

TESIS

**ANALISIS MOLEKULER *Sarcocystis* sp PADA SAPI DI
SURABAYA**

PENELITIAN EKSPLORASI LABORATORIS



Oleh

BRIANTONO WILLY RENDRAGRAHA

NIM. 061624253002

**PROGRAM STUDI MAGISTER
ILMU PENYAKIT DAN KESEHATAN MASYARAKAT VETERINER
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
2019**

**ANALISIS MOLEKULER *Sarcocystis* sp PADA SAPI DI
SURABAYA**

PENELITIAN EKSPLORASI LABORATORIS

TESIS

untuk memperoleh gelar magister

**dalam Program Studi Ilmu Penyakit dan Kesehatan Masyarakat Veteriner
pada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga**

Surabaya

BRIANTONO WILLY RENDRAGRAHA

NIM. 061624253002

PROGRAM STUDI MAGISTER

ILMU PENYAKIT DAN KESEHATAN MASYARAKAT VETERINER

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN

UNIVERSITAS AIRLANGGA

2019

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam hasil penelitian tesis berjudul :

ANALISIS MOLEKULER *Sarcocystis* sp PADA SAPI DI SURABAYA

tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar Magister di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Surabaya, 12 Juli 2019



Briantono Willy Rendragraha

NIM. 061624253002

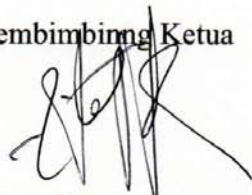
Lembar Pengesahan

TESIS INI TELAH DISETUJUI

Tanggal 12 Juli 2019

Oleh:

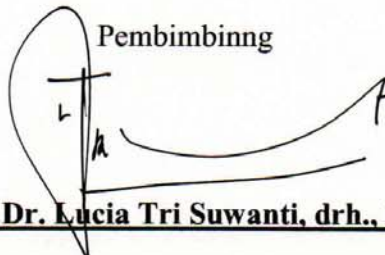
Pembimbing Ketua



Dr. A. T. Soelih Estoepangestie, drh

NIP. 1956091519870122001

Pembimbing



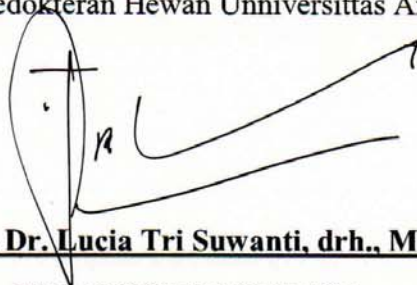
Prof. Dr. Lucia Tri Suwanti, drh., MP.

NIP. 196208281989032001

Mengetahui,

Ketua Program Studi Ilmu Penyakit dan Kesehatan Masyarakat Veteriner

Fakultas Kedokteran Hewan Unniversittas Airlangga



Prof. Dr. Lucia Tri Suwanti, drh., MP.

NIP. 196208281989032001

JUDUL PENELITIAN

Analisis Molekuler *Sarcocystis* sp pada Sapi di Surabaya

Nama Mahasiswa : Briantono Willy Rendragraha

NIM : 061624253002

Program Studi : Ilmu Penyakit dan Kesehatan Masyarakat Veteriner

Telah diuji pada tanggal : 18 Februari 2019

KOMISI PENILAI SEMINAR HASIL PENELITIAN

Ketua : Dr. Mufasirin, drh., M.Si

Sekretaris : Dr. Soeharsono, drh., M.Si

Anggota : Dr. Nenny Harijani, drh., M.Si

Pembimbing Utama : Dr. A. T. Soelih Estoepangestie, drh

Pembimbing Serta : Prof. Dr. Lucia Tri Suwanti, drh., M.P

Tesis ini telah diuji dan dinilai pada

Tanggal 26 Maret 2019

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Dr. Mufasirin, drh., M.Si

Anggota : Dr. Soeharsono, drh., M.Si

Dr. Nenny Harijani, drh., M.Si

Dr. A. T. Soelih Estoepangestie, drh

Prof. Dr. Lucia Tri Suwanti, drh., M.P

Surabaya, 22 Juli 2019

Program Studi Magister Ilmu Penyakit dan Kesehatan Masyarakat Veteriner

Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga

Dekan,



Prof. Dr. Pudji Srianoto, drh., M.Kes

NIP. 19560105 198601 1 001

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji dan syukur kehadirat Allah S.W.T atas karunia yang dilimpahkan sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan tesis dengan judul “**Analisis Molekuler *Sarcocystosis* sp pada Sapi di Surabaya**”.

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada: Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Prof. Dr. Pudji Sianto, drh., M.Kes. atas kesempatan mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Dr. A. T. Soelih Estoepangestie, drh selaku dosen pembimbing utama dan Prof. Dr. Lucia Tri Suwanti, drh., M.P selaku dosen pembimbing serta, atas saran, bimbingan, dan dukunganya sampai dengan selesainya penelitian dan penulisan tesis ini.

Dr. Mufasirin, M.Si., drh, selaku ketua penguji, Dr. Soeharsono, M.Si., drh. selaku sekertaris penguji, dan Dr. Nenny Harijani, M.Si., drh selaku anggota penguji, atas kesediaanya untuk meluangkan waktu menguji, menilai, dan berdiskusi untuk saran dan masukan dalam penelitian ini. Seluruh bapak dan ibu dosen pengajar atas wawasan keilmuan serta pengalaman belajar selama penulis mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Bapak dan Ibu staff kependidikan yang telah banyak membantu selama penulis belajar di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

Seluruh Laboran di *Tropical Disease Diagnostic Center, Institute of Tropical Disease*, Universitas Airlangga yang telah banyak memberi wawasan baru, membantu, dan membimbing dalam pelaksanaan teknis penelitian ini.

Orang tua tercinta Ayahanda Drs. Tatok Heripoernomo, M.Pd (almarhum) dan Ibunda Sri Wahyuningsih, S.Ap, kakak saya Anggraini Winda Purnamasari dan Fatkhurrohman, yang selalu menjadi sosok yang menginspirasi, menenangkan, serta memberikan doa, semangat, dan banyak hal yang luar biasa pada penulis.

Teman-teman penelitian yang selalu saling mendukung dan memberikan saran membangun untuk bersama-sama menyelesaikan penelitian ini Septian Hakim Susantoputro, Ni Komang Apriliani, Yuli Susana, Vindo Rossy, Diah ayu kurniasari, M. Roffi P, dan drh. Dikky Eka, M. Si yang turut membantu dan membimbing selama masa perkuliahan dan teman-teman pendidikan sarjana di Universitas Airlangga yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa masih banyak terdapat kekurangan dan kesalahan sehingga saran dan kritik yang membangun sangat dibutuhkan demi kesempurnaan penyusunan makalah penelitian selanjutnya. Semoga makalah ini dapat dijadikan referensi dan menambah pengetahuan bagi yang memanfaatkannya. Amin.

Surabaya, 12 Juli 2019

Penulis

RINGKASAN

Analisa Molekuler *Sarcocystis* sp pada Sapi di Surabaya

Daging sapi merupakan salah satu komoditas pangan yang selama ini memberikan andil terhadap pemenuhan gizi masyarakat, khususnya protein hewani yang sangat dibutuhkan dalam menopang pembangunan sumber daya manusia Indonesia. Mengonsumsi daging sapi maupun produk olahan daging sapi memiliki potensi mengganggu kesehatan jika tidak melalui proses yang benar, salah satu potensi penyakit yang dapat ditularkan melalui konsumsi daging sapi adalah sarcocystosis. Sarcocystosis merupakan penyakit yang disebabkan oleh protozoa dari genus *Sarcocystis*. Dalam siklus hidupnya *Sarcocystis* memerlukan dua host (intermediet dan definitif). Manusia dapat berperan sebagai host definitif maupun host intermediet. Analisa terkait infeksi *Sarcocystis* pada sapi maupun daging sapi masih sangat sedikit dilakukan di Indonesia, hal tersebut penting untuk dilakukan mengingat penyakit sarcocystosis dapat menimbulkan kerugian baik pada aspek kesehatan hewan dan manusia maupun aspek ekonomi.

Analisis mengenai infeksi *Sarcocystis* dalam penelitian ini dilakukan dengan mengambil sampel esofagus sapi yang dipotong di RPH Pegirian Surabaya. Deteksi *Sarcocystis* dalam penelitian ini dilakukan dengan *digestion method* yang dimodifikasi dari Dehkordi *et al.* (2016). Sampel esofagus dipotong kecil-kecil, kemudian ditambahkan larutan HCl dan tripsin untuk memecah dinding kista pada jaringan otot, sehingga bradizoit *Sarcocystis* dapat diamati dengan pewarnaan Haematoxilin Eosin (HE) dan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x. Uji konfirmasi dilakukan dengan metode PCR dengan menarget gen 18S rRNA. Hasil PCR dibaca dengan agarose gel electrophoresis. Seluruh sampel positif pemeriksaan PCR dilanjutkan pada tahap *sequencing* untuk mengidentifikasi spesies.

Sembilan dari tiga puluh lima sampel dalam penelitian ini menunjukkan adanya bradizoit dengan bentukan seperti pisang (*banana-like shaped*). *Polymerase Chain Reaction* dilakukan terhadap semua sampel positif pemeriksaan mikroskopis dan dua sampel negatif pemeriksaan mikroskopis. Lima dari sembilan sampel positif pemeriksaan mikroskopis menunjukkan hasil positif pada pemeriksaan PCR dengan munculnya band pada 900bp, hasil positif PCR juga didapatkan dari satu sampel negatif pemeriksaan mikroskopis. Hasil *sequencing* dicocokkan dengan data base NCBI dengan aplikasi BLAST menunjukkan sampel 03, 04, 05, dan 08 memiliki kesamaan sebesar 87%, 91%, 94%, dan 80% dengan *Sarcocystis cruzi*, sampel 15 dan 16 memiliki kesamaan sebesar 79% dan 78% dengan *Sarcocystis hominis*.

SUMMARY

Analysis of *Sarcocystis* sp in Cattle in Surabaya

Beef is one of the food commodities that has contributed to the fulfillment of community nutrition, especially animal protein, which is very much needed to support the development of Indonesia's human resources. In Indonesia, beef is the second biggest commodity that supplies animal protein just after poultry meat. However, consuming undercooked beef and beef products have potential to causing Sarcocystosis. Sarcocystosis is a disease caused by protozoa of the genus *Sarcocystis*. In its life cycle, *Sarcocystis* requires intermediate (prey) and definitive host (predator and human). *S. hominis* is one of some species that can infect human (zoonoses). Human can be a definitive host after consuming undercooked beef containing *S. hominis*. This disease can cause harm to both health and economic aspects. Some *Sarcocystis* species have high pathogenicity in livestock, cause anorexia, weight loss, abortion, and death. Even it causes adverse conditions for animals, sarcocystis infection also causes a decrease in meat quality in cattle. That is why the analysis about *Sarcocystis* is very important.

Analysis of *Sarcocystis* infection was carried out on cows slaughtered in Pegirian Abattoirs with oesophagus as a sample. *Sarcocystis* examination in oesophagus was carried out by digestion method modified from Dehkordi *et al.* (2016). Oesophagus sample was cut into small pieces, then added trypsin and HCl enzymes with the aims to break up cysts in meat. Broken cysts will excrete bradizoites which can be observed with HE (Haematoxylin Eosin) coloration in 400x magnification. The possibility of microscopic identification error makes it necessary to do a confirmation test with Polymerase Chain Reaction (PCR). Hamidinejat *et al.* (2015) identified *Sarcocystis* by amplifying the 18S rRNA gene. The PCR results were continued into the agarose gel electrophoresis stage, a positive sample would be sequenced to identify the infecting *Sarcocystis* species.

Thirty five samples were taken from Pegirian slaughterhouse of Surabaya and examined macroscopically. The bradizoite of *Sarcocystis* sp was discovered in 9 samples by microscopic examination. The bradizoite was identified from its banana-like shape and bluish nucleus in color with HE staining (Haematoxylin Eosin). The sediment obtained from the digestive method was taken to extract DNA for PCR examination. Polymerase Chain Reaction examination showed five of nine samples that have shown bradizoite shape positive infected with *Sarcocystis* sp. In this research, two negative samples, according to microscopic examination was analyzed using PCR for the interest of statistical analysis, one of them was positive, it showed by 900BP band in agarose gel electrophoresis. All of positive samples were sequenced to confirm and analyze species that infected cattle slaughtered in Pegirian abattoirs. The sequence was processed using BioEdit and then analyzed using Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) to compare nucleotide sequences to sequence database in NCBI. The result showed that sample 03, 04, 05, and 08 had identity about 87%, 91%, 94%, and 80% identity with *Sarcocystis cruzi*, sample 15 and 16 had 79% and 78% identity with *Sarcocystis hominis*.

ANALISIS MOLEKULER *Sarcocystis* sp PADA SAPI DI SURABAYA

Briantono Willy Rendragraha

ABSTRACT

Sarcocystosis is a disease that can cause problem in both economic and health of human and animal. Consumption of undercooked meat is one of a route transmission of this parasite from animal to human. The purpose of this study was to determine the presence of *Sarcocystis* sp and species that infect slaughtered cattle in an Abatoirs in Surabaya. Thirty five of slaughtered cattle's oesophagus were examined microscopically to identify the presence of *Sarcocystis* bradizoites. Molecular examination using PCR with 18s rRNA gene as gene target was also done for eleven samples including nine positive and two negative microscopically examination. The result showed six samples were PCR positive which four samples from positive microscopically examination and one from negative microscopically examination, but it needs to be investigated further.

Key words: *Sarcocystis, cattle, beef, potential of zoonotic*

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL DALAM	ii
PERSYARATAN GELAR	iii
PERNYATAAN.....	iv
PERSETUJUAN	v
PENETAPAN PANITIA PENGUJI	vi
UCAPAN TERIMA KASIH.....	viii
RINGKASAN	x
SUMMARY	xi
ABSTRACT	xii
DAFTAR ISI.....	xiii
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR TABEL.....	xvii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xviii
DAFTAR SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG	xix
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan.....	5
1.4 Manfaat.....	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Sarcocystis.....	6
2.1.1 Siklus Hidup	6
2.2 Sarcocystosis pada Sapi.....	10
2.2.1 Prevalensi Sarcocystosis pada Sapi	12
2.2.2 Infeksi Eksperimental <i>Sarcocystis</i> pada Hewan Coba.....	15
2.3 Infeksi <i>Sarcocystis</i> pada Bahan Pangan	16
2.4 Sarcocystosis pada Manusia	19
2.5 Metode Analisis <i>Sarcocystis</i>	21
2.5.1 Deteksi Makrokista <i>Sarcocystis</i>	21

2.5.2	<i>Digestion Method</i>	22
2.5.3	<i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	23
2.5.4	Sequencing.....	25
2.6	Rumah Potong Hewan	28
2.6.1	Rumah Potong Hewan Pegirian.....	29
BAB 3	KERANGKA KONSEPTUAL	30
3.1	Kerangka Konseptual	30
BAB 4	MATERI DAN METODE	33
4.1	Jenis dan Rancangan Penelitian.....	33
4.2	Sampel Penelitian	33
4.2.1	Populasi	33
4.2.2	Besar Sampel	33
4.3	Definisi Operasional	33
4.4	Alat dan Bahan Penelitian	34
4.5	Waktu dan Lokasi Penelitian.....	34
4.6	Pemeriksaan Mikroskopis	34
4.7	Ekstraksi DNA dan PCR	35
4.7.1	Ekstraksi DNA.....	35
4.7.2	<i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	35
4.7.3	Sequencing.....	36
4.8	Analisis Data	36
4.9	Kerangka Operasional Penelitian	36
BAB 5	ANALISIS HASIL PENELITIAN	37
5.1	Identifikasi <i>Sarcocystis</i> sp	37
5.1.1	Pemeriksaan Mikroskopis.....	37
5.1.2	Uji <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	38
5.2	Validitas Uji Mikroskopis	38
5.3	Hasil Sequencing	40
BAB 6	PEMBAHASAN	42
6.1	Deteksi <i>Sarcocystis</i> sp Dengan <i>Digestion Method</i> dan PCR.....	42
6.2	Validitas Uji Mikroskopis	43
6.3	Identifikasi Spesies <i>Sarcocystis</i> sp	45

BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN.....	51
7.1 Kesimpulan.....	51
7.2 Saran.....	51
DAFTAR PUSTAKA	52
LAMPIRAN.....	56

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1. Siklus hidup <i>Sarcocystis</i>	7
2.2. Morfologi <i>Sarcocystis</i>	10
2.3. Potongan daging paha sapi dengan lesi eosinophilic myositis.....	11
2.4. Ookista <i>Sarcocystis</i> yang telah bersporulasi dan sporokista pada feses anjing	16
2.6. <i>Sarcocystis</i> pada sitoplasma otot bergaris.....	19
2.5. Makrocyst pada otot leher, Oesophagus, dan Otot diafragma	19
2.7. Deteksi makrokista <i>Sarcocystis</i> pada oesophagus di RPH El-Kharga, Mesir	22
3.1. Bagan Kerangka Konseptual.....	30
4.1. Bagan kerangka oprasional penelitian	36
5.1. Bradizoit <i>Sarcocystis</i> pada perbesaran 400X dengan pewarnaan HE.....	37
5.2. Hasil agarose gel electrophoresis produk PCR	38
5.3. Gambar phylogenic tree isolat <i>Sarcocystis</i> sp.....	41

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Hasil uji identifikasi <i>Sarcocystis</i> sp	39
2. Hasil uji statistik hasil uji mikroskopis dan uji PCR.....	40
3. Hasil BLAST pada data base NCBI terhadap suspect <i>Sarcocystis</i> sp	41

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Prosedur Digestive Method.....	56
2. Prosedur ekstraksi DNA menggunakan QIAamp® DNA Mini Kit.....	57
3. Hasil homologi sampel 04 dengan <i>Sarcocystis cruzi</i>	59
4. Gambar pengambilan sample.....	60
5, Gambar ekstraksi DNA dan persiapan PCR	60
6. Alat-alat yang digunakan dalam penelitian.....	61

DAFTAR SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG

sp	= Spesies
PCR	= <i>Polymerase Chain Reaction</i>
rRNA	= <i>ribosomal Rybo Nuchleic Acid</i>
bp	= base pairs
HCL	= Hidrogen Chlorida
BLAST	= <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
NCBI	= <i>National Center for Biotechnology Information</i>
RFLP	= <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>