

STUDI KOMPARATIF RESISTENSI ANTARA SAPI BALI DAN MADURA TERHADAP INFEKSI *Fasciola gigantica*

Ening Wiedosari

Balai Besar Penelitian Veteriner,
Jln. R.E. Martadinata 30 Bogor 16114 Tel. 0251-331048,
e-mail: eningwied@yahoo.com

ABSTRACT

Designing of future approaches for the control of Fasciola gigantica infection in cattle requires an understanding of the host-parasite relationships. This study was therefore undertaken to compare the susceptibility to infection with F. gigantica between Bali and Madura cattle. Seven Bali and seven Madura cattle were infected orally with 15 metacercariae of F. gigantica twice weekly for 32 weeks. Similar observations were made on four Bali and 4 Madura cattle maintained fluke-free as controls. The study shows that there was a trend of a lower fluke burden and faecal egg counts Madura cattle than in Bali cattle. The packed cell volume (PCV) values was significantly higher in infected Madura than in Bali cattle ($P < 0,05$). The increased of eosinophil cell response and the antibody isotypes immunoglobulin (Ig)G1 in Madura cattle were significantly higher than in Bali cattle ($P < 0,05$). These varying responses represent differences in host-parasite relationships between Bali and Madura cattle and may be linked to the observed varying levels of resistance to F. gigantica infection between these host.

Keywords: *Fasciola gigantica*, Resistance, Bali cattle, Madura cattle

PENDAHULUAN

Di Indonesia, ternak merupakan sumber lapangan kerja di samping sebagai sumber pangan dan penghasil bagi sebagian masyarakat petani di pedesaan. Di tingkat nasional, peternakan merupakan salah satu komoditas penunjang peningkatan pertumbuhan ekonomi masyarakat di masa sekarang dan mendatang.¹ Salah satu kendala yang sering menghambat keberhasilan suatu usaha peternakan adalah serangan penyakit. Fasciolosis merupakan penyakit parasiter pada ternak ruminansia yang menyerang organ hati dan disebut sebagai cacing hati (*liver fluke*). Di Indonesia parasit cacing yang menimbulkan penyakit ini adalah *Fasciola gigantica*, sedangkan di negara empat musim seperti Eropa dan Australia adalah oleh *Fasciola hepatica*.² Kejadian di Indonesia masih sangat tinggi, dapat mencapai 40–90%.³ Kerugian ekonomi akibat fasciolosis bisa mencapai kurang lebih Rp500 milyar setiap tahunnya yang berupa kematian, penurunan berat

badan, kehilangan tenaga kerja dan penurunan nilai jual khususnya hati.⁴

Sebagai negara tropis, Indonesia merupakan lingkungan yang baik bagi perkembangan parasit sehingga gangguan parasit pada ternak merupakan kendala biologis yang sulit diatasi, terutama pada peternakan tradisional. Teknik pengendalian parasit konvensional belum berhasil diterapkan pada peternakan tradisional karena memerlukan dukungan modal. Selain itu dapat menimbulkan masalah resistensi obat cacing serta terjadinya polusi lingkungan akibat pemakaian bahan-bahan kimia dan obat-obatan. Keadaan ini memotivasi para ahli untuk mencari cara pengendalian penyakit yang dianggap ramah lingkungan dan berkelanjutan, yaitu secara *genetic host resistance*. *Resistance* adalah kemampuan ternak untuk menghambat jumlah parasit yang bertahan hidup, tumbuh, dan berkembang biak. Beberapa indikator resisten yang sederhana yang telah diuji dalam percobaan infeksi cacing adalah jumlah cacing yang dapat ditemukan kembali saat

nekropsi, jumlah telur cacing dalam tinja, jumlah sel eosinofil dalam sirkulasi darah, *packed cell volume* (PCV), dan titer antibodi.⁵

Pemanfaatan *genetic host resistance* di dalam pengendalian parasit telah lama dikenal di dunia, seperti pemilihan bangsa hewan yang resisten terhadap infeksi parasit *Hemonchus contortus*.⁶ Beberapa penelitian telah dilakukan untuk melihat perbedaan kepekaan di antara bangsa sapi, antara lain *Bos indicus* yang lebih resisten terhadap *F. gigantica* daripada *Bos taurus*.⁷ Boyce *et al.*⁸ menemukan bahwa domba St. Croix dan Florida Nativ lebih resisten terhadap *F. hepatica* daripada domba Barbados Blackbelly. Domba West African Dwarf lebih resisten terhadap *F. gigantica* daripada kambing.⁹ Dari penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Wiedosari dan Copeman,¹⁰ diketahui bahwa domba ekor tipis Indonesia sangat tahan terhadap infeksi fasciolosis dan menurut Batubara,¹¹ Romjali¹² dan Romjali *et al.*¹³ domba ini pun tahan terhadap infeksi cacing lambung, *Hemonchus contortus*. Karena itu, tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui perbedaan resistensi antara sapi Bali dan Madura terhadap infeksi *Fasciola gigantica*, dimana dalam penelitian ini infeksi dilakukan secara berulang sehingga terjadi secara alamiah seperti di alam bebas.

BAHAN DAN METODE

Hewan Coba

Pada penelitian ini digunakan masing-masing 11 ekor sapi Bali dan Madura yang diketahui bebas dari infeksi *Fasciola gigantica*. Penelitian dilakukan di kandang percobaan Balai Besar Penelitian Veteriner di Bogor. Pada saat percobaan dimulai, sapi berumur sekitar 9 bulan, diberi pakan rumput *Penissetum purpureum* dan konsentrat. Masing-masing bangsa sapi dibagi menjadi dua kelompok, yaitu 7 ekor sebagai kelompok perlakuan (diinfeksi) dan 4 ekor sebagai kelompok kontrol (tidak diinfeksi). Seluruh sapi kelompok perlakuan diinfeksi metaserkaria cacing *Fasciola gigantica* secara oral dengan dosis 15 metaserkaria/hewan yang diinfeksi 2 kali/minggu selama 32 minggu. Setelah itu, semua sapi dibunuh dengan memotong vena jugularis pada leher pada minggu ke-36.

Parasit

Metaserkaria *F. gigantica* diperoleh dari siput *Lymnaea rubiginosa* yang dikoleksi dari Jawa Barat. Metaserkaria disimpan pada lembaran plastik yang direndam dalam botol berisi air pada suhu 14°C di laboratorium Parasitologi, Bbalitvet, Bogor. Menjelang infeksi, metaserkaria diperiksa viabilitasnya di bawah mikroskop-stereo dan selanjutnya dikumpulkan dalam botol Erlenmeyer yang berisi larutan 0,4% *carboxymethyl cellulose* (CMC) agar tidak menempel pada dinding botol. Larutan tersebut kemudian diambil dan disemprotkan secara merata pada kertas saring, lalu kertas saring tersebut dimasukkan ke dalam kapsul gelatin yang selanjutnya diinfeksi kepada sapi secara oral menggunakan *plastic infected gun*.

Penghitungan cacing, telur cacing, sel eosinofil dan *packed cell volume* (PCV)

Seluruh sapi dibunuh pada minggu ke-36 setelah infeksi mulai, dan hatinya dikoleksi. Kantong empedu dipisahkan dari hati, dan hati dihancurkan dengan tangan kemudian diberi air dan disaring. Selanjutnya hati dimasukkan ke dalam bak plastik berdasar hitam agar cacing hati yang berwarna putih dapat jelas dan mudah ditemukan. Seluruh cacing dikumpulkan dalam botol berisi air, panjang tubuh diukur dan dihitung jumlahnya. Pemeriksaan tinja terhadap telur cacing hati dilakukan sejak minggu ke-12 setelah infeksi mulai, dengan frekuensi 2 minggu sekali sampai penelitian berakhir. Satu gram tinja diproses dengan prosedur endapan yang telah baku.¹⁴

Sampel darah sapi dikoleksi setiap 4 minggu selama 36 minggu. menggunakan tabung venoject 10 ml yang mengandung *Ethylene Diamine Te-traacetic Acid* (EDTA). Pemeriksaan sel eosinofil dilakukan dengan cara membuat preparat apus darah dengan pewarnaan Giemsa sedangkan penghitungannya dilakukan dalam persentase. Penghitungan PCV dilakukan dengan menggunakan tabung kapiler (*haematocrit*) yang disumbat dengan *crystoseal*, setelah itu disentrifus selama 5 menit. Tabung ditentukan nilai persentase PVC-nya pada *haematocrit chart*.¹⁰

Isotipe antibodi imunoglobulin (Ig)G1 dan IgG2

Antibodi diperiksa dengan metode *Enzyme linked immunosorbent assay*/ELISA (Wiedosari, 2005). Lempeng ELISA dilapisi dengan 50 µl (3 mg/ml) antigen cacing *Fasciola gigantica* dalam larutan bufer karbonat (pH 9,6), lalu diinkubasi semalam pada suhu 4°C. Lempeng ELISA kemudian dicuci 4x dengan 0,1% PBS (*phosphate buffer saline*)-Tween 20 dan diblok dengan 200 µl / lubang 5% skim milk dalam 0,1% PBS-tween 20 lalu diinkubasi selama 1 jam dalam inkubator 37°C. Setelah inkubasi lempeng ELISA dicuci 3x dengan 0,1% PBS Tween- 20, sampel serum (1/200) dimasukkan ke dalam 2 lubang untuk ulangnya dan diinkubasi selama 1 jam dalam inkubator 37°C, setelah itu dicuci 3x dengan PBS Tween- 20. Lalu masukkan 50 µl *mouse monoklonal anti-bovine* IgG1 atau IgG2 lalu diinkubasi selama 1 jam dalam inkubator 37°C. Kemudian dicuci dan dimasukkan substrat ABTS /2,2-aziao-bis(3-ethyl benzthiazoline-6-sulphonic acid), dan ditunggu sekitar 2 jam pada 37°C. Selanjutnya dibaca nilai OD/*Optical Density* dengan *ELISA reader* model *Multiscan EX* dari *Labsystems* 1998 dengan panjang gelombang 415 nm.

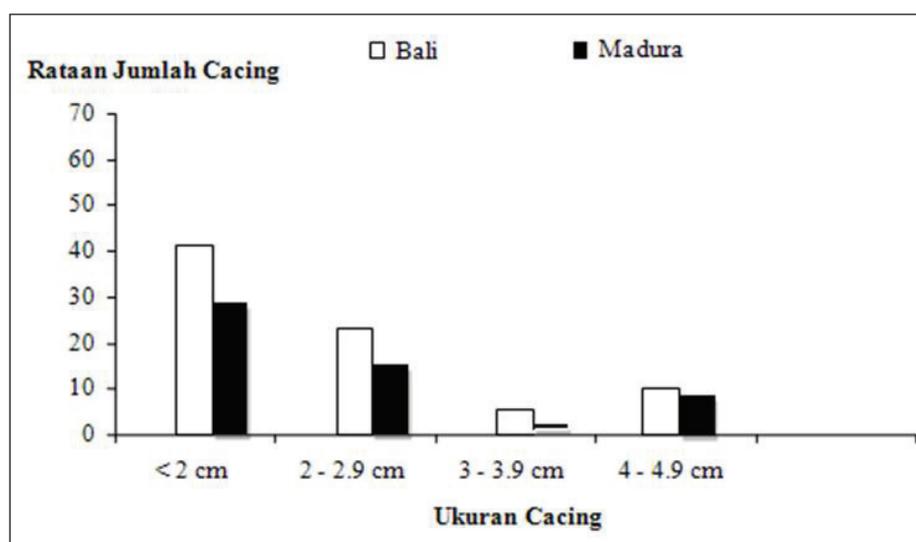
Analisis Statistik

Data yang diperoleh dalam penelitian diuji dengan ANOVA dan dilanjutkan dengan uji Duncan menggunakan *software* SAS.¹⁵

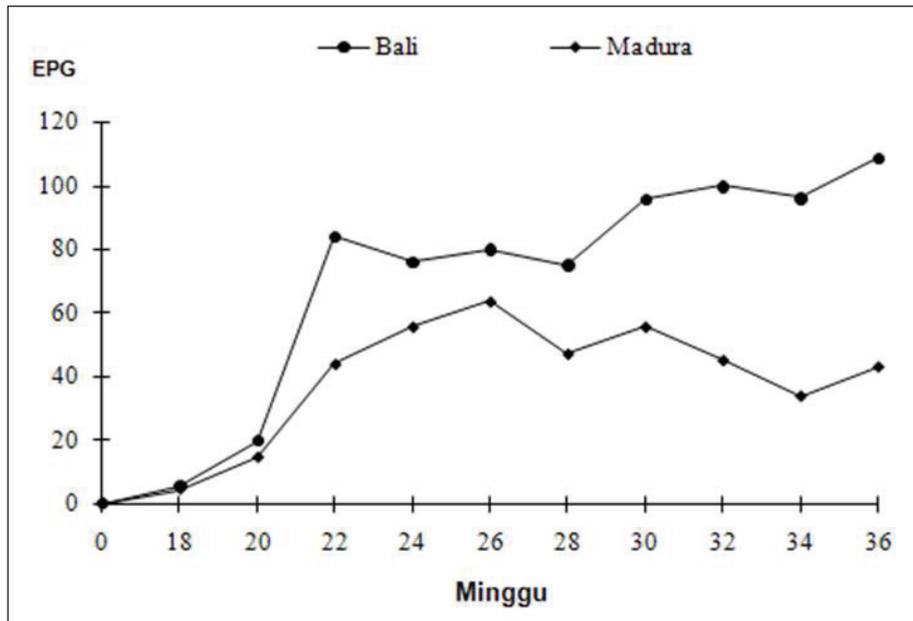
HASIL DAN PEMBAHASAN

Rataan jumlah cacing *F. gigantica* yang ditemukan dari hati sapi Bali dan Madura 36 minggu setelah infeksi berturut-turut adalah 10,5% dan 8,7% dari jumlah metaserkaria yang diberikan (Gambar 1). Tidak ada perbedaan yang nyata antara keduanya, tetapi terlihat bahwa kelompok sapi Madura jumlah cacing lebih rendah daripada kelompok sapi Bali. Begitu pula rata-rata jumlah telur cacing pada tinja dari sapi Madura lebih rendah dibanding sapi Bali (Gambar 2). Sementara cacing dan telur cacing tidak ditemukan pada kelompok kontrol (tidak diinfeksi). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa sapi Madura relatif lebih resisten terhadap infeksi *F. gigantica* daripada sapi Bali.

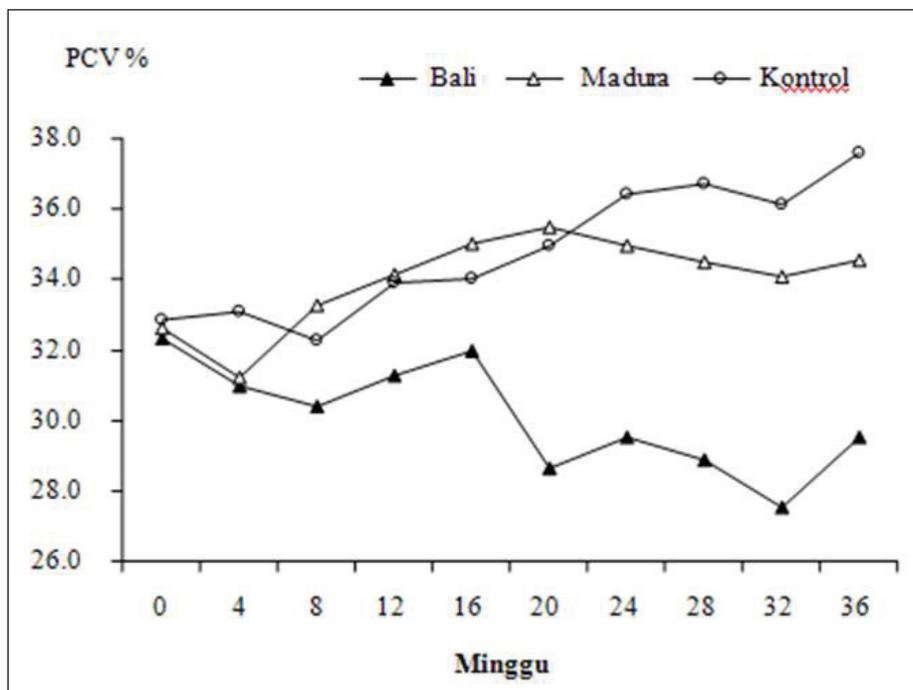
Dinamika rata-rata nilai PCV selama sapi diinfeksi dengan *F. gigantica* dapat dilihat pada Gambar 3. Pada gambar tersebut terlihat bahwa nilai PCV pada ke-2 bangsa sapi relatif stabil sampai infeksi berlangsung selama 14 minggu, tetapi setelah itu pada sapi Bali rata-rata nilai PCV mengalami penurunan, tetapi tidak pada sapi Madura ($P < 0,05$). Hal ini diduga berkaitan dengan jumlah cacing pada sapi Madura yang tidak sebanyak sapi Bali, dan berkaitan dengan tingkat resistensi sehingga walaupun terjadi infeksi cacing pada sapi Madura, namun sapi dapat tetap bertahan dan tidak mengalami anemia yang berat seperti pada sapi Bali. Pada 14 minggu setelah infeksi, cacing *F. gigantica* akan meningkatkan



Gambar 1. Rataan jumlah cacing yang ditemukan pada hati sapi Bali dan Madura 36 minggu setelah diinfeksi dengan 15 metaserkaria *Fasciola gigantica* 2 kali/minggu selama 32 minggu



Gambar 2. Rataan telur cacing per gram tinja (EPG/eggs per gram of faeces) pada sapi Bali dan Madura setelah diinfeksi dengan 15 metaserkaria *Fasciola gigantica* 2 kali/minggu selama 32 minggu



Gambar 3. Rataan packed cell volume /PCV (%) dari sapi Bali dan Madura setelah diinfeksi dengan 15 metaserkaria *Fasciola gigantica* 2 kali/minggu selama 32 minggu

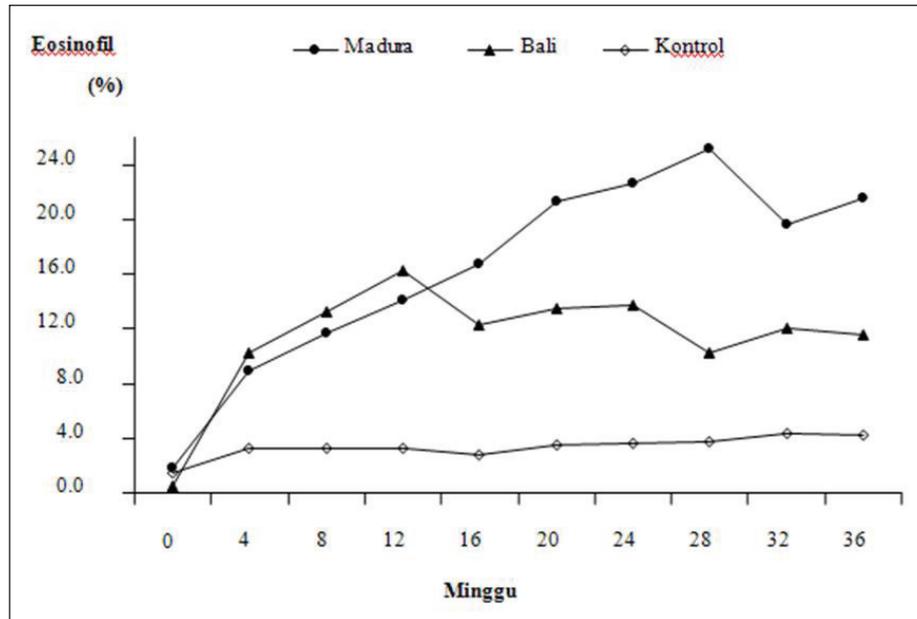
aktivitasnya dalam bergerak dan menghisap darah karena mempersiapkan diri untuk menghasilkan telur, sehingga menyebabkan anemia.¹⁶

Dalam penelitian ini terjadi eosinofilia segera setelah infeksi, tetapi kenaikannya lebih

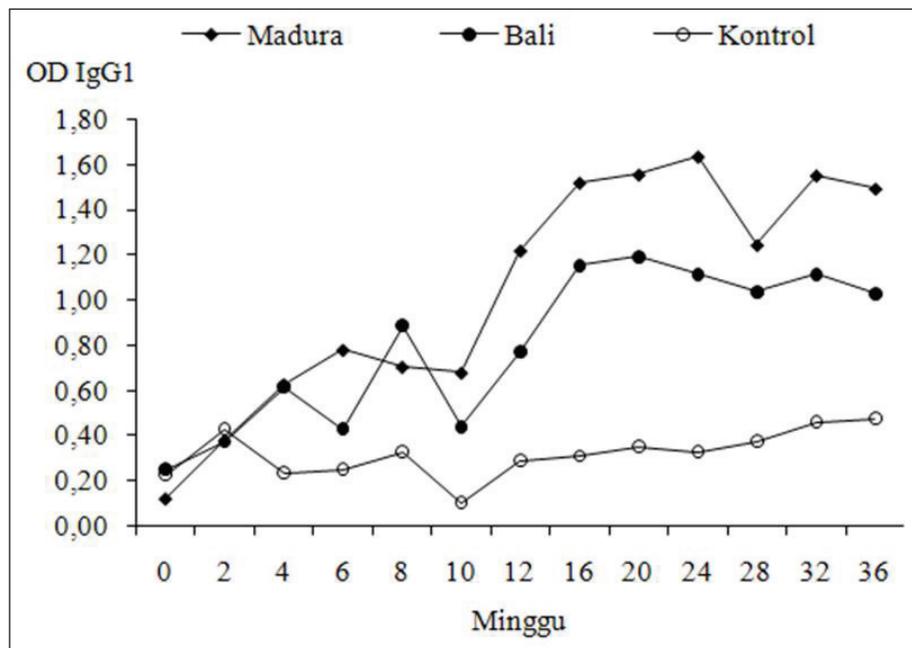
tinggi ($P < 0,05$) pada sapi Madura dibandingkan dengan pada sapi Bali, terutama pada minggu ke-16 setelah infeksi (Gambar 4). Respons eosinofilia ini kemungkinan besar merupakan salah satu penyebab dari lebih resistennya sapi Madura

terhadap infeksi cacing *F. gigantica* daripada sapi Bali. Piedrafita¹⁷ berpendapat bahwa eosinofilia dalam sirkulasi darah merupakan akibat dari suatu respon kebal di dalam tubuh dan merupakan suatu bukti bahwa eosinofilia merupakan fenomena yang terjadi yang tidak lepas dari faktor genetika pada hewan.

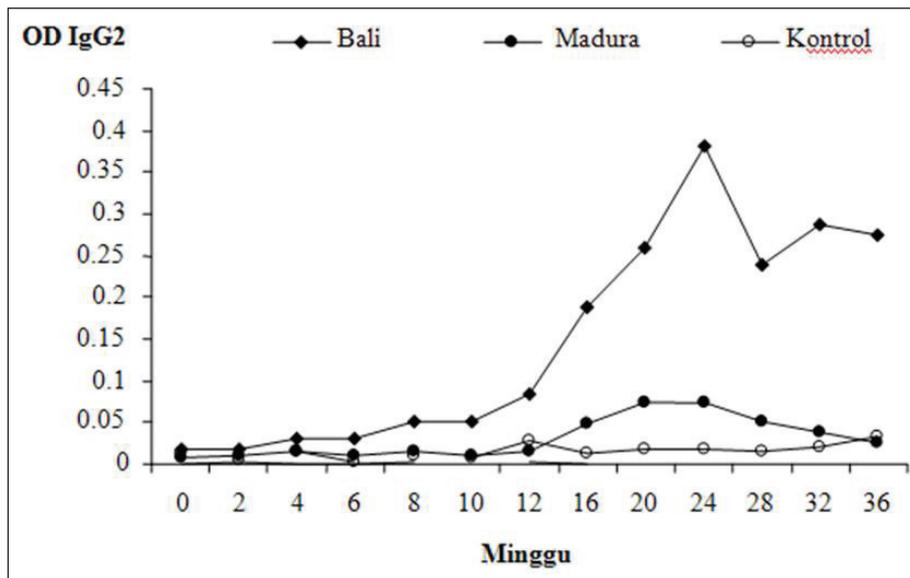
Suatu penelitian telah dilakukan oleh Milbourne dan Howell¹⁸ dengan menyuntikkan ekskresi/sekresi antigen *F. hepatica* pada tikus dan mencit yang sudah diketahui berturut-turut sebagai hewan yang resisten dan peka terhadap infeksi fasciolosis. Ternyata kenaikan eosinofilia



Gambar 4. Rataan jumlah eosinofil (%) dari sapi Bali dan Madura setelah diinfeksi dengan 15 metaserkaria *Fasciola gigantica* 2 kali/minggu selama 32 minggu



Gambar 5. Rataan jumlah produksi IgG1 dalam OD (*Optical Density*) dari sapi Bali dan Madura setelah diinfeksi dengan 15 metaserkaria *Fasciola gigantica* 2 kali/minggu selama 32 minggu



Gambar 6. Rataan jumlah produksi IgG2 dalam OD (*Optical Density*) dari sapi Bali dan Madura setelah diinfeksi dengan 15 metaserkaria *Fasciola gigantica* 2 kali/minggu selama 32 minggu

pada tikus lebih banyak dibandingkan dengan pada mencit. Selanjutnya mereka menyimpulkan bahwa cacing *F. hepatica* diduga menghasilkan molekul yang mirip dengan interleukin (IL)-5 yang sudah diketahui sebagai penyebab eosinofilia.¹⁹ Bukti yang lebih spesifik yang menunjukkan bahwa eosinofilia mungkin dapat bertindak sebagai salah satu faktor terjadinya resistensi akibat infeksi *F. hepatica* pada hewan adalah hasil penelitian Duffus *et al.*²⁰ yang mengisolasi *bovine major basic protein* dari sel eosinofil. Ternyata, dalam konsentrasi yang sangat rendah, yaitu $1 \times 10^{-6}M$, protein ini dapat menimbulkan kerusakan dan kematian cacing *F. hepatica* yang belum dewasa.

Respon kekebalan berdasarkan isotype antibodi IgG1 dapat dilihat pada Gambar 5. Dari gambar tersebut terlihat bahwa peningkatan titer antibodi pada ke-2 bangsa sapi mulai terjadi pada minggu ke-2, tetapi pada minggu ke-12 peningkatan lebih tinggi dijumpai pada sapi Madura ($P < 0,05$). Sebaliknya, peningkatan titer antibodi IgG2 pada sapi Madura sangat rendah dibanding pada sapi Bali ($P < 0,05$) (Gambar 6). Mungkin pada saat terjadi infeksi, kehadiran cacing *F. gigantica* di dalam tubuh sapi Madura akan merangsang sel eosinofil yang berada dalam rongga perut, dimana sel tersebut kemu-

dian bekerja sama dengan IgG1 dalam upaya membunuh cacing, yang secara *in vitro* telah terbukti.²¹ Kemungkinan lain adalah IgG2 yang sangat tinggi pada sapi Bali berperan sebagai antibodi penghambat dalam mekanisme kerja sel eosinofil dan IgG1. Mekanisme pertahanan terhadap infeksi cacing terjadi melalui respon antibodi IgG1 dan sel eosinofil. IgG1 berfungsi merangsang mastosit untuk melepaskan granula dan menyulut reaksi inflamasi yang melepaskan *eosinophil chemotactic factor* sehingga sel eosinofil mendekat dan melekat pada permukaan cacing. Cacing yang dilapisi imunoglobulin (IgG1) dapat dihancurkan oleh sel eosinofil karena granula sel eosinofil diketahui dapat melepaskan peroksidase dan enzim proteolitik.²²

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa sapi Madura memberi respon jumlah cacing dan jumlah telur cacing dalam tinja yang lebih rendah daripada sapi Bali. Hal ini diduga berkaitan erat dengan lebih tingginya daya resistensi pada sapi Madura dibanding sapi Bali terhadap infeksi cacing *F. gigantica*. Dugaan ini didukung oleh jumlah sel eosinofil, nilai PCV dan antibodi IgG1 yang lebih tinggi pada sapi Madura daripada sapi Bali.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada ACIAR yang telah mendanai penelitian ini. Selain itu, terima kasih juga disampaikan kepada teknisi di bagian Patologi dan Parasitologi, Balitvet yang telah membantu kelancaran penelitian ini

DAFTAR PUSTAKA

- ¹Diwiyanto, K., S. Bahri dan E. Masbulan. 2000. Ketersediaan dan kebutuhan teknologi peternakan dan veteriner dalam upaya meningkatkan ketahanan pangan. *Prosiding Seminar Nasional Peternakan dan Veteriner Bogor 2000*: 51–64. Bogor 18–19 September 2000: Pusat Penelitian Peternakan, Badan Litbang Pertanian, Departemen Pertanian Bogor.
- ²Edney, I.M. dan A. Muchlis. 1962. Fasciolosis in Indonesian Livestock. *Communication Veteriner*, 2: 49–52.
- ³Estuningsih, S.E., G. Adiwinata, S. Widjajanti dan D. Piedrafita. 2004. Pengembangan teknik diagnosa Fasciolosis pada sapi dengan antibodi monoklonal dalam capture ELISA untuk deteksi antigen. *Prosiding Seminar Nasional Parasitologi dan Toksikologi Veteriner*. Bogor 20–21 April 2004: Balai Besar Penelitian Veteriner Bogor.
- ⁴Wiedosari, E. 2005. *Perbedaan ekspresi mRNA antara domba ekor tipis dan Merino terhadap infeksi Fasciola gigantica*. Disertasi Program S3 Institut Pertanian Bogor.
- ⁵Partoutomo, S. 2004. Pengendalian parasit dengan *Genetic Host Resistance*. *Wartazoa*, 4: 160–177.
- ⁶Stear, M.J. dan M. Murray. 1994. Genetic resistance to parasitic disease: particularly of resistance in ruminants to gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology*, 54: 161–176.
- ⁷Bitakaramire, P.K. 1973. The incidence of fasciolosis in different breeds of cattle in Kenya. *Bulletin of Epizootic Diseases of Africa*, 21: 145–152.
- ⁸Boyce, W. M., C.H. Courtney dan P. E. Loggins. 1987. Resistance to experimental infection with *Fasciola hepatica* in exotic and domestic breeds of sheep. *International Journal of Parasitology*, 17: 1233–1237.
- ⁹Ogunrinade, A. F. 1984. Infectivity and pathogenicity of *F. gigantica* in West African Dwarf sheep and goats. *Tropical Animal Health and Production*, 16: 161–166.
- ¹⁰Wiedosari, E dan D.B. Copeman. 1990. High resistance to experimental infection with *Fasciola gigantica* in Indonesian thin-tailed sheep. *Veterinary Parasitology*, 37: 101–111.
- ¹¹Batubara, A. 1997. *Studies on genetic resistance of Sumatran Breeds and Hair sheep Crossbreeds to experimental infection with Haemonchus contortus in North Sumatra, Indonesia*. MSc. Thesis, Prince Leopold Institute of Tropical Medicine. Antwerpen, Belgium.
- ¹²Romjali, E. 1995. *Studies of Genetic Resistance of sheep to gastrointestinal nematodes in North Sumatra*. MSc Thesis, Prince Leopold Institute of Tropical Medicine. Antwerpen, Belgium
- ¹³Romjali, E., V.S. Pandey, R.M. Gatenby dan A. Verhulst. 1997. Genetic resistance of different genotypes of sheep to natural infection with gastrointestinal nematodes. *Animal Sciences*, 64: 97–104.
- ¹⁴Wiedosari, E. 1989. *Studies on Infection Indonesian Thin Tailed sheep with Fasciola gigantica and Gigantocotyle explanatum*. Tesis, Universitas James-Cook Australia.
- ¹⁵SAS. 1998. *SAS/STAT Guide for Personal Computer*. Version 6.2 Edition. SAS Institute Cary., NC, USA.
- ¹⁶Sigmund, O.H. dan C. M. Fraser. 2000. *The Merck Veterinary Manual*. Ed ke-5. Merck and Co., Inc. Rahway, New York, USA.
- ¹⁷Piedrafita, D. 2001. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity to newly excysted juvenile *Fasciola hepatica* *in vitro* is mediated by reactive nitrogen intermediates. *Parasite Immunology*, 23: 473–482.
- ¹⁸Milbourne, E. A. dan M. J. Howell. 1990. Eosinophil responses to *F. hepatica* in rodents. *International Journal of Parasitology*, 20: 705–708.
- ¹⁹Milbourne, E. A. dan M. J. Howell. 1993. Eosinophil differentiation in response to *F. hepatica* and its excretory/secretory antigens. *International Journal of Parasitology*, 23: 1005–1009.
- ²⁰Duffus, W.P.H., K. Thorne dan R. Oliver. 1980. Killing of *F. hepatica* by purified bovine eosinophil proteins. *Clinical and Experimental Immunology*, 40: 336–344.
- ²¹Estuningsih, S.E., S. Widjajanti, S. Partoutomo, T.W. Spithill, H. Raadsma, dan D. Piedrafita. 2002. Peran sel imunologi domba ekor tipis dalam membunuh cacing hati *F. gigantica* secara *in vitro*. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*, 7: 124–129.
- ²²Tizard, I.R. 2000. *Immunology: An Introduction*. Ed ke-6. New York: Saunders College Publishing.