

**PENENTUAN DAN ANALISIS SECARA MOLEKULER DARI STRAIN  
*Schistosoma japonicum* (TREMATODA) DI INDONESIA**

**DETERMINATION AND MOLECULAR ANALYSIS OF STRAIN  
OF *Schistosoma japonicum* (TREMATODA) IN INDONESIA**

**Kurniasih<sup>1</sup>, F.A. Sudjadi<sup>2</sup>, Bambang Sumiarto<sup>3</sup> dan Susan M. Noor<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Bagian Patologi, <sup>2</sup>Bagian Parasitologi, <sup>3</sup>Bagian Kesmavet, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada  
Sekip Unit II Yogyakarta 55281, Telp./Fax. (0274) 563083

**ABSTRAK**

Schistosomiasis adalah penyakit endemik yang dapat menyerang manusia dan hewan di sekitar danau Lindu dan lembah Napu, Sulawesi Tengah, Indonesia. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemungkinan adanya variasi intra-spesies dari cacing dewasa *Schistosoma japonicum* berasal dari Indonesia. Tikus liar dan siput, *Oncomelania hupensis lindoensis*, diambil dari danau Lindu dan lembah Napu, Sulawesi Tengah. Serkaria *S. japonicum* yang keluar dari siput kemudian di infeksi ke lima ekor mencit untuk pengamatan cacing dewasa dan perubahan histopatologi semua organ. Serkaria dan cacing dewasa diamati morfologinya, sebagian cacing dewasa di fiksasi dengan larutan ethanol absolut untuk dilakukan ekstraksi rDNA, amplifikasi dengan PCR, atau analisis *restriction length fragment polymorphism* (RFLP) dengan enzim digesti dan elektroforesis pada agarose. Ekstraksi rDNA cacing jantan dan betina secara individual dengan metoda *phenol chloroform* dan amplifikasi rDNA menunjukkan hasil band yang baik. Hasil analisis RFLP dengan menggunakan 3 enzim (*HindIII*, *EcoRI* dan *BamHI*) menunjukkan perbedaan strain *S. japonicum* yang berasal dari Napu dan Lindu. Variasi intra-spesies rDNA cacing dewasa dijumpai pula di lembah Napu.

**Kata kunci :** *S. japonicum*, analisis molekuler

**ABSTRACT**

Schistosomiasis is an endemic disease that can infect human and animals surrounding Lindu lake and Napu valley, Central Sulawesi, Indonesia. The aim of research was to analyse out the intra-species variation of *Schistosoma japonicum* isolated from Indonesia. Wild rats and snails, *Oncomelania hupensis lindoensis*, were collected from Lindu lake and Napu valley, Central Sulawesi. Cercaria of *S. japonicum* emerged from snail were then infected into 5 mice to get adult worm and to examine the histopathological changes. Cercariae and adult worm were examined morphologically. Some of adult worm were fixed with the absolute ethanol for rDNA extraction, amplification, restriction length fragment polymorphism (RFLP) and agarose gel electrophoresis. Ribosomal DNA extraction product of individual male and female worms using phenol-chloroform method and rDNA amplification at the internal transcribed spacer 1 (ITS 1) was obtained a good result. The use of three enzymes (*HindIII*, *EcoRI* and *BamHI*) in RFLP gave variations of *S. japonicum* from Napu and Lindu. Intra-species variations of adult worm was also found in the Napu valley.

**Key words :** *S. japonicum*, molecular analysis

## PENDAHULUAN

Schistosomiasis adalah penyakit yang disebabkan oleh *Schistosoma japonicum* dan ditemukan pertama kali di Indonesia berasal dari tinja manusia yang hidup di Palu, Sulawesi Tengah oleh Muller dan Tesch pada tahun 1937. Faust dan Bonne selanjutnya pada tahun 1948 menemukan cacing dewasanya pada manusia, anjing dan hewan liar lainnya pada tahun 1948 (Hadidjaja, 1985). Hadidjaja *et al.* (1972) melaporkan bahwa 53% dari sampel tinja manusia yang hidup disekitar danau Lindu, Sulawesi Tengah positif menderita penyakit ini. Siput *Oncomelania* sp. pertama kali ditemukan sebagai hospes perantaranya oleh Carney *et al.* (1972).

Pemerintah telah banyak berusaha menanggulangi penyakit endemik ini yaitu antara lain dengan pemberian obat Niridazole dan Stibophen (Hardjawidjaja *et al.*, 1976) atau Prazikuantel (Hadidjaja *et al.*, 1972), pemberantasan siput hospes perantaranya dan perbaikan irigasi pengairan (Sudomo, 1994). Usaha tersebut telah banyak menurunkan angka kejadian penyakit yang bersifat sementara saja (Hadidjaja, 1985). Namun Brindley (1994) melaporkan adanya resistensi terhadap obat schistosomiasis yang berhubungan dengan bertambahnya umur penderita.

Hospes definitif dari parasit ini adalah manusia dan hewan mamalia. Telur cacing yang keluar bersama tinja akan menetas dan mengeluarkan mirasidium yang secara aktif berenang menembus badan siput, *Oncomelania hupensis lindoensis*. Miracidium berubah menjadi sporokista didalam kelenjar pencernaan siput, yang akan membentuk serkaria. Serkaria mempunyai ujung ekor bercabang, aktif berenang keluar dari siput dan akan menembus kulit manusia atau hewan. Setelah serkaria melepaskan ekornya dan tumbuh menjadi *schistosomula* akan masuk mengikuti aliran darah atau saluran limfe melalui berbagai organ seperti paru, jantung, usus, hati dan organ lainnya (Anonim, 1991).

Identifikasi *species*, *sub-species* dan strain selain menggunakan perbedaan morfologi juga dapat ditentukan berdasarkan *chromosome*, protein dan asam nucleate (DNA dan RNA). Pengamatan DNA pada vertebrata dan invertebrata (termasuk Digenea) mempunyai 3 *coding-region* yaitu 18S, 5,8S dan 28S. Sedangkan *non-coding region* terdiri atas *external transcribed spacer*, *dua internal transcribed spacer*, dan *non transcribed spacer*. Internal transcribed spacer (ITS1 dan ITS2) terletak diantara 18S, 5,8S dan 28S adalah sangat sensitif dan sering digunakan untuk indikator yang menentukan hubungan antar *species* atau

strain. Kepekaan *region* ini telah dibuktikan pada genus *Dolichosaccus* (Luton *et al.*, 1992), *species Fasciolidae* (Adlard dkk., 1993), *species Didymozoidae* (Anderson dan Barker, 1993) dan genus *Schistosoma* (Bowles *et al.*, 1995).

Variasi intra-*species S. japonicum* sangat besar diberbagai negara seperti China dan Filipina (Merenlander *et al.*, 1987; He *et al.*, 1994), Laos dan Malaysia (Woodruff *et al.*, 1987). McManus dan Hope (1993) melaporkan adanya variasi *schistosomiasis* pada manusia secara molekuler. Bahkan variasi genetik siput *Oncomelania* sp. yang ter-infeksi *S. japonicum* juga besar (Hope dan McManus, 1994). Enzim yang digunakan untuk memotong rDNA pada lokasi tertentu, mempunyai panjang 4-6 base pair. Fragmen yang dihasilkan dari digesti rDNA oleh enzim kemudian diamati berdasarkan ukurannya dengan gel agarose elektroforesis. Fragmen yang lebih kecil dapat pindah lebih mudah dari pada fragment yang lebih besar sehingga akan menghasilkan *band* yang berbeda (Dowling *et al.*, 1990).

Hingga saat ini strain *S. japonicum* penyebab dari *schistosomiasis* di Sulawesi Tengah tersebut belum pernah dianalisis secara molekuler. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui banyaknya *subspecies/strain S. japonicum* yang menginfeksi manusia dan ternak di danau Lindu dan Lembah Napu, Sulawesi Tengah, berdasarkan pemeriksaan morfologi parasit dan analisa ribosomal DNA cacing dewasa jantan dan betina pada daerah ITS.1.

## MATERI DAN METODE

Materi yang dipakai adalah: 1). tikus untuk infeksi *S. japonicum*, 2). tikus liar, 3). siput bebas parasit untuk daur hidup ulang, 4). organ dalam tikus untuk pemeriksaan histopatologi, dan 4). cacing dewasa *S. japonicum* untuk pemeriksaan morfologi dan molekuler.

Tikus liar yang hidup disekitar danau Lindu dan lembah Napu, Sulawesi Tengah ditangkap dengan jerat untuk diperiksa kemungkinan adanya cacing dewasa. Siput *Oncomelania hupensis lindoensis*, yang hidup disekitar lokasi tersebut dikumpulkan sebanyak mungkin untuk pengamatan serkaria dan proses daur hidup selanjutnya. Pengamatan dan otopsi selama pengambilan sampel dilakukan di Laboratorium Kesehatan yang tersedia di lokasi tersebut.

Serkaria yang keluar dari siput kemudian di-infeksikan pada 5 ekor mencit melalui sub-kutan. Mencit diamati gejalanya dan dibunuh pada minggu ke 7 untuk diamati cacing dewasa dan perubahan

histopatologi semua organ. Cacing dewasa di fiksasi dengan larutan formalin 10% untuk pemeriksaan morfologi, dan sebagian di-fiksasi dalam larutan etanol absolut untuk pemeriksaan molekuler.

Individu cacing dewasa jantan dan betina diekstraksi dengan menggunakan metoda *phenol-chloroform/isoamyl alkohol*, kemudian di presipitasi dengan *sodium chlorida* dan dilarutkan dengan TE buffer.



Gambar 1. Hasil analisis RFLP dengan enzim *HindIII* (a - d), *EcoRI* (e - h), *BamHI* (i - l) dan marker (m) a, c, e, g, i, k = cacing betina dari Napu; b, f, j = cacing jantan dari Napu; d, h, l = cacing jantan dari Lindu.

Amplifikasi rDNA menggunakan polymerase chain reaction (PCR) dengan bahan yang tersedia pada PCR-kit dan 2 primer (*backward dan forward primers*) pada setiap reaksi didaerah ITS 1. Primer *forward* yang digunakan adalah SB11 (5'-3') GTA GGT CCT GCG CAA GGA TC dan primer *backwad* adalah AS2 (5'-3') ACC CAT GGC CGC AAT GTG CGT. Jumlah siklus yang digunakan pada PCR sebanyak 26 atau 40 yang masing-masing dengan program 94°C selama 60 detik, 55°C selama 60 detik dan 72°C selama 2 menit detik. Hasil amplifikasi kemudian dianalisis dengan 1,2% agarose gel elektrophoresis. Hasil amplifikasi yang diperoleh di-digesti dengan enzim *HindIII*, *EcoRI* dan *BamHI* selama 2-5 jam pada penangas 37°C. Fragmentasi yang dihasilkan diamati pada 1% agarose gel elektrophoresis dengan voltase 50 selama 90 menit.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Siput, *Oncomelania hupensis lindoensis* mempunyai cangkang berbentuk kerucut, berwarna coklat kekuningan dan jernih, mempunyai ukuran 6,5-

7,5 lingkaran (dewasa), panjangnya 1-5 mm. Siput tersebut dipelihara dalam baki plastik yang berisi tanah liat, batu kapur, daun nangka kering yang sebelumnya sudah di-sterilkan, air setinggi 1 cm. serta daun selada keriting yang segar.

Permukaan badan dan ekor serkaria mempunyai duri halus dan ujung ekor bercabang. Panjang badan 125 µm dan ekor 180-230 µm. Batil isap mulut oval dengan permukaan luarnya berduri,

sebagai tempat bermuaranya saluran kelenjar. Batil isap perut bundar dan dapat ditonjolkan keluar. Kelenjar liur simetris dengan masing-masing mempunyai 5 sel.

Tikus yang di-infeksi dengan serkaria ada yang mati pada minggu ke 6. Tikus tersebut menunjukkan gejala lesu, kurus, kurang nafsu makan, asites dan kolik menjelang kematian. Pada saat autopsi nampak rongga perut berisi cairan jernih, adanya noduli kekuningan dengan diameter 1-3 mm. pada hati, limpa dan lapisan serosa usus halus (duodenum, jejunum dan ileum). Permukaan mukosa usus nampak menjendol dan berdarah.

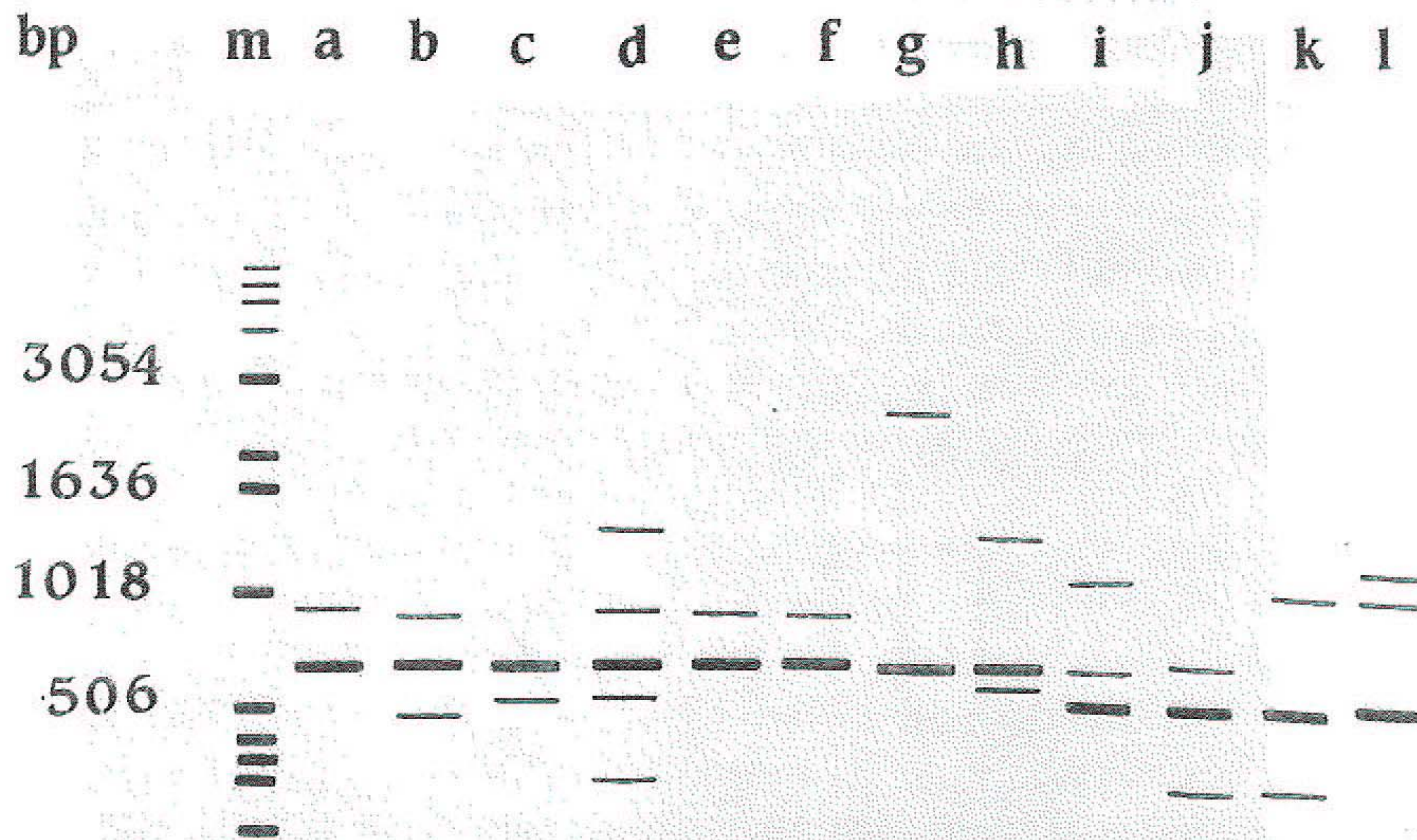
Cacing dewasa sebagian besar ditemukan pada *vena porta* dibanding pada *vena mesenterica* ataupun vena yang lain. Cacing tersebut biasanya berpasangan, cacing betina berada dalam *canalis gynaecophorus* dari cacing jantan. Cacing dewasa jantan silindris, panjang bervariasi antara 5-12 mm, permukaan tubuh ber-spina halus terutama disekitar batil isap dan *canalis gynaecophorus*. Sekum tunggal, memanjang hingga kebelakang. *Testis dorso-ventral* 6-8 buah, genital pore dibelakang acetabulum. Cacing betina *filiform*, lebih

panjang dari yang jantan, panjang 10-14 mm. *Ovarium median, elongate* di belakang. *Vitellaria* disepanjang caecum. Telur *oval* dengan *lateral spina*.

Patogenesitas *schistosomiasis* akibat *S. japonicum* telah banyak dilaporkan terutama berdasarkan jumlah serkaria yang di-infeksikan. He *et al.* (1992) menginfeksi dengan 200-300 serkaria pada monyet menunjukkan radang granuloma hati, terutama disekitar vena porta, dan kerusakan bertahap pada usus

dan Lindu (Gambar 1 dan 2). Cacing betina yang berasal dari Napu juga menunjukkan perbedaan yang jelas.

Intra-spesifik variasi *S. japonicum* telah banyak dilaporkan di Filipina (Merenlander *et al.*, 1987), di Cina (He *et al.*, 1994), di Laos dan Malaysia (Woodruff *et al.*, 1987). Namun pernyataan tersebut disanggah oleh Bowles *et al.* (1993), berdasarkan pengamatan RFLP rDNA pada *ITS 2 region* dan



Gambar 2. Skematik dari Gambar 1, menunjukkan hasil dari RFLP dengan enzim *HindIII* (a - d), *EcoRI* (e - h), *BamHI* (i - l) dan marker (m). a, c, e, g, i, k = cacing betina dari Napu; b, f, j = cacing jantan dari Napu; d, h, l = cacing jantan dari Lindu.

besar. Hadidjaja (1985) telah membuat berbagai infeksi (15, 30, 50, 75, 150 dan 300 serkaria) pada tikus, disimpulkan bahwa infeksi dengan 30-50 serkaria memberi hasil yang baik. Penimbunan telur cacing menyebabkan kerusakan (nekrosis hingga radang granulomatosa) pada hati, limpa dan organ lain (Hadidjaja, 1985; Anonim, 1991; McManus dan Hope, 1993). Perubahan tersebut diatas sesuai dengan perubahan yang diperoleh pada penelitian ini. Kelompok mencit yang mendapat infeksi serkaria yang menghasilkan 27-30 cacing dewasa pada minggu ke 6 dan ke 7, dan menyebabkan nekrosis dan radang granuloma pada hati, usus halus, dan paru-paru.

Ekstraksi rDNA individu cacing dewasa jantan dan betina menggunakan *phenol-chloroform* menunjukkan hasil *band* yang baik pada agarose gel *elektrophoresis*. Hasil ekstraksi yang kemudian di-amplifikasi dengan alat PCR menggunakan 2 primer (SB11 dan AS2) menunjukkan pita yang jelas pada 600 *base pair*. Restriksi dengan menggunakan enzim (*HindIII*, *EcoRI* dan *BamHI*) menunjukkan adanya perbedaan pada cacing jantan yang berasal dari Napu

*cytochrome c oxidase I (COI) gene* dari *genom mitochondria S. japonicum* berasal dari Cina dan Filipina adalah sama (tidak ada variasi intra-spesies).

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat dikatakan bahwa RFLP di *ITS 1 region* kemungkinan merupakan daerah yang sensitif dan belum pernah diteliti sebelumnya. Hasil digesti dengan enzim *HindIII*, *EcoRI* dan *BamHI* pada RFLP menunjukkan perbedaan yang jelas antara cacing jantan yang berasal dari Napu dan Lindu dan membuktikan adanya variasi intra-spesies *S. japonicum* di Indonesia. Khususnya pada cacing jantan dari Lindu lebih menunjukkan konsisten kemiripan dibandingkan dengan yang berasal dari Napu. Hal ini mungkin dipengaruhi oleh letak danau Lindu yang lebih terisolir dan sulit dijangkau manusia dibandingkan dengan lembah Napu. Sehingga memungkinkan terjadinya mutasi gen dari *S. japonicum* di lembah Napu.

Cacing dewasa sebagian besar ditemukan pada *vena porta* dibandingkan di *vena* yang lain. Cacing biasanya berpasangan, dengan cacing betina berada dalam *canalis gynacophorus* dari cacing jantan.

Morfologi dari serkaria dan cacing dewasa berasal dari danau Lindu dan Napu mirip dengan *S. japonicum* yang ada di negara lain.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih diucapkan kepada Hibah Bersaing VI, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional telah memberi biaya penelitian. Ucapan terima kasih ditujukan pula kepada Lembaga Penelitian UGM, Dekan Fakultas Kedokteran Hewan UGM dan Bagian Patologi FKH-UGM atas fasilitas yang diberikan.

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada drh. Nurendah, Dinas Peternakan Propinsi Sulawesi Tengah; drh. Effendi, BPPH Wilayah VI, Maros; Bp. Ramona Baono, Laboratorium Schistosomiasis, Lembah Napu; Bp. Daniel Samel, Laboratorium Schistosomiasis, danau Lindu yang membantu dalam pengambilan sampel siput dan tikus liar.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Adlard, R.A., S.C. Barker, D. Blair, and T.H. Cribb, 1993. Comparison of the second internal transcribed spacer (ribosomal DNA) from populations and species of Fasciolidae (Digenea). *International Journal for Parasitology*, **23**: 423-425.
- Anderson, G.A. and S.C. Barker, 1993. Species differentiation in the Didymozoidae (Digenea): restriction fragment length differences in internal transcribed spacer and 5,8S ribosomal DNA. *International Journal for Parasitology*, **23**: 133-136.
- Anonim, 1991. *Tropical diseases: Progress in research 1989-1990*. 135 pp. World Health Organization. Geneva.
- Bowles, J. and D.P. McManus, 1995. A molecular phylogeny of the human schistosomes. *Molecular of Phylogenetic Evolution*, **4**: 103-109.
- Bowles, J., M. Hope, W.U. Tiu, X. Liu, and D.P. McManus, 1993. Nuclear and mitochondrial genetic markers highly conserved between Chinese and Philippine *Schistosoma japonicum*. *Acta Tropica*, **55**: 217-229.
- Carney, W.P., P. Hadidjaja, G.M. Davis, M.D. Clarke, M. Djajasasmita, S. Nalim, 1972. *Oncomelania hupensis* from the schistosomiasis focus in Central-Sulawesi (Celebes) Indonesia. *Journal of Parasitology*, **59**: 210-215.
- Dowling, T.E., C. Moritz, J.D. Palmer, 1990. Nucleic acids II: restriction site analysis. In: Hillis, D.M. & Moritz, C. (Eds.) *Molecular systematics*. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts. p. 250-317.
- Hadidjaja, P., W.P. Carney, M.D. Clarke, J.H. Cross, A. Jusuf, J.S. Saroso, S. Oemijati, 1972. *Schistosoma japonicum* and intestinal parasites of the inhabitants of lake Lindu, Sulawesi (Celebes); a preliminary report. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **3**: 594-599.
- Hadidjaja, P., 1985. *Schistosomiasis di Sulawesi Tengah Indonesia*. 120 pp. Fakultas Kedokteran-Universitas Indonesia, Jakarta.
- Hardjawidjaja, L., R.T. Clark, K. Sorensen, J. Putrali, 1976. Drug trial of *Schistosoma japonicum* infection in Indonesia. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **7**: 314-318.
- He, X.Y., Y.Q. Fang, and Y.Q. Hu, 1992. Parasitological and histopathological studies of rhesus monkeys infected with chinese mainland strain of *Schistosoma japonicum*. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **23**: 254-260.
- He, X.Y., Y.Q. Hu, Q.F. Yu, H.C. Xue, L.S. Qiu, and M. Xie, 1994. Strain complex of *Schistosoma japonicum* in the mainland of China. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **25**: 232-242.
- Hope, M. and D.P. McManus, 1994. Genetic variation in geographically isolated populations and subspecies of *Oncomelania hupensis* determined by a PCR-based RFLP method. *Acta Tropica*, **57**: 78-82.

Luton, K., D. Walker, and D. Blair, 1992. Comparisons of ribosomal internal transcribed spacers from two congeneric species of flukes (Trematoda: Digenea). *Molecular and Biochemical Parasitology*, **56**: 323-328.

McManus, D.P. dan M. Hope, 1993. Molecular variation in the human schistosomes. *Acta Tropica*, **53**: 255-276.

Merenlender, A.M., D.S. Woodruff, E.S. Upatham, V. Viyanant, H.C. Yuant. Large genetic distance between Chinese and Philippine *Schistosoma japonicum*. *The Journal of Parasitology*, **73**: 861-863.

Sudomo, M., 1994. Pemberantasan siput penular skistosomiasis di Sulawesi Tengah. *Majalah Parasitologi Indonesia*, **7**: 60-64.

Woodruff, D.S., A.M. Merenlender, E. S. Upatham, and V. Viyanant, 1987. Genetic variation and differentiation of three *Schistosoma* species from the Philippines, Laos, and Peninsular Malaysia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **36**: 345-354.