

SKRIPSI

ISOLASI PROTEIN SPESIFIK INTESTIN CACING

Mecistocirrus digitatus DEWASA

DENGAN TEKNIK ELUSI



Oleh:

JULIANI FITRIYAH
KEDIRI-JAWA TIMUR

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN

UNIVERSITAS AIRLANGGA

SURABAYA

2006

ISOLASI PROTEIN SPESIFIK INTESTIN CACING
***Mecistocirrus digitatus* DEWASA**
DENGAN TEKNIK ELUSI

Skripsi sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

pada

Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

Oleh:

JULIANI FITRIYAH

NIM. 060112946

Menyetujui

Komisi Pembimbing,

Lianny Nangoi, M.S., Drh.

Pembimbing Pertama

Nunuk Dyah Retno L, M.S., 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**.

Menyetujui
Panitia Penguji,

Poedji Hastutiek, M.Si., Drh.

Ketua

Prof. Dr. Sri Subekti, DEA., Drh.

Sekretaris

Dr. Rahayu Ernawati, M.Sc., Drh.

Anggota

Lianny Nangoi, M.S., Drh.

Anggota

Nunuk Dyah Retno L, M.S., Drh.

Anggota

Surabaya, 24 Februari 2006

Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga

Dekan,

Prof. Dr. Ismudiono, M.S., Drh.

NIP. 130 687 297

**ISOLASI PROTEIN SPESIFIK INTESTIN CACING
Mecistocirrus digitatus DEWASA
DENGAN TEKNIK ELUSI**

JULIANI FITRIYAH

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi protein spesifik intestin cacing *Mecistocirrus digitatus* dewasa dengan menggunakan teknik preparasi gel *electrophoresis* (ELUSI) yang diharapkan dapat digunakan sebagai bahan diagnostik *mecistocirrusis* secara serologis.

Sampel intestin cacing *M. digitatus* dewasa diperoleh dari pembedahan cacing *M. digitatus* dewasa yang diisolasi dari abomasum sapi penderita *mecistocirrusis*. Intestin yang telah diperoleh disonikasi dengan frekuensi 35 kHz selama 3x1 menit dengan interval waktu istirahat selama satu menit, kemudian dilakukan analisis protein dengan menggunakan SDS-PAGE untuk memperoleh profil protein intestin cacing *M. digitatus* dewasa, sedangkan untuk memastikan bahwa hasil analisis protein yang dilakukan merupakan protein spesifik intestin *M. digitatus* dewasa dan memberikan gambaran dasar pada saat dilakukan isolasi protein, selanjutnya dilakukan identifikasi protein intestin *M. digitatus* dewasa dengan teknik *western blot* menggunakan antibodi poliklonal anti-intestin *M. digitatus*. Tahap berikutnya dilakukan isolasi dengan teknik preparasi gel *electrophoresis* (ELUSI). Hasil isolasi protein spesifik tersebut kemudian dianalisis kembali menggunakan teknik SDS-PAGE untuk memastikan protein yang berhasil diisolasi pada berat molekul yang tepat.

Penelitian ini berhasil mengisolasi protein spesifik intestin *M. digitatus* dewasa dengan berat molekul 58,94 kDa dengan menggunakan teknik preparasi gel *electrophoresis* (ELUSI).

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah puji syukur kehadiran Allah SWT., yang telah memberikan rahmat dan hidayahNYA sehingga penulis dapat menyelesaikan makalah skripsi ini sebagai salah satu syarat memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan pada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Melalui naskah skripsi yang berjudul “**Isolasi Protein Spesifik Intestin Cacing *Mecistocirrus digitatus* Dewasa dengan Teknik Elusi**” penulis mencoba melakukan isolasi protein spesifik dari intestin cacing *Mecistocirrus digitatus* dewasa dengan teknik preparasi gel *electrophoresis* (ELUSI) sehingga dapat digunakan untuk diagnosis *mecistocirrusis* secara serologis.

Berkaitan dengan itu pula, penulis ingin mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya kepada yang terhormat :

1. Bapak Prof. Dr. Ismudiono, M.S., Drh selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, serta civitas akademika atas pemberian kebijaksanaan dan fasilitasnya.
2. Ibu Lianny Nangoi, M.S., Drh selaku pembimbing pertama dan Ibu Nunuk Dyah Retno L, M.S., Drh selaku pembimbing kedua atas segala bimbingan, kritik dan saran maupun semangat yang telah diberikan kepada penulis.
3. Ibu Poedji Hastutiek, M.Si., Drh., Prof. Dr. Sri Subekti, DEA., Drh. dan Ibu Dr. Rahayu Ernawati, M.Sc., Drh. selaku dosen penguji atas semua kritik dan saran pada penulisan makalah skripsi ini.

4. Ibu Halimah Puspitawati, M. Kes., Drh., Bapak Kusnoto, M. Si., Drh dan Ibu Prof. Dr. Sri Subekti B.S., DEA., Drh. selaku dosen proyek penelitian atas semua bantuannya selama penelitian dan penulisan makalah skripsi ini
 5. Bapak Herry Agus Hermadi, M.S., Drh selaku dosen wali dan seluruh dosen FKH UNAIR yang telah memberikan ilmu selama perkuliahan.
 6. Kepala Laboratorium beserta seluruh staf Laboratorium Parasitologi FKH UNAIR, Laboratorium Biologi Molekuler FKH UNAIR dan *Tropical Disease Center (TDC)* UNAIR yang telah membantu selama penelitian.
 7. Bapak Waris selaku pegawai Rumah Potong Hewan (RPH) Pegirian Surabaya atas bantuan penyediaan bahan penelitian.
 8. Bapak (almarhum) dan Ibu tercinta beserta kakak-kakakku atas segala do'a, semangat dan dukungannya baik secara moril maupun materiil.
 9. Semua pihak yang telah membantu baik secara langsung maupun tidak langsung dalam penelitian dan penyelesaian penulisan makalah skripsi ini.
- Penulis sepenuhnya menyadari masih banyak terdapat kekurangan mengingat terbatasnya pengetahuan dan kemampuan yang penulis miliki, oleh karena itu saran dan kritik yang sifatnya membangun sangat penulis harapkan demi kesempurnaan penulisan makalah skripsi ini. Akhirnya penulis berharap semoga tulisan ini dapat bermanfaat bagi pembaca.

Surabaya, Februari 2006

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
ABSTRAK.....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang Penelitian.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Landasan Teori.....	4
1.4 Tujuan Penelitian.....	5
1.5 Manfaat Penelitian.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Tinjauan <i>Mecistocirrus digitatus</i>	6
2.1.1 Klasifikasi.....	6
2.1.2 Morfologi.....	6
2.1.3 Siklus Hidup.....	8
2.1.4 Patogenesis dan Gejala klinis.....	9
2.1.5 Epidemiologi.....	10
2.1.6 Diagnosis.....	11

2.1.7 Pengendalian	12
2.2 Tinjauan Antigen Parasit.....	12
2.2.1 Antigen Parasit.....	12
2.2.2 Karakterisasi Antigen Parasit.....	15
BAB III MATERI DAN METODE PENELITIAN.....	18
3.1 Jenis Penelitian.....	18
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	18
3.3 Bahan dan Alat Penelitian.....	18
3.3.1 Bahan Penelitian	18
3.3.2 Alat Penelitian.....	19
3.4 Metode Penelitian	19
3.4.1 Isolasi Cacing <i>M. digitatus</i>	19
3.4.2 Isolasi Intestin Cacing <i>M. digitatus</i>	20
3.4.3 Pembuatan Homogenat Intestin Cacing <i>M. digitatus</i>	20
3.4.4 Pembuatan Antibodi Poliklonal	21
3.4.5 Analisis Protein dengan Teknik SDS-PAGE	21
3.4.6 Identifikasi Protein dengan Teknik <i>Western Blot</i>	23
3.4.7 Isolasi Protein Spesifik dengan Teknik ELUSI	23
BAB IV. HASIL PENELITIAN	28
BAB V. PEMBAHASAN	31

BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN.....	35
6.1 Kesimpulan.....	35
6.2 Saran.....	35
RINGKASAN.....	36
DAFTAR PUSTAKA.....	38
LAMPIRAN.....	41

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1. Cacing <i>Mecistocirrus digitatus</i>	7
3.1. Kerangka Operasional Penelitian.....	27
4.1. Analisis Protein Intestin <i>M. digitatus</i> Dewasa Hasil Elusi dengan Teknik SDS-PAGE.....	29

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Komposisi Bahan Penelitian.....	41
2. Gambar Morfologi Cacing <i>Mecistocirrus digitatus</i>	43
3. Gambar Peralatan Penelitian.....	44
4. Analisis Protein Intestin <i>M. digitatus</i> Dewasa dengan Teknik SDS-PAGE.....	45
5. Identifikasi Protein Intestin <i>M. digitatus</i> Dewasa dengan Teknik <i>Western Blot</i>	46
6. Analisis Regresi Antara Nilai Rf (x) dan Berat Molekul (log y Da) untuk Menentukan Berat Molekul Protein Spesifik Intestin <i>M. digitatus</i> Dewasa Hasil Elusi.....	47

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Penelitian

Nematodosis gastrointestinal pada sapi menyebabkan banyak kerugian bagi peternak. Kerugian tersebut diantaranya meliputi penurunan produksi daging, susu, dan tenaga kerja, serta dapat menyebabkan kematian. Salah satu nematoda gastrointestinal adalah *Mecistocirrus digitatus* yang dapat menginfeksi abomasum berbagai ruminansia seperti domba, kambing, sapi, zebu, kerbau, lambung babi dan pernah dilaporkan pada manusia di Amerika Tengah (Soulsby, 1986). Menurut Dunn (1978) *Mecistocirrus digitatus* banyak dijumpai di abomasum sapi dan kerbau di daerah tropis, jarang dijumpai pada abomasum ruminansia kecil.

Prevalensi *M. digitatus* di daerah tropis relatif tinggi seperti di tiga wilayah peternakan di Mindanao-Filipina sebesar 30 % pada sapi berumur 1-30 bulan (Van Aken *et al.*, 1998), selanjutnya Puspitawati dkk. (2001^b) mendapati prevalensi *M. digitatus* dari 76 sapi yang dipotong di Rumah Potong Hewan (RPH) Pegirian Surabaya sebesar 72,3 % pada sapi jenis Peranakan Ongole (PO) dan Friesian Holstein (FH) yang berumur dua sampai enam tahun. Prevalensi yang tinggi ini perlu mendapat perhatian khusus agar langkah pengendalian mencapai sasaran dengan baik. Pengendalian terhadap *mecistocirrusis* dapat dilakukan dengan usaha pencegahan dan pengobatan. Diagnosis yang tepat dan akurat sangat mendukung langkah pengendalian yang cepat dan tepat.

Pengendalian *mecistocirrusis* dapat dilakukan dengan menekan jumlah larva yang infeksi dari siklus hidupnya atau menekan populasi cacing *M. digitatus* sampai batas yang tidak mengganggu, selain itu dapat dilakukan dengan memberikan pengobatan dengan menggunakan anthelmintika untuk mengeluarkan parasit dari tubuh induk semang.

Diagnosis pada *mecistocirrusis* yang selama ini diterapkan adalah dengan melihat gejala klinis, seperti *bottle jaw* dan anemia, juga dengan pemeriksaan feses untuk melihat telur *M. digitatus* (Subekti dkk., 2002). Gejala klinis dari *mecistocirrusis* mempunyai kemiripan dengan haemonchosis, sehingga diagnosis berdasarkan gejala klinis mengalami kesulitan karena dapat dikacaukan dengan haemonchosis, sedangkan pada pemeriksaan feses membutuhkan waktu yang lama karena harus menunggu periode prepatennya yang berkisar 60-70 hari. Diagnosis yang sulit dan lama tersebut membutuhkan adanya diagnosis yang lebih dini dan spesifik pada *mecistocirrusis* dengan mengembangkan uji serologis menggunakan protein spesifik dari *M. digitatus*.

Penegakan diagnosis *mecistocirrusis* memerlukan uji dan bahan uji dengan sensitifitas dan spesifisitas yang tinggi. Spesifisitas bahan uji diperlukan mengingat banyaknya protein yang tidak spesifik pada infeksi parasit, oleh karena itu perlu dipikirkan sumber protein yang spesifik untuk selanjutnya dilakukan isolasi terhadap protein spesifik tersebut. Teknik preparasi gel *electrophoresis* (ELUSI) merupakan salah satu metode untuk mendapatkan protein yang murni (*purified protein*). Pemurnian protein akan meningkatkan spesifisitas protein,

sehingga protein tersebut mempunyai potensi untuk digunakan sebagai bahan diagnostik (Abdel-Rahman, 2000).

Informasi tentang eksplorasi secara molekuler *M. digitatus* dewasa ini masih sedikit sekali, hanya saja sebagai acuan kerabat terdekat dari *M. digitatus* yang masih dalam satu famili yaitu *Haemonchus sp.* Kodyman *et al.* (2000) yang dikutip oleh Puspitawati dkk. (2003) telah meneliti antigen produk ekskresi sekresi (ES) yang mengandung protein imunogenik dengan berat molekul 15 kDa, dan 24 kDa, selanjutnya Lastuti dkk (2001) meneliti profil protein intestin *Haemonchus sp.* dan diperoleh 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.

Penelitian pendahuluan pernah dilakukan oleh Puspitawati dkk., (2003) tentang profil protein intestin cacing *M. digitatus* dewasa dan diperoleh hasil lima fraksi protein yaitu 87,5 kDa, 59,0 kDa, 48,51 kDa, 14,01 kDa, dan 12,44 kDa dengan fraksi yang dominan yaitu fraksi protein dengan berat molekul 59,0 kDa.

Penelitian ini mencoba mengisolasi protein spesifik intestin cacing *M. digitatus* dewasa menggunakan teknik preparasi gel *electrophoresis* (ELUSI). Hasilnya diharapkan dapat memperoleh fraksi protein spesifik yang teridentifikasi dari berat molekulnya dan protein tersebut dapat digunakan sebagai bahan diagnostik *mecistocirrusis* secara serologis.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang dijelaskan diatas dapat dirumuskan masalah sebagai berikut:

Apakah protein spesifik intestin *M. digitatus* dewasa yang teridentifikasi dari berat molekulnya dapat diisolasi dengan teknik preparasi gel *electrophoresis* (ELUSI)?

1.3 Landasan Teori

Antigen parasit cacing dapat ditemukan pada beberapa bagian seperti pada permukaan tubuh, antigen internal yang dilepas pada saat pemangsaan pada hospes (ekskresi sekresi), ekspresi dan ganti kulit dan ditemukan juga antigen somatik. Identifikasi tipe atau strain dari parasit harus mempunyai perangkat antigen yang spesifik terhadap antibodi yang ditimbulkan (Rantam, 2003).

Intestin cacing *M. digitatus* dewasa merupakan salah satu organ yang mampu mensekresi dan mengekskresikan hasil metabolit, diantaranya adalah antikoagulan yang didapat dari sifat *haematophagous* cacing *M. digitatus* di habitatnya, yaitu di abomasum, selain itu sel intestin cacing kaya akan mitokondria, kompleks golgi, ribosom, glikogen dan butir protein (Noble dan Noble, 1989).

Penelitian pendahuluan pernah dilakukan oleh Puspitawati dkk. (2003) tentang profil protein intestin cacing *M. digitatus* dewasa dan diperoleh hasil lima fraksi protein yaitu 87,5 kDa, 59,0 kDa, 48,51 kDa, 14,01 kDa, dan 12,44 kDa dengan fraksi yang dominan yaitu fraksi protein dengan berat molekul 59,0 kDa,

kemungkinan fraksi protein ini dapat diisolasi untuk dieksplorasi lebih lanjut sifat antigenitasnya.

Menurut Hendry (2004) ada beberapa metode *electrophoresis* yang dapat digunakan untuk karakterisasi protein antigen yaitu SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), *western blot*, *dot blot* dan elusi. Teknik elusi merupakan preparasi protein yang akan menghasilkan protein yang murni (*purified protein*).

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengisolasi protein spesifik dari intestin cacing *M. digitatus* dewasa dengan teknik preparasi gel *electrophoresis* (ELUSI).

1.5 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan dalam diagnosis imunologis *mecistocirrusis* yang disebabkan oleh *M. digitatus*, yaitu sebagai penelitian dasar dalam pembuatan bahan diagnostik *mecistocirrusis* melalui pemeriksaan serologis dengan uji imunologik yang mempunyai sensitifitas dan spesifisitas yang tinggi. Diharapkan penelitian ini juga dapat memberikan sumbangan bagi perkembangan dan kemajuan dunia Kedokteran Hewan, khususnya pengembangan biologi molekuler di bidang parasitologi.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan *Mecistocirrus digitatus*

2.1.1 Klasifikasi

Menurut Soulsby (1986) klasifikasi cacing *Mecistocirrus digitatus* adalah sebagai berikut :

Filum	: Nematelminthes
Kelas	: Nematoda
Ordo	: Strongylida
Superfamili	: Trichostrongyloidea
Famili	: Trichostrongylidae
Genus	: <i>Mecistocirrus</i>
Spesies	: <i>Mecistocirrus digitatus</i>

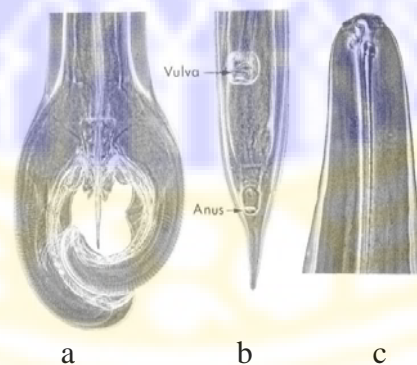
2.1.2 Morfologi

Cacing *Mecistocirrus digitatus* mempunyai \pm 30 buah garis longitudinal pada kutikulanya. *Cervical papila* menonjol, *Buccal capsule* kecil dengan gigi langsing yang disebut *lancet*. Cacing jantan mempunyai panjang lebih dari 31 mm. Bursa kopulatorik kecil, lobus dorsal simetris, *rays* ventral kecil, sedangkan *rays* lateroventral dan anteroventral lebih panjang dibanding *rays* yang lain. Spikula panjang dan langsing dengan panjang 3,8-7 mm. Panjang cacing betina kurang lebih 43 mm. Uterus melilit berbentuk spiral dengan intestin yang

membentuk warna belang merah putih (*barber's pole*). Vulva terletak 0,6-0,9 mm dari ujung posterior tanpa vulva flap. Telur dikeluarkan bersama kotoran dengan ukuran $95-120 \times 56-60 \mu\text{m}$ (Soulsby, 1986). Gambar morfologi cacing *M. digitatus* dapat dilihat pada Lampiran 2.

Morfologi *M. digitatus* dan *Haemonchus sp.* secara makroskopis memiliki kemiripan, namun secara ultrastruktur dengan *scanning electron microscope* (SEM) kedua spesies tersebut mempunyai perbedaan pada *synlophe*-nya. *Haemonchus sp.* memiliki *synlophe* longitudinal tajam atau tumpul, sedangkan *M. digitatus* *synlhope*-nya sirkuler dan tumpul (Puspitawati, 2001^a).

Telur *M. digitatus* berwarna lebih gelap daripada *Haemonchus sp.* (Subekti dkk. , 2002). Secara ultrastruktur dengan SEM kedua spesies tersebut mempunyai perbedaan pada morfologi telurnya. Pada *Haemonchus sp.* permukaan dinding telurnya diliputi selaput yang membentuk beberapa segi tidak beraturan sehingga mirip dengan permukaan dalam mukosa omasum sapi, sedangkan pada *M. digitatus* dinding telurnya tampak diselimuti lapisan tipis bertekstur lebih halus dibandingkan lapisan luar dinding telur *Haemonchus sp.* (Mumpuni dkk. , 2001).



Gambar 2.1 Cacing *Mecistocirrus digitatus*. Posterior Jantan (a), Posterior Betina (b), Anterior Jantan dan Betina (c) (Sumber :Bowman, 1995)

2.1.3 Siklus Hidup

Siklus hidup cacing *M. digitatus* termasuk tipe langsung, yaitu tanpa memerlukan induk semang perantara. Telur keluar bersama dengan feses, menetas dan berkembang di luar tubuh induk semang menjadi larva stadium satu (L_1), kemudian menjadi larva stadium dua (L_2) dan berkembang menjadi larva stadium tiga (L_3) yang infeksi. Infeksi terjadi pada sapi yang merumput di lapangan yang telah terkontaminasi oleh larva stadium tiga (Kusumamihardja, 1993). Perkembangan dari telur, L_1 , L_2 dan L_3 di alam membutuhkan waktu kurang lebih sepuluh hari (Van Aken *et al.*, 1997)

Tahap larva empat (L_4) cukup lama yaitu dari hari ke sembilan sampai dengan hari ke dua puluh delapan setelah terjadi infeksi. Periode prepaten berlangsung selama 60 hari (Soulsby, 1986; Kusumamihardja, 1993), sedangkan menurut Dunn (1978) periode prepaten dicapai antara 59-82 hari. Urquhart *et al.* (1994) menyatakan periode prepaten berlangsung selama 60 sampai 80 hari, sedangkan Van Aken *et al.* (1997) menyatakan periode prepaten bervariasi antara 61 – 79 hari dan *Egg Per Gram* (EPG) tertinggi didapatkan pada hari 80 – 90 pasca infeksi.

Kelangsungan hidup nematoda gastrointestinal dalam menyelesaikan satu siklus hidupnya dipengaruhi beberapa faktor, baik faktor di luar maupun faktor di dalam tubuh induk semang. Faktor di luar tubuh induk semang terutama suhu dan kelembaban. Sedangkan faktor di dalam tubuh induk semang yang berpengaruh adalah kepekaan atau kekebalan dari induk semang terhadap spesies parasit.

Suhu dan kelembaban sangat berpengaruh terhadap penetasan telur cacing sampai menjadi larva stadium tiga (L_3) yang infeksi. Kehidupan larva akan dipengaruhi oleh cuaca panas dan lingkungan yang kering, dimana larva stadium satu (L_1) tidak dapat berkembang menjadi larva stadium dua (L_2) maupun larva stadium tiga (L_3) karena tempat kehidupan larva yang berada pada rumput atau tanah yang kering tidak menunjang siklus hidup larva.

2.1.4 Patogenesis dan Gejala klinis

Mecistocirrus digitatus merupakan cacing penghisap darah (*haematophagous*) yang dapat menimbulkan gejala klinis pada induk semang yang mirip dengan haemonchosis yaitu adanya anemia, penurunan berat badan dan bulu kusam (Soulsby, 1986). Pendapat yang sama juga dikemukakan oleh Urquhart *et al.* (1994) yang menginformasikan bahwa gejala yang ditimbulkan oleh *M. digitatus* sama dengan *Haemonchus contortus*. Kusumamihardja (1993) menyebutkan gejala klinis yang ditimbulkan adalah anemia, kurus dan lemah terutama pada anak sapi dan anak kerbau, sedangkan menurut Van Aken, *et al.* (1997) infeksi *M. digitatus* dapat menyebabkan hilangnya protein plasma dan pada pemeriksaan darah menunjukkan adanya penurunan *Packed Cell Volume* (PCV) yang tampak pada hari ke 70 – 80 setelah infeksi.

Perubahan anatomis yang terjadi adalah perdarahan pada mukosa abomasum dan hipoproteinemia (Soulsby, 1986). Hipoproteinemia yang terjadi dapat berakibat edema bawah rahang (*bottle jaw*).

2.1.5 Epidemiologi

Distribusi *M. digitatus* menurut Dunn (1978) terutama di Asia termasuk Rusia. Konsentrasi terbesar dapat ditemukan di India, Pakistan, Bangladesh, Srilangka, Mauritius, Burma, Thailand, Indonesia dan negara-negara di wilayah Indo-China. Kejadian secara sporadis terjadi di Amerika Selatan dan Eropa. Jithendran (1999) melaporkan bahwa *M. digitatus* termasuk nematoda gastrointestinal yang menginfeksi sapi dan kerbau di 12 desa yang terletak di lembah Kangra-India dengan tingkat infeksi tertinggi pada bulan juli-september, selanjutnya Van Aken *et al.* (1998) melaporkan bahwa kejadian *M. digitatus* pada tiga wilayah peternakan di Mindanao-Filipina sebesar 30 % pada sapi berumur 1-30 bulan, dengan *Egg Per Gram* (EPG) menunjukkan peningkatan pada sapi berumur lebih dari 10 bulan dan setelah itu stabil atau terdapat penurunan namun tidak berbeda nyata sampai pada umur 24 bulan.

Di Indonesia pernah dilaporkan oleh Kusumamihardja (1993) pada tahun 1963 di Kabanjahe, Sumatra Utara ada seekor sapi dewasa mati tanpa tanda klinis adanya penyakit lain kecuali ditemukan cacing *M. digitatus* dalam lambungnya, dalam penelitiannya yang lain Kusumamihardja (1998) juga pernah menemukan *M. digitatus* di peternakan sapi perah di Pengalengan Jawa Barat. Subekti dkk. (1993) menemukan cacing *M. digitatus* di daerah Jawa Timur, selanjutnya Puspitawati dkk. (2001^b) mendapati prevalensi *M. digitatus* dari 76 sapi yang dipotong di Rumah Potong Hewan (RPH) Pegirian Surabaya sebesar 72,3 % pada sapi jenis Peranakan Ongole (PO) dan Friesian Holstein (FH) yang berumur dua sampai enam tahun.

2.1.6 Diagnosis

Diagnosis merupakan bagian yang penting dalam usaha pengendalian penyakit, tidak terkecuali pada helminthiasis. Diagnosis pada *mecistocirrusis* dapat dilakukan dengan melihat gejala klinis yang timbul seperti *bottle jaw* dan anemia, juga pemeriksaan feses untuk melihat telur *M. digitatus* (Subekti dkk., 2002). Penentuan diagnosis dari gejala klinis dapat dikacaukan dengan haemonchosis karena memiliki kemiripan gejala klinis, selain kemiripan gejala klinis juga memiliki kemiripan morfologi agen penyebab dan kemiripan patogenesis (Puspitawati dkk. , 2001^b). Penentuan diagnosis dengan pemeriksaan feses terkadang kurang akurat, bahkan telur terlalu lama terdeteksi dalam feses karena harus menunggu cacing melewati periode prepaten. Dengan demikian, diperlukan cara lain untuk diagnosis *mecistocirrusis* selain pemeriksaan gejala klinis dan pemeriksaan feses pada induk semang, yaitu dengan cara diagnosis secara imunologis dengan menggunakan protein spesifik *M. digitatus*.

Beberapa metode yang dapat dikembangkan untuk imunodiagnosis pada infeksi yang disebabkan oleh nematoda adalah : 1) Uji aglutinasi cepat; 2) Imunodifusi ; 3) Imunoelektroforesis; 4) ELISA ; 5) Imunobloting 6) Imunohistokimia (Warren, 1993, dikutip oleh Kusnoto, 2003). Sebagian besar dari teknik tersebut memerlukan antigen yang spesifik agar reaksi antara antigen dengan antibodi yang diharapkan sebagai indikator keberhasilan dapat terwujud (Harlow and Lane, 1998). Kesulitan yang dihadapi dalam penyediaan antigen dari nematoda adalah bervariasinya sumber antigen menurut stadium hidupnya dan

hampir selalu berbeda, hal ini karena perubahan stadium dan perbedaan hospes (Cohen and Warren, 1993, dikutip oleh Hendry, 2004).

2.1.7 Pengendalian

Pengendalian pada *mecistocirrusis* dapat dilakukan dengan usaha pencegahan dan pengobatan. Pencegahan dapat dilakukan seperti pada usaha pencegahan haemonchosis, yaitu dapat dilakukan dengan cara ternak tersebut dikandangan tanpa digembalakan atau dengan metode rotasi padang rumput. Usaha ini dapat menekan jumlah larva yang infeksi dari siklus hidup cacing dan dapat menekan populasi cacing sampai batas yang tidak mengganggu.

Pengobatan pada *mecistocirrusis* dapat dilakukan dengan pemberian anthelmintika seperti Doramectin / Ivermectin dengan dosis 200 µgram/Kg *single dose*, efektif untuk cacing dewasa (Subekti dkk., 2002), selain itu dapat menggunakan Phenotiazin 60-80 g tiap hewan, Nегuvon 44 mg tiap Kg BB dan Thiabendazol 100 mg tiap Kg BB dapat memberikan hasil yang baik (Kusumamihardja, 1993)

2.2 Tinjauan Antigen Parasit

2.2.1 Antigen Parasit

Antigen adalah substansi yang dapat dikenali dan diikat dengan baik oleh sistem imun. Antigen dapat berasal dari organisme (bakteri, virus, jamur dan parasit) atau molekul asing bagi tubuh (Rantam, 2003). Secara fungsional antigen dibagi menjadi dua bentuk, yaitu imunogen dan haptan. Imunogen adalah suatu

bahan molekul yang dapat menimbulkan respon imun, contohnya protein, polisakarida dan asam nukleat. Hapten adalah suatu bahan molekul yang dapat bereaksi dengan antibodi tetapi tidak dapat merangsang pembentukan antibodi secara langsung, contohnya lemak dan antibiotika (Bellanti, 1993 ; Baratawidjaja, 2004). Hapten dapat menginduksi antibodi dengan titer yang tinggi jika diikatkan dengan *carier* berupa protein yang mempunyai berat molekul tinggi atau polimer sintetik (Rantam, 2003).

Parasit memiliki ukuran yang lebih besar dari bakteri dan virus sehingga mengandung lebih banyak antigen baik dalam jumlah maupun jenis (Baratawidjaja, 1996, Roitt, *et al.*, 1998 dikutip oleh Kusumawardhani, 2003). Antigen yang berasal dari parasit akan menjadi imunogen apabila dikenal sebagai *non self* (benda asing) dengan berat molekul tertentu (Bellanti, 1993) 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 Kusnoto, 2003).

Antigen parasit cacing dapat ditemukan pada beberapa bagian seperti pada permukaan tubuh, antigen internal yang dilepas pada saat pemangsaan pada hospes (ekskresi sekresi), ekspresi dan ganti kulit dan ditemukan juga antigen somatik. Berbagai macam antigen tersebut sangat berkaitan dengan respon imun akibat adanya stimulasi dari antigen tersebut, dengan demikian untuk identifikasi tipe atau strain dari parasit harus mempunyai perangkat antigen yang spesifik terhadap antibodi yang ditimbulkan (Rantam, 2003).

Berdasarkan sumber dan lokasi parasit, antigen parasit terbagi menjadi:

- 1) Eksoantigen terlarut yang berasal dari parasit hidup atau dalam media buatan produk ekskresi berupa metabolit ;
- 2) Antigen somatik terlarut yang berasal dari cacing stadium dewasa atau larva yang hancur atau dari sel permukaan tubuh parasit;
- 3) Parasit yang mati atau fragmen larva cacing, sedangkan berdasarkan stadium dan siklus hidup, antigen terbagi menjadi :
 - 1) Spesifikasi genus, spesies, strain, dan stadium hidup;
 - 2) Parasit yang mengalami perubahan bentuk (el-Massry, 1999 dikutip oleh Kusnoto, 2003).

Pengamatan terhadap antigen cacing dapat dilakukan terhadap protein telur, larva dan cacing dewasa. Protein antigenik pada cacing dewasa yang paling sering digunakan adalah ekskresi sekresi (Pettersson, 1989 dikutip oleh Rossari, 2005), sedangkan antigen ekskresi sekresi merupakan bagian dari protein intestin karena mengandung kelenjar intestin dan semua cairan yang dikeluarkan cacing pada saat makan atau buang produk metabolit dari intestin (Kusnoto, 2003).

Intestin cacing *M. digitatus* dewasa merupakan salah satu organ yang mampu mensekresi dan mengekskresikan hasil metabolit, diantaranya adalah antikoagulan yang didapat dari sifat *haematophagous* cacing *M. digitatus* di habitatnya, yaitu di abomasum, oleh karena itu intestin cacing *M. digitatus* dewasa dapat digunakan sebagai salah satu bahan antigen yang memungkinkan bersifat spesifik.

Informasi tentang eksplorasi secara molekuler *M. digitatus* dewasa ini masih sedikit sekali, hanya saja sebagai acuan kerabat terdekat dari *M. digitatus* yang masih dalam satu famili yaitu *Haemonchus sp.* Kodyman *et al.* (2000) yang

dikutip oleh Puspitawati dkk. (2003) telah melakukan penelitian tentang antigen produk ekskresi dan sekresi mengandung protein yang sangat imunogenik dengan berat molekul 15 kDa dan 24 kDa, sedangkan Lopez *et al.* (1999) menginformasikan bahwa antibodi monoklonal 2a. 15 dihasilkan oleh eksudat oral *H. contortus*, dan diketahui bahwa antigen juga didapatkan pada daerah sepanjang esofagus dan usus serta eksudat L₃. Lastuti dkk (2001) telah meneliti profil protein intestin *Haemonchus sp.* dan diperoleh 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.

Puspitawati dkk. (2003) telah meneliti profil protein intesin *M. digitatus* dewasa dan diperoleh hasil lima fraksi protein yaitu 87,5 kDa, 59,0 kDa, 48,51 kDa, 14,01 kDa, dan 12,44 kDa dengan fraksi yang dominan yaitu fraksi protein dengan berat molekul 59,0 kDa.

Dengan demikian, hal tersebut memberikan gambaran bahwa intestin cacing *M. digitatus* dewasa dapat dikembangkan sebagai sumber antigen, walaupun masih diperlukan analisis yang lebih lanjut agar nantinya didapatkan antigen yang memiliki spesifisitas tinggi

2.2.2 Karakterisasi Antigen Parasit

Ada beberapa metode *electrophoresis* yang dapat digunakan untuk karakterisasi protein antigen yaitu SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), *western blot*, *dot blot* dan elusi. Setiap

metode *electrophoresis* tersebut mempunyai aplikasi yang berbeda menurut tujuan dan kebutuhan yang akan dikehendaki.

Metode SDS-PAGE digunakan untuk menentukan berat molekul protein antigen. Pada SDS-PAGE, protein *dielectrophoresis* dalam detergen ionik, yaitu *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS). Detergen ini akan mengikat residu hidrofobik dari bagian belakang peptida, salah satu dari setiap asam amino, sehingga dapat membuka rantai peptida secara komplit. Dengan demikian protein SDS-kompleks migrasi melalui *polyacrylamide* tergantung pada berat molekulnya. Protein yang kecil bergerak melalui pori gel dengan lebih mudah dan cepat dari pada protein yang besar. Protein yang terpisah terlihat seperti pita (Rantam, 2003). Penggunaan *polycrylamide* dalam teknik ini memiliki keuntungan yaitu menghindarkan terjadinya pita yang cembung pada gel (Wongsosupantio, 1990 dikutip oleh Hendry, 2004). Kelemahan dari SDS-PAGE yaitu protein antigenik yang dideteksi banyak yang tidak spesifik, karena SDS-PAGE menampilkan profil protein antigenik dalam bentuk umum.

Teknik *western blot* digunakan untuk mendapatkan protein antigenik yang lebih spesifik. Protein yang spesifik tersebut dapat diketahui dari ikatan yang terjadi antara protein antigenik dan antibodi. Prinsip kerja dari *western blot* yaitu setelah dilakukan pemisahan protein dengan SDS-PAGE, dilanjutkan dengan mentransfer protein tersebut ke membran nitroselulose dan selanjutnya dilabel dengan antibodi. Hasil ikatan antara protein antigenik dan antibodi tersebut kemudian diwarnai dengan menggunakan pewarnaan yang diinginkan seperti

fast-red atau *commasie blue* (Rantam, 2003). Teknik *western blot* ini nantinya dapat dijadikan acuan untuk melakukan preparasi protein (Elusi).

Selain teknik *western blot*, juga dikenal metode *dot blot*. Metode ini digunakan untuk mengetahui jenis antigen dan tidak bisa digunakan untuk mengetahui berat molekul protein. Namun demikian, estimasi konsentrasi antigen dapat diketahui pada blot yang terbentuk. Metode ini cukup baik untuk digunakan uji atau skrining dengan sampel yang cukup banyak (Rantam, 2003).

Teknik elusi merupakan preparasi protein yang akan menghasilkan protein yang murni (*purified protein*) Dalam proses ini, gel hasil pemisahan (SDS-PAGE) dipotong pada pita / *band* yang spesifik, kemudian potongan tersebut dielusi dengan cara digerus menggunakan pelarut yang cocok yang bertujuan agar protein terlepas dari gel. Bukti bahwa protein tersebut sudah murni hanya dapat secara pasti ditetapkan setelah melakukan *sequencing* (pemetaan susunan asam amino protein). Prosedur analitik yang cukup sederhana namun dapat dipertanggungjawabkan untuk mengukur derajat kemurnian protein adalah SDS-PAGE, yang dapat dikerjakan dengan cepat dan sensitif dan dapat memisahkan polipeptida berdasarkan perbedaan ukurannya (Sutiman dkk. , 1998). Pada metode ini digunakan gel *polyacrylamide* karena dengan gel ini endosmosis serta difusi tidak terjadi. Kelemahan dari pemakaian gel ini untuk preparatif ialah lebih sulitnya pelepasan fraksi protein dari gel (Hendry, 2004).

BAB III

MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksploratif laboratorik, yaitu untuk mendeskripsikan tentang protein spesifik yang diisolasi dari intestin *M. digitatus* dewasa dengan teknik preparasi gel *electrophoresis* (ELUSI), oleh karena itu penelitian ini termasuk penelitian deskriptif.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi, Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dan *Tropical Disease Center* (TDC) Universitas Airlangga pada bulan Mei sampai bulan Oktober 2005.

3.3 Bahan dan Alat Penelitian

3.3.1 Bahan Penelitian

Penelitian ini menggunakan intestin cacing *M. digitatus* dewasa yang diisolasi dari abomasum sapi penderita *mecistocirrusis* yang berasal dari Rumah Potong Hewan (RPH) Pegirian Surabaya.

Bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini antara lain adalah: *Phospat Buffer Saline* (PBS) pH 7,4, *acrylamide*, Tris HCl pH 6,8 dan pH 8,8, *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS) 0,5 %, aquades, tetramethyldiamin (temed),

Ammonium Persulphate (APS) 10 %, *electrophoresis buffer*, *laemmli buffer*, metanol 5 % dan 50 %, asam asetat 7,5 %, glutaraldehyd 5 %, NaOH 0,36 %, NH₃ 25 %, AGNO₃, formaldehyd 37 %, asam sitrat 5 %, butanol, *marker rainbow*, acetic acid 10 %, gliserin 10 %.

3.3.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah: nampan plastik, cawan petri, tabung *ependorf*, konikel cup, *object glass*, mikroskop *dissecting*, kertas label, *tissue*, *sprit disposable*, sentrifus, termos, *freezer*, magnetik bar dan stirrer, kertas saring, pipet plastik, pipet *ependorf*, tip, sonikator, gelas ukur, botol *blue cup*, erlenmeyer, pH meter, kertas *whatmann*, *elektroelusi*, plastik selofan, *power supply*, *chamber SDS-PAGE*, *glass plate*, *comb*, *cutter*, *shacker*. Gambar beberapa alat penelitian dapat dilihat pada Lampiran 3.

3.4 Metode Penelitian

3.4.1 Isolasi cacing *M. digitatus*

Cacing dewasa *M. digitatus* disolasi dari bagian abomasum sapi yang berasal dari Rumah Potong Hewan (RPH) Pegirian Surabaya. Isi abomasum dikeluarkan dan ditempatkan pada nampan plastik untuk pemeriksaan adanya cacing *M. digitatus*. Cacing yang ditemukan dicuci dengan PBS pH 7,4 beberapa kali hingga bersih (kurang lebih 3 kali). Cacing yang ditemukan hanya diambil yang masih hidup, kemudian ditempatkan pada cawan petri yang berisi PBS pH 7,4.

3.4.2 Isolasi intestin Cacing *M. digitatus*

Cacing *M. digitatus* dewasa yang telah diisolasi kemudian dipreparasi di bawah mikroskop *dissecting* dengan menggunakan teknik bedah saluran pencernaan untuk mengisolasi intestinnya. Intestin diambil dengan cara memotong bagian anterior cacing (esofagus) dan bagian posterior cacing sedikit, kemudian bagian median tubuh cacing disayat dengan hati-hati dan intestin dikeluarkan dari tubuh cacing dengan memisahkannya dari uterus pada cacing betina dan pada cacing jantan dipisahkan dari organ reproduksi seperti bursa kopulatorik. Intestin yang telah terkumpul tersebut kemudian disimpan dalam tabung *ependorf* yang berisi PBS pH 7,4 pada temperatur -30° C yang dipersiapkan untuk proses homogenasi protein.

3.4.3 Pembuatan Homogenat intestin *M. digitatus*

Pembuatan homogenat dilakukan dengan teknik sonikasi, yaitu intestin *M. digitatus* yang disimpan pada -30° C di *thawing*, kemudian dilakukan pencucian dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali, selanjutnya dihancurkan dengan gelombang ultrasonik (sonikator), dengan tabung dalam sebuah rak yang terendam dalam air es untuk menjaga agar protein intestin tidak rusak karena efek panas dari proses sonikasi. Sonikasi dilakukan dengan frekuensi 35 kHz selama 3×1 menit dengan interval waktu istirahat satu menit. Sonikasi dinyatakan berhasil bila intestin cacing hancur sempurna menjadi homogenat. Suspensi hasil sonikasi disentrifus 5000 rpm selama 10 menit, bagian supernatan diambil dan dipisahkan

dari peletnya, kemudian disimpan dalam *freezer* pada temperatur -30° C atau siap digunakan untuk bahan analisa protein dengan SDS-PAGE.

3.4.4 Pembuatan Antibodi Poliklonal

Pembuatan antibodi poliklonal digunakan untuk uji identifikasi protein dengan teknik *western blot*. Pembuatan antibodi poliklonal ini dilakukan dengan menginjeksikan homogenat intestin cacing *M. digitatus* pada kelinci dengan dosis 760 μ gram/ekor. Sebanyak tiga ekor kelinci jantan ras Australia umur tiga bulan diinjeksi dengan protein *M. digitatus*, injeksi dilakukan secara subkutan dengan menambahkan *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) pada imunisasi pertama dan *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA) pada imunisasi ulang (booster). Imunisasi dilakukan sebanyak empat kali dengan interval waktu dua minggu. Dua minggu setelah *booster* terakhir dilakukan pengambilan darah kelinci, kemudian disentrifugasi untuk mendapatkan serum yang mengandung antibodi poliklonal anti-*M. digitatus* (Kusnoto, 2003).

3.4.5 Analisis Protein dengan Teknik SDS-PAGE

Analisis protein dengan teknik SDS-PAGE digunakan untuk memperoleh profil protein intestin *M. digitatus* dewasa yang pada akhirnya dapat dijadikan sebagai acuan dalam melakukan identifikasi protein dengan teknik *western blot*. Analisis protein dengan teknik SDS-PAGE pada penelitian ini menggunakan larutan *separating gel* 12 % dan larutan *stacking gel* 5 % (komposisi dapat dilihat pada lampiran 1). Adapun cara kerja dari SDS-PAGE sebagai berikut:

larutan *separating gel* 12 % yang telah dibuat segera dimasukkan pada *glass plate* pada posisi vertikal, dilanjutkan dengan pemberian butanol 5% di atasnya sampai mengeras, kemudian butanol 5 % dibuang dan dibersihkan dengan *electrophoresis buffer* dan dikeringkan dengan kertas *whatmann*. Larutan *stacking gel* 5 % yang telah dibuat segera dimasukkan pada *glass plate* (diatas *separating gel*), *comb* dimasukkan dan ditunggu sampai mengeras, sehingga gel siap digunakan.

Gel yang siap digunakan diambil *comb*-nya dan dicuci dengan *electrophoresis buffer*, kemudian *glass plate* yang berisi gel dimasukkan ke dalam *chamber* SDS-PAGE yang berisi *electrophoresis buffer* sebanyak kurang lebih 400 ml. Sampel dicampur dengan *laemmli buffer* dengan perbandingan 1:1, kemudian dipanaskan 100⁰C selama lima menit. Sampel yang telah dipanaskan dan *marker* kemudian dimasukkan pada sumuran gel dengan pipet *eppendorf*, selanjutnya dilakukan *running* dengan menjalankan *power supply* pada kekuatan 40 mA dan tegangan 125 V hingga reaksi gel sudah sampai bawah, kemudian dimatikan dan *plate* dibuka. Gel hasil *running* dicuci dengan buffer sebanyak tiga kali. Pencucian pertama menggunakan 25 ml metanol 50 %, 3,75 ml asam asetat 7,5 % dan 21,25 ml aquades selama 30 menit. Pencucian kedua menggunakan 2,5 ml metanol 5%, 3,75 ml asam asetat 7,5 % dan 93,75 ml aquades selama 20 menit. Pencucian ketiga menggunakan glutaraldehid 10 % selama 25 menit.

Proses pencucian yang telah selesai dilakukan kemudian dilanjutkan proses pewarnaan menggunakan pewarnaan *silver* selama 15 menit. Dilanjutkan dengan pencucian menggunakan 100 ml aquades selama dua menit sebanyak dua kali. Proses berikutnya adalah pemberian pengembang warna sampai *band*

terlihat pada gel, selanjutnya dilakukan proses penghentian pengecatan menggunakan asam asetat 10 %, untuk pengawetan larutan diganti dengan larutan gliserin 10 %. Selama proses pencucian sampai tahap akhir gel dimasukkan pada cawan petri dan diletakkan di atas *shacker* (Rantam, 2003). Hasil SDS-PAGE kemudian dilakukan perhitungan berat molekul protein untuk memperoleh profil protein intestin cacing *M. digitatus* dewasa.

3.4.6 Identifikasi Protein dengan Teknik *Western Blot*

Proses identifikasi protein dengan teknik *western blot* diawali seperti pada proses SDS-PAGE, namun setelah running protein ditransfer dari gel ke membran nitroselulose (PVDF) menggunakan *blotter*. PVDF (*Polivinylidene Difluoride*) blot diblok dengan 10 % BSA kemudian dicuci dengan larutan PBS dua kali. Dan direaksikan dengan antibodi poliklonal. PVDF diinkubasi pada suhu ruang, dicuci dengan PBS tiga kali, kemudian ditambahkan konjugat *anti-rabbit* yang dilabel alkalin fosfatase dan substrat 4-NPP dan diwarnai dengan *western blue* (Rantam, 1997). Akhirnya PVDF dikeringkan di udara pada suhu ruang, kemudian ditentukan protein spesifik dan berat molekul protein spesifik intestin *M. digitatus*.

3.4.6 Isolasi Protein dengan Teknik ELUSI

Isolasi protein dengan teknik ELUSI dilakukan dengan mengacu pada hasil identifikasi protein dengan teknik *western blot*. Proses preparasi gel *electrophoresis* (ELUSI) ini diawali seperti proses SDS-PAGE, akan tetapi setelah

proses *running*, gel hasil *running* tidak diwarnai seperti halnya pada prosedur SDS-PAGE. Perbedaan lainnya terlihat pada jumlah kolom pada gel, pada satu gel SDS-PAGE dapat terdiri dari sepuluh kolom, sedangkan pada gel yang dipakai pada elusi hanya digunakan satu kolom untuk marker dan sisa gel lainnya dibuat menjadi satu kolom yang lebar. Sampel yang dibutuhkan untuk proses elusi kurang lebih sebanyak 180 μ l hal ini dikarenakan sampel yang dibutuhkan untuk satu kolom pada gel kurang lebih 20 μ l, untuk elusi sembilan kolom dijadikan menjadi satu kolom sehingga sembilan kolom tersebut dikalikan dengan 20 μ l menjadi 180 μ l (Rantam, 1997).

Pada proses *ELUSI*, setelah *running*, dilanjutkan dengan pemotongan *marker* untuk selanjutnya marker tersebut diwarnai menggunakan pewarnaan *silver*. *Marker* yang telah diwarnai nantinya berguna sebagai acuan pada proses pemotongan gel *band* atau pita yang diinginkan. Gel hasil pemotongan tersebut kemudian dimasukkan dalam plastik selofan. Setelah gel masuk ke dalam selofan, ujung selofan bagian bawah diikat dan dilanjutkan dengan penambahan cairan PBS satu kali 2 ml. Ujung selofan kemudian diikat pada bagian atasnya. Setelah itu dilakukan proses *running* pada *electroelusi* yang telah ditambahkan larutan buffer 500 μ l dengan cara meletakkan selofan tersebut pada kutub anoda katoda yang ada pada *electroelusi* dengan tegangan 125 volt, 40 mA. Proses ini dilakukan kurang lebih selama 45 menit. Tujuan dari proses ini adalah memisahkan protein antigen dengan gel sehingga nantinya didapatkan cairan hasil protein antigen yang telah dimurnikan dan gel.

Cairan hasil *running* yang terdapat dalam selofan kemudian dimasukkan dalam tabung *eppendorf* dan dapat disimpan pada suhu -30°C (Rantam, 1997). Untuk memastikan protein antigen tersebut sudah murni atau tidak, hasil *elusi* tersebut kemudian dianalisis kembali dengan teknik SDS-PAGE.

Hasil SDS-PAGE berupa *band* (pita) diukur untuk menghitung berat molekul sampel. Menurut Rybicki dan Purves (1996), berat molekul (BM) atau massa molekul relatif (Mr) ditentukan berdasarkan log BM atau log Mr dari protein standar dan nilai Rf (*Retardation factor*). Nilai Rf merupakan perbandingan antara jarak migrasi molekul protein dengan jarak migrasi zat warna. Kemudian mencari persamaan dengan menentukan kurva standar dari Rf dan log BM atau log Mr. Sampel yang diketahui dibaca sebagai log Mr dari sampel setelah menghitung Rf pada agar yang sama.

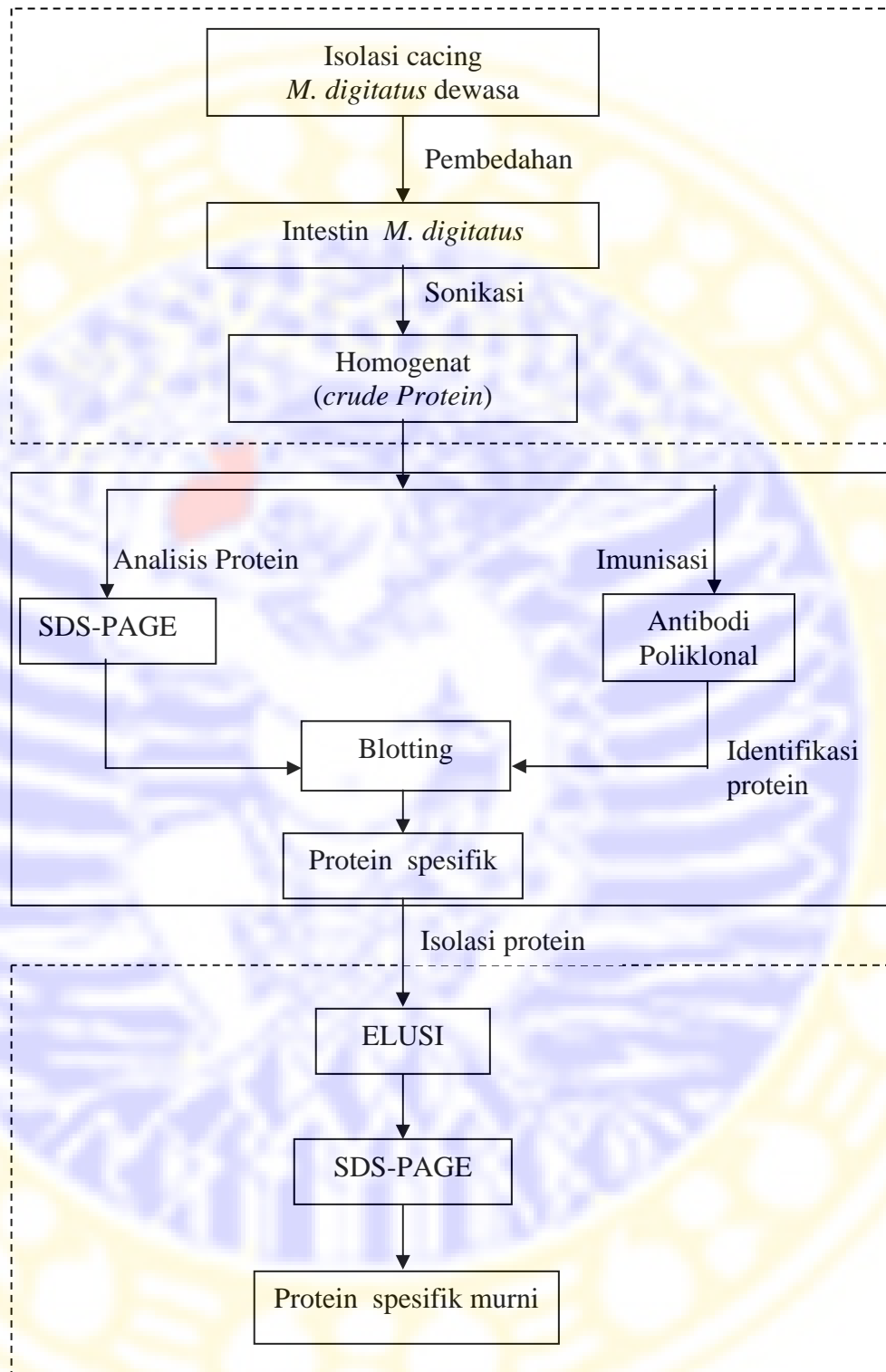
Menurut Meyer dan Warker (1987), untuk menghitung nilai Mr dari protein yang belum diketahui, mula-mula log 10 Mr dari protein standar dihitung. Kemudian menghitung mobilitas relatif yaitu perbandingan jarak perpindahan protein dengan jarak perpindahan warna.

Menurut Rantam (2003) penentuan BM antigen atau antibodi dilakukan dengan menghitung nilai Rf dari setiap *band* dengan rumus sebagai berikut:

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

Massa molekul relatif ditentukan dengan cara mengkonversi data nilai Rf dan massa molekul relatif dari protein standar. Nilai Rf disimbolkan dengan X, sedangkan Y adalah logaritma massa molekul relatif (log Mr) protein standar.

Nilai R_f dinyatakan sebagai nilai X (variabel bebas) dan nilai $\log BM$ atau $\log \textit{marker}$ dalam satuan Dalton (Da) dinyatakan sebagai nilai Y (variabel terikat). Kemudian mencari persamaan regresi yang sesuai. Setelah persamaan regresi didapat, nilai X (R_f) sampel dimasukkan ke dalam persamaan untuk mendapatkan nilai berat molekul (BM) protein sampel.



Gambar 3.1. Kerangka Operasional Penelitian

Keterangan:----- = dilakukan

———— = tidak dilakukan

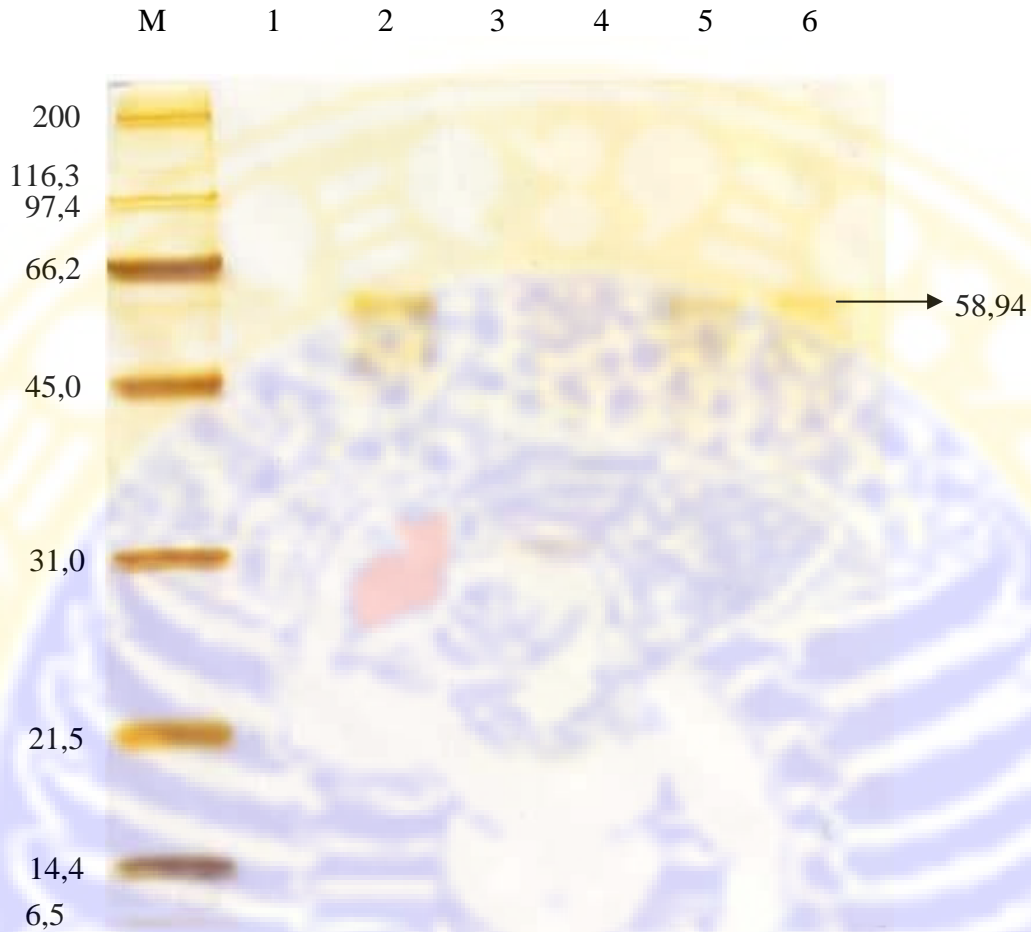


BAB IV

HASIL PENELITIAN

Hasil analisis protein dari intestin *M. digitatus* dewasa dengan teknik SDS-PAGE didapatkan 11 fraksi protein (seperti terlihat pada Lampiran 4), untuk memastikan bahwa hasil analisis protein yang dilakukan merupakan protein spesifik *M. digitatus* dewasa, maka dilakukan identifikasi protein dengan teknik *western blot* menggunakan antibodi poliklonal anti- intestin *M. digitatus* dewasa, dari 11 fraksi protein pada hasil analisis protein dengan SDS-PAGE tidak semua merupakan protein spesifik. Hasil identifikasi protein menunjukkan 6 ikatan protein dengan karakter yang berbeda (seperti terlihat pada Lampiran 5)

Gambaran protein intestin *M. digitatus* dewasa hasil analisis protein dengan teknik SDS-PAGE dan hasil identifikasi protein dengan teknik *western blot* dijadikan acuan untuk melakukan isolasi protein spesifik menggunakan teknik preparasi gel *electrophoresis* (ELUSI). Preparasi protein difokuskan pada protein dengan berat molekul 58,94 kDa dan 14,66 kDa karena pada kedua berat molekul tersebut terjadi ikatan antara antigen intestin *M. digitatus* dengan antibodi poliklonal anti-intestin *M. digitatus* dan relatif tidak terjadi ikatan yang sama dengan intestin *Haemonchus sp.*, kemudian hasil preparasi protein tersebut dilakukan SDS-PAGE kembali. Hasil analisis tersebut tampak seperti pada Gambar 4.1



Gambar 4.1 Analisis Protein Intestin *M. digitatus* Dewasa Hasil Elusi dengan Teknik SDS-PAGE

Keterangan : M = marker (Sigma)

Kolom 1-6 = intestin *M. digitatus*

Gambar 4.1 menunjukkan analisis protein hasil isolasi (elusi) dari intestin *M. digitatus* dewasa dengan teknik SDS-PAGE, yang diperoleh satu pita protein, sedangkan untuk menentukan berat molekul (BM) protein dilakukan penghitungan menggunakan persamaan regresi antara nilai Rf dan log BM (seperti terlihat pada Lampiran 6).

Hasil analisis protein elusi dari intestin *M. digitatus* dewasa diperoleh satu fraksi protein dengan berat molekul 59,21 kDa, yang pada hakikatnya adalah fraksi protein dengan berat molekul 58,94 kDa, dengan pita protein yang tampak tebal dan sedikit *smear*, sedangkan preparasi protein pada berat molekul 14,66 kDa tidak berhasil dilakukan seperti tampak pada Gambar 4.1 yang tidak didapatkan pita protein yang diinginkan.

BAB V

PEMBAHASAN

Gambaran protein intestin *M. digitatus* dewasa hasil analisis protein dengan teknik SDS-PAGE dan hasil identifikasi protein dengan menggunakan teknik *western blot* dijadikan acuan untuk melakukan isolasi protein menggunakan teknik preparasi gel *electrophoresis* (ELUSI). Tahap elusi ini berguna untuk mendapatkan protein murni (*purified protein*) yang dapat digunakan sebagai bahan diagnostik *mecistocirrusis*. Purifikasi protein akan meningkatkan spesifisitas protein dibanding dengan *crude extract*. Isolat murni yang didapatkan mempunyai potensi untuk digunakan sebagai bahan diagnostik dengan sensitifitas tinggi (Abdel-Rahman, 2000).

Pada tahap elusi difokuskan pada protein dengan berat molekul (BM) 58,94 kDa dan 14,66 kDa karena pada kedua berat molekul tersebut terjadi ikatan antara antigen intestin *M. digitatus* dan antibodi poliklonal anti-intestin *M. digitatus* dan relatif tidak terdapat ikatan yang sama dengan intestin *Haemonchus sp*, sehingga memiliki nilai spesifitas yang tinggi, setelah tahap elusi dilakukan, untuk memastikan keberadaan protein murni hasil isolasi protein intestin *M. digitatus* tersebut perlu dilakukan kembali SDS-PAGE pada setiap protein.

Analisis protein hasil elusi dengan teknik SDS-PAGE dari intestin *M. digitatus* diperoleh satu pita protein dengan berat molekul 59,21 kDa, yang pada hakikatnya adalah fraksi protein dengan berat molekul 58,94 kDa.

Menurut Kusnoto (2003) perhitungan menggunakan regresi akan menimbulkan kemungkinan adanya perbedaan relatif dalam menentukan jarak pita protein maupun panjang dan awal pengukuran gel, maka kemungkinan ada beberapa pita protein yang memiliki sedikit perbedaan dengan peneliti lain, tetapi sebenarnya yang dimaksud adalah pita protein yang sama.

Gambar 4.1 menunjukkan protein dengan berat molekul 58,94 kDa tampak pita yang tebal dan sedikit *smear*. *Smear* pada pita protein (*band*) dapat terjadi karena adanya peningkatan denaturasi protein sampel pada waktu preparasi sampel atau selama proses *electrophoresis*, sehingga mengakibatkan degradasi protein pada hasil separasi. Menurut Sutiman dkk. (1998) beberapa faktor yang berpengaruh dalam separasi yaitu konsentrasi *acrylamid* dan *bisacrylamid*, pH *buffer*, kekuatan ionik dan lama waktu *running*.

Preparasi protein dengan berat molekul 14,66 kDa tidak berhasil dilakukan seperti tampak pada Gambar 4.1 yang tidak didapatkan pita protein yang diinginkan, bahkan gel tampak kurang bersih. Pita protein dengan berat molekul 14,66 kDa tidak muncul karena kadar proteinnya rendah. Menurut Purwaningsih (2003) intensitas pita protein ditentukan oleh konsentrasi sampel yang digunakan waktu *running*, untuk sampel dengan konsentrasi rendah maka pita protein tidak muncul atau kemunculannya dengan intensitas yang lemah sehingga sulit diamati.

Hasil identifikasi protein dengan teknik *western blot* menunjukkan bahwa protein dengan berat molekul 88,63 kDa, 40,24 kDa, dan 25,17 kDa selain terdeteksi pada cacing *M digitatus* juga ditemukan pada cacing *Haemonchus sp.* Hal ini menunjukkan terjadinya ikatan protein (antigen) cacing *M. digitatus* dan

cacing *Haemonchus sp.* terhadap antiserum. Sehingga protein tersebut bukan merupakan protein spesifik dan kemungkinan dapat menghasilkan reaksi silang jika dipakai dalam pembuatan bahan diagnostik. Perbandingan dengan cacing *Haemonchus sp.*, karena *Haemonchus sp.* merupakan cacing yang mempunyai famili, habitat dan hospes yang sama dengan *M. digitatus* (Puspitawati, 2001^b).

Hasil analisis intestin *Haemonchus sp.* dalam penelitian Lastuti dkk. (2001) didapatkan 13 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. Sedangkan Kodyman *et al.* (2000) menyatakan bahwa protein produk ekskresi-sekresi (ES) *Haemonchus contortus* pada berat molekul 15 kDa dan 24 kDa merupakan protein yang spesifik dan imunogenik yang mampu membangkitkan IgE pada domba berumur sembilan bulan. Pada intestin *Haemonchus sp.* juga didapatkan protein dengan berat molekul 24 kDa dan 14,9 kDa yang tentunya dapat diasumsikan sebagai protein spesifik dan imunogenik. Namun pada penelitian Arisandy (2005) diperoleh protein yang spesifik dari ES *Haemonchus contortus* dengan berat molekul 33,5 kDa dan 29,4 kDa, perbedaan ini diduga karena perbedaan strain pada cacing *Haemonchus*. Selanjutnya Kusumawardhani (2003) telah melakukan identifikasi fraksi protein *whole Haemonchus contortus* dewasa yang imunogenik menggunakan teknik *immunoblotting*, lebih lanjut dinyatakan bahwa terdapat delapan pita protein yang imunogenik dengan enam pita protein yang terwarnai tebal yaitu protein dengan berat molekul 39,1 kDa, 22,4 kDa, 15 kDa, 11,7 kDa, 9 kDa, dan 5 kDa. Pada intestin *Haemonchus sp.* juga didapatkan protein dengan berat molekul 41,2 kDa dan 14,9 kDa yang

tentunya juga dapat diasumsikan sebagai protein spesifik dan imunogenik pada cacing *Haemonchus sp.* Hal ini membuktikan adanya reaksi silang antara cacing *M. digitatus* dengan cacing *Haemonchus sp.* pada protein dengan berat molekul 40,24 kDa dan 25,17 kDa.

Hasil identifikasi protein intestin *M. digitatus* dengan berat molekul 8,85 kDa tidak diisolasi karena mempunyai berat molekul yang relatif rendah, meskipun berat molekul tersebut merupakan protein yang spesifik. Menurut Tizzard (1988) bahwa molekul besar jauh lebih baik berlaku sebagai antigen dari pada molekul kecil, meskipun sifat antigenitas ditentukan juga oleh keasingan dan kompleksitas fisikokimiawi yang lain seperti kekakuan dan kerumitan makromolekul. Menurut Bellanti (1993) imunogen yang efektif mempunyai berat molekul lebih besar dari 10.000 dalton.

Dengan demikian fraksi protein intestin *M. digitatus* dengan berat molekul 58,94 kDa merupakan protein spesifik yang berhasil diisolasi dengan teknik ELUSI dan dapat digunakan sebagai komponen yang dapat dimanfaatkan untuk diagnosis mecostocirrusis.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Protein spesifik intestin *M. digitatus* dewasa dengan berat molekul 58,94 kDa dapat diisolasi dengan teknik preparasi gel *electrophoresis* (ELUSI).

6.2 Saran

1. Perlu dilakukan uji lebih lanjut tentang antigenitas, sensitifitas, dan spesifisitas terhadap protein intestin *M. digitatus* dewasa yang telah berhasil diisolasi.
2. Protein yang telah berhasil diisolasi dikembangkan sebagai bahan diagnostik mecistocirrusis secara serologis.

RINGKASAN

JULIANI FITRIYAH. Isolasi Protein Spesifik Intestin Cacing *Mecistocirrus digitatus* Dewasa Dengan Teknik ELUSI. Di bawah bimbingan Lianny Nangoi, M.S., Drh. sebagai pembimbing pertama dan Nunuk Dyah Retno L., M.S., Drh. sebagai pembimbing kedua.

Mecistocirrus digitatus merupakan salah satu nematoda gastrointestinal yang dapat menginfeksi abomasum berbagai ruminansia, diantaranya sapi, dengan tingkat prevalensi di daerah tropis yang relatif tinggi. Prevalensi yang tinggi ini perlu mendapat perhatian khusus agar langkah pengendalian mencapai sasaran dengan baik, dengan didukung adanya diagnosis yang tepat dan akurat. Diagnosis pada mecistocirrusis dengan melihat gejala klinis dapat dikacaukan dengan haemonchosis, sedangkan diagnosis dengan pemeriksaan feses membutuhkan waktu yang lama, sehingga diperlukan diagnosis yang lebih dini dan spesifik pada mecistocirrusis dengan mengembangkan uji serologis menggunakan protein spesifik dari *M. digitatus*. Teknik preparasi gel *electrophoresis* (ELUSI) merupakan salah satu metode untuk mendapatkan protein yang murni (*purified protein*). Pemurnian protein akan meningkatkan spesifisitas protein, sehingga protein tersebut mempunyai potensi untuk digunakan sebagai bahan diagnostik

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi protein spesifik intestin *M. digitatus* dewasa dengan teknik elusi yang diharapkan dapat digunakan sebagai bahan diagnostik mecistocirrusis secara serologis.

Sampel intestin cacing *M. digitatus* dewasa diperoleh dari pembedahan cacing *M. digitatus* dewasa yang diisolasi dari abomasum sapi penderita *mecistocirrusis*. Intestin yang diperoleh disonikasi dengan frekuensi 35 kHz selama 3x1 menit dengan interval waktu istirahat selama satu menit, kemudian dilakukan analisis protein dengan teknik SDS-PAGE untuk memperoleh profil protein intestin cacing *M. digitatus* dewasa, sedangkan untuk memastikan bahwa hasil analisis protein yang dilakukan merupakan protein yang spesifik intestin *M. digitatus* dewasa dan memberikan dasar pada saat dilakukan isolasi protein, selanjutnya dilakukan identifikasi protein dengan teknik *western blot* menggunakan antibodi poliklonal anti-intestin *M. digitatus*. Tahap berikutnya dilakukan isolasi protein dengan teknik preparasi gel *electrophoresis* (ELUSI). Hasil isolasi protein spesifik tersebut kemudian dianalisis kembali menggunakan teknik SDS-PAGE untuk memastikan protein yang berhasil disolasi pada berat molekul yang tepat.

Penelitian ini berhasil mengisolasi protein spesifik intestin *M. digitatus* dewasa dengan berat molekul 58,94 kDa menggunakan teknik preparasi gel *electrophoresis* (ELUSI).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan disarankan perlunya melakukan uji lebih lanjut tentang antigenitas, sensitifitas, dan spesifisitas terhadap protein intestin *M. digitatus* dewasa yang telah berhasil disolasi dan protein yang telah berhasil diisolasi tersebut dikembangkan sebagai bahan diagnostik *mecistocirrusis* secara serologis.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdel-Rahman, E. H., K.N.Abdel-Megeed and M. A. Hassanain. 2000. *Structural Characterization and Immunocatalization of Egg Antigens Crossreact With Toxocara vitolorum, Fasciola gigantica and Moniezia expanza*. Abstract. J. Egypt. Soc. Parasitol. 30(2):581-91
- Arisandy D. 2005. *Profil Protein Ekskresi-Sekresi Haemonchus contortus Dewasa yang Imunogenik Dengan Teknik Immunobloting*. Skripsi Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya
- Baratawidjaja, K. G. 1996. *Imunologi Dasar*, Edisi ke-3. Balai Penerbit FKUI. Jakarta. Hal. 113-121
- 2004. *Imunologi Dasar*, Edisi ke-6. Balai Penerbit FKUI. Jakarta. Hal. 73-77
- Bellanti, J. A. 1993. *Imunologi III. Diterjemahkan oleh Prof. Dr. A. Samik Wahab*. Gajah Mada University press. Hal. 86-95
- Bowman D. D. 1995. *Georgis's Parasitology for Veterinarians*. Sixth edition. A Division of Harcourt Brace & Company. Philadelpia. 165-167
- Dunn A. M. 1978. *Veterinary Helminthology*. William Heinemann Medical Books Ltd. London. 2nd Ed P. 25-26; 29-30
- Harlow, E. N., and D. Lane. 1988. *Antibodies. A laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory. USA
- Hendry, A., 2004. *Isolasi Protein Spesifik Larva Kedua (L₂) Toxocara cati Dengan Teknik Elusi*. Skripsi Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Jithendran K.P, and Bhat T.K. 1999. *Epidemiologi of Parasitosis in Dairy Animals in the North West Humid Himalayan Region of India with Particular Reference to Gastrointestinal Nematodes*. Trop. Anim. Health Prod. 31(4): 205-214
- Kusnoto. 2003. *Isolasi dan Karakterisasi Protein Imunogenik Larva Stadium II Toxocara cati Isolat lokal*. Tesis. Universitas Airlangga. Surabaya
- Kusumamihardja, S. 1993. *Parasit dan Parasitosis pada Hewan Ternak dan Hewan piaraan di Indonesia*. PAU Bioteknologi. IPB. Bogor. Hal.145-146

- 1998. *Pengaruh Pemberian Anthelmintik pada Peningkatan Produksi Susu Sapi Perah di Pengalengan Jawa Barat*. Prosiding Seminar Nasional V. Bogor. Hal. 319-323
- Kusumawardhani, I., 2003. *Identifikasi Fraksi Protein Whole Haemonchus contortus Dewasa yang Imunogenik dengan Menggunakan Teknik Immunobloting*. Skripsi Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Lastuti N. D. R., Mufasirin, Bimo Aksono HP. 2001. *Profil Protein Intestin Haemonchus contortus Dewasa*. Laporan Penelitian. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga. Surabaya
- 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(4):397-405
- Meyer R. J., and J. H. Warker. 1987. *Immunochemical Methods in Cell and Molekuler Biology*. Academic Press Inc Harcourt Brace Javanich Publisher. 61-95, 179, 259
- Mumpuni S., Subekti S., Puspitawati H. 2001. *Profil Morfologi Telur Cacing yang Habitatnya pada Abomasum Domba/Kambing dengan Scanning Electron Microscope (SEM)*. Laporan Penelitian. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga. Surabaya
- Noble E. R., dan Noble G. A. 1989. Diterjemahkan oleh Drh. Wardiarso. *Biologi Parasit Hewan*. Edisi ke-5. Universitas Gadjah Mada. University Press. Hal. 540-543
- Purwaningsih A. 2003. *Identifikasi Protein Daging Sapi dan Babi dengan Elektroforesis Gel Poliakrilamid-Sodium Dodesil Sulfat (SDS-PAGE)*. Tesis. Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga. Surabaya
- Puspitawati P. 2001^a. *Profil Morfologi Cacing Haemonchus sp dan Mecistocirrus digitatus dengan Pewarnaan Carmine, dan Scanning Electrone Microscope (SEM)*. Tesis. Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga. Surabaya
- 2001^b. *Cacing Mecistocirrus digitatus dan Haemonchus sp. pada Sapi Madura dan Peranakan Ongole (PO) di RPH Pegirian Surabaya*. Media Kedokteran Hewan Unair. Vol.17. (1): 41-44

- Mufasirin, Subekti S. 2003. *Profil Protein Intestin Cacing Mecistocirrus digitatus Dewasa*. Laporan Penelitian Lembaga Penelitian Universitas Airlangga. Surabaya
- Rantam, F. A. 1997. *Borna Virus and Cell Culture. Isolation Infections Bornavirus from Human and Animal and Their Characterization*. Diss. Vet. Med. FV-Berlin
- 2003. *Metode Immunologi*. Airlangga University Press. Surabaya.
- Rossari R. 2005. *Isolasi Protein Cathepsin L Fasciola spp. Dengan Teknik Elusi*. Skripsi Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya
- Rybicki and M. Purves. 1996. *Enzyme-Assisted Immuno-electroblotting (IEB) or Western Blotting*. Departement of Microbiology University of Cape Town. ([http:// Web. Uct. Ac. Za / microbiology / western. html](http://Web.Uct.Ac.Za/microbiology/western.html))
- Soulsby, E. J. L. 1986. *Helminths, Artropods and Protozoa of Domesticated Animals*. Bailliere Tindall and Cassell London 7th. Ed. P 231-257
- Subekti, B.S.S., R.B. Soedjoko, S. Soehartojo dan N.D.R. Lastuti .1993. *Pola Beternak Sapi Perah dan Pengaruhnya Terhadap Infeksi Cacing (Helminthiasis) di Daerah Dataran Tinggi di Wilayah Propinsi Jawa Timur*. Media Keokteran Hewan. Vol. 9 (1): 44-51
- , Koesdarto, S., Mumpuni, S., Puspitawati, H., Kusnoto, 2002. *Ilmu Penyakit Nematoda*. Laboratorium Helmintologi Universitas Airlangga. Surabaya.
- Sutiman B., Sumitro, Sri Rahayu, Fatiyah, Sri Widyarti, dan Esti. 1998. *Diktat Kuliah dan Praktikum Kursus Teknik-Teknik Dasar Analisis Protein dan DNA*
- Tizzard I. 1988. Terjemahan Masduki P. dan Soehardjo H. *Pengantar Immunologi Veteriner*. Airlangga University Press. Surabaya
- Urquhart, G. M., J. Amor., J.L. Duncan., and F.W. Jennings. 1994. *Veterinary Parasitology*. The University of Glasgow. Scotland. 18-22
- Van Aken D, Vercruyse J, Dargantes AP, Lagapa JT, Raes S, Shaw DJ. 1997. *Pathophysiological Aspects of Mecistocirrus digitatus (Nematoda : Trichostrongylidae) Infections in Calves*. Vet. Parasitol. 69 (3-4): 255-263
- 1998. *Epidemiologi of Mecistocirrus digitatus and Gastrointestinal Nematode Infections in Cattle of Mindanao, Philippines*. Vet. Parasitol.74 (1): 29-41



Lampiran 1. Komposisi Bahan Penelitian1. Komposisi *phospat buffer saline* (PBS) pH 7,4

NaCl	8,0 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Na ₂ PO ₄ 12 H ₂ O	2,9 g
KCl	0,2 g
Aquades	ad 1000 ml

2. Komposisi *separating gel* 12 % (Bio-Metra)

30 % <i>Acrylamide</i> , 0,8 <i>Bis acrylamide</i>	2,5 ml
Tris HCl pH 8,8	1,2 ml
SDS 0,5 %	1,2 ml
Aquades	1,1 ml
Temed	5,0 µl
APS 10 %	30 µl

3. Komposisi *Stacking gel* 5 % (Bio-Metra)

30 % <i>Acrylamide</i> , 0,8 <i>Bis acrylamide</i>	0,33 ml
0,625 M Tris HCl pH 6,8	0,4 ml
SDS 0,5 %	0,4 ml
Aquades	0,87 ml
Temed	2,0 µl
APS 10 %	10 µl

4. Komposisi *laemmli buffer*

Tris HCl pH 6,8	1 ml
Gliserin	0,8 ml
SDS 10 %	1,6 ml
<i>Bromfenol blue</i> 0,5 %	0,4 ml
Mercaptoetanol 5 %	5,0 μ l
Aquades	3,8 ml

5. Komposisi *Electrophoresis buffer*

Tris (hidroxymethyl) aminomethan	30,29 g
Glysin	144,13 g
SDS $\text{CH}_{12}\text{H}_2\text{SO}_4$	10 g
Aquades	ad 1000 ml

6. Komposisi pewarnaan silver

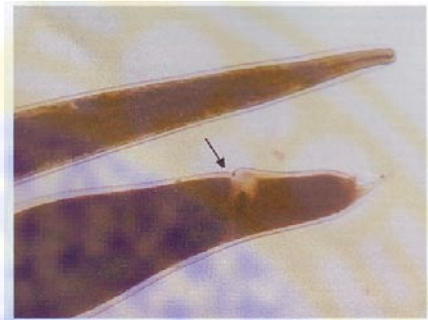
Aquades	73,5 ml
NaOH 0,36 %	21 ml
NH_3 25 %	1,4 ml
AgNO_3 0,8 g dilarutkan dalam 4 ml aquades	

7. Komposisi pengembang warna

Formaldehid 37 %	50 μ l
Asam sitrat (zitronensaure) 0 5 %	100 μ l
Aquades	ad 100 ml

Lampiran 2. Gambar Morfologi Cacing *Mecistocirrus digitatus*

Gambar 1. Bentukan *barber's pole* pada cacing *M. digitatus* betina (Pembesaran 40 ×)



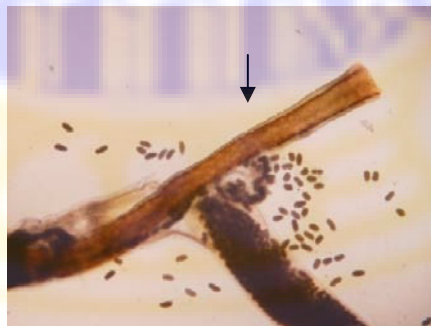
Gambar 2. Vulva tanpa vulva flap pada bagian posterior *M. digitatus* betina (Pembesaran 100 ×)



Gambar 3. Posterior *M. digitatus* betina (Pembesaran 40 ×)



Gambar 4. Spikula pada bagian posterior *M. digitatus* jantan (Pembesaran 40 ×)



Gambar 5. Intestin *M. digitatus* (Pembesaran 40 ×)

Lampiran 3. Gambar Peralatan Penelitian



Gambar 1. Mikroskop *dissecting*



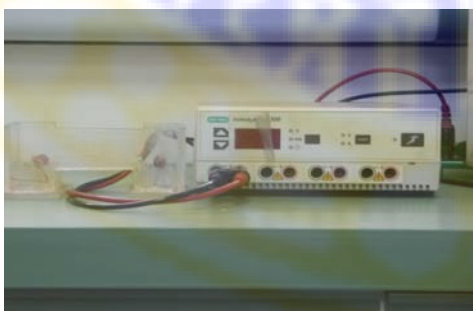
Gambar 2. Sonikator



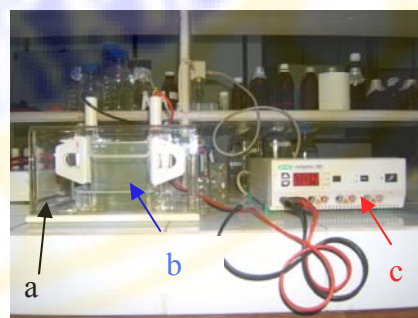
Gambar 3. Mikropipet
(*pipet eppendorf*)



Gambar 4. *Shacker*

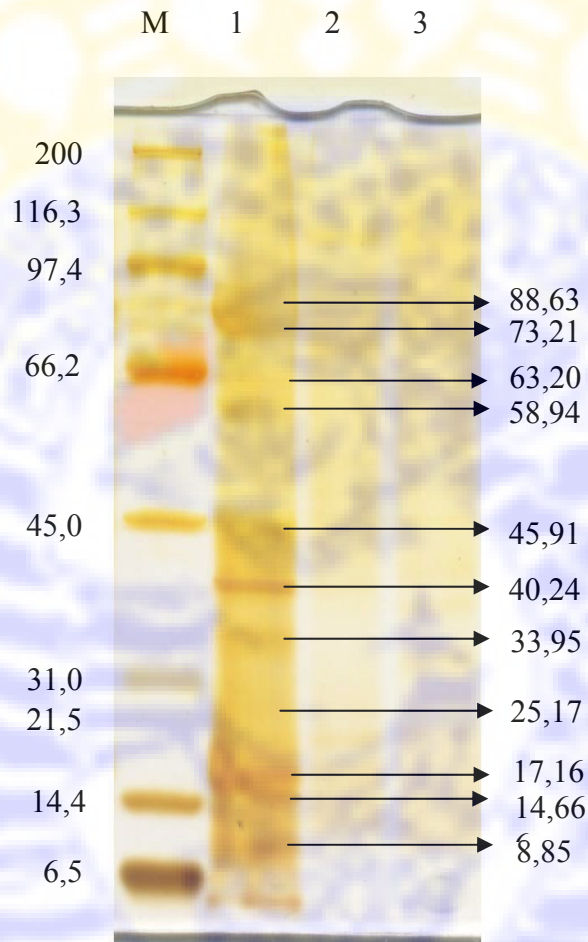


Gambar 5. *Electroelusi*



Gambar 6. (a) *Chamber SDS-PAGE*
(b) *Glass plate*
(c) *Power supply*

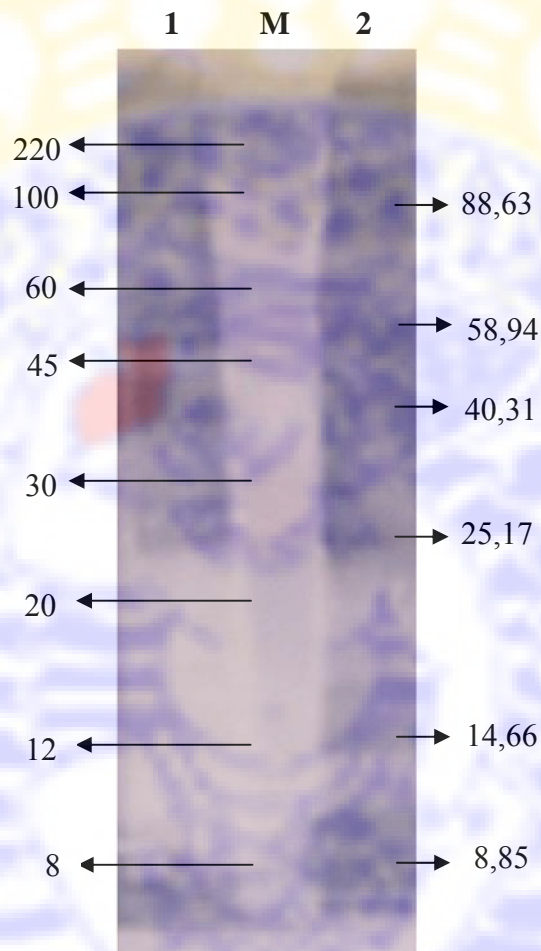
Lampiran 4. Analisis Protein Intestin *M. digitatus* Dewasa dengan Teknik SDS-PAGE



Hasil Analisis Protein Intestin *M. digitatus* dewasa dengan Teknik SDS-PAGE.

Keterangan: M = marker (Sigma)
 Kolom 1 = intestin *M. digitatus*
 Kolom 2 = ekskresi sekresi *M. digitatus*
 Kolom 3 = esofagus *M. digitatus*

Lampiran 5. Identifikasi Protein Intestin *M. digitatus* Dewasa dengan Teknik Western Blot



Hasil Identifikasi Protein Intestin *M. digitatus* Dewasa Terhadap Antibodi Poliklonal Anti-Intestin *M. digitatus*

Keterangan : Kolom 1 = intestin *Haemonchus sp.*

M = marker *Rainbow*

Kolom 2 = intestin *M. digitatus*

Lampiran 6. Analisis Regresi Antara Nilai Rf (x) dan Berat Molekul (log y Da) untuk Menentukan Berat Molekul Protein Spesifik Intestin *M. digitatus* Dewasa Hasil Elusi

Summarize

Case Processing Summary^a

	Cases					
	Included		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Rf	9	100,0%	0	,0%	9	100,0%
Log BM	9	100,0%	0	,0%	9	100,0%

a. Limited to first 100 cases.

Case Summarize^a

band	jarak	Rf	BM(y kDa)	BM(y Da)	Log y(Da)
1	6	0,053	200,00	200000	5,301
2	13	0,114	116,3	116300	5,066
3	17	0,149	97,4	97400	4,989
4	25	0,219	66,2	66200	4,821
5	41	0,360	45,0	45000	4,653
6	64	0,561	31,0	31000	4,491
7	87	0,763	21,5	21500	4,332
8	105	0,921	14,4	14400	4,158
9	112	0,982	6,5	6500	3,813
Total Sum		4,112			41,624
Mean		0,45800			4,62489
Std. Deviation		0,360060			0,474920

Keterangan : ^a = Limited to first 100 cases
Panjang gel = 114 mm

Curve Fit

Model Description

Model Name		MOD_3
Dependent Variable	1	Log BM
Equation	1	Cubic
Independent Variable		Rf
Constant		Included
Variable Whose Values Label Observations in Plots		Unspecified
Tolerance for Entering Terms in Equations		,0001

Cubic

Model Summary

R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
,996	,991	,986	,055

The independent variable is Rf.

ANOVA

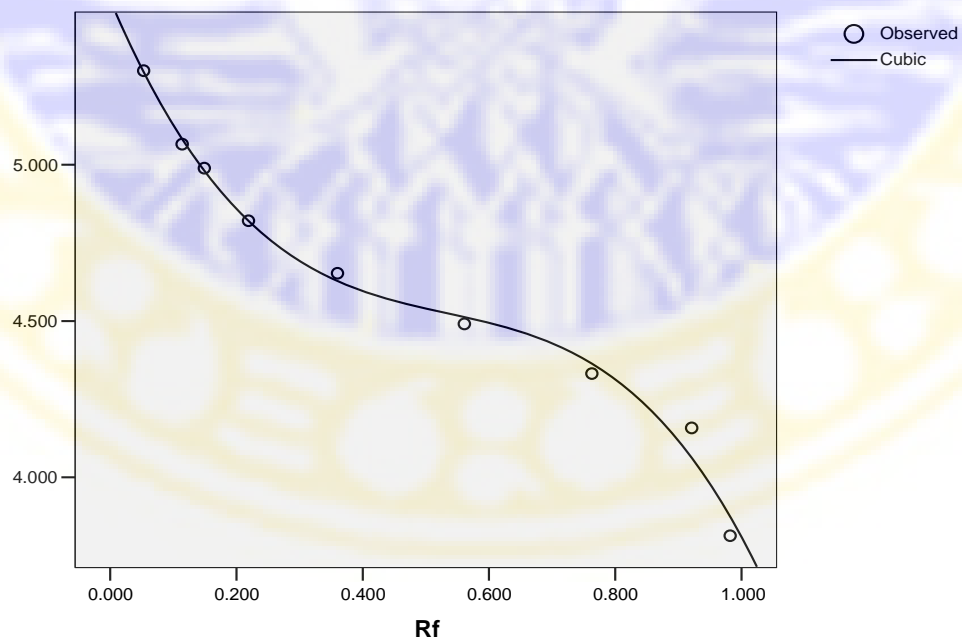
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Regression	1,789	3	,596	193,928	,000
Residual	,015	5	,003		
Total	1,804	8			

The independent variable is Rf.

Coefficients

	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
Rf	-4,760	,704	-3,609	-6,763	,001
Rf ** 2	8,095	1,619	6,480	5,001	,004
Rf ** 3	-5,053	1,033	-3,931	-4,891	,005
(Constant)	5,528	,074		74,773	,000

Log BM



Berdasarkan perhitungan regresi diketahui bahwa terdapat hubungan negatif sangat erat antara nilai Rf dengan berat molekul protein pada marker, koefisien korelasi (r) sebesar -0,996 dengan persamaan garis regresi $(y) = 5,528 - 4,760x + 8,095 x^2 - 5,053 x^3$, kemudian persamaan tersebut digunakan untuk menghitung berat molekul protein spesifik intestin *M. digitatus* dewasa. Hasil perhitungan dapat dilihat pada tabel berikut:

PP* ke	Jarak pada gel	Nilai Rf	Y ** Da	Antilog Y (BM) Da	BM(kDa)
1	28	0,246	4,7723	59197,04	59,21

Keterangan:

PP=Pita protein

**=Persamaan regresi dengan $y=5,528-4,760 x+8,095 x^2-5,053 x^3$
dimana x= Nilai Rf