

Full Paper

IDENTIFIKASI MOLEKULER DENGAN TEKNIK PCR-RFLP LARVA PARASIT *Anisakis* spp (Nematoda: *Anisakidae*) PADA IKAN TONGKOL (*Auxis thazard*) DAN KEMBUNG (*Rastrelliger kanagurta*) DARI PERAIRAN MAKASSAR

MOLECULAR IDENTIFICATION OF *Anisakis* spp (Nematode: *Anisakidae*) FROM FRIGATE TUNA (*Auxis thazard*) AND INDIAN MACKEREL (*Rastrelliger kanagurta*) OF MAKASSAR WATERS

Hilal Anshary

Jurusan Perikanan, Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan Universitas Hasanuddin
 Jl. Perintis Kemerdekaan km. 10 Tamalanrea, Makassar 90245
 E-mail: hilal_an@yahoo.com/hilalanshary@unhas.ac.id

Abstrak

Beragam spesies ikan laut dikenal sebagai inang perantara dari berbagai spesies parasit, termasuk nematoda *Anisakis* yang merupakan agen penyebab Anisakiasis pada manusia. Anisakiasis dapat terjadi pada manusia setelah memakan ikan mentah atau setengah matang yang terinfeksi oleh *Anisakis* sp. Di Indonesia, khususnya di Sulawesi Selatan, informasi tentang Infeksi *Anisakis* ikan sering kali diabaikan dan tidak terdokumentasi dengan baik. Oleh karena itu, penelitian ini dimulai dengan mengumpulkan larva nematoda dari dua spesies ikan (*Auxis thazard* dan *Rastrelliger kanagurta*). Organ tubuh yang diperiksa meliputi rongga perut, organ internal dan jaringan otot. Larva nematoda yang diidentifikasi secara morfologis menunjukkan *Anisakis* spp kemudian dipisahkan untuk identifikasi secara molekuler lebih lanjut. Parasit difiksasi dalam etanol 70% dan dilanjutkan dengan PCR menggunakan primer ITS-1, 5.8S dan ITS-2 regions. Secara morfologi, *Anisakis* spp. dapat dibedakan dengan *Anisakidae* lain oleh adanya ventriculus yang jelas terlihat pada *Anisakis* spp. di bawah mikroskop stereo. *Anisakis* tipe I dan tipe II dibedakan oleh adanya mukron yang hanya terdapat pada *Anisakistipe* I dan tidak adanya di *Anisakis* tipe II. Spesies yang diidentifikasi menggunakan PCR-RFLP menunjukkan bahwa nematoda yang ditemukan pada ikan tongkol dan ikan kembung adalah *Anisakis typica*.

Kata kunci: *Anisakis typica*, *Auxis thazard*, *Rastrelliger kanagurta*, PCR-RFLP, Makassar

Abstract

Different species of marine fishes are known as intermediate host of various species of parasites, including *Anisakis* nematode, the causative agent of human Anisakiasis. Anisakiasis may occur in human after consuming raw or undercooked fish infected by *Anisakis* sp. In Indonesia, particularly in South Sulawesi, information about *Anisakis* Infection of fish is negligible and not well documented. Therefore, this research was initiated by collecting nematode larvae from the two species of fish (frigate tuna *Auxis thazard* and Indian mackerel *Rastrelliger kanagurta*). Organs of fish examined were body cavity, internal organs, and muscle. Nematode larvae were morphologically identified and those belonging to *Anisakis* spp, were separated for further molecular identification. Parasites were fixed in 70% ethanol, and PCR was performed using primers on ITS-1, 5.8S and ITS-2 regions. Morphologically, *Anisakis* spp can be distinguished with other *Anisakidae* by the presence of prominent ventricle clearly seen under stereomicroscope in *Anisakis* spp. *Anisakis* type I and type II are differentiated by the presence of mucron in *Anisakis* type I and absence in *Anisakis* type II. Species identification using PCR-RFLP showed that *Anisakis* type I found in frigate tuna and Indian mackerel were *Anisakis typica*.

Key words: *Anisakis typica*, *Auxis thazard*, *Rastrelliger kanagurta*, PCR-RFLP, Makassar

Pengantar

Dalam perdagangan produk perikanan secara global, masalah keamanan pangan merupakan salah satu isu penting menyangkut kualitas produk. Produk perikanan dipersyaratkan bebas dari bahan-bahan

berbahaya termasuk diantaranya terbebas dari patogen yang dapat menyebabkan penyakit pada manusia (zoonosis). Pada produk perikanan, isu keamanan pangan yang disebabkan oleh patogen antara lain berupa bakteri, virus, jamur dan parasit.

Salah satu golongan parasit yang menjadi perhatian saat ini adalah parasit-parasit yang bersifat zoonosis pada manusia. Umumnya parasit yang bersifat zoonosis pada produk perikanan disebabkan oleh parasit cacing yang hidupnya dewasa pada mamalia laut dan menggunakan ikan, krustasea atau hewan akuatik lainnya sebagai perantaranya, seperti parasit dari golongan Nematoda, Digenea dan Cestoda. Parasit-parasit ini juga dapat hidup pada saluran pencernaan maupun paru-paru manusia dan menyebabkan gangguan pada organ manusia yang terinfeksi. Beberapa jenis penyakit pada manusia akibat patogen zoonosis adalah Anisakiasis akibat infeksi *Anisakis* spp. (Nematoda), Paragonomiasis akibat infeksi parasit *Paragonimus* sp. (Digenea), Cystococcosis akibat infeksi parasit *Cystococcus parvulus* (Cestoda). Parasit *Anisakis* sp yang menyebabkan penyakit Anisakiasis pada manusia, menyebabkan nyeri dan luka pada lambung (Doet *et al.*, 2010; Gutiérrez-Ramos *et al.*, 2000), serta menyebabkan syndrome alergi (Fotiet *et al.*, 2002).

Indonesia sebagai pusat diversitas parasit di dunia, kemungkinan memiliki spesies parasit *Anisakis* spp. yang lebih besar dan belum terdeskripsi. Informasi yang tersedia tentang parasit ini masih sangat langka. Penelitian yang pernah dilakukan di Indonesia yaitu di sekitar perairan Pulau Seribu Jakarta, yang dilakukan pada tahun 1978. Penelitian yang dilakukan oleh Hadidjaja *et al.* (1978) tersebut mengambil sampel dari tiga jenis ikan yaitu *Rastrelliger kanagurta*, *Decapterus russelli*, dan *Sardinella sirm* dan menemukan bahwa tingkat infeksi larva Anisakidae pada ikan tersebut berkisar antara 40 sampai dengan 50%. Lebih lanjut dilaporkan bahwa ada dua jenis *Anisakis* yang ditemukan yaitu larva *Anisakis* type I dan *Terranova* type B. Penelitian akhir-akhir ini yang dilakukan oleh Jakob & Palm (2006) pada Pantai Barat Jawa terhadap 5 spesies ikan komersial menemukan tingkat infeksi *Anisakis* sp mencapai 70-100%. Penelitian yang telah dilakukan akhir-akhir ini adalah dari ikan-ikan yang berasal dari perairan Bali dan perairan Jawa (Palmet *et al.*, 2008) dan menemukan 3 spesies *Anisakis* spp., yaitu *A. typica*, *Anisakis* sp. 1 dan *Anisakis* sp. 2. Hasil-hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa produk perikanan dari laut memiliki resiko besar menyebarkan penyakit pada manusia.

Penyakit Anisakiasis menjadi perhatian utama dari ilmuwan karena kecenderungan tingkat infeksi parasit ini pada manusia menjadi semakin

meningkat. Pada awalnya hampir semua kasus Anisakiasis yang dilaporkan disebabkan oleh parasit *Anisakis simplex*. Diagnosis *Anisakis* spp. pada ikan menghadapi masalah karena tahap larva parasit ini sangat sulit dibedakan antara satu spesies dengan spesies lainnya secara morfologi, terutama yang termasuk spesies sibling. Hal ini disebabkan karena stadia larva III yang berada pada hewan akuatik belum memiliki organ yang berkembang untuk dapat dibedakan secara morfologi, sehingga hanya dengan teknik molekuler parasit ini dapat diidentifikasi. Pada awalnya *Anisakis* spp. hanya dapat dikelompokkan menjadi dua yaitu *Anisakis* tipe I dan *Anisakis* tipe II berdasarkan panjang ventriculus dan keberadaan mukron pada ujung posterior (Berland, 1961). Berdasarkan informasi teknik deteksi molekuler, sampai saat ini ada beberapa jenis *Anisakis* spp. yang telah dideskripsi, dan masih ada beberapa yang diketahui sebagai spesies baru berdasarkan data molekuler (Palmet *et al.*, 2008). Teknik PCR-RFLP telah berhasil digunakan untuk membedakan spesies *Anisakis* spp di Jepang (Umehara *et al.*, 2007). Penelitian yang sama dilakukan oleh Paggiet *et al.* (2001), Abe *et al.* (2005), Pontes *et al.* (2005) dan Marques *et al.* (2006) untuk membedakan spesies yang bentuknya mirip dengan teknik molekuler PCR-RFLP. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui jenis dan tingkat infeksi parasit *Anisakis* spp. pada ikan tongkol dan ikan kembung di pelelangan Paotere Makassar, dengan teknik molekuler PCR-RFLP.

Bahan dan Metode

Tingkat Kejadian Infeksi Parasit Anisakis spp.

Untuk menentukan tingkat kejadian infeksi parasit pada ikan laut, dilakukan survey tingkat keberadaan parasit pada ikan tongkol dan ikan kembung yang dibeli dari pasar ikan Paotere, Makassar. Jumlah ikan tongkol yang diperiksa adalah 42 ekor sedangkan ikan kembung 32 ekor. Ikan-ikan yang diperiksa dilakukan pengukuran terhadap panjang dan beratnya serta dilakukan pengamatan terhadap keberadaan parasit *Anisakis* spp. Parasit yang ditemukan dibersihkan dari kotoran yang melekat dari parasit dan selanjutnya dilakukan fiksasi pada alkohol 70%. Tingkat infeksi parasit dinyatakan dalam prevalensi, dan intensitas rata-rata parasit. Prevalensi adalah persentase ikan yang terinfeksi oleh parasit *Anisakis* sp. Intensitas rata-rata adalah rata-rata jumlah parasit *Anisakis* sp. yang menginfeksi ikan.

Deteksi Morfologi dan Molekuler Parasit *Anisakis* spp.

Parasit *Anisakis* spp dibedakan secara morfologi dari parasit Anisakidae lainnya dengan melihat bentuk ventriculusnya di bawah mikroskop. Selanjutnya parasit-parasit yang diduga *Anisakis* dipisahkan dan dilakukan pengamatan terhadap ventriculusnya. Parasit kemudian difiksasi dalam alkohol 70% untuk dilakukan identifikasi secara molekuler dengan teknik PCR-RFLP. Sebanyak 5 ekor parasit dari ikan tongkol dan 1 ekor dari ikan kembung diuji dengan PCR-RFLP. Adapun tahapan-tahapan yang dilakukan untuk melakukan deteksi secara molekuler adalah sebagai berikut:

Ekstraksi dan Amplifikasi DNA

Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan Kit Qiagen DNA Mini Kit menggunakan protocol untuk tissues. Ekstraksi dilakukan dengan mengikuti petunjuk pabrikan dengan beberapa modifikasi. Primer yang digunakan adalah Universal primer yang meliputi region ITS-1, 5.8S dan ITS-2, yaitu Primer F: (5'-GTA GGT GAA CCT GCG GAA GGA TCA TT -3') dan R: (5'-TTA GTT TCT TTT CCT CCG CT-3'). Kondisi reaksi PCR yang digunakan pada penelitian adalah adalah 10x buffer PCR 1X, dNTP mix 0,2 mM, Primer F dan R masing-masing 0,8 mM dan Taq Polymerase 0,02 U/µl dan Templat DNA 2 µl, lalu ditambahkan miliQ untuk mencukupkan volume reaksi 20 µl. Kondisi PCR adalah pre-denaturasi 95°C 15 menit, 35 siklus (denaturasi 94°C 1 menit, 55°C annealing, 72°C ekstension), dan ekstensi akhir 72°C 5 menit. Untuk kontrol digunakan master mix tanpa DNA. Visualisasi dilakukan setelah elektroforesis dengan menggunakan 1,5% agarose selama 25 menit dan pewarnaan dengan Ethidium Bromida selama 10-20 menit atau dengan SYBR safe green selama 40-60 menit. Selanjutnya dilakukan visualisasi pada UV-Transiluminator dan dilakukan dokumentasi.

PCR-RFLP

Uji PCR-RFLP dilakukan dengan menggunakan 3 jenis enzim restriksi yaitu Taq I (Takara), Hinf I (Roche) dan Cfo/Hha I (Roche), untuk mengidentifikasi parasit *Anisakis* spp menurut kriteria genetic yang telah

dikembangkan oleh D'Amelio *et al.* (2000). Hasil PCR didigest menggunakan enzim restriksi dengan mengikuti protocol pabrikan. Metode yang digunakan untuk masing-masing enzim restriksi adalah sebagai berikut: Taq I (10 U/µl) (DNA hasil PCR 8 µl, 10 x Taq I Buffer 2 µl, 0.1% BSA 2 µl, Enzim Restriksi Taq I 1 µl, MiliQ 7 µl). Semua bahan-bahan tersebut dicampur dan selanjutnya dilakukan inkubasi pada suhu 65°C selama 3-4 jam. Selanjutnya ditambahkan 1/10 volume 10 x loading buffer untuk menghentikan reaksi enzim lalu diambil sebanyak 5 µl untuk elektroforesis pada Gel untuk melihat fragmen-fragmen DNA. Hinf I (10 U/µl) (DNA hasil PCR 8 µl, 10 x SuRE/Cut Buffer H2 µl, MiliQ 9.9 µl, Enzim Restriksi 0.1 µl). Diinkubasi pada suhu 37 °C selama 3-4 jam, Selanjutnya ditambahkan 1/10 volume 10 x loading buffer untuk menghentikan reaksi enzyme lalu diambil sebanyak 5 µl untuk elektroforesis pada Gel untuk melihat fragmen-fragmen DNA. Hha I (Cfo I) (10 U/µl) (DNA hasil PCR 8 µl, 10 x SuRE/Cut Buffer L2 µl, MiliQ 9.9 µl, Enzim Restriksi 0.1 µl). Inkubasi pada suhu 37 °C selama 3-4 jam, Selanjutnya ditambahkan 1/10 volume 10 x loading buffer untuk menghentikan reaksi enzim lalu diambil sebanyak 5 µl untuk elektroforesis pada gel untuk melihat fragmen-fragmen DNA.

Hasil dan Pembahasan

Tingkat Infeksi *Anisakis* pada Ikan Laut

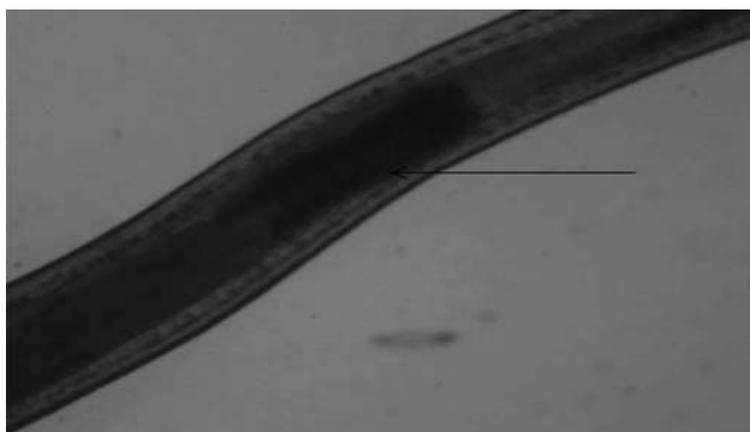
Ikan laut yang diperiksa adalah ikan tongkol (*Auxis thazard*) dengan panjang berkisar 30 sampai 50 cm dan ikan kembung (*Rastrelliger kanagurta*) dengan panjang 20 sampai 30 cm. Tingkat infeksi parasit *Anisakis* spp. pada ikan tongkol adalah 33.3% sedangkan pada ikan kembung tergolong rendah, yaitu hanya 1 dari 32 ekor (3.1%) ikan yang diperiksa (Tabel 1). *Anisakis* spp. yang ditemukan dari ikan tongkol dan ikan kembung semuanya termasuk *Anisakis* tipe I yang ditandai dengan adanya *boring tooth* pada bagian ujung anterior dan mukron pada bagian ujung posterior. Umumnya parasit yang ditemukan menginfeksi bagian dinding saluran pencernaan, rongga tubuh serta pada hati ikan.

Tabel 1. Tingkat infeksi Parasit *Anisakis* spp.

Nama ikan	Lokasi sampel	Waktu Sampling	Jumlah ikan yang diperiksa	Jumlah ikan terinfeksi	Jumlah parasit <i>Anisakis</i> spp.
Ikan Tongkol (<i>Auxis thazard</i>)	Makassar	Agustus dan September 2010	42	14	78
Ikan Kembung (<i>Rastrelliger kanagurta</i>)	Makassar	Agustus dan September 2010	32	1	1



Gambar 1. Bagian anterior parasit *Anisakis* sp. tampak boring apparatus pada bagian anterior-end dari parasit tersebut (Tanda panah).



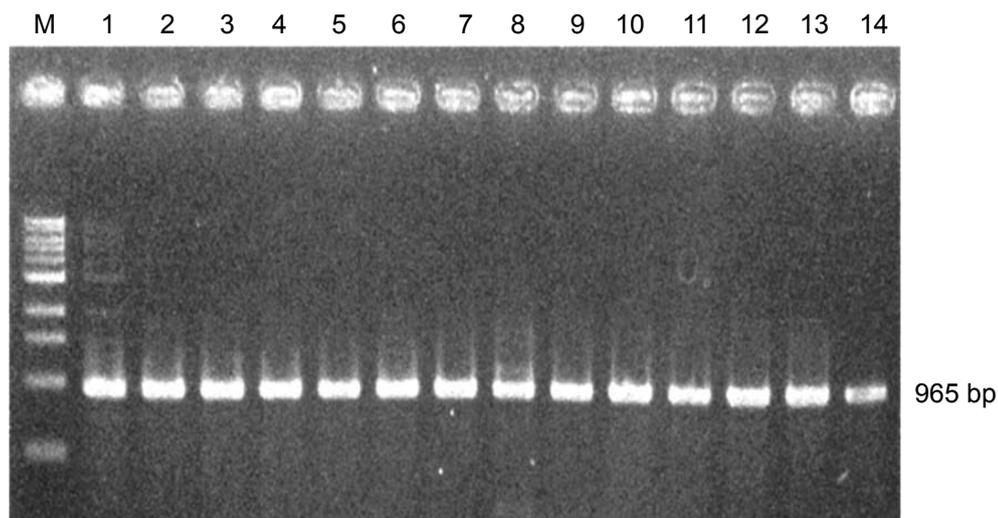
Gambar 2. Ventriculus parasit *Anisakis* sp. tampak jelas dengan menggunakan stereo mikroskop (Tanda panah).

Secara morfologi parasit *Anisakis* spp. dapat dibedakan dari parasit anisakidae lainnya dengan melihat bagian anterior end (*booring tooth*), dan bentuk ventriculusnya dengan menggunakan mikroskop stereo (Gambar 1 dan 2). Bagian ventriculus parasit ini tampak memanjang dan bahkan dapat terlihat dengan mata tanpa mikroskop dimana ventriculus tampak seperti bintik putih.

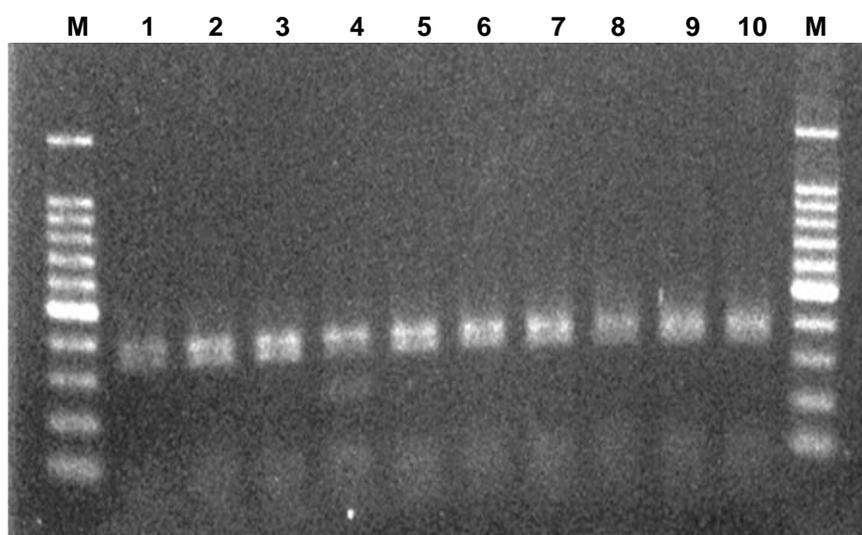
Optimasi PCR

Optimasi PCR dilakukan dengan menggunakan konsentrasi PCR yaitu 10 PCR buffer 1X, dNTP mix 0,2 mM, masing-masing primer 0,8 mM, dan Taq Polymerase 0,02 U/ μ l. Kondisi PCR yang digunakan adalah denaturasi awal 95°C 15 menit,

30 siklus (denaturasi 94°C 1 menit, annealing 55°C 1 menit, ekstension 72°C 1 menit), dan ekstensi akhir 72°C 5 menit. Selain itu juga dilakukan PCR dengan menggunakan Taq Mix produk Takara, Jepang. Konsentrasi PCR yang digunakan adalah Taq Mix 7,4 μ l, primer masing-masing 3 μ l (stok 10 pmol) dan templat DNA 2 μ l, larutan dibuat menjadi 20 μ l dengan menambahkan Milli Q. Kondisi PCR yang digunakan adalah sama seperti di atas. Hasil optimasi PCR menunjukkan bahwa *Anisakis* spp. dapat teramplifikasi dan menunjukkan pita tebal pada angka 965 bp (Gambar 3). Pada penelitian ini optimasi yang dilakukan terhadap konsentrasi dan kondisi PCR tidak memerlukan penyesuaian terhadap



Gambar 3. Elektroforesis *Anisakis* spp tampak pita pada 965 pasangan basa.



Gambar 4. Analisis PCR-RFLP dengan enzim restriksi Taq I. Tampak adanya 2 buah pita, pita atas terbaca pada angka 400 bp dan pita bawah terbaca pada angka 350 bp. M adalah Marker dan 1 s/d 10 adalah sampel parasit *Anisakis*.

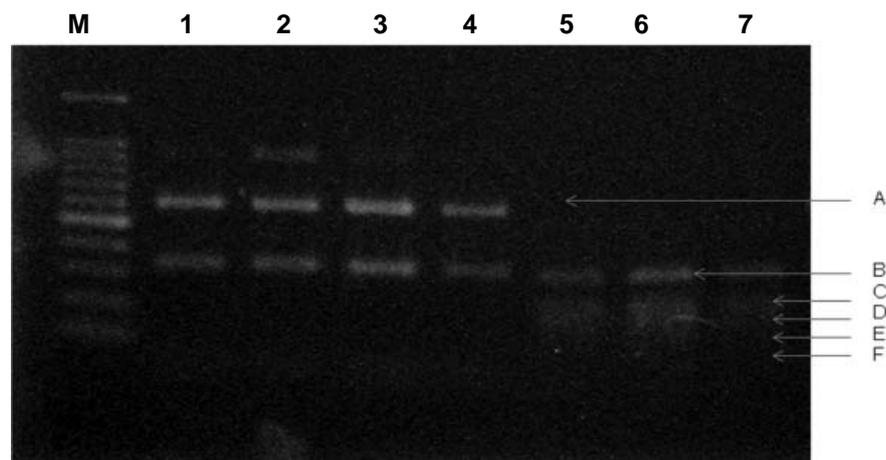
bahan-bahan *cock tail* yang digunakan karena dengan satu kali PCR pada kondisi yang telah ditentukan telah memberikan hasil yang baik. Hasil yang sama diperoleh dengan menggunakan Taq Mix produk Takara Jepang, bahkan dengan konsentrasi primer yang sangat rendah 0,6µl (stok 10 pmol) memberikan hasil yang sangat bagus.

Uji PCR-RFLP

Untuk menentukan kemungkinan spesies parasit *Anisakis* spp yang terdapat pada ikan-ikan yang diperiksa, dilakukan uji PCR-RFLP. Uji ini merupakan perpaduan antara uji *Polymerase Chain Reaction* dan uji *Restriction Fragment Length Polymorphism*. Hasil

uji PCR yang memperlihatkan pita pada angka yang dikehendaki (965 bp) dilakukan uji lanjut dengan melakukan pemotongan fragment DNA menggunakan 3 enzim restriksi, yaitu Taq I, Hinf I dan Cfo I. Dengan menggunakan enzim Taq I, fragment DNA nampak jelas pada angka 400 bp dan 350 bp (Gambar 4). Dengan enzim restriksi Hinf I fragment DNA terbaca pada angka 620 bp dan 350 bp, sedangkan dengan enzim restriksi Cfo I fragment DNA terbaca pada angka 320 bp, 240 bp, 180 bp., dan 160 bp (Gambar 5).

Uji PCR-RFLP dengan menggunakan ketiga enzim restriksi tersebut menunjukkan bahwa spesies *Anisakis* yang ditemukan tersebut dari ikan tongkol



Gambar 5. Uji PCR-RFLP menggunakan enzim restriksi Hinf I dan Cfo I. M= marker, Lane 1 sd 4 Hinf I., Lane 5 sd 7 dengan Cfo I. A=620 bp, B= 350 bp, C= 320 bp, D= 240 bp, E= 180 bp, F= 160 bp.

(*A. thazard*) adalah *Anisakis typica*. Uji PCR-RFLP untuk menentukan spesies *Anisakis* spp telah digunakan sebelumnya oleh beberapa orang peneliti, yaitu antara lain Pontes *et al.* (2005) pada ikan dari Perairan Madeira, Umehara *et al.* (2010) dari ikan hair tail dari perairan Taiwan dan Jepang, serta Lee *et al.* (2009) dari ikan di Korea. Hasil penelitian dari para penelitian tersebut menunjukkan pita fragment DNA pada ukuran yang sama dengan sampel penelitian yang dilakukan saat ini.

Siklus hidup parasit *Anisakis* sp. seperti digambarkan oleh Kagei (1969) adalah sebagai berikut: setelah dolphin/lumba-lumba dan hewan lainnya, yang merupakan inang utama parasit *Anisakis* sp., mengeluarkan feses yang mengandung telur parasit ke laut selanjutnya telur menetas menjadi larva stadia I. Selanjutnya larva stadia I tersebut dimakan oleh krustasea kecil yang merupakan inang perantara pertama seperti Euphasia atau Thysanoessa, dan menjadi larva parasit stadia II dan stadia III. Namun demikian, saat ini diketahui bahwa parasit yang telah menetas dari telur sudah memasuki stadia larva III yang kemudian menginfeksi krustasea kecil. Krustasea tersebut lalu dimakan oleh ikan sebagai inang perantara kedua dan larva parasit berubah menjadi larva stadia III atau IV pada ikan. Jika selanjutnya ikan dimakan oleh lumba-lumba, maka parasit akan berkembang menjadi dewasa pada lumba-lumba dan siklus hidup menjadi lengkap. Manusia dapat berfungsi sebagai inang insidental, jika memakan ikan mentah yang terinfeksi oleh larva parasit ini maka parasit akan menginfeksi manusia dan menyebabkan penyakit Anisakiasis.

Penyakit yang disebabkan oleh *Anisakis* spp. yang dikenal dengan nama anisakiasis adalah termasuk salah satu penyakit zoonosis yang menginfeksi manusia setelah mengkonsumsi makanan mentah dari ikan atau organisme perairan lainnya yang terinfeksi oleh larva dari parasit tersebut. Penyakit Anisakiasis telah dilaporkan dari beberapa Negara terutama yang memiliki kebiasaan mengkonsumsi makanan mentah seperti Jepang, Korea dan beberapa negara di Eropa. Laporan tentang adanya anisakiasis pertamakali dilaporkan dari Belanda dari pasien yang menderita gangguan pada bagian pencernaannya dan dari hasil diagnosis menunjukkan bahwa pasien tersebut telah terinfeksi oleh parasit *Anisakis simplex*, dan setelah itu maka perhatian terhadap parasit ini menjadi semakin besar. Di Jepang *Anisakis nematode* dimasukkan sebagai salah satu agen biologi patogen dalam "Food Sanitation Law" (National Institute of Infectious Diseases and Tuberculosis and Infectious Disease Control Division, Ministry of Health, Labour & Welfare (2004). Kasus Anisakiasis yang paling banyak dilaporkan adalah disebabkan oleh *Anisakis* Tipe I, dan yang paling banyak dilaporkan adalah disebabkan oleh *A. simplex* baik di Eropa maupun di Jepang. Sedangkan kasus Anisakiasis akibat infeksi *A. typica* belum dilaporkan. Hal ini kemungkinan besar sangat terkait dengan pola makan, serta menurut hasil penelitian bahwa *A. simplex* yang paling besar kemungkinan melakukan penetrasi pada otot ikan. Namun demikian, keberadaan *A. typica* juga sangat umum dan telah dilaporkan dari beberapa wilayah seperti Jepang dan Taiwan. Hal ini menunjukkan bahwa parasit ini memiliki distribusi global di daerah tropis atau di daerah beriklim sedang yang memiliki

suhu air lebih tinggi. Umehara *et al.* (2010) melaporkan bahwa keberadaan *A. typica* relatif kurang mendapat perhatian dan belum diketahui secara luas sehingga efek zoonosisnya juga kemungkinan underestimated. Lebih jauh dilaporkan oleh Palm *et al.* (2008) dan hasil penelitian saat ini menunjukkan bahwa parasit *A. typica* disamping ditemukan pada permukaan bagian dalam rongga tubuh juga dapat ditemukan pada otot yang berarti bahwa parasit ini berpeluang sangat besar menginfeksi manusia lewat makanan mentah.

Kasus di Indonesia tentang Anisakiasis belum banyak dilaporkan, namun hasil penelitian yang dilakukan oleh peneliti Uga *et al.* (1996) dengan pendekatan sero-epidemiologi menunjukkan adanya kasus Anisakiasis yang relatif tinggi di Sidoarjo, Jawa Timur. Kalau dilihat dari distribusi parasit, *A. simplex* yang diketahui memiliki penyebaran terbatas di daerah suhu dingin (Mattiucci & Nascetti, 2006) bukanlah merupakan penyebab dari kasus Anisakiasis yang dilaporkan di Jawa Timur, namun kemungkinan besar disebabkan oleh *A. typica*, yang memiliki penyebaran luas di daerah dengan suhu air tropis (Mattiucci & Nascetti, 2006). Hypotesis ini tentunya masih memerlukan observasi lebih jauh tentang jenis dan penyebab kasus anisakiasis di Jawa Timur dan bahkan tempat-tempat lainnya di Indonesia.

Identifikasi secara akurat terhadap Anisakis pada setiap stadia siklus hidupnya merupakan hal yang sangat penting untuk dapat melakukan diagnose secara tepat dan cepat dan merupakan salah satu hal yang sangat penting dalam melakukan surveillance dan monitoring serta pengendalian penyakit anisakiasis. Dalam banyak kasus, identifikasi larva Anisakis masih sangat sulit dilakukan secara morfologi karena terbatasnya karakteristik taksonomi yang dimiliki stadia larva parasit ini. Dengan teknik molecular PCR ternyata dapat mengatasi masalah tersebut. Parasit Anisakis dapat dipisahkan secara morfologi dan mengelompokkannya ke dalam Anisakis tipe I atau Anisakistipe II berdasarkan keberadaan mukron pada bagian *posterior end*-nya. Anisakis yang memiliki mukron dikelompokkan ke dalam tipe I (Berland, 1961). Dari hasil pemeriksaan menunjukkan bahwa Anisakis tipe I yang merupakan parasit penyebab Anisakiasis merupakan parasit dominan pada ikan tongkol. Parasit yang dikelompokkan ke dalam Anisakis tipe II memerlukan penelaahan lebih lanjut karena terkadang sulit melihat dengan jelas keberadaan mukron akibat proses preservasi parasit yang kurang sempurna.

Target yang digunakan dalam mengembangkan teknik diagnose untuk parasit ini adalah wilayah ITS1-5.8S-ITS2, karena dari berbagai penelitian terdahulu menunjukkan bahwa wilayah ini merupakan wilayah yang dapat digunakan sebagai penanda molekuler untuk identifikasi dan diagnose *Anisakis nematode* dengan benar. Dengan teknik ini beberapa spesies Anisakis tipe I dan tipe II sudah dapat dipisahkan berdasarkan susunan oligonukleotidanya. Beberapa sampel parasit Anisakis yang tergolong ke dalam tipe I yang diisolasi dari ikan tongkol di ekstraksi DNANYa, dilakukan pengujian dengan PCR dan hasil PCR yang menunjukkan pita pada angka 965 bp dilakukan uji PCR-RFLP. Hasil penelitian yang dilakukan Uji PCR-RFLP dengan enzim restriksi Taq I memperlihatkan adanya 2 buah pita yang berdekatan pada angka 400 bp dan 350 bp dan dengan enzim restriksi Hinf I menunjukkan pita pada angka 620 bp dan 350 bp dan enzim restriksi Cfo I memperlihatkan adanya 4 buah pita pada angka di bawah 500 bp (320 bp, 240 bp, 180 bp dan 160 bp). Sampel parasit Anisakis tipe I yang diuji dengan PCR-RFLP semuanya menunjukkan bahwa spesiesnya adalah *A. typica* berdasarkan kriteria D'Amelio *et al.* (2000) dan Pontes *et al.* (2005)

Kesimpulan dari penelitian ini adalah hasil pengujian dengan PCR-RFLP terhadap 6 sampel yang diamati menunjukkan bahwa spesies Anisakis tipe I yang diisolasi dari ikan tongkol dan ikan kembung adalah *A. typica* dan teknik PCR-RFLP dapat digunakan untuk identifikasi parasit *Anisakis* spp yang ada di perairan Indonesia.

Ucapan Terima kasih

Penelitian ini dibiayai oleh dana proyek penelitian Research Grant IMHERE UNHAS, dengan Surat Perjanjian Kontrak No. 67/I-MHERE-UH/VI/2010 Tanggal 10 Juni 2010.

Daftar Pustaka

- Abe, N., N. Ohya & R. Yanagiguchi. 2005. Molecular characterization of *Anisakis pegreffii* larvae in Pacific cod in Japan. *J. Helminthol.* 79(4): 303-6.
- Berland, B. 1961. Nematodes from some Norwegian marine fishes. *Sarcia*, 2: 1-50.
- D'Amelio, S., K.D. Mathiopoulos, C.P. Santos, O.N. Pugachev, S.C. Webb, M. Picanço & L. Paggi. 2000. Genetic markers in ribosomal DNA for the identification of members of the genus *Anisakis*

- (Nematoda: ascaridoidea) defined by polymerase-chain-reaction-based restriction fragment length polymorphism. *Int. J. Parasitol.*: 30(2):223-6.
- Do, K.R., Y.S. Cho, H.K. Kim, B.H. Hwang, E.J. Shin, H.B. Jeong, S.S. Kim, H.S. Chae & M.G. Choi. 2010. Intestinal Helminthic Infections Diagnosed by Colonoscopy in a Regional Hospital during 2001-2008. *Korean J. Parasitol.*, 48 (1): 75-78.
- Foti, C., E. Nettis, N. Cassano, I.D.I. Mundo & G.A. Vena. 2002. Acute Allergic Reactions to *Anisakis simplex* After Ingestion of Anchovies. *Acta Derm Venereol.* 82: 121-123.
- Gutiérrez-Ramos, R. Guillén-Bueno, R. Madero-Jarabo, R. del Hoyo & C. Cuéllar. 2000. Digestive haemorrhage in patients with anti-*Anisakis* antibodies. *European J. Gastroen Hepatol.* 12:337-343.
- Hadidjaja, P., H.D. Ilahude, H. Mahfudin, Burhanuddin & M. Hutomo. 1978. Larvae of *Anisakidae* in Marine Fish of Coastal Waters near Jakarta, Indonesia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 27(1): 51-54.
- Jakob, E. & H.W. Palm. 2006. Parasites of commercially important fish species from the southern Java coast, Indonesia, including the distribution pattern of trypanorhynch cestodes. *Verhandlungen der Gesellschaft für Ichthyologie*, Band 5, 165-191.
- Kagei, N. 1969. Life history of nematodes of the genus *Anisakis*. *Saishin Igaku* 24, 389-400.
- Lee, M.H., D.S. Cheong & C. Choi. 2009. Molecular genotyping of *Anisakis* species from Korean sea fish by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *Food Cont.* 20: 623-626.
- Marques, J.F., H.N. Cabral, M. Busi & S. D'Amelio. 2006. Molecular identification of *Anisakis* species from Pleuronectiformes off the Portuguese coast. *J. Helminthol.*; 80(1):47-51.
- Mattiucci, S. & G. Nascetti, 2006. Molecular systematics, phylogeny and ecology of anisakid nematodes of the genus *Anisakis* Dujardin, 1845: an update. *Parasite* 13, 99-113.
- National Institute of Infectious Diseases and Tuberculosis and Infectious Diseases Control Division, Ministry of Health, Labour and Welfare. 2004. Foodborne helminthiases as emerging diseases in Japan. *Infect. Agents Surveillance Rep.*: 25: 214-215.
- Paggi, L., S. Mattiucci & S. D'Amelio. 2001. Allozyme and PCR-RFLP markers in anisakid nematodes, aetiological agents of human anisakidosis. *Parassitologia.*; 43 Suppl 1:21-7.
- Palm, H.W., I.M. Damriyasa, Lindaandl.B.M. Oka. 2008. Molecular genotyping of *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda: Ascaridoidea: Anisakidae) larvae from marine fish of Balinese and Javanese waters, Indonesia. *Helminthologia*, 45, 1: 3-12.
- Pontes, T., S. D'Amelio, G. Costa & L. Paggi. 2005. Molecular characterization of larval anisakid nematodes from marine fishes of Madeira by a PCR-based approach, with evidence for a new species. *J. Parasitol.*; 91(6):1430-4.
- Uga, S., K. Ono, N. Katokan & H. Hasan. 1996. Seroepidemiology of five major zoonotic parasite infections in inhabitants of Sidoarjo, East Java, Indonesia. *SE Asian J. Trop. Med.*, 2, 556-561.
- Umehara, A., Y. Kawakami, J. Araki & A. Uchida. 2007. Molecular identification of the etiological agent of the human anisakiasis in Japan. *Parasitol. Int.* 56(3):211-215.
- Umehara, A., Y. Kawakami, H.K. Ooi, A. Uchida, H. Ohmae & H. Sugiyama. 2010. Molecular identification of *Anisakis* type I larvae isolated from hairtail fish off the coasts of Taiwan and Japan. *Int. J. Food Microbiol.* 143: 161-165.