tersebut terdapat pita yang tercat tebal yaitu: 30,1 kDa. Pada penelitian ini perlu dilanjutkan dengan imunobloting untuk mengetahui protein yang imunogenik yang nantinya akan digunakan sebagai bahan diagnostik dan vaksin

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas AK, Litcman AH, Prober JS. 2000 . Cellular and Mollecular Immunology. 4th ed. Saunders company. Philadhelpia
- Abdel-Rahman EH, and Abdel-Megeed KN. 2000. Molecular Identity of major cross reactive adult antigens in *Fasciola gigantica*, *Toxocara vitulorum* and *Moniezia expansa*. Abstrak. J. Egyp. Soc. Parasitol. 30 (2): 561-71
- Artama, Wayan.T. 1991. Rekayasa Genetika. PAU – Bioteknologi Universitas Airlangga Gajah Mada. Yogyakarta
- Axelsen, N.H. 1983. Handbook of Immunoprecipitation in Gel Techniques. Blackwell Scientific Publications. Australia
- Baratawidjaya, K.G. 2000. Imunologi Dasar. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta
- Bellanti. 1993. Immonologi III (Terjemahan). Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Bowman, D. O. 1995 . Parasitology for Vetenaries. W. B. Saunders company. Philadelphia. 166-167
- Chandrawathani, P., M. Adnan., and P.J waller. 1999. Anthelmintic Resistance in sheep and goat farm on Peninsullar Malaysia. Vet. Parasitol. May;82(4): 305-310.
- El-Massry AA.1999. Characterization of antigenic property of *Toxocara canis* and *Toxocara leonine* adults and larvae through immunodiagnostic electrophoresis (SDS-PAGE) and western blot technique. J. Egyp. Soc. Parasitol; 29 (2): 335-45
- 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.
- Heryanto,A., Enuh Raharjo, Rosmelati Situmeang, Sukardji Partodihardjo dan Gatot Adiwino. 2000. tanggap Kebal Domba terhadap Vaksinasi Larva Tiga (L3) cacing *Haemonchus contortus* Iradiasi 500 Gy (uji lapang). Buletin Veterinaria Farma. II (9): 11-17
- Johnstone, C.1999. Parasites and Parasitic Disease of DomesticAnimal.University of Pensylvania. June,28.

- Knox, M.R. 1990. Future prospects for controlling parasitic gastrointestinal Nematodes in small ruminants in Indonesia. *Majalah Parasitologi Indonesia*, vol.3 (edisi khusus): 85-89.
- Kodyman, F.N., H.D. Scallig., M.A. Vanleuwen., S. Mackellar., 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.* Jan;22(1):13-20.
- Kusumamihardja, S. 1993. Parasit dan Parasitosis pada Hewan Ternak dan Hewan Piaraan di Indonesia. Pusat antar Universitas Bioteknologi Institut Pertanian Bogor.137-139
- Lastuti, N.D.R., Mufasirin, B. Aksono. 2001. Profil Protein Intestine *H. contortus* Dewasa. Lemlit, Universitas Airlangga. Surabaya.
- Levine. 1990. Parasitologi Veteriner. Diterjemahkan oleh Gatot Ashadi. Gajah Mada University Press. Yogyakarta
- Lopez de Mendoza, M.E., Durtis, R.H., Gowen, S. 1999. Identification and Characterization of Excreted-secreted Products and Surface Coat Antigens of Animal and plant Parasitic Nematodes. *Parasitology.* Apr; 118(Pt4):397-405
- Meyer, R.J. and J.H. Walkers . 1987. Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology. Academic Press Inc. Harcourtbrace Jovanich Publisher. 1-95
- Molento, M.B., Prichard, R.K. 1999^a. Effect of Multidrug Resistance Reversing Agents Verapamil and C1 347,099 on The Efficacy of Ivermectin against unselected and drug selected Strains of *H. contortus* in Jirds. *Parasitol. Res. Des*;85(12):1007-10011
-, Wang, G.T., Prichard, R.K. 1999^b. Decresed Ivermectin and Moxidectin Sensitivity in *Haemonchus contortus* Selected with Moxidectin Over 14 Generations. *Vet. Parasitol.* Sept. 15., 86(1):77-81
- Page AP, Richards DT, Lewis JW, Omar HM and Maicel RM. 1991. Comparison of isolate and spesies of *Toxocara* and *Toxocaris* by biosynthetic labeling of somatic and ES protein from infeksi larva. *J. parasitol.* 103 : 261-265
- Pratiwi T. 1998. Penentuan protein imunogen larva *Toxocara vitulorum* sebagai usaha menemukan metode imunodiagnosis dini toxocariasis pada induk sapi. Disertasi Program Pascasarjana Universitas Airlangga
- Roitt, I. 1997. Essensial Immunology. 9th Ed. Blackwell Science. Australia

- Rehman A, Jasmer DP. A tissue specific approach for analysis of membrane and secreted protein antigens from *H. contortus* gut and its application to diverse nematodes species. *Mol Biochem Parasitol* 1998;97:55-68
- Safar, E.H, el-Rifaei, and Maklad, K.M. 1992. Protein chromatographic study on adult *Ascaris lumbricoides*, *Ascaris vitulorum* and *Toxocara canis*. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 22(1) : 171-6
- Schalling, H.D.F.H., van Leewen, M.A.W., Verstrepen, B., E., Cornelissen A.W.C.A. Molecular characterization and expression of two putative protective excretory secretory proteins of *H. contortus*. *Mol Biochem Parasitol* 1997;88:203-213
- 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 host protective extract from *Haemonchus contortus*. *Parasitology*, Oct: 119 (Pt4): 405-412
- Soulsby, E.J.L 1986. *Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animal*. 7th Ed. Bailliere Tindall. London.
- Sri Subekti, Setiawan Koesdarto, Sri Mumpuni, Halimah Puspitawati, dan Kusnoto, 2000. *Diktat Kuliah Ilmu Penyakit Nematoda Veteriner*. Fakultas Kedokteran hewan Universitas Airlangga Surabaya
- Tizzard, I.R. 1982. *An Introduction to Veterinary Immunology*. 2nd Ed. W.B. Saunders Company. Ontario, Canada.
- Urquhart, G.M., Armour, J., Duncan, J.L., Dunn, A.M. and Jennings, F.W. 1988. *Veterinary Parasitology*. Longman Scientific & Technical. London
- Zajac, A.M., Gipson, T.A. 2000. Multiple Anthelmintic Resistance in Goat Herd. *Vet. Parasitol.* Jan. 87(2-3): 163-172

LAMPIRAN

Kurva Hubungan RF dengan Log.BM Protein Standard

- **RF = Jarak band dari sumuran / Panjang gel sesudah di running**

- **Marker**

Panjang gel sesudah di running = 12

1. Protein 45 kDa → RF = $1,45 / 12$ = 0,12
2. Protein 30 kDa → RF = $3,5 / 12$ = 0,30
3. Protein 20,1 kDa → RF = $4,5 / 12$ = 0,38
4. Protein 14,3 kDa → RF = $5,0 / 12$ = 0,42
5. Protein 6,5 kDa → RF = $6,5 / 12$ = 0,54

Sumuran I :

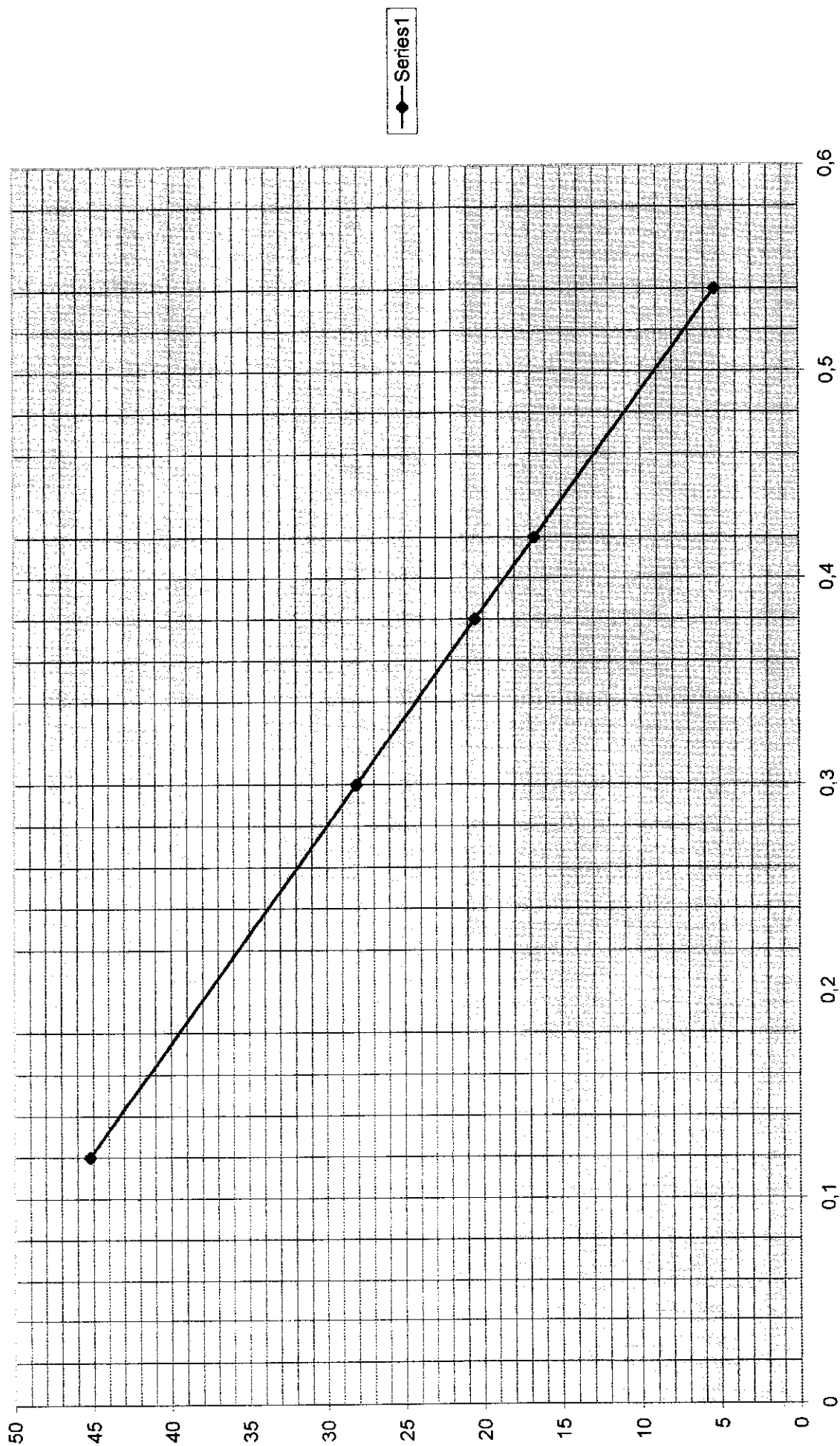
1. RF = $1 / 12$ = 0,08
2. RF = $1,25 / 12$ = 0,10
3. RF = $2,6 / 12$ = 0,22
4. RF = $3,2 / 12$ = 0,27
5. RF = $4 / 12$ = 0,33
6. RF = $4,25 / 12$ = 0,35
7. RF = $4,7 / 12$ = 0,40
8. RF = $5 / 12$ = 0,42
9. RF = $5,3 / 12$ = 0,44

- Dari data yang didapatkan pada marker, dimasukkan pada persamaan linier dimana koefisien X = Rf marker dan Y = Protein marker (kD)

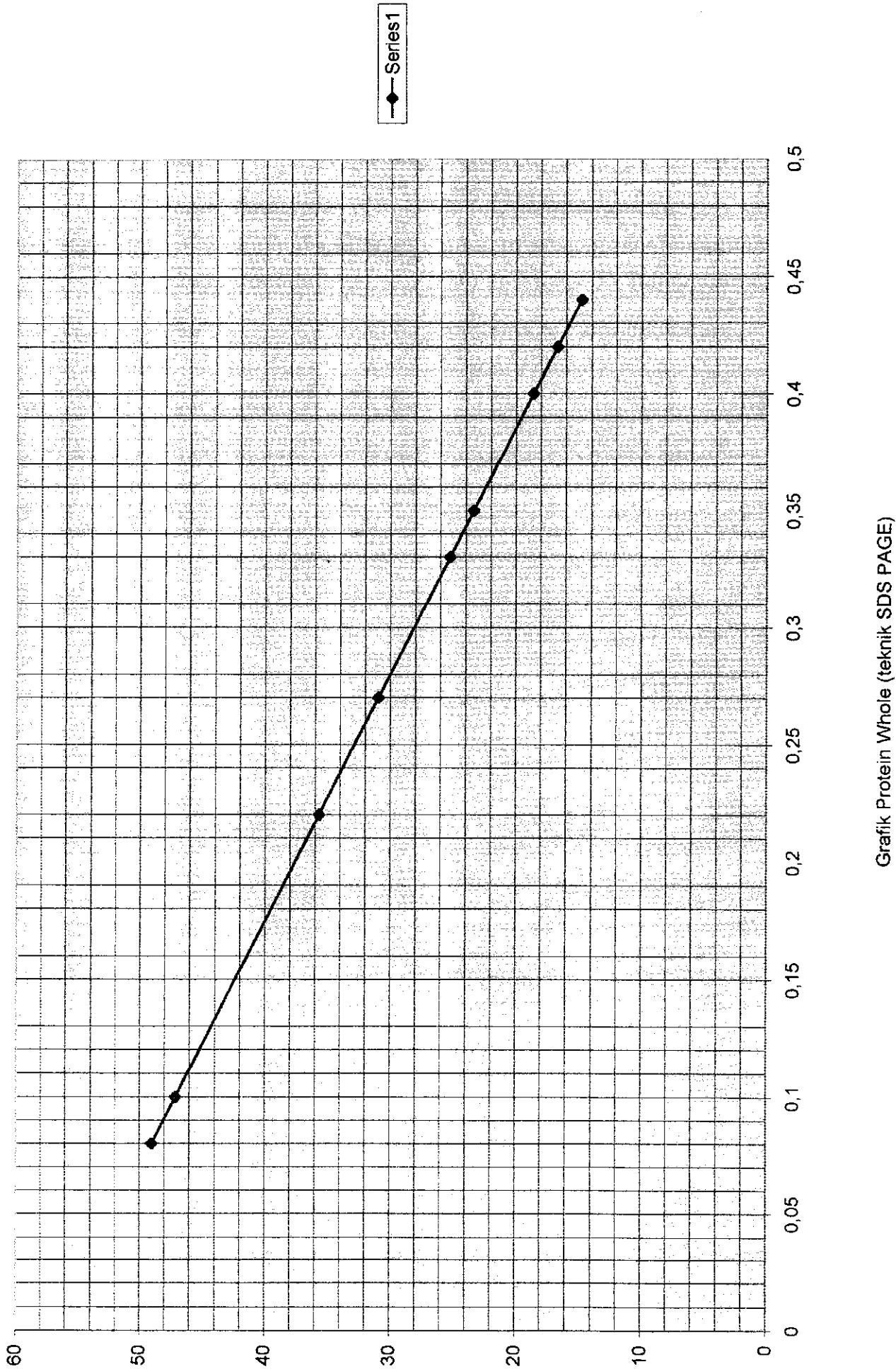
→ didapatkan persamaan : $Y = 56,624 - 95,012 X$

Hasil :

1. 49,0 kDa
2. 47,1 kDa
3. 35,7 kDa
4. 30,1 kDa
5. 25,3 kDa
6. 23,4 kDa
7. 18,6 kDa
8. 16,7 kDa
9. 14,8 kDa



Grafik Marker Protein Whole (teknik SDS PAGE)



CARA KERJA SDS-PAGE

SDS-PAGE 12%

1. Bahan-bahan yang diperlukan:

Acrilamid	Tris HCl pH 8,8	Tris HCl pH 6,8
SDS 0,5%	Aquadest	Temed
APS 10%, 4°C Buffer		Methanol 50%
Methanol 5 %	Acetic Acid 7,5 %	Glutaraldehyd 10 %
NaOH 0,36 %	NH ₃	AgNO ₃
Formaldehide	Zitronensoure 5 %	Butanol

2. Membuat Running Gel

Bahan:	Acrilamid	2,5 ml
	Tris HCl pH 8,8	1,2 ml
	SDS 0,5 %	1,2 ml
	Aquadest	1,1 ml
	Temed	5,0 µl
	APS 10 %	30 µl

3. Masukkan lewat dinding kaca sampai 1 cm dari atas.

4. Tambahkan Butanol diatasnya sampai penuh.

5. Membuat Stacking Gel

Bahan:	Acrilamid	0,66 ml
	Tris HCl pH 6,8	0,80 ml
	SDS 0,5 %	0,80 ml
	Aquadest	0,80 ml
	Temed	4,0 µl
	APS 10 %	20 µl

6. Masukkan ke atas cetakan Running gel sampai penuh kemudian masukkan

comb ke stacking gel dan inkubasi selama 25 menit.

7. Siapkan sampel (Laemmli Buffer + Sample) masukkan ke dalam ependorf dan tutup ependorf ditusuk dengan jarum $\frac{1}{2}$ tusukan, langsung godok dengan 100°C selama 5 menit.
8. Setelah inkubasi selesai lepaskan comb dan cuci dengan E buffer 1X.
9. Masukkan cetakan tadi ke Bio Rad.
10. Tuangi dengan E Buffer 1X (800 ml)
11. Masukkan sample ke dalam lubang comb tadi dan hilangkan gelembung udara tadi dengan jarum.
12. Pasang listrik dengan 125 V dan 40 mA.
13. Tunggu sampai sample turun seluruhnya.
14. Matikan listrik dan lepas agarnya pelan-pelan.
15. Masukkan ke petridish yang sudah ada larutan pencucian.
16. Tahap pencucian

Pencucian I	Methanol	25 ml
	Asam asetat	3,75 ml
	Aquadest	71,25 ml

Goyang dengan kecepatan 42 selama 30 menit

Pencucian II	Methanol	25 ml
	Asam asetat	3,75 ml
	Aquadest	93,75 ml

Goyang dengan kecepatan 42 selama 30 menit

Pencucian III (Glutaraldehyd 10 %)

Glutaraldehyd	10 ml
Aquadest	90 ml

Pencucian IV

Pencucian dengan aquadest @ 100ml 3X selama 30 menit.

17. Tahap Pewarnaan

Timbang AgNO_3 0,8 g + 4 ml DW, campur dan masukkan ke dalam

larutan yang terdiri dari: NaOH 0,36 % 21 ml

NH_3 1,4 ml

 Aquadest 73,5 ml

Masukkan ke dalam petridish dan goyang dengan kecepatan 42 selama 15 menit. Buang

18. Cuci dengan aquadest @100 ml 2X selama 2 menit.

19. Masukkan pengembang warna yang terdiri dari:

Formaldehid 3,7 % 50 μl

Zitronensaure 5 % 100 μl

Aquadest 100 ml

Tunggu 5 menit sambil digoyang terus.

20. Masukkan stop reaksi dengan Acetic Acid 10 %.

21. Cuci dengan Aquadest @ 100 ml 2 X selama 2 menit.

22. Beri Glicerol 10 %

Glicerol 10 ml

Aquadest 90 ml

Gambar Cacing *Haemonchus contortus* jantan dan betina



Cacing *H. contortus* jantan bagian posterior



Cacing *H. contortus* betina bagian posterior



Cacing *H. contortus* jantan dan betina bagian anterior