



**POTENSI BAHAYA INFEKSI NEMATODA ANISAKID PADA IKAN
CAKALANG (*Katsuwonus pelamis*)**

DISERTASI
Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Doktor

Oleh :

LADY CINDY SOEWARLAN
NIM. 117 080 100 111 006



PROGRAM DOKTOR ILMU PERIKANAN DAN KELAUTAN
MINAT TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN

PROGRAM PASCA SARJANA
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG
2015



**POTENSI BAHAYA INFEKSI NEMATODA ANISAKID PADA IKAN
CAKALANG (*Katsuwonus pelamis*)**

DISERTASI
Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Doktor

Oleh :
LADY CINDY SOEWARLAN
NIM. 117 080 100 111 006

Bagian dari penelitian ini telah dipublikasikan pada:
International Journal of Bioscience Vol 5, No 9, 423-432, 2014
International Journal of PharmTech Research Vol 8 No 2, 221-229, 2015



PROGRAM DOKTOR ILMU PERIKANAN DAN KELAUTAN
MINAT TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN

PROGRAM PASCA SARJANA
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG
2015



LEMBAR PENGESAHAN

Judul Disertasi : Potensi Bahaya Infeksi Nematoda Anisakid Pada Ikan Cakalang (*Katsuwonus pelamis*)

Nama Mahasiswa : Lady Cindy Soewarlan

NIM : 117080100111006

Program Studi : Program Doktor Ilmu Perikanan dan Kelautan

Program Minat : Teknologi Hasil Perikanan dan Kelautan

Menyetujui

Komisi Pembimbing,
Promotor

Prof. Dr. Ir. Eddy Suprayitno, MS.

NIP. 19591005 198503 1 004

Ko-Promotor 1

Ko-Promotor 2

Dr. Ir. Hardoko, MS.

NIP. 19620108 198802 1 001

Dr. Ir. Happy Nursyam, MS.

NIP. 19600322 198601 1 001

Mengetahui,

Dekan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan

Prof. Dr. Ir. Diana Arfiati, MS.

NIP. 19591230 198503 2 001

**IDENTITAS PENGUJI DISERTASI**

Judul Disertasi : Potensi Bahaya Infeksi Nematoda Anisakid Pada Ikan Cakalang (*Katsuwonus pelamis*)

Nama Mahasiswa : Lady Cindy Soewarlan

NIM : 117080100111006

Program Studi : Program Doktor Ilmu Perikanan dan Kelautan

Program Minat : Teknologi Hasil Perikanan dan Kelautan

KOMISI PEMBIMBING

Promotor : Prof. Dr. Ir. Eddy Suprayitno, MS.

Ko Promotor 1 : Dr. Ir. Hardoko, MS.

Ko Promotor 2 : Dr. Ir. Happy Nursyam, MS.

KOMISI PENGUJI

Penguji 1 : Prof. Dr. drh. Aulan' am, DES

Penguji 2 : Dr. dr. Nurdiana, MKes

Penguji 3 : Prof. Dr. Ir. YS. Darmanto, MSc

Penguji Tamu : Dr. Ir. Fonny. J.L Risamasu, MSi

Tahapan Ujian

1. Ujian Kualifikasi : 01 Juni 2012
2. Sidang Komisi Proposal Disertasi : 06 Agustus 2012
3. Ujian Proposal Disertasi : 14 Januari 2013
4. Sidang Komisi Hasil Disertasi : 02 April 2015
5. Seminar Hasil Disertasi : 25 Mei 2015
6. Evaluasi Kelayakan Disertasi : 6 Juli 2015
7. Ujian Akhir Disertasi Disertasi : 10 Agustus 2015



BAB I PENDAHULUAN

1.1. Latar belakang

Cakalang (*Katsuwonus pelamis*) merupakan produk konsumsi perikanan komersial penting dari famili Scombridae, mengalami tren peningkatan volume ekspor sebesar 63,35% (95,481—58,453 ton/tahun) dan nilai produksi 74,16% (131,414-228,870 US \$ 1.000). Ikan ini menduduki peringkat ke 3 setelah ikan tuna sirip kuning (*yellow fin tunas*) dan ikan tuna bermata besar (*bigeye tunas*), sebaliknya menduduki peringkat 1 berdasarkan volume dan nilai produksi untuk ekspor beku. Pada rantai niaga dipasarkan dalam bentuk segar/dingin (*fresh/chilled*) dan beku (*frozen*) (Kementerian Kelautan dan Perikanan, 2012).

Survei awal pemetaan infeksi cacing parasit yang dilakukan pada bulan Mei 2012 terhadap 15 ikan konsumsi hasil tangkapan nelayan dari perairan Nusa Tenggara Timur (NTT), menemukan bahwa cakalang adalah ikan dengan intensitas dan prevalensi tertinggi oleh infeksi nematoda dan cestoda. Nematoda adalah parasit yang paling umum dijumpai pada survei awal dan memiliki intensitas infeksi yang lebih tinggi dibandingkan cestoda. Karakter morfologi eksternal dari nematoda yang ditemukan serupa dengan nematoda dari genus *Anisakis*. Beberapa penelitian di Indonesia menjelaskan infeksi oleh nematoda adalah yang paling dominan terdeteksi menginfeksi produk perikanan laut umumnya dari famili Anisakidae. Berdasarkan identifikasi morfologi, nematoda yang ditemukan adalah *Anisakis spp* (Semarariana, Suratman dan Oka, 2012; Setyobudi, Suparmo dan Helmiati 2011; 2007; Irma, 2011; Saputra, 2011; Abdiani, 2010; Nurhayati, 2008; Hariyadi, 2006; Hutomo *et al.*, 1978), *Anisakis simplex* (Desrina, 2007) dan *Anisakis typica* berdasarkan identifikasi molekuler



(Anshary *et al.*, 2014; Palm, *et al.*, 2008). Beberapa jenis dari family Anisakidae dilaporkan dapat bertransmisi ke manusia (zoonoses) dan menyebabkan Anisakiasis atau Anisakidosis (Hamer and Hochberg, 2010; Nieuwenhuizen, Jeebhay and Lopata 2009, World Health Organization, 2008; 2004; 1995; Huss and Embarek, 2004). Sebagai produk pangan cakalang harus terbebas dari segala bentuk bahaya kimia, fisik dan biologi yang berpotensi menyebabkan penyakit atau mencederai manusia.

Potensi bahaya utama oleh tertelannya nematoda zoonoses ada dua; pertama, tanpa sengaja melalui konsumsi ikan mentah atau setengah matang dapat menyebabkan infeksi lambung dan usus (Audicana and Kennedy, 2008). Kedua, larva nematoda dalam keadaan matipun masih dapat menyebabkan reaksi alergi (Nieuwenhuizen and Lopata, 2013; Caballero *et al.*, 2011; Nieuwenhuizen *et al.*, 2009; Cheah and Lymbery, 2007; Moneo *et al.*, 2007).

Sejak 1960 sampai saat ini perkembangan penelitian infeksi saluran cerna oleh nematoda famili Anisakidae, genus *Anisakis* sudah banyak dilakukan tetapi difokuskan pada spesies *Anisakis simplex* yang dilaporkan sangat patogen.

Selain itu sekitar 12 alergen teridentifikasi dari *A. simplex* yaitu: Ani s 1 sampai Ani s 12 (Nieuwenhuizen *et al.*, 2009; Caballero *et al.*, 2011; Faeste *et al.*, 2014). Studi *in vitro* menemukan bahwa antigen tersebut memicu reaksi hipersensitifitas tipe I berkaitan dengan alergi. Sementara itu, *Anisakis spp* sendiri terdiri dari kurang lebih 9 spesies berbeda (D'Amelio *et al.*, 2010; Mattiuci and Nascetti, 2008; Marques *et al.*, 2006; Pontes *et al.*, 2005). Informasi dari 8 spesies lainnya sangat minim dan biasanya digeneralisasi berdasarkan studi patogenitas dari infeksi *A. simplex*.

Cakalang memiliki spektrum konsumsi yang cukup luas dari tingkat lokal, nasional sampai internasional dan biasanya dikonsumsi sebagai olahan yang telah dimasak. Pada beberapa negara dan wilayah Indonesia Bagian Tengah



dan Timur selain dimasak dan diasap, cakalang juga dikonsumsi dalam keadaan segar atau mentah. Restoran-restoran yang menyajikan makanan mentah juga menggunakan ikan cakalang sebagai salah satu sajian menu mentah. Biasanya untuk konsumsi mentah menggunakan cakalang segar atau cakalang beku yang ditawing. Permasalahannya, jika nematoda yang menginfeksi cakalang segar atau beku bersifat zoonoses maka ada bagian populasi masyarakat yang mengkonsumsi cakalang dalam keadaan mentah berisiko terhadap dampak yang ditimbulkan oleh transmisi nematoda tersebut. Setelah ditemukan kasus pertama alergi karena mengkonsumsi ikan mentah yang terinfeksi Anisakis di Sidoarjo pada 1996, sepengetahuan peneliti hingga saat ini belum ada laporan tentang patogenitas dari spesies Anisakis dan nematoda laut lainnya terutama dari spesies-spesies yang berdistribusi pada perairan Indonesia.

Terkait aspek epidemiology dan keamanan pangan maka kajian yang mendalam terhadap infeksi spesies nematoda pada cakalang yang tertangkap di perairan NTT penting dilakukan. Hal ini merupakan langkah awal penilaian risiko untuk mempelajari lebih dalam tentang penyakit bawaan makanan (*foodborne disease*). Sebab itu, proses ilmiah yang harus dilakukan adalah: melakukan identifikasi bahaya dan dilanjutkan dengan kajian paparan untuk mempelajari potensi bahaya kerusakan jaringan saluran cerna dan alergi melalui studi *in vitro* pada tikus wistar (*Rattus norvegicus*). Identifikasi ekspresi protein daging ikan yang terinfeksi dan tidak terinfeksi juga dilakukan untuk mempelajari adanya potensi lain akibat infeksi. Penelitian ini akan memberikan informasi tentang potensi bahaya yang mungkin terjadi apabila kita mengkonsumsi ikan yang terinfeksi.



1.2. Perumusan masalah

Berdasarkan uraian latar belakang maka dapat dirumuskan beberapa masalah sebagai berikut:

1. Jenis apakah nematoda anisakid yang menginfeksi cakalang?
2. Apakah nematoda anisakid hidup mampu menyebabkan kerusakan jaringan lambung tikus wistar yang diberikan secara per oral?
3. Apakah terjadi peningkatan jumlah total *Immunoglobulin E* (IgE) dan sel eosinofil pada tikus wistar yang dipaparkan dengan nematoda anisakid mati dalam keadaan segar dan beku?
4. Adakah perbedaan ekspresi protein dari daging ikan cakalang yang tidak terinfeksi dan terinfeksi nematoda anisakid?

1.3. Tujuan penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk:

1. Mengidentifikasi jenis nematoda anisakid yang menginfeksi cakalang.
2. Menentukan kemampuan larva nematoda anisakid hidup menyebabkan kerusakan jaringan lambung tikus wistar yang diberikan secara per oral.
3. Mengetahui jumlah total IgE dan sel eosinofil pada tikus wistar yang dipaparkan dengan larva nematoda anisakid mati dalam keadaan segar dan beku.
4. Mengidentifikasi ekspresi protein dari daging cakalang yang tidak terinfeksi dan terinfeksi nematoda anisakid.

1.4. Manfaat penelitian.

Manfaat yang diharapkan dari penelitian ini adalah:

1. Manfaat praktis, hasil penelitian ini memberikan informasi tentang potensi bahaya dari larva nematoda yang terdeteksi pada perairan NTT. Informasi ini dapat digunakan oleh otoritas berkompoten untuk melakukan



pembinaan dan pengawasan mutu hasil perikanan berkaitan dengan keamanan pangan.

2. Manfaat teoritis, hasil penelitian ini dapat menjadi masukan bagi pengembangan ilmu pengetahuan yang berkaitan dengan epidemiologi, keamanan pangan dan penanda biologi.

3. Manfaat bagi peneliti lainnya, hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai bahan referensi untuk riset terkait.



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Nematoda zoonoses

Cacing parasit menjadi masalah utama kesehatan global dengan lebih dari 2 miliar orang terinfeksi di seluruh dunia (Hotez *et al.*, 2007). Penyakit bawaan makanan oleh cacing parasit yang ditransmisikan melalui ikan dan produk perikanan merupakan masalah utama kesehatan dunia dan diseluruh dunia jumlah orang yang berisiko termasuk pada negara-negara berkembang, lebih dari setengah miliar (WHO, 2004; 1995). Lebih dari 1 miliar orang di seluruh dunia terinfeksi oleh satu atau lebih spesies cacing parasit nematoda gastrointestinal (GI) yang menyebabkan gangguan kesehatan ringan sampai mematikan (WHO, 2008). Selain hewan, manusia tanpa sengaja menjadi inang (*incidental/accidental host*) dari nematoda parasit yang tidak dapat melengkapi siklus hidupnya pada manusia tetapi dapat secara langsung menyebabkan penyakit yang melemahkan kesehatan atau memulai *immune hipersensitivity* (Moreno *et al.*, 2011; Garcia *et al.*, 2001).

Beberapa parasit sangat patogen, infeksi pada manusia oleh parasit karena mengkonsumsi ikan mentah atau setengah matang (WHO, 1995). Menurut sejarah, hanya dua besar spesies zoonoses yang diakui yaitu: *herring worm* (*A simplex*) dan *codworm* (*Pseudoterranova decipiens*) (= *Phocanema, Terranova*) keduanya berpotensi berdistribusi pada kisaran yang luas (Chai, Murrell, and Lymbery, 2005).

Saat ini penelitian alloenzym dan Polymerase Chain Reaction-Retraction Fragment Length Polymorphisms (PCR-RFLP) menunjukkan bahwa genus anisakis terdiri dari kurang lebih 9 spesies berbeda, Clade 1 ada 6 spesies



sesuai larva tipe 1 namanya: *A simplex sensu stricto*, *A pegreffii*, *A simplex C*, *A typica*, *A ziphidarum* dan *Anisakis* sp *A* adalah identik dengan *Anisakis* sp (D'Amelio *et al.*, 2010) dan Clade 2 termasuk larva tipe 2: *A physeteris*, *A brevispiculata* dan *A paggie* yang memiliki perbedaan struktur genetika, siklus hidup dan distribusi geografis (Marques *et al.*, 2006; Pontes *et al.*, 2005; Mattiuci *et al.*, 1998). Palm *et al.* (2008) menduga adanya satu taksa tambahan, terkait erat dengan *A typica* dalam sebuah studi pada larva *Anisakis* dari spesies ikan di perairan *nonmigratory* Bali dan Jawa di Indonesia.

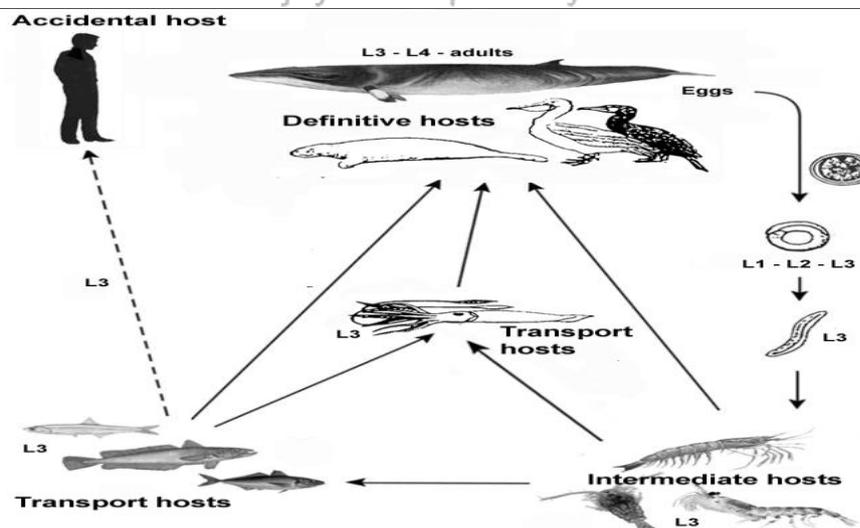
Studi molekuler genetika terbaru, telah menunjukkan bahwa morphospesies sebenarnya terdiri dari sejumlah spesies saudara, genetik dan sering dibedakan dengan perbedaan geografis dan atau rentang *host*. Lebih lanjut studi genetik niscaya akan menemukan lebih banyak spesies nematoda *Anisakid* dan *Pseudoterranova* memperpanjang rentang geografis spesies-spesies yang telah dijelaskan (Cheah and Lymbery, 2007).

2.2. Siklus hidup

Anisakis didefinisikan secara luas merupakan ascaradoids dengan ikan, reptile, burung yang memakan ikan dan mamalia sebagai inang definitif di perairan, transmisi tergantung pada air, biasanya melibatkan invertebrata air dan ikan lainnya sebagai inang perantara. Siklus hidup *A simplex* adalah kompleks. Cacing dewasa menetap di perut *host* mamalia laut, terutama ikan paus dan lumba-lumba. Telur dari cacing betina menetas dan dikeluarkan bersama tinja dalam bentuk embrio ke perairan laut. Setelah menetas dari telur, larva memasuki perairan laut. Selanjutnya dikonsumsi oleh invertebrata seperti: krustasea dari keluarga Euphausidae dan berkembang pada tahap ke tiga (Cheah and Lymbery, 2007).



Kajian ekologi menjelaskan mereka ditemukan dalam 3 host: cacing dewasa ditemukan dalam sistem pencernaan mamalia seperti lumba-lumba, singa laut dan paus. Cacing betina mengeluarkan telur-telurnya melalui feces dari mamalia laut dan embrionya ke laut. Pada tahap berikut larva dimakan oleh krustasea seperti krill dan cumi-cumi, ini adalah infeksi pertama dari *intermediate host* (Sakanari and McKerrow, 1989; D'Amelio *et al.*, 2010). Ketika krustasea yang dimakan oleh ikan atau cumi-cumi (*transport host*), larva dilepaskan dan bermigrasi keluar dari saluran pencernaan dan masuk ke misenterium, jeroan atau otot. Jika ikan atau cum-cumi yang terinfeksi ini kemudian dimakan oleh mamalia laut, larva dilepaskan dan menjadi menetap pada perut *host*, dimana mereka akan mengubur bagian anterior tubuh mereka ke dalam lambung (Howgate and dos Santos, 2011). Secara umum siklus hidup dari anisakid digambarkan pada gambar 2.1.



Gambar 2.1. Siklus hidup parasit Anisakid (European Food Safety Authority, 2010).

Setelah moulting, pematangan dan kopulasi cacing betina menghasilkan telur dalam jumlah banyak dalam *defenitif host*, kemudian embrio menetas dan berenang bebas didalam air sebagai larva tahap tiga (Koie, Berland and Burt,



1995). Ketika ikan terinfeksi karena memakan ikan lain, larva yang terenkapsulasi dicerna sehingga mengulangi siklus larva pada ikan sebagai *host*. Hal ini penting dari prespektif epidemiologi dan keamanan pangan sejak terjadi perpindahan larva antara ikan dalam rantai makanan mengakibatkan akumululasi yang ekstensif, khususnya pada ikan dengan ukuran besar dan tua, kadang-kadang jumlah enkapsulasi mencapai seratus atau seribu (Smith and Wotten, 1978).

2.3. Epidemik

Empat kelompok utama, parasit ikan dan produknya adalah protozoa, nematoda (cacing gilik), trematoda (cacing pita) dan cestoda (cacing pipih). Trematoda dan cestoda adalah parasit yang menginfeksi produk air tawar sedangkan nematoda pada air laut. Salah satu nematoda yang patogen dan menyebabkan penyakit di beberapa negara adalah dari keluarga Anisakidae jenis *Anisakis* spp yang dapat menyebabkan Anisakiasis (Howgate and dos Santos, 2011). Anisakid adalah parasit laut kosmopolitan sangat lazim dijumpai pada stok ikan yang bernilai komersial di perairan. Parasit ini diakui berbahaya bagi kesehatan manusia dan bertanggung jawab atas munculnya zoonoses yang disebut Anisakiasis, menyebabkan gangguan alergi dan lambung bagi konsumen (Abolo, Gestal and Pascual, 2001; Nieuwenhuizen *et al.*, 2009; Plessis, Lopata and Steinman 2004).

Anisakiasis adalah infeksi parasit pada saluran pencernaan manusia yang disebabkan karena mengkonsumsi produk laut mentah atau yang tidak dimasak sebentar dan perendaman ikan seperti *sushi* dan *sashimi* di Jepang, ikan herring asin dan asap di Belanda, *ceviche* (ikan mentah yang diberi jus lemon) di Amerika Latin, *lomi-lomi* (salmon mentah) di Hawaii, *kinilaw* (irisan, ikan yang diawet) di Philipina, *gravlax* (salmon diawet kering) di Scandinavia, *boquerones*



en vinagre (anchovies yang di buat acar atau asinan) di Spanyol (Sakanari and Mc Kerrow, 1989; Cheah and Lymbery, 2007).

Sejak tahun 1988, kelompok ahli standarisasi nomenklatur penyakit parasit pada binatang merekomendasikan untuk menggunakan tiga istilah yang berbeda: (1) Anisakidosis untuk penyakit yang disebabkan oleh anggota dari famili Anisakidae, (2) Anisakiasis penyakit yang disebabkan oleh genus anisakis dan (3) Pseudoterranovosis untuk penyakit yang disebabkan oleh anggota dari genus Pseudoterranova (Kassal *et al.*, 1988).

Nematoda anisakis dilaporkan menyebabkan ribuan kasus penyakit manusia setiap tahun di Jepang dan Amerika Serikat dari beberapa literatur yang di rangkum Murell. (2004) melaporkan total akumulasi 11.629 kasus lambung, 567 kasus usus dan 45 kasus dari ekstra pencernaan Anisakiasis serta 355 kasus Pseudo-terranoviasis lambung. Dilaporkan juga perkembangan pada tahun 1998 diseluruh dunia jumlah kasus dalam literatur adalah 33.747. Howgate and dos Santos. (2011) menjelaskan lebih dari 500 kasus Anisakiasis telah dilaporkan dari beberapa negara. Beberapa parasit sangat pathogen dan menyebabkan infeksi pada manusia karena mengkonsumsi produk mentah atau yang setengah matang (*undercook*). Meningkatnya konsumsi ikan mentah di beberapa negara seperti *sushi* dan *sashimi* merupakan salah satu faktor penyebabnya. Uga *et al.* (1996) melaporkan kasus hipersensitivitas Anisakiasis akibat infeksi larva nematode di Sidoarjo Jawa Timur, diduga akibat mengkonsumsi ikan mentah atau kurang masak (*sushi/sashimi*), ini merupakan kasus pertama di Indonesia.

2.4. Patogenesis

Infeksi lambung oleh larva anisakid untuk pertama kali dilaporkan oleh Van Thiel, Kuipers and Roskam. (1960). Setelah infeksi pada manusia, larva dapat dikeluarkan melalui muntah atau tinja atau dapat menembus dinding



gastrointestinal tract tempat mereka mati. Larva hidup walaupun telah mengalami ekstraksi beberapa jam dan hari setelah infeksi, ada indikasi bahwa mereka mungkin dapat hidup dan bertahan selama berminggu-minggu atau bahkan berbulan-bulan dalam tubuh manusia sebagai inang (Alonso, Daschner and Morena-Ancilo, 2007).

Penetrasi pada lambung dan mucosa usus sangat umum terjadi dari Anisakiasis. Anisakiasis lambung adalah lebih dari invasi usus. Infeksi anisakis berasosiasi dengan invasi ke lambung dan usus, sementara infeksi oleh *Pseudoterranova* biasanya hanya menyebabkan invasi ke lambung (Bouree, Paugam and Petithory, 1995). Gejala gastric akut muncul 1-12 jam setelah konsumsi ikan, dan termasuk sakit perut secara tiba-tiba, mual dan muntah.

Sering juga ditemukan darah yang tersembunyi dalam cairan lambung dan kotoran (tinja) (Sakanari and Mckerrow, 1989; Paino *et al.*, 2000) Intestinal Anisakiasis biasanya berupa penyakit akut, yang terjadi 5-7 hari setelah mengkonsumsi ikan. Gejala klinis mual, muntah, demam dengan perdarahan tersembunyi dan beberapa nyeri perut bagian bawah, sama dengan akut *abdominal syndromes* seperti *intestinal obstruction*, *appendicitis* atau *peritonitis* (Bouree *et al.*, 1995).

Anisakidosis pada saluran pencernaan dari sudut pandang klinis diklasifikasikan kedalam kondisi akut dan sedang. Berdasarkan lokalisasi, penyakit ini dibagi dalam Anisakidosis atau Anisakiasis lambung dan Anisakidosis atau Anisakiasis usus (D'Amelio *et al.*, 2010; Ishida *et al.*, 2007).

Keadaan akut lasimnya Anisakidosis lambung yang ditandai dengan mual, muntah dan nyeri epigastrium. Gejala ini muncul 4-6 jam (D'Amelio *et al.*, 2010), 1-7 jam (Oshima, 1987) setelah menelan ikan yang terinfeksi. Dalam Anisakidosis usus, tanda-tanda akan muncul sekitar 7 hari setelah infeksi dengan

nyeri perut, mual, muntah, demam, diare, tinja mengandung darah, leukositosis dan bentuk moderat dari eosinophilia jarang terjadi (D'Amelio *et al.*, 2010).

Anisakidosis lambung yang dicirikan dengan hilangnya nafsu makan, epigastralgia dan terjadinya pseudotumor lambung, evolusi anisakidosis usus moderat lebih berbahaya. Beberapa lokalisasi extragastrointestinal yang aneh telah didokumentasikan (rongga perut, polip, omentum). Berdasarkan gambar histologis, Anisakidosis diklasifikasikan menjadi empat tahapan: pertama, phlegmon adalah kekhasan dari Anisakidosis usus dibandingkan Anisakidosis lambung. Kedua, abses adalah kekhasan dari lambung lebih sering ditandai oleh jaringan nekrotik berlimpah disekitar larva dan populasi eosinofil yang tinggi. Ketiga, granuloma abscess sesuai dengan evolusi penyakit flogistic, setidaknya 6 bulan setelah menelan larva. Pada saat muncul larva diserang oleh eosinofil, dikelilingi oleh giant cells dan inflamasi parvicellular berlimpah. Keempat, granuloma jarang diamati ditandai oleh penurunan eosinofil dengan kelimpahan limfosit, giant cells dan collagenization yang signifikan (D'Amelio *et al.*, 2010).

Ringkasan kronologi physiopathology infeksi *A simplex* pada manusia disajikan pada tabel 2.1

Tabel 2.1. Ringkasan kronologi physiopathology infeksi *A simplex* pada manusia

Waktu setelah konsumsi	Peristiwa infeksi	Respon imun	Proses pada jaringan
< 1 jam	Adhesi mukosa	Enzim proteolitik	Lesi hemorrhagic, cacing melubangi jaringan
4 jam – 6 hari	Penetrasi pada mukosa dan mukosa sub	Faktor chemotatic	Eosinophilic phlegmon, lesi erosive
7 – 14 hari	Pembentukan granuloma	Induksi respon hipersensitivity	Lesi ulcerous
>14 hari	Larva mati	Inflamation (radang) persisten atau granuloma	Hilangnya parasit, ulceration kronik yang menetap

Sumber: Audicana and Kennedy. (2008).





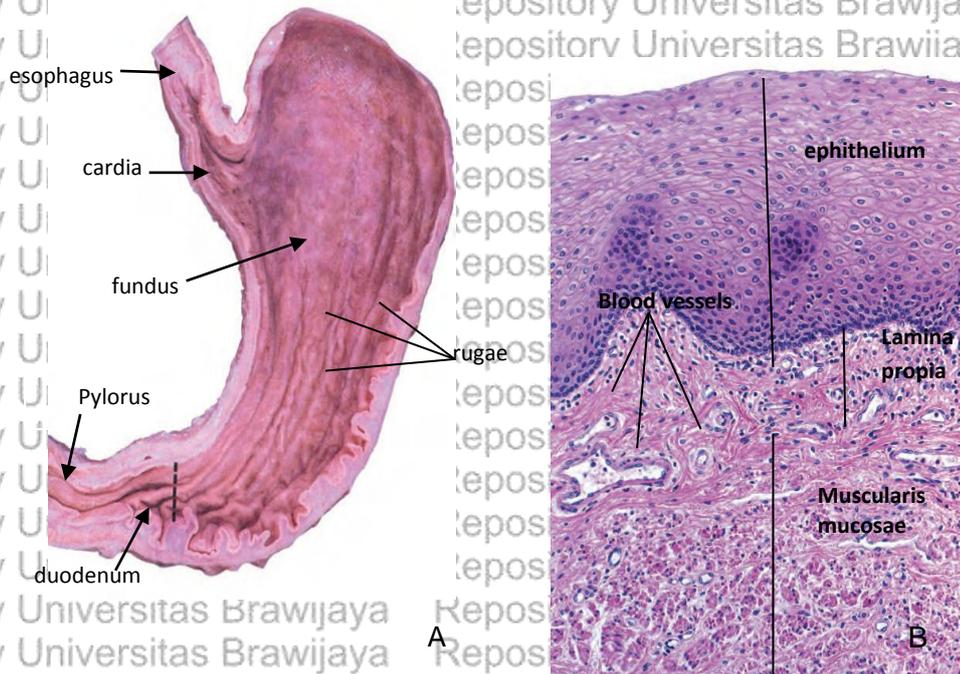
Audicana dan Kennedy. (2008) menjelaskan kebanyakan cacing menyebabkan penyakit infeksi kronik lebih dari infeksi akut, bahkan dalam kasus-kasus infeksi parasit tingkat tinggi, cacing parasit dapat mengembangkan mekanisme untuk mengatasi dan menghindari respons imun *host* untuk mengamankan kelangsungan hidup mereka. Anisakidosis manusia adalah khas karena parasit tidak dapat beradaptasi untuk hidup pada manusia dan infeksi hanya sementara.

2.5. Bagian lambung dan infeksi lapisan lambung

Larva anisakid tidak dapat melengkapi hidupnya pada manusia tapi dapat melakukan penetrasi pada saluran pencernaan dan menyerang beberapa organ terkait, menyebabkan efek patologis. Larva dapat tetap berada dalam saluran pencernaan tanpa penetrasi jaringan dan menyebabkan infeksi *asumtomatic*.

Pada Anisakiasis invasiv, larva menembus mucosa lambung atau usus atau bagian lainnya seperti tenggorokan (Chai *et al.*, 2005). Penyakit anisakiasis dapat diklasifikasi berdasarkan infeksi pada organ atas Anisakiasis lambung dan Anisakiasis usus. Anisakiasis lambung biasanya terjadi beberapa jam setelah mengkonsumsi ikan mentah (Ishida *et al.*, 2007).

Lambung terdiri atas empat wilayah yaitu: esofagus, kardia, fundus dan pilorus (gambar 2.2, A). Gambaran histologi: kardia terletak dekat lubang esofagus yang berisi kelenjar jantung, pilorus daerah sempit antara lambung dan duodenum yang berisi kelenjar piloric dan fundus, bagian terbesar dari lambung terletak antara kardia dan pilorus berisi kelenjar fundic. Permukaan lambung memiliki struktur umum yang sama secara keseluruhan, terdiri atas: mukosa, submukosa, muskularis eksterna dan serosa. Pada permukaan lambung terdapat sejumlah lipatan yang disebut rugae (Ross and Paulina, 2011).

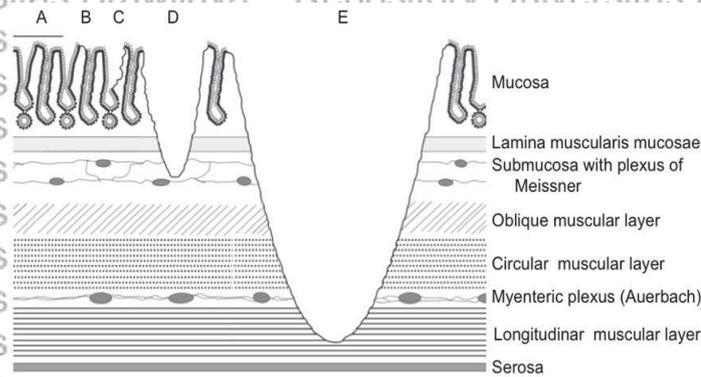


Gambar 2.2. (A): Bagian lambung dan (B): Bagian mukosa lambung pada manusia (Ross and Paulina, 2011).

Mukosa atau bagian dalam dari saluran GI (gambar 2.2, B) adalah selaput lendir yang terdiri atas (1). lapisan epithelium yang berkontak langsung dengan isi saluran GI, (2). Lapisan jaringan pengikat yang disebut lamina propria, dengan banyak pembuluh darah dan pembuluh limfe dan serat otot polos, kadang-kadang mengandung kelenjar dan jaringan limfoid dan (3). lapisan otot polos atau muskularis mucosa, umumnya terdiri atas lapisan sirkulasi dalam yang tipis dan lapisan longitudinal luar serat otot polos (Tortora and Derrickson, 2009; Junqueira, Carneiro dan Kalley, 1997).

Barthel *et al.* (2003) menjelaskan derajat kerusakan lambung terdiri atas 4 lesi histopatologik yaitu: kerusakan epitel, hyperemia/hemoragi, inflamasi dan jumlah mucous cap sel. Kerusakan epitel dapat berupa pengelupasan epitel, erosi dan ulserasi. Erosi lambung didefinisikan sebagai cacat dangkal atau pengelupasan di lapisan mukosa tidak sampai menembus lapisan muskularis

mukosa, ini digambarkan oleh Toljamo. (2012) pada gambar 2.3. Erosi pada lapisan epitel terdiri dari: *superficial erosion* dan *deep erosion* Sedangkan erosi pada lapisan lamina propia adalah *acute ulcer*. Jika erosi terjadi pada lapisan muskularis mukosa disebut *chronic ulcer*.



Gambar 2.3. A. Struktur normal; B. *Superficial erosion*; C. *deep erosion*; D. *Acute ulcer*; E. *Chronic ulcer* (Toljamo, 2012).

Hiperemia adalah ekkses darah pada bagian tubuh tertentu atau terjadinya pendarahan ditandai dengan pembengkakan (hemoragi) (Dorland, 2001).

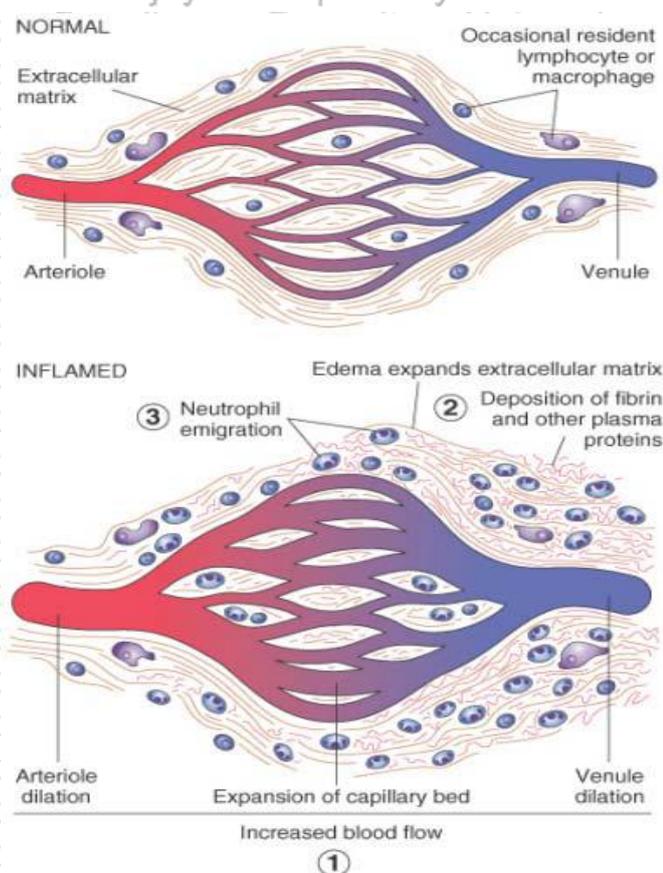
Inflamasi atau peradangan merupakan respons jaringan yang bersifat protektif terhadap cedera atau pengrusakan jaringan, yang berfungsi menghancurkan atau mengencerkan atau mengurung agen yang menyebabkan cedera maupun jaringan yang cedera. Peradangan diklasifikasikan berdasarkan durasi lesi dan gambaran histologi yaitu inflamasi akut dan kronis. Inflamasi akut adalah radang yang terjadi dalam waktu yang relatif singkat dari beberapa menit, beberapa jam sampai beberapa hari, tandanya: nyeri, panas, kemerahan dan bengkak.

Sedangkan inflamasi kronik radang yang berlangsung lama terutama ditandai oleh pembentukan jaringan ikan baru (Dorland, 2012; Bazebah *et al.*, 2004).

Polymorphonuclear (PMN) atau sel darah putih adalah garis pertama pertahanan kekebalan tubuh terhadap penyakit. Mereka merupakan sel yang

bertanggung jawab untuk kerusakan jaringan inflamasi yang terjadi selama infeksi akut (Kumar, Abbas and Aster, 2013).

Mucous cap sel adalah lapisan selaput lendir yang berisi kelenjar menutupi permukaan lambung, permukaannya halus, lembut seperti beludru. Ini terdiri dari epitel, lamina propria, dan muskularis mukosa (Dorland, 2012). Proses peradangan disajikan pada gambar 2.4.



Gambar 2.4. Reaksi peradangan. Manifestasi lokal utama peradangan akut, dibandingkan dengan normal (Kumar et al., 2013).

Gambar 5.4 menjelaskan, reaksi inflamasi akut dengan cepat menggerakkan leukosit dan protein plasma ke lokasi cedera untuk menghilangkan agen penyebab infeksi. Peradangan akut memiliki dua komponen utama yaitu: perubahan vaskular dan seluler. Perubahan dalam pembuluh darah menyebabkan peningkatan aliran darah (vasodilatasi) dan perubahan dinding



pembuluh darah yang memungkinkan protein plasma meninggalkan sikulasi. Hal ini karena terjadi peningkatan permeabilitas pembuluh darah. Di sisi lain, terjadi adhesi dan migrasi leukosit melalui dinding pembuluh darah akibat aktifnya sel endotel. Peristiwa seluler ini bertujuan untuk menghilangkan agen penyebab peradangan (Kumar *et al.*, 2013).

2.6. Alergi

Rincian perkembangan penelitian alergen anisakis dapat dilihat pada tabel

2.2.

Tabel 2.2. Anisakis Alergen

Alergen	Berat molekul	Deskripsi	Lokasi	Pustaka
Ani s 1	24 kDa	Kunitz type serin	Excretory gland	Moneo <i>et al.</i> (2000)
	21 kDa isoform	Seperti Protease inhibitor Heatstable	Secreted (ES product)	Caballero <i>et al.</i> (2008)
Ani s 2	100 kDa	Paramyosin	Otot	Shimakura <i>et al.</i> (2004)
Ani s 3	41 kDa	Tropomyosin	Otot	Perez-Perez <i>et al.</i> (2000)
Ani s 4	9 kDa	Nematoda Cystatin	Excretory gland	Asturias <i>et al.</i> (2000)
		Cystein protease inhibitor Heat stable	Dibawah jaringan cuticle L3 ES Product	Moneo <i>et al.</i> (2005)
Ani s 5	15 kDa	Homologous with nematoda Protein in the SXP/RAL-2 family Heat resistant	Excretory gland Ventriculus dan luminal Intestinal epithelium ES Protein	Caballero <i>et al.</i> (2008)
Ani s 6	7 Kda	Serine protein inhibitor	ES Product	Caballero and Moneo. (2004)
Ani s 7	139 kDa	Glycoprotein	ES Product	Kobayashi <i>et al.</i> (2007)
Ani s 8	15 kDa	Heat stable SPX/RAL protein Homologous with protein in the SXP/RAL-2 family, including Ani s 5	ES Product	Anadon <i>et al.</i> (2009)
Ani s 9	21 kDa	Homology to nematoda troposin	ES Product and crude extract	Rodrigues <i>et al.</i> (2000)

Sumber: Nieuwenhuizen *et al.* (2009)



Kajian-kajian tentang alergen dari nematoda laut yang berhasil dirangkum dari tahun 2000 sampai tahun 2008 (table 2.2) adalah sekitar 9 alergen dan semuanya adalah alergen dari *A simplex* (Nieuwenhuizen *et al.*, 2009). Penelitian selanjutnya, Caballero *et al.* (2011) berhasil mengidentifikasi Ani s 10 dengan berat molekul protein 22 kDa, Ani s 11 dan Ani s 12 diidentifikasi oleh Faeste *et al.* (2014).

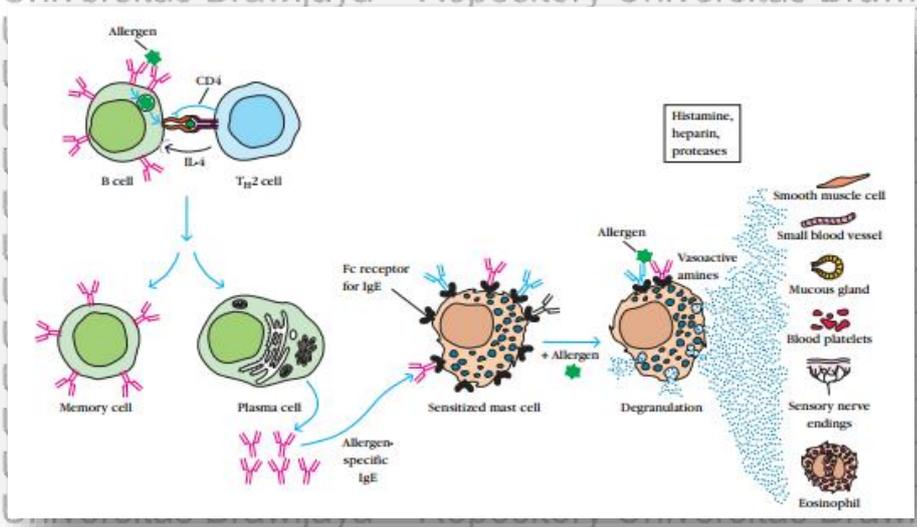
Menurut Audicana *et al.* (2002), beberapa kasus alergi dilaporkan dari Spanyol menyebabkan meningkatnya IgE sebagai respons terhadap antigen *A simplex* (sensu lato); kekuatan dari reaksi alergi spesies Anisakid lainnya belum diketahui. Gejala alergi mulai dari urtikaria ringan sampai syok anaphylactic disebabkan oleh adanya antibodi IgE yang merupakan komponen penting dari respon kekebalan terhadap parasit (Del Pozo *et al.*, 1999). Produksi IgE cenderung meningkat selama infeksi parasit, tetapi efek utama IgE bervariasi tergantung pada hubungan antara parasit dan *host* (Yazdanbakhsh, Kremsner and Van Ree, 2002).

Peningkatan jumlah absolut eosinofil dalam darah (eosinofilia) berhubungan dengan reaksi alergi dan infeksi cacing (parasit). Dalam jaringan, eosinofil ditemukan dalam jaringan ikat dibawah epitel kulit, bronkus, saluran cerna, uterus, vagina dan mengelilingi cacing parasit. Selain itu, sel-sel menghasilkan zat-zat yang mengatur peradangan melalui inaktivasi leukotrin dan histamin yang dihasilkan oleh sel-sel yang lain (Junqueira *et al.*, 1997). Eosinofil memiliki inti biru-merah yang menyerupai gagang telepon kuno (Gambar 4.3), jumlahnya meningkat pesat selama alergi dan infeksi oleh cacing parasit karena mengkonsumsi makanan (seperti ikan mentah) atau masuk melalui kulit (Marieb, 2007).

2.7. Reaksi kekebalan terhadap cacing parasit

Berbagai patogen seperti virus, jamur atau parasit mengandung berbagai bahan yang disebut imunogen atau antigen dan dapat menginduksi sejumlah respons imun. Antibodi adalah bahan glikoprotein yang diproduksi oleh sel B sebagai respons terhadap rangsangan imunogen, dikenal sebagai sel plasma. Dalam praktek antigen sering digunakan sebagai imunogen (Bratawijaya dan Rengganis, 2009). Selain sel B, sel T juga berperan dalam reaksi kekebalan (Roitt, Brostoff and Male, 2001).

Parasit ekstraseluler adalah kelompok yang beragam dan sangat patogen, meliputi: nematoda (cacing bulat), platyhelminthes (cacing pipih) dan beberapa protozoa ekstraseluler. Parasit helminths menginduksi respons TH2 yang sangat terpolarisasi dan berkontribusi terhadap sel mast, eosinofil, giant sel, IgE/IgA, dan tanggapan mukosa biasanya terkait dengan infeksi (Sacks *et al.*, 2003). Proses yang melibatkan parasit dalam reaksi alergi pada gambar 2.5.



Gambar 2.5. Mekanisme umum reaksi hipersensitivity (Owen, Punt and Stanford, 2013)





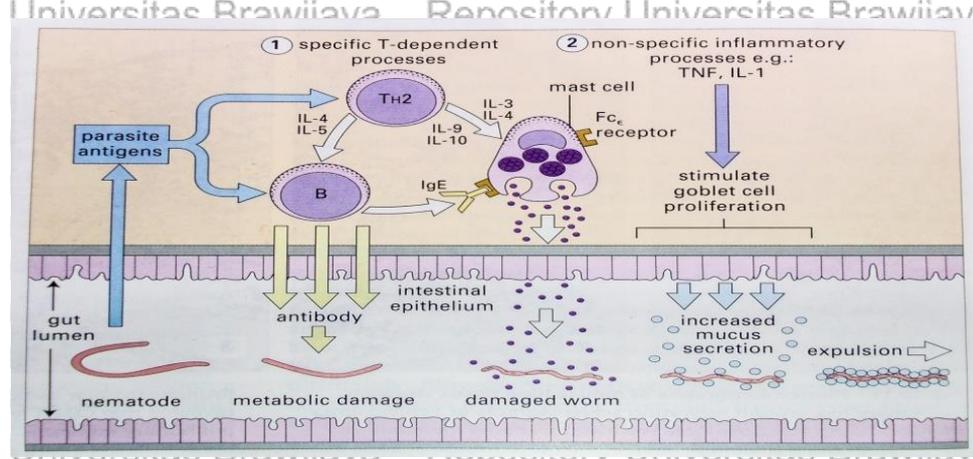
Reaksi hipersensitivitas merupakan bentuk dari respon imun terhadap patogen yang potensial menyebabkan infeksi. Reaksi hipersensitivitas diklasifikasikan menjadi empat jenis: Tipe I (kekebalan reaktan IgE), Tipe II (kekebalan reaktan IgG), Tipe III (imun reaktan IgG) dan Tipe IV (imuno reaktan sel TH1, sel TH2 dan CTL). Alergi, adalah jenis yang paling umum dari reaksi Tipe I, yang merupakan reaksi hipersensitiviti yang langsung dimediasi oleh IgE, yang mengindukski aktivasi sel mast (Murphy, Travers and Walport, 2008). Reaksi Tipe I yang disebut juga reaksi cepat atau reaksi anafilaksis atau reaksi alergi, timbul segera sesudah tubuh terpajan dengn alergen. Pada reaksi tipe I, alergen yang masuk ke dalam tubuh menimbulkan respons imun berupa produksi IgE dan penyakit alergi seperti rinitis alergi, asma dan dermatitis atopi. Gejala: anafilaksis, utikaria, angioderma, mengi, hipotensi, nausea, muntah, sakit abdomen, diare (Bratawijaya dan Rengganis, 2009).

Reaksi alergi disebabkan oleh degranulasi sel mast diikuti dengan peradangan berlanjut, yang dikenal sebagai respons fase akhir. Respon akhir melibatkan perekrutan beberapa efektor lainnya terutama limfosit, TH2, eosinofil dan basofil yang memberikan kontribusi yang signifikan terhadap imunopatologi dari reaksi alergi. Reaksi alergi dipicu alergen terikat silang pada IgE yang terikat pada reseptor FcεRI pada sel mast. Sel mast melapisi permukaan tubuh dan berfungsi untuk meningkatkan sistem kekebalan tubuh terhadap reaksi lokal (Murphy *et al.*, 2008).

Paparan alergen mengaktifkan sel TH2 yang merangsang sel B dari sel plasma mensekresikan IgE. Molekul IgE disekresikan molekul reseptor spesifik Fc (FcεRI) mengikat IgE pada sel mast dan basofil darah (IgE memiliki kekhususan dalam mengikat FcεRI). Kedua paparan terhadap alergen menyebabkan reaksi silang dari IgE terikat, memicu pelepasan mediator

farakologi aktif (vasoaktif amina) dari sel mast dan basofil. Mediator menyebabkan peningkatan konsentrasi otot, permeabilitas pembuluh darah dan vasolidation (Kindt, Goldsby and Osborne, 2007).

Tampaknya ada dua tahapan pengusiran nematoda, yang merupakan kombinasi antara mekanise T-dependent dan T-independent. Pertama, sel T (dominan sel TH2) merespon antigen parasit dan menginduksi: (a) produksi antibodi oleh sel-sel dalam menanggapi IL-4 dan IL-5. (b) proliferasi mukosa sel mast, menanggapi IL-3, IL-4, IL-9 dan IL-10. (c) Hyperlasia dari sel goblet mensekresikan lendir dalam epitel usus. Cacing yang berbahaya oleh antibodi dengan IgE sebagai produk sel mast berkontak dengan antigen, sehingga melepaskan histamin dan meningkatkan permeabilitas epitel usus. Proses ini tidak cukup untuk menghilangkan cacing. Kedua, Inflamasi molekul non spesifik yang dikeluarkan oleh makrofag termasuk IL-1 dan TNF berkontribusi terhadap proliferasi sel goblet menyebabkan peningkatan sel lendir. Lendir yang dihasilkan akan mengusir cacing. Jumlah sel goblet dalam jejunum epitel dan peningkatan skresi lendir sebanding dengan jumlah cacing (Roitt *et al.*, 2001). Prosesnya dijelaskan pada gambar 2.6.



Gambar 2.6. Tahapan pengeluaran nematoda dari usus (Roitt *et al.*, 2001)





Peran biologis IgE dalam sistem pertahanan tubuh terutama sebagai respons terhadap cacing parasit yang lasim terjadi di negara-negara berkembang. Di negara-negara industri respons alergi IgE terhadap antigen berbahaya sangat dominan dan merupakan penyebab penyakit penting (Murphy *et al.*, 2008). Mayoritas manusia mengalami peningkatan IgE sebagai pertahanan terhadap infeksi parasit. Setelah seseorang terekspos parasit, serum IgE mengalami peningkatan dan tetap tinggi sampai parasit berhasil dibersihkan dari tubuh (Kindt *et al.*, 2007). Infeksi cacing yang khas terkait dengan peningkatan jumlah eosinofil dan IgE, dimana sel TH1 dan TH2 berperan dalam sistem kekebalan (Roitt *et al.*, 2001). IgE penting dalam respon imun terhadap infeksi parasit, sering ditemukan dalam jumlah yang tinggi pada pasien yang terinfeksi khususnya cacing (Clark, 1991).

2.8. Hewan eksperimen

Analisis variabel dan aplikasi imunologi pada manusia dipelajari menggunakan beberapa hewan percobaan yang berbeda. Beberapa model sintesis menggunakan hewan percobaan seperti kelinci, *mice* (tikus, kisaran berat 20 g) dan *rat* (tikus, kisaran berat 200 g) telah menghasilkan sejumlah besar informasi yang berkaitan dengan reaksi kekebalan manusia terhadap larva stadia 3 (L3). Saat ini reaksi kekebalan pada tikus terhadap larva Anisakid umumnya dianggap serupa dengan manusia, khususnya berkaitan dengan perkembangan alergi (Cho and Lee, 2006).

Deteksi IgE menggunakan tikus menunjukkan bahwa tikus merupakan model yang dapat diterapkan untuk alergi L3 pada manusia (Daschner *et al.*, 1999). Tikus dengan berat kira-kira 200 gram, telah terbukti digunakan secara luas untuk mempelajari reaksi kekebalan terhadap anisakiasis. Tikus dengan ukuran demikian memungkinkan pengambilan darah mingguan. Selain itu peningkatan

IgE dapat dievaluasi melalui berbagai metode. Secara biologis efek IgE pada penelitian dengan menggunakan tikus telah dijelaskan cukup baik (Cho and Lee, 2006). Amano *et al.* (1995) melaporkan bahwa mayoritas L3 yang diinfeksi secara oral pada tikus hilang dari tubuh setelah satu hari. Cho *et al.* (2005) melaporkan bahwa tidak ditemukan L3 pada saluran pencernaan tikus setelah satu minggu diinfeksi secara oral.

Perkembangan penelitian untuk infeksi dan alergi oleh nematoda menggunakan hewan uji dalam beberapa tahun terakhir yang berhasil dihipunkan dapat dilihat pada tabel 2.3.

Tabel 2.3. Beberapa studi infeksi dan alergi oleh nematoda menggunakan Hewan uji tikus

Hewan uji	Nematoda	Variabel/Parameter	Pustaka
Mice	<i>A simplex</i> dan nematoda lainnya	Antigen dan antibodi	Iglesia <i>et al.</i> (1993)
Mice	<i>A simplex</i>	Stage spesifik antigen dan antibodi	Iglesia <i>et al.</i> (1995)
Ratts	<i>A simplex</i>	Antibodi spesifik	Amano <i>et al.</i> (1995)
Ratts	<i>A simplex</i>	IgE, IgG, Spesifik IgE	Baeza <i>et al.</i> (2005)
Ratts	<i>A simplex</i>	Spesifik IgE	Cho <i>et al.</i> (2005)
Mice	<i>Anisakis sp.</i>	IgE dan limfosit	Diab <i>et al.</i> (2011)
Ratts	<i>A simplex</i>	IgE, IgM, Spesifik IgE	Abe and Teramoto. (2014)

Penelitian pada hewan eksperimen pada tikus kebanyakan difokuskan pada uji serologi untuk mempelajari respons alergi oleh infeksi L3 *A simplex*. Sedangkan penelitian infeksi jaringan dengan hewan uji diawali oleh Romero *et al.* (2013) menggunakan *A simplex* dan *A peregrinii*, kemudian oleh Zuloaga *et al.* (2013) menggunakan *Anisakis spp.*





2.9. Cakalang dan infeksi anisakid

Cakalang, Scrombidae (tuna) ikan berukuran sedang satu-satunya spesies dari genus *Katsuwonus*. Ukuran tubuhnya dapat mencapai 1 m dengan berat lebih dari 18 kg, meskipun rata-rata ukuran ikan yang biasanya tertangkap sekitar 50 cm. Ikan ini dikenal dengan beberapa nama berbeda seperti: *cakalang*, *cakang*, *kausa*, *kambojo*, *karamojo*, *turingan* dan tongkol. Secara internasional dikenal sebagai *Skipjack tuna* (Food and Agriculture Organization, 1983).

Klasifikasi ikan cakalang menurut FAO. (1983) sebagai berikut:

Phylum : Vertebrata

Class : Teleostei

Ordo : Perciformes

Famili : Scombridae

Genus : *Katsuwonus*

Spesies : *Katsuwonus pelamis*

Ikan cakalang memiliki bentuk tubuh fusiform, memanjang dan agak bulat, 53-63 tapis insang (*gill rakers*) pada helai pertama, serta dua sirip punggung yang terpisah (FAO, 1983). Sirip punggung pertama terdapat 14-16 jari-jari keras dan jari-jari lemah pada sirip punggung kedua diikuti oleh 7-9 finlet. Sirip dada pendek dengan 26-27 jari-jari lunak, ada dua flops diantara sirip perut, sirip anal dengan 7-8 finlet. Badan tidak bersisik, gurat sisi memiliki titik-titik kecil kecuali pada barut badan (*corselets*), punggung berwarna biru kehitaman (gelap) dengan warna keperakan dibawah perut dan terdapat 4-6 buah garis-garis kehitaman yang memanjang pada sisi tubuh. Bentuk umum ikan cakalang dapat dilihat pada gambar 2.7.



Gambar 2.7. Bentuk umum serta bagian-bagian tubuh kan Cakalang (*Katsuwonus pelamis*) (Sumber: <http://www.fishbase.org>).

Cakalang termasuk perenang cepat di laut zona pelagik dan mempunyai sifat makan yang rakus. Makanan mereka berupa krustase, chepalopoda dan moluska. Ikan jenis ini sering bergerombol yang hampir bersamaan melakukan ruaya disekitar pulau maupun jarak jauh dan senang melawan arus, ikan ini sering bergerombol dalam kawanan besar di perairan pelagis hingga kedalaman 200 m, mencari makan berdasarkan penglihatan dah rakus terhadap mangsanya (FAO, 1983).

Kajian literatur menjelaskan bahwa parasit nematoda khususnya *Anisakis* sp dan *Pseudoteranova* sp menjadikan cakalang sebagai *intermediate host*. Anshary *et al.* (2014) melakukan investigasi infeksi *Anisakis* terhadap 18 spesies ikan, antara lain *A thazard* dan *K pelamis*. Identifikasi dilakukan menggunakan ITS 1-5.8S-ITS 2 dan region mt DNA cox 2. Hasil sekuensing DNA dari namatoda yang dikoleksi menunjukkan similaritas antara 94% sampai 99% dengan *A typica* AB517571/DQ116427. Herrero *et al.* (2011) melakukan deteksi nematoda *Anisakid* pada ikan dan produk perikanan menggunakan metode RT-PCR dan ditemukan *P decipiens* mengkontaminasi *K pelamis* yang dikalengkan.

Sampel untuk identifikasi diperoleh dari beberapa pasar ikan dan toko di Spanyol. Espinera *et al.* (2010) melakukan identifikasi morfologi dan molekuler,

mendapatkan *K. pelamis* yang diperoleh dari pasar ikan di Spanyol terkontaminasi *P. decipiens*. Rinciannya selengkapnya disajikan pada tabel 2.4.

Tabel 2.4. Penelitian infeksi nematoda anisakid pada cakalang

Nematoda	Host	Lokasi sampling	Metode deteksi	Pustaka
<i>A. typica</i>	<i>K. pelamis</i>	Selat Makassar	Molekuler	Anshary <i>et al.</i> (2014)
<i>P. decipiens</i>	<i>K. pelamis</i> (dikaleng-kan)	Toko dan pasar ikan di Spanyol	RT-PCR	Herero, Vieites and Espenera (2011)
<i>Anisakis</i> sp	<i>K. pelamis</i>	Tempat Pelelangan Ikan: Beba-Takalar, Rajawali dan Paotere-Makassar	Morfologi dan molekuler (ITS1, 5.8 dan ITS 2)	Irma. (2011)
<i>P. decipiens</i>	<i>K. pelamis</i>	Toko dan Pasar ikan di Spanyol	Morfologi dan molekuler	Espineria, <i>et al.</i> (2010)

Irma. (2011), melakukan deteksi morfologi dan molekuler (ITS 1, 5.58 dan ITS 2) terhadap *K. pelamis* dan menemukan infeksi yang disebabkan oleh *Anisakis* sp. Pengambilan sampel ikan diperoleh dari beberapa Tempat Pelelangan Ikan di Beba-Takalar, Rajawali dan Paotere- Makassar. Larva Anisakid berhasil diisolasi dari jeroan ikan (hati, lambung dan usus) dan pada bagian otot perut. Pada rongga abdomen larva menempel pada peritonium dan tidak ditemukan adanya larva Anisakis pada otot atau *fillet*. Prevalensi tertinggi diperoleh dari *K. pelamis* yang berukuran besar ≥ 30 cm.

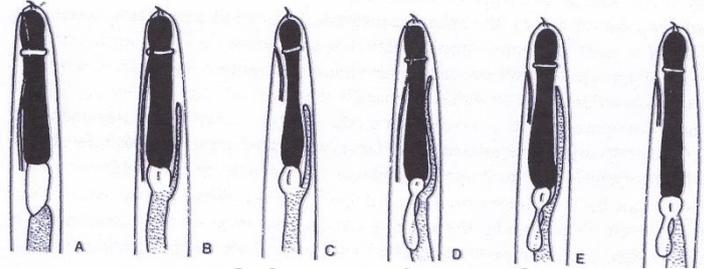
2.10. Identifikasi larva Anisakid

Klasifikasi dari Anisakid umumnya didasarkan pada analisis morfologi secara sistematis pada ciri-ciri penting. Batasan diagnosis spesifik dari nematoda berdasarkan identifikasi morfologi tergantung dari dua faktor utama. Pertama, bentuk karakter larva nematoda biasanya secara morfologi kurang dapat digunakan untuk tujuan taxonomi. Identifikasi morfologi biasanya didasarkan





pada bentuk saluran cerna seperti yang ditunjukkan oleh Grabda. (1991) pada gambar 2.8.



Gambar 2.8. Bentuk saluran cerna larva stadia 3 Anisakidae. Keterangan: A. Anisakis. B. Phocanema. C. Porrocaecum. D. Contraecum. E. Thynnascaris. F. Raphidascaris. Area hitam: oesophagus, area putih: ventriculus, area berbintik: intestine.

Kedua, beberapa larva seperti nematoda dari genus Anisakis hanya dapat diidentifikasi pada tingkat genus tetapi tidak dapat diidentifikasi pada level spesies. Faktor inilah yang menyebabkan mutlak untuk menggunakan metode genetik dan molekuler untuk mengidentifikasi larva nematoda pada tingkat spesies. Deteksi molekuler menggunakan pendekatan PCR dalam beberapa kasus lebih baik, mengingat pendekatan ini telah menunjukkan kepekaan dalam mendeteksi variasi genetik. Metode ini hanya membutuhkan sejumlah kecil sampel segar untuk analisis. (D'Amelio *et al.*, 2010).

Penggunaan PCR telah berkembang secara cepat seiring dengan perkembangan biologi molekuler. PCR digunakan untuk identifikasi penyakit genetik, infeksi virus, diagnosis dini penyakit seperti AIDS, *genetic proilling in forensic, legal and bio-diversity applications*, biologi evolusii, *site-directed mutagenesis of genes* dan *mRNA quantivication* di sel ataupun jaringan (Fatchiyah *et al.*, 2009). Metode PCR merupakan teknik amplifikasi DNA untuk



memperpanjang rantai DNA. Dalam pelaksanaannya diperlukan oligonukleotida (primer) yang spesifik sesuai dengan tujuan amplikasi (Aulanni'am, 2004).

Prinsip kerja PCR melibatkan beberapa tahap berulang yaitu: pra peleburan DNA templat, peleburan DNA templat, penempelan primer pada templat (*annealing*); (4) elongasi atau pemanjangan primer (*extension*) dan (5) pemantapan (*post extension*). Tahap kedua sampai empat merupakan siklus berulang (20-30 siklus), setiap siklus terjadi duplikasi DNA (Handoyo dan Rudirenta, 2001).

Deteksi genus *Anisakis* dapat menggunakan primer ITS-1 dan ITS-2. ITS-1 menggunakan primer NC5 dan NC13R (Forward: 5'-GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT-3' dan revers: 5'-GCTGCGTTCTTCATCGAT-3'), amplifikasi ITS-1 dari spesies *Anisakis* pada fragment sekitar 300 bp. ITS-2 diamplifikasi dengan primer XZ1 dan NC2 (forward: 5'-ATTGCGCCATCGGGTTCATTCC-3' dan revers: 5'-TTAGTTTCTTTTCTCCGCT-3'), pada fragment sekitar 400bp (D'Amelio *et al.*, 2010).

2.11. Deteksi IgE

Identifikasi spesifik IgE merupakan langkah awal dalam diagnosa dari reaksi alergi. Produksi IgE spesifik biasanya dibuktikan melalui *Indirect* Enzim Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Radio Allergosorbent Test (RATS) atau *Western Blot*, yang didasarkan pada prinsip reaksi pengikatan immunochemical (Cho and Lee, 2006). Cho *et al.* (2005) menggunakan tikus sebagai hewan uji untuk mempelajari respon alergi karena infeksi oral *Anisakis* L3 menggunakan metode *indirect* ELISA untuk mengetahui total IgE. ELISA merupakan metode yang sangat berguna untuk menentukan konsentrasi antibodi dalam serum, dan juga

untuk mendeteksi antigen. Metode ini juga bisa diaplikasikan dalam industri makanan untuk mendeteksi alergen potensial dalam makanan. Tiga metode dasar utama dari ELISA: *direct* ELISA, *indirect* ELISA dan *sandwich* ELISA (Crowther, 2001).

ELISA adalah salah satu teknik biokimia yang digunakan terutama dalam bidang immunology untuk mendeteksi keberadaan antibodi atau antigen dalam suatu sampel. ELISA telah digunakan sebagai alat diagnostik dalam bidang medis, patologi tumbuhan, dan juga berbagai bidang industri. Penggunaan ELISA melibatkan setidaknya satu antibodi dengan spesifitas untuk antigen tertentu. Sampel dengan jumlah antigen yang tidak diketahui dimobilisasi pada suatu permukaan solid (biasanya berupa lempeng mikrotiter) (Crowther, 2001).

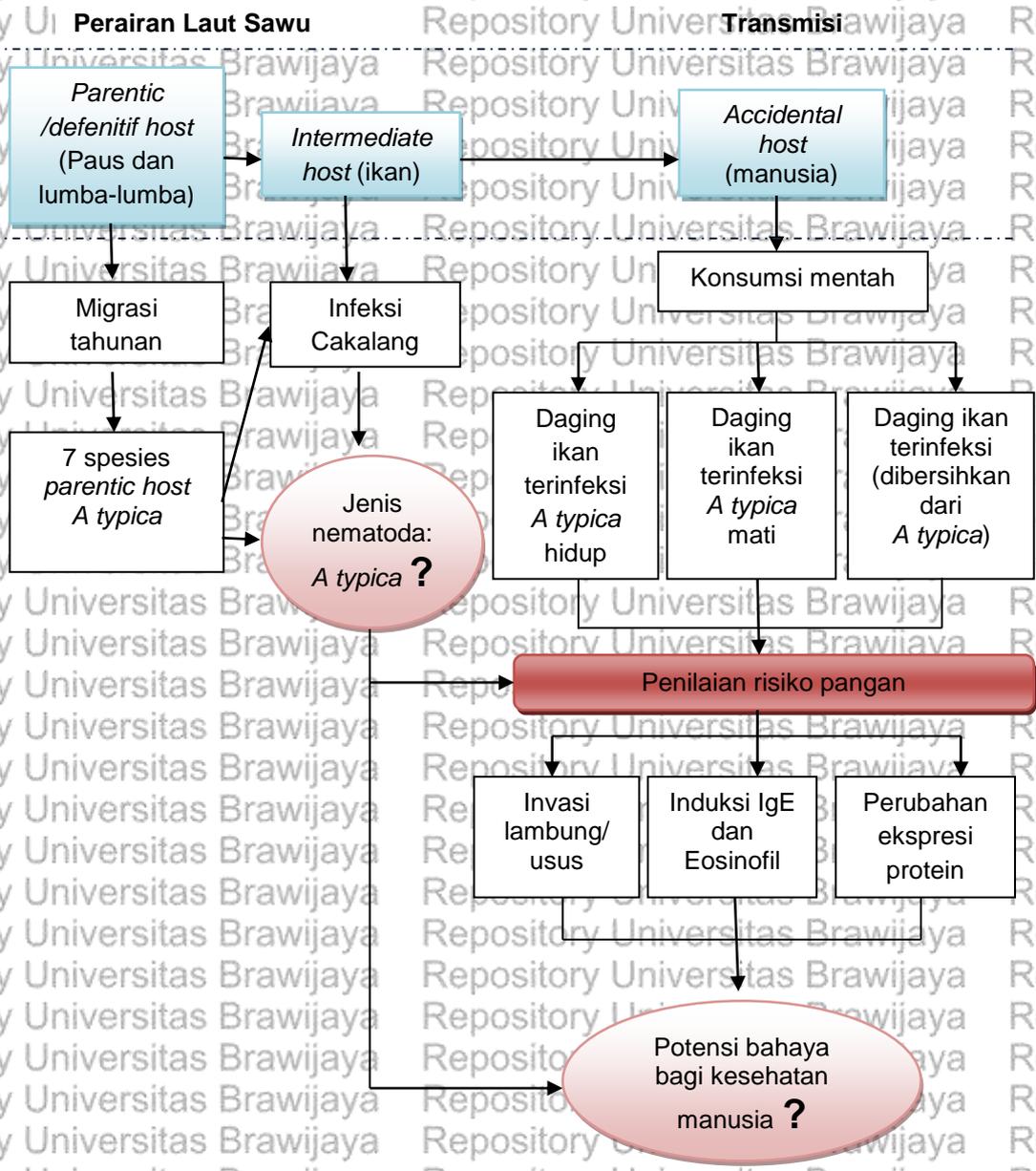
Immunoassay adalah test yang menggunakan antibodi sebagai reagen. Enzim immunoassay menggunakan enzim yang melekat pada salah satu dari reaktan yang memungkinkan kuantifikasi dari pengembangan warna setelah penambahan substrat/chromogen. ELISA melibatkan reaksi bertahap dengan penambahan reagen untuk zat fase padat terikat, melalui inkubasi dan pemisahan dengan reagen menggunakan langkah-langkah pencucian. Sebuah reaksi enzim digunakan untuk menghasilkan warna dan mengukur reaksi, melalui penggunaan reaktan enzim berlabel (Crowthe, 2001).





**BAB III
KERANGKA KONSEP PENELITIAN**

3.1. Kerangka konseptual



Gambar 3.1. Kerangka konseptual penelitian

Penelitian ini adalah penelitian epidemiologi analitik untuk mengetahui jenis dan potensi bahaya dari nematoda pada manusia ketika mengonsumsi ikan cakalang yang terinfeksi. Transmisi pada manusia akan dipelajari melalui studi *in vitro* menggunakan tikus wistar. Kaitan antara berbagai konsep pemikiran dalam penelitian ini untuk memecahkan masalah yang ingin diteliti disajikan pada kerangka konseptual penelitian pada gambar 3.1.

Cakalang adalah ikan dari famili Scrombidae dengan nilai produksi tertinggi dibandingkan kelompok tuna lainnya (William and Terawasi, 2008). Studi pendahuluan menemukan bahwa pada musim penangkapan tertentu larva nematoda adalah parasit yang paling umum ditemukan menginfeksi cakalang dengan prevalensi mencapai 100% dan intensitas infeksi bervariasi dari rendah (18 individu/ekor) sampai tinggi (71 individu/ekor). Larva nematoda yang ditemukan memiliki ciri-ciri fisik seperti cacing gilik, panjang antara 1-3 cm dan berwarna putih. Berdasarkan ciri-ciri tersebut maka diduga nematoda tersebut adalah larva anisakid dari family Anisakidae.

Infeksi larva dari family Anisakidae pada cakalang telah dilaporkan sebelumnya oleh Espinera *et al.* (2010), Irma. (2011), Herero *et al.* (2011) dan Anshary *et al.* (2014). Mereka menemukan spesies dari family Anisakidae yaitu: *A. typica*, *Anisakis sp* dan *P. decipiens* menjadikan cakalang sebagai inang antara. Hasil identifikasi molekuler oleh Palm *et al.* (2008) dan Anshary *et al.* (2014) menemukan bahwa *A. typica* adalah spesies yang ditemukan pada perairan Bali dan Selat Makassar. Kedua perairan ini adalah perairan laut yang berdekatan dengan perairan NTT. Pada kasus ini, kemungkinan larva nematoda yang ditemukan adalah *A. typica*, dugaan ini berdasarkan pola ruaya ikan cakalang dan migrasi dari beberapa mamalia laut sebagai *parentic host*.





Famili Scrombidae antara lain cakalang dan beberapa kelompok tuna pada waktu-waktu tertentu akan bermigrasi melewati Perairan Laut Sawu dan Perairan Laut NTT lainnya (Mallaca, Amir, Susanti., 2014). Migrasi juga dilakukan oleh beberapa mamalia laut seperti: paus, lumba-lumba dan dugong. Mamalia laut yang ditemukan di Laut Sawu terdiri dari 14 spesies paus, 7 spesies lumba-lumba dan 1 spesies dugong (KKP, 2014). Sekitar 22 dari 27 spesies Cetacea di dunia bermigrasi dari Lautan Pasifik melewati Laut Banda, Laut Flores, Laut Sawu menuju Laut India termasuk Paus Biru dan Paus Sperma. Peneliti menduga beberapa mamalia laut melepaskan larva nematoda ketika bermigrasi melewati Perairan Laut Sawu. Hal inilah yang mendasari pengambilan sampel ikan cakalang dari wilayah penangkapan perairan ini.

Iniguez *et al.*, (2011) dan Mattiuci *et al.*, (2002) menjelaskan paus dari spesies *Kogia breviceps* dan *Peponocephala electra* serta lumba-lumba dari spesies *Sotalia guianensis*, *Sotalia fluviatilis* dan *Stenella cylimene* teridentifikasi sebagai *parentic host* dari *A typica* yang ditemukan pada Perairan Brazil. Menurut KKP. (2014) *K breviceps* dan *P electra* dengan 12 spesies paus lainnya juga bermigrasi melewati Laut Sawu. Sedangkan *S guianensis*, *S fluviatilis* dan *S cylimene* tidak dilaporkan melewati perairan ini.

Mattiuci *et al.* (2004); Mattiuci and Nascetti. (2006; 2007) juga melaporkan inang dari *A typica* adalah cetacean (ziphiidae): *Mesoplodon densirostris*, *Mesoplodon europaeus*, *Mesoplodon grayi*, *Mesoplodon layardii*, *Mesoplodon mirus*, *Ziphius cavirostris*. Selanjutnya dari Delphinidae adalah: *Globicephala macrorhynchus*, *S fluviatilis*, *Stenella attenuata*, *Stenella coeruleoalba*, *Steno bredanensis* dan *Tursiops truncatus*. KKP. (2014) menjelaskan beberapa spesies yang dilaporkan oleh Mattiuci *et al.*, (2004); Mattiuci and Nascetti. (2006; 2007) seperti : *Mesoplodon sp*, *Ziphius cavirostris*, *S attenuata*, *S bredanensis* dan

Tursiops truncatus dilaporkan juga bermigrasi melewati Perairan Laut Sawu.

Berdasarkan laporan-laporan ini maka sekitar 7 spesies mamalia laut yang teridentifikasi sebagai *parentic host A typica* bermigrasi melewati perairan laut NTT. Spesies-spesies ini diduga melepaskan larva ke perairan, selanjutnya larva berpindah ke *intermediate* dan *transpor host* melalui rantai makanan.

Migrasi inang akan menentukan sebaran geografis nematoda pada perairan tertentu. Studi genetik melaporkan inang *A typica* terdeteksi antara 30°S dan 30°L pada perairan hangat dan tropis (Matiucci *et al.*, 2002). *A typica* dilaporkan terdeteksi pada beberapa lokasi yaitu: perairan Brazil (Mattiuci, 2002; Borges, 2012; Iniques, Santos, Vicente., 2009; Iniques *et al.*, 2011), perairan Mediterania (Fajarllah and Busi, 2008; Fajarllah and Slimane, 2008), perairan Bali (Palm *et al.*, 2008), perairan Papua New Guinea (Koinari *et al.*, 2013) dan Selat Makassar (Anshary *et al.*, 2014). Perairan Bali dan Perairan Selat Makassar adalah dua perairan yang berdekatan dengan perairan Laut Sawu dan ketiganya merupakan Perairan Wilayah Indonesia Bagian Tengah. Dengan demikian berdasarkan data ciri umum morfoogi larva, sebaran geografis, migrasi inang dan letak perairan memperkuat dugaan bahwa larva nematoda yang menginfeksi ikan cakalang adalah *A typica*.

A typica merupakan bagian dari genus *Anisakis spp.* family Anisakidae. Kajian infeksi nematoda *zoonoses* menjelaskan nematoda dari famili Anisakidae jenis *Anisakis spp* adalah yang menginfeksi produk perikanan laut dan memiliki jenis yang paling patogen seperti: *A simplex*, *P decipiens*, *Contraceum* dan dapat menyebabkan penyakit pada manusia (Audicana and Kennedy, 2008; Cheah and Lymbery, 2007; Sakanary and McKerrow, 1989; Chai *et al.*, 2005). Dijelaskan pula bahwa ketiganya diindikasikan sebagai penyebab anisakiasis di Jepang, Belanda dan Amerika Selatan. Beberapa jenis dari class nematoda dilaporkan



menyebabkan penyakit akut dan kronik pada lambung dan usus (Abolo et al., 2001; Bouree et al., 1995) dan alergi pada manusia (Caballero et al., 2011; Nieuwenhuizen et al., 2009; Audicana and Kennedy, 2008; Cheah and Lymbery, 2007; Moneo et al., 2007). Sepanjang sepengetahuan penulis sampai saat ini belum ada laporan tentang patogenitas dari *A. typica* ketika bertransmisi ke manusia atau pada hewan uji. Sebab itu perlu suatu kajian untuk mendapatkan kepastian dari potensi bahaya atau risiko yang mungkin terjadi.

Zoonoses berhubungan dengan transmisi dari hewan ke manusia. Transmisi disebabkan oleh kebiasaan konsumsi ikan mentah. Beberapa wilayah di Indonesia memiliki kebiasaan konsumsi daging ikan mentah seperti: *kokohu* di Maluku, *lawar* di NTT, *lawa* di Sulawesi Selatan, *gohu* di Maluku Utara dan *naniura* di Sumatera Utara. Selain daging, organ dalam seperti: hati, jantung, gonad dan telur juga dikonsumsi. Menjamurnya restoran siap saji yang menghadirkan makanan laut mentah dan perubahan kebiasaan makan juga berpeluang bagi terjadinya zoonoses. Sebab itu, perlu dilakukan penilaian risiko terhadap potensi bahaya dari *A. typica*.

Penilaian risiko adalah proses ilmiah dalam mengumpulkan dan menafsirkan informasi dari berbagai sumber untuk mengetahui karakteristik dan memperkirakan risiko terkait dengan bahaya yang dikandung makanan (Muscatello, 2010). Forysthe and Hayes. (1998) menjelaskan penilaian risiko merupakan karakteristik dari potensi risiko yang mempengaruhi bahaya, termasuk menyangkut perkiraan besarnya risiko, efek dari keluaran atau hasil yang ada dan melibatkan suatu indikasi dari suatu ketidak pastian. Penilaian risiko ini mencakup informasi mengenai kontribusi infeksi nematoda terhadap bahaya dalam makanan (cakalang).





Menurut Sumner, Ross and Ababouch, (2004), risiko merupakan fungsi dan probabilitas dari efek yang merugikan kesehatan dan konsekuensi dari keparahan untuk bahaya yang dikandung makanan. Risiko dibagi atas dua bagian: pertama, kemungkinan bahwa bahaya akan mempengaruhi kesehatan konsumen dan kedua, jika konsekuensinya tidak terjadi keparahan. Sebab itu, untuk membuktikan bahwa larva nematoda yang ditemukan pada cakalang berisiko bagi kesehatan maka harus melalui suatu kajian yang disebut: analisis risiko (*risk analysis*).

Penilaian risiko merupakan salah satu komponen dan analisis risiko yaitu: proses ilmiah dalam mengumpulkan dan menafsirkan informasi dari berbagai sumber untuk mengetahui karakteristik dan memperkirakan risiko terkait dengan bahaya yang dikandung makanan (Muscatello, 2010). Forysthe and Hayes (1998) menjelaskan penilaian risiko merupakan karakteristik dari potensi risiko yang mempengaruhi bahaya, termasuk menyangkut perkiraan besarnya risiko, efek dari keluaran atau hasil yang ada dan melibatkan suatu indikasi dari suatu ketidak pastian. Penilaian risiko ini mencakup informasi mengenai kontribusi infeksi larva nematoda terhadap bahaya dalam makanan (cakalang). Penilaian risiko secara ilmiah berbasis proses terdiri atas langkah berikut: identifikasi bahaya (*hazard identification*), karakterisasi bahaya (*hazard characterization*), kajian paparan (*exposure assessement*) dan karakterisasi risiko (*risk charaterization*) (Muscatello, 2010; Sumner *et al.*, 2004), secara teoritis konsep tersebut yang mendasari penelitian ini.

Sebelum proses pembuktian potensi bahaya maka hal pertama yang harus dilakukan adalah identifikasi jenis bahaya. Identifikasi bahaya disini merupakan identifikasi agen biologi dalam hal ini larva *A typica* yang diduga mampu menyebabkan efek kerugian bagi kesehatan, konsep ini seperti penjelasan

Sumner *et al.*, (2004). Identifikasi biasanya dilakukan dalam 2 cara morfologi dan molekuler. Beberapa nematoda tidak dapat diidentifikasi pada tingkat spesies berdasarkan karakter morfologi sebab itu harus dipastikan melalui identifikasi molekuler. Cara identifikasi morfologi telah dijelaskan dengan sistematis oleh Grabda. (1991) dan identifikasi molekuler menggunakan PCR dengan ITS region (D'Amelio *et al.*, 2010). Setelah diketahui jenis larva nematoda yang diduga zoonoses dilanjutkan dengan pembuktian potensi bahaya meliputi: kajian paparan, karakterisasi bahaya dan karakterisasi risiko.

Potensi bahaya pertama adalah kemampuan *A. typica* hidup menyebabkan infeksi lambung. Meskipun telah berada dalam saluran cerna dalam beberapa jam sampai beberapa hari atau beberapa minggu atau beberapa bulan kemungkinan larva masih dapat hidup dan melakukan penetrasi pada lambung dan menyebabkan anisakiasis lambung (Bouree *et al.*, 1995). Pembuktian dilakukan melalui studi *in vitro* pada tikus, data ini digunakan untuk mempelajari kerusakan jaringan saluran cerna akibat infeksi larva hidup melalui studi histopatologi seperti yang telah dilakukan oleh Zuloaga *et al.* (2013) dan Romero *et al.* (2013) menggunakan *Anisakis spp* serta 2 sibling spesies *A. simplex* ss dan *A. pegreffii*. Hasil studi akan menjelaskan ada tidaknya perubahan histologi jaringan lapisan lambung yang mengarah pada penyakit akut dan kronis.

Potensi bahaya kedua adalah reaksi alergi, nematoda dalam keadaan mati dapat menyebabkan reaksi hypersensitivity tipe I dan dapat dideketahui melalui deteksi serum darah. Penelitian serologi menggunakan inokulasi *A. simplex* untuk mempelajari respons imun dan spesifik antibodi pada tikus telah dilakukan oleh Abe dan Teramoto. (2014); Diab *et al.* (2011); Cho *et al.* (2005); Baeza *et al.* (2005); Iglesia *et al.* (1995); Amano *et al.* (1995) dan IgE adalah salah satu parameter yang mereka amati. Nematoda mengandung berbagai antigen yang



37

dapat menginduksi reaksi imun dan merangsang sel B mensekresikan IgE (Murphy *et al.*, 2008; Kindt *et al.*, 2007). Selain peningkatan IgE, infeksi juga terkait dengan peningkatan jumlah sel eosinofil. Eosinofil terlibat langsung dalam proses pengusiran cacing dari tubuh inang. Bratawijaya dan Rengganis. (2009) menjelaskan bahwa IgE akan berikatan dengan permukaan cacing yang diikat eosinofil kemudian *host* mensekresikan enzim untuk menghancurkan cacing. Jadi dalam penelitian ini total IgE dan jumlah sel eosinofil akan digunakan untuk mempelajari hubungan antara infeksi larva dan reaksi alergi.

Selain itu identifikasi profil protein dari ikan yang terinfeksi dan tidak terinfeksi larva juga digunakan untuk mempelajari ada tidaknya perubahan profil protein daging. Antigen Anisakis ditemukan menyebar disekitar otot ikan yang terinfeksi (Solas *et al.*, 2008; Rodriguez-Mahillo *et al.*, 2010) dan berpotensi menginduksi respons alergi. Penyebaran antigen ke daging menyebabkan perubahan dalam ekspresi protein daging. Data ini akan digunakan untuk mempelajari kemungkinan adanya penyebaran antigen pada daging ikan yang terinfeksi.

3.2. Hipotesis penelitian

Berdasarkan kerangka konseptual, untuk menjawab permasalahan dan mencapai tujuan penelitian maka dirumuskan hipotesis sebagai berikut:

1. Nematoda anisakid yang menginfeksi cakalang adalah *A typica*.
2. *A typica* hidup mampu menyebabkan kerusakan jaringan lambung tikus wistar yang diberikan secara per oral.
3. *A typica* mati dalam keadaan segar dan beku yang dipaparkan secara per oral ke tikus wistar dapat meningkatkan konsentrasi total IgE dan jumlah sel eosinofil.
4. Ada perbedaan ekspresi protein dari daging ikan cakalang yang tidak terinfeksi dan terinfeksi *A typica*.



3.3. Kerangka operasional penelitian

Pembuktian hipotesis dilakukan melalui empat tahapan proses penelitian yang terdiri dari:

- 1) Penelitian tahap I, bertujuan untuk menjawab tujuan penelitian pertama. Pada tahap ini dilakukan pengumpulan nematoda dari cakalang dan kemudian diidentifikasi secara morfologi dan molekuler. Identifikasi morfologi dilakukan melalui pengukuran karakter morfologi nematoda. Perhitungan karakter morfologi meliputi: panjang total badan, maksimum lebar badan, panjang oesopagus, panjang ventriculus, rasio antara panjang ventriculus oesopagus dan panjang mucron. Identifikasi morfologi pada prinsipnya didasarkan pada bentuk saluran cerna, sayatan melintang saluran cerna dan gambaran bentuk bagian kepala dan ekor. Identifikasi molekuler menggunakan PCR dengan ITS region. Hasil identifikasi larva nematoda adalah dasar bagi penelitian tahap berikut. Selanjutnya membuktikan potensi bahaya yang mungkin dikandung oleh nematoda pada hewan uji tikus Wistar.
- 2) Penelitian tahap II, bertujuan untuk menjawab tujuan ke dua. Tahap ini merupakan tahap pertama dari identifikasi potensi bahaya dari nematoda yang diinfeksi pada tikus Wistar. Pada tahap ini, larva *A. typica* hidup diinfeksi secara per oral pada tikus wistar menggunakan *feeding needle*, kemudian 2-8 jam setelah infeksi akan dilakukan pembedahan untuk mengamati perjalanan larva pada saluran cerna, kemampuan invasi atau penetrasi ke dinding saluran cerna dan menganalisis perubahan jaringan menggunakan pewarnaan haematoxylin-eosin (HE). Data ini akan



menjelaskan tentang kemampuan larva *A. typica* menyebabkan infeksi melalui gambaran histopatologi jaringan lambung

3) Penelitian tahap III, bertujuan untuk menjawab tujuan penelitian ke tiga.

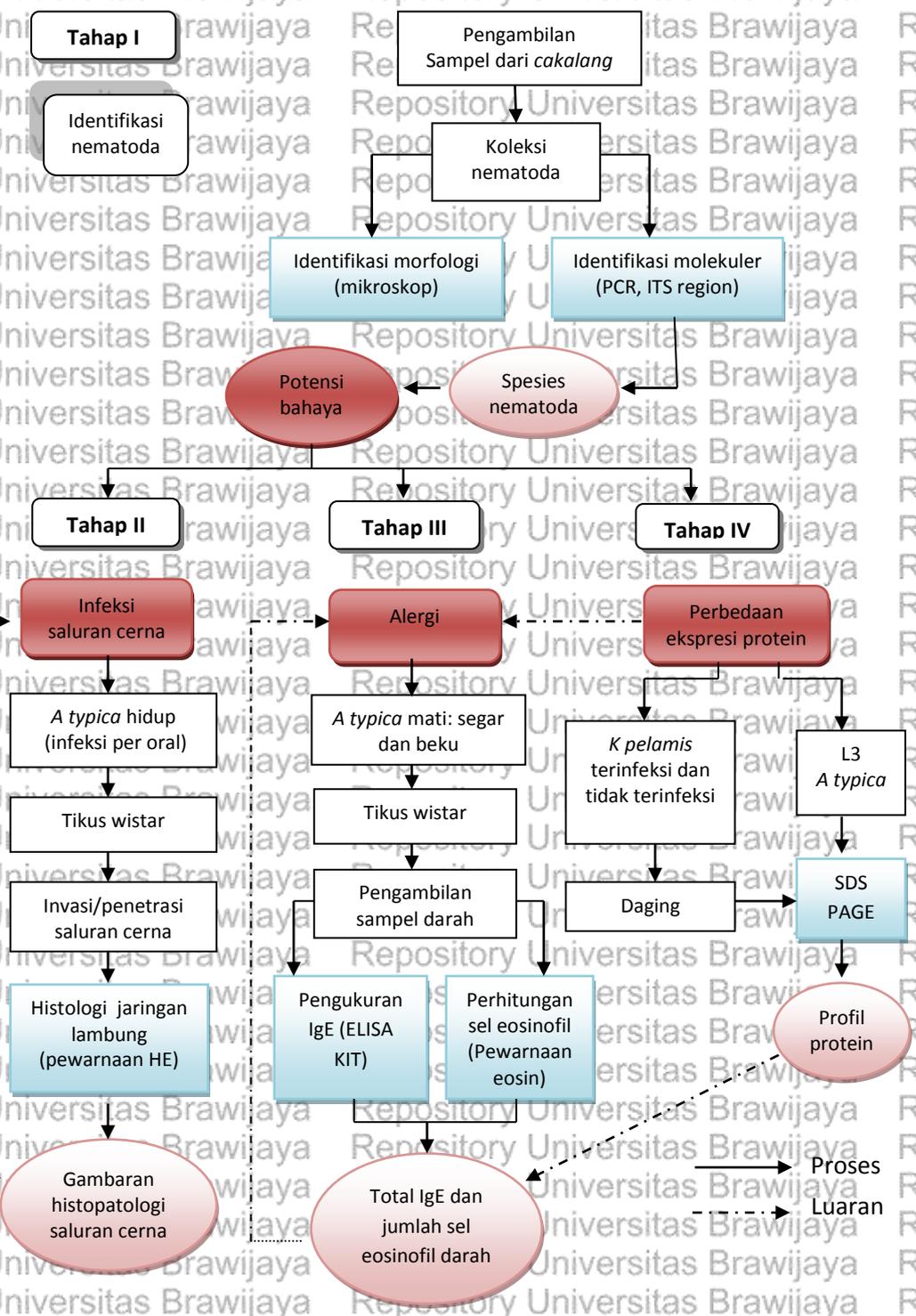
Tahap ini menguji potensi bahaya alergi yang mungkin disebabkan *A. typica* mati dalam keadaan segar dan beku. Perlakuan (1) *A. typica* segar dan perlakuan (2) *A. typica* beku diinfeksi per oral pada tikus Wistar, 8, 10 dan 12 jam setelah infeksi dilakukan pengambilan sampel darah untuk mengukur total IgE (ELISA Kit) dan jumlah sel eosinofil (pewarnaan eosin).

Data ini digunakan untuk menjelaskan potensi bahaya alergi yang mungkin disebabkan oleh infeksi *A. typica*.

4) Penelitian tahap IV, bertujuan untuk menjawab penelitian tahap ke empat.

Tahap ini, menguji hipotesis perbedaan ekspresi protein dari daging ikan yang tidak terinfeksi dan terinfeksi *A. typica*. Daging cakalang yang terinfeksi, tidak terinfeksi dan *A. typica* diidentifikasi profil proteomnya menggunakan SDS PAGE. Profil protein hasil analisa akan digunakan untuk memperkuat pembahasan potensi bahaya alergi.

Garis besar operasional penelitian disajikan pada Gambar 3.2.



Gambar 3.2. Kerangka operasional penelitian



BAB IV METODE PENELITIAN

41

4.1. Lokasi dan waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Maret 2013 sampai Juni 2014 pada beberapa lokasi berbeda. Sampel ikan diperoleh dari Kupang NTT selanjutnya dibawa ke Malang menggunakan transportasi udara. Lokasi penelitian dirinci sebagai berikut:

1. Tahap I: Koleksi larva Anisakid, identifikasi morfologi dan molekuler dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi Hewan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya, Laboratorium Biosains UB dan Laboratorium Biokimia Fakultas MIPA UB. Sekuensing hasil PCR di Macrogen Inc, Korea Selatan.
2. Tahap II: Studi *in vitro* pada tikus Wistar dan histologi jaringan dilakukan di laboratorium Fisiologi Hewan Fakultas MIPA UB dan Bagian Histopatologi Rumah Sakit Umum Daerah Dr Sutomo Surabaya selanjutnya analisis preparat dilaksanakan di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
3. Tahap III: Studi *in vitro* pada tikus wistar dilakukan pada Laboratorium Fisiologi Hewan UB, analisa eosinofil pada Laboratorium Biokimia FMIPA UB dan analisa IgE pada Laboratorium Biosains UB.
4. Tahap IV: Analisa profil protein pada Laboratorium Biosains UB.

Jadwal penelitian dapat dilihat pada lampiran 1.



4.2. Materi penelitian

4.2.1. Larva Nematoda

Larva nematoda dikumpulkan dari cakalang yang diperoleh dari Tempat Pendaratan Ikan Oeba Kupang. Cakalang merupakan hasil tangkapan dari perairan Laut Sawu NTT (Lampiran 2) menggunakan alat tangkap pancing (*pole and Line*), *trip* penangkapan 2 hari. Hasil tangkapan dari perairan Laut Sawu dipilih sebab peneliti mempelajari sekitar 22 spesies mamalia laut melakukan migrasi tahunan melewati perairan ini. Mereka diduga menyebarkan beberapa jenis nematoda zoonoses yang kemudian bertransmisi ke ikan-ikan konsumsi. Setelah sampel ikan terkumpul dilakukan pengamatan terhadap ciri-ciri morfologi ikan untuk memastikan bahwa sampel adalah cakalang. Ukuran ikan yang dijadikan sampel ≥ 50 cm dengan ciri fisik tampak luar tubuh (daging) kenyal serta melegkung.

Secara visual tidak bisa membedakan antara ciri-ciri fisik ikan yang terinfeksi dan tidak terinfeksi larva nematoda. Pengamatan dilakukan dengan cara: beberapa ikan dari *trip* penangkapan yang sama diambil secara acak untuk pengamatan pada bagian anus. Biasanya bila intensitas larva per individu tinggi maka sebagian larva yang tidak terenkapsulasi akan bergerombol disekitar anus. Bagian anus disayat sekitar 1-2 cm untuk menemukan larva. Bila sekumpulan larva ditemukan pada daerah sekitar anus, ini mengindikasikan intensitas infeksi per individu cukup tinggi. Dalam satu *trip* penangkapan bila 1 atau beberapa ekor ikan terindikasi terinfeksi maka sejumlah besar ikan dari tangkapan yang sama juga terinfeksi. Ikan cakalang untuk tujuan studi prevalensi, intensitas infeksi, identifikasi morfologi dan molekuler dipilih menggunakan teknik *random sampling*. Ikan dari *trip* penangkapan yang sama diambil secara acak.

Selanjutnya sampel ikan yang terinfeksi disimpan dalam kotak pendingin untuk memperlambat proses perubahan biokimia setelah *post mortem*. Hal ini untuk mempertahankan kelangsungan hidup larva nematoda. Perbandingan ikan dan es adalah 2:1.

Pembedahan dilakukan untuk mendapatkan larva nematoda yang tersebar pada daging dan isi perut dari cakalang. Larva yang terkumpul dicuci berulang kali dengan NaCl 0.9% kemudian dikelompokan berdasarkan kenampakan fisik (ukuran panjang, bentuk tubuh dan warna). Beberapa larva diawetkan dalam larutan glyserin 5% dalam etanol 70% untuk analisa morfologi dan beberapa larva diawetkan dalam etanol absolut untuk analisa molekuler.

Ikan cakalang yang digunakan untuk tujuan studi prevalensi, intensitas infeksi, identifikasi morfologi dan molekuler menggunakan teknik *random sampling*. Ikan dari *trip* penangkapan yang sama diambil secara acak.

4.2.2. Hewan Uji

1). Populasi, sampel dan kriteria

Populasi penelitian adalah tikus wistar (*Rattus norvegicus* L) galur wistar yang diperoleh dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada Jogjakarta, No/262/LP3HP/15/X/2012.

Kriteria inklusi sampel: tikus wistar jantan, berat 150-250 gram, umur 4-5 bulan, tampakan fisik normal. Kriteria eksklusi meliputi; tikus sakit atau mati sebelum mendapat perlakuan dan tikus mati setelah mendapat perlakuan.

Kriteria *drop out* yang digunakan adalah tikus mati dan tikus yang belum dideparasitisasi.

Besar sampel ditentukan berdasarkan prinsip dasar dan etika penggunaan hewan uji penelitian, seperti yang dijelaskan oleh (Ridwan, 2013). Pada





penelitian pra eksperimental terdiri dari 10 perlakuan setiap perlakuan 3 kali ulangan sehingga jumlah tikus yang dipergunakan 30 ekor, dengan rincian 3 perlakuan (24, 48, 72 jam) dan 7 perlakuan (2,3,4,5,6,7,8 jam). Penelitian observasional menggunakan 8 ekor tikus (kelompok risiko) dan 3 ekor tikus (kelompok kontrol). Pengambilan sampel dilakukan secara acak sederhana dengan pertimbangan sampel homogen dan telah memenuhi kriteria inklusi, eksklusi dan *drop out*.

2) Deparasitisasi

Deparasitisasi adalah tahapan pertama yang dilakukan sebelum pelaksanaan penelitian menggunakan hewan uji. Hewan uji yang digunakan harus dipastikan bebas dari cacing parasit terutama pada organ target untuk histopatologi, sehingga menghindari kesalahan dan bias dalam pengamatan. Hewan uji yang bebas cacing diperoleh melalui proses deparatisasi menggunakan obat sesuai dosis yang ditentukan. Pengobatan menggunakan obat-obatan bertujuan untuk mengurangi jumlah atau mencegah reinvestasi cacing parasit pada hewan uji. Berbagai upaya pengobatan tidak dapat membuat hewan uji dalam kondisi steril, tetapi merupakan usaha untuk memperkecil terjadinya investasi cacing dan parasit lainnya (Fermex and Riley, 1968 dalam Widjajanto, 2012).

Pencegahan reinfeksi cacing pada hewan uji diawali dengan konsultasi pada Pusat Veterineri Farma Jawa Timur. Deparasitisasi menggunakan IVOMEC yang mengandung Ivermectrin 1 ml per 33 kg/berat badan. Dosis yang digunakan pada tikus ditetapkan berdasarkan konversi dari rata-rata berat badan tikus yang akan dideparasitisasi. Pemberian IVOMEC melalui injeksi secara subkutan dan diulang 7 hari setelah injeksi pertama. Hewan uji yang telah diobati dirawat sebagai usaha memperkecil kemungkinan terjadinya infeksi berulang. Perawatan yang dilakukan meliputi: semua kandang yang digunakan harus dicuci terlebih



dahulu dan diberi antiseptik. Disinfeksi juga dilakukan terhadap serut kayu setiap pagi hari. Serut kayu diganti setiap 3 hari sekali. Makanan yang diberikan adalah makanan standar dan mengonsumsi air mineral Aqua.

Kriteria keberhasilan pengobatan dan pemeliharaan diuji pada beberapa sampel tikus. Sejumlah 30% tikus diambil secara acak kemudian dilakukan nekropsi sesuai prosedur 4.2.2 (3) untuk melihat keberadaan cacing parasit pada saluran cerna. Pada tahap ini, bila tidak dijumpai cacing gilik maka pengobatan dianggap berhasil. Tikus yang terbebas dari infeksi cacing gilik sudah dapat digunakan dalam eksperimen 7 hari setelah pengobatan terakhir.

Pada prinsipnya, tidak semua bagian saluran cerna dapat dijadikan target histologi akibat perlakuan paparan cacing. Hal ini disebabkan adanya investasi cacing pada bagian-bagian tertentu dari saluran cerna meskipun sudah dilakukan pengobatan berulang dan pemeliharaan standar. Sebab itu, proses ini juga bertujuan untuk menentukan bagian saluran cerna yang akan dijadikan target dalam penelitian tahap II. Sedangkan untuk penelitian tahap III, semua hewan uji kontrol dan yang diberikan perlakuan diasumsikan memiliki total IgE yang sama setelah proses deparasitisasi.

3). Prosedur etanasi dan nekropsi

Langkah-langkah melakukan nekropsi sesuai dengan petunjuk Widyarini. (2011) sebagai berikut:

1. Sebelum nekropsi tikus dietanasi menggunakan kloroform. Kloroform 5 ml dituang pada kapas, lalu dimasukkan ke dalam stoples dan dilanjutkan dengan memasukan tikus. Stoples ditutup rapat, beberapa menit kemudian dilakukan pemeriksaan terhadap hilangnya detak jantung,



pernafasan dan refleks pupil mata tikus. Setelah tikus benar-benar teretnansi dilanjutkan dengan nekropsi.

2. Prosedur nekropsi dilakukan setelah etanasi berhasil. Tikus yang telah dietanasi diletakan pada papan nekropsi dengan posisi rebah dorsal (perut menghadap atas) dan posisi kepala menjauh operator. Permukaan tubuh dibasahi air kemudian dengan menggunakan forceps angkat kulit abdomen dan buat irisan (gunting) sepanjang *ventral midline* dari dagu bagian bawah sampai dengan irisan sub kutan.
3. Proses selanjutnya membuat irisan pada otot dibawah kulit abdomen sampai terlihat organ pada rongga abdomen. Rongga dada dibuka dengan cara memotong tulang rusuk. Setelah itu dilakukan pengamatan terhadap saluran cerna. Proses ini digunakan pada penelitian pra eksperimen dan penelitian observasional.

4.3. Ruang lingkup dan rancangan penelitian

4.3.1. Ruang lingkup

Ruang lingkup penelitian adalah ilmu keamanan pangan berintegrasi dengan parasitologi, epidemiologi, histologiopatologi dan biokimia. Keamanan pangan difokuskan pada potensi bahaya akibat mengkonsumsi ikan yang terinfeksi *L3 A typica* dalam keadaan hidup atau mati. Asumsi yang digunakan adalah: Pertama, ikan yang terinfeksi larva hidup *A typica* dikonsumsi dalam bentuk mentah kemudian larva tertelan tanpa sengaja secara utuh dalam keadaan hidup. Pengamatan pada tahap ini adalah infeksi pada lambung, dipelajari melalui gambaran perubahan histologi jaringan mukosa lambung. Kedua, konsumsi ikan mentah dalam keadaan segar dan beku yang terinfeksi larva *A typical* mati. Dalam perjalanannya larva segar atau beku terkunyah melalui proses pencernaan. Asumsi ini digunakan untuk mempelajari terjadinya reaksi alergi



tipe I melalui pengukuran total IgE dan jumlah sel eosinofil. Ketiga, asumsinya jika daging ikan yang terinfeksi dibersihkan dari larva kemudian dikonsumsi. Daging ikan yang terinfeksi diduga akan memberikan ekspresi protein yang berbeda dengan daging yang tidak terinfeksi, dan berpotensi merugikan kesehatan.

Pendekatan penelitian didasarkan pada studi epidemiologi analitik yang ditujukan untuk membuktikan hipotesis dan menaksir sejauhmana pengaruh paparan terhadap penyakit. Pembuktian akan dilakukan melalui studi *in vitro* menggunakan tikus wistar, perlakuan paparan menggunakan larva *A. typica* serta risiko yang ditimbulkan adalah infeksi saluran cerna dan indikasi reaksi alergi.

4.3.2. Kelaikan etik

Penelitian ini telah diuji oleh Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya yang disahkan melalui Keterangan Kelaikan Etik (*Ethical Clearence*) No: 268-KEP-UB.

4.3.3. Rancangan penelitian

1). Penelitian pra eksperimental

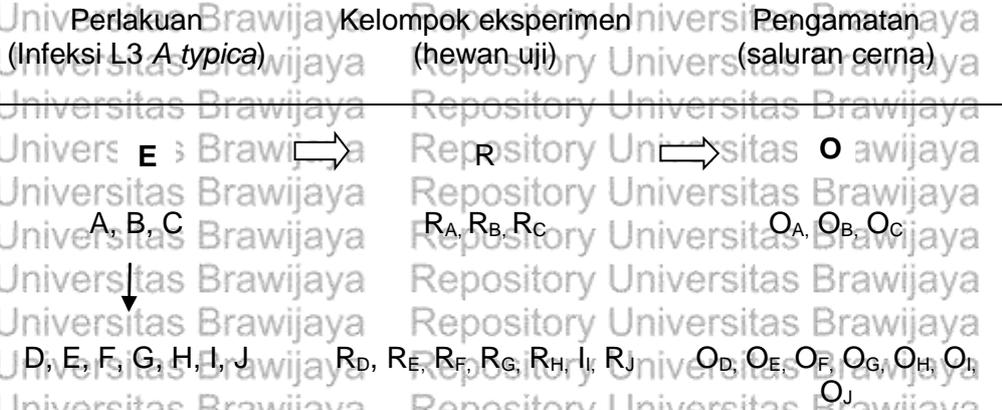
Desain penelitian merupakan studi analitik laboratorium diawali dengan pra-eksperimen: *one shot case study* dilanjutkan dengan penelitian observasional.

Tahapan pra eksperimen bertujuan untuk mengamati perjalanan larva pada saluran cerna tikus dan perlakuan waktu paska infeksi yang digunakan sebagai dasar penelitian observasional. Saluran cerna yang diamati meliputi: oesophagus, lambung, duodenum, jejunum, ileum dan kolon.

Proses pra eksperimen tidak ada variabel kontrol, terdapat suatu kelompok yang diberi perlakuan dan selanjutnya diamati hasilnya. Skema rancangan



penelitian untuk mengamati perjalanan larva pada saluran cerna tikus wistar berdasarkan waktu paska infeksi (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J), desainnya pada gambar 4.1.



Gambar 4.1. Desain pra eksperimen *one shot case study*. A sampai J: Perlakuan paparan (jam paska infeksi), R: *Ratt*/tikus sesuai perlakuan. O: Observasi/pengamatan.

Sesuai gambar 4.1: A, B dan C adalah waktu paska infeksi 24 jam, 48 jam dan 72 jam (perlakuan per hari). Hasil pengamatan merupakan dasar penentuan waktu perlakuan D sampai J. Pengamatan D sampai J dijadikan dasar pemilihan organ target pada penelitian observasional.

2). Penelitian observasional

Penelitian obsevasional yang digunakan yaitu penelitian kohort atau penelitian prospektif. Penelitian ini adalah penelitian non eksperimen yang digunakan untuk mempelajari hubungan antara faktor risiko dengan efek. Pendekatan yang digunakan adalah longitudinal kedepan. Artinya, faktor risiko yang akan dipelajari diidentifikasi dahulu, kemudian diikuti kedepan secara prospektif timbulnya efek.

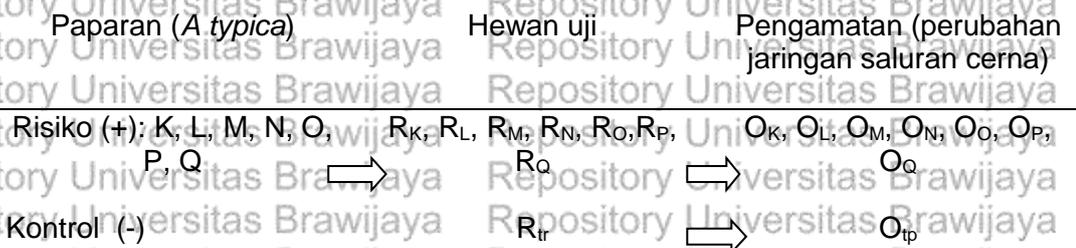
Penelitian ini dibagi atas dua kelompok yaitu kelompok dengan risiko dan kelompok tanpa risiko (kontrol) yang diteliti. Kemudian kedua kelompok diamati antara 2-8 jam untuk menentukan ada tidaknya efek. Secara teknis infeksi L3 A



typica diberikan secara tidak sengaja. Kelompok risiko (K, L, M, N, O, P, Q) dibandingkan dengan kelompok kontrol (R_{tr}). Pengamatan dilakukan terhadap terhadap kedua kelompok setelah kelompok risiko diinfeksi.

Asumsi yang digunakan bahwa keadaan kesehatan dan penyakit pada individu atau populasi tidak terjadi secara acak melainkan secara sistematis yang dipengaruhi antara lain oleh faktor risiko (Hennekens and Buring, 1987).

Berdasarkan tujuan penelitian maka perubahan yang terjadi pada jaringan saluran cerna atau hubungan antara waktu paska infeksi (variabel bebas/faktor risiko) dengan besarnya perubahan yang terjadi (variabel tergantung/efek), desainya pada gambar 4.2.

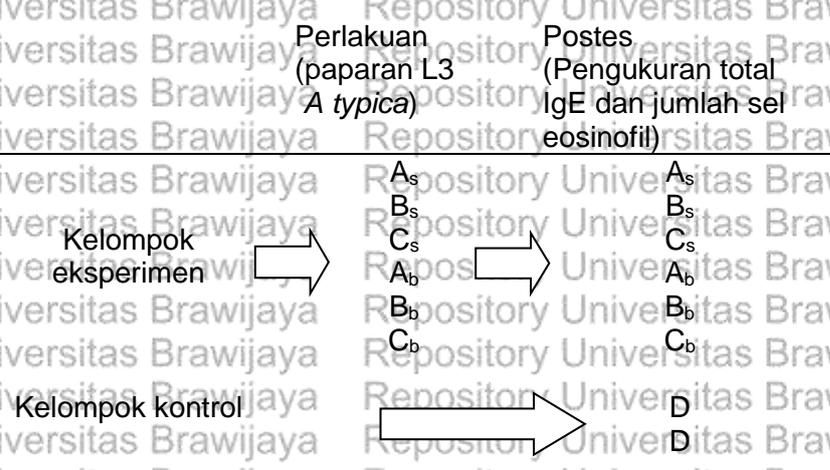


Gambar 4.2. Desain penelitian observasional. K sampai Q: Perlakuan paparan (jam paska infeksi), R: Ratt/tikus sesuai perlakuan, O: Observasi/pengamatan.

3). Penelitian eksperimental sungguhan

Desain ini digunakan untuk mengukur pengaruh perlakuan terhadap jumlah total IgE dan eosinofil dalam darah. Desain penelitian menggunakan studi analitik laboratorium melalui penelitian eksperimen sungguhan: rancangan *posttest* dengan kelompok kontrol (*posttest only control group design*), menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) terdiri dari 2 kelompok yaitu: kelompok eksperimen dan kelompok kontrol.

Kelompok kontrol dianggap sama dengan kelompok eksperimen sebelum dilakukan perlakuan. Kelompok eksperimen diinfeksi kemudian dilakukan pengukuran pengaruh perlakuan pada kelompok eksperimen. Selanjutnya, hasil pengukuran dari kelompok eksperimen dibandingkan dengan kelompok kontrol. Hasil pengukuran digunakan untuk mempelajari hubungan antara paparan dalam waktu berbeda terhadap potensi alergi oleh *A. typica*, desainya pada gambar 4.3.



Gambar. 4.3. Penelitian *posttest only control group design*. A_s, B_s, C_s; Perlakuan paparan dengan L3 segar. A_b, B_b, C_b; Perlakuan paparan dengan L3 beku.

4.4. Pelaksanaan penelitian

4.4.1. Tahap I: Identifikasi larva nematoda

1). Identifikasi morfologi

Cacing diambil secara acak kemudian dijernihkan menggunakan larutan glyserin-phenol-asam laktat-akuades (2:1:1:1). Cacing direndam kurang lebih 48 jam sampai jernih dan terlihat bagian-bagian tubuh seperti kepala, organ dalamnya atau saluran cerna dan bagian ekor. Cacing diletakan pada gelas obyek diolesi glyserin dan ditutup cover gelas dan diamati menggunakan mikroskop cahaya (ECLIPSE E 100 Nikon). Identifikasi bentuk morfologi menggunakan petunjuk Grabda (1991).



2). Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA mengikuti petunjuk D'Amelio (2010) dengan modifikasi sebagai berikut:

1. Nematoda anisakid dibilas dengan PBS dimasukkan ke mikrotube 1,5 ml, ditambahkan 200 μ l buffer ekstrak (Tris Cl pH 8 50 mM, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10% SDS, Proteinase K 10 mg/ml) dan dihomogenkan dengan *yellow tip*. Kemudian diinkubasi dalam *waterbath* pada suhu 56 °C selama 2 jam. Sebelum divortex selama 10 detik, tambahkan 125 μ l NaCl 5 M kemudian sentrifuge selama 5 menit pada 13.000 rpm. Tambahkan PCI (25:24:1) 200 μ l pada supernatan divorteks beberapa detik lalu disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 10 menit.
2. Ulangi lagi, supernatan ditambah Cl (24:1) 200 μ l divorteks beberapa detik lalu disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 10 menit. Supernatan ditambah 500 μ l ethanol absolut dan diinkubasi satu jam pada suhu -20°C. Sentrifuge selama 10 menit pada 13.000 rpm dan suhu 4°C. Pelet ditambahkan 500 μ l ethanol 70% selanjutnya disentrifuge selama 5 menit pada 13.000 rpm dan suhu 4°C. Pelet dikeringkan pada suhu 55°C. Setelah kering ditambahkan 50 μ l TE buffer pH 7,6.
3. Uji Kuantitatif dan kualitatif DNA. Uji kuantitatif dilakukan terhadap hasil ekstraksi untuk mengetahui konsentrasi DNA menggunakan nanophotometer. Setelah itu, dilanjutkan dengan uji kualitatif menggunakan elektroforesis dengan agarose 1,5% volume 20 ml. Hasil *running* DNA pada gel agarose divisualisasi menggunakan Gel Doc.
4. PCR. DNA hasil isolasi diamplifikasi menggunakan ITS (ITS 1,58S rDNA dan ITS 2), primer NC₅ (*forward*: 5'-GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT-3') dan NC₂ (*reverse*: 5'-



TTAGTTTCTTTTCTCCGCT-3'). Program PCR sebanyak 30 siklus pada temperatur 95°C selama 10 menit (predenaturasi), 95°C selama 30 detik (denaturasi), 55°C selama 30 detik (*annealing*), 72°C selama 75 detik (*extension*) dan 72°C selama 7 menit (*post extension*) (D'Amelio, 2010). Campuran reaksi untuk PCR meliputi PCR Mix 10 µl, dH₂O 4 µl, Primer *Forward* 2 µl, Primer *Reverse* 2 µl, DNA sampel 2 µl.

5. Purifikasi DNA dan sekuensing. Hasil purifikasi PCR ITS region masing-masing 12 µl ditambah 2 µl Na asetat ditambah 30 µl etanol absolut dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu -20°C selama 30 menit. Setrifuge pada 13.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Tambahkan 200 µl ethanol 70% pada pelet dan disentrifuge pada 13.000 rpm dan suhu 4°C selama 10 menit. Pelet dikeringkan dan tambahkan 10 µl air distilasi. Selanjutnya untuk menguji keberhasilan purifikasi dilakukan elektroforesis menggunakan gel agarose 1,5% (2 µl loading dye : 2 µl DNA hasil purifikasi).

Hasil purifikasi DNA sebanyak 5 µl dicampur dengan 5 µl primer (10 pmol/µl) dilanjutkan dengan sekuensing menggunakan ABI Prism 3730XL (Macrogen, Inc-South Korea). Data hasil sekuensing dianalisis dengan menggunakan MEGA 5.03 dengan menggunakan kimura-2 parameter dan bootstrap 1000.

3). Prevalensi dan intensitas

Studi prevelensi dan intensitas infeksi digunakan sebagai data pendukung pembahasan. Perhitungan prevelensi dan intensitas menurut (Bush *et al.*, 1997), dengan modifikasi untuk infeksi pada setiap organ dalam:

$$\text{Prevalensi (\%)} = \frac{\text{Jumlah ikan yang terinfeksi nematoda}}{\text{Jumlah sampel ikan}}$$

$$\text{Intensitas (\%)} = \frac{\text{Jumlah total nematoda yang ditemukan pada ikan}}{\text{Jumlah ikan yang terinfeksi}}$$

4.4.2. Tahap II: Uji kemampuan L3 *A. typica* hidup menyebabkan kerusakan jaringan lambung tikus wistar

1). Koleksi L3 *A. typica*

Larva *A. typica* dikumpulkan dari cakalang selanjutnya di tampung dalam larutan NaCl fisiologi (gambar 4.4). Pada pra eksperimen dalam keadaan hidup dipilih berdasarkan teknik *purposive sampling*. Kriteria spesifik adalah larva berenang, bergerak atau bergerak ketika disentuh. Pelaksanaan observasional, larva dipilih berdasarkan *purposive sampling* dengan kriteria hidup, aktif bergerak tanpa berhenti dan dapat berkelompok dengan larva lain dalam media NaCl fisiologis. Larva yang digunakan pada tahap observasional dipindahkan 2-3 kali dalam larutan NaCl Fisiologi pada wadah yang berbeda. Hal ini dilakukan untuk memastikan bahwa larva benar-benar hidup dan aktif sebelum diinfeksi ke tikus.



Gambar 4.4. Proses koleksi larva

Sebagian populasi larva dari penelitian tahap ini dibilas berulang kali dalam NaCl fisiologi dan diawetkan sesuai prosedur pada point 4.4.1 point (1) untuk keperluan identifikasi. Identifikasi sampel larva dilakukan untuk memastikan bahwa larva yang digunakan adalah *A. typica*.

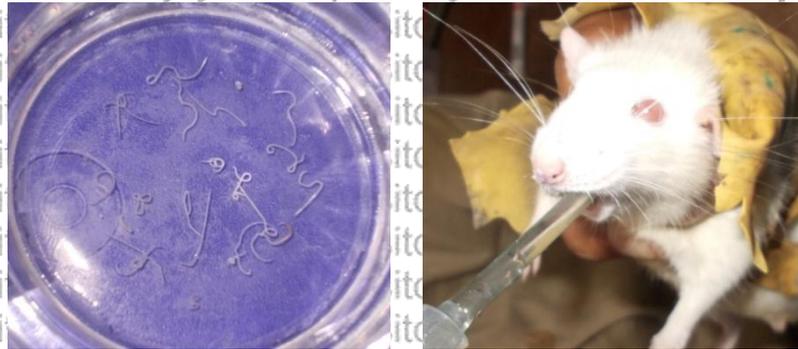


2). Penelitian pra eksperimen ke-1

Penelitian pra eksperimen ke-1 menggunakan 3 perlakuan dengan 3 kali ulangan, rinciannya sebagai berikut:

1. A : 24 jam paska infeksi
2. B : 48 Jam paska infeksi
3. C : 72 jam paska infeksi

Tikus ditempatkan dalam kandang sesuai perlakuan dan diberi makan dan minum secara *ad libitum*. Semua tikus perlakuan diinfeksi dengan 5 individu L3 *A typica*. Larva dipindahkan dari NaCl fisiologi ke air aqua selanjutnya diambil menggunakan *feeding needle* 7 cm. Larva didorong masuk ke saluran cerna dengan cara sonde (gambar 4.5).



Gambar 4.5. Proses infeksi per oral L3 *A typica*

Setelah diinfeksi tikus tidak diberi makan, tujuannya untuk memudahkan pengamatan larva dalam saluran cerna. Sesuai perlakuan, tikus dinekropsi setelah benar-benar teretnansi (point 4.2.2. point 3) dan dilanjutkan dengan pengamatan. Semua hasil pengamatan dicatat menggunakan instrumen Lampiran. 3 dan didokumentasikan menggunakan kamera dan video rekaman.

Pengamatan diarahkan pada setiap bagian saluran cerna terhadap keberadaan larva utuh dalam keadaan hidup atau mati. Jika larva tidak ditemukan asumsinya tercerna atau terbuang melalui *faces*. Tujuannya untuk



mendapatkan gambaran umum tentang keberadaan larva dalam saluran cerna.

Data pengamatan dianalisis secara diskriptif. Hasilnya dijadikan acuan bagi penetapan perlakuan pra eksperimen ke-2.

3). Penelitian pra eksperimen ke-2

Penelitian pra eksperimen ke-2 menggunakan 7 perlakuan dengan 3 ulangan, rinciannya sebagai berikut:

1. D : 2 jam paska infeksi
2. E : 3 jam paska infeksi
3. F : 4 jam paska infeksi
4. G : 5 jam paska infeksi
5. H : 6 jam paska infeksi
6. I : 7 jam paska infeksi
7. J : 8 jam paska infeksi

Pelaksanaan penelitian sebelum dan sesudah infeksi per oral sama dengan kegiatan 4.4.2 point (2). Semua larva yang diamati dicatat lokasi keberadaannya saat ditemukan menggunakan instrumen pada Lampiran. 3. Bila ditemukan larva melakukan invasi atau penetrasi maka pengamatan difokuskan pada bagian saluran cerna tersebut.

Dasar penentuan organ target yang akan dijadikan obyek pengamatan pada penelitian observasional adalah bagian saluran cerna yang pada seluruh perlakuan dan ulangannya setelah pembedahan bebas dari cacing gilik. Larva yang melakukan invasi diawetkan untuk identifikasi morfologi, prosedurnya mengikuti petunjuk 4.4.1 point (1). Identifikasi pada tahap ini bertujuan untuk memastikan bahwa larva berasal dari genus Anisakis atau cacing lainnya yang secara alamiah ada pada tikus.



4). Penelitian observasional

Dasar pertimbangan menggunakan penelitian observasional kohort karena larva bersifat musiman, jumlah dan kondisi larva yang memenuhi syarat untuk perlakuan terbatas. Berdasarkan kegiatan pra eksperimen ke-1 dan pra eksperimen ke-2 maka saluran cerna yang dapat dijadikan obyek pengamatan adalah lambung. Artinya, yang diamati adalah pengaruh paparan (faktor risiko) terhadap kerusakan jaringan lambung (efek).

Prosedurnya mengikuti point 4.4.2 point (2), 7 ekor tikus diinfeksi masing-masing dengan 10 L3 *A. typica* terseleksi. Berdasarkan pengamatan pra eksperimen menggunakan infeksi 5 individu larva ditemukan sekitar 1% larva melakukan penetrasi. Dosis ini dinilai tidak maksimal untuk menjelaskan hubungan antara infeksi dengan risiko yang ditimbulkan sesuai dengan tujuan yang akan dicapai. Sebab itu dosis infeksi ditingkatkan menjadi 10 individu larva.

Waktu pengamatan dimulai dari:

- | | | |
|------|---|---------------------|
| 1. K | : | 2 jam paska infeksi |
| 2. L | : | 3 jam paska infeksi |
| 3. M | : | 4 jam paska infeksi |
| 4. N | : | 5 jam paska infeksi |
| 5. O | : | 6 jam paska infeksi |
| 6. P | : | 7 jam paska infeksi |
| 7. Q | : | 8 jam paska infeksi |

Sesuai perlakuan setelah infeksi dilakukan etanasi dan nekropsi sesuai 4.4.2 point (3) untuk mengamati keberadaan larva pada bagian lambung.

Pengamatan difokuskan pada keberadaan larva dalam keadaan hidup atau mati.

Pencatatan menggunakan instrumen yang sama pada penelitian pra eksperimen.

Selain itu yang menjadi target dari penelitian ini adalah mengamati invasi atau penetrasi larva pada permukaan dinding lambung.

Organ lambung dipisahkan dari bagian saluran cerna lainnya kemudian dilakukan *dissection* dan pengamatan terhadap keberadaan larva. Dinding

lambung yang ditemukan larva hidup, atau larva mati, atau larva hidup yang melakukan penetrasi, jaringannya diambil sebagian dan diawetkan dalam formalin 10% untuk analisa histopatologi menggunakan pewarnaan HE.

Beberapa larva diambil untuk identifikasi morfologi mengikuti petunjuk 4.4.1 point (1) tujuannya memastikan larva berasal dari genus Anisakis. Sebagai pembanding, lambung dari tikus kelompok kontrol juga di analisa histopatologi.

Analisa histologi menggunakan pewarnaan HE mengacu pada Ross and Pawlina. (2011).

5). Analisis data histopatologi

Metode pemeriksaan menggunakan skoring derajat kerusakan lambung menurut metode Barthel *et al.* (2003) yang dimodifikasi.

Tabel 4.1. Skor lesi histopatologik

Bentuk lesi	Skor	Keterangan
A. Kerusakan Epitel	0	Tidak terjadi perubahan histopatologi
	1	Terjadi pengelupasan epitel
	2	Terjadi Erosi yaitu jika jumlah nekrosis sel epitel antara 1 - 10 sel
	3	Terjadi Ulcerasi yaitu jika jumlah nekrosis sel epitel >10 sel
B. Hiperemia /hemoragi	0	Tidak terjadi perubahan histopatologi
	1	Jika hiperemia terjadi pada < 1/3 jumlah pembuluh vaskuler
	2	Jika hiperemia terjadi pada antara 1/3 – 2/3 jumlah pembuluh vaskuler
	3	Jika hiperemia terjadi pada > 2/3 jumlah pembuluh vaskuler
C. Inflamasi	0	Jika jumlah sel Poly Morpho Nuclear (PMN) < 5 sel
	1	Jika jumlah sel PMN antara 6 – 20 sel
	2	Jika jumlah sel PMN antara 21 – 60 sel
	3	Jika jumlah sel PMN antara 61 – 100 sel dengan infiltrasi hingga lamina propia
	4	Jika jumlah sel PMN > 100 sel dengan infiltrasi hingga lamina propia
D. Jumlah Mucous cap Sel	0	Jika jumlah Mucous cap sel > 40 sel/LP 1000x: Jumlah sel goblet > 28/10 LP 400X
	1	Jika jumlah Mucous cap sel 24-39 sel/LP 1000x: Jumlah sel goblet 11-27/10 LP 400X
	2	Jika jumlah Mucous cap sel 12-23 sel/LP 1000x: Jumlah sel goblet 1-10/10 LP 400X
	3	Jika jumlah Mucous cap sel > 12 sel/LP 1000x: Jumlah sel goblet < 1/10 LP 400X



Derajat kerusakan dari setiap sampel ditentukan dengan cara menjumlahkan seluruh skor dari 4 (empat) jenis lesi histopatologik seperti pada tabel 4.1. Pemeriksaan preparat menggunakan mikroskop cahaya biasa merk Nikon H600L yang dilengkapi dengan digital camera DS Fi2 300 megapixel dan software pengolah gambar Nikkon Image System. Analisa gambar jaringan mengacu pada Aughey and Frye. (2001). Berdasarkan metode pemeriksaan ini maka Skor derajat kerusakan organ yang terjadi berada pada kisaran 0 – 13, dengan interpretasi sebagai berikut :

Total skor 1-2 : Belum nampak peradangan (normal pada tikus SPF).

Total skor 3-4 : Peradangan Ringan.

Total skor 5-8 : Peradangan Sedang.

Total skor 9-13 : Peradangan Berat.

Sebagai data tambahan untuk mempertajam pembahasan dilakukan analisa terhadap jaringan usus menggunakan skoring lesi patogenik yang dimodifikasi merujuk pada Klopffleisch. (2013). Datanya akan dibandingkan dengan perubahan jaringan yang terjadi pada dinding lambung. Analisis data dilakukan secara diskriptif dengan membandingkan gambaran histopatologik bagian lambung yang terpapar dengan bagian yang sama pada kelompok tanpa paparan. Dengan demikian diperoleh bukti ada atau tidaknya infeksi pada lambung.

4.4.3. Tahap III: Mengukur jumlah total IgE dan sel eosinofil pada tikus yang terpapar L3 *A. typica* mati dalam keadaan segar dan beku

1). Persiapan larva

Koleksi L3 *A. typica* sama dengan pada prosedur 4.4.2 point (1). Larva yang akan digunakan dicuci berulang kali dengan NaCl fisiologis. Selanjutnya, untuk perlakuan menggunakan larva segar: larva dalam kondisi hidup digerus.

Sedangkan untuk perlakuan menggunakan larva beku, larva dalam kondisi hidup dibekukan selama 48 jam pada suhu -20°C setelah itu digerus. Hasil gerusan diberikan per oral menggunakan *feeding needle*.

2). Infeksi per oral

Penetapan perlakuan waktu pengamatan didasarkan pada hasil penelitian pra eksperimen. Pada penelitian pra eksperimen ke 1, 24 jam setelah infeksi larva tidak ditemukan pada tubuh tikus. Selanjutnya pada penelitian pra eksperimen ke 2, 8 jam setelah infeksi larva tidak ditemukan pada lambung tetapi pada usus dan kolon. Sehingga diprediksikan setelah 8 jam yaitu: 10 dan 12 jam sebelum meninggalkan tubuh tikus, larva masih mampu menginduksi peningkatan total IgE dan jumlah sel eosinofil.

Pertimbangan lainnya parameter IgE dan eosinofil hasilnya akan menjelaskan potensi bahaya alergi berkaitan dengan reaksi hipersensitivitas tipe I. Reaksi tipe I disebut juga reaksi cepat yang timbul segera setelah tubuh terpajan alergen. Selain itu, kami menggunakan data sekunder yang menjelaskan bahwa 4-6 jam setelah konsumsi terjadi respons imun kemotatik antara antigen *A simplex* dengan eosinofil dan induksi respons hipersensitivitas baru terjadi setelah itu (Audicana and Kennedy, 2008). Sebab itu perlakuan dimulai pada 8 jam setelah infeksi.

Tikus diambil secara acak dengan pertimbangan bahwa kedua kelompok mempunyai sifat dan kriteria yang sama. Tikus yang digunakan dalam penelitian ini berjumlah 21 ekor tikus, terdiri dari 18 tikus kelompok perlakuan dan 3 tikus kelompok kontrol. Masing-masing perlakuan dan kontrol ada 3 kali ulangan, rinciannya sebagai berikut:



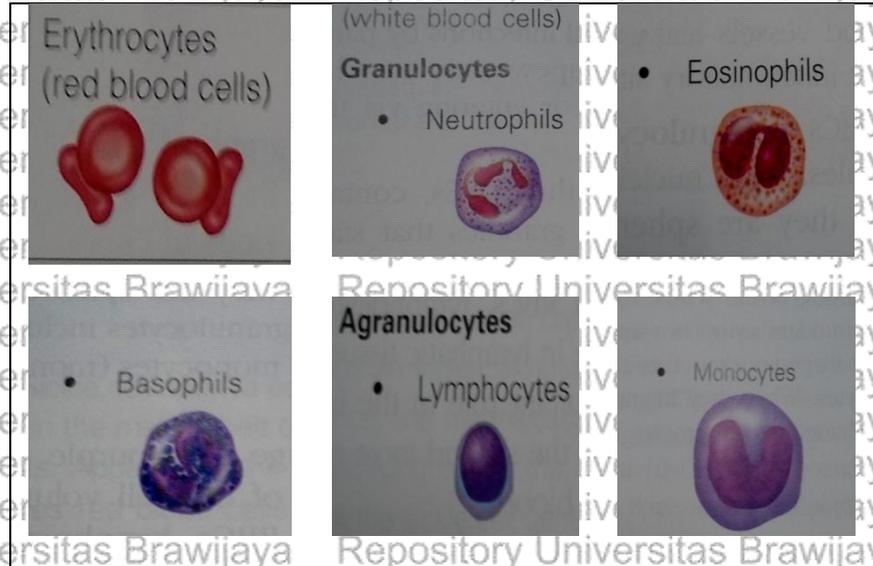


Pemberian L3 <i>A typica</i> segar	A _s :	8 jam setelah infeksi per oral
	B _s :	10 jam setelah infeksi per oral
	C _s :	12 jam setelah infeksi per oral
Pemberian L3 <i>A typica</i> beku	A _b :	8 jam setelah infeksi per oral
	B _b :	10 jam setelah infeksi per oral
	C _b :	12 jam setelah infeksi per oral
Kontrol	D :	Akhir

Tikus ditempatkan dalam kandang sesuai perlakuan dan diberi makan dan minum secara *ad libitum*. Setiap tikus diberi 10 individu L3 *A typica*. Jumlah larva yang diberikan merupakan dosis tunggal. Jumlah ini didasarkan pada dosis infeksi primer dari penelitian-penelitian sebelumnya. Selain itu, keterbatasan jumlah larva juga menjadi pertimbangan penggunaan dosis tunggal. Larva yang telah digerus dicampur NaCl fisiologis kemudian diberikan per oral menggunakan *feeding needles* 7 cm ke tikus. Setelah perlakuan, tikus tetap diberi makan dan minum seperti biasa. Sesuai waktu yang telah ditentukan dilakukan pengambilan darah melalui vena ekor. Jumlah sampel darah yang diambil sebagai berikut: 1,5 µl untuk pengukuran total IgE dan 1 tetes untuk hapusan preparat eosinofil per setiap tikus, dilakukan duplo.

3). Pengukuran jumlah sel eosinofil

Pengukuran eosinofil mengikuti petunjuk dari Houwen. (2000) dimodifikasi. Buat preparat apusan secara duplo pada gelas obyek dan keringkan slide sekitar 60 menit. Fiksasi obyek gelas berisi apusan darah (*blood smear*) dengan methanol atau ethanol. Selanjutnya tetesi slide dengan eosin dan inkubasi selama 5 menit pada suhu ruang. Bilas dengan ethanol, teteskan 1% *methylene blue* pada slide dan inkubasi selama 5 menit pada suhu ruang. Bilas dengan air mengalir dan keringkan.



Gambar 4.6. Bentuk dan tipe sel darah (Marieb, 2007).

Perhitungan eosinofil dilakukan dengan mengamati bentuk sel darah dibawah mikroskop cahaya ECLIPSE E 100 Nikon. Pengamatan sel darah mengacu pada gambar 4.6. Pengamatan untuk setiap ulangan adalah 2 preparat yang mana masing-masing preparat terdiri dari 3 lapang pandang.

4). Pengukuran total IgE

Sampel darah dikumpulkan dengan cara *venipuncture* ke dalam mikrotube 1,5 μ l. Untuk memisahkan plasma dengan serum darah maka mikrotube diletakan dengan kemiringan 45° selama 3 jam. Setelah itu dilakukan setrifuge pada 3000 rpm selama 10 menit. Kemudian, serum darah dipindahkan ke dalam mikrotube baru dan dibekukan pada suhu -20°C sampai saat digunakan.

Pengukuran total IgE menggunakan marker kit RAT IgE ELISA ICI dengan no katalog E-25E Lot # 11 (untuk penentuan IgE pada serum tikus). Sebelum pengukuran dilakukan persjapan marker sesuai petunjuk kit, meliputi: *running buffer*, *wash solution*, *enzyme-antibody conjugate* dan kalibrasi standar rat IgE.

Selanjutnya, prosedur pengukuran total IgE sebagai berikut:



5). Intepretasi hasil

Penentuan konsentrasi IgE diawali dengan pembuatan kurva baku rat IgE. Nilai konsentrasi standar dan absorbansi standar dilog dan dibuat kurva standar dengan log konsentrasi pada sumbu x dan log absorbansi pada sumbu y (persamaan kurva baku). Selanjutnya, nilai log konsentrasi sampel dan log absorbansi sampel dimasukkan ke dalam persamaan kurva baku untuk mendapatkan nilai konsentrasi IgE sampel.

6). Analisa data

Pembahasan tentang hubungan antara paparan dengan peningkatan total IgE, jumlah sel eosinofil menggunakan ANOVA (Program SPSS 19). Hubungan antara keduanya menggunakan Korelasi Pearson.

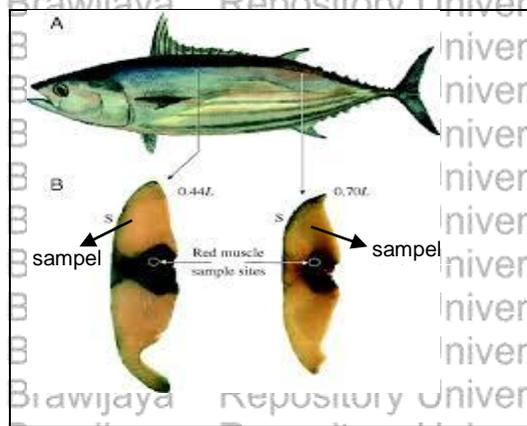
4.4.4. Tahap IV: identifikasi perbedaan ekspresi protein daging cakalang yang terinfeksi dan tidak terinfeksi serta L3 *A. typica*

1). Persiapan sampel

Daging cakalang dengan ukuran dan cirri fisik (tingkat kesegaran) yang sama seperti dijelaskan pada point 4.2.1 disimpan dalam larutan PBS kemudian dibekukan pada suhu -20°C . Selain daging ikan, sejumlah larva L3 *A. typica* disimpan dengan cara yang sama untuk dianalisa. Sampel daging adalah daging putih dengan pertimbangan bahwa bagian ini yang biasanya dikonsumsi dalam keadaan mentah. Sampel daging ikan terdiri atas 2 yaitu: sampel daging ikan yang tidak terinfeksi (F_{ni}) dan daging ikan yang terinfeksi (F_i), masing-masing dibuat duplo.

Sampel daging ikan diambil dari otot bagian bawah antara sirip dorsal pertama dan sirip dorsal kedua, seperti pada gambar 4.7. Analisa hanya dilakukan pada daging ikan segar yang tidak terinfeksi dan daging ikan segar yang terinfeksi larva nematoda. Pertimbangannya, secara visual daging ikan

segar dapat dengan mudah dinilai tingkat keseegarannya dibanding daging ikan beku. Hal ini dilakukan untuk menjamin homogenitas kualitas sampel.



Gambar 4.7. Bagian daging yang dijadikan sampel uji

2). Analisa SDS PAGE

Penentuan berat molekul dengan elektroforesis menggunakan SDS PAGE merujuk pada Aulanni'am. (2004) dan Laemmli. (1970). Keseluruhan prosesnya sebagai berikut:

- 1). Isolasi protein. Masing-masing sampel daging ikan ditimbang seberat 1 gr dan cacang 0,5 gr berat basah. Sampel digerus dalam keadaan dingin menggunakan mortar ditambahkan PBS TPMSF (*Tween Phenil Methil Sulfoid Fluoride*) ditambahkan juga pasir kuarsa. Hasil gerusan dimasukkan ke dalam tabung falcon dan disonivikasi 10 menit, dilakukan dalam keadaan dingin. Supernatant dipindahkan ke mikrotube, ditambahkan etanol absolut (1:1). Sentrifuge pada 4°C selama 15 menit pada 6000 rpm. Inkubasi pada -20°C semalam. Setrifuge pada 10.000 rpm, suhu 4°C selama 10-15 menit. Supernatan dibuang dan pelet diangin-anginkan sampai bau etanol hilang. Tambahkan Tris HCl 0,02 M, pH 6,8 dengan perbandingan 1:1. Selanjutnya dilakukan pengukuran





konsentrasi isolat protein menggunakan nanophotometer. Data ini untuk menyamakan konsentrasi yang akan digunakan saat running. Konsentrasi terendah akan dipakai sebagai patokan.

2. Persiapan gel. Buat plat gel dengan merangkai dua plat kaca dengan jarak antara plat 1 mm. Dua lapis gel dibuat sebagai tempat pengumpulan sampel (*stacking gel*) dan media untuk pemisahan protein (*separating gel*). Masukkan campuran *separating gel* menggunakan mikropipet ke dalam plate (tempat lapisan gel). Biarkan 10-30 menit hingga terbentuk gel. *Stacking gel* selanjutnya dituang di atas *separating gel* sambil dipasang sisir hingga terbentuk gel berikut sumurannya. Didiamkan selama 30 menit. Setelah gel terbentuk, sisir diangkat dengan hati-hati. Kemudian plate dipasang pada alat elektroforesis, selanjutnya buffer dituangkan pada bejana elektroforesis (Aulanni'am, 2004).

3. Injeksi sampel. Sejumlah 10 μL sampel isolat protein ditambah 10 μL Tris-cl + 20 μL RSB (*Reducing Sample Buffer*), dan dimasukkan ke dalam mikrotube, kemudian dipanaskan dalam pemanas air pada suhu 100 $^{\circ}\text{C}$ selama 3 menit. Setelah didinginkan sampel dimasukkan dalam sumur-sumur gel dengan volume 20 μL untuk tiap sumur. Setelah itu anoda dihubungkan pada reservoir bawah dan katoda dihubungkan pada reservoir atas. *Power supply* dihidupkan dengan arus listrik sebesar 30 mA dan 130 V. Proses pemisahan (*running*) dihentikan setelah warna biru



dari penanda mencapai ketinggian 0,5 cm dari batas bawah plat gel.

4. Pewarnaan dan pecucian gel. Pewarnaan dilakukan dengan merendam gel dalam larutan *staining* selama 30-60 menit.

Penghilangan warna dilakukan dengan merendam gel dalam larutan *destaining* sambil digoyangkan dengan penggoyang otomatis sampai gel menjadi jernih. Kemudian hasil elektroforesis discan.

5. Penentuan berat molekul. Dengan membandingkan hasil elektroforesis sampel dengan marker protein. Penentuan berat molekul dilakukan dengan menghitung nilai R_f (*Retardation factor*) dari masing-masing pita dimana:

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

Selanjutnya nilai berat molekul (BM) di log dan dibuat kurva regresi (persamaan 1) antara BM dan log BM dan R_f . Untuk mendapatkan persamaan regresi diolah menggunakan software dan hasilnya digunakan untuk menentukan BM dari sampel. BM sampel diketahui setelah penentuan R_f dari masing-masing pita sampel. Selanjutnya, nilai R_f dimasukkan ke persamaan 1 (nilai log BM). Kemudian dibuat kurva standar dengan harga R_f sebagai sumbu x dan harga logaritma berat molekul sebagai sumbu y. Berat molekul sampel ditentukan dengan diinterpolasikan pada kurva standar dari protein marker. Identifikasi protein dari berat molekul sampel merujuk kepada data sekunder.



BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Identikasi jenis larva nematoda yang menginfeksi cakalang

5.1.1. Prevalensi dan intensitas infeksi

Larva Anisakid dikoleksi dari 31 ekor ikan cakalang yang tertangkap pada bulan Oktober 2013 dengan total prevalensi 100%. Jumlah larva yang terkumpul 2048 individu dengan intensitas rata-rata 66,06 individu/ikan, rinciannya pada tabel 5.1.

Tabel 5.1. Distribusi dan intensitas rata-rata larva Anisakid yang diisolasi dari ikan Cakalang di Perairan Laut Sawu

No	Bagian yang terinfeksi	Distribusi (%)	Intensitas (individu/ikan)
1.	Daging	0,24	1,25
2.	Dinding perut	3,71	6,33
3.	Organ dalam (lambung, hati, gonad, empedu)	96,04	63,45
Total		100	66,06

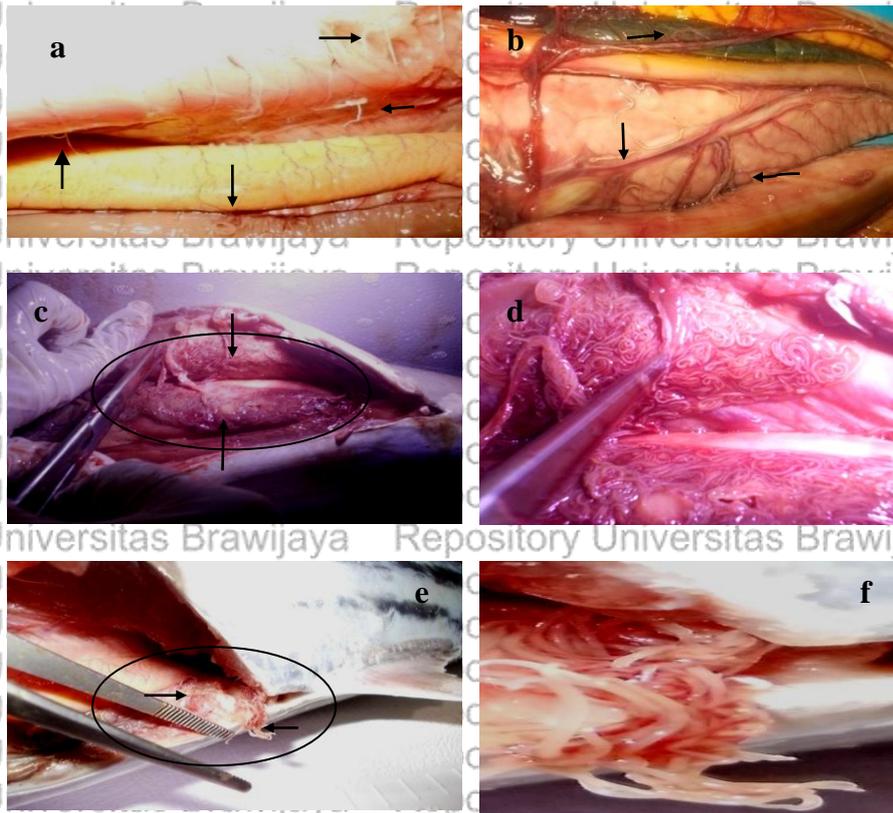
Sumber: diolah dari Lampiran 5

Larva berwarna putih, ditemukan menempel pada bagian-bagian yang terinfeksi, dengan distribusi dan intensitas infeksi yang berbeda. Larva tidak ditemukan dalam suspensi saluran cerna tetapi umumnya menempel dalam kondisi terenkapsulasi pada bagian luar organ dalam. Larva yang ditemukan dalam kondisi enkapsulasi, posisinya tidak bergerak atau berada dalam keadaan diam dengan bentuk badan melingkar pada tempat ia menempel. Sebagian larva ditemukan terkonsentrasi di bagian anus dalam kondisi tidak terenkapsulasi.

Secara visual larva menyebabkan kerusakan jaringan ditempat ia menempel.

Ciri khusus dari populasi, ketika intensitas infeksi tinggi, larva dijumpai dalam bentuk kelompok atau bergerombol, padat dan saling tumpang tindih. Sementara

larva yang tidak terenkapsulasi teramati bergerak aktif dan cenderung berkelompok di daerah sekitar anus. Umumnya larva yang terenkapsulasi, tidak bergerak dan melingkarkan tubuhnya. Sedangkan yang tidak terenkapsulasi ditemukan bergerak bebas. Gambaran derajat infeksi pada dinding bagian luar saluran cerna ikan cakalang disajikan pada gambar 5.1.



Gambar 5.1. Bagian ikan cakalang yang terinfeksi. Keterangan: a,b: Intensitas infeksi rendah, beberapa larva ditemukan pada lapisan bagian luar organ dalam. c,d,e,f: Intensitas infeksi tinggi; ratusan larva berkelompok, terenkapsulasi dan menempel menutupi permukaan dinding perut dan lapisan bagian luar organ dalam (c,d). Larva berkelompok dan tidak terenkapsulasi pada bagian anus (e,f). (Camera Nikon CoolPIX 1,23, pembesaran 14x).

Ikan yang intensitas infeksinya rendah, larva biasanya ditemukan terenkapsulasi hanya pada satu atau beberapa dinding bagian luar organ perut dan tidak pada otot dinding perut. Sedangkan bila intensitas infeksi tinggi, larva



dijumpai menyebar di dinding bagian luar semua organ perut, otot dinding perut dan area anus. Infeksi tidak ditemukan pada bagian lain seperti insang tetapi hanya pada saluran cerna dan daerah sekitarnya.

Larva masuk melalui rantai makanan ketika ikan cakalang mengkonsumsi ikan-ikan pelagis kecil. Pelagis kecil diduga sebagai *transport host* yang kemudian bertransmisi ke cakalang sebagai *intermediate host*. EFSA (2010) menjelaskan awalnya larva masuk melalui rantai makanan dan beberapa kali melakukan transmisi pada *transport host* kemudian ke *intermediate host*. Ketika terinfeksi ada respons imun dari ikan cakalang yang bertujuan untuk mengeluarkan larva dari tubuh melalui sekresi lendir pada usus, sesuai penjelasan Roitt *et al.* (2004) pada gambar 2.4.

Larva akan mengembangkan mekanisme pertahanan untuk tetap hidup dalam tubuh inang melalui adaptasi fisiologis. Adaptasinya: pertama, larva keluar dari dan melalui penetrasi saluran cerna. Kedua, larva menempel pada bagian dinding luar saluran cerna kemudian terenkapsulasi. Ketiga, bagi larva yang belum berhasil mendapatkan tempat untuk menempel ditemukan bergerak bebas pada bagian dalam perut atau berkelompok pada bagian anus.

Enkapsulasi merupakan bagian dari respons inang (*defensif reaction*) untuk melawan efek bahaya dari infeksi larva, menetralkan racun dan untuk tetap bertahan hidup. Adaptasi fisiologis dan mekanisme reaksi defensif yang dikembangkan oleh larva dan inang ditunjukkan pada gambar 5.1. Gambar 5.1.c dan d kondisi intensitas infeksi tinggi, larva berkelompok, terenkapsulasi dan saling tumpang tindih pada bagian luar dinding organ dalam dan dinding perut ikan dengan bentuk tubuh melingkar. Pada posisi ini larva terkesan mati tetapi sebenarnya mereka berdiam diri dalam keadaan hidup. Grabda (1991)



menjelaskan ketika terinfeksi, inang mencoba untuk mengisolasi parasit dengan kapsul jaringan ikat (enkapsulasi) supaya terlindung dari dari metabolit dan racun yang disekresikan larva. Gambar 5.1. e dan f intensitas infeksi tinggi, larva bergerombol pada bagian anus tetapi tidak berada dalam kondisi enkapsulasi. Ini adalah upaya yang dilakukan untuk menemukan tempat menempel atau kondisi lingkungan yang sesuai untuk bertahan hidup. Sepertinya enkapsulasi hanya terjadi ketika larva berikatan atau menempel pada jaringan ikan. Jadi mekanisme defensif terjadi setelah larva menempel dan terikat pada jaringan.

Kami menduga penempelan larva berkaitan dengan kompetisi terhadap ruang. Artinya mereka masih mencari atau belum menemukan tempat atau kondisi yang sesuai untuk menempel dan tetap hidup. Bila tersedia ruang yang cukup untuk menempel maka proses enkapsulasi dapat terjadi. Menurut Bruschi and Chimiento (2011); Parker, Ball and Chub (2009), enkapsulasi merupakan adaptasi mutualisme antara *host* dan parasit. Strategi yang dilakukan oleh keduanya untuk mengurangi angka kematian dan menjamin kelangsungan hidup

Ketika berada dalam proses enkapsulasi larva berada dalam keadaan anabiosis yaitu mengacu pada keadaan tidak aktif dimana metabolisme dan aktifitas melambat sebagai respons terhadap tekanan lingkungan. Pada kasus ini, adaptasi yang dilakukan terhadap tekanan dan perubahan lingkungan yaitu agrerasi dan anabiosis. Anabiosis larva dalam keadaan tidak terenkapsulasi juga menjadi dasar bagi mekanisme pertahanan yang dilakukan inang. Banyak spesies nematoda bertahan hidup dengan kondisi yang kurang menguntungkan melalui mekanisme anydrobiosis, cryptobiosis, osmobiosis atau cryobiosis. Keberhasilan mereka dalam ekosistem antara lain kemampuan adaptasi fisiologis (Tahseen, 2012). Ada juga spesies nematoda melakukan agregasi yaitu individu-individu bersama membentuk kelompok atau bergerombol atau

akumulasi dalam jumlah besar yang diyakini berfungsi dalam proses adaptasi terhadap perubahan lingkungan (McSorley, 2003).

Sekitar 93% larva ditemukan dalam keadaan hidup baik dalam kondisi terenkapsulasi maupun tidak terenkapsulasi. Kami menduga selain anabiosis dan agregasi, ada hubungan antara kelangsungan hidup mereka dengan perubahan *post mortem* pada *host*. Larva adalah parasit sejati yang sangat bergantung pada suplai energi dari tubuh inang. Jadi selama energi dan kondisi lingkungan sesuai untuk mereka bertahan hidup, mereka akan tetap berada dalam tubuh inang sampai mati atau dikeluarkan dari tubuh oleh mekanisme respon imun.

Selain itu kemungkinan kelangsungan hidup mereka bergantung dari kondisi lambung ikan, berkaitan dengan pH lambung. Karena ikan bukanlah *defenitif host* dari *A. typica* maka faktor lingkungan pada *intermediate host* juga berpengaruh pada kemampuan adaptasi dan survival rate. Arizono *et al.* (2012) mempelajari tentang potensi patogenik dari *A. pegreffii* dan *A. simplex* (ss) yang dilokasi dari Chub mackerel menemukan bahwa *A. simplex* lebih toleran terhadap asam lambung buatan (pH 1.8) dibandingkan *A. pegreffii*. Angka kematian *A. simplex* (ss) 50% dalam 2,6 hari dan 1,4 hari untuk *A. pegreffii*. Kemampuan invasi di media agar oleh *A. simplex* (ss) lebih tinggi dibandingkan *A. pegreffii*.

Kelangsungan hidup *A. simplex* (ss) dan *A. pegreffii* juga dipelajari menggunakan asam lambung buatan (pH 1,8), suhu 37°C pada kondisi CO₂ 5%.

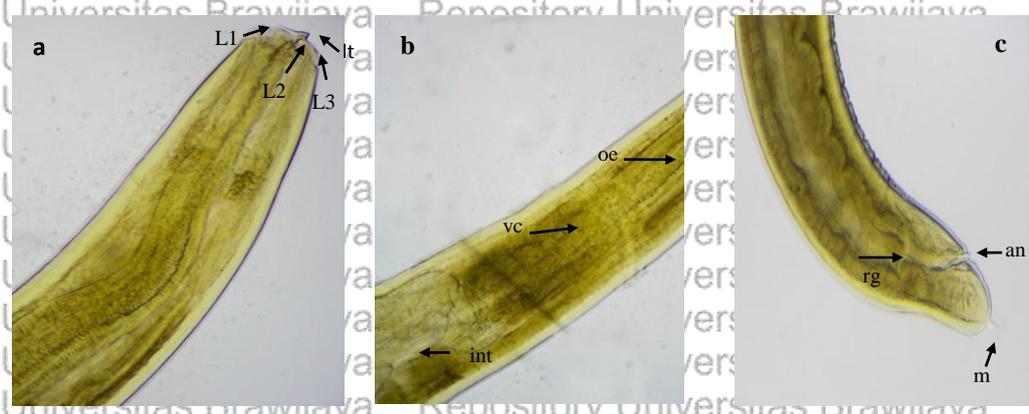
Secara signifikan menunjukkan tingkat kelangsungan hidup *A. simplex* (ss) lebih besar dari *A. pegreffii* (Hyeok-Jeon and Ho Kim, 2015). Kedua hasil penelitian ini menunjukkan bahwa setiap spesies memiliki kemampuan untuk bertahan hidup yang berbeda pada kondisi pH tertentu.



5.1.2. Identifikasi morfologi

Analisa morfologi yang dilakukan terhadap 40 individu larva yang diambil secara acak menunjukkan struktur eksternal larva berwarna putih dan bentuk tubuh memanjang, silinder, bentuk melingkar (*spindle shaped*), meruncing pada bagian anterior dan posterior. Rata-rata panjang tubuh 12,07±6,85 mm dengan kisaran antara 7,28~20,27 mm.

Struktur internal morfologi larva nematoda yang diisolasi disajikan pada gambar 5.2, bagian tubuh terdiri atas 3 bagian utama yaitu: *cephalic*, *digestive tract* dan *caudal*. Bagian A adalah *cephalic* atau bagian yang berkaitan dengan kepala menggambarkan bahwa nematoda memiliki 3 bibir disekitar mulut dan bagian atas kepala terdapat gigi. Bagian B adalah saluran pencernaan yang terdiri atas oesophagus, ventriculus dan intestin.



Gambar 5.2. Bentuk internal morfologi larva nematoda. Keterangan: a. Bagian *cephalic*; b. *digestive tract*; c. bagian *caudal*. Singkatan: Lt. *larval tooth*; L. *Lips* (L1,L2,L3); oe.oesophagus; vc.ventriculus; int.intestin; rg.rectal gland; an.anus; m. mucron (Light microscope model ECLIPSE E 100 Nikon, BE Plan 10x/0,25, pembesaran 10x)

Bagian C adalah *caudal* atau ekor terdiri atas *rectal gland*, anus dan diakhiri dengan mucron. Saluran cerna dan ekor merupakan bagian yang terpenting karena digunakan sebagai dasar untuk mengidentifikasi nematoda pada tingkat



genus. Bila diamati dari bentuk saluran cerna dan bentuk ekor, sesuai penjelasan Grabda, 1991., Harwitch, 1974 dan Iglesia *et al.*, 1995, nematoda dalam penelitian ini diidentifikasi sebagai larva dewasa stadia tiga (L3) dari famili Anisakidae. Harwitch, (1974) mengklasifikasikannya atas subfamily Anisakinae, genus Anisakis.

Sayatan melintang larva dewasa stadia 3 oleh Grabda. (1991) dijelaskan terdiri dari: oesophagus, pertemuan antara ventriculus dan intestin, dan bagian tengah intestin. Secara teknis sulit untuk menentukan dengan tepat ketiga bagian ini, sehingga beberapa bagian diambil secara acak untuk mengetahui gambaran histologi sayatan melintang larva. Gambaran histologi yang paling jelas dipilih untuk memperkuat identifikasi perkembangan stadia larva, disajikan pada gambar 5.3.



Gambar 5.3. Sayatan melintang bagian tengah intestine (int) larva nematode

Gambar 5.3. menjelaskan bahwa sayatan melintang ini adalah bagian tengah dari intestin larva. Hal ini memperkuat hasil indentifikasi internal morfologi pada gambar 5.2; jadi nematoda yang diisolasi adalah *Anisakis spp* stadia 3. Karakter internal morfologi lainnya disajikan pada table 5.2.

Tabel 5.2. Ukuran karakter morfologi dari L3 *Anisakis spp* yang diisolasi dari ikan Cakalang dari Perairan Laut Sawu.

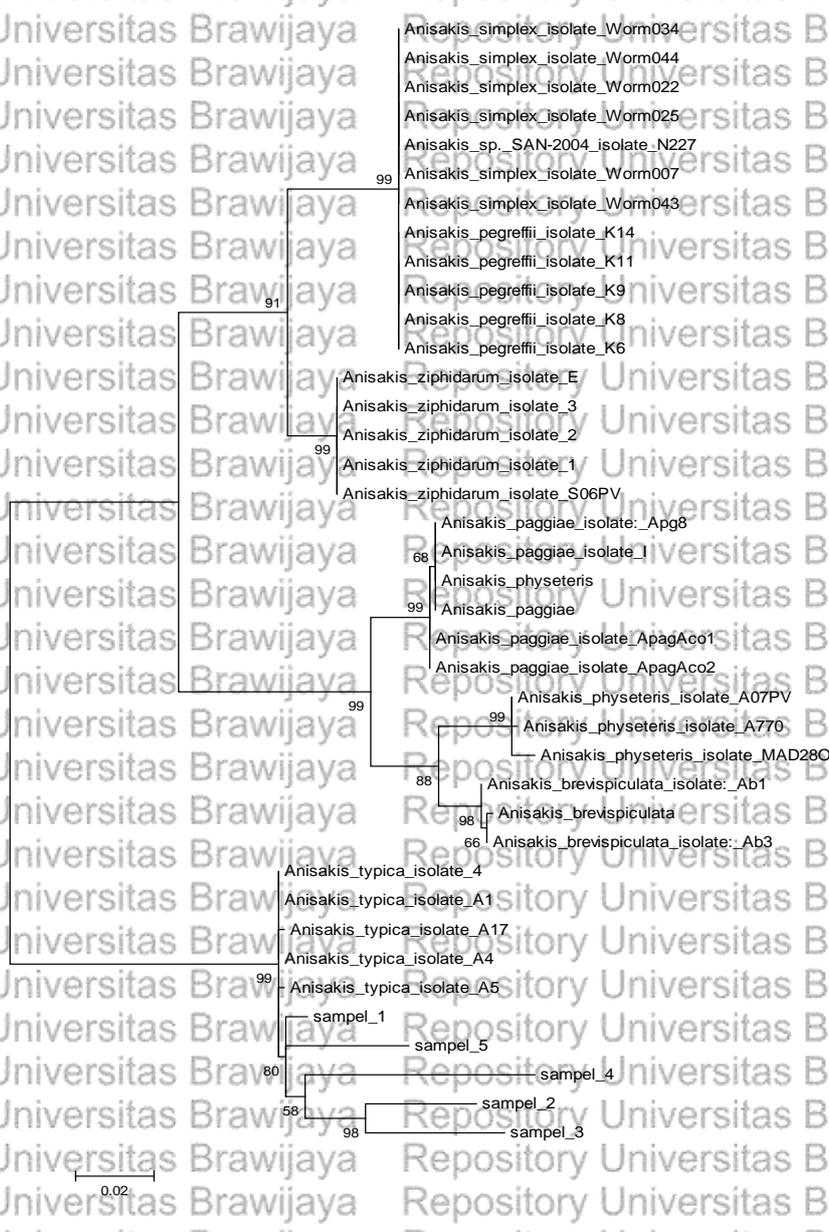
Karakter Morfologi	Ukuran (mm) (Rata-rata±Sd, (Kisaran))
Jumlah cacing	40
Panjang Total Badan	12,07±6,85 (7,28~20,27)
Lebar Maksimum Badan	0,37±0,14 (0,24~0,69)
Panjang Oesophagus	0,10±0,02 (0,06~0,13)
Panjang Ventriculus	0,05±0,001 (0,01~0,07)
Lebar Ventriculus	0,02±0,003 (0,01~0,02)
Rasio antara Oesophagus dan Ventriculus	1:1,03.1:9,36
Panjang Ekor	0,02±0,004 (0,01~0,03)
Panjang Mucron	0,002±0,0004 (0,001~0,003)

Sumber: diolah dari Lampiran 6

5.1.3. Identifikasi molekuler

Hasil amplifikasi PCR pada gel agarose 1,5% menunjukkan bahwa 5 sampel acak (sampel 1-5) L3 Anisakid tervisualisasi pada fragment 400 bp (Lampiran 3). Analisis nilai similaritas antara *A. typica* (pada gen bank) dengan sampel 1-5 dapat dijelaskan sebagai berikut; sampel 1: 99%, sampel 2: 95%, sampel 3: 94%, sampel 4: 93% dan sampel 5: 96%. Artinya sampel 1-5 memiliki nilai similaritas antara 93% sampai 99% dengan *A. typica*. Kesimpulannya sampel larva nematoda yang dikoleksi dari ikan Cakalang dari Perairan Laut Sawu adalah spesies *A. typica*. Kekerbatan *A. typica* dengan sampel penelitian dibuktikan melalui pohon filogenetik pada gambar 5.4.





Gambar 5.4. Pohon filogenetik dari *A. typica* dan sampel penelitian

Identifikasi morfologi dan molekuler terhadap keberadaan larva anisakid pada Perairan Laut Sawu, merupakan proses ilmiah pertama dalam analisis risiko yang disebabkan oleh agen biologi parasit L3 *A. typica* terhadap cakalang sebagai produk konsumsi. Proses ini merupakan studi awal untuk kepentingan pemetaan distribusi geografis, epidemiologi dan keamanan pangan.



5.1.4. Potensi bahaya *A typica*

Berdasarkan hasil identifikasi maka *A typica* masuk ke tubuh ikan (*port of entry*) dan menginfeksi ikan (*port of infection*) pada stadia 3. Hasil pengamatan menjelaskan infeksi pada daging kemungkinan disebabkan oleh: (1) Infeksi yang tinggi pada saluran cerna khususnya pada otot dinding perut. Tingginya intensitas larva per individu ikan menyebabkan kompetisi terhadap ruang bagi larva untuk menempel. Ketika saluran cerna dipenuhi larva maka sejumlah larva akan berpindah ke tempat lain seperti dinding perut, daging dan anus. (2)

Proses penanganan yang kurang hati-hati memudahkan larva berpindah ke daging, terutama bagi yang tidak terenkapsulasi.

Prevalensi L3 *A typica* pada daging ditemukan pada otot yang berdekatan dengan saluran cerna. Pada penelitian ini, prevalensi tertinggi ditemukan pada ikan-ikan berukuran ≥ 60 cm. Pada ikan-ikan berukuran besar, transmisi larva menyebabkan akumulasi yang ekstensif, terutama jika dihubungkan dengan jumlah inang pada perairan, kebiasaan makan sebagai karnivora, ukuran dan umur. Rantai ini penting dipahami untuk tindakan pengendalian dalam proses penanganan. Meskipun prevalensi L3 *A typica* pada daging rendah dan belum dilaporkan secara spesifik menyebabkan anisakiasis namun perlu diwaspadai karena kemampuan invasi ketika berada pada *intermediate host*. Kemampuan tersebut berpotensi terjadi pada manusia ketika mengkonsumsi ikan yang terinfeksi dalam keadaan mentah atau setengah masak.

Distribusi dan intensitas L3 *A typica* pada bagian tubuh ikan memberikan penjelasan tentang keberadaan larva saat berada pada *intermediate host*.

Gambaran ini dapat digunakan sebagai informasi dasar untuk pengembangan tindakan pengendalian dan pencegahan pada rantai penanganan dan pengolahan ikan cakalang. Tahap ini merupakan langkah pertama dari penilaian

risiko. Selanjutnya untuk mengetahui patogenitas dari *L3 A typica* harus dilakukan penelitian berkaitan karakterisasi dan memeperkirakan risiko yang mungkin berdampak bagi kesehatan. Thursfield. (2005) menjelaskan, penelitian observasional dapat digunakan untuk mengidentifikasi faktor risiko dan mengestimasi efek kuantitatif dan kontribusi beberapa komponen terhadap penyakit. Potensi risiko tersebut disajikan pada penelitian tahap berikut.

5.2. Kemampuan *L3 A typica* hidup menyebabkan kerusakan jaringan lambung tikus Wistar

5.2.1. Penelitian pra eksperimen ke-1

Penelitian pra eksperimen ke-1 menyelidiki infeksi larva hidup per oral, menemukan pada perlakuan A:24 jam, B:48 jam dan C:72 jam tidak dijumpai *L3 A typica* pada suspensi esophagus lambung, duodenum, jejunum, ileum dan kolon. Larva juga tidak dijumpai sedang melakukan invasi atau penetrasi atau yang menetap pada dinding dan bagian lain di sekitar saluran cerna. Larva hilang dari saluran cerna setelah 24 jam, 48 jam dan 72 jam paska infeksi (pi). Data ini digunakan sebagai dasar untuk menentukan waktu paska infeksi pada perlakuan pra eksperimen ke-2.

Setelah 24 jam pi, tidak ditemukannya lava dalam saluran cerna disebabkan oleh reaksi *host* dalam proses pengusiran cacing. Prosesnya, terjadi sekresi lendir dalam epitel usus dan meningkatkan permeabilitas epitel usus diikuti dengan proliferasi sel goblet yang meningkatkan sel lendir. Lendir yang dihasilkan akan membantu mengeluarkan cacing dari saluran cerna. Penelitian sebelumnya tentang infeksi *L3 A typica* pada tikus belum dilaporkan tetapi untuk larva *L3 A simplex* yang diinfeksi per oral pada tikus hilang dari tubuh setelah satu hari Amano *et al.* (1995) dan 1 minggu setelah infeksi Cho *et al.* (2005).

REPOSITORY.UB.AC.ID
 UNIVERSITAS BRAWIJAYA

 REPOSITORY.UB.AC.ID
 UNIVERSITAS BRAWIJAYA

 REPOSITORY.UB.AC.ID
 UNIVERSITAS BRAWIJAYA




L3 *A simplex* dan larva Anisakid lainnya memiliki siklus hidup yang sama dan kemiripan karakter morfologi. Setelah dilepas oleh mamalia laut, mereka bertransmisi ke beberapa *intermediate host* sebelum akhirnya pada *accidental host*. Ketika dilepas ke perairan, masuk ke *transport host*, *intermediate host* selanjutnya ke *accidental host* terjadi adaptasi fisiologi berulang akibat perbedaan kondisi lingkungan hidup. Perpindahan dari satu inang ke inang lainnya diduga menyebabkan menurunnya kemampuan larva untuk beradaptasi dan bertahan hidup lebih lama dalam saluran cerna. Pada *accidental host* terjadi respons imun dan ketika larva tidak berhasil melakukan adaptasi fisiologis maka mereka akan mudah dikeluarkan dari tubuh melalui anus. Tahap ini, larva tidak dijumpai dalam tubuh sehingga tidak ada gambaran tentang keberadaan larva pada saluran cerna.

5.2.2. Penelitian pra eksperimen ke-2

Hasil penelitian tentang terjadinya Anisakiasis akut setelah infeksi bervariasi, antara lain: 1-7 jam, 1-12 jam, 4-6 jam, 5-7 hari dan > 14 hari. Waktu pengamatan penelitian pra eksperimen ke-2 ditentukan atas pertimbangan penelitian sebelumnya dan hasil penelitian pra eksperimen ke-1. Berdasarkan pertimbangan tersebut maka ditetapkan waktu pengamatan adalah 2-8 jam.

Kisaran ini dilakukan dengan memperhitungkan faktor teknis pelaksanaan yaitu keterbatasan larva yang memenuhi syarat dan efisiensi dalam penggunaan hewan uji. Hasil penelitian pra eksperimen 2 disajikan pada tabel 5.3.

