SKRIPSI

ISOLASI PROTEIN CATHEPSIN-L *Fasciola spp.* DENGAN TEKNIK *ELUSI*

Oleh :

RAKHMI ROS SARI
SURABAYA – JAWA TIMUR

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2005

ISOLASI PROTEIN *CATHEPSIN – L Fasciola spp.* DENGAN TEKHNIK *ELUSI*

Skripsi sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

pada

Fakultas Kedokteran Hewan, Unversitas Airlanggga

Oleh :

Rakhmi Ros Sari
060012786

Menyetujui

Komisi Pembimbing

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

Dr.I Komang Wiarsa Sardjana
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

Penitia Penguji

Ririen Ngesti Wahyuti,M.Kes.,Drh

Ketua

Prof.Dr.SetiawanKoesdarto, MSc.,Drh

Sekretaris

Jola Rahmahani, M.Kes., Drh

Anggota

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

Anggota

Dr. I Komang Wiarsa Sardjana.,Drh

Anggota

Surabaya, 12 April 2005

Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga

Dekan,

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

NIP 130687297

ISOLASI PROTEIN *CATHEPSIN – L Fasciola spp.* DENGAN TEKHNIK ELUSI

RAKHMI ROS SARI

ABSTRAK

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

Sampel cacing dikoleksi dari hepar sapi penderita *Distomatosis*, untuk memperoleh material ES cacing *Fasciola spp.* diinkubasi dalam medium RPMI 1640 dan PBS. Sedangkan *Whole Extract.* diperoleh dari sonikasi dengan frekwensi 30 KHz selama 3 X 30 detik Kemudian dilakukan analisis protein dengan menggunakan *SDS PAGE* untuk memperoleh profile protein cacing *Fasciola spp.* Untuk memastikan bahwa hasil analisis protein CatL yang dilakukan merupakan protein spesifik *Fasciola spp.* dan memberikan gambaran dasar pada saat dilakukan isolasi protein, selanjutnya 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).

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah SWT, karena perkenannya jugalah penelitian ini dapat diselesaikan dengan baik.

Ucapan terima kasih juga ditujukan kepada Prof. Dr. Sri Subekti B.S. DEA., drh selaku dosen pembimbing pertama dan Dr.I Komang Wiarsa Sardjana selaku dosen pembimbing kedua, yang telah memberikan saran dan bimbingan serta dorongan dan bantuan moril maupun pikiran kepada penulis. Kepada Ibu Sri Mumpuni, Mkes., drh dan Bapak Kusnoto, Mkes.,drh penulis mengucapkan terima kasih atas semua saran dan bimbingannya selama melakukan penelitian di Laboratorium Helmintologi Fakultas Kedokteran Hewan (FKH) UNAIR.

Terima kasih pula kepada Mas Kris, Mbak Helen dan Mbak Indah selaku staf Laboratorium di *Tropical Disease Center* (TDC) UNAIR; Bapak Suwarno, staf Laboratorium Helmintologi FKH UNAIR dan Pak Waris, Pegawai pemeriksa daging, Rumah Potong Hewan (RPH) Pegirian Surabaya atas bantuan pengadaan bahan penelitian.

Kepada rekan-rekan satu tim penelitian (Rendy, Lamia dan Mukhlis) penulis mengucapkan terima kasih atas semua bantuan dan kerjasamanya selama penelitian berlangsung. Kepada sahabat-sahabat tercintaku Eva, Neea, Dhani dan Chimy, terima kasih atas semua semangat, dukungan dan dorongan yang diberikan. Juga terima kasih untuk semua perjuangan teman-teman satu angkatan (angkatan 2000), semoga kita dapat terus melanjutkan perjuangan ini sampai menjadi dokter hewan yang handal dan terpercaya di masyarakat

Kepada Bapak, Ibu terima kasih untuk semua nasehat, kesabaran dan bantuan-bantuannya kepada penulis yang telah mendukung mulai dari awal penelitian sampai terselesaikannya penelitian ini. Kepada adik-adikku, dek Ayom, dek Imbang, dan dek Kanti. Terima kasih pula buat Indra atas semua bantuan dan dorongannya selama penelitian, semoga Allah juga memberikan yang terbaik. Buat "Monshu" yang selalu setia menemani setiap langkah perjalananku, semoga kau tetap terawat dengan baik.

Akhirnya kepada semua pihak yang membantu dalam pelaksanaan penelitian ini yang tidak mungkin penulis sebut namanya satu persatu, terima kasih yang sebesar-besarnya. Semoga Allah SWT memberikan balasan sesuai dengan amal kebaikannya.

Surabaya, Maret 2005

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL i

LEMBAR PENGESAHAN ii

ABSTRAK iv

KATA PENGANTAR v

DAFTAR ISI vii

DAFTAR GAMBAR x

DAFTAR LAMPIRAN xi

BAB I. PENDAHULUAN 1

1.1 Latar Belakang 1

1.2 Perumusan Masalah 4

1.3 Tujuan Penelitian 4

1.4 Manfaat Penelitian 4

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA 5

2.1 Tinjauan *Fasciola spp.* 5

2.1.1 Klasifikasi 5

2.1.2 Morfologi 5

2.1.3 Siklus hidup 8

2.2 *Distomatosis* 11

2.2.1 Aspek zoonosis 11

2.2.2 Patogenesis 12

RINGKASAN 34

DAFTAR PUSTAKA 36

LAMPIRAN 39

2.2.3 Diagnosa 14

2.3 Antigen Parasit 15

BAB III. MATERI DAN METODE PENELITIAN 17

3.1 Tempat dan waktu Penelitian 17

3.2 Bahan dan alat 18

3.3 Metode Penelitian 18

3.3.1 Teknik koleksi cacing hati dari organ hepar sapi .. 18

3.3.2 Teknik Pembuatan RPMI Medium 20

3.3.3 Pembuatan *Whole Extract* cacing Fasciola spp..... 21

3.3.4 Pembuatan Antigen ES cacing *Fasciola spp*..... 21

3.3.5 Pembuatan Antibodi Poliklonal 22

3.3.6 *Polyacrilamid Gel Elektrophoresis* (SDS-PAGE) 22

3.3.7 Identifikasi Protein dengan Teknik *Western Blot* 24

3.3.8 Preparasi Gel *Elektrophoresis (ELUSI)*..... 24

3.4 Kerangka Operasional 26

BAB IV. HASIL PENELITIAN 27

BAB V. PEMBAHASAN 29

BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN 33

6.1 Kesimpulan 33

6.2 Saran 33

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 a Cacing Dewasa *Fasciola spp.* 6

b Telur *Fasciola spp* 6

Gambar 2.2 Siklus hidup cacing *Fasciola spp* 9

Gambar 2.3 Hepar sapi penderita *Distomatosis* 12

Gambar 4.1 Analisis protein hasil isolasi catL dari protein E/S *Fasciola spp.* dengan teknik SDS-Page 28

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Analisis Protein dengan SDS-PAGE 39

Lampiran 2.Hasil Penghitungan Berat Molekul Protein Cacing *Fasciola spp* 40

Lampiran 3. Analisis Regresi untuk Menentukan Hubungan antara Nilai Rf pada SDS-PAGE dengan Massa Molekul Relatif (MR) Protein..... 41

Lampiran 4 Identifikasi Protein Dengan Teknik *Western Blot* 44

BAB I

PENDAHULUAN

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Penelitian

Sub sektor peternakan pada era reformasi memegang peran strategis dalam pembangunan perekonomian nasional, bahkan telah mampu berperan di garis depan dalam mengatasi krisis, karena sektor peternakan sebagai bagian tak terpisahkan dari sektor pertanian telah mampu menjadi sub sektor andalan dan mesin penggerak pertumbuhan ekonomi. Dalam upaya memenuhi kebutuhan pangan dalam negeri, salah satu kebijakan yang diambil sub sektor peternakan adalah mengembangkan komoditas peternakan khususnya ternak sapi.

Salah satu penyakit hewan ternak yang cukup merugikan ialah penyakit yang disebabkan parasit cacing yaitu *fasciolasis* atau *distomatosis* yang disebabkan oleh *Fasciola spp.,* namun demikian pengendalian terhadap penyakit ini sedikit sekali dilakukan oleh peternak karena berbagai alasan, antara lain: 1) Tidak memperlihatkan gejala yang mencolok, kecuali pada yang terinfeksi berat; 2) Kapasitas kerja kurang dan penampilan reproduksi yang jelek; dan 3) Penampilan kapasitas kerja menurun dan produksi yang buruk (Suhardono,2003).

Angka prevalensi *distomatosis* di berbagai negara dapat bervariasi di Peru, Mesir, Ethiopia berturut-turut sebesar 10%, 2-7%, dan 11%. Ekuador sebesar 24 - 53 % dan di China bisa mencapai 60% (Tolan,2003). Sedangkan menurut hasil penelitian Balitvet tahun 2003 menunjukkan bahwa dari 87 ekor sapi yang

dipotong di RPH Jakarta 64,4% positif mengandung *Fasciola* di dalam organ hatinya dan 50,6% positif terdapat telur cacing didalam fesesnya.

Kerugian yang ditimbulkan cacing ini pun tidaklah sedikit. Berdasarkan hasil pengamatan Direktorat Jenderal Bina Produksi Peternakan, Departemen Pertanian Republik Indonesia pada 31 lokasi di Indonesia dinyatakan bahwa kerugian akibat *Fasciola gigantica* mencapai 513,6 miliar per tahun (Balitvet,2003)

Infeksi cacing ini pun juga sangat merugikan tidak hanya bagi peternak tetapi juga konsumen, karena mengakibatkan kerugian langsung dan kerugian konsekuensial. Kerugian langsung yaitu berupa penurunan nilai suatu ternak Ternak dapat menderita anemia, gangguan pertumbuhan pada ternak muda, penurunan bobot badan ternak dewasa, penurunan bobot karkas dan penurunan produksi susu pada sapi perah. Sedangkan kerugian konsekuensial adalah ikut sertanya konsumen menerima daging (terutama organ hati) yang secara kualitas di bawah kelayakan untuk dikonsumsi (Brotowidjoyo,1996 dikutip oleh Satriya, 1996). Selain itu manusia juga dapat tertular akibat mengkonsumsi makanan atau sumber air yang tercemar oleh metaserkaria yang infektif (Sri Subekti dkk., 2002). Sehingga menyebabkan fibrosis dan atropi organ hati, anemia, diare, penurunan berat badan, demam dan eosinophilia (Subronto dan Tjahajati 2001).

Indonesia sebagai negara tropik merupakan lingkungan yang baik bagi pertumbuhan dan perkembangan cacing *Fasciola spp.*, sehingga *distomatosis* merupakan problema tersendiri khususnya pada ternak ruminansia. Hal ini karena kesulitan dalam pengendalian dan pemberantasan agen penyakit ini, terutama dari

aspek lingkungan dan inang perantaranya yaitu *Lymnaea javanica,* seperti diketahui bahwa pada musim penghujan, kondisi lingkungan yang basah dan tingkat kelembaban yang tinggi merupakan tempat yang sesuai untuk perkembangbiakan *Lymnaea javanica.* Kesulitan memberantas parasit ini diperburuk dengan sistem penggembalaan ternak dan juga kemampuan hidup serta daya reproduksi cacing yang cukup lama. Curah hujan berkaitan langsung dengan aktivitas pertanian, penggembalaan, ketersediaan hijauan dan air minum ternak, serta terbentuknya habitat yang cocok untuk perkembangbiakan siput *Lymnaea javanica*, dimana kesemuanya itu berhubungan dengan proses terjadinya infeksi cacing hati ini.

Oleh karena itu untuk menghindari kerugian lebih besar yang ditimbulkan oleh penyakit cacing ini maka diperlukan tindakan pengendalian termasuk tindakan pencegahan dan pemberantasan. Penentuan diagnosis harus dibuktikan dengan keberadaan telur *Fasciola spp.* pada feses, yang dapat dilakukan dengan teknik pemeriksaan feses secara sedimentasi (Subronto dan Tjahajati, 2001). Namun demikian telur cacing tersebut hanya dapat ditemukan apabila cacing dewasa telah memproduksi telur. Untuk mengatasi masalah ini diperlukan diagnosis yang lebih dini, cepat dan akurat pada saat periode prepaten (± 2 bulan), Sebagai upaya dilakukan penelitian isolasi protein antigen spesifik parasit yang kemudian diharapkan dapat digunakan untuk diagnosis dini terhadap *distomatosis.* Salah satunya ialah protein *cathepsin-L* berukuran 27-28 kDa yang dihasilkan dari material *excretory/secretory* (E/S) *Fasciola spp..* Protein ini telah digunakan sebagai vaksin *distomasis* (Estuningsih, 2003[a]).

1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang dan permasalahan tersebut dapat dirumuskan masalah sebagai berikut.

Apakah *cathepsin-L* sebagai protein antigen spesifik *Fasciola spp.* dengan berat molekul 27 -28 kDa dapat dimurnikan dengan teknik preparasi gel electroforesis *(ELUSI)* ?

1.4 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh protein spesifik *Fasciola spp.* dengan berat molekul 27 – 28 kDa melalui teknik preparasi gel electroforesis *(ELUSI).*

1.5 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan dalam diagnosis imunologis yang mempunyai sensitivitas dan spesifisitas tinggi terhadap *distomatosis* yang disebabkan oleh *Fasciola spp.*

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan *Fasciola sp.*

2.1.1 Klasifikasi

Klasifikasi cacing *Fasciola gigantica* menurut Norman D. Levine (1990) adalah sebagai berikut :

Filum	: Platyhelmintes
Kelas	: Trematoda
Sub Kelas	: Digeneasida
Ordo	: Echinostomorida
Sub Ordo	: Echinostomarina
Famili	: Fasciolidae
Genus	: Fasciola
Spesies	: *Fasciola gigantica* *Fasciola hepatica*

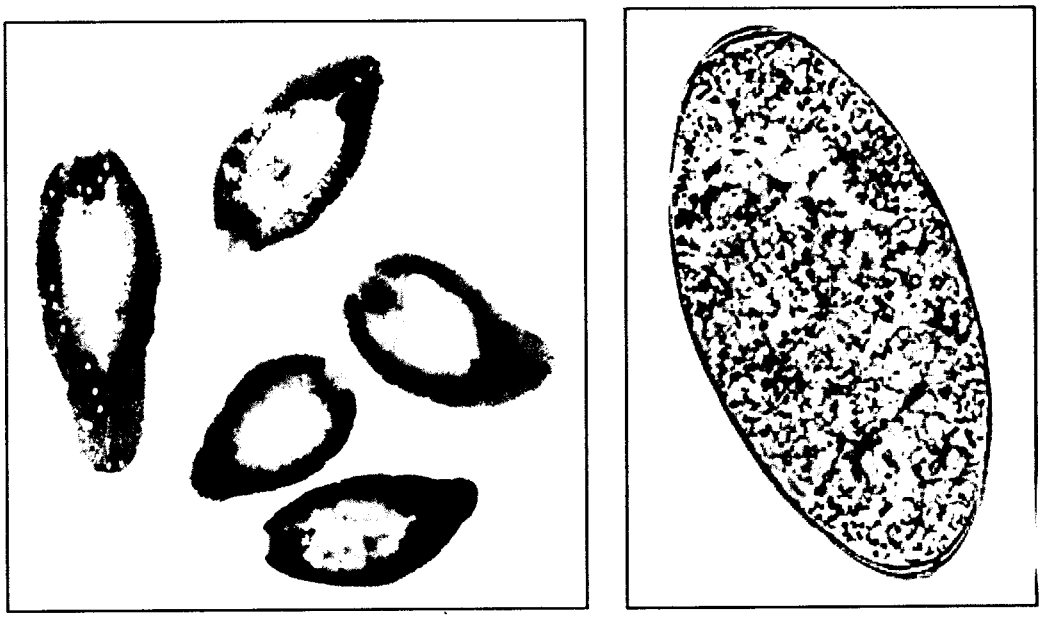
2.1.2 Morfologi

Cacing *Fasciola hepatica* berukuran panjang 20-30 mm dan lebar 13 mm sedangkan cacing *Fasciola gigantica* berukuran panjang 25-75 mm dan lebar 12 mm. Cacing *Fasciola hepatica* berwarna coklat gelap, sedangkan cacing *Fasciola gigantica* berwarna coklat muda dan tembus pandang. Ukuran telur cacing *Fasciola hepatica* 130-150 μm x 65-90 μm, sedangkan telur cacing *Fasciola gigantica* 150 – 190 μm x 70 – 140 μm (Sri Subekti dkk., 2001).

Cacing hati ini bersifat *hermaprodit* yakni pada satu individu terdapat dua jenis alat kelamin, yaitu alat kelamin betina dan alat kelamin jantan. Alat Kelamin jantan terdiri dari dua buah testes yang bercabang banyak dan terletak di tengah garis median tubuh. Sedangkan pada alat kelamin betina terdiri atas ovarium yang

jumlahnya satu dan bercabang – cabang banyak serta terletak di sebelah kanan garis median agak di sebelah atas dari testis (Soulsby, 1986).

Cacing dewasa *F.gigantica* biasanya ditemukan pada saluran empedu dan organ hati ruminansia khususnya sapi, kambing dan domba. Tetapi sapi lebih resisten daripada kambing atau domba dan dapat bertahan meskipun terinfeksi parasit dalam jumlah yang banyak tanpa menunjukkan manifestasi gejala klinik.



Gb. 2.1.
a. Cacing Dewasa *Fasciola spp.*
b. Telur *Fasciola spp.*

(Sumber : Urquhart *et al;* 1994)

2.1.3 Siklus Hidup

Fasciola spp. memiliki siklus hidup yang kompleks. Salah satu bagian dari siklus hidupnya yang penting adalah bahwa *Fasciola sp.* memerlukan induk semang antara (host intermediate) yaitu siput (*Lymnaea sp.).* Siklus hidup diawali dengan pembuahan sel telur, dan setelah keluar dari uterus cacing telur akan masuk dalam duodenum bersama dengan cairan empedu. Selanjutnya, telur tersebut terbawa empedu masuk kedalam usus dan dikeluarkan bersama tinja. Cacing dewasa mengeluarkan telur rata-rata 3.000 per harinya.Telur cacing hati berdinding tipis dan berwarna kuning serta mempunyai operkulum pada salah satu ujung terminal. Telur menetas setelah 10-12 hari pada suhu 26°C, menghasilkan mirasidium (Sri Subekti dkk., 2002). Ditempat basah, lembab dan hangat, operculum terbuka, yang untuk itu diperlukan enzim proteolitik yang berasal dari dalam telur sendiri, dan selanjutnya mirasidium yang bersilia keluar, berenang dan berputar – putar di dalam air selama beberapa jam, untuk pada suatu saat menempel dan menembus kulit siput *Lymnaea spp.* (Subronto dan Tjahajati, 2001)

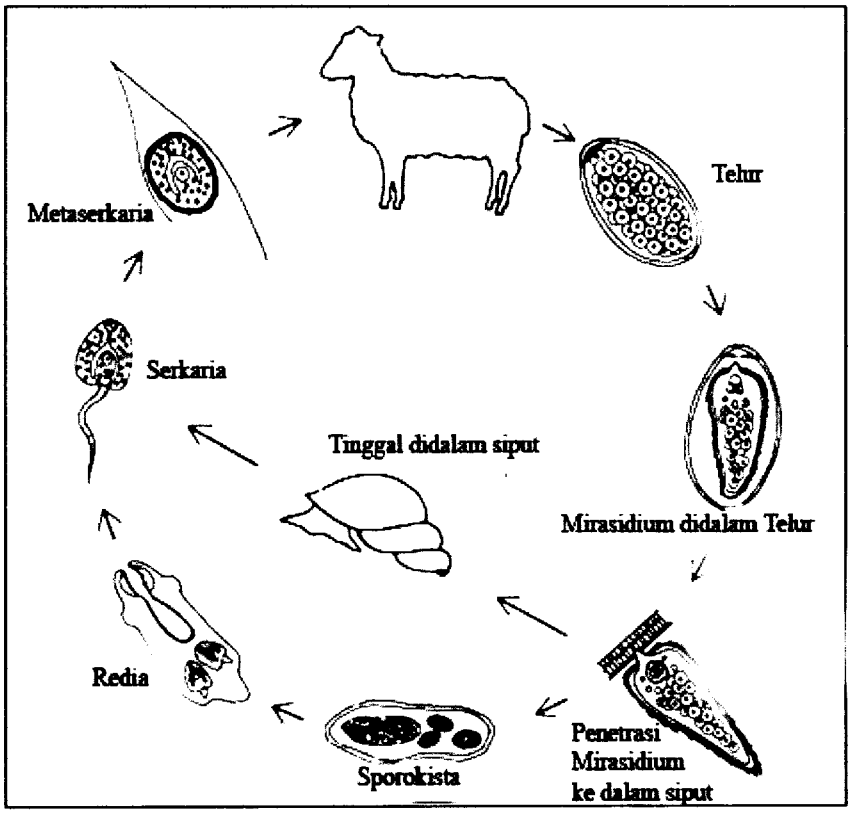
Mirasidium berbentuk menyerupai segitiga, ujung yang lancip adalah posterior. Bagian anterior melebar dengan suatu penonjolan kecil berbentuk papila kutikula bersilia serta mempunyai sepasang titik mata. Mirasidium berenang aktif di dalam air hingga menjumpai siput, kemudian menempel dan menembus kulit siput dari genus *Lymnaea.* Siput merupakan induk semang antara cacing dari genus *Fasciola spp. Lymnaea javanica* atau *Lymnaea rubigenosa* merupakan induk semang antara *Fasciola gigantica,* sedangkan *Lymnaea tomentosa* dan

Lymnaea trancatula merupakan induk semang antara cacing *Fasciola gigantica* (Soulsby, 1986;Sri Subekti dd., 2002; Subronto dan Tjahajati, 2001).

Didalam tubuh siput mirasidium berkembang menjadi sporokista yang panjangnya dapat mencapai sati milimeter, dan melalui perkembang biakan aseksual dihasilkan beberapa redia generasi pertama dan kedua Setiap sporokista menghasilkan 5-8 redia yang bila berkambang secara penuh panjangnya dapat mencapai 1-3 milimeter (Sri Subekti dkk., 2002)Redia keluar dari tubuh siput sebagai serkaria, dan pada waktu malam berenang di air, dan selanjutnya menempel pada daun sebagai metaserkaria. Sacara teoritis, satu ekor mirasidium dapat menghasilkan 1000 ekor larva (serkaria,metaserkaria) yang infektif. Waktu yang diperlukan untuk perubahan serkaria menjadi metaserkaria lebih kurang 2 bulan (Subronto dan tjahajati 2001).

Metaserkaria yang hidup dalam kista akan tumbuh sebagai cacing muda. Sapi atau ruminansia lain akan terinfeksi oleh penyakit ini karena makan rumput yang mengandung metaserkaria. Apabila dedaunan atau rumput-rumputan yang tercemar kista dimakan ternak, metaserkaria akan sampai di dalam usus.Kista metaserkaria yang berada dalam usus akan mengeluarkan cacing muda. Selanjutnya cacing muda akan menembus usus (duodenum) induk semang, kemudian akan memasuki rongga perut dalam waktu 24 jam setelah infeksi. Pada hari ke 4-6 pasca infeksi, sebagian besar cacing muda. sudah menembus pembungkus hati dan migrasi di dalam jaringan hati (Soulsby, 1986; Levine 1990;Akoso, 1996;Subronto dan tjahajati , 2001).

Dilaporkan bahwa cacing muda ini selain ke hati juga dapat ke paru-paru dan migrasi ke fetus pada sapi yang sedang bunting. Migrasi di dalam parenkim hati terjadi selama 6 minggu, setelah minggu ke 7 cacing muda mulai memasuki saluran empedu dan tumbuh menjadi cacing dewasa. Setelah minggu ke 8 dan seterusnya telur cacing dapat ditemukan dalam saluran atau cairan empedu dan kemudian juga dapat ditemukan pada tinja. Cacing hati ini tinggal, berkembang dan bertelur lagi di dalam saluran hati yang lamanya mencapai 10 – 12 minggu (Subronto dan Tjahajati 2001;Sri Subekti dkk., 2002).



Gb. 2.3. Siklus Hidup *Fasciola sp.*

(Sumber : Urquhart *et al;* 1994)

2.2 Distomatosis

2.2.1 Aspek Zoonosis

Distomatosis ialah suatu penyakit yang disebabkan oleh cacing *Fasciola ssp.* World Health Organization (WHO) mencatat bahwa sekitar 2,4 juta penduduk dunia terinfeksi penyakit ini, dan jumlahnya terus bertambah setiap tahun. Di daerah tropis dan sub tropis sebagai daerah endemik penyakit ini *Distomatosis* seringkali menimbulkan masalah kesehatan yang cukup serius. Manusia bisa terinfeksi karena mengkonsumsi makanan atau sumber air yang telah tercemar oleh larva infektif (Akoso, 1996; Maleewong *et al.*,1999; Subronto dan Tjahajati, 2001; Sri Subekti dkk., 2002).

Migrasi cacing muda ke jaringan organ hati manusia dapat menyebabkan berbagai masalah yang serius. Cacing muda ini dapat membuat lesi pada jaringan parenkhim hati. Invasi cacing ke saluran empedu dapat mengganggu sekresi cairan empedu yang menyebabkan proses pencernaan menjadi tidak sempurna (Sri Subekti dkk., 2002) .

Angka prevalensi penyakit ini dapat berbeda – beda pada suatu daerah, hal ini karena dipengaruhi oleh faktor lingkungan seperti suhu (temperatur), derajad keasaman (pH), kelembaban (Rh) dan kebutuhan oksigen. Karena hal itu daerah yang beriklim tropis dan sub tropis menjadi daerah endemik penyakit ini (Sri Subekti dkk., 2002).

2.2.2 Patogenesis

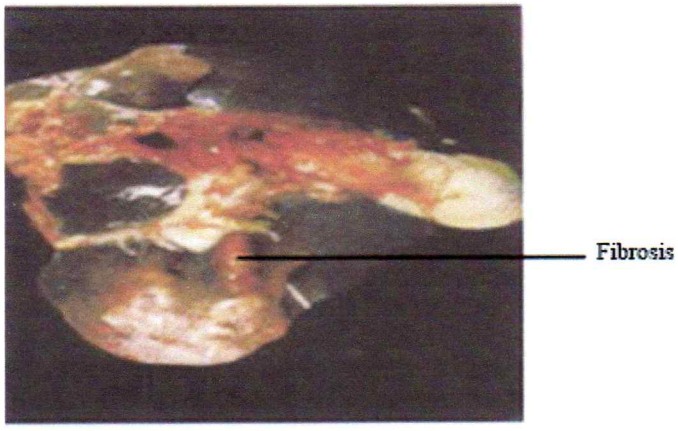
Distomatosis pada ruminansia dapat berlangsung akut, sub akut maupun kronik. Pada kejadian yang akut dapat terjadi kematian tanpa disertai gejala klinis yang jelas, kejadian yang akut ini sering terjadi pada kambing dan domba serta anak sapi (Sri Subekti dkk., 2002). Kejadian *distomatosis* secara akut disebabkan oleh termakannya metaserkaria dalam jumlah besar yang masuk kedalam saluran pencernaan, kira-kira lebih dari 2000 metaserkaria (Urquhart *et al.,* 1994*)*. Invasi cacing muda berlangsung secara masif dalam waktu pendek, dan merusak jaringan parenkim hati, hingga fungsinya menjadi terganggu. Meskipun cacing muda hidup pada organ hati, cacing muda juga menghisap darah, seperti cacing dewasa sehingga dapat menyebabkan anemia. Diperkirakan 10 ekor cacing dewasa menyebabkan kehilangan darah sebanyak 2 ml per hari. Pada pemeriksaan darah ditemukan perubahan antara lain: anemia normokromik, eosinofilia dan hipoalbuminemia. Bila diikuti infeksi sekunder oleh *Clostridium novyi* dapat mengakibatkan *Black Water Disease* dan kematian yang terjadi akibat infeksi sekunder ini biasanya kurang dari 24 jam (Subronto dan Tjahajati, 2001).

Pada kejadian sub akut gejala klinis yang ditimbulkan tidak jauh berbeda dengan kejadian akut, hanya waktu berjalannya penyakit lebih lama, yaitu mencapai satu sampai dua minggu yang diikuti dengan penurunan bobot badan hewan penderita (Sri Subekti dkk., 2002).

Distomatosis kronik berlangsung lambat dan disebabkan oleh aktivitas cacing dewasa di dalam saluran empedu dan organ hati. Kejadian ini berlangsung selama empat sampai lima bulan setelah termakannya 200-500 metaserkaria. Ciri

khas infeksi kronis adalah penurunan kondisi tubuh secara progresif, anemia dan hypoalbuminemia yang menyebabkan kekurusan, membran mukosa pucat, oedem submandibular, dan *ascites* (Urquhart *et al.,* 1994). Pada kejadian yang kronik juga terlihat oedem sub mandibula *(bottle jaw)*, anemia, hewan menjadi cepat lelah disebabkan kelemahan umum, dan ikhterus (Sri Subekti dkk., 2002).

Distomatosis juga seringkali disertai diare, yang disebabkan oleh enzim yang terdapat di dalam cacing yang merangsang selaput lendir usus, hingga terjadi enteritis. Kurangnya produksi empedu juga menyebabkan metabolisme lemak terganggu, dan juga mendorong terjadinya diare. Manifestasi klinik *Distomatosis* tergantung dari jumlah metaserkaria yang termakan oleh penderita. Dalam jumlah besar metaserkaria menyebabkan kerusakan organ hati, fibrosis, obstruksi saluran empedu serta anemia. Frekuensi invasi metaserkaria juga sangat menentukan beratnya penyakit ini (Subronto dan Tjahajati, 2001).



Gambar 2.3. Hepar Sapi Penderita *Distomatosis*
(Sumber : Urquhart *et al;* 1994)

2.2.3 Diagnosis

Penentuan diagnosis *Distomatosis* seekor hewan harus dibuktikan dengan ditemukannya telur cacing, yang dapat dilakukan dengan pemeriksaan feses metode sedimentasi. Namun diagnosis ini terkadang kurang akurat, karena telur cacing hanya dihasilkan oleh cacing dewasa yang sudah melewati periode prepaten (kurang lebih dua bulan). Penentuan diagnosis dari gejala klinisnya pun seringkali juga dapat dikelirukan dengan penyakit lain, karena *Distomatosis* tidak mempunyai gejala klinis yang spesifik. Dengan demikian diperlukan cara lain untuk diagnosis *Distomatosis* selain menggunakan pemeriksaan feses dan pemerisaan gejala klinis pada hospes definitif. Beberapa cara telah dikembangkan untuk diagnosis penyakit ini antara lain dengan imunodiagnostik seperti: imunoelektroforesis, imunobloting, dan ELISA.

Adanya antigen spesifik yang berasal dari *excretory- secretory* (E/S) yang dihasilkan oleh cacing *Fasciola spp.* dewasa dapat diidentifikasi dan diisolasi dengan menggunakan *Sodium Dodecyl Sulphate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS–PAGE)* dan uji immunoblotting. Salah satu komponen antigen dari (E/S) cacing dewasa dengan berat molekul 27 kDa ternyata dapat bereaksi dengan serum penderita *distomatosis* dengan tingkat sensitifitas dan spesifisitas yang tinggi. Menurut Cornelissen *et al.* (2001) diagnosis dengan ELISA menggunakan Cathepsin L sebagai antigen spesifk pada sapi penderita *Distomatosis* menunjukkan tingkat sensitivitas 100% dan spesifitas 96,5%. Cathepsin L sebagai salah satu antigen spesifik dari *Fasciola spp.* juga dapat

digunakan untuk diagnosis *Distomatosis* pada manusia dengan tingkat spesifitas 98% dan sensitivitas 100% (Intapan *et al.,* 1998).

2.3 Pencegahan dan Pemberantasan

Cara pencegahan dan pemberantasan *distomatosis* sangat sulit, namun dapat dilakukan usaha-usaha yaitu dengan pemeriksaan feses untuk menemukan telur cacing hati yang rutin pada ternak setiap 2-3 bulan sekali, mencegah siput air masuk ke wilayah peternakan dengan cara membuat selokan tergeng disekitar peternakan dan pada air selokan dimasukkan obat-obat anti siput *(molluscida).* Usaha lain yang dapat dilakukan adalah memotong siklus hidup cacing hati yaitu memberantas siput air yang merupakan induk semang antara cacing ini dengan pemberian *Natrium pentachlopenate* sebanyak 9 kg dilarutkan dalam 3600 liter air untuk per hektar padang penggembalaan. *Molluscida* hendaknya disemprotkan pada waktu padang penggembalaan berair dan selama 3-5 hari tidak boleh dipakai untuk padang penggembalaan. Pada ternak yang dinyataan positif terhadap infeksi cacing hati dapat diobati antara laing dengan: 1)Hexachlorophene secara per oral dengan dosis 15 mg/kg BB efektif untuk cacing dewasa dan 40 mg/kg BB dapat membunuh cacing muda umur 4 minggu; 2)Dovenix dengan dosis 7 ml untuk sapi dewasa, pemberian secara subcutan; 3)Triclabendazole dengan dosis 5 mg/kg BB, pemberian secara Intramuskuler.

2.3 Antigen Parasit

Antigen ialah suatu bahan molekul yang dapat merangsang respon imun atau suatu bahan molekul yang dapat bereaksi dengan antibodi yang sudah ada. Secara fungsional antigen dibagi menjadi dua bentuk, yaitu imunogen dan hapten.

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 (Belanti, 1983;Baratawijaya, 2000).

Beberapa jenis antigen parasit dapat diketahui dari sumber dan lokasi serta populasi dan siklus hidup parasit. Berdasarkan sumber dan lokasi parasit, antigen terbagi menjadi: 1) Exoantigen terlarut yang berasal dari parasit hidup atau dalam media buatan 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; dan 2) Parasit yang mengalami perubahan bentuk (el-Massry, 1999 dikutip oleh Kusnoto, 2003).

Karena siklus hidup Fasciola spp. yang kompleks maka pengamatan terhadap antigen cacing tersebut dilakukan terhadap protein telur, larva, dan cacing dewasa. Protein antigenik pada telur cacing dapat diperoleh dari kulit telur (*egg shell*), membran vitelin (*vitelline membrane*) dan *granular layer*. Protein antigenik pad cacing dewasa yang paling sering digunakan adalah *excretory/secretory* (E/S). Hal yang perlu diperhatikan adalah bahwa pada semua stadium selalu terdapat protein yang tetap disamping beberapa protein lain yang berbeda, karena profil pada setiap stadium kehidupan parasit pada umumnya mempunyai kesamaan ataupun perbedaan bergantung pada stadium hidupnya

(Petterson, 1989). Protein yang selalu dapat ditemukan pada seluruh stadium dikenal dengan protein dominan (*predominantly protein*) (Kooyman *et al.*, 2000).

Berkembangnya penelitian di bidang biologi molekuler, juga telah banyak dilaporkan kandidat antigen yang berbeda yang telah berhasil diisolasi dari cacing hati *Fasciola sp.*,antara lain:1) *Fatty Acid Binding Protein* (FABP) yang merupakan kelompok protein yang besar, termasuk dalam ikatan dari berbagai *hydrophobic ligand* seperti palmitat dan oleat. Karakteristik dari kelompok protein ini adalah kelompok *cytoplasmic* FABP. Protein ini berukuran antara 14 – 16 kDa; 2) Glutamic S–Transferase (GST) meliputi kelompok isoenzim yang termasuk dalam detoksikasi sel dari substrat kimia. Penetralan dari substrat melalui konjugasi dari glutathione menghasilkan protein yang mudah larut dalam air dan tidak toksik. Protein ini berukuran antara 24 – 29 kDa; 3) *Cathepsin – L,* Cacing hati *Fasciola spp.* mempunyai enzim proteolitik yang melimpah, khususnya dalam *excretor/secretory* (E/S) material. *Cathepsin – L* protease yang dihasilkan dari ES cacing *Fasciola spp.* telah digunakan sebagai vaksin dan protein ini berukuran antara 27 – 28 kDa (Estuningsih, 2003[a]). 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).

BAB III

MATERI DAN METODE PENELITIAN

BAB III

MATERI DAN METODE

Sampel cacing dikoleksi dari hepar sapi penderita *distomatosis,* untuk memperoleh material *excretory-secretory* (E/S) cacing *Fasciola gigantica.* diinkubasi dalam medium RPMI 1640 dan PBS. Sedangkan *Whole Extract* diperoleh dari hasil sonikasi dengan frekuensi 30 KHz selama 3 x 30 detik. Kemudian dilakukan analisis protein dengan menggunakan *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamid Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) untuk memperoleh profil protein cacing *Fasciola spp.* Untuk memastikan bahwa hasil analisis protein *Cathepsin-L* yang dilakukan merupakan protein spesifik *Fasciola spp.* dan untuk selanjutnya memberikan gambaran dasar pada saat dilakukan isolasi protein, kemudian 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.

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Helmintologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya dan *Tropical Disease Centre* Universitas Airlangga Surabaya pada bulan Agustus sampai dengan bulan Desember 2004

3.2 Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain adalah: aquadest, *excretory-secretory* (ES) cacing *Fasciola spp.*, *Phosphat Buffer Saline* (PBS), *Rosewall Park Memorial Institute* (RPMI) 1640, *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS), $NaHCO_3$, *laemmli buffer*, akrilamid, butanol, ammoniumpersulfat (APS), tetramethylendiamin (TEMED), electroforesis *buffer*, $AgNO_3$, asam asetat 7,5%, asam asetat 10%, metanol 5%, metanol 50%, glutaraldehid 10%, Tris-HCl pH 6,8 dan Tris-HCl pH 8,8.

Alat yang digunakan dalam penelitian meliputi tabung reaksi, *cover glass, object glass,* sentrifus, saringan, mikroskop, pipet, mikrotube, tabung konical, *becker glass,* erlenmeyer, gunting, pinset, pisau, *elektroelusi, chamber* SDS-PAGE, *glass plate, comb, cutter, shaker,* power supply, tabung *eppendorf,* timbangan sartorius, *magnetic stirrer, Laminar flow*, pH meter, spuit, filter mikro, bunsen, botol, *waterbath, sonikator.*

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Teknik Koleksi Cacing Hati dari Organ Hati Sapi

Organ hati dikeluarkan dari dalam tubuh sapi beserta kantong empedunya, kantong empedu dipisahkan dari organ hati dan dibuka, lalu cairan empedunya disaring dengan saringan 250 μm, untuk mencari kemungkinan adanya cacing dewasa di dalam kantong empedu. Bila terdapat cacing, maka cacing dikumpulkan dalam botol plastik berlabel nomor sesuai dengan nomor sapi dan berisi air. Organ hati kemudian dicuci dengan air bersih sambil disaring dengan

saringan bertingkat (ukuran 711 μm di atas dan ukuran 250 μm di bawah), untuk menahan cacing yang kemungkinan keluar dari saluran empedu hati. Cacing yang ada dikumpulkan dalam botol plastik yang sama. Organ hati dibersihkan dari lemak dan jaringan lain yang menempel dan dengan menggunakan gunting, saluran empedu yang besar pada organ tersebut dibuka dan dicari cacingnya. Apabila terdapat cacing maka cacing tersebut diambil dengan pinset dan dikumpulkan di dalam botol plastik yang sama. Organ hati kemudian dipotong menjadi dua bagian dengan pisau, dan masing – masing bagian dipotong lagi menjadi dua atau tiga bagian. Tiap potongan organ dipijat – pijat untuk mengeluarkan cacing hati yang berada dalam saluran empedu yang kecil sambil digunting atau dibelah saluran empedunya. Cacing yang ditemukan dikumpulkan dalam botol plastik yang sama. Apabila dengan cara tersebut di atas sudah tidak ditemukan cacing hati maka organ hati dipotong – potong dengan ketebalan ± 1 cm, lalu potongan organ hepar tersebut dipijat – pijat untuk mendapatkan cacing yang masih tersisa. Bila masih ditemukan cacing hati, maka cacing tersebut dikumpulkan dalam botol plastik yang sama. Potongan – potongan organ hati tersebut lalu dicuci dengan air bersih sambil disaring dengan saringan bertingkat seperti di atas, sampai organ hati dan cairannya bening, tidak merah lagi. Serpihan organ hati yang tertampung pada saringan yang berukuran 250 μm, kemudian dibilas dengan air bersih dan ditampung dalam nampan plastik berdasar hitam. Semua cacing hati yang utuh, potongan bagian kepala cacing dan potongan bagian ekor cacing dikumpulkan dalam botol plastik yang sama. Cacing yang terkumpul kemudian dihitung dan diseleksi untuk mencari yang masih hidup. Cacing

kemudian diambil sebanyak 50 ekor sebagai bahan isolasi protein E/S (Adiwinata, 2003).

3.3.2 Teknik Pembuatan RPMI Medium

$NaHCO_3$ dan Hepes ditimbang dengan menggunakan timbangan sartorius (eq. 10 mg) sebanyak 2,016 g untuk $NaHCO_3$ dan 2,3 g untuk Hepes. Aquades dituang ke dalam *beacker glass* dengan menggunakan gelas ukur sebanyak 1000 ml. Kemudian $NaHCO_3$ dan Hepes dilarutkan ke dalam aquades. Setelah itu ditambahkan RPMI-1640 sebanyak 10,4 g. Larutan tersebut diaduk dengan menggunakan *magnetic stirrer*, kemudian ditambahkan penicillin (400.000 IU:500 mg) sebanyak 1 ml. Selama proses pengadukan larutan diukur keasamannya dengan menggunakan pH meter. Jika keasaman larutan mencapai 7,4 sampai 7,5 atau dengan pH terendah, larutan siap difilter ke dalam botol. Larutan difilter ke dalam botol 250 ml. Proses penyaringan menggunakan spuit dan filter mikro, dan dilakukan dalam *Laminar flow*, dengan bunsen yang menyala di dalamnya. Larutan diambil dengan menggunakan spuit, kemudian filtermikro sartorius dipasang pada spuit lalu dipindahkan ke dalam botol. Larutan yang sudah selesai disaring ke dalam botol, diberi label tanggal pembuatan dan jenis larutan kemudian disimpan ke dalam lemari es. Jika RPMI medium berubah warna menjadi kuning dalam 24 jam, berarti larutan tercemar dengan bakteri, atau jika warna berubah merah disebabkan kurang rapat selama penutupan dalam botol. RPMI medium yang berubah warna tidak dapat dipakai sebagai medium.

3.3.3 Pembuatan *Whole Extract* Cacing *Fasciola spp.*

Setelah proses isolasi cacing dewasa *Fasciola spp.*, hasil isolasi tersebut dicuci dengan PBS, kemudian dipotong kecil-kecil dengan menggunakan gunting. Hasil potongan cacing tersebut digerus dalam cawan dengan mortir dan ditambahkan PBS sedikit demi sedikit. Hasil gerusan sebanyak 10 ml ditampung dalam tabung reaksi kemudian disonikasi. Sonikasi dilakukan dua seri dengan frekuensi 30 KHz. Masing-masing seri terdiri dari 3 x 30 detik, setiap 30 detik sonikasi dihentikan selama satu menit. Selama proses sonikasi tabung tempat sampel cacing *Fasciola spp.* dimasukkan dalam air dingin (air bercampur es). Sonikasi dinyatakan berhasil bila cacing hancur sempurna menjadi homogenat.

3.3.4 Teknik Pembuatan Antigen *Excretory/Secretory* (E/S) *Fasciola spp.*

Cacing dewasa *Fasciola spp.* dikoleksi dari hati sapi, lalu dimasukkan dalam gelas piala. Larutan PBS dan RPMI sebelum digunakan harus selalu dalam keadaan hangat dengan suhu 37 °C dalam waterbath. Setiap 50 ekor cacing ditambahkan 100 ml PBS dalam gelas piala kemudian diinkubasikan dalam waterbath dengan suhu 37 °C selama 15. Setelah 15 menit inkubasi, larutan PBS diganti dengan medium RPMI, lalu diinkubasikan dalam *waterbath* dengan suhu 37 °C selama 15 menit. Seluruh cacing yang masih hidup dan bersih dipindahkan ke dalam media RPMI segar, lalu diinkubasikan dalam waterbath dengan suhu 37 °C selama empat jam. Setelah empat jam, cacing lalu dibuang, sedangkan cairan yang tertinggal yang merupakan antigen E/S tersebut kemudian disimpan dalam pendingin (Estuningsih, 2003[b]).

3.3.5 Pembuatan Antibodi Poliklonal

Antibodi poliklonal dibuat dengan jalan menyuntikkan Protein E/S *Fasciola spp.* pada kelinci. Sebanyak empat ekor kelinci jantan lokal umur 3 bulan diinjeksi dengan protein ES, injeksi dilakukan 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-ES *Fasciola spp.* Pembuatan antibodi poliklonal digunakan untuk uji identifikasi protein dengan teknik *Western blot.*

3.3.6 *Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE)

Elektroforesis merupakan suatu metode pemisahan molekul protein berdasarkan berat molekulnya. Prinsip dasarnya ialah adanya perbedaan kecepatan gerak partikel-partikel bermuatan bila terdapat dalam suatu medan listrik. SDS PAGE adalah cara yang cukup baik untuk menetukan berat molekul protein atau enzim, yang memiliki ketelitian 10% dibawah cara ultrasentrifugasi (Wangsosupantio,1990).

Gel pemisah (akrilamid) dimasukkan pada *glass plate* pada posisi vertikal, dilanjutkan dengan pemberian butanol di atas *glass plate* sampai mengeras (*separating gel*), kemudian butanol dibuang dan dibersihkan dengan PBS dan

dikeringkan dengan kertas *Whatmann*. Setelah itu ditambahkan *stacking gel*, *comb* dimasukan dan tunggu sampai mengeras sehingga gel siap digunakan

Setelah gel siap, *comb* diambil dan dicuci dengan aquadest kemudian diberi larutan buffer. Sampel dicampur dengan *Laemmli buffer* dengan perbandingan 1:2 kemudian dipanaskan 100° C selama lima menit. Sampel yang telah dipanaskan kemudian dimasukkan pada sumuran gel dengan pipet *eppendorf*. Setelah itu *power supply* dijalankan hingga reaksi gel sudah sampai bawah kemudian di matikan dan *plate* dibuka dan selanjutnya 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 (Rantam, 2003).

Setelah proses pencucian, dilanjutkan pewarnaan menggunakan pewarnaan $AgNO_3$ selama 15 menit. Dilanjutkan dengan pencucian menggunakan 100 ml aquades selama dua menit sebanyak dua kali. Proses berikutnya adalah pemberian pengembang warna sampai *bands* terlihat pada gel. Setelah *bands* terlihat, dilakukan proses penghentian pengecatan menggunakan asam asetat 10% (Rantam, 2003).

3.3.7 Identifikasi Protein dengan Teknik Western Blot

PVDF (*Polivinylidene Difluoride*) blot diblok dengan 10 % BSA kemudian dicuci dengan larutan PBS dua kali. Direaksikan dengan antibodi poliklonal dan sebagai kontrol direaksikan dengan HMAF. PVDF diinkubasi pada suhu ruang, dicuci dengan larutan PBS tiga kali, kemudian ditambahkan konjugat *anti-rabbit* yang dilabel alkaline fosfatase dan substrat 4-NPP dan diwarnai dengan *Western Blue* (Rantam, 1997). Akhirnya PVDF dikeringkan diudara pada suhu ruang. Dari hasil ini kemudian ditentukan protein *cathepsin-L* dan massa molekul relatif (MR) protein spesifik *Fasciola spp.*

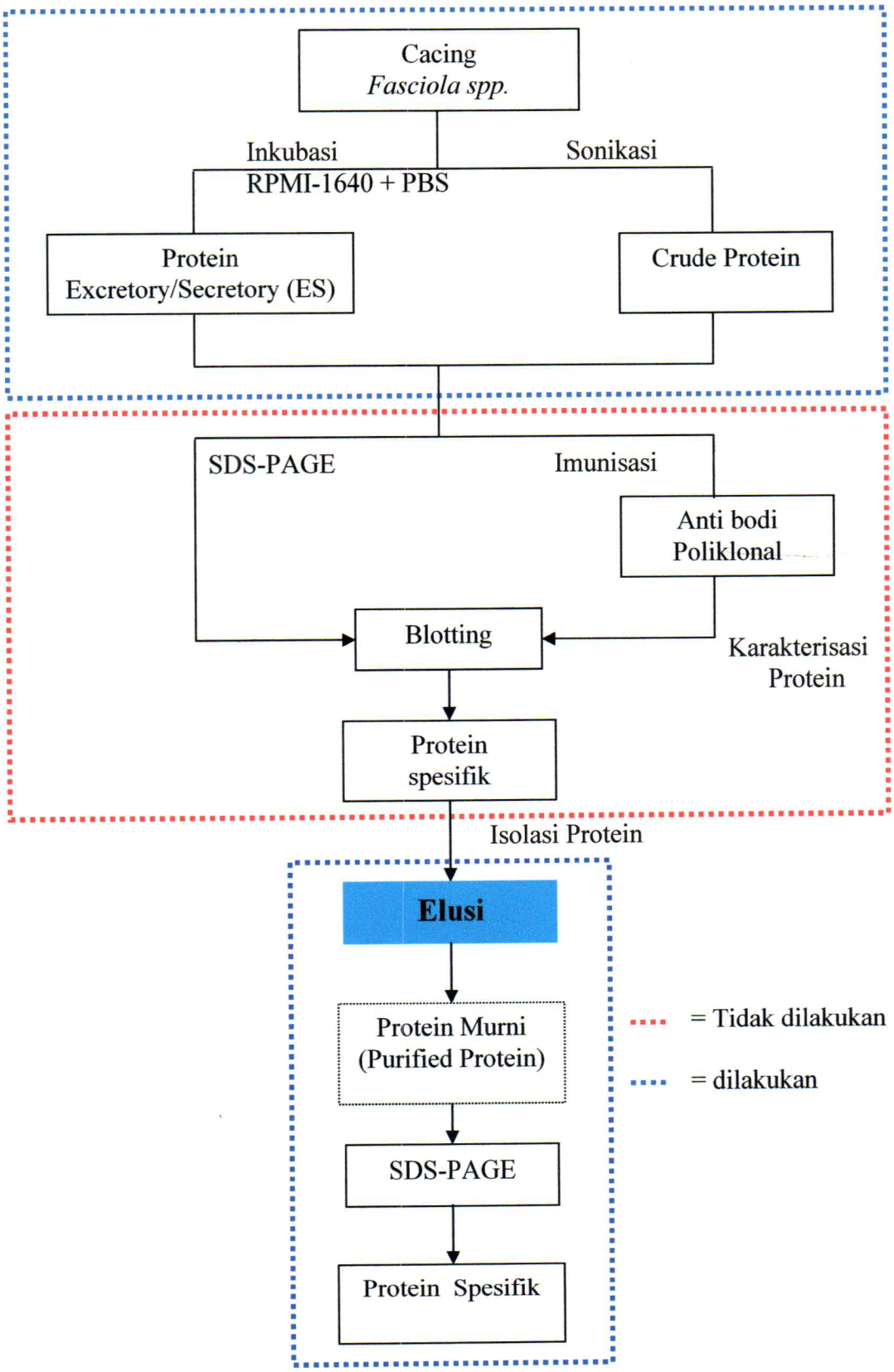
3.3.8 Preparasi Gel Elektroforesis (*ELUSI*)

Proses preparasi gel 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 180μl, hal ini dikarenakan sampel yang dibutuhkan untuk satu kolom pada gel kurang lebih 20μl, untuk elusi sembilan kolom dijadikan menjadi satu kolom sehingga sembilan kolom tersebut dikalikan dengan 20μl menjadi 180μl (Rantam, 1997).

Pada proses *ELUSI,* setelah *running*, dilanjutkan dengan pemotongan marker untuk selanjutnya marker tersebut diwarnai menggunakan pewarnaan $AgNO_3$. 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 μl 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.

Setelah *running* selesai, cairan hasil *running* yang terdapat dalam selofan dimasukkan ke dalam tabung *eppendorf* dan dapat disimpan pada suhu -7° C (Rantam, 1997). Untuk memastikan protein antigen tersebut sudah murni atau tidak, hasil elusi tersebut kemudian dianalisiskembali dengan teknik SDS-PAGE.

3.4 Kerangka Operasional



BAB IV

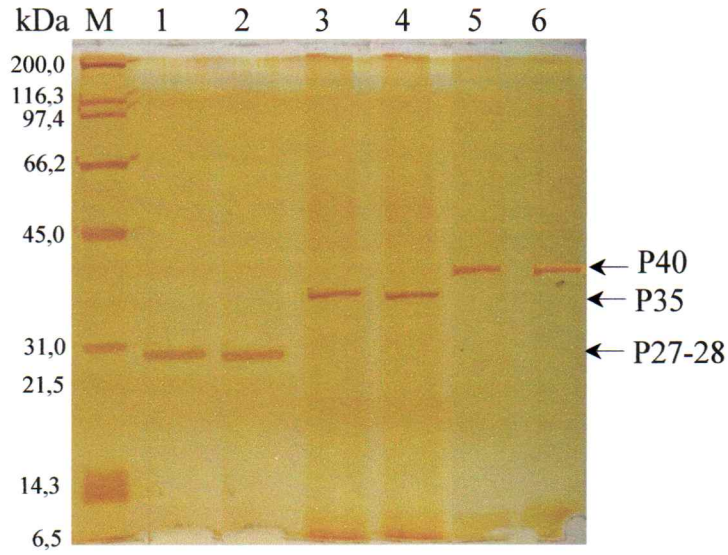
HASIL PENELITIAN

BAB IV

HASIL PENELITIAN

Hasil analisis protein dari *excretor-/secretory* (E/S) dan *whole extract* cacing *Fasciola spp.* dewasa dan muda dengan teknik SDS-PAGE didapatkan 16 fraksi protein (seperti terlihat pada lampiran 1). Untuk memastikan bahwa hasil analisis protein CatL yang dilakukan merupakan protein spesifik *Fasciola spp.* maka dilakukan identifikasi protein dengan teknik *Western blot* menggunakan antibodi poliklonal anti *Fasciola spp.*. Dari 16 pita protein pada hasil analisis protein dengan SDS-PAGE tidak semua merupakan protein spesifik. Hasil identifikasi protein menunjukkan 12 ikatan protein dengan karakter yang berbeda (seperti terlihat pada lampiran 2).

Dari gambaran protein *Fasciola spp.* hasil analisis protein dengan menggunakan teknik SDS-PAGE dan karakterisasi protein dengan *Western blot* dijadikan acuan untuk melakukan isolasi protein menggunakan teknik preparasi gel *elektrophoresis* (ELUSI). Preparasi protein difokuskan pada prot catL dengan berat molekuk 27-28 kDa, namun demikian juga dilakukan isolasi terhadap P35 dan 40 kDa. Setelah tahap preparasi protein, hasil preparasi tersebut kemudian dilakukan SDS-PAGE kembali. Hasil analisis tampak seperti pada gambar 4.1



Gambar 4.1 Analisis SDS-PAGE hasil isolasi catL dari protein ES *Fasciola spp*. M, marker (Sigma); Kolom 1-2, catL (P27-28); kolom 3-4, P35; dan kolom 5-6, P40 kDa.

BAB V

PEMBAHASAN

BAB V

PEMBAHASAN

Pada tahap elusi di titik beratkan pada protein dengan berat molekul 27–28 kDa, karena pada MR tersebut mampu terjadi ikatan antara antigen dan antibodi poliklonal anti *Fasciola spp.*, namun demikian juga dilakukan isolasi terhadap protein dengan berat molekul (MR) 35 dan 40 kDa karena pada saat karakterisasi protein dengan teknik *Western blot* ada empat pita protein spesifik yaitu pada berat molekul 40 kDa, 35 kDa, 28 kDa dan 27 kDa.

Pada Gambar 4.1 protein catL dengan BM 27-28 kDa tampak lebih dominan dibanding protein yang lain, sedangkan protein dengan BM 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)

Dari gambaran protein *Fasciola spp.* hasil analisis protein dengan menggunakan teknik SDS-PAGE dan karakterisasi protein dengan menggunakan teknik *Western blot* dijadikan acuan untuk melakukan isolasi protein menggunakan teknik preparasi gel elektroforesis *(ELUSI)*. Tahap *ELUSI* ini berguna untuk mendapatkan protein spesifik murni yang dapat digunakan sebagai bahan diagnostik *distomatosis.*. Purifikasi protein akan meningkatkan spesifisitas protein dibanding dengan *crude extract*. Isolat murni yang didapatkan mempunyai

potensi untuk digunakan sebagai bahan diagnostik dengan sensitivitas tinggi (Abdel-Rahman, 2000). Setelah tahap elusi dilakukan, untuk memastikan keberadaan protein murni hasil isolasi protei *Fasciola spp.*, perlu dilakukan kembali SDS-PAGE pada masing-masing protein

Hasil karakterisasi protein dengan menggunakan teknik *Western blot* menunjukkan bahwa protein dengan berat molekul 130 kDa, 108 kDa, 58 kDa, 45 kDa, 25 kDa, 18 kDa, dan 15 kDa selain terdeteksi pada cacing *Fasciola spp* juga ditemukan pada cacing *Paramphistomum spp.* Hal ini menunjukkan terjadinya ikatan protein (antigen) cacing *Fasciola spp.* dan cacing *Paramphistomum spp.* terhadap antiserum. Sehingga protein tersebut bukanlah protein spesifik dan kemungkinan dapat menghasilkan reaksi silang jika dipakai dalam pembuatan bahan diagnostik. Protein spesifik yang terdeteksi ada empat pita yaitu pada berat molekul 40 kDa, 35 kDa dan 27-28 kDa

Sarimehmetoglu (2002) telah melakukan pengamatan terhadap protein *excretory/secretory* (E/S) cacing *Fasciola hepatica* dengan menggunakan teknik *Western blot*, lebih lanjut dinyatakan bahwa protein spesifik yang terdeteksi menurut pengamatan tersebut adalah protein dengan berat molekul 36 kDa, 29 kDa, dan 17 kDa. Hammami *et al.* (1997), malaporkan bahwa protein dengan berat molekul 29 kDa dikenal sebagai antigen yang spesifik.

Chaithirayanon *et al.* (2002), menyatakan bahwa antigen pada *Fasciola gigantica* pada berat molekul 28,5 kDa tidak menghasilkan reaksi silang dengan antigen parasit trematoda lain termasuk *Schistosoma mansoni, Eurytrema pancreaticum* dan *Paramphistomum spp.* antigen tersebut merupakan komponen

utama penyusun jaringan kulit terutama pada bagian luar mulut dan *tegumental cells*. Jaringan kulit tersebut secara terus menerus dapat berganti dengan jaringan kulit baru.

Attalah *et al.* (2002), telah melakukan identifikasi dan karakterisasi pada antigen *Fasciola gigantica* dengan berat molekul 26-28 kDa, menyatakan bahwa antigen tersebut tidak hanya berada pada ekstrak cacing dewasa tetapi juga ditemukan pada produk *excretory/secretory* (E/S) cacing dan cairan empedu serta serum sapi yang terinfeksi secara alami dengan parasit ini. Lebih lanjut disimpulkan bahwa antigen *Fasciola spp.* pada berat molekul 27-28 kDa kemungkinan dapat dipromosikan sebagai kandidat antigen untuk imunodiagnosis *distomasis*. Intapan *et al.* (1998) yang juga melakukan pengamatan terhadap material E/S *Fasciola gigantica* menyimpulkan bahwa antigen *Fasciola gigantica* berat molekul 27 kDa adalah antigen yang sensitif dan spesifik untuk diagnosis *distomatosis* pada manusia (sensitivitas100% dan spesifisitas 98%). Estuningsih (2003[a]) menyatakan bahwa protein *cathepsin L* protease berukuran antara 27-28 kDa yang dihasilkan dari material E/S cacing *Fasciola spp.* telah digunakan sebagai vaksin.

Maleewong *et al.,* (1999) telah melakukan purifikasi antigen spesifik *Fasciola gigantica* dengan teknik *Elusi* pada berat molekul 27 kDa menyatakan, bahwa antigen tersebut adalah antigen yang sensitif dan spesifik untuk diagnosis *Distomatosis* pada manusia. Pada CatL terkandung protein yang lebih murni yaitu pada MR antara 27-28 kDa sehingga antibodi yang terikat secara spesifik lebih sedikit. Hal ini sesuai dengan penelitian Safar *et al.,*(1992) yang menyatakan

bahwa, penggunaan *partially purified antigen* sebagai bahan uji serodiagnosis helmintiasis dengan teknik elisa menujukkan hasil yang lebih spesifik dibanding dengan *crude extract.*

Cathepsin L hasil pemurnian dengan teknik Elusi yang merupakan hasil akhir pada tahap penelitian ini selanjutnya dilakukan uji ELISA untuk mengetahui nilai sensitivitas dan spesifisitas pada diagnosis *distomatosis* dalam serum darah sapi.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Telah berhasil diisolasi protein *cathepsin – L* (catL) dari ES *Fasciola spp.*, yaitu pada MR 27 – 28 kDa.

6.2 Saran

Perlu dilanjutkan uji aplikasi protein *cathepsin-L* (CatL) dari *excretory-secretory* (ES) *Fasciola spp.*, yaitu pada MR 27-28 kDa sebagai kit diagnostik dibandingkan dengan bahan uji lain, misalnya protein 40, 35, dan 8.

RINGKASAN

Rakhmi Ros Sari. Isolasi Protein *Cathepsin-L Fasciola spp.* dengan teknik Elusi. Dibawah bimbingan Prof. Dr. Sri Subekti, DEA., drh. (sebagai dosen pembimbing pertama) dan Dr. I Komang Wiarsa Sardjana (sebagai dosen pembimbing kedua).

Salah satu penyakit hewan ternak yang cukup merugikan ialah penyakit yang disebabkan parasit cacing yaitu *fasciolasis* atau *distomatosis* yang disebabkan oleh *Fasciola spp.* Indonesia sebagai negara tropik merupakan lingkungan yang baik bagi pertumbuhan dan perkembangan cacing *Fasciola spp.*, sehingga *distomatosis* merupakan problema tersendiri khususnya pada ternak ruminansia. Hal ini karena kesulitan dalam pengendalian dan pemberantasan agen penyakit ini, terutama dari aspek lingkungan dan hewan perantaranya yaitu *Lymnaea spp.*

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh protein spesifik *Fasciola spp.* dengan berat molekul 27 – 28 kDa melalui teknik preparasi gel electroforesis *(ELUSI)*. Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan dalam diagnosis imunologis yang mempunyai sensitivitas dan spesifisitas tinggi terhadap *distomatosis* yang disebabkan oleh *Fasciola spp.*

Sampel cacing dikoleksi dari hepar sapi penderita *distomatosis,* untuk memperoleh material *excretory-secretory* (E/S) cacing *Fasciola spp.* diinkubasi dalam medium RPMI 1640 dan PBS. Sedangkan *Whole Extract* diperoleh dari sonikasi dengan frekwensi 30 KHz selama 3 X 30 detik. Kemudian dilakukan

analisis protein dengan menggunakan *Sodium Dodesil Sulphat Polyacrylamid Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) untuk memperoleh profil protein cacing *Fasciola spp.* Untuk memastikan bahwa hasil analisis protein *Cathepsin-L* yang dilakukan merupakan protein spesifik *Fasciola spp.* dan untuk selanjutnya memberikan gambaran dasar pada saat dilakukan isolasi protein, kemudian 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.

Hasil penelitian menunjukkan telah berhasil diisolasi protein *cathepsin-L* (catL) dari *excretory/secretory* (E/S) cacing *Fasciola spp.*, yaitu pada berat molekul (MR) 27-28 kDa sebagai protein antigenik spesifik *Fasciola spp.* Yang dapat dianalisis lebih lanjut sebagai *diagnostik kit* terhadap *distomatosis* yang disebabkan oleh *Fasciola spp.*

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

Abdel-Rahman, E.H. and Megeed, K.N. 2000. Molecular Identity of Major Cross-reactive Adult Antigens in *Fasciola gigantica, Toxocara vitulorum* and *Moniezia expansa.* J.Egypt.Soc. Parasitol. 30(3); 561-571.

Abdel-Rahman, E. H. 2000. Structural Characterization and Immunocatalization of Egg Antigen Cross-React with *Toxocara vitulorum, Fasciola gigantica* and *Moniezia expanza.* Abstract. J. Egypth. Soc. Parasitol. 30(2): 581

Adiwinata, G., 2003. Teknik Koleksi Cacing Hati *Fasciola gigantica* dari Hati Sapi. Workshop Pengembangan Diagnostik Fasciolasis dengan Elisa untuk Deteksi Cathepsin-L. Balai Penelitian Veteriner. Bogor. Hal. 21-22

Akoso, B. T., 1996. Kesehatan Sapi. Penerbit Kanisius. Jogjakarta. Hal. 157-159

Attallah, A.M., Karawia, E.A., Ismail,H., Tabil, A.A., Nawar, A.A., Ragab, W.A., Abdel Azi\, M.M., El-Dosoky, L. 2002. *Identification and Characterization of a 26-27 kDa Circulating antigen of Fasciola gigantica.* Ann.Trop.Med.Parasitol. 96(3); 271-82.

Balitvet, 2003. Workshop Pengembangan Diagnostik Fasciolasis Dengan Elisa Untuk Deteksi Cathepsin-L (CatL). Balai Penelitian Veteriner. Bogor

Baratawidjaja, K.G. 2000. Imunologi Dasar, Ed.4. Balai Penerbit FKUI. Jakarta

Bellanti, J.A. 1985. Imunologi III. Diterjemahkan oleh Prof. Dr. A. Samik Wahab. Gajah Mada University press. hal 86-87

Chaithirayanon K, Wanichanon C, Vichasri-Grams, Upathan ES, Sobhon P, Viyanant V. 2002. Production and characterization of a monoclonal antibody against 28,5 kDa tegument antigen of *Fasciola gigantica.* Acta.Trop. 84(1):1-8

Cornellisen JB, Gaasenbeek CP, Borgsteede FH, Holland WG, Harmsen MM, Borrsma WJ. 2001. Early Immunodiagnosis of fasciolosis in ruminants using recombinant *Fasciola hepatica* cathepsin L-like protease. Int. J. Parasitol. 31(7):728-737

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.microbial.Infect.Dis. 41(1-2): 43-49.

Estuningsih, E. 2003[a]. *Antigen Fasciola gigantica.* Workshop Pengembangan Diagnostik Fasciolosis dengan ELISA untuk Deteksi Cathepsin-L. Bogor. Balai Penelitian Veteriner. hal.20.

Estuningsih, E. 2003[b]. *Pembuatan Antigen Excretory/Secretory E/S Fasciola gigantica.* Workshop Pengembangan Diagnostik Fasciolosis dengan ELISA untuk Deteksi Cathepsin-L. Bogor. Balai Penelitian Veteriner. 23.

Hammami, H., Ayadi, A., Camus, D. and Dutoit, E. 1997. *Diagnostic Value of demonstration of Spesific Antigen of Fasciola hepatica by Western Blot Technique.* Parasite 1997, September; 4(3); 291-295.

Intapan, P.M., Kaleewong, W., Wongkham, C., Tamanakam, K., Leamviteevanich, K., Sukolapong, V. 1998. Excretory-Secretory antigenic Component of adults *Fasciola gigantica* Recognized by Infected Human Sera. Southeast Asian J Trop. Med. Public Health. 29(3):579-583.

Kooyman FN, Schallig HD, Van Leeuwen MA, MacKeller A, Huntly JF, Cornelissen AW, Vervede L, 2000. Protection in Lambs vaccinated *Haemonchus contortus* antigens is age related, and correlated with IgE rather than IgI antibody. Parasit Immunol; 22(1): 13-20

Kusnoto. 2003. Isolasi dan Karakterisasi protein imunogenik larva stadium II *Toxocara cati* isilat lokal. Thesis, Pascasarjana, Universitas Airlangga.

Levine, N.D. 1990. Buku Pelajaran PARASITOLOGI VETERINER. Gajah Mada University Press. Jogjakarta. 116.

Maleewong W, Wongkham C, Intapan PM, Pipitgool V. 1999. *Fasciola gigantica*-spesific antigens: purification by a continous-elution method and its evaluation for the diagnosis of human fasciolosis. Am. J. Trop. Hyg. 61(4):648-651

More, S. 1995. *Struktur Antigen Parasit.* Dalam : Tekhnologi ELISA dalam Diagnosis dan Penelitian. Editor Graham W. Burgess. Gajah Mada University Press. Jogjakarta. 458-460.

Petterson, R.M. 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. 279-297.

Rantam, F.A. 1997. Bornavirus dan Cells Culture. Isolation infection Bornavirus from Human and Animal and Their Characterization. Diss. Vet. Med. FV. Berlin.

Rantam F.A. 2003. Metode Imunologi. Airlangga University Press. Surabaya.

Safar EH, el Rifaei F, and Maklad KM. 1992. Protein chromatographic study on adult *Ascaris lumbricoides, Ascaris suum,* and *Toxocara canis.* J. Egypt. Soc. Parasitol. 22(1): 171

Sarimehmetoglu, H. O. 2002. Application of Western Blotting for the Immunodiagnosis of *Fasciola hepatica* in Cattle using Excretory/Secretory Antigen. Turk Journal of Veterinary Science. 1061-1085.

Satriya, U. 1996. Cacing Hati Bikin "Makan Hati". Infovet. Edisi 039. Oktober 1996. Jakarta. 35-36.

Soulsby, E.J.L. 1986. Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals 7thEd. Bailliere Tindall. London. 40-43

Spithill TW, Smooker PM, Sexton DL, Bozas E, Morrison CA, Creaney J, and Parson JC. 1999. Development of vaccines against *Fasciola hepatica.* In : Fasciolosis (J.P. Dalton Ed) CAB International

Sri Subekti, B.S.S., Koesdarto, S., Mumpuni, S., Puspitawati, H., Kusnoto, 2001. Diktat Helmintologi Veteriner. Laboratorium Helmintologi Universitas Airlangga Surabaya.

Sri Subekti, B.S.S., Koesdarto, S., Mumpuni, S., Puspitawati, H., Kusnoto, 2002. Ilmu Penyakit Trematoda dan Cestoda Veteriner. Laboratorium Helmintologi Universitas Airlangga. Surabaya

Subronto, Tjahayati I. 2001. Ilmu Penyakit Ternak II. Gajah Mada University Press. Jogjakarta. hal. 76-82.

Suhardono 2003. Pengenalan Fasciolosis Disebabkan oleh *Fasiola spp.* Pada Ternak. Workshop Pengembangan Diagnostik Fasciolosis dengan ELISA untuk Deteksi Cathepsin-L. Bogor. Balai Penelitian Veteriner. hal 4-7

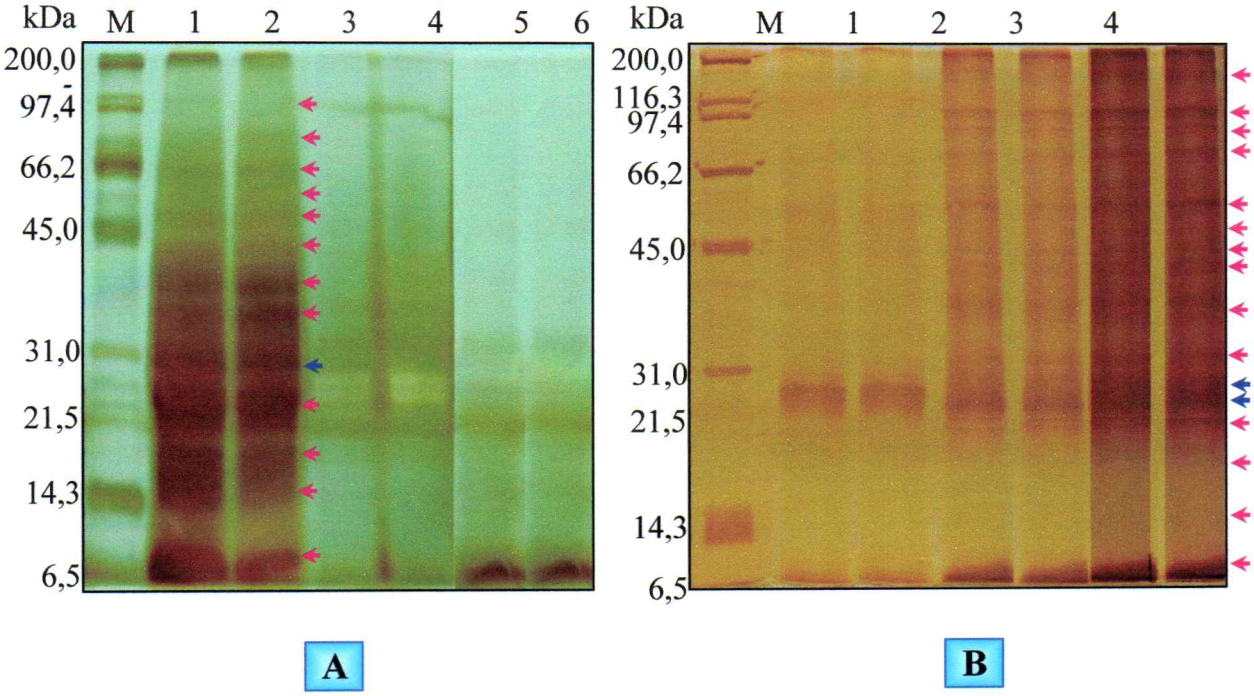
Tolan, 2003. Fascioliasis. eMedicine Instant Acces to Minds Of Medicine.

Urquhart, G.M., J. Armor., J.L. Duncan., and F.W. Jennings. 1994. Veterinary Parasitology. The University of Glasgow. Scotland. 99-101

Wongsosupantio, S. 1990. Elektrophoresis Gel Protein. Pusat Antar Universitas Bioteknologi Universitas Gajah Mada. Yogyakarta

LAMPIRAN

Lampiran 1: Analisis Protein Dengan SDS-PAGE



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, ES *Fasciola spp juvenile*; *Running* kedua (B); M, marker (Sigma); kolom 1-2, ES *Fasciola spp juvenile*; kolom 3-4, ES *Fasciola spp* dewasa; kolom 5-6, homogenat cacing *Fasciola spp* dewasa.

Lampiran 2 : Hasil Penghitungan Berat Molekul Protein Cacing *Fasciola spp* pada Gel SDS-PAGE

No.	Jarak	rf	log y Da	BM Da	BM 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

Lampiran 3 : Analisis Regresi untuk Menentukan Hubungan antara Nilai rf pada SDS-PAGE dengan Berat Molekul 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	BM (y KDa)	BM (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
```

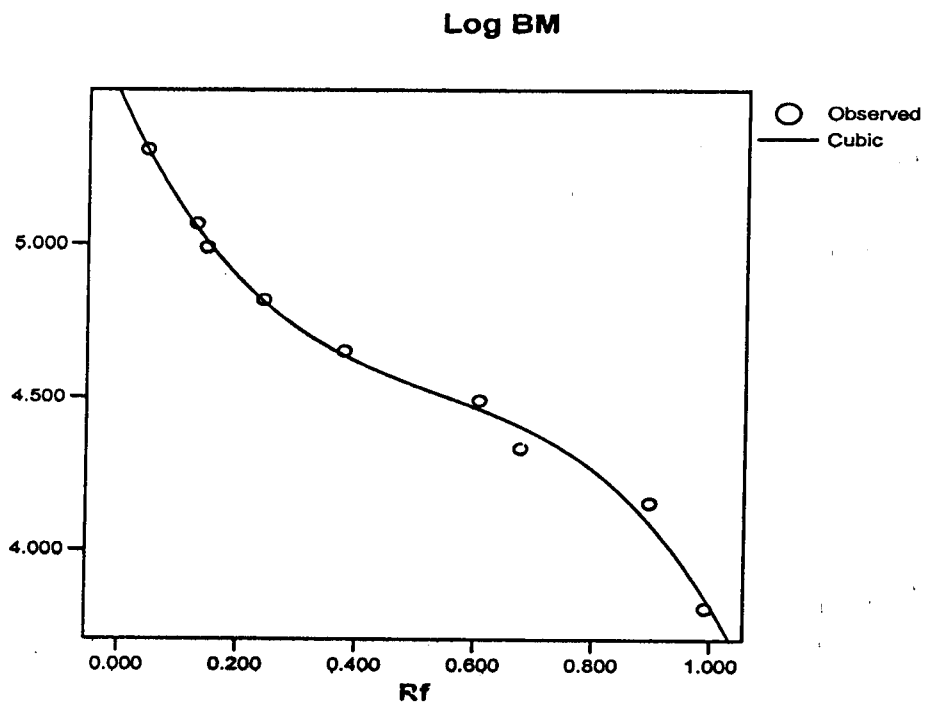
Analysis of Variance:

	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 ----------

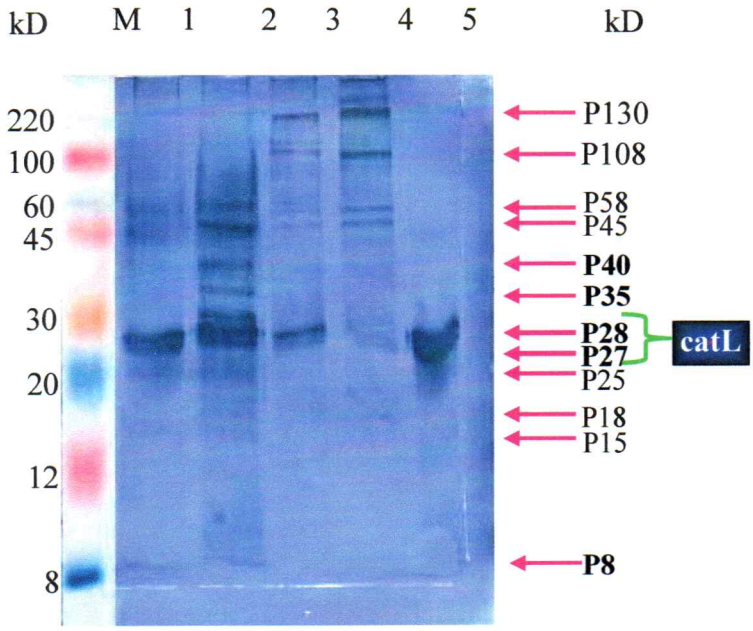
Variable	B	SE B	Beta	T	Sig T
rf	-3.905645	.591888	-2.870936	-6.599	.0012
rf**2	5.963641	1.344548	4.596238	4.435	.0068
rf**3	-3.701280	.847274	-2.786718	-4.368	.0072
(Constant)	5.461692	.062664		87.158	.0000



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 BM 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 4 : Identifikasi Protein dengan teknik *Western Blot*



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.