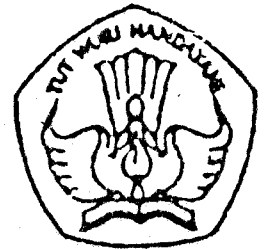




ADLN - Perpustakaan Unair

# LAPORAN PENELITIAN PROYEK DUE-Like BATCH III



Judul Penelitian:

**IDENTIFIKASI DAN PRODUKSI ANTIBODI POLIKLONAL PROTEIN  
SPESIFIK EKSKRESI SEKRESI *Haemonchus contortus*  
SEBAGAI BAHAN DIAGNOSTIK HAEMONCHOSIS  
PADA DOMBA DAN KAMBING**

Oleh:

Mufasirin, M.Si., Drh.

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

Iwan Sahrial Hamid, M.Si., Drh.

006207191

**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA**

**NOPEMBER 2002**



**LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN  
LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN PROYEK DUE-LIKE**

**A. Judul**

**Identifikasi dan Produksi Antibodi Poliklonal Protein Spesifik Ekskresi Sekresi *Haemonchus contortus* sebagai Bahan Diagnostik Haemonchosis pada Domba dan Kambing**

**B. Ketua Peneliti**

- a. Nama : Mufasirin, M.Si., drh.  
 b. Jenis Kelamin : Laki-laki  
 c. Pangkat/Golongan/NIP : Penata / IIIb/132061190  
 d. Bidang Keahlian : Parasitologi, Bioteknologi  
 e. Fakultas/Jurusan : Kedokteran Hewan /Kesmavet  
 f. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

**C. Tim Peneliti**

No.	Nama	Bidang Keahlian	Fakultas/Jurusan	Perguruan Tinggi
1.	Nunuk Dyah R.L., M.S., Drh	Parasitologi	FKH/Kesmavet	Unair
2.	Iwan Sahrial H., M.Si., Drh.	Farmakologi, Imunologi	FKH/Kesmavet	Unair

**D. Pendanaan dan Jangka Waktu Penelitian :**

- Jangka Waktu Penelitian yang Diusulkan : 6 bulan  
 Biaya Total yang Diusulkan : Rp. 30.000.000,-  
 Biaya yang Disetujui : Rp. 30.000.000,-

Surabaya, 8 Desember 2002

Mengetahui  
 Dekan Fakultas Kedokteran Hewan  
 Universitas Airlangga

(Dr. Ismudiono, drh.)  
 NIP. 130687739

Ketua Peneliti

(Mufasirin, M.Si., drh.)  
 NIP. 132061190

Disetujui,  
 Staf LPIU  
 Universitas Airlangga  
 Titik Setiawan, Ph.D  
 NIP. 131801627

**Identifikasi dan Produksi Antibodi Poliklonal Protein Spesifik Ekskresi Sekresi *Haemonchus contortus* sebagai Bahan Diagnostik Haemonchosis pada Domba dan Kambing (Mufasirin, Nunuk Dyah Retno Lastuti, Iwan Sahrial Hamid, 2002, 43 halaman)**

Diagnosis terhadap penyakit cacing gastrointestinal sampai saat ini ditetapkan melalui pemeriksaan tinja dengan metode konsentrasi maupun apung, namun untuk mendiagnose haemonchosis masih harus melakukan nekropsi dan dilanjutkan dengan cara pemupukan tinja untuk mengidentifikasi stadium larva sehingga bisa ditentukan spesiesnya. Diagnosis secara serologis untuk menentukan spesies secara tepat dan cepat sampai saat ini di Indonesia belum ada laporan.

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi dan memproduksi antibodi poliklonal protein spesifik ekskresi sekresi cacing *H. contortus*. Diharapkan dengan didapatkan protein spesifik ekskresi sekresi dan dilanjutkan produksi antibodi poliklonal, dapat digunakan sebagai bahan diagnosis molekular haemonchosis pada domba dan kambing. Protein ekskresi sekresi yang bersifat imunogenik selanjutnya dapat dikembangkan sebagai bahan vaksin sub unit dalam penanggulangan haemonchosis pada domba dan kambing.

Cacing *H. contortus* betina dewasa dikultivasi dalam medium PBS untuk tujuan isolasi protein ekskresi sekresi dan isolasi protein *Whole* didapat dengan metode sonikasi cacing utuh. Hasil isolasi protein kemudian dilakukan elektroforesis dengan SDS-Page untuk menentukan fraksi protein yang dihasilkan. Protein selanjutnya diinjeksikan pada kelinci untuk mendapatkan antibodi poliklonal yang akan digunakan proses imunobloting untuk mendapatkan protein imunogenik. Identifikasi protein imunogenik dilakukan dengan *western blot* dan protein ekskresi-sekresi yang imunogenik dipisahkan dengan kromatografi. Protein ekskresi sekresi yang imunogenik hasil pemisahan dengan kromatografi digunakan sebagai bahan produksi antibodi poliklonal protein spesifik pada kelinci. Pengukuran titer antibodi yang didapat dilakukan dengan uji ELISA. Setelah mencapai titer antibodi yang tinggi, kelinci dibunuh untuk mendapatkan serum yang mengandung antibodi terhadap protein spesifik ekskresi sekresi *H. contortus*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa protein ekskresi sekresi dengan berat molekul 33,5 kDa dan 29,4 kDa merupakan protein imunogenik dan dapat diproduksi pada kelinci. Disarankan penelitian lebih lanjut penggunaan protein ekskresi sekresi yang bersifat imunogenik dan protein dari stadium lain untuk pengembangan vaksin sub unit terhadap haemonchosis. Antibodi poliklonal yang didapatkan sebelum digunakan sebagai bahan diagnostik perlu dilakukan sensitivitas dan spesifitas serta dilanjutkan uji silang dengan protein cacing Nematoda lain khususnya kelompok *Strongyloids*, sehingga antibodi poliklonal yang dipakai hanya spesifik terhadap *H. contortus* pada kambing dan domba di lapangan.

(Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga yang dibiayai oleh Proyek DUE-Like Batch III dengan Nomor Kontrak: 44/PL/DUE-Like/UA/2002, 9 Agustus 2002)



## SUMMARY

Identify and Production of Poliklonal Antibody Protein on Specific Excretion-Secretion *Haemonchus contortus* as the Matter Diagnostic of Haemonchosis to Sheep and Goat (Mufasirin, Nunuk Dyah Retno Lastuti, Iwan Sahrial Hamid, 2002, p. 44)

The diagnostic to the diseases of worm's gastrointestinal is in up this time have been determined by the feces inspection both to concentration and float methods. On the contrary for the haemonchosis diagnosis is still have to nekropsi, and then by the feces fertilizing to identify of the larva's stadium, so that can be determined of those species. There are not records in Indonesia about the serology's diagnosis to establish of the species on the appropriate and quickly until this time.

The purpose of this study is identified and produced the specific of protein antibody poliklonal on both excretion-secretion worm's *H. contortus*. These products can be expected in useful as the molecular haemonchosis diagnosis to sheep and goat. The sense of imunogenic to the excretion-secretion of protein can be developed for the sub-unit vaccine in deal with haemonchosis to sheep and goat.

The cultivation of female worm's *H. contortus* on the PBS medium is purposive for the isolation of excretion-secretion protein, but the whole isolation of this protein can be gained by sonic method on the whole worms. The electroforesis with SDS-Page to the product of protein isolation to determined a protein fraction. These protein is then injection to a rabbit for obtain poliklonal antibody that will used on imunobloting process to get imunogenic protein. Identify of imunogenic protein by western blot and for the imunogenic on excretion-secretion protein is separated by chromatography kolum. This protein is used as a matter of product for protein poliklonal to a rabbit. The measures of antibody titer that have are getting by ELISA test. After the high of antibody titer, the rabbit is killed to obtain the serum that containing of antibody to excretion-secretion protein on worm's *H. contortus*.

The result of this study is show that excretion-secretion protein with 33.5 kDa molecule and 29.5 kDa is imunogenic protein and it is can be produced on a rabbit. For the next study is suggest to using the excretion-secretion protein that have imunogenic sense and protein from the other stadium to establish a sub-unit vaccine for haemonchosis. Poliklonal antibody that is gained before be used as the diagnostic matter, these need be worked on the sensitivity and specificity and crossing test with the other worm's Nematoda protein especially *Strongyloids*, so that poliklonal antibody is specific only to *H. contortus* for goat and sheep.

(Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga yang dibiayai oleh Proyek DUE-Like Batch III dengan Nomor Kontrak: 44/PL/DUE-Like/U/2002, 9 Agustus 2002).

Dengan mengucapkan puji syukur kepada Allah SWT bahwa hibah penelitian yang dibiayai proyek DUE-Like Batch III dapat diselesaikan walaupun proses akhir produksi antibodi poliklonal masih berjalan. Tujuan dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi bagi peternakan khususnya dalam bidang teknologi diagnosis penyakit haemonchosis pada domba dan kambing.

Pada kesempatan ini kami mengucapkan terima kasih pada berbagai pihak yang telah membantu hingga terselesainya penelitian ini, antara lain:

1. Direktorat Jenderal Perguruan Tinggi atas pemberian Dana Due-Like Batch III di Universitas Airlangga
2. Prof. Dr. Med Puruhito selaku Rektor Universitas Airlangga
3. Tjitjiek Srie Tjahjandari, Ph.D. selaku Direktur LPIU Unair
4. Dr. Ismudiono, M.S., Drh. selaku Dekan FKH Unair
5. Retno Bijanti, M.S., Drh. selaku Koordinator Due-Like Batch III FKH Unair
6. Endang Suprihati, M.S., Drh. Kepala Lab. Entomologi dan Protozoologi FKH Unair
7. Dr. Fedik Abdul Rantam, Drh. selaku PIC Hibah Penelitian dan Kepala lab. Biologi Molekuler Veteriner FKH Unair
8. Semua pihak yang telah membantu pelaksanaan penelitian sampai selesai

Kami menyadari bahwa laporan penelitian ini masih banyak kekurangannya, oleh karena itu kritik dan saran kami harapkan untuk kesempurnaan hasil penelitian ini. Semoga hasil penelitian ini bermanfaat bagi dunia peternakan dan perkembangan ilmu dan teknologi.

November 2002

Penyusun

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN</b>	i
<b>RINGKASAN DAN SUMMARY</b>	ii
<b>PRAKATA</b>	vi
<b>DAFTAR TABEL</b>	viii
<b>DAFTAR GAMBAR</b>	ix
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b>	x
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	1
<b>BAB II TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN</b>	3
<b>BAB III TINJAUAN PUSTAKA</b>	4
<b>BAB IV METODE PENELITIAN</b>	9
<b>BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	15
<b>BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN</b>	22
<b>DAFTAR PUSTAKA</b>	23
<b>LAMPIRAN</b>	24

Tabel 1. Hasil ELISA Serum Protein <i>Whole</i>	25
Tabel 2. Hasil ELISA Serum Protein Ekskresi sekresi	26





	Halaman
Gambar 1. Hasil Elektroforesis <i>Whole Protein</i> Cacing <i>H. contortus</i>	15
Gambar 2. Hasil Elektroforesis Protein Ekskresi Sekresi Cacing <i>H. contortus</i>	17
Gambar 3. Hasil Immunobloting <i>Whole Protein</i> Cacing <i>H. contortus</i>	18
Gambar 4. Hasil Immunobloting Protein Ekskresi Sekresi Cacing <i>H. contortus</i>	19



	Halaman
Lampiran 1. Hasil ELISA produksi antibodi poliklonal Protein <i>Whole</i> dan Ekskresi Sekresi dari Cacing <i>H. contortus</i>	25
Lampiran 2. Grafik Protein Standart (marker) dan Perhitungan Berat Molekul	27
Lampiran 3. Abstrak Penelitian Mahasiswa yang Ikut Penelitian Proyek DUE- Like	39



Haemonchosis merupakan penyakit cacing saluran pencernaan yang disebabkan oleh *H. contortus* pada domba dan kambing yang menyebabkan kerugian ekonomi yang sangat besar. Kerugian ekonomi yang ditimbulkan meliputi kerugian penurunan produksi daging, susu, dan wol baik secara kuantitatif maupun kualitatif serta kematian ternak. Indonesia dengan jumlah ternak ruminansia kecil sekitar 126 juta ekor merupakan sumber protein hewani, selain itu juga merupakan pendapatan peternak kecil dimana 25% pendapatan berasal dari sumber tersebut (Knox, 1990). Pada tahun 1984 terjadi kerugian akibat haemonchosis sebesar 16,6 juta US\$ pertahun (Fabiyyi, 1986). Kerugian ekonomi tersebut pada kambing dan domba meliputi kematian, pertumbuhan terhambat dan gangguan reproduksi.

*Haemonchus contortus* merupakan parasit yang patogenik, luas penyebaran dan tingkat infeksiya dapat mencapai 80%. Kambing dan domba mudah terkena infeksi cacing saluran pencernaan ini karena Indonesia yang beriklim tropis basah sangat menguntungkan kelangsungan hidup dan mempermudah penularannya.

Diagnosis terhadap penyakit cacing gastrointestinal sampai saat ini dilakukan melalui pemeriksaan tinja dengan metode konsentrasi maupun apung, namun untuk mendiagnose haemonchosis masih harus melakukan nekropsi dan dilanjutkan dengan cara pemupukan tinja untuk mengidentifikasi stadium larva sehingga bisa ditentukan spesiesnya. Diagnosis secara serologis untuk menentukan spesies secara tepat dan cepat sampai saat ini di Indonesia belum ada laporan.

kontaminasi oleh parasit serta memberikan pengobatan dengan anthelmintika untuk mengeluarkan parasit dari dalam tubuh induk semang, akan tetapi anthelmintika sendiri memberikan dampak negatif yakni dapat mengkontaminasi daging, susu dan telur disamping parasit cacing memiliki kemampuan genetika untuk mengembangkan sifat kebal terhadap anthelmintik sehingga menimbulkan “drug resistant” (Molento, 1999, Zajac, 2000). Telah dilaporkan bahwa sejak tahun 1964 terjadi resistensi terhadap anthelmintik pada ruminansia kecil di seluruh dunia, namun di Asia Tenggara baru dilaporkan mulai tahun 1990 seperti di Malaysia, Philipina, sedangkan di Indonesia mulai tahun 1995 telah diteliti bahwa *H. contortus* pada domba resisten dengan benzimidazole (Chandrawathani *et al.*, 1999).

Antigen dari produk ekskresi dan sekresi cacing *H. contortus* yang mengandung protein 15 dan 24 kDa merupakan protein yang sangat imunogenik (Kodyman, 2000). *Haemonchus contortus* yang diisolasi di Indonesia belum tentu mempunyai kesamaan protein ekskresi-sekresi imunogenik dengan isolat yang dilaporkan oleh peneliti sebelumnya. Protein imunogenik yang didapatkan pada isolat lokal, potensial untuk pengembangan reagen diagnostik dan diagnosis molekuler haemonchosis, identifikasi *H. contortus* varian tertentu serta pengembangan vaksin pada ternak.

Berdasarkan permasalahan tersebut di atas, maka perlu adanya pemikiran untuk mengetahui fraksi protein ekskresi-sekresi dan produksi antibodi poliklonal protein spesifik untuk diagnosa haemonchosis pada domba dan kambing. Diharapkan dengan adanya diagnosa yang tepat maka pengendalian haemonchosis dapat dilakukan dengan tepat.

## **TUJUAN DAN MANFAAT**

### **2.1 Tujuan**

- a. Mendapatkan fraksi protein ekskresi-sekresi *H. contortus* yang imunogenik dan mempunyai reaktifitas tinggi.
- b. Produksi antibodi poliklonal spesifik untuk diagnosa serologis pada domba dan kambing yang terinfeksi *H. contortus*.

### **2.2 Manfaat**

- a. Protein ekskresi-sekresi yang imunogenik dapat digunakan untuk bahan diagnostik dan pengembangan vaksin sub unit terhadap haemonchosis pada domba dan kambing.
- b. Antibodi poliklonal spesifik yang didapatkan dapat digunakan untuk diagnosa serologis dan terapi hiperimun serum terhadap haemonchosis.

## TINJAUAN PUSTAKA

### 3.1 Etiologi

Haemonchosis adalah suatu penyakit kecacingan pada hewan akibat infeksi oleh *Haemonchus*. Cacing *Haemonchus* menyerang ruminansia dan pada kambing/domba spesies yang sering menginfeksi adalah *Haemonchus contortus* yang mempunyai habitat pada abomasum dan sering disebut “stomach worm” atau “Barber pole”. Nama *contortus* diberikan karena pada cacing betina terlihat merah putih berselang-seling yang melingkar disepanjang tubuhnya. Penyebaran penyakit melalui padang penggembalaan yaitu melalui rumput yang terkontaminasi larva infeksi stadium III (L3), dimana larva tersebut sangat tahan terhadap lingkungan luar dengan temperatur di atas 10°C dengan curah hujan di atas 50 mm per bulan. Penyebaran *Haemonchus* dapat terjadi secara cepat terutama pada musim penghujan karena fluktuasi jumlah telur dalam kotoran cenderung dipengaruhi fluktuasi curah hujan dan titik terendah pada musim kemarau (Soulsby, 1986).

Cacing *Haemonchus* dalam keadaan segar dapat dikenali dan dibedakan antara jantan dan betina. Cacing betina mempunyai ciri khas dengan adanya warna selang-seling di tubuhnya, warna tersebut berasal dari organ intestin yang berwarna merah karena berisi darah, dan dililit oleh organ ovarium yang berwarna putih. Cacing jantan dapat diidentifikasi dengan adanya bursa kopulatrik di bagian posterior dan ukuran tubuhnya lebih kecil dari pada cacing betina (Soulsby, 1986).

### 3.1.1 Siklus Hidup

Siklus hidup *Haemonchus* sangat kompleks, banyak faktor yang mempengaruhi kehidupan cacing di luar tubuh hewan terutama suhu dan kelembaban serta habitat, sedang di dalam tubuh hewan yang berpengaruh adalah umur, kepekaan maupun kekebalan induk semang. Telur dikeluarkan oleh induk semang dalam keadaan sudah berembrio, selanjutnya dimulai stadium bebas dari parasit tersebut, kemudian menetas menjadi larva stadium I dalam waktu 14 – 19 jam dan dalam waktu kurang lebih 4 hari mengalami moulting sebanyak 2 kali dan menjadi larva stadium 3 yang sudah infeksi. Larva infeksi mempunyai selubung dan ekor yang cukup panjang serta bergerak aktif dan tahan terhadap kekeringan dan pembekuan. Penularan terjadi secara oral oleh karena tertelannya larva infeksi bersama rumput, kemudian larva tertelan oleh kambing atau domba masuk ke dalam saluran pencernaan dan migrasi ke dalam abomasum, kemudian mengalami ekdisis menjadi larva stadium IV dan dalam waktu 2 hari setelah infeksi larva menuju ke lamina propria selaput lendir abomasum dan larva mulai menghisap darah induk semang. Larva menjadi dewasa dalam waktu kurang lebih 18 hari, setelah hari ke-18 sampai ke-21 pasca infeksi, telur yang berembrio mulai dikeluarkan oleh induk semang bersama kotoran (Soulsby, 1986).

### 3.1.2 Patogenitas

Patogenitas haemonchosis tergantung jumlah larva yang menginfeksi, pada domba muda yang terinfeksi sebanyak 1500 sampai 2500 larva infeksi akan terjadi kematian, sedangkan pada domba dewasa jika terinfeksi 3000-6000 larva cacing

*Haemonchus*. Telah dilaporkan bahwa pada infeksi hiperakut terjadi kematian pada domba, dan ditemukan 20.000 sampai 50.000 *H. contortus* di dalam abomasum (Colin, 1999). Kerugian yang ditimbulkan selain kematian pada infeksi hiperakut dengan menelan larva infeksi dalam jumlah besar, juga terhambatnya pertumbuhan dan produksi karena sifat cacing adalah menghisap darah akibatnya terjadi anemia hemorrhagic yang ditandai adanya penurunan jumlah eritrosit, dan PCV. Infeksi khronis dapat berjalan lama karena masih adanya sejumlah cacing juga disertai nutrisi yang jelek yang berakibat penurunan berat badan dengan disertai penurunan serum protein sehingga tidak tersedianya asam amino yang diperlukan untuk perkembangan cacing baik dalam plasma maupun haemoglobin. (Colin, 1999).

*Haemonchus* akan mengeluarkan sejumlah darah dari tubuhnya sendiri sebab pada infeksi berat, isi dari abomasum biasanya jelas sekali bercampur dengan pigmen darah, menurut hasil pengamatan klinis menunjukkan adanya perubahan pada gambaran darah yaitu penurunan kadar haemoglobin dan penurunan berat badan yang menyolok (Soulsby, 1986).

### 3.2 Diagnosa Penyakit

Diagnosa penyakit akibat penyakit parasit yang sering digunakan adalah pemeriksaan adanya telur cacing dan dilanjutkan pemupukan tinja untuk mengidentifikasi larva cacing tertentu (Soulsby, 1986). Beberapa teknik diagnosa penyakit cacing menggunakan teknik biologi molekular masih dikembangkan seperti yang dilakukan Gasser dan Zhu Xo (1999) yang meneliti mutasi dengan analisis sequent dari fragmen hasil amplifikasi DNA cacing.



## 3.2 Pengendalian

Tindakan pengendalian haemonchosis dilakukan dengan cara pencegahan dengan melakukan rotasi padang penggembalaan, hal ini untuk memutus siklus hidup dari parasit. Selain itu pemberian anthelmintika seperti phenothiazine 10% yang dicampur dalam makanan, tetramisol hidroklorid 15 mg/kg berat badan, levamisol hidroklorid 7,5 mg/kg berat badan. Usaha pencegahan yang lain yaitu melakukan vaksinasi pada ternak kambing atau domba terutama pada anaknya dengan menggunakan larva *Haemonhus* yang telah diradiasi dengan 40.000 sampai 60.000 Rg ternyata dapat menimbulkan kekebalan yang baik pada ternak.

Pengendalian biologis terhadap haemonchosis dengan melakukan vaksinasi masih banyak dilakukan percobaan. Telah dilaporkan bahwa pengendalian *H. contortus* dengan vaksinasi produk ekskresi dan sekresi yang mengandung protein 15 dan 24 kDa dapat menstimulir IgE tetapi tidak menstimulir IgG1 (Kodyman, *et al.*, 2000). Penelitian lain yang dilakukan adalah identifikasi dan karakterisasi dari produk sekresi-ekskresi dilaporkan bahwa antibodi 2a.15 dihasilkan dari eksudat oral *H. contortus*, dan diketahui bahwa antigen didapatkan pada daerah sepanjang oesophagus dan usus serta eksudat yang dihasilkan dari larva stadium III selama mengalami ekdisis (Lopez *et al.*, 1999).

## 3.3 Fraksi Protein *H. contortus*

Antigen dari produk ekskresi dan sekresi cacing *H. contortus* yang mengandung protein 15 dan 24 kDa merupakan protein yang sangat imunogenik (Kodyman, 2000). Lastuti dkk (2001) telah melaporkan adanya 7 fraksi protein yang dominan dari 13 fraksi protein yang didapatkan pada intestine *H. contortus* yaitu 19,6 kDa, 14,9 kDa, 9 kDa,

4 kDa, 3,8 kDa dan 3, 6 kDa. Nowland *et al.* (1999) telah meneliti protein membran 35 kDa (galectine) hasil kloning gen penghasil protein di usus dan digunakan sebagai vaksin sub unit *Haemonchus* pada domba. Dari hasil penelitiannya menunjukkan bahwa protein tersebut tidak mampu memproteksi terhadap *haemonchus* pada domba. Skuce *et al.* (1999) juga telah mencoba mengklon dan mengidentifikasi sistein proteinase dari ekstrak intestine dan didapatkan 3 cDNA yang mengkode cathepsin – B like cysteine proteinase *Haemonchus contortus* merupakan protein protektif terhadap haemonchosis.

### 3.4 Imunologi terhadap Cacing

Antibodi terhadap parasit umumnya dan khususnya pada cacing efektif apabila stadium parasit dalam sistem peredaran darah. Pada infeksi cacing IglE diproduksi tinggi dan menggerakkan masuknya mediator sel mast antara lain eosinofil. Pada sistem kebal terhadap parasit, CD8 memegang peranan yang penting. Khusus untuk cacing yang terdapat dalam saluran pencernaan, respon tergantung TH2 dan membutuhkan koordinasi aktifitas antibodi, pelepasan mucin oleh sitokin yang distimulir oleh sel goblet dan mekanisme diare akibat mediator se mast (Roitt, 1994)

## METODE PENELITIAN

### 4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Entomologi dan Protozoologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga untuk mengidentifikasi dan isolasi cacing *Haemonchus contortus*, sedang untuk identifikasi dan produksi antibodi poloklonal dilakukan di laboratorium Biologi Molekuler Veteriner FKH Unair. Waktu penelitian dilaksanakan selama 4 bulan mulai bulan Agustus sampai dengan bulan Nopember 2002.

### 4.2 Kultivasi cacing *H. contortus* invitro

Sebanyak 100 ekor cacing *H. contortus* dewasa betina diisolasi dari abomasum domba yang dipotong di Rumah Potong Hewan (RPH) Surabaya dan dilakukan pencucian dengan PBS tiga sampai lima kali sampai cacing bersih dari kotoran abomasum. Cacing kemudian diinkubasikan dalam Phospat Buffers Saline (PBS) sebanyak 10 ml pada cawan petri dengan temperatur 37 °C selama semalam. Cairan ekskresi maupun sekresi yang dihasilkan dalam PBS diambil untuk isolasi protein sekresi-ekskresi dan disimpan dalam freezer dan siap untuk proses isolasi protein (Mufasirin, 1999).

### 4.3 Pembuatan *whole protein* dari cacing *H. contortus* dewasa

Eksktraksi protein dilakukan dengan teknik Sonikasi. Cacing dicuci dengan PBS dengan cara disentrifugasi dengan kecepatan 16.000 rpm selama 5 menit. Pelet cacing

ADLN - Perpustakaan Unair  
dicuci dengan PBS dua kali dengan cara yang sama. Pelet cacing dilarutkan dengan PBS 1 ml kemudian disonikasi pada 45 W selama 30 menit. Larutan hasil sonikasi kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 16.000 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil dan siap digunakan untuk produksi antibodi poliklonal pada kelinci.

#### 4.4 Isolasi Protein Sekresi-Ekskresi

Protein ekskresi-sekresi yang terdapat di dalam PBS hasil kultivasi cacing semalam diisolasi dengan penambahan amonium jenuh sama banyak dan dicampur serta diinkubasi dalam suhu 4°C selama semalam, kemudian dilakukan sentrifugasi 10.000 rpm selama 10 menit, 4°C. Pelet yang didapatkan kemudian dicuci dengan PBS tiga sampai lima kali sampai bersih dengan cara disentrifugasi dengan cara yang sama seperti di atas. Pelet yang didapatkan dilarutkan dengan PBS sebanyak 1-2 ml. Untuk mendapatkan protein didialisis semalam sehingga didapatkan protein yang bebas dari garam-garam lain. Konsentrasi protein diukur menggunakan spektrofotometer pada OD<sub>590</sub>.

#### 4.5 Produksi Antibodi Poliklonal dari *whole protein* dan Protein Ekskresi-Sekresi cacing *H. contortus*

Protein *whole* dan Ekskresi-sekresi yang didapat dari ekstraksi dan kultivasi digunakan untuk produksi antibodi poliklonal pada kelinci. Antibodi poloklonal yang didapat digunakan untuk *immunoblotting* terhadap protein *whole* dan protein ekskresi-sekresi yang imunogenik (Mufasirin, 1999)

#### 4.5.1 Imunisasi Protein pada Kelinci

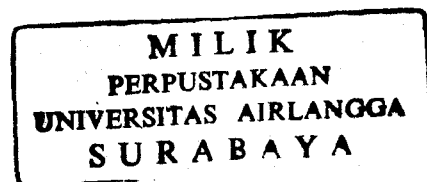
ADLN - Perpustakaan Unair

Kelinci jantan dewasa sehat diinjeksi dengan protein dengan dosis 50-100  $\mu\text{g}$  yang sebelumnya sudah ditambahkan adjuvant *complete* (Sigma) dengan perbandingan yang sama sehingga volume akhir sebanyak 500  $\mu\text{l}$ . Penyuntikan dilakukan di bawah kulit pada empat lokasi tubuh yang mempunyai kulit longgar. Injeksi diulang dengan protein yang sama dengan penambahan adjuvant *incomplete* (Sigma) pada 2 minggu setelah penyuntikan pertama. Penyuntikan ulang berikutnya menggunakan protein yang sama dengan adjuvant *incomplete* dengan cara yang sama sampai seterusnya hingga didapatkan titer antibodi yang tinggi. Sebelum dilakukan penyuntikan pertama dilakukan pengambilan serum sebagai kontrol negatif dalam uji ELISA. Pengambilan serum selanjutnya dilakukan sebelum dilakukan booster untuk melihat respon antibodi setiap setelah penyuntikan dengan uji yang sama.

#### 4.5.2 Penentuan Titer Antibodi Pasca Imunisasi

Penentuan titer antibodi dilakukan dengan metode *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Setiap sumuran plat mikro diisi sebanyak 100  $\mu\text{l}$  larutan protein membran dengan konsentrasi 10  $\mu\text{g/ml}$  dalam bufer karbonat dan diinkubasi pada suhu 37°C semalam. Plat mikro dicuci 3 kali dengan bufer pencuci dan kemudian tiap sumuran ditambahkan 200  $\mu\text{l}$  *blocking solution*. Setelah diinkubasikan pada suhu 37°C selama 1-2 jam, dilakukan 3 kali pencucian. Setiap sumuran kemudian diisi dengan 100  $\mu\text{l}$  serum mencit yang telah diencerkan (pengenceran berseri), dan diinkubasikan pada 37°C selama 1 jam, serta diikuti dengan 3 kali pencucian. Selanjutnya setiap sumuran diisi dengan 100  $\mu\text{l}$  konjugat (Santa Cruz, USA) dan diinkubasikan selama 1

jam, diikuti 3-4 kali pencucian. Sebanyak 150 µl substrat 4 nitrophenil (Sigma, USA) (dimasukkan ke dalam tiap sumuran, diinkubasikan pada 37°C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 50 µl larutan asam oksalat 2%. Titer antibodi dibaca pada *ELISA reader* (Axelsen, 1983 yang sudah dimodifikasi)



#### 4.6 Karakterisasi Protein

##### 4.6.1 Elektroforesis protein ekskresi-sekresi dengan SDS-PAGE

Running gel dibuat dan dimasukkan ke dalam plate kaca, setelah mengeras pada bagian atasnya dimasukkan stacking gel yang telah dipersiapkan. Susunan running gel dan stacking gel dibuat dengan mencampurkan Acrylamid, Tris, SDS 0,8%, Temed, APS dan aquades dalam beker gelas. Sebanyak 10 µg sampel yang ditambahkan *laemly buffers* dengan perbandingan 2 : 1 dilakukan perebusan pada 100°C selama 5 menit, setelah itu dimasukkan ke dalam kolom cetakan yang terletak pada *stacking gel* dan dilakukan *running* pada *chamber* yang telah diisi *Electrode Buffers* 1X dengan 100 volt, 40 mA. Setelah *running*, gel dimasukkan ke dalam larutan pencuci yang terdiri dari methanol 25 ml, asam asetat 3,7 ml, dan Aquades ad 100 ml. Digoyang di atas sackher selama 30 menit. Dilakukan pencucian ulang dengan larutan yang sama dengan pengurangan komposisi ethanol dan penambahan asam asetat setengah dari sebelumnya selama 30 menit. Pencucian berikutnya dengan larutan glutaraldehid 10% dan Aquades selama 30 menit. Setelah dicuci gel diwarnai dengan AgNO<sub>3</sub> selama 15 menit, kemudian dilakukan pencucian dengan aquades dua kali masing-masing selama 2 menit. Diberikan larutan pengembangan warna yang terdiri dari formaldehid 3,7%, zitronsauc 5% dan aquades. Setelah pita-pita protein terlihat maka reaksi dihentikan dengan menambahkan

asam asetat 10%. Hasil gel yang sudah ditampal pita proteinnya disimpan dalam larutan gliserol 10% dan siap untuk didokumentasikan. Penghitungan berat molekul dilakukan dengan membandingkan standart marker (Axelsen, 1983 yang sudah dimodifikasi).

#### 4.6.2 Immunoblotting (Western blot)

Antigen sekresi-ekskresi *H. contortus* direaksikan dengan antibodi poliklonal dengan menggunakan metode *western blott*. *SDS-PAGE* ditransfer ke membran niroselulose, selanjutnya membran diblokir dengan BSA 1% selama semalam pada suhu 4°C dan dilanjutkan pencucian dengan 0,05% Tween 100 dalam TBS selama 10 menit, dan pencucian diulang 3 kali. Membran selanjutnya dimasukkan ke dalam larutan antibodi poliklonal dalam PBS (1:50) dan diinkubasikan 1 jam pada temperatur ruang dengan *shacker* dan dilakukan pencucian dengan 0,05% Tween 100 dalam TBS selama 10 menit. Pencucian diulang 4 kali dengan cara yang sama. Selanjutnya membran diinkubasikan dalam larutan konjugat (1:3000) (Santa Cruz, USA) selama 1 jam pada temperatur kamar dengan *sacker* dan diikuti dengan pencucian 5 kali dengan 0,05% Tween dalam TBS dan 1 kali tanpa Tween. Membran diwarnai dengan substrat *Western Blue Ready*. Reaksi dihentikan apabila sudah terlihat pita protein dengan cara menambahkan aquades. Membran dikeringkan pada kertas Whatman dan siap untuk didokumentasikan. Penghitungan berat molekul yang imunogenik dilakukan dengan membandingkan pita protein yang tampak dengan standart marker yang diwarnai dengan perak nitrat (Sambrook *et al.*, 1989 yang sudah dimodifikasi)

#### 4.7 Pemisahan Protein Ekskresi-Sekresi

ADLN - Perpustakaan Unair

Setelah diketahui pita protein yang imunogenik, protein ekskresi-sekresi yang didapat dari kultivasi cacing *H. contortus* di lakukan pemisahan fraksi dengan kolum kromatografi dengan menggunakan matrik sephadex. Matrik sephadex dibuat dengan melarutkan 1 gram dengan 20 ml aquadest deionized. Campuran tersebut dibiarkan semalam dalam temperatur ruang, dan setelah mengembang, sephadex dimasukkan ke dalam kolum kromatografi yang bagian dasarnya sudah dilapisi dengan *glass wool* dan dibiarkan beberapa jam agar terjadi proses polimerisasi. Setelah terbentuk matrik yang kuat, larutan dalam kolum dikeluarkan dan diganti dengan PBS dengan jumlah yang setimbang. Kecepatan alir per menit diukur dengan mengeluarkan PBS dari kolum. Sampel dimasukkan dalam kolum secara perlahan tanpa merusak matrik kolum. Ditambahkan PBS diatas sampel sebanyak 2 ml dan kolum dibiarkan beberapa saat dan sampel siap dilakukan pemisahan. Sampel ditampung dengan cara mengalirkan sesuai dengan kecepatan alir yang dikehendaki pada beberapa tabung kolektor (Sudjadi, 1988). Untuk mengetahui kemurnian protein yang diharapkan dilakukan dengan SDS-Page.

#### 4.6 Produksi Antibodi Poliklonal Protein Spesifik Ekskresi-Sekresi

Fraksi protein imunogenik yang didapat kemudian disuntikkan pada kelinci dengan metode yang sama seperti pada metode 4.5.1 dan titer antibodi diukur dengan ELISA (Axelsen, 1983 yang sudah dimodifikasi).



**HASIL DAN PEMBAHASAN**

Hasil elektroforesis protein *whole cacing H. contortus* dengan SDS-Page didapatkan sembilan fraksi protein yaitu 49 kDa, 47,1 kDa, 35,7 kDa, 30,1kDa, 25,3 kDa, 23,4 kDa, 18,6 kDa, 16,7 kDa dan 14,8 kDa. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil elektroforesis *whole protein cacing H. contortus*

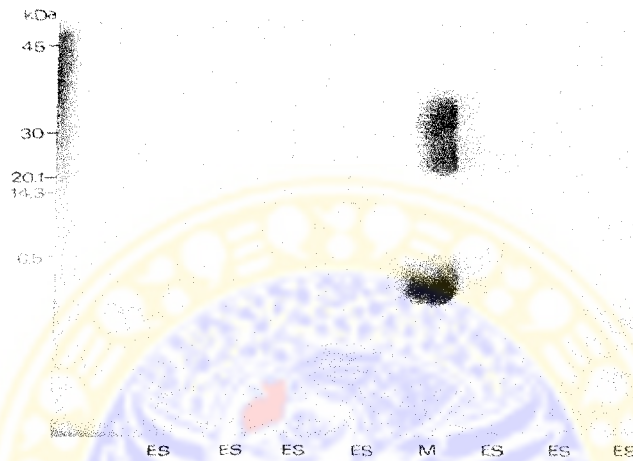
Keterangan : M= Marker, wp= *whole protein*

Dari Gambar 1. Terlihat satu pita protein yang lebih tebal yaitu protein dengan berat molekul 35,7 kDa dibandingkan dengan pita protein yang lain. Protein tersebut merupakan *major proteine* yang diekspresikan cacing secara keseluruhan. Kesembilan protein tersebut merupakan protein yang ada pada tubuh cacing yang berasal dari protein

somatik, visceral dan ekskresi-sekresi. Bellanti (1993) mengatakan bahwa parasit mengandung berbagai macam antigen somatik dan antigen metabolit, beberapa diantaranya adalah spesifik stadium dan bersifat sementara dan yang lain tetap ada pada seluruh daur hidup parasit dan dapat merangsang terus menerus respon imunologik yang berbeda.

Dari kesembilan protein tersebut protein dengan berat molekul 47,1 kDa, 35,7 kDa, 25,3 kDa dan 14,8 kDa diduga merupakan protein intestine dari cacing sesuai dengan laporan Lastuti dkk. (2001) yang melaporkan adanya protein dari intestine cacing 46 kDa, 36 kDa, 24 kDa dan 14,9 kDa. Selain protein intestine didapatkan juga protein ekskresi sekresi cacing *H. contortus* yaitu 23,4 kDa dan 14,8 kDa, seperti yang dilaporkan oleh Kodyman *et al.* (2000) yang melaporkan fraksi protein ekskresi sekresi yang imunogenik sebesar 15 kDa dan 24 kDa. Fraksi protein 35,7 kDa disamping merupakan protein intestine juga merupakan protein cathepsin B-like cystein proteinase. Hal tersebut sebagaimana dilaporkan oleh Skuce *et al.* (1999) yang telah mengklon protein 35 kDa sebagai protein cathepsin B-like cystein proteinase.

Hasil elektroforesis protein ekskresi sekresi didapatkan 5 fraksi protein yaitu: 42,3 kDa, 39,3 kDa 28,9 kDa, 24,4 kDa dan 13,9 kDa. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 2.



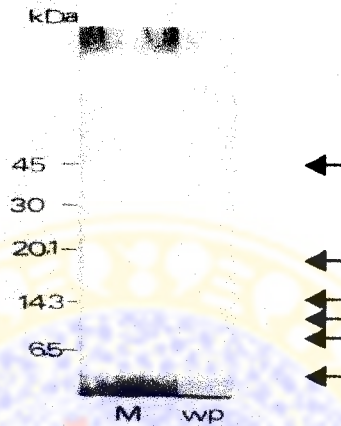
Gambar 2. Hasil elektroforesis protein ekskresi sekresi cacing *H. contortus*

Keterangan : M= Marker, ES= Eskresi Sekresi

Kelima fraksi protein yang diekskresi sekresikan cacing *Haemonchus* sebagian diantaranya bersifat imunogenik. Kodyman *et al.* (2000) melaporkan protein 15 kDa dan 24 kDa merupakan protein ekskresi sekresi yang imunogenik dari cacing *H. contortus*.

ADLN - Perpustakaan Nasional

Hasil imunoblotting *whole protein* menggunakan antibodi poliklonal terhadap protein tersebut yang diproduksi dari kelinci didapatkan delapan pita protein yang imunogenik yaitu 39,1 kDa, 31,8 kDa, 22,4 kDa, 15 kDa, 11,7 kDa, 9 kDa, 5 kDa dan protein di bawah 1 kDa. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 3.

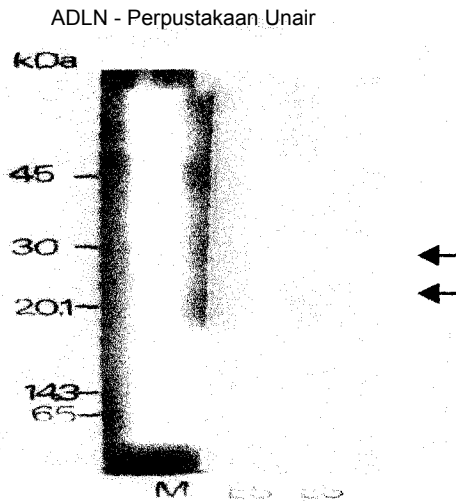


Gambar 3. Hasil imunoblotting *whole protein* cacing *H. contortus* dengan antibodi poliklonal

Keterangan : M= Marker, wp= *whole protein*

Delapan pita protein yang imunogenik tersebut ditemukan enam protein yang tewarnai dengan tebal (tanda panah), hal ini menunjukkan bahwa protein tersebut mempunyai reaktifitas yang tinggi dibanding dengan dua protein yang lainnya dan dapat digunakan sebagai kandidat vaksin sub unit serta mempunyai sensitifitas tinggi sebagai bahan antigen diagnostik.

Hasil imunoblotting protein ekskresi sekresi menggunakan antibodi poliklonal terhadap protein tersebut yang diproduksi dari kelinci didapatkan dua pita protein yang imunogenik yaitu 33,5 kDa dan 29,4 kDa. Hasil imunoblotting selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Hasil imunoblotting ekskresi-sekresi cacing *H. contortus* dengan antibodi poliklonal

Keterangan : M= Marker, wp= *whole protein*

Protein ekskresi-sekresi yang imunogenik hasil dari imunoblotting berbeda dengan yang dilaporkan oleh Kodyman *et al.* (2000) yang mengatakan bahwa protein ekskresi sekresi 15 kDa dan 24 kDa adalah protein yang imunogenik. Kemungkinan adanya imunogenitas yang berbeda dengan hasil penelitian sebelumnya, diduga disebabkan strain cacing *Haemonchus* yang dipakai untuk penelitian berbeda dengan strain yang dipakai Kodyman *et al.* (2000), karena perbedaan strain menyebabkan perbedaan protein yang diekspresikan berbeda termasuk protein ekskresi sekresi yang bersifat imunogenik.

Protein dengan berat molekul 33,5 kDa tidak tampak pada hasil elektroforesis protein ekskresi-sekresi. Kemungkinan protein yang diekspresikan sangat sedikit sehingga tidak tampak pada hasil elektroforesis tetapi protein tersebut reaktif sehingga tampak pada hasil imunoblotting. Keempat protein ekskresi-sekresi lainnya yang tampak pada hasil elektroforesis tidak reaktif artinya tidak membangkitkan respon imun

yang kuat sehingga tidak tampak pada hasil immunoblotting. Kedua protein ekskresi-sekresi yang imunogenik dari hasil immunoblotting keduanya tercatat tipis, hal ini disebabkan konsentrasi sampel yang digunakan sedikit yang berpengaruh terhadap hasil blotting. Hasil protein ekskresi sekresi yang bersifat imunogenik yang spesifik untuk isolat lokal mempunyai peluang untuk pengembangan lebih lanjut, baik untuk bahan diagnostik, vaksin atau sebagai bahan karakterisasi strain cacing *H. contortus* tertentu.

Hasil produksi antibodi poliklonal protein *whole* dan protein ekskresi sekresi pada kelinci lokal dapat dilihat pada Lampiran 1. Hasil uji ELISA serum darah kelinci setelah penyuntikan menunjukkan kecenderungan meningkat walaupun peningkatan titer antibodi yang dihasilkan relatif sedikit. Peningkatan titer tersebut tergantung dari respon imun hewan coba. Strain kelinci yang digunakan untuk produksi antibodi adalah kelinci lokal yang cenderung lambat dalam merespon terhadap antigen dibandingkan dengan kelinci ras. Faktor lain yang berpengaruh adalah antigen yang diinjeksikan. Kompleksitas antigen berpengaruh terhadap respon imun yang dihasilkan khususnya berat molekul dengan susunan asam amino yang dikandung. Semakin kompleks dan besar berat molekul semakin tinggi respon imunologinya. Tizzard (1982) mengatakan bahwa faktor faktor yang berpengaruh terhadap antigenitas suatu bahan adalah keasingan, ukuran molekul, kerumitan struktur kimiawi dan konstitusi genetik.

Faktor lain yang menyebabkan responsibilitas antibodi yang rendah pada kelinci adalah dosis yang mampu merespon antibodi tidak memenuhi konsentrasi yang ditetapkan yaitu 50-100 µg tiap kelinci. Pada penelitian ini konsentrasi protein diukur dengan spektrofotometer dan sampel belum dimurnikan. Pengukuran konsentrasi protein menggunakan spektrofotometer mempunyai beberapa kelemahan, antara lain fraksi

protein yang rusak dan kebersihan sampel sangat menentukan sehingga sampel yang tidak dimurnikan dari partikel lain dapat memberikan hasil yang bias dari yang diharapkan. Disamping faktor tersebut, rute pemberian antigen pada kelinci juga berpengaruh.

Dari hasil pemanenan antibodi poliklonal pada kelinci didapatkan 25-30 ml serum. Banyaknya serum yang didapat karena pemanenan darah dilakukan lewat jantung yang memungkinkan sebagian besar darah di tubuh hewan coba dapat terambil. Pemakaian hewan coba kelinci dilakukan dengan pertimbangan jumlah serum yang didapatkan banyak disamping responsibilitas kelinci terhadap antigen tertentu dan handling yang lebih mudah.

Pada uji ELISA juga didapatkan penurunan titer antibodi beberapa hari sebelum booster I dilakukan. Fenomena ini sering terjadi pada hewan coba yang dimunisasi dengan antigen tertentu yang disebut dengan *windows periode*, yaitu suatu fenomena dimana setelah dilakukan imunisasi tampak adanya respon *biphasic* pada titer antibodi, mula-mula terjadi penurunan respon imun akibat proses pengenalan imunogen dan proliferasi sel B yang membutuhkan waktu, serta kemungkinan faktor lain yang tidak dikehendaki bisa muncul seperti stress penyuntikan, hipertermia dan kemungkinan aktifitas mediator imun akibat faktor pyrogenik. Hal ini sesuai dengan pernyataan Roitt (1997) yang mengatakan bahwa terjadi penurunan respon imun segera setelah imunisasi sebelum respon imun meningkat tajam.

**BAB VI**  
ADLN - Perpustakaan Unair  
**KESIMPULAN DAN SARAN**

### 6.1 Kesimpulan

1. Fraksi protein ekskresi sekresi yang imunogenik dari cacing *H. contortus* adalah protein dengan berat molekul 33,5 kDa dan 29,4 kDa.
2. Antibodi poliklonal protein spesifik ekskresi sekresi cacing *H. contortus* dapat diproduksi pada kelinci.

### 6.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian penggunaan fraksi protein ekskresi sekresi yang imunogenik yang diisolasi dari cacing *H. contortus* isolat lokal untuk pengembangan vaksin sub unit terhadap haemonchosis pada domba dan kambing dan penelitian protein spesifik lain pada beberapa stadium sehingga pengembangan vaksin dan bahan diagnosis penyakit dapat lebih efisien.
2. Antibodi poliklonal terhadap protein spesifik ekskresi sekresi yang bersifat imunogenik yang diproduksi di kelinci perlu dilakukan uji sensitifitas dan spesifitas serta dilanjutkan uji silang dengan protein dari cacing Nematoda lain khususnya kelompok *Strongyloids* sebelum digunakan sebagai bahan diagnostik haemonchosis pada kambing dan domba di lapangan



- Axelsen, N.H. 1983. *Handbook of Immunoresipitation-in-Gel Technique*. Black Well Scientific Publications. London
- Bellanti, J.A. 1993. *Immunologi III* (Terjemahan: A. S. Wahab). Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Chandrawathani, P., M. Adnan and P.J. Waller. 1999. Anthelmintic Resistance in sheep and goat farms on Peninsular Malaysia. *Vet. Parasitol.* 82 (4):305-310.
- Colin, J. 1999. *Parasites and Parasitic Diseases of Domestic Animals*. University of Pennsylvania. June, 28.
- Fabiyi, J.P. 1986. Production Losses and Control of Helminths Ruminant of Tropical Regions. Proc. Sixth International Congr. Parasitol., Canberra, Aust. Acad.Sci:435-442.
- Freshney, R.I 1987. *Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique*. 2<sup>nd</sup> Ed. Alan R. Liss, Inc. New York.
- Gasser, R.B. and Zhu Xo. 1999. Sequence based analysis of enzymatically amplified fragment DNA by mutation detection techniques. *Parasitol today*. 15 (11): 42-465.
- Knox, M.R. 1990. Future prospects for controlling parasitic gastrointestinal Nematodes in small ruminants in Indonesia in Indonesia. *Majalah Parasitologi Indonesia*. 3(ed. Khusus): 85-89.
- Kodyman F.N., Scallig,H.D., Vanleuwen, M.A., MacKellar,S.,Huntley,J.F. 2000. Protection in Lambs Vaccinated with *H.contortus* antigens is age Related and Corellates with IgE rather than IgG1 Antibody. *Parasite. Immunol.* Jan;22(1);13-20
- Lastuti, N.D.R., Mufasirin dan E.B. Aksono. 2001. Profil protein intestine *H. contortus* dewasa. *Laporan penelitian*. Lemlit Unair. Surabaya.
- Lopez de Mendoza ,M.E., Durtis,R.H., Gowen,S. 1999. Identification and Characterization of Excreted-secreted Products and Surface Coat Antigens of Animal and Plant Parasitic Nematodes. *Parasitology*. Apr;118(Pt4):397-405
- Molento, M.B., Prichard,R.K. 1999. Effect Of Multidrug Resistance Reversing Agents Verapamil and CI 347,099 on The Efficacy of Ivermectin against unselected and drug selected Strains of *H.contortus* in Jirds. *Parasitol. Res. Des*;85(12):1007-1011.

- Mufasirin, 1999. *Kloning dan sintesis protein membran menyandi Protein membran T. gondii isolat Bogor*. Tesis. Pasca Sarjana UGM. Yogyakarta.
- Newland, G.F., P.J. Skuce, D.P. Knox, S.K. Smith and W.D. Smith. 1999. Cloning and characterization of a B galactosidase binding protein (galactine) from the gut of the gastrointestinal Nematode parasites *H. contortus*. *J. Parasitol.* 119(pt 5): 483-490.
- Roitt, I. 1997. *Essensial Immunology*. 9<sup>th</sup> Ed. Blackweel Science. Australia.
- Skuce, P.J., D.L. Redmond, S. Lindell, E.M. Stewart, W.D. Smith and D.P. Knox. 1999. Molecular cloning and characterization of gut derived cystein proteinases associated with a host protective extract from *Haemonchus contortus*. *J. Parasitol.* 119 (pt 4) : 405-412.
- Soulsby, E.J.L 1986. *Helminths, Arthropods and Protozoa Of Domesticated Animals*. 7<sup>th</sup> Ed. Bailliere Tindall. London.
- Sudjadi, 1988. *Metode Pemisahan*. Penerbit Kanisius. Yogyakarta.
- Tizzard, I.R. 1982. *An Introduction to veterinary immunology*. 2<sup>nd</sup> Ed W.B. Saunders Co. Ontario, Canada.
- Zajac, A.N. and T.A, Gibson. 2000. Multiple anthelmintic resistance in goat herd. *Vet. Parasitol.* 87 (2-3): 163-172.

Lampiran 1. Hasil ELISA produksi antibodi poliklonal Protein *Whole* dan Ekskresi sekresi dari cacing *H. contortus*

Hasil ELISA serum Protein *Whole*

ABSORBANCE 50 MODE

DATE: 10/30/03  
TIME: 14:42

FILTER: 450nm  
PLATE No. 235  
BLANK AVE. 0.195

1A	0.756	2A	0.639	7A	1.002	8A	0.916
1B	0.608	2B	1.010	7B	1.210	8B	1.193
1C	0.570	2C	0.675	7C	0.967	8C	0.917
1D	0.490	2D	0.859	7D	0.979	8D	0.775
1E	0.414	2E	0.000*	7E	1.003	8E	0.749
1F	0.512	2F	0.927	7F	1.004	8F	1.169
1G	0.501	2G	0.842	7G	0.805	8G	0.870
1H	0.577	2H	0.682	7H	0.634	8H	2.722
3A	0.750	4A	0.500	9A	0.884	10A	0.942
3B	0.829	4B	0.739	9B	1.016	10B	1.132
3C	0.691	4C	0.440	9C	0.907	10C	0.828
3D	0.723	4D	0.563	9D	0.914	10D	0.914
3E	0.678	4E	0.695	9E	0.960	10E	0.871
3F	0.554	4F	0.663	9F	1.129	10F	0.811
3G	0.693	4G	0.618	9G	0.806	10G	0.627
3H	0.567	4H	0.491	9H	0.687	10H	0.596
5A	0.864	6A	0.930	11A	0.783	12A	1.012
5B	0.941	6B	1.082	11B	1.012	12B	1.208
5C	0.730	6C	0.916	11C	1.010	12C	0.927
5D	0.730	6D	0.914	11D	0.863	12D	1.074
5E	0.653	6E	0.902	11E	0.870	12E	1.054
5F	0.622	6F	1.048	11F	0.885	12F	1.152
5G	0.539	6G	0.842	11G	0.718	12G	0.909
5H	0.614	6H	0.748	11H	0.713	12H	0.766

Keterangan :

- |                     |                     |
|---------------------|---------------------|
| 1= Kontrol          | 7= post booster 7   |
| 2= post imunisasi I | 8= post booster 8   |
| 3= post booster 3   | 9= post booster 9   |
| 4= post booster 4   | 10= post booster 10 |
| 5= post booster 5   | 11= post booster 11 |
| 6= post booster 6   | 12= post booster 12 |

Laporan Penelitian

Identifikasi dan Produksi Antibodi ....

Mufasirin

A= Pengenceran 10

E= Pengenceran 160

B= Pengenceran 20

F= Pengenceran 320

C= Pengenceran 40

G= Pengenceran 640

Hasil ELISA serum Protein Ekskresi Sekresi

ABSORBANCE (S) MODE

DATE: 10/30/02

TIME: 14:44

FILTER: 450nm

PLATE No. 20

BLANK HVE. 0.067

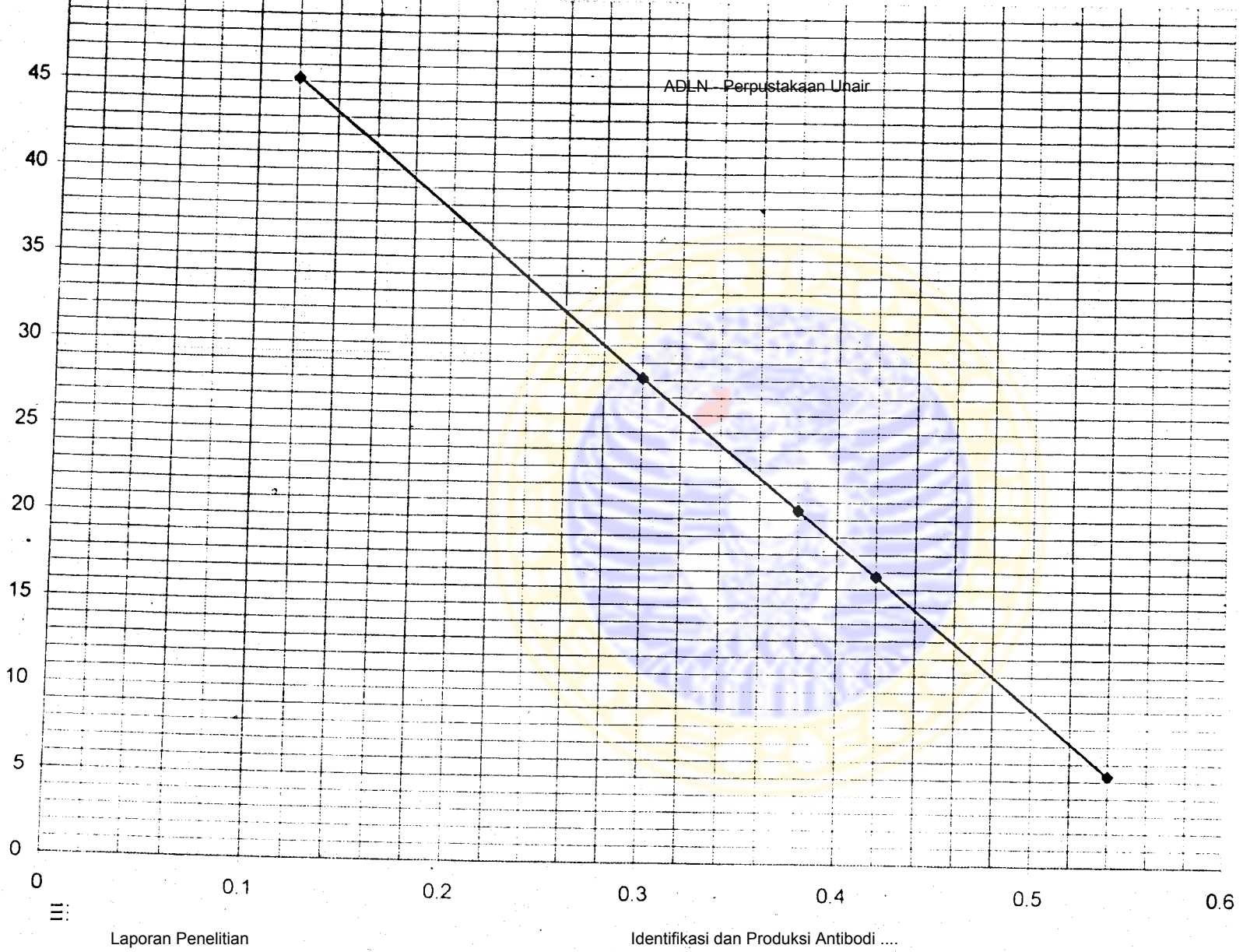
1A 0.547	2A 0.450	7A 0.471	8A 0.510
1B 0.542	2B 0.482	7B 0.580	8B 0.545
1C 0.498	2C 0.367	7C 0.379	8C 0.408
1D 0.515	2D 0.358	7D 0.456	8D 0.434
1E 0.573	2E 0.598	7E 0.410	8E 0.595
1F 0.503	2F 0.421	7F 0.517	8F 0.576
1G 0.475	2G 0.349	7G 0.325	8G 0.428
1H 0.477	2H 0.407	7H 0.411	8H-0.001*
3 0.428	4A 0.460	9A 0.517	10A 0.551
3B 0.607	4B 0.444	9B 0.519	10B 0.507
3C 0.368	4C 0.394	9C 0.430	10C 0.407
3D 0.510	4D 0.387	9D 0.538	10D 0.507
3E 0.304	4E 0.427	9E 0.497	10E 0.360
3F 0.401	4F 0.405	9F 0.497	10F 0.474
3G 0.420	4G 0.361	9G 0.493	10G 0.563
3H 0.404	4H 0.372	9H 0.001*	10H-0.001*
5A 0.480	6A 0.461	11A 0.574	12A 0.653
5B 0.491	6B 0.451	11B 0.515	12B 0.437
5C 0.377	6C 0.372	11C 0.436	12C 0.500
5D 0.405	6D 0.516	11D 0.419	12D 0.441
5E 0.461	6E 0.407	11E 0.318	12E 0.501
5F 0.529	6F 0.424	11F 0.457	12F 0.500
5G 0.416	6G 0.505	11G 0.445	12G 0.451
5H 0.340	6H 0.405	11H 0.001*	12H-0.001*

**Keterangan :**

- |                     |                     |
|---------------------|---------------------|
| 1= Kontrol          | 7= post booster 7   |
| 2= post imunisasi I | 8= post booster 8   |
| 3= post booster 3   | 9= post booster 9   |
| 4= post booster 4   | 10= post booster 10 |
| 5= post booster 5   | 11= post booster 11 |
| 6= post booster 6   | 12= post booster 12 |

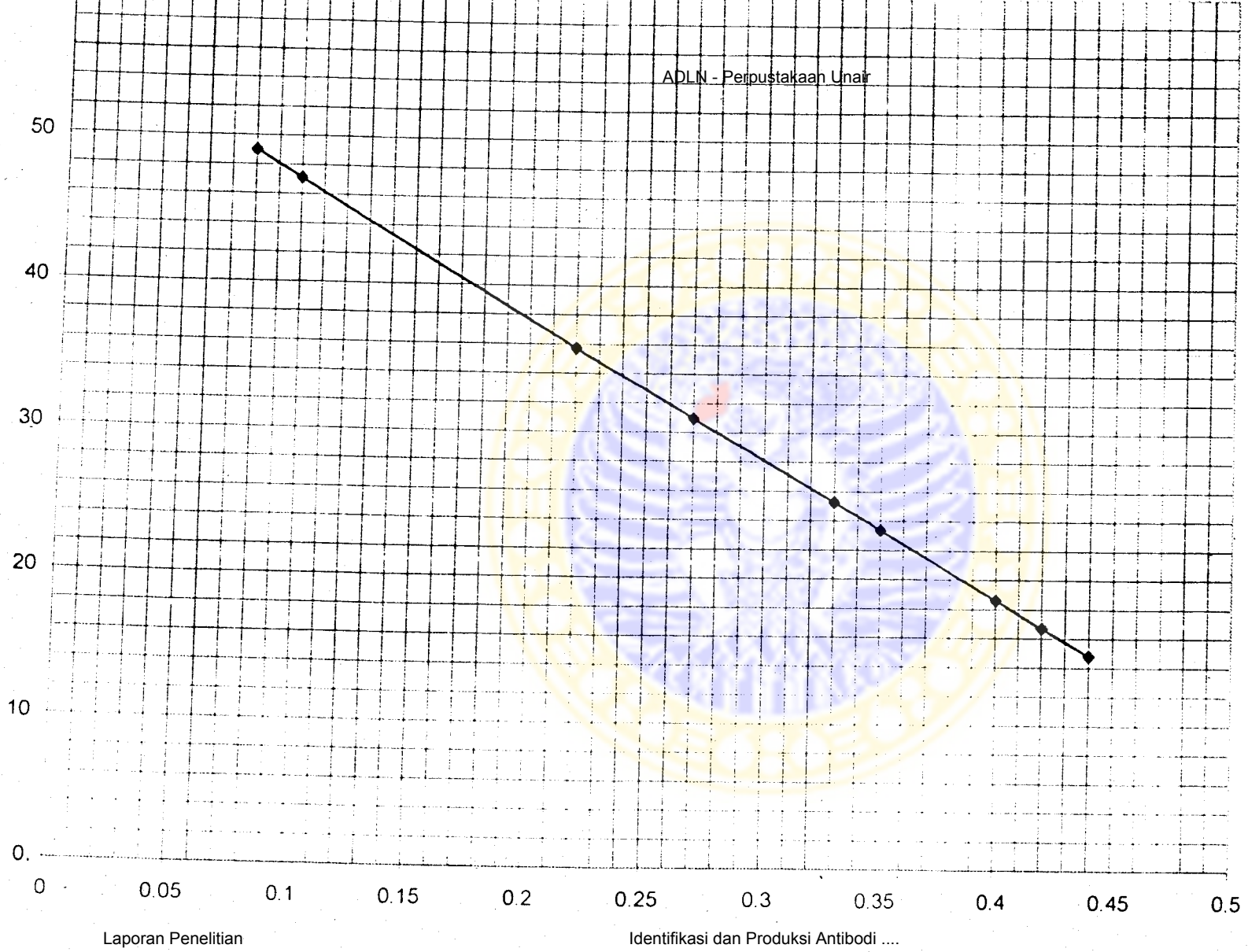
- A= Pengenceran 10  
 B= Pengenceran 20  
 C= Pengenceran 40  
 D= Pengenceran 80

- E= Pengenceran 160  
 F= Pengenceran 320  
 G= Pengenceran 640  
 H= Pengenceran 1280



Series1

Grafik Marker Protein Whole (teknik SDS PAGE)



Series1

Grafik Protein Whole (teknik SDS PAGE)

## Kurva Hubungan RF dengan Log.BM Protein Standard

ADLN - Perpustakaan Unair

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

- **Marker**

Panjang gel sesudah di running = 12

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

**Sumuran I :**

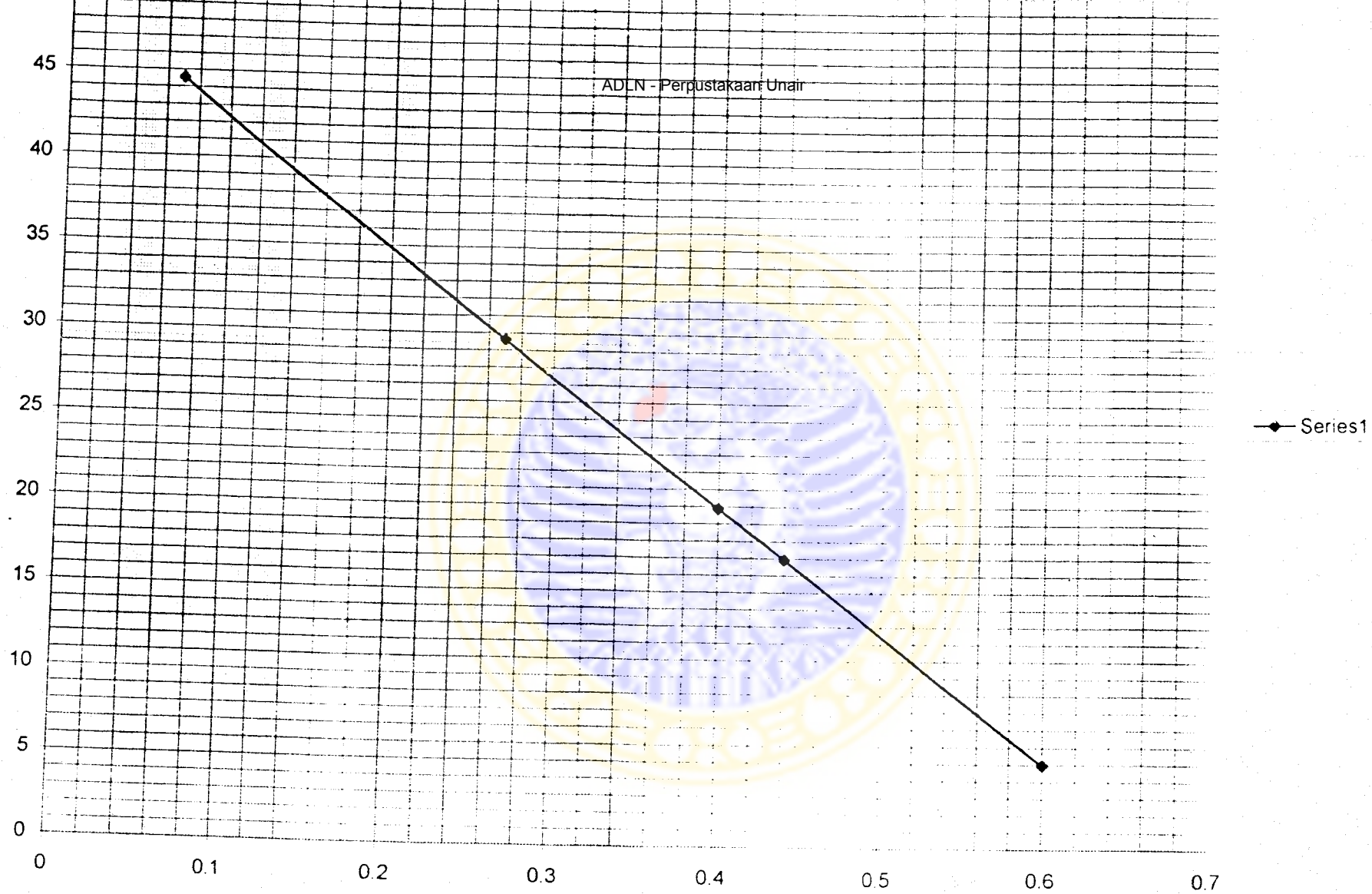
1. RF =  $1 / 12$  = 0,08
2. RF =  $1,25 / 12$  = 0,10
3. RF =  $2,6 / 12$  = 0,22
4. RF =  $3,2 / 12$  = 0,27
5. RF =  $4 / 12$  = 0,33
6. RF =  $4,25 / 12$  = 0,35
7. RF =  $4,7 / 12$  = 0,40
8. RF =  $5 / 12$  = 0,42
9. RF =  $5,3 / 12$  = 0,44

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

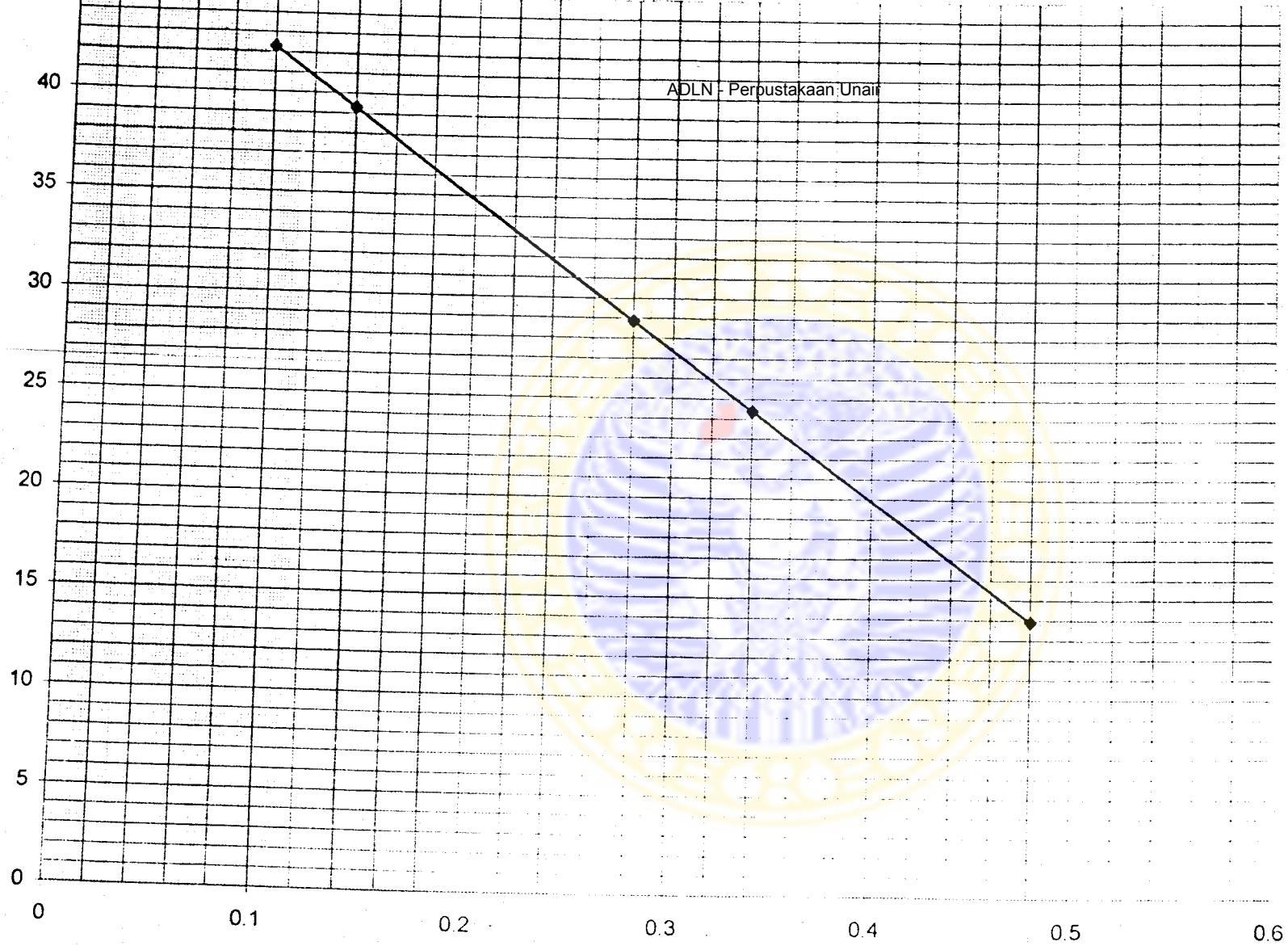
→ didapatkan persamaan :  $Y = 56,624 - 95,012 X$

**Hasil :**

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







Series1

Laporan Penelitian

Identifikasi dan Produksi Antibodi ....

Mufasirin

Grafik Protein ES (teknik SDS PAGE)

## Kurva Hubungan RF dengan Log.BM Protein Standard

ADLN - Perpustakaan Unair

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

- **Marker**

Panjang gel sesudah di running = 12

1. Protein 45 kDa → RF = 0,85 / 12 = 0,10
2. Protein 30 kDa → RF = 3,25 / 12 = 0,12
3. Protein 20,1 kDa → RF = 4,7 / 12 = 0,28
4. Protein 14,3 kDa → RF = 5,25 / 12 = 0,34
5. Protein 6,5 kDa → RF = 7,2 / 12 = 0,48

**Sumuran I :**

1. RF = 1,2 / 12 = 0,10
2. RF = 1,7 / 12 = 0,14
3. RF = 3,4 / 12 = 0,28
4. RF = 4,1 / 12 = 0,34
5. RF = 5,8 / 12 = 0,48

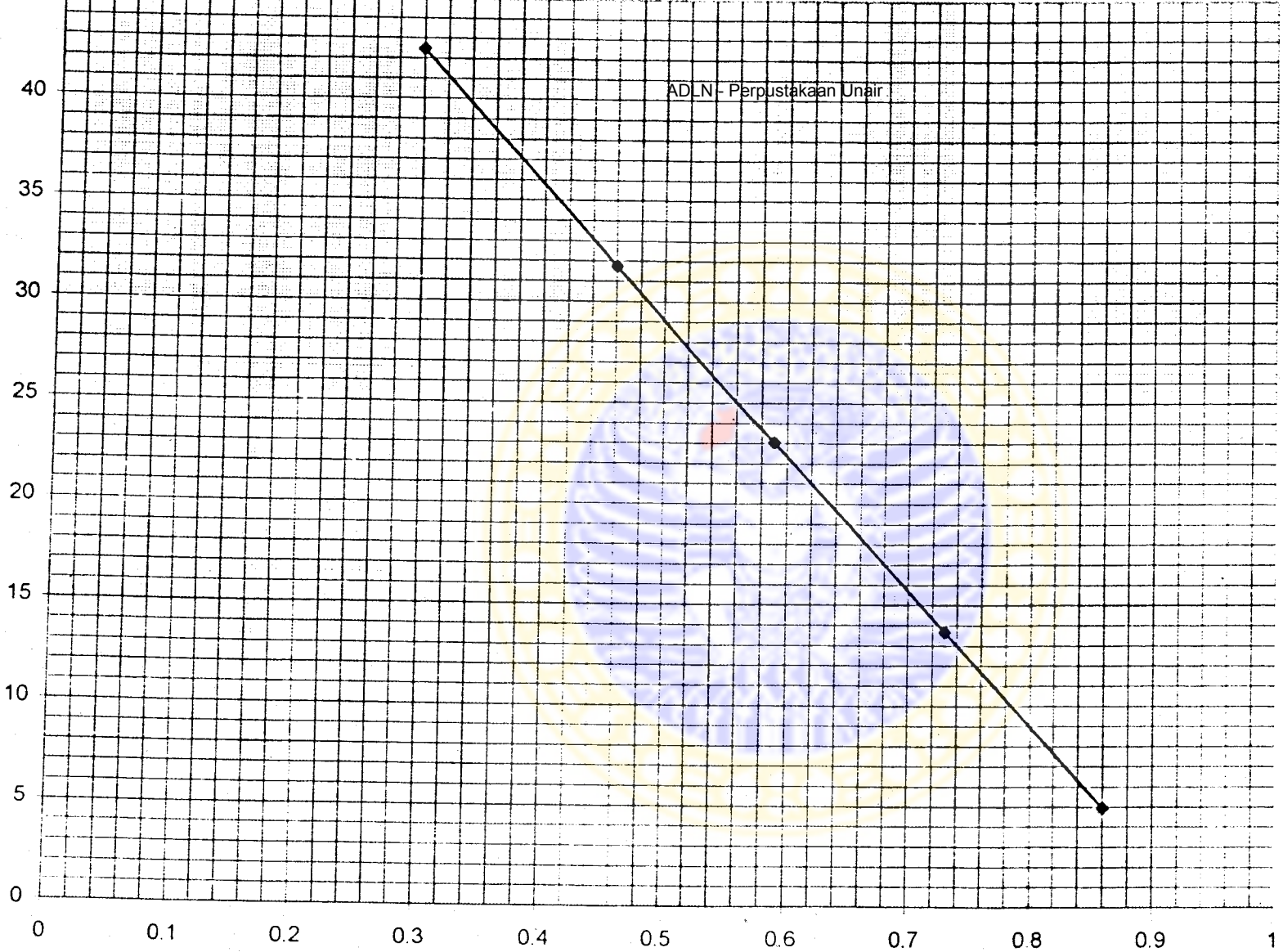
- Dari data yang didapatkan pada marker, dimasukkan pada persamaan linier dimana koefisien X = Rf marker dan Y = Protein marker (kD)

→ didapatkan persamaan :  $Y = 49,766 + (-) 74,679 X$

$$Y = 49,766 - 74,679 X$$

**Hasil :**

1. 42,3 kDa
2. 39,3 kDa
3. 28,9 kDa
4. 24,4 kDa
5. 13,9 kDa



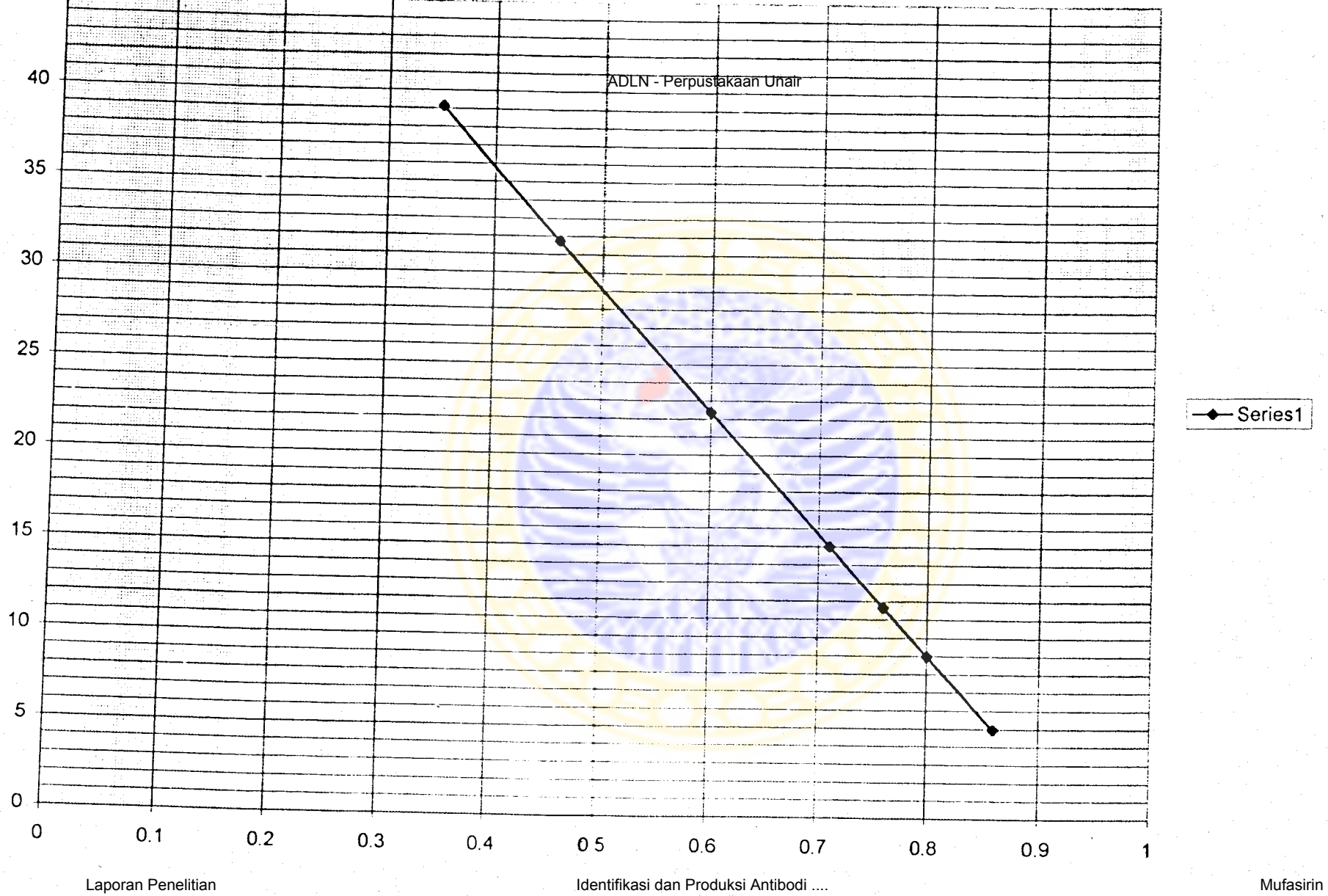
Series1

Laporan Penelitian

Identifikasi dan Produksi Antibodi ....

Mufasirin

Grafik Marker Protein Whole (teknik Immunoblotting)



Grafik Protein Whole (teknik Immunoblotting)

## Kurva Hubungan RF dengan Log.BM Protein Standard

ADLN - Perpustakaan Unair

- RF = Jarak band dari sumuran / Panjang gel sesudah di running
- Dari gambar didapatkan hasil sebagai berikut :

- **Marker**

Panjang gel sesudah di running = 6,3

1. Protein 45 kDa → RF =  $1,9 / 6,3$  = 0,30
2. Protein 30 kDa → RF =  $2,9 / 6,3$  = 0,46
3. Protein 20,1 kDa → RF =  $3,7 / 6,3$  = 0,59
4. Protein 14,3 kDa → RF =  $4,6 / 6,3$  = 0,43
5. Protein 6,5 kDa → RF =  $5,4 / 6,3$  = 6,86

**Sumuran I :**

1. RF =  $2,2 / 6,3$  = 0,35
2. RF =  $2,9 / 6,3$  = 0,46
3. RF =  $3,8 / 6,3$  = 0,60
4. RF =  $4,5 / 6,3$  = 0,71
5. RF =  $4,8 / 6,3$  = 0,76
6. RF =  $5,1 / 6,3$  = 0,80
7. RF =  $5,4 / 6,3$  = 0,86
8. RF =  $5,9 / 6,3$  = 0,94

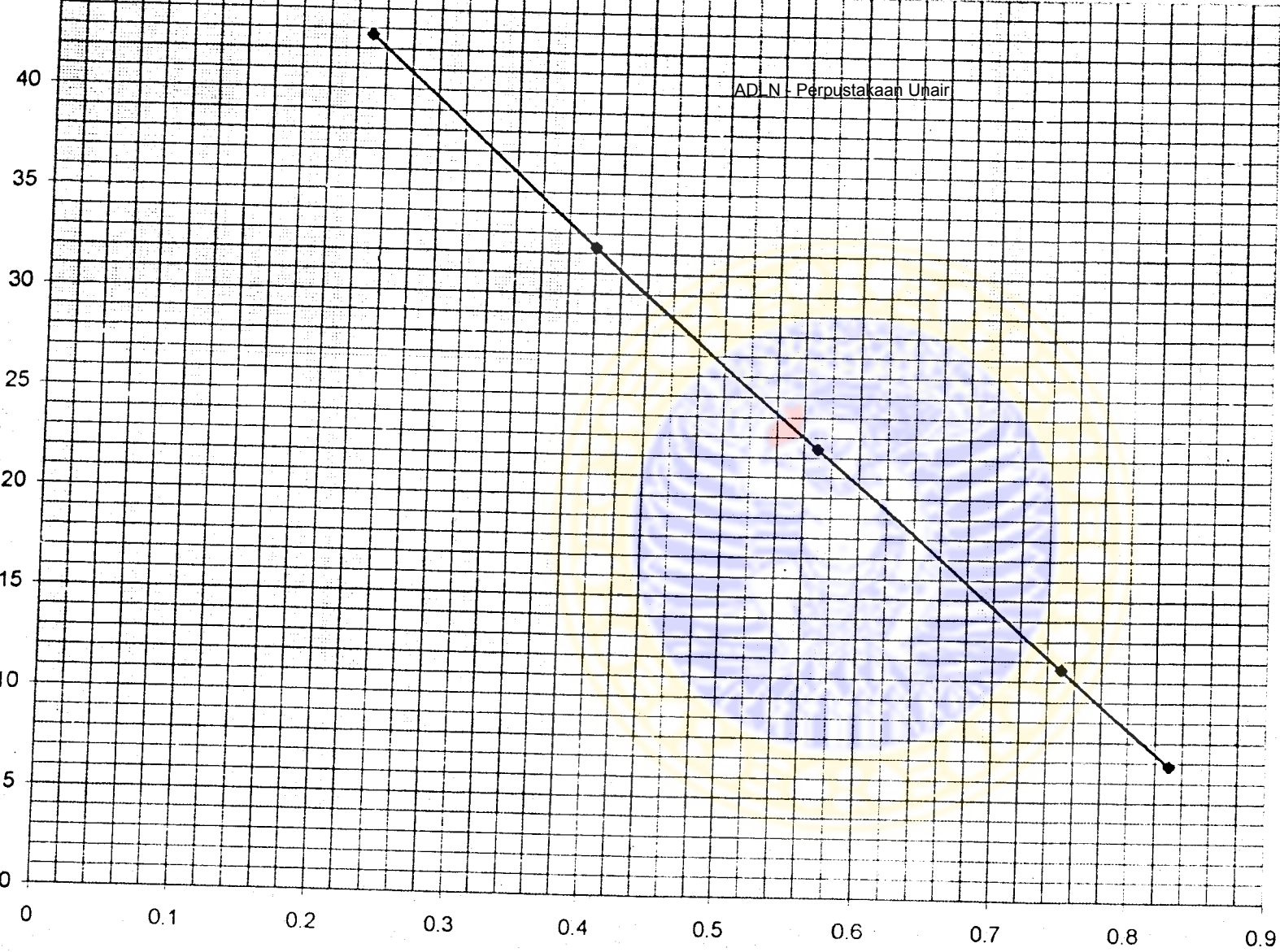
- Dari data yang didapatkan pada marker, dimasukkan pada persamaan linier dimana koefisien X = Rf marker dan Y = Protein marker (kD)

→ didapatkan persamaan :  $Y = 62,570 + (-) 66,990 X$

$$Y = 62,570 - 66,990 X$$

**Hasil I :**

1. 39,1 kDa
2. 31,8 kDa
3. 22,4 kDa
4. 15,0 kDa
5. 11,7 kDa
6. 9 kDa
7. 5 kDa
8. sangat kecil/ dibawah 1 kDa



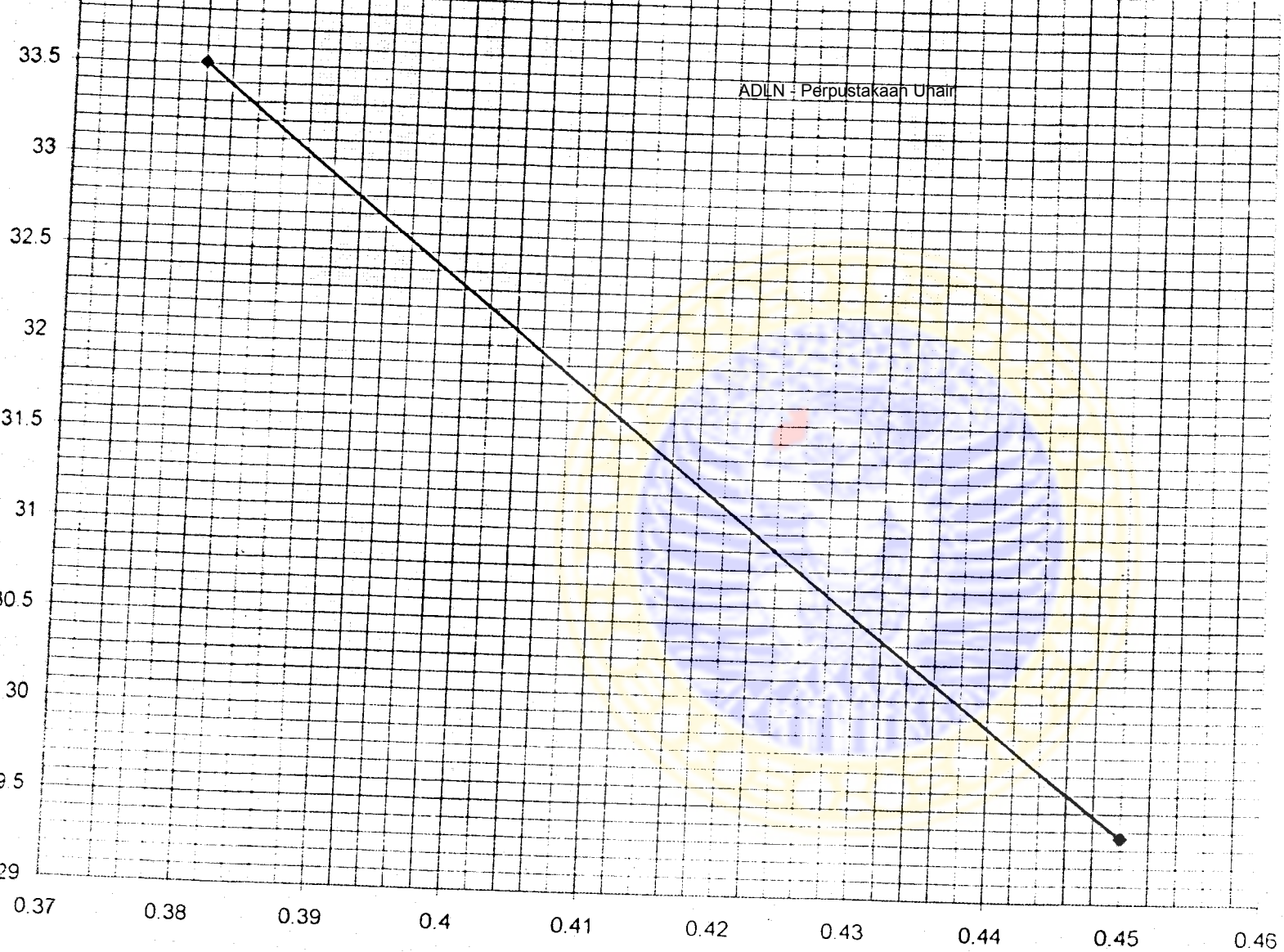
Series1

Laporan Penelitian

Identifikasi dan Produksi Antibodi ....

Mufasirin

Grafik Marker Protein ES (teknik Immunoblotting)



Series1

## Kurva hubungan Rf dengan Log.BM Protein Standard

ADLN - Perpustakaan Unair

- **RF = Jarak band dari sumuran / Panjang gel sesudah dirunning**
- Dari gambar didapatkan hasil sebagai berikut :

- **Marker**

Panjang gel sesudah dirunning = 6

1. Protein 45 kDa → Rf =  $1,35 / 6 = 0,23$
2. Protein 30 kDa → Rf =  $2,4 / 6 = 0,4$
3. Protein 20,1 kDa → Rf =  $3,4 / 6 = 0,57$
4. Protein 14,3 kDa → Rf =  $4,5 / 6 = 0,75$
5. Protein 6,5 kDa → Rf =  $5 / 6 = 0,83$

- **Sumuran I**

Ada 2 macam band

Panjang gel sesudah di running = 6

1. Rf =  $2,3 / 6 = 0,38$
2. Rf =  $2,7 / 6 = 0,45$

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

→ didapatkan persamaan :  $Y = 56,018 - 59,231X$

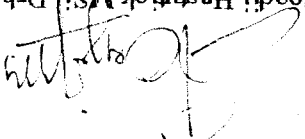
$$Y = 56,018 - 59,231X$$

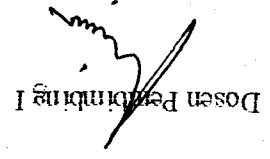
- **Hasilnya** : didapatkan bahwa dari band tersebut terdapat 2 macam protein whole pada cacing *haemonchus contortus* yaitu :

**Band I** →

1. **33,5 kDa**
2. **29,4 kDa**



  
Dosen Pembimbing II

  
Dosen Pembimbing I

Dosen Pembimbing  
Menyetujui



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

ADLN - Perpustakaan Unair  
Lampiran 3. Abstrak Penelitian Mahasiswa yang Ikut Penelitian Proyek DUE- Like  
**IDENTIFIKASI FRAKSI *WHOLE PROTEIN*  
CACING *Haemonchus contortus* DEWASA**

Kurniawati Amrihasih

### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi fraksi *whole protein* dari cacing *Haemonchus contortus* dewasa yang dinyatakan dalam berat molekul.

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

Hasil penelitian didapatkan 9 fraksi protein yaitu: 49,0 kDa; 47,1 kDa; 35,7 kDa; 30,1 kDa; 25,3 kDa; 23,4 kDa; 18,6 kDa; 16,7 kDa; 14,8 kDa. Agar didapatkan pita protein yang jelas disarankan agar dilakukan pemurnian protein sebelum dielektroforesis.

**IDENTIFIKASI FRAKSI PROTEIN EKSKRESI-SEKRESI**  
**CACING *Haemonchus contortus* DEWASA**



Oleh:

**Artha Rini Pasila**

**069812592**

Menyetujui,

**Komisi Pembimbing**

Pembimbing Pertama

Pembimbing Kedua

# IDENTIFIKASI FRAKSI PROTEIN EKSKRESI-SEKRESI CACING *Haemonchus contortus* DEWASA

Artha Rini Pasila

## ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan fraksi protein ekskresi-sekresi cacing *H. contortus* yang dinyatakan dalam berat molekul.

Sebanyak 100 ekor cacing *H. contortus* dewasa diisolasi dari abomasum domba dan kambing yang berasal dari RPH Surabaya, cacing dicuci hingga bersih dengan PBS lalu diinkubasi dalam PBS dengan pH 7,0 dan temperatur 37°C selama semalam. Cairan ekskresi-sekresi yang dihasilkan cacing dalam PBS diambil untuk isolasi protein ekskresi-sekresi dengan penambahan amonium jenuh, sedangkan untuk mendapatkan fraksi protein ekskresi-sekresi digunakan metode SDS-PAGE.

Penelitian yang telah dilakukan menghasilkan 5 fraksi protein ekskresi-sekresi yaitu: 42,3 kDa; 39,3 kDa; 28,9 kDa; 24,4 kDa dan 13,9 kDa.

**LEMBAR PENGESAHAN**

**PRODUKSI ANTIBODI POLIKLONAL PROTEIN WHOLE *Haemonchus*  
*contortus* DEWASA**

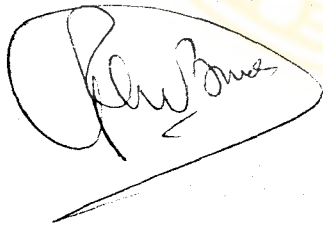
Oleh

ROSITA AMALIA

NIM:069812572

Menyetujui

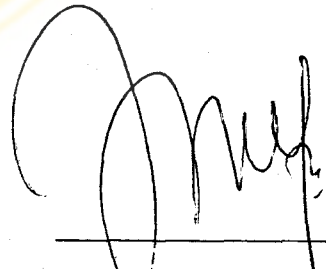
Komisi Pembimbing,



---

M. Anam Al Arief, M.P., drh

Pembimbing Pertama



---

Mufasirin, MSi., drh

Pembimbing Kedua

**PRODUKSI ANTIBODI POLIKLONAL PROTEIN  
WHOLE *Haemonchus contortus* DEWASA**

**Rosita Amalia**

**ABSTRAK**

Penelitian ini bertujuan untuk memproduksi antibodi poliklonal dari protein *whole* cacing *Haemonchus contortus* dewasa. Antibodi poliklonal yang diperoleh dapat digunakan untuk diagnosa haemonchosis secara serologis pada kambing dan domba.

Protein *whole* dibuat dari cacing *Haemonchus contortus* dewasa yang diisolasi dari abomasum domba dan kambing yang diambil dari Rumah Potong Hewan (RPH) Surabaya. Ekstraksi protein dilakukan dengan teknik sonikasi. Identifikasi protein dianalisis dengan *SDS PAGE*. Produksi antibodi poliklonal dimulai dengan imunisasi kelinci dengan protein *whole* dari *Haemonchus contortus* dengan dosis 50 µg ditambah dengan adjuvan komplit. Penyuntikan dilakukan di bawah kulit. Booster dilakukan satu minggu setelah penyuntikan pertama dengan dosis yang sama ditambah dengan adjuvan inkomplit. Booster diulang satu minggu setelah booster sebelumnya sampai diperoleh titer antibodi yang tinggi. Penentuan titer antibodi dilakukan dengan metode *Enzyme Linked Immunosorbant Assay* (ELISA).

Hasil uji ELISA setelah Booster ke-12 menunjukkan adanya kenaikan titer antibodi yang cukup tinggi.

LEMBAR PERSETUJUAN

**PRODUKSI ANTIBODI POLIKLONAL  
PROTEIN EKSKRESI - SEKRESI**  
*Haemonchus contortus*





OLEH :

**DUWI PUDJI NING ASIH**

069812578

Disetujui Oleh :

  
**Budi Santoso., drh**  
Pembimbing Satu

  
**Julien S., drh., SU**  
Pembimbing Dua

# PRODUKSI ANTIBODI POLIKLONAL PROTEIN EKSKRESI – SEKRESI CACING *Haemonchus contortus*

Oleh  
**DUWI PUDJINING ASIH**

## ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan memproduksi antibodi poliklonal protein spesifik ekskresi-sekresi cacing *Haemonchus contortus* dewasa. Diharapkan antibodi tersebut dapat digunakan sebagai bahan diagnosa hemonchosis pada domba dan kambing.

Protein ekskresi-sekresi diisolasi dari hasil kultur *in vitro* cacing *Haemonchus contortus* dewasa dan identifikasi protein dianalisis dengan SDS PAGE. Produksi antibodi poliklonal dimulai dengan imunisasi kelinci dengan protein ekskresi-sekresi dengan dosis 50 µg yang ditambah adjuvan complit. Booster dilakukan 1 minggu setelah dengan dosis yang sama yang telah ditambahkan adjuvan incomplit. Booster diulang setiap minggu sampai didapat titer antibodi yang tinggi. Untuk mengetahui titer antibodi poliklonal protein ekskresi-sekresi digunakan metode ELISA.

Dari hasil ELISA didapatkan titer antibodi poliklonal protein ekskresi-sekresi pada booster ke-12 sudah meningkat.

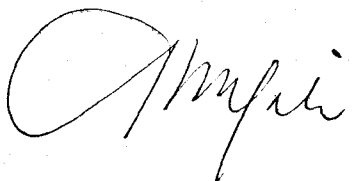


**PROFIL PROTEIN *WHOLE Haemonchus contortus* DEWASA YANG  
IMUNOGENIK DENGAN TEKNIK IMMUNOBLOTTING**

Oleh :  
Indhira Kusumawardhani  
Nim.069812550

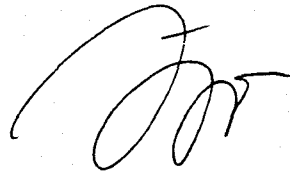
Menyetujui  
Dosen Pembimbing  
Tanggal 2 Desember 2002

Dosen Pembimbing I



( Ajik Azmijah, SU., Drh )

Dosen Pembimbing II



( E. Bimo Aksono H.P., Mkes., Drh )

## PROFIL PROTEIN *WHOLE Haemonchus contortus* DEWASA YANG IMUNOGENIK DENGAN TEKNIK IMMUNOBLOTTING

Indhira Kusumawardhani

### ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan fraksi protein *whole* yang imunogenik dari *Haemonchus contortus* yang dinyatakan dengan berat molekul. Fraksi protein tersebut nantinya dapat digunakan sebagai penelitian lanjutan biologi molekuler untuk keperluan diagnostik maupun pengembangan pembuatan vaksin sub unit *Haemonchosis*.

Cacing *Haemonchus contortus* dewasa diisolasi dari abomasum yang didapatkan dari domba dan kambing di Rumah Potong Hewan (RPH) Surabaya. Ekstraksi protein *whole* dilakukan dengan teknik Sonikasi. Produksi antibodi poliklonal dilakukan pada kelinci dan titer antibodi diukur dengan metode Enzym Linked Immunosorbant Assay (ELISA). Identifikasi fraksi protein *whole* yang imunogenik dengan Western Blott ( Immunoblotting ).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat 8 fraksi protein imunogenik dari protein *whole Haemonchus contortus* yaitu : 39,1 kDa, 31,7 kDa, 22,4 kDa, 15 kDa, 11,7 kDa, 9 kDa, 5 kDa, dan dibawah 1 kDa.