



LAPORAN PENELITIAN PROYEK DUE-LIKE BACTH III



Judul Penelitian

**DETEKSI PROTEIN CATHEPSIN-L UNTUK PENGEMBANGAN
DIAGNOSIS DISTOMATOSIS DENGAN TEKNIK ELISA**

Ketua Peneliti dan Anggota

Sri Mumpuni Sosiawati, MKes., drh.
Prof. Dr. Sri Subekti B.S., DEA., drh.
Kusnoto, MSi., drh.

Dibiayai oleh Proyek DUE-Like Bacth III Universitas Airlangga
Surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah Penelitian Nomor: 87/PL/DUE-Like/UA/2004

008207141

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
JANUARI 2005

**LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN
LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN PROYEK DUE-Like BACTH III**

Judul : Deteksi Protein *Cathepsin-L* untuk Pengembangan
Diagnosis Distomatosis dengan Teknik ELISA

Ketua Peneliti


Nama : Sri Mumpuni Sosiawati, MKes., drh.
Jenis Kelamin : Perempuan
Pangkat/Golongan : Penata Tingkat I / Gol. III/D
NIP : 130 933 206
Fakultas : Lab. Helmintologi, Fakultas Kedokteran Hewan


Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Jangka Waktu : 6 (enam) bulan

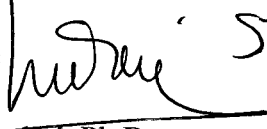
Biaya yang diajukan : Rp30.000.000,00 (Tigapuluh juta rupiah)

Surabaya, Januari 2005
Ketua Peneliti,

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan,

Prof. Dr. Sunudiono, MS., drh.
NIP. 130 687 297


Sri Mumpuni Sosiawati, MKes., drh.
NIP. 130 933 206

Menyetujui,
Direktur Eksekutif LPIU
Universitas Airlangga


Titik Sri Iriandari, Ph.D.
NIP. 131 801 627

RINGKASAN

DETEKSI PROTEIN CATHEPSIN-L UNTUK PENGEMBANGAN DIAGNOSIS DISTOMATOSIS DENGAN TEKNIK ELISA (Sri Mumpuni Sosiawati, Sri Subekti B.S., dan Kusnoto, 35 halaman)

Penggunaan antigen *crude protein* untuk diagnosis distomatosis tidaklah spesifik, karena antigen ini terdiri dari berbagai macam protein sehingga dikenali pula oleh antibodi terhadap cacing lain. Oleh karena itu perlu dilakukan isolasi dan karakterisasi terhadap protein spesifik, agar diperoleh protein murni dengan sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi. Penelitian ini mencoba untuk mengisolasi protein *cathepsin-L* (CatL) yang diperkirakan massa molekul relatif (MR) 27-28 kDa dari protein ES *Fasciola spp* kemudian dilakukan karakterisasi protein. Adanya ikatan antara antigen CatL dengan antibodi anti-CatL merupakan dasar dari penelitian ini.

Penelitian ini secara umum bertujuan memperoleh protein antigenik dengan sensitivitas dan spesifisitas tinggi yang dapat dibakukan untuk pembuatan *kit diagnostik* untuk diagnosis distomatosis melalui pemeriksaan serum darah penderita.

Pada penelitian ini dilakukan isolasi dan karakterisasi protein yang berasal dari protein *excretory-secretory* (ES) dari cacing *Fasciola spp* dengan cara mereaksikan protein murni dengan antibodi poliklonal. Pada tahap pertama *Fasciola spp* dewasa diinkubasikan dengan medium RPMI untuk memperoleh protein ES, selanjutnya protein ES diidentifikasi melalui SDS-PAGE dengan pewarnaan silver. Kedua, protein ditransfer ke membran nitroselulose menggunakan *transblotter* dan direaksikan dengan antibodi poliklonal anti-*Fasciola spp* yang kemudian divisualisasikan melalui konjugat *goat-anti mouse* dan pewarnaan *Western blue*. Ketiga, menentukan fraksi protein dilakukan berdasarkan pada nilai MR dan kemudian dilakukan isolasi protein dengan preparatif gel elektroforesis. Keempat, uji antigenesitas, sensitivitas dan spesifisitas terhadap protein CatL yang berhasil diisolasi pada tahap ketiga maupun protein ES yang diisolasi pada tahap pertama.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa: 1) Telah diketahui 16 macam fraksi protein ES *Fasciola spp*, yaitu pada MR 130, 108, 91, 74, 58, 52, 45, 40, 35, 32, 28, 27, 25, 18, 15, 8 kDa; 2) Telah berhasil diidentifikasi protein menunjukkan duabelas ikatan protein dengan karakter yang berbeda, yaitu protein pada BM 130, 108, 58, 45, 40, 35, 28, 27,

25, 18, 15, dan 8 kDa; 3) Telah berhasil diisolasi protein *cathepsin-L* (CatL) dari ES *Fasciola spp*, yaitu pada BM 27-28 kDa; dan 4) Sebagai bahan uji, protein CatL dengan nilai sensitivitas 63,6% dan nilai spesifisitas 87,5% lebih baik dibanding protein ES dengan sensitifitas 100% tetapi spesifisitasnya 0%.



Dibiayai oleh Proyek DUE-Like Bacth III Universitas Airlangga, Surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah Penelitian Nomor: 87/PL/DUE-Like/UA/2004

SUMMARY

PROTEIN CATHEPSIN-L DETECTION FOR DEVELOPING OF DISTOMATOSIS DIAGNOSTIC BY ELISA TECHNIQUE (Sri Mumpuni Sosiawati, Sri Subekti B.S., and Kusnoto, 35 pp)

The use of crude protein antigen to diagnose of distomatosis is actually not specific, because this type of antigen consists of various proteins that has been recognized by other worms. Therefore, it is necessary to isolate and characterize a specific protein in order to produce a pure protein which has high sensitivity and specivicity for the diagnostic aid of distomatosis. In this research cathepsin-L (CatL) protein with relative molecular mass (MR) 27-28 kDa originated from ES *Fasciola spp* protein was characterized based on the binding amongst CatL and anti CatL antibodies.

This research was aimed to find out antigenic protein with high sensitivity and specivicity for producing a diagnostic kit of distomatosis through blood test of patients.

Isolation and characterization of protein originated from excretory-secretory (ES) of *Fasciola spp* were performed by the reaction of pure protein and polyclonal antibodies. In the first step mature of *Fasciola spp* were incubated in RPMI medium for producing ES protein, this later protein was identified by SDS-PAGE with silver stain. The second step, this protein was transferred to nitrocellulose membrane by using transblotter and reacted with polyclonal antibodies anti-*Fasciola spp* then was visualized through goat-anti mouse conjugate and western blue staining. The third step, the determination of protein fraction were carried out based on the result of MR and then this protein was isolated by preparative gel electrophoresis. The fourth step, tests of antigenicity, sensitivity and specificity for CatL protein which has been isolated in the third step and these procedure has also were carried out for protein ES which has been isolated in the first step.

The results of the research showed: 1). It has been found 16 types of protein fractions ES *Fasciola spp*, ie. in the MR 130, 108, 91, 74, 58, 52, 45, 40, 35, 32, 28, 27, 25, 18, 15, 8 kDa; 2). It has been identified protein which showed 12 protein bound with different characters, that were protein in the molecular weight (MW) 130, 108, 58, 45, 40,

35, 26, 27, 25, 18, 15 and 8 kDa; 3). It has been isolated cathepsin-L (CatL) protein from ES *Fasciola* spp, that was at the MW 27-28 kDa; and 4). As a material for diagnostic test, protein CatL with the points of sensitivity 63.6% and spesificity 87.5% was better than protein ES with the points of sensitivity 100% but its sensitivity was 0%.



DUE-Like Project Bacth III Airlangga University, Contract Number: 87/PL/DUE-Like/UA/2004

PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT, karena perkenannya jugalah penelitian ini dapat diselesaikan. Penelitian ini terselenggara atas bantuan dana melalui Proyek Due-Like Batch III Unair tahun 2004.

Pada kesempatan ini kami sampaikan terima kasih sebesar-sebesarannya atas bantuan moril maupun materiil kepada:

1. Menteri Pendidikan Nasional
2. Ketua LPIU Universitas Airlangga
3. Dekan FKH Universitas Airlangga
4. Semua pihak yang membantu dalam pelaksanaan penelitian ini yang tidak mungkin kami sebut namanya satu persatu. Semoga Allah SWT memberikan balasan sesuai dengan amal kebajikannya.

Surabaya, Januari 2004

Sri Mumpuni Sosiawati, MKes.,drh (Ketua Peneliti)

Prof.Dr. Hj. Sri Subekti B.S., DEA,drh (Peneliti)

Kusnoto, MSi.,drh (Peneliti)

DAFTAR ISI

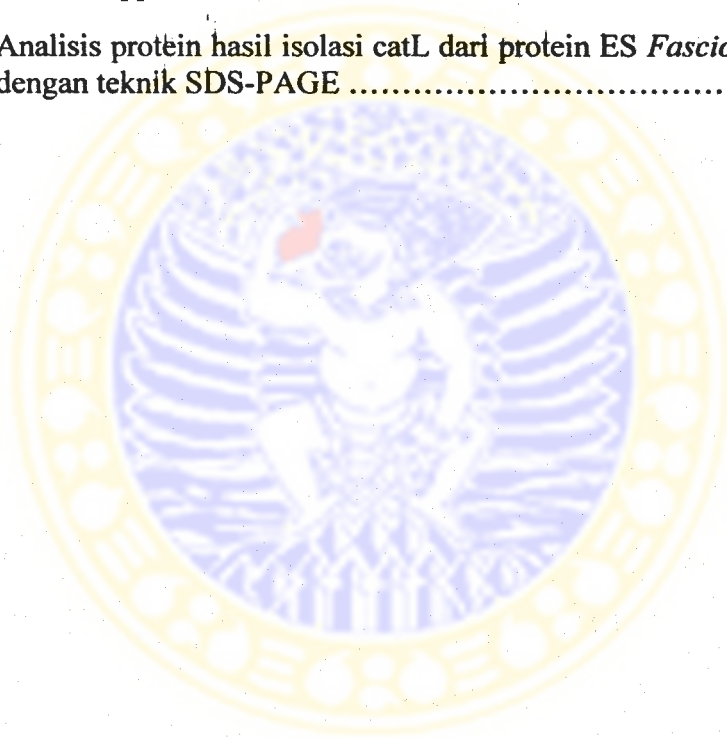
	Halaman
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN DAN SUMMARY	iii
PRAKATA	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Subyek Penelitian	3
1.3 Lokasi Penelitian	3
1.4 Hasil yang Ditargetkan	3
BAB II. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	4
2.1 Tujuan Penelitian	4
2.2 Manfaat Penelitian	4
BAB III. TINJAUAN PUSTAKA	5
3.1 Penyebab Distomatosis	5
3.2 Siklus Hidup <i>Fasciola spp</i>	6
3.3 Gejala Klinis, Patogenesis dan Penyebaran Distomatosis	7
3.4 Antigen <i>Fasciola spp</i>	9
3.4 Diagnosis Distomatosis	10
BAB IV. METODE PENELITIAN	11
4.1 Sampel <i>Fasciola spp</i>	11
4.2 Pembuatan Antibodi Poliklonal	11
4.3 Analisis Protein dengan Teknik SDS-PAGE	11
4.4 Identifikasi Protein dengan Teknik <i>Western Blot</i>	13
4.5 Isolasi Protein	13
4.6 Uji Antigenisitas Protein CatL dan ES Terhadap Serum Sapi dengan Teknik <i>indirect-ELISA</i>	13
4.7 Uji Sensitivitas dan Spesifisitas Protein CatL pada Diagnosis Distomatosis dalam Serum Darah Sapi	14

BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN	15
5.1 Isolasi Sampel <i>Fasciola spp</i>	15
5.2 Analisis Protein dengan Teknik SDS-PAGE	15
5.3 Identifikasi Protein dengan Teknik <i>Western Blot</i>	17
5.4 Isolasi Protein CatL dari <i>Excretory-Secretory (ES) Fasciola spp...</i>	19
5.5 Uji Antigenisitas Protein CatL dan ES Terhadap Serum Sapi dengan Teknik <i>indirect-ELISA</i>	20
5.6 Uji Sensitivitas dan Spesifisitas Protein CatL pada Diagnosis Distomatosis dalam Serum Darah Sapi	22
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN	25
6.1 Kesimpulan	25
6.2 Saran	25
DAFTAR PUSTAKA	26
LAMPIRAN	28



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 3.1 Morfologi <i>Fasciola spp</i>	5
Gambar 3.2 Siklus hidup <i>Fasciola spp</i> secara skematik	7
Gambar 5.1 Hasil isolasi cacing A, hati sapi penderita distomatosis; B, cacing muda (<i>juvenile</i>) dan cacing dewasa <i>Fasciola spp</i>	15
Gambar 5.2 Hasil analisis protein dengan teknik SDS-PAGE	16
Gambar 5.3 Hasil identifikasi protein <i>Fasciola spp</i> terhadap serum anti- <i>Fasciola spp</i>	18
Gambar 5.4 Analisis protein hasil isolasi catL dari protein ES <i>Fasciola spp</i> dengan teknik SDS-PAGE	20



DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 5.1 Hasil Penghitungan Berat Molekul Protein Cacing <i>Fasciola spp</i> pada Gel SDS-PAGE	17
Tabel 5.2 Rata-rata Nilai <i>Optical Density</i> Hasil Pengujian Antigenesitas Protein CatL dan ES <i>Fasciola spp</i> Terhadap Antibodi dengan Teknik <i>Indirect-ELISA</i>	21
Tabel 5.3 Hasil Penghitungan Nilai Sensitivitas dan Spesifisitas Protein CatL pada Diagnosis Distomatosis Serum Sapi dengan Tabulasi Silang.....	22
Tabel 5.4 Hasil Penghitungan Nilai Sensitivitas dan Spesifisitas Protein ES pada Diagnosis Distomatosis Serum Sapi dengan Tabulasi Silang.....	22



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Analisis Regresi untuk Menentukan Hubungan antara Nilai Rf pada SDS-PAGE dengan Massa Molekul Relatif (MR) Protein....	28
Lampiran 2. Hasil Pembacaan Nilai <i>Optical Density</i> Serum Sapi Penderita Distomatosis dengan Teknik <i>indirect-ELISA</i>	30
Lampiran 3. Penghitungan Nilai Sensitivitas dan Spesifisitas Protein CatL dan ES pada Diagnosis Distomatosis Serum Sapi dengan Tabulasi Silang	32
Lampiran 4. Abstrak Hasil Penelitian Mahasiswa Peserta Hibah Due-Like...	33



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Penelitian

Untuk memastikan keberadaan cacing hati di dalam tubuh ternak ada beberapa kendala, antara lain teknik yang dipakai dan umur cacing. Teknik deteksi secara konvensional dengan menemukan telur cacing dalam feses hanya dapat dilakukan apabila cacing sudah dewasa dan memproduksi telur yakni sudah melewati masa periode prepaten (13-16 minggu). Perubahan enzimatik dalam darah secara tidak langsung juga dapat dipakai untuk menduga keberadaan parasit di dalam hati setelah melalui diagnosa banding. Uji serologik dengan teknik ELISA dapat dipakai untuk mendeteksi adanya antibodi di dalam darah, teknik ini sangat sensitif dan dapat dipakai untuk mendeteksi infeksi dini ataupun yang sudah lanjut. Namun teknik ini mempunyai kelemahan, yaitu tidak dapat mendeteksi secara pasti apakah infeksi cacing masih berlangsung atau sudah berlalu, di samping itu apabila antigen yang digunakan tidak spesifik, maka spesifisitas uji menjadi rendah. Oleh karena itu perlu dicoba mengembangkan teknik tersebut dengan mempertimbangkan protein antigen dominan dan mengisolasinya, sehingga didapatkan protein murni guna memperoleh bahan uji yang lebih spesifik terhadap *Fasciola spp* dan mudah diaplikasikan.

Infeksi oleh cacing genus *Fasciola*, yang dikenal dengan sebutan fasciolosis atau distomatosis, pada sapi dan kerbau biasanya bersifat kronis, sedangkan pada domba dan kambing bersifat akut. Penyakit ini pada ternak perlu mendapat perhatian, karena kerugian yang ditimbulkan amat besar (diperkirakan 20 milyar rupiah per tahun) berupa penurunan berat badan, terhambatnya pertumbuhan, hati yang terbuang dan kematian hewan. Di samping itu kerugian dapat berupa penurunan tenaga kerja dan daya tahan terhadap penyakit lain yang tidak terhitung (Soulsby, 1986).

Penegakkan diagnosis distomatosis memerlukan uji dan bahan uji dengan spesifisitas tinggi. Teknik *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) merupakan metode yang baik dan dapat dikembangkan untuk diagnosis penyakit tersebut. Spesifisitas bahan uji juga diperlukan mengingat banyaknya protein yang tidak spesifik pada infeksi parasit. Penggunaan antigen *crude protein* untuk diagnosis distomatosis tidaklah spesifik, karena antigen ini terdiri dari berbagai macam protein sehingga dikenali pula oleh antibodi terhadap cacing lain. Oleh karena itu perlu dilakukan isolasi dan karakterisasi terhadap protein spesifik, agar diperoleh protein murni dengan antigenesitas dan spesifisitas yang tinggi. Dalam hal ini *cathepsin-L* (CatL), yang terdapat dalam *excretory-secretory* (ES) material, memiliki antigenesitas yang dapat diandalkan karena merupakan antigen yang sangat potensial pada *Fasciola spp* (Estuningsih, 2003). Penelitian ini mencoba untuk mengisolasi protein CatL dari protein ES *Fasciola spp* yang diperkirakan memiliki massa molekul relatif (MR) 27-28 kDa dan melakukan karakterisasi. Selanjutnya dilakukan pengujian antigenesitas sensitivitas dan spesifisitas terhadap serum tersangka maupun penderita distomatosis. Mengingat kemungkinan terjadi reaksi silang (*cross reaction*) antar sesama infeksi parasit, maka perlu adanya kontrol positif, dalam hal ini digunakan serum sapi yang terinfeksi cacing klas Nematoda (nematodosis).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakter protein ES *Fasciola spp* dan mengisolasi CatL sehingga dapat diketahui reaktivitasnya dengan antibodi anti-CatL yang dapat digunakan sebagai dasar pengembangan diagnosis distomatosis pada sapi.

Rencana penelitian ini adalah membuat antigen ES *Fasciola spp* dengan RPMI, analisis protein ES *Fasciola spp* dengan teknik SDS-PAGE, identifikasi protein CatL dengan *Western blot*, isolasi protein CatL, dan pengujian antigenitas, sensitivitas serta spesifisitas protein CatL maupun ES terhadap serum sapi tersangka maupun penderita distomatosis.

1.2 Subyek Penelitian

Jenis materi yang diteliti adalah *cathepsin-L* (Cat-L) yaitu protein *excretory/secretory* (ES) cacing *Fasciola spp* dewasa pada MR 27-28 kDa yang merupakan antigen yang sangat potensial. Cacing *Fasciola spp* diisolasi dari saluran empedu sapi penderita distomatosis yang dipotong di RPH Pegirikan, Surabaya.

Aspek penelitian meliputi isolasi dan identifikasi protein CatL dari ES *Fasciola spp* sebagai komponen bioaktif (perangkat diagnosis) distomatosis pada sapi dengan teknik *indirect-ELISA*.

1.3 Lokasi Penelitian

Laboratorium Helminthologi, Lab. Virologi dan Imunologi, Lab. Biomolekuler Fakultas Kedokteran Hewan, dan Lab. Dengue, Tropical Disease Center, Universitas Airlangga, Surabaya.

1.4 Hasil yang Ditargetkan

Mendapatkan protein *cathepsin-L* (CatL) cacing *Fasciola spp* sebagai komponen bioaktif yang dapat digunakan sebagai perangkat diagnostik untuk penegakkan diagnosis distomatosis pada sapi dengan mengembangkan teknik ELISA.

BAB 2

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

2.1 Tujuan Penelitian

2.1.1 Tujuan umum

Menjajagi kemungkinan pembuatan kit diagnostik guna menyelesaikan masalah diagnosis dini distomatosis akibat infeksi *Fasciola spp* pada ternak.

2.1.2 Tujuan khusus

a) Tujuan khusus jangka pendek

- 1) Menentukan fraksi protein *excretory/secretory* (ES) *Fasciola spp*
- 2) Mengkarakterisasi protein *cathepsin-L* (CatL) dari ES *Fasciola spp*
- 3) Mendapatkan protein *cathepsin-L* (CatL) dari ES *Fasciola spp*
- 4) Menguji antigenitas, sensitivitas dan spesifisitas protein *cathepsin-L* maupun ES *Fasciola spp* terhadap serum sapi tersangka dan penderita distomatosis.

b) Tujuan khusus jangka panjang

Mendapatkan bahan uji yang spesifik untuk penegakkan diagnosis distomatosis pada sapi.

2.2 Manfaat Penelitian

Keberhasilan mengidentifikasi dan mengisolasi protein CatL dari E-S *Fasciola spp* akan diperoleh bahan uji yang spesifik yang dapat dimanfaatkan untuk diagnosis distomatosis dengan pemeriksaan serum. Hasil penelitian ini dapat diharapkan dapat digunakan tolok ukur dalam pembuatan kit diagnostik.

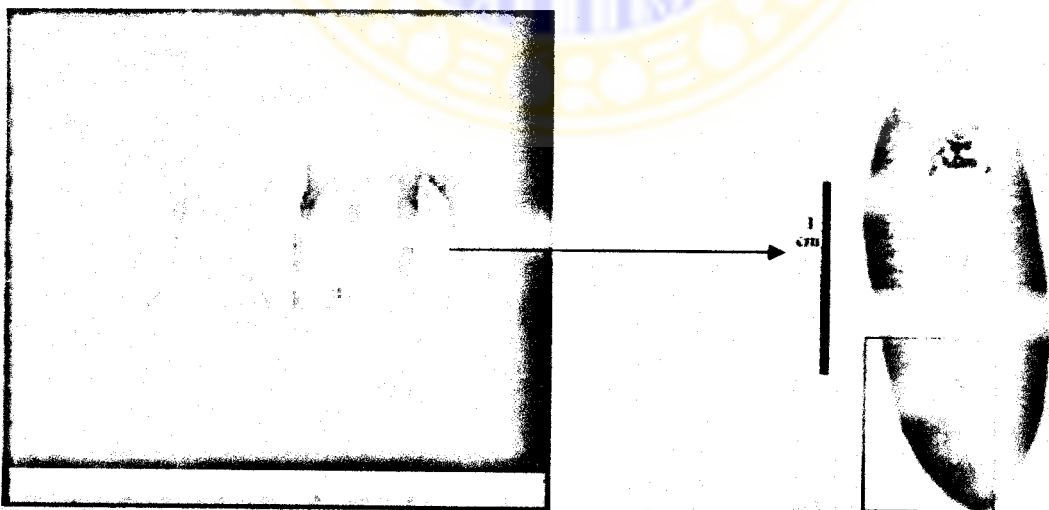
Penelitian ini melibatkan empat orang mahasiswa, sehingga bermanfaat dalam peningkatan pengetahuan, keterampilan laboratorium dan penyelesaian skripsi mereka. Keempat orang mahasiswa yang terlibat dalam penelitian ini adalah: Rendy Tri D.L. (NIM: 069912651), Mukhlis (NIM: 060012769), dan Rahmi R.L. (NIM: 060012786).

BAB 3 TINJAUAN PUSTAKA

3.1 Penyebab Distomatosis

Distomatosis adalah infeksi yang disebabkan oleh cacing dari klas Trematoda, genus *Fasciola*, terdapat dua spesies yaitu *F. hepatica* dan *F. gigantica*. Penyakit ini tergolong zoonosis. Dari kedua spesies tersebut yang banyak terdapat di Indonesia adalah *F. gigantica*.

Ukuran cacing *F. hepatica* dan *F. gigantica* agak berbeda, *F. hepatica* berukuran panjang 20-30 mm dan lebar 13 mm, sedangkan *F. gigantica* panjangnya 25-75 mm dan lebar 12 mm. Warna kedua cacing tersebut juga agak berbeda, untuk *F. hepatica* warnanya coklat gelap, sedangkan *F. gigantica* warnanya coklat muda dan tembus pandang. Ukuran telur kedua species ini juga agak berbeda, untuk *F. hepatica* 130-150 μm x 65-90 μm sedangkan *F. gigantica* 150-190 μm x 70-140 μm , walaupun kedua telur cacing tersebut sama-sama mempunyai satu tutup (*operculum*) di salah satu ujungnya (Levin, 1978; Kusumamihardja, 1993; Tolan, 2003). Morfologi cacing *Fasciola spp* dapat dilihat pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Morfologi *Fasciola spp*. Sumber: Tolan (2003).

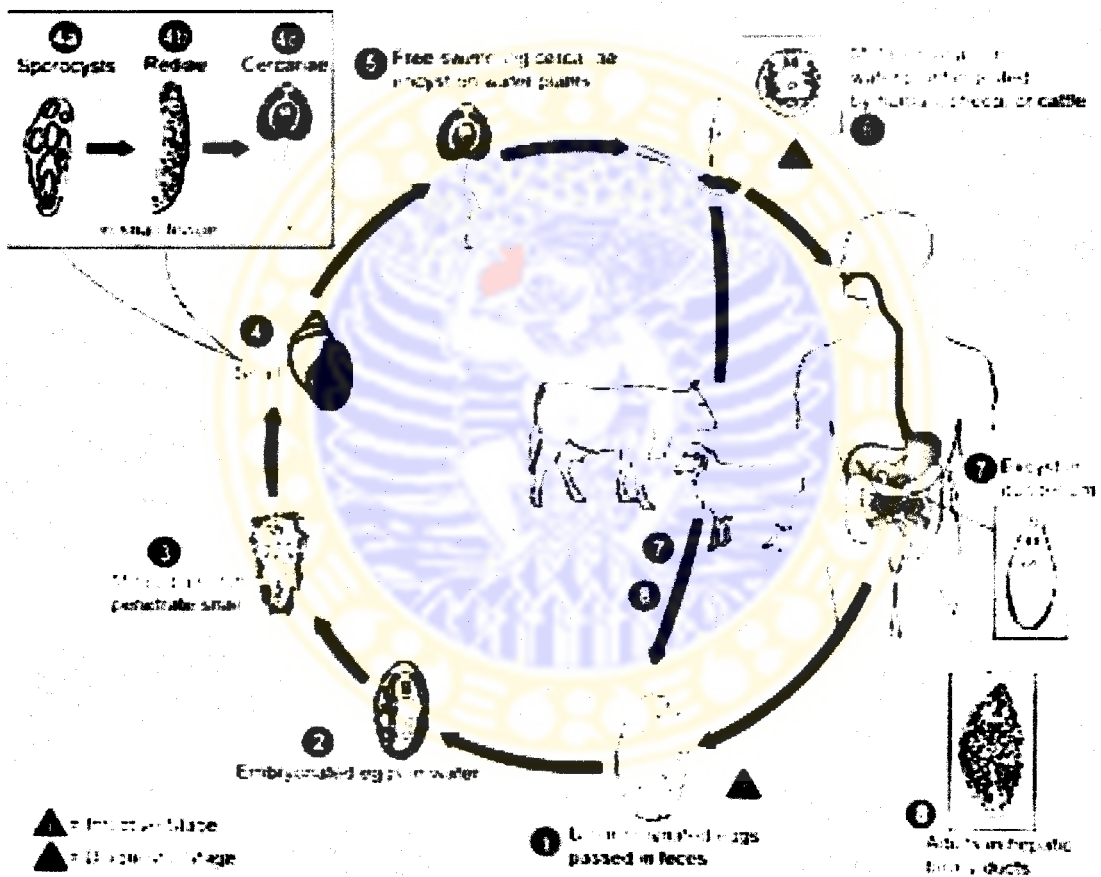
3.2 Siklus Hidup *Fasciola spp*

Fasciola spp dalam hidupnya mengalami beberapa generasi, yaitu telur, *sporocyst*, *miracidium*, *redia*, *cercaria*, *metacercaria*, dan cacing dewasa. *Metacercaria* merupakan stadium infeksi yang banyak menginfeksi hewan ruminansia, yaitu kambing, sapi dan kerbau (Jithendran and Bhat, 1999), di samping itu juga dapat menginfeksi manusia pada semua kelompok umur.

Perkembangan telur *Fasciola spp* menjadi *miracidium* dicapai 9-15 hari, *sporochysta*, *redia*, *cercaria* (di dalam tubuh siput *Lymnea spp*, 4-7 minggu), *metacercaria* (2 menit-2 jam setelah *cercaria* keluar dari tubuh siput), dan cacing dewasa terdapat dalam saluran empedu hospes definitif. Apabila *metacercaria* tertelan, kemudian masuk duodenum maka akan terbentuk cacing muda yang selanjutnya menembus dinding duodenum, kemudian masuk rongga perut dalam waktu 24 jam setelah infeksi. Pada hari ke-4 s.d. 6 sejak infeksi, sebagian cacing muda sudah menembus pembungkus hati dan bermigrasi di dalam jaringan hati. Beberapa cacing muda mungkin mencapai hati melalui aliran darah dan dapat menembus paru maupun plasenta. Migrasi di dalam parenkim hati terjadi selama 6 minggu, setelah minggu ke-7 cacing muda mulai memasuki saluran empedu dan tumbuh menjadi dewasa. periode prepaten berkisar antara 3-4 bulan (Soulsby, 1986; Bunnag *et al.*, 1992). Gambaran siklus hidup dapat dilihat pada Gambar 3.2.

Metaserkaria dapat bertahan hidup dalam waktu yang lama di lingkungan yang basah, namun tidak tahan pada kondisi kering. Selain menempel pada vegetasi, serkaria juga dapat menjadi metaserkaria di permukaan air, menimbulkan gelembung air kecil yang memungkinkan metaserkaria ini untuk mengambang. Induk semang definitif tertular karena memakan vegetasi atau meminum air yang mengandung metaserkaria. Setelah kista metaserkaria masuk dalam duodenum maka cacing muda keluar dari kista, selanjutnya menembus dinding duodenum induk semang, kemudian memasuki rongga perut dalam waktu 24 jam setelah infeksi. Pada hari ke 4-6 pasca

infeksi, sebagian cacing muda sudah menembus pembungkus hati dan migrasi di dalam jaringan organ hati. Beberapa cacing muda mungkin mencapai hati melalui aliran darah. Periode prepaten (dari infeksi hingga telur cacing muncul di feses induk semang) \pm dua bulan, tetapi tidak semua cacing muda mencapai dewasa pada waktu yang sama dan proses pendewasaan ini dapat bertambah lagi dua bulan (Soulsby, 1986).



Gambar 3.2 Siklus hidup *Fasciola spp* secara skematik. Sumber: Tolan (2003).

3.3 Gejala Klinis, Patogenesis dan Penyebaran Distomatosis

Habitat cacing dewasa di lumen saluran empedu penderita. Infeksi pada manusia 50% bersifat sub klinis, gejala yang tampak adalah demam (60%),

hepatomegali, nyeri abdomen, malaise dan kehilangan berat badan (35%), gatal-gatal dengan bintik merah dan bengkak (20%), mual, anoreksia, vomit, diare dan *Jaundice*. Secara keseluruhan penderita dengan infeksi kronis tidak memperlihatkan gejala (Tolan 2003). Pada hewan terdapat gejala yang khas berupa oedema *bottle jaw*, namun dapat dikacaukan dengan haemonchosis (Levine, 1978; Kusumamihardja, 1986). Oleh karena itu perlu dilakukan karakterisasi dan isolasi protein dengan spesifisitas, antigenisitas dan imunogenisitas tinggi sehingga mempunyai arti penting yang dapat dijadikan acuan, baik untuk diagnosis penyakit maupun sebagai kandidat vaksin.

Manusia dapat tertular distomatosis karena makanan atau air minum terkontaminasi oleh larva infeksius (*metacercaria*), terutama sayuran dan air dengan pemasakan kurang sempurna (Tolan, 2003). Lebih lanjut dinyatakan bahwa, diperkirakan dua juta kasus terjadi di dunia dan insidennya meningkat sejak 1980. Prevalensinya yang menunjukkan angka tinggi khususnya di daerah tertentu di Bolivia (65-92%), Ecuador (24-53%), Egypt (2-17%), dan Peru (10%). Sebanyak 68% dari anak-anak Bolivia pada wilayah hiperendemik mengalami infeksi distomatosis, hal ini juga terjadi pada 11% dari orang-orang Ethiopia yang migrasi ke Esrael.

Bunnag *et al.* (1992) menyatakan bahwa, infeksi oleh *F. gigantica* lebih banyak terjadi pada herbivora, angka prevalensinya tinggi di daerah endemik, misalnya Cina, pada sapi (50%), kambing (45%), dan kerbau (33%); dan di Thailand, pada sapi (60%). Distomatosis akibat infeksi *Fasciola gigantica* pada manusia dilaporkan terjadi di Zimbabwe, Uganda, Tashkent, Iraq, Vietnam, Hawaii, dan Thailand.

Distomatosis pada sapi dan kerbau biasanya bersifat kronis, sedangkan pada domba dan kambing bersifat akut. Penyakit ini pada ternak perlu mendapat perhatian, karena kerugian akibat penyakit ini amat besar (diperkirakan 20 milyar rupiah per tahun) berupa penurunan berat badan, terhambatnya pertumbuhan, hati yang terbuang dan kematian hewan. Di samping itu kerugian dapat berupa penurunan tenaga kerja dan daya tahan terhadap penyakit lain yang tidak terhitung (Soulsby, 1986).

3.4 Antigen *Fasciola spp*

Mengingat siklus hidup *Fasciola spp* yang kompleks, maka pengamatan terhadap antigen cacing tersebut dapat dilakukan terhadap protein telur, larva, dan cacing dewasa. Pada telur cacing, protein antigenik dapat diperoleh pada kulit telur (*egg shell*), membran vitelin (*vitelline membrane*) dan *granular layer*. Pada stadium larva dan dewasa yang paling sering digunakan adalah *excretory/secretory* (ES) antigen dan *somatic antigen*. Namun demikian yang sering digunakan adalah *tegumental extract*, *whole somatic extract* dan *ES product*. Hal yang perlu diperhatikan adalah bahwa pada semua stadium selalu terdapat protein yang tetap di samping beberapa protein lain yang berbeda, karena profil protein pada setiap stadium kehidupan parasit pada umumnya mempunyai kesamaan ataupun perbedaan bergantung kepada stadium hidupnya (Patterson, 1989). Protein yang selalu dapat ditemukan pada seluruh stadium dikenal dengan protein dominan (*predominantly protein*) (Kooyman *et al.*, 2000).

Beberapa macam ekstrak antigen dari cacing *Fasciola spp* seperti *crude somatic* dan protein *excretory/secretory* (ES) telah banyak digunakan sebagai antigen untuk melakukan vaksinasi pada hewan di laboratorium, domba dan sapi. Namun dengan berkembangnya penelitian di bidang bioteknologi, telah banyak dilaporkan kandidat-kandidat antigen yang lain, antara lain: *fatty acid binding protein* (FABP), *glutamic S-transferase* (GST), dan *cathepsin L* (CatL) (Spithill *et al.*, 1999; Cornevale *et al.*, 2001).

Fatty acid binding protein merupakan kelompok protein yang besar, termasuk dalam ikatan dari berbagai *hydrophobic ligand* seperti oleat dan palmitat. Karakteristik dari kelompok protein ini adalah kelompok *cytoplasmic* FABP yang berukuran antara 14 hingga 16 kDa. *Glutamic S-transferase* meliputi kelompok isoenzim yang termasuk dalam detoksifikasi sel dari substrat kimia. Penetrasi dari substrat melalui konjugasi dari glutathione menghasilkan protein yang mudah larut dalam air dan tidak toksik. Protein ini berukuran antara 24 hingga 29 kDa. *Cathepsin L* protease didapatkan

dalam ES cacing *Fasciola spp*, karena *Fasciola spp* menghasilkan enzim proteolitik yang melimpah khususnya di dalam ES material. Protein ES mudah dikoleksi dari cacing dewasa secara *invitro*. CatL protease berukuran antara 27-28 kDa, protein ini dihasilkan oleh cacing *Fasciola spp* dewasa yang berada dalam saluran empedu penderita sebagai enzim pencernaan. Beberapa literatur menyebutkan bahwa CatL merupakan antigen yang sangat potensial (Spithill *et al.*, 1999; Cornevale *et al.*, 2001; Estuningsih, 2003).

3.5 Diagnosis Distomatosis

Pada ternak yang terinfeksi *Fasciola spp* kronis, pemeriksaan feses untuk menemukan telur cacing masih merupakan metode diagnosis yang paling baik. Akan tetapi pada kejadian infeksi dini atau distomatosis akut, telur cacing sering kali tidak dapat ditemukan. Maka dalam upaya diagnosis dalam berbagai status, kedalaman dan tipe infeksi *Fasciola spp* diperlukan metode diagnosis yang lebih baik, yaitu dengan menggunakan teknik ELISA maupun pengembangannya dan CatL merupakan antigen yang sangat potensial digunakan sebagai bahan ujinya (Estuningsih dkk., 2004).

BAB 4

DESAIN DAN METODE PENELITIAN

4.1 Sampel *Fasciola spp*

Fasciola spp dewasa diisolasi dari saluran empedu sapi Madura penderita distomatosis yang dipotong di RPH Pegirian Surabaya. Cacing dewasa kemudian diinkubasikan dalam medium RPMI dan PBS pada suhu 37°C untuk mendapatkan *excretory/secretory* (ES) material. Protein ES selanjutnya disimpan untuk bahan analisis protein dan isolasi *cathepsin-L* (CatL) protease.

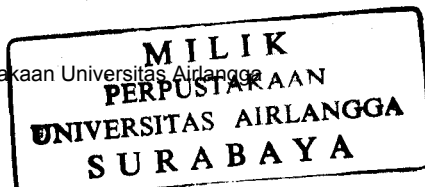
4.2 Pembuatan Antibodi Poliklonal

Antibodi poliklonal dibuat dengan jalan menyuntikkan protein ES *Fasciola spp* pada kelinci. Sebanyak empat ekor kelinci jantan lokal umur 3 bulan diinjeksi dengan protein ES, 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 dua minggu. Dua minggu setelah *booster* terakhir dilakukan pengambilan darah kelinci kemudian disentrifugasi untuk mendapatkan serum yang mengandung antibodi poliklonal anti-ESP *Fasciola spp*. Pembuatan antibodi poliklonal digunakan untuk uji identifikasi protein dengan teknik *Western blot*, pada tahap ini juga dilakukan uji reaksi silang dengan antigen ES cacing muda (*juvenile*), *crude protein* cacing dewasa dan cacing klas Trematoda lain yaitu *Paramphistomum spp*.

4.3 Analisis Protein dengan Teknik SDS-PAGE

Protein ES cacing dewasa *Fasciola spp* selanjutnya dilakukan *running* dengan teknik *sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE).

Komposisi SDS-PAGE yang dipakai adalah *separating gel* 12% (2,5 ml acrylamide; 1,2 ml Tris-HCl pH 8,8; 1,2 ml SDS 0,5%; 1,1 ml aquadest, 50 µl Temed dan 30



μl APS 10%) dan *stacking gel* 10% (0,66 ml *acrylamide*; 0,8 ml Tris-HCl pH 6,8; 0,8 ml SDS 0,5%; 0,74 ml aquadest; 4 μl TEMED dan 20 μl APS 10%).

Setelah larutan gel pemisah 12% dimasukkan pada gel *plate* pada posisi vertikal kemudian di atasnya diberi butanol sampai mengeras dan kemudian butanol dibuang dan dibersihkan dengan PBS dan dikeringkan dengan kertas *Whatman*.

Selanjutnya ditambahkan *stacking gel* dan setelah itu dimasukan *comb* dan ditunggu sampai betul-betul *set*. *Plate* berisi gel kemudian dipasang pada Minigel Twin G-42 slab dan dituangkan *electrophoresis buffer* (30,29 g Tris aminomethan; 144,13 g glisin; 10 g SDS dalam 1000 ml aquadest).

Sebanyak 15 μl sampel berupa protein ES *Fasciola spp* dewasa ditambah *Lamlli buffer* sama banyak. Kemudian sampel didenaturasi dengan *Lamlli buffer* (Tris-HCl pH 6,8 1,0 ml, gliserin 0,8 ml, SDS 10% 1,6 ml, bromfenolblue 0,5% 0,4 ml, merkptoetanol 5% 50 μl , aquades 3,8 ml) pada pemanasan 100°C selama 5 menit, dimasukkan pada sumuran *stacking gel*. Sebagai marker digunakan protein dengan berat molekul pada kisaran 14,5-200 kDa produksi BIO-RAD. Elektrophoresis dinyalakan dengan tegangan 40 V dengan kuat arus 10 mA dan ditingkatkan menjadi 120 V 25 mA ketika sampel telah melewati *stacking gel*; kira-kira selama 1-2 jam.

Pencucian terhadap gel hasil *running* dilakukan 3 tahap, yaitu: 1) Pencucian pertama, menggunakan 25 ml metanol 50%, 3,75 ml asam asetat 7,5% dan 71,25 ml aquadest selama 30 menit; 2) Pencucian kedua, menggunakan 2,5 ml metanol 5%, 3,75 ml asam asetat 7,5% dan 93,75 ml aquadest selama 20 menit; dan 3) Pencucian ketiga, menggunakan glutaraldehida 10% selama 25 menit. Gel kemudian diwarnai dengan teknik pewarnaan silver (1,6 g AgNO_3 dalam 8 ml aquadest; 42 ml NaOH 0,36%; 2,8 ml NH_3 25% dalam 147 ml aquadest) selama 15 menit, dilanjutkan pencucian 2 kali 2 menit dengan 100 ml aquadest dan kemudian ditambahkan larutan pengembang warna (200 μl asam sitrat 5%; 100 μl formaldehid 37% dalam aquadest 200ml) dan dilakukan pencucian kembali selama 2 kali 2 menit dengan 100 ml aquadest. Setelah gel

terwarnai kemudian dimasukkan dalam larutan asam asetat 10% untuk menghentikan proses pengecatan. Selanjutnya gel dapat disimpan pada larutan gliserin 10% (Harlow dan Lane, 1988).

4.4 Identifikasi Protein dengan Teknik *Western Blot*

PVDF blot diblok dengan 10 % BSA kemudian dicuci dengan larutan TBS dua kali. Direaksikan dengan antibodi monoklonal dan sebagai kontrol direaksikan dengan HMAF. PVDF diinkubasi pada suhu ruang, dicuci dengan larutan TBS tiga kali, kemudian ditambahkan konjugat *anti-rabbit* yang dilabel alkalin fosfatase dan substrat 4-NPP dan diwarnai dengan *Western blue* (Harlow dan Lane, 1988; Rantam, 1997). Akhirnya PVDF dikeringkan di udara pada suhu ruang. Dari hasil ini kemudian ditentukan protein CatL dan massa molekul relatif (MR) protein spesifik *Fasciola spp*

4.5 Isolasi Protein

Gel silinder dimasukkan melalui sistem selang dan protein eluinsi ditransport sampai bawah membran dialisa. Selanjutnya sampel dicampur dengan *Laemmli bufer*. Untuk gel pemisah protein digunakan konsentrasi 17% acrylamid kemudian dibiarkan polimerisasi pada suhu ruang. Setelah itu ditambahkan acrylamid 4 %, kemudian 250 µl sampel dimasukkan. Arus listrik yang dipakai 99,9 Volt, 50 mA dan 12 W dan selanjutnya protein ditampung pada 125 tabung 4 ml dan jika sudah bereaksi sampai bawah, maka koleksi protein dihentikan. Selanjutnya protein ditaruh pada suhu 4°C dan dilakukan analisis protein lagi secara biokimiawi untuk menentukan protein CatL (Rantam, 1997).

4.6 Uji Antigenisitas Protein CatL dan ES Terhadap Serum Sapi dengan Teknik *indirect-ELISA*

Pengujian antigenisitas dilakukan terhadap protein CatL dan ES hasil isolasi pada tahap sebelumnya sebagai antigen terhadap antibodi anti-*Fasciola spp* dari sampel

serum darah sapi. Pengujian dilakukan dengan teknik *indirect*-ELISA adapun sampel serum diperoleh dari sapi tersangka dan penderita distomatosis yang sebelumnya dilakukan skrining dengan pengamatan pascamati maupun pemeriksaan feses secara mikroskopis.

4.7 Uji Sensitivitas dan Spesifisitas Protein CatL dan ES Terhadap Serum Darah Sapi Tersangka dan Penderita Distomatosis

Serum darah yang diuji dipastikan berasal dari sapi penderita Distomatosis dengan infeksi tunggal. Untuk memastikan keberadaan infeksi tersebut diambil serum darah sapi yang dipotong di RPH Pegirikan Surabaya dengan memeriksa saluran pencernaan dan hepar sapi sampel, disamping itu juga dilakukan pengambilan sampel feses untuk diperiksa keberadaan telur cacing dengan bantuan mikroskop 100x. Sampel yang memenuhi kriteria ditentukan sebanyak 22 ekor sapi penderita distomatosis dan 8 serum kontrol positif dari serum sapi Madura yang terinfeksi cacing Nematoda. Serum tersebut kemudian diperiksa dengan teknik *indirect*-ELISA. Antigen yang digunakan adalah protein CatL hasil isolasi dari tahap sebelumnya ES *Fasciola spp.* Sensitivitas dan spesifisitas dihitung dengan tabulasi silang sebagai berikut.

	Hasil ELISA		Total
	OD +	OD -	
Distomatosis +	a	b	a + b
Distomatosis -	c	d	c + d
Total	a + c	b + d	a + b + c + d

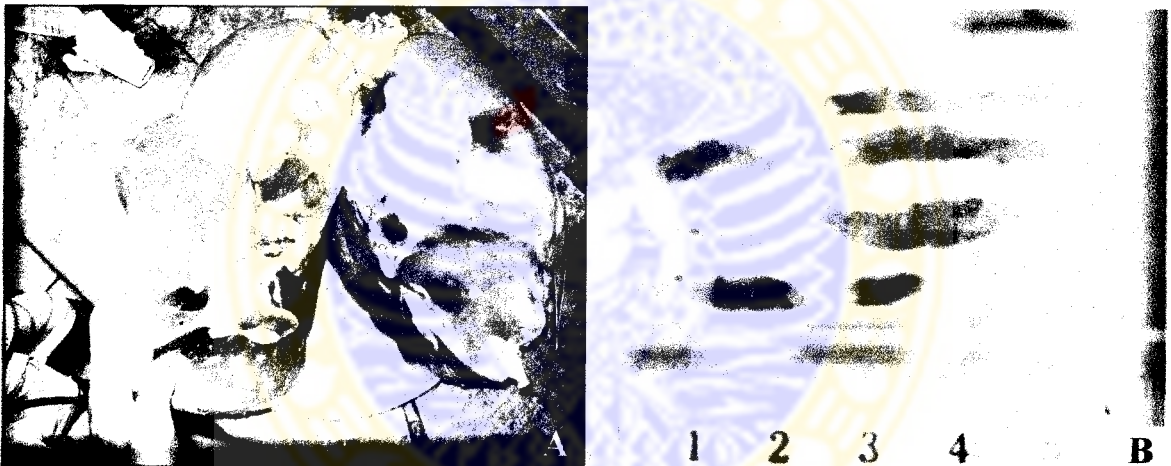
$$\text{Sensitivitas} = \frac{a}{a + b} \times 100 \%$$

$$\text{Spesifisitas} = \frac{d}{c + d} \times 100 \%$$

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Isolasi Sampel *Fasciola spp*

Fasciola spp dewasa diisolasi dari saluran empedu sapi penderita distomatosis yang dipotong di RPH Pegirikan Surabaya. Cacing dewasa kemudian diinkubasikan dalam medium RPMI dan PBS pada suhu 37°C untuk mendapatkan *excretory/secretory* (ES) material. Protein ES selanjutnya disimpan untuk bahan analisis protein dan isolasi CatL protease. Hasil isolasi cacing muda (*juvenile*) dan cacing dewasa *Fasciola spp* dapat dilihat pada Gambar 5.1.



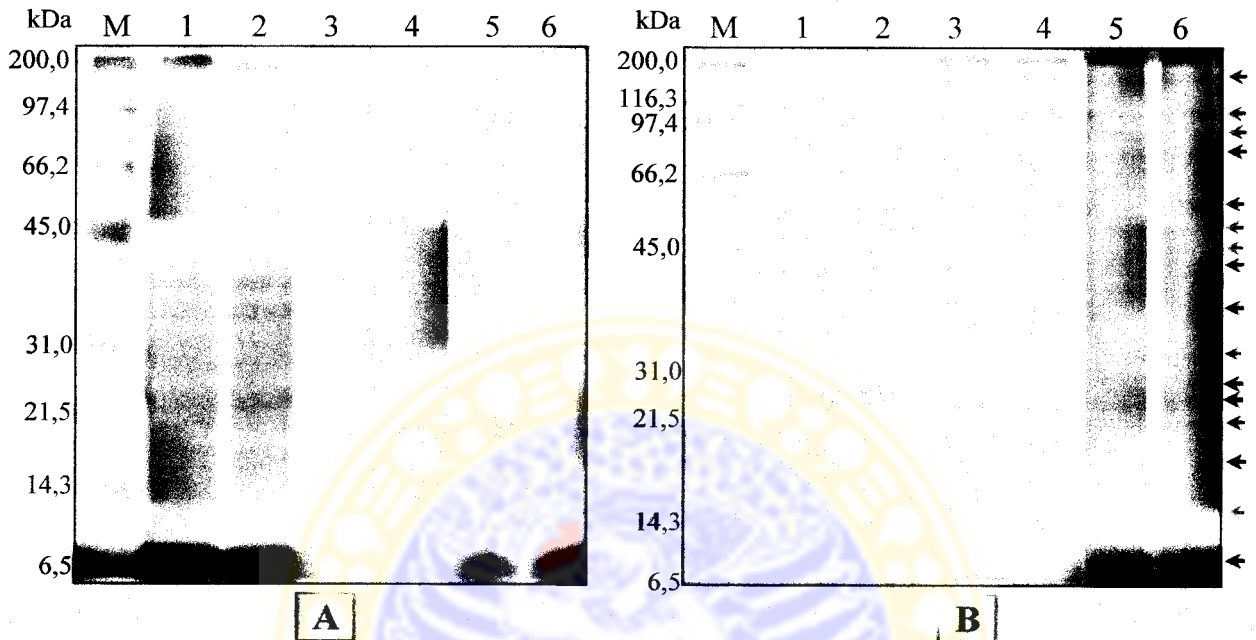
Gambar 5.1 Hasil isolasi cacing A, hati sapi penderita distomatosis; B, cacing muda (*juvenile*) dan cacing dewasa *Fasciola spp*.

5.2 Analisis Protein dengan Teknik SDS-PAGE

Hasil analisis protein ES cacing dewasa *Fasciola spp* yang dilakukan dengan teknik *sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) dapat dilihat pada Gambar 5.2.

Pada Gambar 5.2 A terlihat bahwa pita protein yang terbentuk pada kolom 3-6 sangat tipis, sedangkan pada kolom 1 dan 2 terlalu tajam sehingga secara keseluruhan pita yang terbentuk kurang jelas. Oleh karena itu perlu optimasi lebih lanjut pada tahap ini sebelum dilanjutkan identifikasi protein. Keadaan ini berkaitan dengan kadar

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



Gambar 5.2 Hasil analisis protein dengan teknik SDS-PAGE. *Running* pertama (A); M, marker (Sigma); kolom 1-2, homogenat cacing *Fasciola spp* dewasa; kolom 3-4, *excretory-secretory protein* (ESP) *Fasciola spp* dewasa; kolom 5-6, ESP *Fasciola spp* juvenile; *Running* kedua (B); M, marker (Sigma); kolom 1-2, ESP *Fasciola spp* juvenile; kolom 3-4, ESP *Fasciola spp* dewasa; kolom 5-6, homogenat cacing *Fasciola spp* dewasa.

Berdasarkan analisis regresi (Lampiran 1) dapat diketahui massa molekul relatif (MR) berbagai pita protein yang terbentuk pada homogenat cacing *Fasciola spp* dewasa maupun *excretory-secretory protein* (ESP) *Fasciola spp* dewasa dan *juvenile* yaitu terdapat 16 macam protein. Antara marker 200 dan 116,3 kDa terdapat satu pita protein yaitu 130 kDa. Antara marker 116,3 dan 97,4 kDa terdapat satu pita protein yaitu 108 kDa. Antara marker 97,4 dan 66,2 kDa terdapat dua pita protein, masing-masing 91 dan 74 kDa. Antara marker 66,2 dan 45 kDa terdapat tiga pita protein, masing-masing 58, 52 dan 45 kDa. Antara marker 45 dan 31 kDa terdapat tiga pita protein, yaitu 40, 35 dan 32 kDa. Antara marker 31 dan 21,5 kDa terdapat tiga pita protein, yaitu 28, 27 dan

25 kDa. Di bawah marker 21,5 kDa terdapat tiga pita protein yaitu 18, 15 dan 8 kDa. Secara lengkap hasil perhitungan MR protein dapat dilihat pada Tabel 5.1.

Tabel 5.1 Hasil Penghitungan Berat Molekul Protein Cacing *Fasciola spp* pada Gel SDS-PAGE

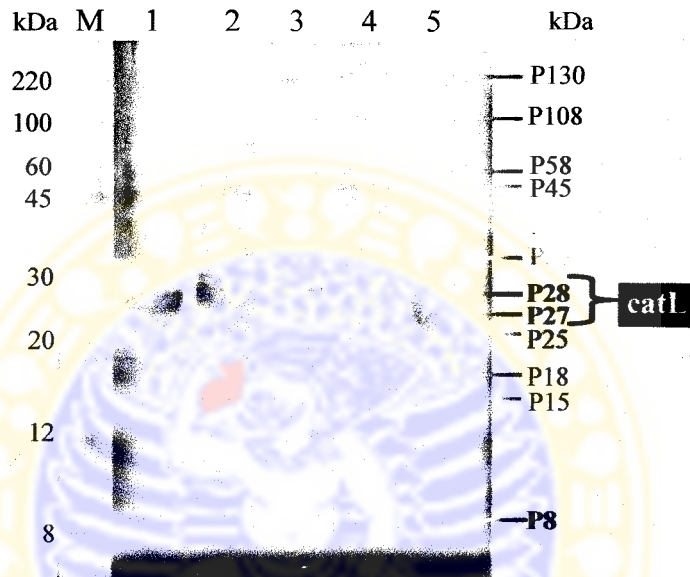
No.	Jarak	Rf ¹⁾	Log y ³⁾ Da	MR ²⁾ Da	MR ²⁾ kDa
1	10.0	0.088	5.163	145545.90	130
2	15.5	0.136	5.032	107646.50	108
3	19.0	0.167	4.960	91201.10	91
4	24.0	0.211	4.869	73960.50	74
5	31.0	0.272	4.766	58344.50	58
6	35.0	0.307	4.718	52239.60	52
7	41.5	0.364	4.652	44874.50	45
8	47.0	0.412	4.606	40364.50	40
9	55.0	0.482	4.550	35481.30	35
10	63.0	0.553	4.500	31622.80	32
11	70.5	0.618	4.452	28313.90	28
12	73.0	0.640	4.435	27227.00	27
13	78.0	0.684	4.396	24888.60	25
14	92.0	0.807	4.249	17741.90	18
15	97.5	0.855	4.169	14757.10	15
16	110.0	0.965	3.922	8356.00	8

¹⁾Rf = *Retardation factor*, merupakan jarak pergerakan protein dari tempat awal dibanding jarak pergerakan warna dari tempat awal; ²⁾y, dihitung berdasarkan persamaan garis regresi $y = 5,462 - 3,906 x + 5,964 x^2 + 3,7 x^3$; ³⁾MR = massa molekul relatif.

5.3 Identifikasi Protein dengan Teknik *Western Blot*

Untuk memastikan bahwa hasil analisis protein CatL yang dilakukan merupakan protein spesifik *Fasciola spp* dan memberikan dasar pada saat dilakukan isolasi protein, maka dilakukan identifikasi protein *Fasciola spp* dengan teknik *Western blot* menggunakan antibodi poliklonal anti-*Fasciola spp* (Gambar 5.3).

Pada Gambar 5.3 tampak bahwa dari 16 pita protein pada analisis protein dengan SDS-PAGE tidak semua merupakan protein spesifik. Hasil identifikasi protein menunjukkan duabelas ikatan protein dengan karakter yang berbeda. Ikatan tersebut pada protein 130, 108, 58, 45, 40, 35, 28, 27, 25, 18, 15, dan 8 kDa.



Gambar 5.3 Hasil identifikasi protein *Fasciola spp* terhadap serum anti-*Fasciola spp*. M, marker Rainbow (Sigma); kolom 1, homogenat cacing dewasa; kolom 2, ES *Fasciola spp* muda (*juvenile*); 3 & 5, ES *Fasciola spp* dewasa; dan 4, homogenat *Paramphistomum spp* dewasa.

Pada protein 130, 108, 58, 45, 25, 18 dan 15 kDa selain menunjukkan ikatan dengan *Fasciola spp* juga berikatan dengan *Paramphistomum spp* hal ini tidak banyak bermanfaat untuk bahan diagnostik karena akan menghasilkan reaksi silang (*false positive*). Kusnoto (2003) menyatakan bahwa, reaksi silang ini dapat terjadi dengan cacing dari klas lain dan biasanya terjadi pada protein dengan MR tinggi. Abdel-Rahman *et al.* (2000) menyatakan bahwa, pengamatan dengan *immunoblotting* menunjukkan polipeptida dari telur *F. gigantica* dikenali oleh antiserum kelinci anti-cacing dewasa. Lebih lanjut dinyatakan bahwa, komponen protein dengan berat

molekul (MR) 240 kDa dan 206 kDa dari telur *F. gigantica*, *Toxocara vitulorum* dan *Moniezia expansa* dikenali oleh antiserum anti-cacing dewasa yang berbeda. Abdel-Rahman and Megeed (2000) melakukan pengamatan terhadap *whole worm extract* dengan teknik *immunoblotting* menyatakan bahwa, antiserum anti-*F. gigantica* terjadi reaksi silang dengan antigen *T. vitulorum* pada MR 133 kDa, dan antigen *M. expansa* pada MR 210 kDa. Adapun antigen *F. gigantica* terjadi reaksi silang dengan antiserum anti-*T. vitulorum* pada MR 133 kDa dan anti-*M. expansa* pada MR 52 kDa. Sementara itu Kusnoto (2003) menyatakan bahwa dengan teknik *Western blot* antigen *F. gigantica* dikenali oleh antiserum terhadap larva kedua (anti-L2) *Toxocara cati* pada MR 133 kDa. Hal ini menunjukkan bahwa polipeptida tersebut spesifisitasnya rendah karena dapat dikenali oleh antisera cacing lain.

Pada protein 40, 35 dan 8 kDa pita ikatan yang jelas tampak pada ESP *Fasciola spp juvenile* tetapi pada *Fasciola spp* dewasa ikatan tersebut tidak jelas, sehingga patut dicermati lebih lanjut karena pita protein ini tidak menunjukkan reaksi silang dengan *Paramphistomum spp*. Adapun pada *cathepsin L* (CatL) dengan MR 27-28 kDa terdapat ikatan yang sangat jelas baik dengan *juvenile* maupun *Fasciola spp* dewasa, hal ini menunjukkan bahwa CatL merupakan antigen yang sangat potensial (Estuningsih, 2003).

5.4 Isolasi Protein CatL dari *Excretory-Secretory* (ES) *Fasciola spp*

Berdasarkan hasil preparasi protein dengan teknik SDS-PAGE telah dilakukan isolasi protein, kemudian masing-masing hasil isolasi dilakukan SDS-PAGE kembali. Hasil analisis protein ES *Fasciola spp* yang difokuskan pada protein catL dengan MR 27-28 kDa, namun demikian juga dilakukan isolasi terhadap P35 dan 45 kDa (Gambar 5.4).

Pada Gambar 5.4 protein catL dengan MR 27-28 kDa tampak lebih dominan dibanding protein yang lain, sedangkan protein dengan MR 40 dan 35 kDa tampak diekspresikan dengan kualitas yang hampir sama. Perbedaan antara catL dengan protein

lain ini menunjukkan perbedaan secara genetik di antara ketiga protein tersebut, karena meskipun berat molekul sama tetapi bila ekspresinya terdapat perbedaan, maka secara genetik terdapat perbedaan pula (Kusnoto, 2003). Hal ini juga memberikan gambaran bahwa *cathepsin L* dapat dimanfaatkan sebagai bahan uji (antigen) untuk diagnosis distomatosis (Spithill *et al.*, 1999; Cornevale *et al.*, 2001).



Gambar 5.4 Analisis protein hasil isolasi catL dari protein ES *Fasciola spp* dengan teknik SDS-PAGE. M, marker (Sigma); Kolom 1-2, catL (P27-28); kolom 3-4, P35; dan kolom 5-6, P40 kDa.

5.5 Uji Antigenisitas Protein CatL dan ES Terhadap Serum Sapi dengan Teknik *indirect-ELISA*

Hasil pemeriksaan serum darah sapi tersangka maupun penderita distomatosis dengan teknik *indirect-ELISA* baik menggunakan protein catL maupun ES dan analisis statistiknya dapat dilihat pada Lampiran 2, sedangkan rata-rata nilai *optical density* (OD) yang diperoleh disajikan pada Tabel 5.2.

Pada Tabel 5.2 terlihat bahwa hasil pembacaan nilai OD₄₀₅ untuk antigen ES adalah sebesar 0,756, sedangkan pada antigen catL diperoleh nilai OD₄₀₅ sebesar 0,241.

Tabel 5.2 Rata-rata Nilai *Optical Density* Hasil Pengujian Antigenesitas Protein CatL dan ES *Fasciola spp* Terhadap Antibodi dengan Teknik *Indirect-ELISA*

Antigen coating	Nilai OD ₄₀₅
Protein CatL	0,241 ^b
Protein ES	0,756 ^a
Kontrol (-) Serum	0,110
Kontrol (-) PBS	0,005

^{a, b} superskrip berbeda pada kolom sama menunjukkan perbedaan sangat nyata ($p < 0,01$)

Berdasarkan hasil analisis statistik dengan uji t tak berpasangan (*independent t-test*) dapat diketahui bahwa, hasil pembacaan nilai OD untuk antigen ES (0,756) secara sangat nyata menunjukkan hasil lebih tinggi dibanding antigen catL (0,241) ($p < 0,01$). Hasil tersebut menunjukkan bahwa nilai antigenitas ES terhadap antibodi anti-*Fasciola spp* dalam serum sapi lebih tinggi dibandingkan dengan catL. Hal ini kemungkinan dapat terjadi karena di dalam ES material terkandung berbagai protein (*crude protein*), masing-masing protein itu dapat berikatan secara spesifik dengan antibodi anti-*Fasciola spp* yang juga beragam baik klas maupun subklasnya, sehingga dalam pembacaan dengan *ELISA-reader* menunjukkan nilai OD yang lebih tinggi. Di pihak lain, pada infeksi alam terjadi paparan berupa parasit (*Fasciola spp*) utuh. Rantam (2003) menyatakan bahwa, limfosit T dan B hanya mampu mengenali satu epitop yang spesifik. Jadi adanya respon imun yang diinduksi oleh banyak epitop, maka diperlukan pengaktifan limfosit untuk berdeferensiasi menjadi bermacam-macam limfosit spesifik terhadap epitop. Pengaktifan masing-masing limfosit tersebut dapat menumbuhkan banyak klon dari sel yang sama untuk merespon antigen, sehingga mengakibatkan proliferasi dan diferensiasi limfosit dengan spesifisitas yang berbeda, oleh karena itu dikenal dengan antibodi poliklonal.

Pada catL terkandung protein yang lebih murni yaitu pada MR antara 27-28 kDa sehingga antibodi yang terikat secara spesifik lebih sedikit, dengan demikian dalam pembacaan dengan *ELISA-reader* menunjukkan nilai OD yang lebih rendah. Walaupun

penggunaan CatL menunjukkan hasil dengan OD rendah, namun secara keseluruhan akan mendapatkan hasil yang lebih spesifik. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Safar *et al.* (1992) yang menyatakan bahwa, penggunaan *partially purified antigen* sebagai bahan uji pada serodiagnosis helmintiasis dengan teknik ELISA menunjukkan hasil yang lebih spesifik dibanding dengan *crude extract*.

5.6 Uji Sensitivitas dan Spesifisitas Protein CatL pada Diagnosis Distomatosis dalam Serum Darah Sapi

Hasil penghitungan nilai sensitivitas dan spesifisitas protein catL dan ES pada diagnosis distomatosis dalam serum darah Sapi dengan tabulasi silang secara lengkap dapat dilihat pada Lampiran 3, sedangkan penghitungan secara ringkas dapat dilihat pada Tabel 5.3 dan 5.4.

Tabel 5.3 Hasil Penghitungan Nilai Sensitivitas dan Spesifisitas Protein CatL pada Diagnosis Distomatosis Serum Sapi dengan Tabulasi Silang

	Hasil ELISA		Total
	OD +	OD -	
Distomatosis +	14	8	22
Sensitivitas	63,6 %	36,4 %	100 %
Distomatosis -	1	7	8
Spesifisitas	12,5 %	87,5 %	100 %
Total	15	15	30

Tabel 5.4 Hasil Penghitungan Nilai Sensitivitas dan Spesifisitas Protein ES pada Diagnosis Distomatosis Serum Sapi dengan Tabulasi Silang

	Hasil ELISA		Total
	OD +	OD -	
Distomatosis +	22	0	22
Sensitivitas	100 %	0 %	100 %
Distomatosis -	8	0	8
Spesifisitas	100 %	0 %	100 %
Total	30	0	30

Pada Tabel 5.3 terlihat bahwa nilai sensitivitas protein catL terhadap antibodi dalam serum darah sapi penderita distomatosis adalah sebesar 63,6 % dan nilai spesifisitas yang diperoleh adalah 87,5%. Nilai sensitivitas dan spesifisitas protein catL sebagai antigen pada penelitian ini tergolong rendah hal ini kemungkinan karena serum kontrol positif (terinfeksi cacing selain *Fasciola spp*) yang digunakan dalam jumlah sedikit, hal ini mengingat keterbatasan waktu dan banyaknya infeksi campuran (*mix infection*) dari beberapa cacing dalam satu ekor sapi. Kemungkinan lain adalah penggunaan kontrol positif cacing dari klas Nematoda yang tidak satu klas (lain klas) dengan *Fasciola spp* yang termasuk klas Trematoda. Kondisi ini bisa berbeda apabila digunakan juga cacing yang satu klas (sesama trematoda) dalam proporsi yang sesuai.

Pada Tabel 5.4 terlihat bahwa nilai sensitivitas protein ES terhadap antibodi dalam serum darah sapi penderita distomatosis adalah sebesar 100 % tetapi spesifisitas yang diperoleh adalah 0%. Nilai sensitivitas yang diperoleh dengan menggunakan protein ES memang sempurna tetapi nilai spesifisitasnya sangat rendah (0%), hal ini menggambarkan betapa tinggi kejadian reaksi silang yang terjadi pada infeksi cacing sekalipun kontrol yang digunakan adalah cacing lain klas.

Adanya reaksi silang pada penggunaan antigen ekstrak *crude protein* memberikan isarat bahwa pada uji imunodiagnostik membutuhkan bahan uji yang lebih spesifik. Abdel-Rahman (2000) menyatakan bahwa, purifikasi protein cacing *T. vitulorum* dewasa ternyata menghasilkan fraksi protein yang dapat meningkatkan spesifisitas (*specific activity*) dibanding dengan *crude extract*. Hal ini juga tampak pada penggunaan *crude extract* dari cacing *T. canis* yang menunjukkan reaksi silang dengan antibodi terhadap *A. vitulorum* dan *A. lumbricoides*, tetapi reaksi silang tidak terjadi bila menggunakan *partially purified antigen* (Safar *et al.*, 1992). Reaksi silang antara *Fasciola spp* dengan antiserum Nematoda lebih sering terjadi pada protein dengan MR tinggi, yaitu sekitar 80 kDa bahkan lebih dari 100 kDa (Kusnoto, 2003). Oleh karena induk semang yang terinfeksi oleh parasit akan menimbulkan respon imun

terhadap banyak epitop, maka perlu dikembangkan bahan uji yang lebih spesifik, yaitu dengan jalan membuat manipulasi sistem imun dengan cara hibridoma, yang merupakan turunan klon tunggal dari sel B yang teraktivasi untuk memproduksi antibodi yang homogen atau *single molecular species of antibody* yang hasilnya dikenal dengan antibodi monoklonal (*monoclonal antibody*) (Rantam, 2003).



BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

- 1) Telah diketahui 16 macam fraksi protein *excretory/secretory* (ES) *Fasciola spp*, yaitu protein 130, 108, 91, 74, 58, 52, 45, 40, 35, 32, 28, 27, 25, 18, 15, 8 kDa.
- 2) Telah berhasil diidentifikasi protein spesifik *Fasciola spp*, yaitu sebanyak duabelas ikatan protein dengan karakter yang berbeda, yaitu protein 130, 108, 58, 45, 40, 35, 28, 27, 25, 18, 15, dan 8 kDa.
- 3) Telah berhasil diisolasi protein *cathepsin-L* (CatL) dari ES *Fasciola spp*, yaitu pada MR 27-28 kDa.
- 4) Sebagai bahan uji, protein CatL dengan nilai sensitivitas 63,6% dan nilai spesifisitas 87,5% lebih baik dibanding protein ES dengan sensitifitas 100% tetapi spesifisitasnya 0%.

6.2 Saran

- 1) Selain catL yaitu protein 27-28 kDa, perlu dicermati protein 40, 35 dan 8 kDa pita ikatan yang jelas tampak pada ES *Fasciola spp juvenile* tetapi pita protein ini tidak menunjukkan reaksi silang dengan *Paramphistomum spp*.
- 2) Perlu dilanjutkan uji aplikasi protein *cathepsin-L* (CatL) dari ES *Fasciola spp*, yaitu pada MR 27-28 kDa sebagai kit diagnosis dibandingkan dengan bahan uji lain, misalnya protein 40, 35 dan 8.
- 3) Untuk mendapatkan uji dengan sensitivitas dan spesifisitas yang sangat tinggi perlu dikembangkan uji ELISA dengan menggunakan antibodi monoklonal anti-CatL.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdel-Rahman EH. 2000. Isolation and structural characterization of *Toxocara vitulorum* specific antigen and its potency in diagnosis of toxocariasis among buffalo calves. *J Egypt Soc Parasitol*, Aug;30(2):387-400
- Abdel-Rahman EH and Abdel-Megeed KN. 2000. Molecular identity of major cross-reactive adult antigens in *Fasciola gigantica*, *Toxocara vitulorum* and *Moniezia expanza*. *Abstract. J. Egypt. Soc. Parasitol.* 30(2): 561-71
- Abdel-Rahman EH, Abdel-Megeed KN, and Hassanain MA. 2000. Structural characterization dan immunocatalization of egg antigens cross-react with *Toxocara vitulorum*, *Fasciola gigantica* and *Moniezia expanza*. *Abstract. J. Egypt. Soc. Parasitol.* 30(2): 581-91
- Bunnag D, Bunnag T, and Goldsmith R. 1992. Liver fluke infections. In: *Tropical Medicine*. 7th ed. Strickland GT. Ed. London: W.B. Saunders Company; pp. 761-4
- Cornevale S, Rodriguez MI, Guarnera EA, Carmona C, Tanos T, and Angel SO. 2001. Immunodiagnosis of fasciolosis using recombinant pro cathepsin L cystein protease. *Diag. microbiol. Infect. Dis.* 41(1-2): 43-49.
- Estuningsih SE. 2003. Antigen *Fasciola gigantica*. Workshop Pengembangan Diagnostik Fasciolosis dengan ELISA untuk Deteksi Cathepsin L. Balai Penelitian Veteriner, Bogor.
- Estuningsih SE, Adiwinata G, Widjajanti S, dan Pienrafita D. 2003. Pengembangan teknik capture ELISA Fasciolosis pada sapi dengan antibodi monoklonal. *Buletin Ilmu Veteriner. Balai Penelitian Veteriner, Bogor.* 1(1): 18-27
- Harlow, E.N., and D. Lane. 1988. *Antibodies. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbour Laboratory. USA.
- Jithendran, K.P., and T.K. Bhat. 1999. Epidemiology of parasitoses in dairy animals in the North West Humid Himalayan Region of India with particular reference to gastrointestinal nematodes. *Trop Anim Health Prod*; 31(4): 205-14
- Kooyman FN, Schallig HD, Van Leeuwen MA, MacKellar A, Huntly JF, Cornelissen AW, Vervelde L, 2000. Protection in lambs vaccinated *Haemonchus contortus* antigens is age related, and correlates with IgE rather than IgG1 antibody. *Parasite Immunol*; 22(1): 13-20
- Kusnoto. 2003. Isolasi dan karakterisasi protein imunogenik larva stadium II *Toxocara cati* isolat lokal. Thesis, Pascasarjana, Universitas Airlangga.

- Kusumamihardja S. 1993. Parasit dan Parasitosis pada Hewan Ternak dan Hewan Piaraan di Indonesia. Bogor: PAU Bioteknologi, IPB.
- Levine ND. 1978. Textbook of Veterinary Parasitology. Burgers Publishing Company. Diterjemahkan oleh: Ashadi G. 1990. Wardiarto Ed. Yogyakarta: Gajah Mada University Press.
- Patterson RM, 1989. The immune respon to helminth parasites. In: ELISA Technology in Diagnosis and Research. Graham and Burgers Eds. James Cook University of North Queensland, Australia. pp: 279-297
- Rantam, F.A. 1997. Bornavirus and cells culture. Isolation infections *Bornavirus* from human and animal and their characterization. Diss. Vet. Med. FV – Berlin.
- Rantam, F.A. 2003. Metode Immunologi. Cetakan Pertama. Airlangga University Press. 3-9; 147-156.
- Safar EH, el-Rifaei F, and Maklad KM. 1992. Protein chromatographic study on adult *Ascaris lumbricoides*, *Ascaris vitulorum* and *Toxocara canis*. J. Egypt. Soc. Parasitol. 22(1): 171-6
- Soulsby E.J.L. 1986. Helminth, Arthropods and Protozoa of Domestic Animals. London: Bailliere Tindall and Cassell.
- Spithill TW, Smooker PM, Sexton DL, Bozas E, Morrison CA, Creaney J, and Parson JC. 1999. Depeloment of vaccines against *Fasciola hepatica*. In: Fasciolosis (J.P. Dalton Ed) CAB International.
- Tolan. 2003. Fascioliasis. eMedicine Instant Access to the Minds of Medicine.
- Wibisono J. 2000. Pemeriksaan kejadian distomatosis sapi Madura di RPH Bangkalan secara patologi anatomik dan histopatologik organ hati. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, Surabaya.

Lampiran 1. Analisis Regresi untuk Menentukan Hubungan antara Nilai Rf pada SDS-PAGE dengan Massa Molekul Relatif (MR) Protein

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

Jarak	Rf	MR (y KDa)	MR (y Da)	log y (Da)
5.0	0.044	200.0	200000	5.301
14.5	0.127	116.3	116300	5.066
16.5	0.145	97.4	97400	4.989
27.5	0.241	66.0	66000	4.820
43.0	0.377	45.0	45000	4.653
69.0	0.605	31.0	31000	4.491
77.0	0.675	21.5	21500	4.332
102.0	0.895	14.3	14300	4.155
113.0	0.991	6.5	6500	3.813

Curve Fit

Dependent variable.. logybm Method.. CUBIC

Listwise Deletion of Missing Data

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

Analysis of Variance:

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

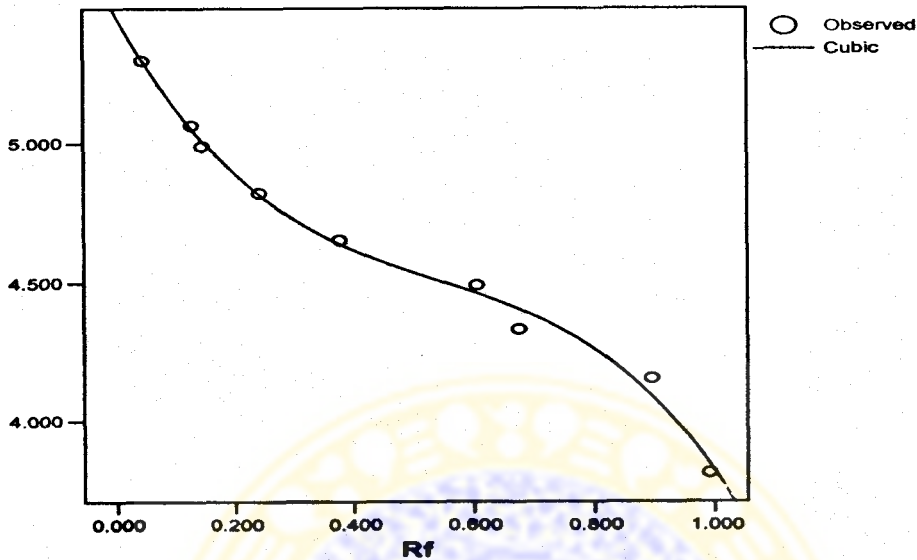
F = 245.29108 Signif F = .0000

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

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

Lanjutan Lampiran 1

Log MR



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

Jarak	rf	log y Da	BM Da	BM kDa
10.0	0.088	5.163	145545.90	145.5
15.5	0.136	5.032	107646.50	107.6
19.0	0.167	4.960	91201.10	91.2
24.0	0.211	4.869	73960.50	74.0
31.0	0.272	4.766	58344.50	58.3
35.0	0.307	4.718	52239.60	52.2
44.0	0.386	4.630	42657.90	42.7
47.0	0.412	4.606	40364.50	40.4
49.0	0.430	4.591	38994.20	39.0
55.0	0.482	4.550	35481.30	35.5
58.0	0.509	4.531	33962.50	34.0
63.0	0.553	4.500	31622.80	31.6
68.0	0.596	4.469	29444.20	29.4
70.5	0.618	4.452	28313.90	28.3
73.0	0.640	4.435	27227.00	27.2
78.0	0.684	4.396	24888.60	24.9
85.0	0.746	4.332	21478.30	21.5
92.0	0.807	4.249	17741.90	17.7
97.5	0.855	4.169	14757.10	14.8
110.0	0.965	3.922	8356.00	8.4

Lampiran 2. Hasil Pembacaan Nilai *Optical Density* Serum Sapi Penderita Distomatosis dengan Teknik *indirect-ELISA*

Case Summaries^a

	ES	CATL
1	1.062	.368
2	.940	.468
3	.734	.364
4	.962	.377
5	1.561	.248
6	.649	.278
7	.826	.178
8	.747	.239
9	.848	.148
10	.333	.131
11	.668	.236
12	.389	.148
13	1.093	.244
14	.461	.127
15	.664	.122
16	.763	.232
17	1.637	.390
18	1.077	.137
19	.721	.254
20	.427	.108
21	.463	.335
22	.697	.602
23	.537	.218
24	.469	.206
25	.352	.128
26	1.131	.239
27	.483	.171
28	.711	.167
29	.613	.220
30	.660	.142
Total	Sum	22.678
	Mean	.75593
	Std. Deviation	.32121
		7.225
		.24083
		.11575

a. Limited to first 100 cases.

Lanjutan Lampiran 2**T-Test****Group Statistics**

Jenis Antigen	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Optical Density ES	30	.75593	.32121	5.8646E-02
CatL	30	.24083	.11575	2.1132E-02

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means				
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference
Optical Density	Equal variances assumed	14.186	.000	8.263	58	.000	.51510	6.2337E-02
	Equal variances not assumed			8.263	36.406	.000	.51510	6.2337E-02

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

Lampiran 3. Penghitungan Nilai Sensitivitas dan Spesifisitas Protein CatL dan ES pada Diagnosis Distomatosis Serum Sapi dengan Tabulasi Silang

Crosstabs

Pemeriksaan Feses * CatL Crosstabulation

			CatL		Total
			OD (+)	OD (-)	
Pemeriksaan Feses	Fasciola (+)	Count	14	8	22
		Expected Count	11.0	11.0	22.0
		% within Pemeriksaan Feses	63.6%	36.4%	100.0%
		% within CatL	93.3%	53.3%	73.3%
		% of Total	46.7%	26.7%	73.3%
	Nematoda (+)	Count	1	7	8
		Expected Count	4.0	4.0	8.0
		% within Pemeriksaan Feses	12.5%	87.5%	100.0%
		% within CatL	6.7%	46.7%	26.7%
		% of Total	3.3%	23.3%	26.7%
Total		Count	15	15	30
		Expected Count	15.0	15.0	30.0
		% within Pemeriksaan Feses	50.0%	50.0%	100.0%
		% within CatL	100.0%	100.0%	100.0%
		% of Total	50.0%	50.0%	100.0%

Crosstabs

Pemeriksaan Feses * ES Crosstabulation

			ES	Total
			OD (+)	
Pemeriksaan Feses	Fasciola (+)	Count	22	22
		Expected Count	22.0	22.0
		% within Pemeriksaan Feses	100.0%	100.0%
		% within ES	73.3%	73.3%
		% of Total	73.3%	73.3%
	Nematoda (+)	Count	8	8
		Expected Count	8.0	8.0
		% within Pemeriksaan Feses	100.0%	100.0%
		% within ES	26.7%	26.7%
		% of Total	26.7%	26.7%
Total		Count	30	30
		Expected Count	30.0	30.0
		% within Pemeriksaan Feses	100.0%	100.0%
		% within ES	100.0%	100.0%
		% of Total	100.0%	100.0%

Lampiran 4. Abstrak Hasil Penelitian Mahasiswa Peserta Hibah Due-Like.

Profil Protein *Excretory-Secretory* (ES) Cacing *Fasciola gigantica* Isolat Lokal

Rendy Tri Dharmawan Laksana

ABSTRAK

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

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui berat molekul protein cacing *F. gigantica* yang nantinya dapat digunakan sebagai bahan penelitian selanjutnya mengenai spesifitas protein imunogenik *F. gigantica* untuk keperluan diagnosis *fasciolosis* dini secara imunologis.

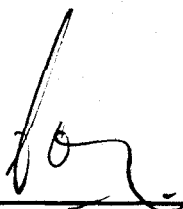
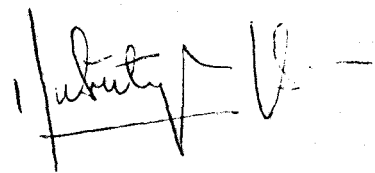
Juvenile dan cacing dewasa dikoleksi dari pembedahan organ hati sapi penderita *fasciolosis*. Kemudian dilakukan isolasi terhadap *juvenile* dan cacing dewasa untuk mendapat ES protein dengan menggunakan medium RPMI.

Analisis protein ES *juvenile* dan ES cacing dewasa *F. gigantica* dilakukan dengan teknik SDS-PAGE.

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

Mengetahui,

Komisi Pembimbing,

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

Prof. Dr. Ir. Hj. Kusurningrum, M.S.

Pembimbing Pertama

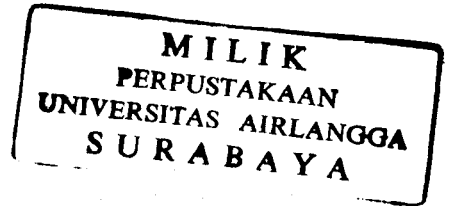
Pembimbing Kedua

Deteksi Protein Cathepsin-L Untuk Pengembangan Diagnosis Distomatosis Dengan Teknik Elisa

Lanjutan Lampiran 4.

**ISOLASI PROTEIN *CATHEPSIN – L*
FASCIOLA SPP. DENGAN
TEKNIK ELUSI**

RAKHMI ROS SARI

**ABSTRAK**

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan protein murni *Fasciola spp.* dengan menggunakan teknik preparasi gel electrophoresis (ELUSI) yang diharapkan dapat digunakan untuk diagnosa *Distomatosis* secara serologis.

Sampel cacing dikoleksi dari hepar sapi penderita *Distomatosis*, untuk memperoleh material *excretory/secretory* (ES) cacing *Fasciola spp.* dewasa dan muda diinkubasi dalam medium RPMI 1640 dan PBS. Sedangkan *Whole extract* diperoleh dari sonikasi dengan frekuensi 20 kHz selama 3 x 30 detik. Kemudian dilakukan analisis protein dengan menggunakan *SDS-PAGE* untuk memperoleh profil cacing *Fasciola spp.* Untuk memastikan bahwa hasil analisis protein CatL yang dilakukan merupakan protein spesifik *Fasciola spp.* dan untuk memberikan gambaran dasar pada saat dilakukan isolasi protein, maka dilakukan identifikasi protein *Fasciola spp.* dengan teknik *Western Blot*. Tahap berikutnya dilakukan purifikasi dengan teknik preparasi gel elektroforesis (Elusi). Hasil isolasi protein murni tersebut kemudian dianalisis kembali menggunakan teknik *SDS-PAGE* untuk memastikan protein yang berhasil diisolasi pada berat molekul yang tepat.

Penelitian ini berhasil memurnikan protein spesifik *Fasciola spp.* dengan berat molekul 27 – 28 kDa menggunakan teknik preparasi gel elektroforesis (Elusi).

Mengetahui,
Komisi Pembimbing

Prof. Dr. Sri Subekti B.S. DEA., Drh
Pembimbing Pertama

Dr. I Komang Wiarsa Sardjana
Pembimbing Kedua

KARAKTERISASI PROTEIN *EXCRETORY* / *SECRETORY*
***Fasciola* spp. ISOLAT LOKAL DENGAN**
TEKNIK *WESTERN BLOT*

Mukhlis

ABSTRAK

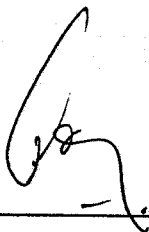
Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui spesifisitas protein *excretory* / *secretory* yang diisolasi dari cacing *Fasciola* spp. stadium dewasa dan stadium muda isolat lokal, penelitian ini diharapkan dapat menunjang pengembangan biologi molekuler khususnya cacing *Fasciola* spp. dan sebagai langkah awal untuk pembuatan bahan diagnostik.

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif, cacing *Fasciola* spp. stadium muda dan dewasa di koleksi dari organ hati sapi yang menderita fasciolosis. Cacing *Fasciola* spp. tersebut kemudian dibuat *whole extract* dengan teknik sonikasi dan dibuat E/S dalam medium RPMI-1640.

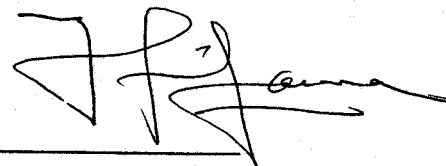
Tahap pertama sampel dianalisis dengan teknik SDS PAGE, lalu dilanjutkan dengan karakterisasi protein dengan teknik *western blott*, untuk mengetahui spesifisitas protein *whole extract* dan E/S *Fasciola* spp. yang di komparasikan dengan E/S cacing *Paramphistomum* spp.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa protein dengan berat molekul 27-28 kDa adalah protein spesifik pada semua stadium (muda dan dewasa) perkembangan cacing *Fasciola* spp. sedangkan protein pada berat molekul 36 kDa dan 40 kDa spesifik pada cacing stadium muda. Protein tersebut sangat potensial sebagai kandidat bahan diagnostik.

Mengetahui,
Komisi Pembimbing



(Prof.Dr. Setiawan Koesdarto M.Sc,Drh)
Pembimbing Pertama



(Drh Husni Anwar)
Pembimbing Kedua