

## Keberadaan *Anisakis typica* (Anisakidae) dari Ikan Tongkol dan Ikan Layang dari perairan Sulawesi Barat

### Occurrence of *Anisakis typica* (Anisakidae) from bullet tuna *Auxis rochei* and Indian scad *Decapterus russelli* from West Sulawesi waters

Muhammad Dusil Hafid<sup>1</sup>, Hilal Anshary<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fish Quarantine and Inspection Agency, Fish quarantine station at West Sulawesi, Mamuju, Indonesia

<sup>2</sup>Laboratory of Fish Parasites and Diseases, Faculty of Marine Science and Fisheries, Hasanuddin University, Indonesia

Email: hilalanshary@unhas.ac.id; hilalanshary@gmail.com)

#### Abstract

Anisakis (L3-stage) is a parasitic nematode commonly found in marine fish or squid serve as intermediate or paratenic host. The purpose of this research was to identify Anisakis larvae using PCR-RFLP and sequencing methods. A total of 30 individuals of each species: bullet tuna (*Auxis rochei*) and Indian scad (*Decapterus russelli*) were examined for presence of *Anisakis spp.* Fish samples caught by fishermen around Mamuju waters were purchased at a fish market. The fish was necropsied and the organs: liver, intestine wall, heart and muscle were removed and put on separated petri dishes and examined for parasites under a stereo microscope. Anisakis found was cleaned and fixed in 70% alcohol. Initial identification was based on ventriculus shape and presence of mucron to distinguish Anisakis type I and Anisakis type II. All Anisakis found belong to Anisakis type I. Ten Anisakis type I were isolated, cleaned and stored in microfuge tubes containing 70% alcohol. The parasite gDNA was extracted using Wizard genomic DNA extraction and purification kit (Promega). Species of Anisakis was determined by PCR-RFLP at ITS1-5.8S-ITS2 region using two restriction enzymes: Taq I and Hinf I and PCR-sequencing in mtDNA cox2 region. Analysis by PCR-RFLP showed that all Anisakis type I examined was in the same pattern as *Anisakis typica*. Sequencing in mtDNA cox-2 region and the phylogenetic analysis showed that all samples were in the same cluster as *A. typica*. Based on PCR-RFLP and sequencing analysis, all Anisakis found in this study belong to *A. typica*.

**Key words:** Anisakis, marine fish, mtDNA cox-2, PCR-RFLP, Sulawesi

#### Abstrak

Anisakis stadia L3 umumnya menginfeksi ikan-ikan laut yang berfungsi sebagai inang perantara/inang paratenik. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi Anisakis sampai level spesies menggunakan metode PCR-RFLP dan sekuensing. Sebanyak masing-masing 30 ekor ikan tongkol (*Auxis rochei*) dan ikan layang (*Decapterus russelli*) diperiksa untuk mendeteksi keberadaan *Anisakis spp.* Ikan sampel diperoleh dari tempat pelelangan ikan Mamuju yang merupakan hasil tangkapan dari perairan di sekitar Mamuju. Metode pemeriksaan yaitu ikan dinekropsi dan organ-organ yaitu hati, dinding usus, jantung dan otot dikeluarkan dari tubuh ikan dan diletakkan secara terpisah pada cawan petri berisi larutan fisiologis (0.85% NaCl), lalu diperiksa di bawah mikroskop stereo. Anisakid yang ditemukan diisolasi dan difiksasi pada alkohol 70%. Identifikasi awal dilakukan dengan melihat bentuk ventriculus dan keberadaan mucron untuk membedakan Anisakis type I atau Anisakis type II. Sebanyak 10 individu parasit Anisakis type I dibersihkan dari debris, disimpan pada tabung microfuge berisi alkohol 70% dan diekstraksi gDNA nya dengan *Wizard genomic DNA extraction and purification kit* (Promega). Parasit diidentifikasi dengan teknik PCR-RFLP dengan enzim restriksi Taq I dan Hinf I dengan target ITS1-5.8S-ITS2. PCR dan sekuensing dilakukan dengan target mtDNA cox2. Hasil analisis dengan teknik PCR-RFLP menunjukkan bahwa semua Anisakis type I yang diperiksa menunjukkan pola pemotongan pita yang sama dengan *Anisakis typica*. Sekuensing dengan target mtDNA cox-2 dan analisa phylogenetik menunjukkan bahwa semua sampel yang diperiksa merupakan spesies *A. typica*.

**Kata kunci:** Anisakis typica, *Auxis rochei*, *Decapterus russelli*, mtDNA cox-2, PCR-RFLP, Sulawesi Barat.

## Pendahuluan

Ikan merupakan inang bagi berbagai macam jenis parasit metazoa termasuk diantaranya adalah parasit monogenea, digenea, acantocephala, dan nematoda. Sebahagian dari parasit tersebut menimbulkan dampak negatif pada ikan akibat luka-luka patologis yang ditimbulkannya. *Anisakis spp* merupakan nematoda anisakid yang memanfaatkan ikan atau invertebrata akuatik seperti cumi-cumi sebagai inang perantara, dan pada inang perantara parasit nematode berada pada stadia L3 (Nagasawa, 1993; Sakanari and McKerrow, 1989). *Anisakis spp.* umumnya hidup pada dinding usus, hati dan otot daging ikan dan dapat menyebabkan efek patologi pada ikan (Yoshinaga *et al.*, 2006; Hassan *et al.*, 2013). Ikan yang terinfeksi tampak adanya respon inflamasi disekitar larva parasit, terjadi nekrosis dan perubahan degeneratif pada hepatocyte ikan (Hassan *et al.*, 2013). Anisakis selain menimbulkan efek patologi pada ikan, yang menjadi perhatian besar bagi ahli-ahli parasitologi adalah dampak zoonosis yang ditimbulkan oleh infeksi parasit Anisakis. *Anisakis sp.* dapat menyebabkan penyakit yang disebut anisakiasis pada manusia yang terinfeksi setelah mengkonsumsi ikan mentah terinfeksi atau yang tidak matang dengan sempurna. Saat ini diketahui ada dua spesies Anisakis yang diketahui telah menyebabkan anisakiasis pada manusia, diantaranya yang paling dikenal adalah *Anisakis simplex* (Rosales *et al.*, 1999) dan spesies lainnya adalah *A. pegreffii* (Fumarola *et al.*, 2009; Mladineo *et al.*, 2016).

Parasit Anisakis adalah parasit yang umum menginfeksi ikan-ikan laut di berbagai belahan dunia. Sampai saat ini diketahui ada sebanyak 9 spesies Anisakis yang telah dilaporkan menginfeksi

berbagai spesies ikan di dunia, yaitu *A. simplex*, *A. Pegreffii*, *A. berlandi* (= *A. simplex* C), *A. typica*, *A. ziphidarum*, *A. nascettii*, *A. paggiae*, *A. physeteris*, dan *A. brevispiculata* (Mattiucci *et al.*, 2014). Enam spesies pertama termasuk Anisakis type I dan 3 spesies terakhir termasuk Anisakis type II. Di Indonesia, sampai saat ini telah dilaporkan *Anisakis typica* dan *Anisakis spp.* yang belum diketahui spesiesnya (Anshary *et al.*, 2014; Palm *et al.*, 2008).

Indonesia dikenal sebagai wilayah yang perairannya sangat luas dan dihuni oleh berbagai spesies ikan maupun hewan invertebrate lainnya, namun demikian penelitian tentang infeksi parasit Anisakis masih sangat terbatas. Beberapa penelitian terdahulu yang telah dilakukan oleh peneliti di berbagai wilayah di Indonesia, yaitu Hadidjaja *et al.*, (1978) di teluk Jakarta, Palm *et al.*, (2008) di Pantai Jawa dan Bali, Setyobudi *et al.*, (2011) di Pantai Selatan Jawa, serta Anshary *et al.*, (2014) di Selat Makassar. Larva *Anisakis sp.* dapat dibedakan dengan relatif mudah dari golongan Anisakid lainnya dengan melihat bentuk ventriculusnya. Untuk melakukan identifikasi sampai level spesies tidak cukup dengan melihat morfologinya saja, namun memerlukan analisis molekuler, yaitu dengan PCR-RFLP dan/atau PCR-sekuensing, walaupun ada beberapa spesies larva L3 Anisakis, seperti *A. physeteris*, *A. brevispiculata* dan *A. paggiae* dapat dibedakan secara morfologi (Murata *et al.*, 2011) serta *A. simplex* (ss) dan *A. pegreffii* berdasarkan panjang mucron (Quiazon *et al.*, 2008). Penggunaan teknik PCR-RFLP telah diketahui dapat membedakan beberapa spesies *Anisakis spp*, dan penggunaan teknik molekuler dengan gen penciri mitokondria *cox-2* dapat membedakan beberapa spesies *Anisakis spp* (Farjallah *et al.*, 2008; Umehara *et al.*, 2010).

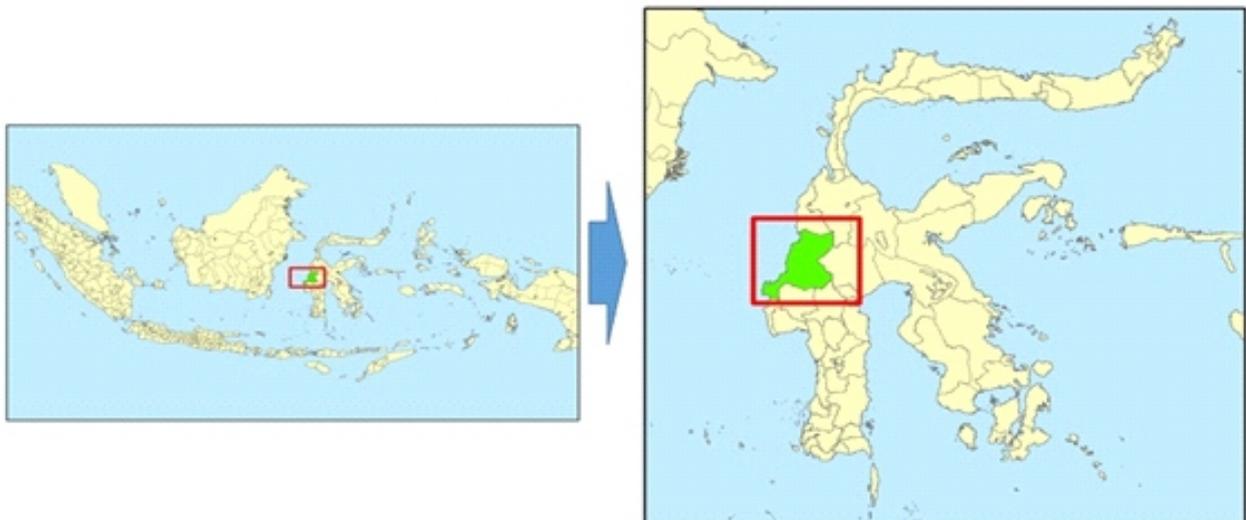
Meskipun parasit *Anisakis sp.* dapat menyebabkan efek patologis pada ikan dan potensil dapat memberikan dampak negatif pada saat ikan dibudidayakan serta kemungkinan penolakan produk perikanan yang terinfeksi, saat ini sangat sedikit informasi yang diketahui tentang infeksi parasit Anisakis terutama di Perairan Mamuju. Penelitian ini ditujukan untuk mengidentifikasi jenis-jenis Anisakis sampai level spesies yang menginfeksi ikan tongkol dan ikan layang di perairan Mamuju secara morfologi dan molekuler, serta menentukan tingkat infeksi dan mikrohabitat parasit.

### Materi dan Metode

Sampling ikan dilakukan pada bulan Maret sampai dengan Desember 2014 di Tempat Pelelangan Ikan (TPI) Mamuju. Ikan yang diperiksa adalah ikan yang merupakan hasil tangkapan nelayan di sekitar perairan Mamuju (Gambar 1). Ikan yang diperiksa adalah ikan tongkol *Auxis rochei* dan ikan layang *Decapterus russellii*. Jumlah ikan yang diperiksa untuk masing-masing spesies adalah

sebanyak 30 ekor. Organ-organ yang diperiksa pada ikan meliputi otot daging, dinding luar usus, hati dan jantung. Organ-organ dalam diambil dan diletakkan pada cawan petri yang berisi larutan fisiologis 0.85% NaCl.

Pemeriksaan parasit dilakukan dengan menggunakan stereomikroskop. Semua cacing nematoda yang ditemukan dikumpulkan pada wadah, dibersihkan, difiksasi pada alkohol 70% dan selanjutnya diidentifikasi untuk membedakan antara *Anisakis sp.* dengan golongan Anisakid lainnya, mengikuti petunjuk buku identifikasi Anderson (2000). Sebelum diperiksa, parasit direndam selama beberapa menit dalam larutan glycerol dan alkohol 70% dengan perbandingan 1:1 agar ventriculus dan mucron parasit tampak jelas. Selanjutnya ventriculus dan mucron parasit Anisakis diukur panjangnya dengan menggunakan *eyepiece graticule*. Prevalensi dan intensitas rata-rata *Anisakis sp.* ditentukan untuk setiap spesies ikan. Prevalensi adalah persentase ikan yang terinfeksi oleh *Anisakis sp.* dan intensitas rata-rata adalah jumlah parasit *Anisakis sp.* yang ditemukan pada ikan yang terinfeksi (Bush *et al.*, 1997).



**Gambar 1.** Peta lokasi sampling ikan di Perairan Mamuju, Sulawesi Barat.

Untuk identifikasi parasit secara molekuler, parasit difiksasi dalam larutan alkohol 70% dan DNA diekstraksi dengan menggunakan *Wizard genomic DNA extraction and purification kit* (Promega) mengikuti protokol pabrikan. Hasil ekstraksi DNA disimpan pada *freezer* – 20 °C sampai digunakan. Sebanyak 12 individu *Anisakis* diidentifikasi dengan teknik PCR-RFLP dan PCR sekuensing dengan marker molekuler mtDNA *cox2*. Gen mtDNA *cox2* diamplifikasi dengan menggunakan primer 210 (5'-CACCAACTCTTAAAATTATC-3') dan 211 (5'-TTTCTAGTTATATAGATTGRT-TYAT-3') (Nadler and Hudspeth, 2000). PCR dilakukan pada volume reaksi 20 µL dengan kondisi PCR sebagai berikut: pre-denaturasi 94 °C 4 menit, denaturasi 94 °C 30 detik, annealing 45 °C 30 detik, ekstension 72 °C 30 detik dan final ekstension 72 °C 5 menit. Untuk keperluan sekuensing, 10 individu parasit yang telah di PCR di kirim ke 1<sup>st</sup> BASE Malaysia melalui PT Genetika Science Indonesia. Hasil sekuensing dianalisis dengan menggunakan software BioEdit dan analisis phylogenetik dilakukan dengan menggunakan software Mega 6 (Tamura *et al.*, 2013).

Identifikasi parasit dengan teknik PCR-RFLP menggunakan target ITS1 dan ITS2 serta 5.8S rRNA, menggunakan primer NC5 (5'-GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT-3') dan NC2 (5'-TTAGTTTCTTTTCCCTCCGCT-3'). Reaksi PCR dilakukan pada 20 µL, dengan kondisi PCR

sebagai berikut: Pre-denaturasi 95 °C 15 menit, dilanjutkan 30 siklus denaturasi 94 °C 1 menit, 55 °C 1 menit, ekstension 72 °C 1 menit, dan terakhir dengan final ekstension 72 °C 5 menit. Sebanyak masing-masing 10 µL dari hasil PCR didigest menggunakan enzim restriksi Taq I dan Hinf I untuk tiap individu parasit. Komposisi reaksi adalah: Produk PCR 10 µL, nuclease free water 3 µL, buffer 1.5 µL dan bovine serum albumin 0.2 µL.

### Hasil dan Pembahasan

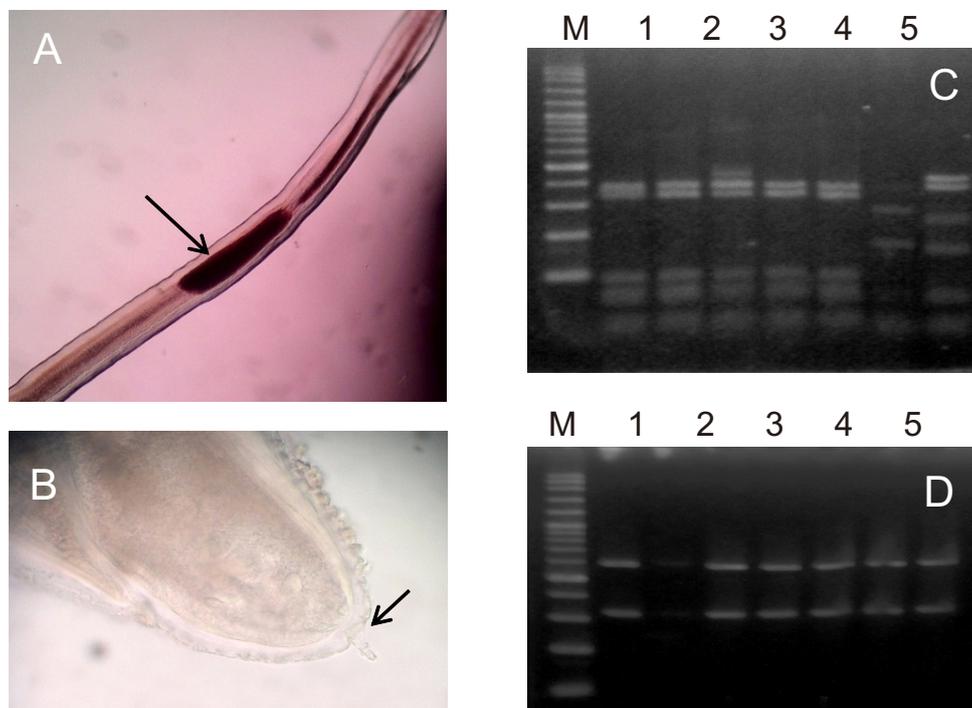
Parasit anisakid yang ditemukan pada ikan tongkol *Auxis rochei* dan ikan layang *Decapterus russelli* adalah *Anisakis* type I, yang ditandai oleh adanya ventriculus yang terlihat jelas dan mucron pada ujung posterior parasit (Gambar 2A dan 2B). Dari sebanyak masing-masing 30 ekor ikan tongkol dan ikan layang yang diperiksa, 56 individu parasit *Anisakis* type I ditemukan dari 13 ekor ikan tongkol yang terinfeksi dan sebanyak 3 individu parasit *Anisakis* type I ditemukan dari 2 ekor ikan layang terinfeksi. Prevalensi *Anisakis sp* pada ikan tongkol adalah 43.3% dan prevalensi infeksi pada ikan layang adalah 10% (Tabel 1). Panjang rata-rata mucron pada *Anisakis* yang ditemukan pada ikan tongkol dan ikan layang hampir sama, yaitu berkisar 0.02 dan 0.03 mm. Kisaran panjang ventriculus pada ikan tongkol lebih bervariasi, yaitu berkisar 0.3 – 1.0 mm dengan rata-rata 0.58 mm, sedangkan pada ikan layang lebih seragam, yaitu 0.52 – 0.65 mm dengan rata-rata 0.57 mm (Tabel 1).

Tabel 1. Prevalensi dan panjang rata-rata ventriculus dan mucron parasit *Anisakis*

Jenis Ikan	Kisaran panjang (cm)/berat (g)	Prevalensi (%)	Intensitas (X±SD)(Kisaran)	Panjang ventriculus (mm) (X±SD)(Kisaran)	Panjang mucron (mm) (X±SD)(Kisaran)
Tongkol, <i>Auxis rochei</i>	26-31/ 220-400	13/30 (43.3%)	(4.3±3.0)(1-9)	0.58±0.16 (0.3-1)	0.024±0.005 (0.02-0.03)
Layang, <i>Decapterus russelli</i>	24.5-31/160-320	2/30 (6.6%)	(1.5±0.5)(1-2)	0.57±0.06 (0.52-0.65)	0.03±0

Ukuran panjang ventriculus merupakan salah satu parameter penting dalam membedakan jenis *Anisakis spp.* secara morfologi. Penggunaan panjang ventriculus dalam membedakan spesies *Anisakis* telah diterapkan pada *Anisakis simplex* (ss) dan *A. pegreffii* (Quiazon *et al.*, 2008), dan untuk membedakan sibling spesies *Anisakis simplex* yaitu *A. simplex* (ss), *A. pegreffii*, dan *A. simplex C* yang selanjutnya dideskripsi sebagai spesies baru dengan nama *Anisakis berlandi* (Mattiucci *et al.*, 2014). Panjang ventriculus untuk masing-masing spesies adalah 1.11 mm (range: 0.8-1.35 mm) untuk *A. berlandi*, 0.76 mm (range: 0.55-0.90 mm) untuk *A. pegreffii*, dan 1.29 mm (range: 1.08-1.44 mm) untuk *A. simplex* (ss) (Mattiucci *et al.*, 2014). Panjang ventriculus untuk *A. simplex* (ss) dan *A. pegreffii* yang dilaporkan dari perairan Jepang adalah masing-masing 0.9-1.5 mm untuk *A. simplex* (ss) dan 0.5-0.78 mm untuk *A. pegreffii* (Quiazon *et al.*, 2008).

Hasil identifikasi terhadap 14 individu parasit *Anisakis sp* dengan menggunakan PCR-RFLP dengan enzim restriksi Taq I dan Hinf I menunjukkan adanya 2 pita pada angka 350 bp dan 400 bp untuk enzim Taq I, dan 2 pita pada 350 bp dan 620 bp pada Hinf I (Gambar 2C dan 2D). Hasil ini menunjukkan bahwa semua parasit yang diidentifikasi dengan teknik PCR-RFLP dilihat dari pola pemotongan pita adalah *Anisakis typica*. Namun demikian pada sampel ke-3 pada pemotongan dengan enzim restriksi Taq I menunjukkan adanya pita di atas angka 400 bp yang diduga merupakan *genotype hybrid* dari *Anisakis sp.* pada ikan tongkol atau adanya spesies sibling pada *A. typica*. Fenomena adanya *hybrid genotype Anisakis sp.* atau spesies sibling *A. typica* juga pernah dilaporkan di Perairan selat Makassar (Anshary *et al.*, 2014).



Gambar 2. A. Ventriculus, B. Mucron pada ujung posterior, C. Pola pemotongan enzim restriksi Taq I (M=Marker, 1-5= *A. typica*, 6= *A. pegreffii*, 7= *A. simplex s.s*), dan D. Pola pemotongan enzim restriksi Hinf I (M=Marker, 1-7= *A. typica*).

Penggunaan teknik PCR-RFLP untuk membedakan spesies *Anisakis* telah digunakan secara luas. Taq I dan Hinf I merupakan enzim restriksi yang dapat digunakan dalam teknik PCR-RFLP (Abe *et al.*, 2006; Farjallah *et al.*, 2008). Selain kedua enzim

tersebut, Hha I juga merupakan enzim restriksi yang telah digunakan secara luas, namun Taq I dan Hinf I pada penelitian ini telah dapat berfungsi dengan baik dan dapat digunakan dalam mengidentifikasi *Anisakis spp.* dari perairan di Indonesia dengan PCR-RFLP.

Tabel 2. Persentase kemiripan parasit *Anisakis* pada penelitian ini dengan *Anisakis typica*.

Present Samples	AM-3	AM-4	AM-5	AM-6	AM-7	AM-8	AM-9	DM-10	DM-11	DM-12	AB517571 <i>A. typica</i>	DQ116427 <i>A. typica</i>	KF356649 <i>A. typica</i>
AM-3		96.5	96.3	95.6	96.3	93.5	96.5	99.1	96.7	96.1	95.6	96.5	94
AM-4			98.8	98.8	99.1	95.4	99.3	97.1	99.2	99	98.2	99	95.7
AM-5				98.6	99	94.3	99.1	96.5	99	99.1	98.6	99.1	94.4
AM-6					98.6	95.2	98.8	96.3	98.7	98.5	97.9	99	95.5
AM-7						94.3	99.5	96.8	99.3	99.1	98.6	99.5	94.8
AM-8							94.5	94.2	94.5	95.1	94.7	94.6	99
AM-9								97	99.5	99.3	98.8	99.7	95
DM-10									96.9	96.8	96.1	96.9	94.5
DM-11										99.2	98.5	99.3	94.8
DM-12											99.3	99.2	94.7

Keterangan: AM= Sampel *Anisakis* dari ikan tongkol, DM= Sampel *Anisakis* dari ikan layang

Sekuensing terhadap 10 *Anisakis* type I, yang terdiri atas 7 individu dari ikan tongkol dan 3 individu dari ikan layang menunjukkan persentase kemiripan yang berkisar antara 94% - 99.7% dengan *A. typica* dewasa yang sudah dilaporkan di dunia (Tabel 2). AT-3 diisolasi dari ikan tongkol memiliki kemiripan 94% dengan *A. typica* (KF356649) dari ikan lumba-lumba *Lagenodelphis hosei*, dan AM-9 memiliki kemiripan 99.7% dengan *A. typica* (DQ116427) dari ikan lumba-lumba. *Anisakis* yang ditemukan memiliki divergensi yang lebih lebar. Tingkat kemiripan parasit *Anisakis* yang ditemukan dengan *A. typica* (AB517571) dewasa adalah berkisar 94.7% - 99.3%, kemiripan dengan *A. typica* (DQ116427) adalah 94.6% - 99.7%, dan kemiripan dengan *A. typica* (KF356649) adalah 94% - 99% (Tabel 2). Tingkat kemiripan *A. typica* yang ditemukan pada penelitian ini dengan beberapa spesies parasit *Anisakis* lainnya berkisar antara 85.4% - 87.7% (Tabel 3) dan secara phylogenetik

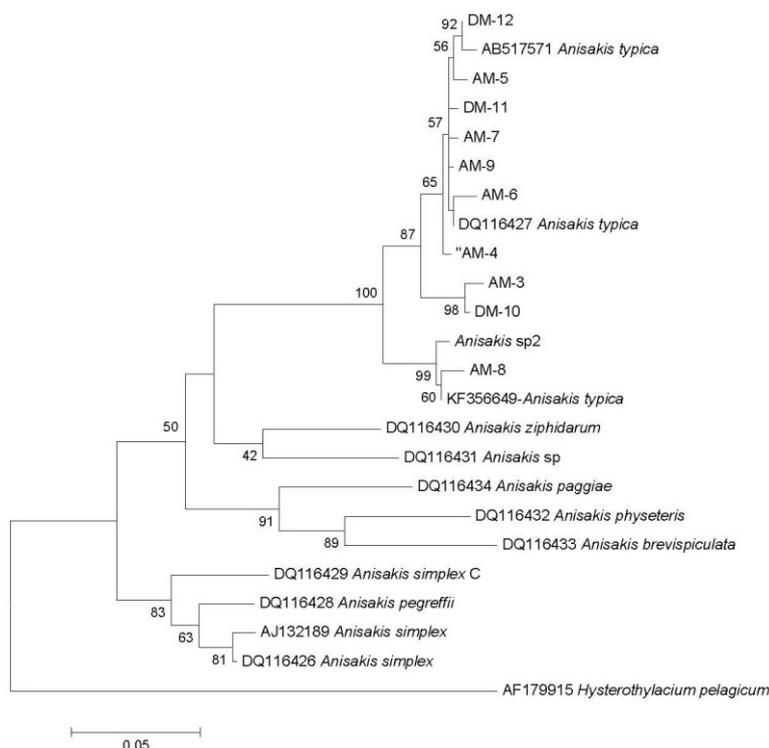
tampak jelas terpisah dari kluster *A. typica* dan membentuk kluster sendiri (Gambar 3). Tingkat kemiripan parasit *Anisakis* yang ditemukan dengan *Anisakis* lainnya yang ada pada GenBank menunjukkan besarnya divergensi dari parasit ini pada region mtDNA *cox 2*, namun masih dalam kategori yang dapat disebut sebagai konspesifik atau dalam satu spesies. Namun demikian tidak menutup kemungkinan adanya *hybrid genotype* atau bahkan spesies baru, sebagaimana dilaporkan oleh Palm *et al.*, (2008) yang dilaporkan dari laut Jawa dan Bali, serta Anshary *et al.* (2014) dari Perairan Selat Makassar. Penelitian akhir-akhir ini dari inang utama *Anisakis* (ikan paus, *Kogia sima*) dari wilayah bagian selatan Filipina menemukan *Anisakis typica* dan *A. brevispiculata*, serta 2 spesies *Anisakis* yang belum diketahui jenisnya yang memiliki kedekatan dengan *A. paggiae* dan *A. ziphidarum* berdasarkan analisa genetik pada region mtDNA *cox-2* (Quiazon *et al.*, 2013).

Analisis filogenetik memperlihatkan bahwa semua Anisakis yang disekuensing berada dalam kluster *A. typica* dan terpisah dengan jelas dari spesies Anisakis lainnya (Gambar 3). Pada pohon phylogeny tersebut tampak bahwa ada 3 subkluster, yaitu kelompok subkluster I diwakili oleh sampel DM-12 sampai AM-4, kelompok II adalah AM-3 dan DM-10, serta kelompok III diwakili oleh Anisakis sp2 dan AM-8. Divergensi yang tinggi pada *A. typica* telah dilaporkan oleh beberapa peneliti sebelumnya (Koinari *et al.*, 2013; Palm *et al.*, 2008). Tingginya tingkat keberadaan *A. typica* pada penelitian ini konsisten dengan penelitian sebelumnya dari Perairan Selat Makassar (Anshary *et al.*, 2014) dan dari Perairan Jawa dan Bali serta spesies *A. typica* yang dominan dari Papua dan menunjukkan bahwa *A. typica* merupakan spesies dominan di daerah tropis, terutama di Indonesia. Pada wilayah lainnya seperti Mediteranea, Korea dan Perairan Taiwan spesies yang dominan adalah *A. pegreffii* (Chen and Shih, 2015; Cho *et al.*, 2015; Piras *et al.*, 2014; Sohn *et al.*, 2014). Di Jepang, *A. simplex* ditemukan dominan pada wilayah utara sampai perairan Pasifik Jepang, sedangkan *A. pegreffii* merupakan spesies dominan pada wilayah Laut Jepang sampai Laut China Timur (Quiazon *et al.*, 2011; Kong *et al.*, 2015). Meskipun *A. typica* merupakan spesies dominan di daerah tropis, namun parasit ini memiliki wilayah sebaran yang luas dari wilayah tropis dan subtropics serta perairan Turki (Pekmezci *et al.*, 2014). Quiazon *et al.* (2013) menemukan adanya beberapa spesies Anisakis dari perairan Filipina yaitu *A. brevispiculata* dan *A. typica* serta beberapa spesies lain yang memiliki kedekatan dengan *A. paggiae* dan *A. ziphidarum* dari inang utama ikan paus (*Kogia sima*).

Tabel 3. Persentase kemiripan Anisakis pada penelitian ini dengan Anisakid lainnya

No	Spesies <i>Anisakis</i>	Persen Kemiripan (%)
1	<i>Anisakis simplex</i>	86.8-87.7
2	<i>Anisakis pegreffii</i>	86.8-87.3
3	<i>Anisakis simplex C</i>	86.3-87.5
4	<i>Anisakis ziphidarum</i>	86.6-87.7
5	<i>Anisakis sp.</i>	87.7-89.0
6	<i>Anisakis physeteris</i>	85.8-86.6
7	<i>Anisakis brevispiculata</i>	83.2-83.8
8	<i>Anisakis paggiae</i>	85.4-86.3
9	<i>Hysterothylacium pelagicum</i>	76.1-77.1
10	<i>Pseudoterranova decipiens</i>	86.1-86.8

Mikrohabitat *A. typica* menunjukkan bahwa sebagian besar parasit ditemukan pada dinding bagian luar usus, sebagian kecil ditemukan pada hati dan tidak ditemukan parasit pada otot dan jantung. Pada ikan tongkol dari 56 parasit yang ditemukan, hanya 1 (1.8%) ditemukan dari hati dan 55 (98.2%) parasit ditemukan dari permukaan dinding usus. Pada ikan layang, semua parasit Anisakis ditemukan dari dinding luar usus. Hasil ini menunjukkan bahwa parasit *A. typica* memiliki preferensi yang lebih tinggi untuk menempati dinding usus dibanding organ-organ lainnya. Hasil penelitian terdahulu terhadap mikrohabitat Anisakis menunjukkan bahwa parasit dominan berada pada viscera/rongga tubuh inang dan hanya sedikit proporsinya yang menempati otot ikan (Piras *et al.*, 2014; Palm *et al.*, 2008), walaupun dalam beberapa kasus seperti infeksi *A. simplex* pada ikan chum salmon, *Oncorhynchus keta*, di Jepang yang proporsinya sangat besar (98%) ditemukan pada otot ikan (Urawa and Fujisaki, 2006).



Gambar 3. Pohon Phylogeny dari sampel Anisakis pada penelitian ini dengan Anisakis lainnya pada region mtDNA-cox2. Phylogeny Maximum likelihood dibuat dengan software Mega 6, kimura 2-parameter model, 1000 x bootstrap, NNI.

Mikrohabitat *A. typica* menunjukkan bahwa sebagian besar parasit ditemukan pada dinding bagian luar usus, sebagian kecil ditemukan pada hati dan tidak ditemukan parasit pada otot dan jantung. Pada ikan tongkol dari 56 parasit yang ditemukan, hanya 1 (1.8%) ditemukan dari hati dan 55 (98.2%) parasit ditemukan dari permukaan dinding usus. Pada ikan layang, semua parasit Anisakis ditemukan dari dinding luar usus. Hasil ini menunjukkan bahwa parasit *A. typica* memiliki preferensi yang lebih tinggi untuk menempati dinding usus dibanding organ-organ lainnya. Hasil penelitian terdahulu terhadap mikrohabitat Anisakis menunjukkan bahwa parasit dominan berada pada viscera/rongga tubuh inang dan hanya sedikit proporsinya yang menempati otot ikan (Piras et al., 2014; Palm et al., 2008), walaupun dalam beberapa kasus seperti infeksi *A. simplex* pada ikan chum salmon,

*Oncorhynchus keta*, di Jepang yang proporsinya sangat besar (98%) ditemukan pada otot ikan (Urawa and Fujisaki, 2006).

### Kesimpulan

Parasit Anisakis yang ditemukan dari Perairan Mamuju, Sulawesi Barat berdasarkan teknik molekuler PCR-RFLP dan PCR-Sekuensing adalah *Anisakis typica*. Hasil ini menunjukkan bahwa *A. typica* adalah spesies dominan di Perairan Sulawesi dan beberapa wilayah di Indonesia. Siklus hidup parasit Anisakis secara umum melibatkan ikan paus atau ikan lumba-lumba sebagai inang utama dan beberapa spesies ikan maupun cephalopoda serta invertebrate lainnya sebagai inang perantara/inang paratenik. Peranan organism tersebut dalam siklus hidup *Anisakis spp* masih perlu

dipelajari lebih lanjut. Selain itu, penelitian tentang jenis dan distribusi geografis Anisakis dari Perairan Indonesia masih perlu dilakukan mengingat Indonesia sebagai Negara kepulauan yang sangat luas perairannya.

### Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada Kepala Stasiun Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Kelas II, Mamuju, Bpk Bakhtiar, S.Pi dan staff, atas dukungan dan bantuannya selama penelitian di Laboratorium SKIPM Mamuju.

### Daftar Pustaka

- Abe, N., Tominaga, K and Kimata I. (2006). Usefulness of PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of the internal transcribed spacer region of rDNA for identification of *Anisakis simplex* complex. *Jpn. J. Infect. Dis.* 59: 60-62.
- Anderson, R.C. (2000). Nematode parasites of vertebrates. Their development and transmission, 2<sup>nd</sup> ed. CABI Publishing International, Wallingford, UK. 650 p.
- Anshary, H., Sriwulan, Freeman, M.A. and Ogawa, K. (2014) Occurrence and molecular identification of *Anisakis* Dujardin, 1845 from marine fish in Southern Makassar Strait, Indonesia. *Korean J. Parasitol.* 52 (1): 9-19.
- Bush, A.O., Lafferty, K.D., Lotz, J.M. and Shostak, A.W. (1997). Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *J. Parasitol.* 83: 575-583.
- Chen, H.Y. and Shih, H.H. (2015). Occurrence and prevalence of fish-borne *Anisakis* larvae in the spotted mackerel *Scomber australasicus* from Taiwanese waters. *Acta Tropica* 145: 61–67.
- Cho, J., Lim, H, Jung, B-K, Shin, E-H. and Chai, J-Y. (2015). *Anisakis pegreffii* larvae in sea eels (*Astroconger myriaster*) from the South Sea, Republic of Korea. *Korean J. Parasitol.* 53 (3): 349-353.
- Farjallah, S., Slimane, B.B., Busi, M., Paggi, L., Amor, N., Blel, H., Khaled Said, K., and Stefano D'Amelio, S. (2008). Occurrence and molecular identification of *Anisakis* spp. from the North African coasts of Mediterranean Sea. *Parasitol. Res.* 102: 371–379.
- Fumarola, L., Monno, R., Lerardi, E., Rizzo, G., Giannelli, G., Lalle, M. and Pozio, E. (2009). *Anisakis pegreffii* etiological agent of gastric infections in two Italian women. *Foodborne Pathog.* 6: 1157-1159.
- Hadidjaja, P., Ilahude, H.D., Mahfudin, B. and Malikusworo, H. (1978). Larvae of *Anisakidae* in marine fish of coastal waters near Jakarta, Indonesia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 27: 51-54.
- Hassan, M.A , Abd El-Mohsen H. Mohamed and Osman, H.A.M. (2013). Some studies on *Anisakidae* larvae in some marine fish species. *Researcher.* 5(12):172-180.
- Koinari, M., Karl, S., Elliot, A., Ryan, U. and Lymbery, A.J. (2012). Identification of *Anisakis* species (Nematoda: *Anisakidae*) in marine fish hosts from Papua New Guinea. *Vet. Parasitol.* 193: 126-133.
- Kong, Q, Fan, L., Zhang, J., Akao, N., Dong, K., Lou, D., Ding, J., Tong, Q, Zheng, B., Chen, R., Ohta, N. and Lu, S. (2015). Molecular identification of *Anisakis* and *Hysterothylacium* larvae in marine fishes from the East China Sea and the Pacific coast of central Japan. *Int. J. Food Microbiol.* 199: 1–7.
- Mattiucci, S., Cipriani, P., Webb, S. C., Paoletti, M., Marcer, F., Bellisari, B., Gibson, D. I. and Nascetti, G. (2014). Genetic and morphological approaches distinguish the three sibling species of the *Anisakis simplex* species complex, with a species designation as *Anisakis berlandi* n. sp. for *A. simplex* sp. C (Nematoda: *Anisakidae*). *J. Parasitol.* 100 (2): 199–214.
- Mladineo, I., Popovic, M., Drmic-Hofman, I and Poljak, V. (2016). A case report of *Anisakis pegreffii* (Nematoda, *Anisakidae*) identified

- from archival paraffin sections of a Croatian patient. *BMC Infect. Dis.* 16:42.
- Murata, R., Suzuki, J., Sadamasu, K. and Kai, A. (2011). Morphological and molecular characterization of *Anisakis* larvae (Nematoda: Anisakidae) in *Beryx splendens* from Japanese waters. *Parasitol. Int.* 60: 193–198.
- Nadler, S.A. and Hudspeth, D.S.S. (2000). Phylogeny of the Ascaridoidea (Nematoda: Ascaridida) based on three genes and morphology: hypotheses of structural and sequence evolution. *J. Parasitol.* 86: 380-393.
- Nagasawa, K., (1993). Review of human pathogenic parasites in the Japanese Common Squid (*Todarodes pacificus*). *Recent Adv. Fish. Biol.* 293–312.
- Palm, H.W., Damriyasa, I.M., Linda and Oka, I.B.M. (2008). Molecular genotyping of *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda: Ascaridoidea: Anisakidae) Larvae from marine fish of Balinese and Javanese waters, Indonesia. *Helminthologia.* 45: 3-12.
- Pekmezci, G.Z., Onuk, E. E., Bolukbas, C. S., Yardimci, B., Gurler, A. T., Acici, M. and Umur, S. (2014). Molecular identification of *Anisakis* species (Nematoda: Anisakidae) from marine fishes collected in Turkish waters. *Vet. Parasitol.* 201: 82–94.
- Piras, M.C., Tedde, T., Garippa, G., Virgilio, S., Farjallah, S., Merella, P. and Sanna, D. (2014). Molecular and epidemiological data on *Anisakis* spp. (Nematoda: Anisakidae) in commercial fish caught off northern Sardinia (western Mediterranean Sea). *Vet. Parasitol.* 203 (1-2): 237-240.
- Quiazon, K.M.A., Yoshinaga, T., Ogawa, K. and Yukami, R. (2008). Morphological differences between larvae and in vitro-cultured adults of *Anisakis simplex* (sensu stricto) and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae). *Parasitol. Int.* 57: 483-489.
- Quiazon, K.M.A., Yoshinaga, T. and Ogawa, K. (2011). Distribution of *Anisakis* species larvae from fishes of the Japanese waters. *Parasitol. Int.* 60: 223–226.
- Quiazon, K.M.A., Santos, M. D. and Yoshinaga, T. (2013). *Anisakis* species (Nematoda: Anisakidae) of Dwarf Sperm Whale *Kogia sima* (Owen, 1866) stranded off the Pacific coast of southern Philippine archipelago. *Vet. Parasitol.* 197: 221–230.
- Rosales, M.J., Mascaro, C., Fernandez, C., Luque, F., Moreno, M. S., Parras, L., Cosano, A. and Munoz, J. R. (1999). Acute Intestinal Anisakiasis in Spain: a Fourth-stage *Anisakis simplex* Larva. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 94(6): 823-826.
- Sakanari, J.A. and McKerrow, J.H. (1989). Anisakiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 278–284.
- Setyobudi, E., Soeparno and Helmiati, S. (2011). Infection of *Anisakis* sp. larvae in some marine fishes from the southern coast of Kulon Progo, Yogyakarta. *Biodiversitas* 12: 34-37.
- Sohn, W.M., Kang, J.M. and Na, B.K. (2014). Molecular analysis of *Anisakis* type I larvae in marine fish from three different sea areas in Korea. *Korean J. Parasitol.* 52: 383-389.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725-2729.
- Umehara, A., Kawakami, Y., Ooi, H-K, Uchida, A., Ohmae, H. and Sugiyama, H. (2010). Molecular identification of *Anisakis* type I larvae isolated from hairtail fish off the coasts of Taiwan and Japan. *Int J. of Food Microbiol.* 143: 161–165.
- Urawa, S. and Fujisaki, Y. (2006). Heavy infection of *Anisakis simplex* (Nematoda: Anisakidae) larvae in the muscle of maturing chum salmon: a preliminary report. (NPAFC Doc. 993). 6 p. National Salmon Resources Center, Fisheries Research Agency, Toyohira-ku, Sapporo 062-0922, Japan.
- Yoshinaga, T., Kinami, R., Hall, K.A. and Ogawa, K. (2006). A preliminary study on the infection of anisakid larvae in juvenile greater amberjack *Seriola dumerili* imported from China to Japan as mariculture seedlings. *Fish Pathol.* 41: 123-126.