



Tersedia daring pada: <http://ejurnal.undana.ac.id/jvn>

STUDI LITERATUR METODE DIAGNOSIS ANISAKIASIS

Oriza Surya Ningsih¹, Annytha I. R. Detha², Diana A. Wuri²

¹Faculty of Veterinary Medicine Universitas Nusa Cendana University, Kupang

²Laboratory of Veterinary Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine
Nusa Cendana University, Kupang

Abstract

Keywords:

Anisakis sp.,
Prevalence,
Diagnostic
techniques,
Molecular
diagnostic
techniques.

Anisakiasis is a disease caused by *Anisakis* sp. and classified as a dangerous zoonosis. The main source of infection in humans is consuming raw fish containing *Anisakis* sp. Larvae. Various diagnostic techniques are being developed to detect the incidence of anisakiasis. Diagnostic techniques currently used are the Rapid test and the molecular test. Molecular techniques have recently been developed as effective tools not only for the diagnosis of individual cases but also for the taxonomic and evolutionary study of anisakis nematodes. This literature study aims to determine the methods and work procedures as well as the level of accuracy of the various methods used to detect *Anisakis* sp. Reference sources are taken in the form of articles, theses, journals, and e-books related to the title of the literature study being explored. via Google Scholar and with the help of the Mendeley app. Based on a review of literature studies, it can be seen that the method used to detect *Anisakis* sp. with a low level of accuracy namely KIT, LAMP Assay and SEM, while the methods with a high level of accuracy are PCR-RFLP and RT-PCR and the most effective methods are used to detect *Anisakis* sp. are PCR-RFLP and RT-PCR because the processing time is fast and can provide accurate results.

Korespondensi:
orizaningsih3011@gmail.com

PENDAHULUAN

Anisakiasis adalah penyakit yang disebabkan oleh cacing *Anisakis sp.* dan tergolong zoonosis yang berbahaya. Sumber infeksi utama pada manusia karena mengkonsumsi ikan mentah yang mengandung larva *Anisakis sp.* (Acha & Szyfres, 2003). Memakan ikan yang tidak masak atau setengah masak yang terinfeksi dapat menyebabkan penyakit Anisakiasis (Bircher *et al.*, 2000). Potensi utama bahaya oleh tertelannya larva nematoda yaitu pertama, tanpa sengaja melalui konsumsi ikan mentah atau setengah matang dapat menyebabkan infeksi lambung dan usus (Audicana & Kennedy, 2008) dan kedua, larva nematoda dalam keadaan matipun masih dapat menyebabkan reaksi alergi (Moneo *et al.*, 2007).

Kasus anisakiasis di Indonesia pertama kali dilaporkan oleh Uga di Sidoarjo Jawa Timur akibat mengonsumsi ikan mentah atau kurang masak (Muttaqin & Abdulgani, 2013). Beberapa penelitian lainnya yaitu telah melakukan penelitian tentang infeksi

Anisakis sp. di berbagai wilayah di Indonesia diantaranya 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. Tingkat kejadian *Anisakis sp.* di NTT terakhir kali dilaporkan di Kota Kupang yaitu Hibur *et al.* (2016) dan Detha *et al.* (2018).

Selain itu di beberapa wilayah Indonesia bagian timur dan tengah masyarakatnya memiliki kebiasaan konsumsi ikan mentah. Beberapa peneliti menemukan infeksi larva nematoda pada ikan-ikan konsumsi dari perairan Indonesia, umumnya teridentifikasi sebagai *Anisakis sp.* dengan ditemukannya infeksi anisakis pada ikan-ikan yang dikonsumsi maka Anisakiasis berpeluang untuk berkembang di Indonesia (Soewarlan, 2016). Berbagai pengembangan teknik diagnosa untuk mendeteksi kejadian anisakiasis pun semakin dikembangkan, namun demikian penelitian tentang infeksi parasit



Tersedia daring pada: <http://ejurnal.undana.ac.id/jvn>

Anisakis masih sangat terbatas. Teknik diagnosa yang digunakan yaitu teknik diagnosa dengan uji Rapid dan uji Molekuler. Teknik molekuler baru-baru ini dikembangkan sebagai alat yang efektif tidak hanya untuk diagnosis kasus individu tetapi juga untuk studi taksonomi dan evolusi nematoda anisakis. Teknik molekuler dapat dengan mudah membedakan 2 jenis larva (Mattiucci & Nascetti, 2008). Namun informasi mengenai teknik diagnosa anisakis berdasarkan prinsip tingkat akurasi dan prinsip kerjanya masih sangat minim. Dengan demikian penulis menganggap perlu dilakukan kajian mengenai “**TEKNIK DIAGNOSIS ANISAKIASIS Anisakis sp**”.

METODOLOGI

Waktu Kajian Studi Literatur

Kajian Studi literatur ini dikerjakan pada bulan September sampai dengan Oktober 2020 yang meliputi pembuatan *resume* dan kerangka studi literatur secara

umum, penelusuran dan pengumpulan berbagai referensi/pustaka yang berhubungan erat dengan judul diambil dari skripsi, jurnal, dan *e-book* yang terkait dengan judul.

Materi Kajian Studi Literatur

Alat dan bahan

Alat digunakan untuk membantu dalam penyusunan kajian studi literatur ini antara lain laptop, *gadget*, *flashdisk*, alat tulis-menulis, dan bahan yang digunakan meliputi sumber referensi/pustaka berupa artikel, skripsi, jurnal, dan *e-book* yang terkait dengan judul kajian studi literatur dari penulis.

Melakukan penelusuran dan pengumpulan berbagai sumber/pustaka acuan.

Sumber acuan/pustaka diambil berdasarkan hubungan atau relasinya dengan judul studi literatur yang akan dikaji. Sumber pustaka tersebut berupa artikel, skripsi, jurnal, dan *e-book* yang terkait dengan judul kajian studi literatur. Sumber/pustaka ini juga dibantu



Tersedia daring pada: <http://ejurnal.undana.ac.id/jvn>

lewat penelusuran melalui *Google Scholar* dan dengan bantuan aplikasi *Mendeley* namun apabila sumber/pustaka tidak terdapat secara otomatis dalam aplikasi *Mendeley* maka akan diinput secara manual oleh penulis.

Membuat resume dan kerangka studi literatur secara umum.

Pembuatan *resume* dan kerangka studi literatur secara umum memuat hal-hal penting yang akan dikaji didalam studi literatur berdasarkan judul yang telah ditentukan mulai dari latar belakang, tinjauan pustaka, metodologi kajian, hasil dan pembahasan, serta kesimpulan dan saran dengan tujuan membantu memudahkan penulis dalam penyusunan studi literatur

Melakukan penyusunan studi literatur.

Tahap berikut setelah mengumpulkan berbagai sumber pustaka acuan adalah mulai menyusun studi literatur sesuai dengan kerangka yang telah disusun

dan berdasarkan informasi-informasi yang diperoleh dari berbagai sumber acuan yang telah didapatkan sebelumnya untuk kemudian dianalisis dan dievaluasi, dan dilanjutkan dengan pembuatan kesimpulan serta saran.

Analisis Data

Data yang diperoleh dari sumber acuan/pustaka yang berasal dari skripsi, jurnal, dan *e-book* yang terkait dengan judul akan dianalisis secara deskriptif dan dibahas berdasarkan hasil riset/penelitian dari berbagai sumber yang memiliki hubungan dengan judul kajian studi literatur.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Prevalensi Kejadian Anisakiasis di Indonesia

Tingkat penularan penyakit pada umumnya dinyatakan dengan prevalensi kejadian. Prevalensi adalah persentase ikan yang terinfeksi dibandingkan dengan seluruh ikan contoh yang diperiksa (Awilia, 2002). Prevalensi dalam



Tersedia daring pada: <http://ejurnal.undana.ac.id/jvn>

suatu habitat di perairan dipengaruhi oleh komponen-komponen habitat seperti suhu, tekanan, kandungan oksigen dan lain-lain (Gutiérrez-Ramos *et al.*, 2000). Suhu perairan yang tinggi mempengaruhi kecepatan laju metabolisme dan respirasi ikan di perairan, sehingga kebutuhan akan oksigen terlarut juga meningkat. Meningkatnya kebutuhan oksigen terlarut ini dapat menurunkan kandungan oksigen di perairan yang

dapat mempengaruhi kehidupan organisme kecil di perairan (Rukminasari, 2011).

Faktor lainnya yang dapat mempengaruhi prevalensi dalam habitat adalah salinitas. Salinitas diperairan dipengaruhi oleh suhu, kandungan oksigen dan letak geografis perairan. Data prevalensi Anisakis di wilayah Indonesia dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Prevalensi Anisakis di Wilayah Indonesia

Lokasi	Jenis Ikan	Prevalensi (%)	Parasit	Referensi
Perairan Makassar	<i>Auxis thazard</i>	33.3	<i>Anisakis spp.</i>	Anshary, 2011
	<i>Rastrelliger kanargurta</i>	3.1		
Jawa Timur	<i>Epinephelus sexfasciatus</i>	100	<i>Anisakis sp.</i>	Arifudin dan Abdulgani, 2013
	<i>Upeneus Sulphureus</i>	36	<i>Anisakis simplex</i>	Amrina, 2014
	<i>Euthynnus affinis</i>	6.67	<i>Anisakis simplex</i>	Kurniawati, 2014
	<i>Rastrelliger brachysoma</i>	9.6	<i>Anisakis simplex</i>	Herman, 2014
	<i>Lutjanus malabaricus</i>	66-80	<i>Anisakis sp.</i>	Muttaqin dan Abdulgani, 2013
	<i>Lutjanus sanguineus</i>	11.67	<i>Anisakis simplex</i>	Anggraeni, 2014
Aceh Barat	<i>Euthynnus</i>	100	<i>Anisakis sp.</i>	Bahri, 2016



Tersedia daring pada: <http://ejournal.undana.ac.id/jvn>

	<i>affinis</i>			
Kupang, NTT	<i>Katsuwonus pelamis</i>	16	<i>Anisakis sp.</i>	Hibur et al., 2016
	<i>Auxis thazard</i>	20	<i>Anisakis sp.</i>	
Perairan Sulawesi Barat	<i>Euthynnus affinis</i>	43.3	<i>Anisakis sp.</i>	Hafid dan Anshary, 2016

Informasi yang tersedia tentang parasit ini masih sangat langka. Kasus pertama penyakit anisakid dijelaskan pada tahun 1876 oleh Leuckhart. Namun penyakit ini baru dikenali secara luas pada tahun 1960-an, ketika epidemi anisakidosis terjadi di Belanda dengan konsumsi ikan herring asin ringan (Aibinu *et al.*, 2019).

Kasus anisakiasis juga telah dilaporkan oleh Aibinu *et al.* (2019) termasuk di Korea (Sohn *et al.*, 2015), China (Qin *et al.*, 2013), Malaysia (Amir *et al.*, 2016), Taiwan (Li *et al.*, 2015), Inggris Raya (Audicana dan Kennedy, 2008), Spanyol (Herrador *et al.*, 2018), Italia (Mattiucci *et al.*, 2018; Guardone *et al.*, 2018), Prancis (Audicana dan Kennedy, 2008), Jerman (Audicana dan Kennedy,

2008), Denmark (Andreassen dan Jorring, 1970), Norwegia (Jacobsen dan Berland, 1969), Kroasia (Mladineo *et al.*, 2016), Amerika Serikat (Kojima *et al.*, 2013), Amerika Selatan (Borges *et al.*, 2012; Eiras *et al.*, 2018), Mesir (Audicana dan Kennedy, 2008), Afrika Selatan (Audicana dan Kennedy, 2008), dan Australia (Shamsi dan Butcher, 2011). Data terbaru yang ditunjukkan oleh Orphanet (Orphanet, 2016) seperti yang dilaporkan oleh Guardone dan rekannya dalam studi epidemiologi retrospektif baru-baru ini tentang anisakiasis manusia (Guardone *et al.*, 2018), memperkirakan kejadian global 0,32 / 100.000.

Menurut Shamsi & Sheorey (2018) konsumsi makanan laut mentah atau setengah matang ini



Tersedia daring pada: <http://ejurnal.undana.ac.id/jvn>

meningkatkan risiko infeksi ketika parasit yang hidup hadir. Dalam studi terbaru kasus anisakiasis yang dilaporkan antara 2000 dan 2017 di Uni Eropa, total 236 kasus dilaporkan dengan insiden tertinggi di Spanyol, diikuti oleh Italia (Aibinu *et al.*, 2019).

Kasus di Indonesia tentang Anisakiasis belum banyak dilaporkan. 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. Hasil penelitian yang dilakukan oleh peneliti Uga *et al.* (1996) dengan

pendekatan seroepidemiologi menunjukkan adanya kasus Anisakiasis yang relatif tinggi di Sidoardjo, Jawa Timur. Kasus ini kemungkinan besar disebabkan oleh *A. typica*, yang memiliki penyebaran luas di daerah dengan suhu air tropis (Mattiucci & Nascetti, 2006). 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 (Palm *et al.*, 2008) dan menemukan 3 spesies *Anisakis* spp., yaitu *A. typica*, *Anisakis* sp. 1 dan *Anisakis* sp. Hasil-hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa produk perikanan dari laut memiliki resiko besar menyebarkan penyakit pada manusia, sehingga perlu menghindari konsumsi ikan mentah atau setengah matang untuk meminimalkan infeksi anisakiasis.



Tersedia daring pada: <http://ejournal.undana.ac.id/jvn>

Teknik Diagnosa

Identifikasi secara akurat terhadap Anisakis pada setiap stadia siklus hidupnya merupakan hal yang sangat penting untuk dapat melakukan diagnosa secara tepat dan cepat dan merupakan salah satu hal

yang sangat penting dalam melakukan surveilans dan monitoring serta pengendalian penyakit anisakiasis. Tingkat akurasi teknik diagnosa dapat diukur dengan beberapa parameter penentu tingkat akurasi, yang dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Parameter tingkat akurasi teknik diagnosa (Simundic, 2008)

No.	Parameter	Keterangan
1.	Sensitifitas dan spesifisitas	Sensitifitas berkaitan dengan potensi alat tes mengenali subjek yang mengidap penyakit.
		Spesifisitas berkaitan dengan kemampuan tes untuk mengenali subjek tanpa penyakit.
2.	Nilai prediktif positif dan negatif	Nilai prediktif positif memiliki probabilitas keadaan/penyakit yang diminati pada subjek dengan hasil positif (+).
		Nilai prediktif negatif memiliki probabilitas tidak adanya penyakit pada subjek dengan hasil tes negatif (-).
3.	Rasio kemungkinan	Rasio kemungkinan hasil tes yang diharapkan pada subjek dengan keadaan atau penyakit tertentu terhadap subjek tanpa penyakit.
4.	Area di bawah KOPKA	Ukuran global dari akurasi diagnostik sebagai penilaian umum untuk membandingkan dua atau lebih tes diagnostik.



Tersedia daring pada: <http://ejurnal.undana.ac.id/jvn>

5.	Indeks Youden	Ukuran global untuk evaluasi kekuatan diskriminatif keseluruhan dari prosedur diagnostik dan untuk perbandingan satu tes dengan tes lainnya.
6.	Rasio peluang diagnostik	Parameter yang digunakan untuk estimasi umum kekuatan diskriminatif prosedur diagnostik dan untuk perbandingan akurasi diagnostik antara dua atau lebih tes diagnostik.

Dalam banyak kasus, identifikasi larva Anisakis masih sangat sulit dilakukan secara morfologi karena terbatasnya karakteristik taksonomi yang dimiliki

stadia larva parasit ini (Anshary, 2011). Berikut ini merupakan tabel metode yang digunakan untuk deteksi anisakiasis.

Tabel 4. Metode mendeteksi Anisakiasis

Metode	Tingkat Akurasi	Fungsi	Prinsip Kerja	Kelebihan	Kekurangan
KIT	Rendah	Mendeteksi kadar suatu senyawa dengan cukup akurat yang mudah digunakan dan dioperasikan oleh berbagai kalangan.	Menyesuaikan dengan protokol, desain eksperimental, dan metode perhitungan yang dijelaskan untuk validasi kualitatif.	Ketersediaan alat uji kit pada laboratorium publik dan swasta menyediakan alat uji yang siap dipakai dan mudah diaplikasikan. Uji spesifikasi mampu membedakan Anisakis dan Pseudoterranova.	Pemeriksaan dengan KIT memiliki kelemahan bisa memberikan hasil "false negative" yakni tampak negatif meski sebenarnya positif.
LAMP Assay	Rendah	Teknik LAMP mengidentifikasi	Prinsip metode LAMP	Teknik amplifikasi	Teknik LAMP kurang sensitif



Tersedia daring pada: <http://ejurnal.undana.ac.id/jvn>

			sekuens bakteri dengan mekanisme <i>rolling circle amplification</i> (RCA).	merupakan metode modifikasi amplifikasi PCR pada suhu tetap dengan menggunakan empat sampai enam pasang primer dari gen dengan sekuens <i>highly conserved</i> pada spesies target.	DNanya relatif baru dan cukup sederhana, mudah dibaca dan lebih hemat biaya, proses LAMP memakan waktu yang relatif lebih singkat dibanding PCR, yaitu sekitar 1 jam. Hasil amplifikasi LAMP lebih efisien dan sensitif, serta mudah dibaca.	daripada PCR untuk sampel yang kompleks, karena perbedaan enzim polimerase yang digunakan.
	SEM	Rendah	Untuk menyelidiki permukaan dari objek solid secara langsung		Penerapannya yang luas, pencitraan tiga dimensi dan topografis yang terperinci, mudah dioperasikan dan bekerja cepat dalam waktu kurang dari lima menit.	Kerugian dari mikroskop elektron mulai dari ukuran dan biaya. SEM mahal, berukuran besar dan harus ditempatkan di area yang bebas dari kemungkinan gangguan listrik, magnet, atau getaran, memerlukan kondisi vakum, hanya mampu menganalisa permukaan saja, memiliki resolusi yang lebih rendah, sampel yang digunakan harus bahan yang konduktif
	PCR-RFLP	Tinggi	Teknik yang banyak	Membandingkan profil pita-pita	Murah, mudah didesain, berlaku	Kelemahan dalam metode PCR-



Tersedia daring pada: <http://ejurnal.undana.ac.id/jvn>

			digunakan dalam mempelajari variasi inter maupun antar spesies dengan memanfaatkan enzim restriksi.	yang dihasilkan setelah dilakukan pemotongan oleh enzim restriksi terhadap DNA target atau individu yang berbeda.	untuk analisis polimorfisme nukleotida tunggal serta mikroindel, tidak ada persyaratan untuk instrumen mahal, tidak ada persyaratan untuk pelatihan ekstensif untuk staf laboratorium.	RFLP adalah membutuhkan waktu yang panjang karena melalui dua tahap analisis yaitu PCR itu sendiri dan pemotongan DNA hasil PCR dengan enzim restriksi.
	RT-PCR	Tinggi	Menggandakan jumlah molekul DNA pada target tertentu dengan menganalisis molekul DNA baru yang berkomplemen dengan molekul DNA target melalui enzim dan oligonukleotida sebagai primer dalam suatu <i>thermocycle</i> .	Mendeteksi dan mengkuantifikasi reporter fluoresen.	Kemampuan untuk mendeteksi organisme tanpa pembiakan sebelumnya, waktu pengerjaan yang lebih cepat, potensi hasil yang tinggi dan kemampuan untuk mengidentifikasi spesies atau strain patogen.	

Kit

Test kit merupakan suatu alat yang dapat digunakan untuk mendeteksi kadar suatu senyawa dengan cukup akurat yang mudah digunakan dan dioperasikan oleh berbagai kalangan (Sulistiyarti *et al.*, 2015). Prinsip kerja seluruh kit dilakukan sesuai dengan

protokol, desain eksperimental, dan metode perhitungan yang dijelaskan untuk validasi kualitatif (OIE, 2016).

Untuk memvalidasi kit komersial ("uji deteksi DNA PATHfinder Anisakis/ Pseudoterranova") ini didasarkan pada RT-PCR multipleks untuk deteksi kualitatif *Anisakis* dan



Tersedia daring pada: <http://ejournal.undana.ac.id/jvn>

Pseudoterranova, menggunakan uji TaqMan Probe, yang ditargetkan pada pengatur jarak internal yang ditranskripsi dari DNA ribosom nuklir. Kit "PATHfider Anisakis/Pseudoterranova DNA detection assay" menunjukkan akurasi 100% karena kemampuan untuk mengidentifikasi bahan referensi yang sudah dikarakterisasi dengan benar (Cavalleroa *et al.*, 2017).

LAMP Assay (Loop-Mediated Isothermal Amplification)

Metode *Loop Mediated Isothermal Amplification* (LAMP) adalah salah satu teknik diagnostik molekuler yang telah dikembangkan dari tahun 1999 di Jepang. Teknik LAMP menggunakan amplifikasi DNA pada suhu tetap, sehingga penggunaan alat *thermocycler* yang mahal tidak diperlukan. Proses amplifikasi pada metode LAMP menggunakan enzim yang dapat menjadi substrat selama proses reaksi amplifikasi berlangsung (Notomi *et al.*, 2000; Tortora *et al.*, 2004).

Uji LAMP dianggap komersial untuk *Anisakis* spp. Deteksi DNA dioptimalkan dan divalidasi untuk mendapatkan alat yang sederhana, cepat, dan murah, yang dapat mengidentifikasi kemungkinan risiko terhadap kesehatan konsumen akibat adanya organisme tersebut dalam produk olahan ikan (Cammilleri *et al.*, 2020). Analisis hasil metode LAMP ini sangat sederhana karena dapat dideteksi secara visual dengan melihat endapan (pada proses reaksi ditambahkan reagen pengendap) atau dapat berupa perubahan warna fluoresensi (pada proses reaksi ditambahkan reagen fluoresensi) dengan menggunakan bantuan sinar UV (Notomi *et al.*, 2000).

Metode LAMP merupakan metode uji diagnostik molekuler cara langsung berdasarkan uji identifikasi asam nukleat bakteri (Notomi *et al.*, 2000).

Prinsip metode LAMP merupakan metode modifikasi amplifikasi PCR pada suhu tetap dengan menggunakan empat sampai enam pasang primer dari gen dengan



Tersedia daring pada: <http://ejournal.undana.ac.id/jvn>

sekuens *highly conserved* pada spesies target (Hanaki *et al.*, 2011).

Teknik LAMP mengidentifikasi sekuens bakteri dengan mekanisme *rolling circle amplification* (RCA) yang merupakan metode gabungan dari multiplex PCR dan nested PCR, dimana menggunakan minimal 2 set primer (multi primer) serta *outer primer* (*standard primer*) dan *inner primer* (*nested primer*) serta reagen amplifikasi yang sesuai (Baddour *et al.*, 2007).

Sensitivitas LAMP Assay

Menurut Cammilleri *et al.* (2020) sensitivitas atau inklusivitas ditetapkan sebagai kemampuan metode LAMP untuk mendeteksi DNA *Anisakis sp.*

Menurut Cammilleri *et al.* (2020) metode LAMP yang diusulkan mampu memperkuat *Anisakis spp.* DNA dari sampel ikan yang diinfeksi secara artifisial, memberikan sensitivitas 100% untuk setiap jenis sampel yang dianalisis. Selain itu, metode ini juga dapat mendeteksi setiap sampel yang terkontaminasi *A. simplex ss*, *A.*

pegreffii, *A. physeteris*, *A. ziphidarum*, dan DNA *A. typica*.

Kelebihan Teknik LAMP

LAMP adalah teknik amplifikasi DNA yang relatif baru dan cukup sederhana, mudah dibaca dan lebih hemat biaya, sehingga teknik ini memiliki banyak kelebihan. Proses LAMP memakan waktu yang relatif lebih singkat dibanding PCR, yaitu sekitar 1 jam (Nagamine *et al.*, 2002). LAMP dapat digunakan sebagai alat untuk survei skrining di lapangan atau di fasilitas kesehatan di lapangan, karena LAMP lebih bagus digunakan untuk diagnosis (Parida *et al.*, 2008). Beberapa studi menunjukkan LAMP berhasil mendeteksi patogen pada sampel yang diproses secara sederhana, seperti sampel darah yang dipanaskan atau material biologis lain (Curtis *et al.*, 2008).

Keterbatasan Teknik LAMP

Teknik LAMP disebutkan kurang sensitif daripada PCR untuk sampel yang kompleks, karena



Tersedia daring pada: <http://ejurnal.undana.ac.id/jvn>

perbedaan enzim polimerase yang digunakan (pada LAMP digunakan Bst DNA polymerase, dan Taq polymerase pada PCR).

resolusi lateral yang dicapai (Sujatno *et al.*, 2015).

Prosedur kerja dengan metode SEM yaitu setelah menyelesaikan molt ke L4, larva dikeluarkan dari kultur untuk studi SEM selama 1–9 minggu. Selain itu, L3 yang baru dikumpulkan dari ikan juga diperiksa dengan SEM untuk dibandingkan dengan L4. Semua larva yang terkumpul dimasukkan ke dalam etanol 70% (v / v) panas dan diawetkan untuk persiapan pemeriksaan dengan SEM. Larva yang diikat menjalani pengeringan titik kritis dan dipotong menjadi 3 bagian, sehingga menghindari distorsi larva yang terjadi jika dipotong saat segar atau hanya diikat. Bagian anterior dan posterior dipisahkan untuk persiapan SEM sementara bagian silinder kecil dari bagian tengah digunakan untuk identifikasi molekuler (Molina-Fernández *et al.*, 2018).

SEM (Scanning Electron Microscopy)

SEM adalah sebuah mikroskop elektron yang didesain untuk menyelidiki permukaan dari objek solid secara langsung, yang memiliki perbesaran 10 – 3000000x, *depth of field* 4 – 0.4 mm dan resolusi sebesar 1 – 10 nm (Yudi, 2011). Komponen utama alat SEM ini pertama adalah tiga pasang lensa-lensa elektromagnetik yang berfungsi memfokuskan berkas elektron menjadi sebuah titik kecil, lalu oleh dua pasang scan coil discan-kan dengan frekuensi variabel pada permukaan sampel. Semakin kecil berkas difokuskan semakin besar

Tabel 5. Kelebihan dan kekurangan SEM (Sumber: Choudhary dan Priyanka (2017)).

No.	Kelebihan	Kekurangan
1.	Penerapannya yang luas	Harganya mahal, berukuran besar dan harus ditempatkan di area yang bebas dari kemungkinan gangguan listrik,



Tersedia daring pada: <http://ejurnal.undana.ac.id/jvn>

		magnet, atau getaran.
2.	pencitraan tiga dimensi dan topografis yang terperinci dan informasi serbaguna yang dikumpulkan dari berbagai detector	Memerlukan pelatihan khusus untuk mengoperasikan SEM serta dalam menyiapkan sampel. Persiapan sampel dapat menghasilkan artefak.
3.	mudah dioperasikan dengan pelatihan yang tepat dan kemajuan dalam teknologi komputer dan perangkat lunak terkait membuat pengoperasiannya mudah digunakan	SEM terbatas pada sampel anorganik padat yang cukup kecil untuk muat di dalam ruang vakum yang dapat menangani tekanan vakum sedang.
4.	Instrumen ini bekerja cepat, seringkali menyelesaikan analisis SEI, BSE dan EDS dalam waktu kurang dari lima menit	membawa risiko kecil paparan radiasi yang terkait dengan elektron yang tersebar dari bawah permukaan sampel.

Selain itu, kelemahan teknik SEM memiliki menurut Lubis (2015), antara lain memerlukan kondisi vakum, hanya mampu menganalisa permukaan saja, memiliki resolusi yang lebih rendah dari TEM dan sampel yang digunakan harus bahan yang konduktif, jika tidak konduktor maka sampel perlu dilapisi dengan logam seperti emas.

PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism)

PCR-RFLP merupakan teknik RFLP yang memanfaatkan amplifikasi DNA dengan PCR yang mampu mendeteksi adanya variasi genetik dalam waktu

yang relatif singkat. Keuntungan menggunakan PCR dalam mengamplifikasi DNA adalah dapat menghasilkan DNA dalam jumlah yang banyak meskipun hanya dari beberapa atau bahkan satu molekul DNA saja dalam waktu yang relatif singkat (White, 1996). PCR-RFLP sangat efektif dan efisien dalam mendeteksi adanya variasi genetik.

Menurut Anshary (2011) 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 genetik yang telah dikembangkan oleh D'Amelio *et al.*,



Tersedia daring pada: <http://ejurnal.undana.ac.id/jvn>

2000. Hasil PCR diukur menggunakan enzim restriksi dengan mengikuti protokol pabrikan. Metode yang digunakan untuk masing-masing enzim restriksi adalah sebagai berikut (Anshary, 2011) :

1. 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.
2. Hinf I (10 U/μl) (DNA hasil PCR 8 μl, 10 x SuRE/Cut Buffer 2 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 enzim lalu diambil sebanyak 5 μl untuk elektroforesis pada Gel untuk melihat fragmen-fragmen DNA.
3. Hha I (Cfo I) (10 U/μl) (DNA hasil PCR 8 μl, 10 x SuRE/Cut Buffer 2 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 enzim lalu diambil sebanyak 5 μl untuk elektroforesis pada gel untuk melihat fragmen-fragmen DNA.

Tabel 6. Kelebihan dan kekurangan PCR-RFLP (Sumber: Rasmussen (2012); Erwanto *et al.* (2012)).

No.	Kelebihan	Kekurangan
1.	Harganya murah	Mengharuskan variasi menghasilkan atau menghapus batasan tempat pengenalan



Tersedia daring pada: <http://ejurnal.undana.ac.id/jvn>

		enzim
2.	Mudah didesain	Beberapa enzim restriksi mahal harganya
3.	Berlaku untuk analisis polimorfisme nukleotida tunggal serta microindel	Genotipe yang tepat tidak dapat dicapai jika terdapat lebih dari satu variasi nukleotida dalam tempat pengenalan enzim restriksi.
4.	Tidak ada persyaratan untuk instrumen mahal	Membutuhkan waktu yang relatif banyak
5.	Tidak ada persyaratan untuk pelatihan ekstensif untuk staf laboratorium	Waktu yang lama dari awal hingga penyelesaian analisis
6.		Tidak cocok untuk analisis hasil yang tinggi
7.		Membutuhkan waktu yang panjang karena melalui dua tahap analisis penting yaitu PCR itu sendiri dan pemotongan DNA hasil PCR dengan enzim restriksi.

RT – PCR (Real Time-Polymerase Chain Reaction)

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan salah satu teknik amplifikasi asam nukleat in vitro yang paling banyak dipelajari dan digunakan secara luas. PCR digunakan untuk menggandakan jumlah molekul DNA pada target tertentu dengan menganalisis molekul DNA baru yang berkomplemen dengan molekul DNA target melalui enzim dan oligonukleotida sebagai primer dalam suatu *thermocycler* (Widayat *et al.*, 2019).

Prinsip kerja PCR real time adalah mendeteksi dan mengkuantifikasi reporter fluoresen. Sinyal fluoresen akan meningkat seiring dengan bertambahnya amplifikasi DNA PCR dalam reaksi (Pardal, 2010).

Pengujian Real-Time PCR (RT-PCR) dari sampel yang sama yang dianalisis dengan LAMP juga dilakukan untuk tujuan perbandingan dan sebagai metode konfirmasi untuk hasil pengujian LAMP. Amplifikasi RT-PCR dilakukan dengan menggunakan bahan dan mengikuti protokol tervalidasi yang dijelaskan oleh (Cavalleroa *et al.*, 2017).

Sensitivitas diagnostik didefinisikan sebagai ukuran derajat

untuk mendeteksi patogen target dalam sampel, yang dapat menghasilkan respons negatif palsu. Ini berkaitan dengan jumlah patogen terendah yang dapat dipercaya terdeteksi per pengujian atau sampel (López *et al.*, 2003). Sensitivitas yang terlalu rendah seringkali menyebabkan kesalahan palsu. Dengan demikian, tingkat akurasi diagnostik yang tinggi dicirikan oleh kemampuan untuk mendeteksi, benar, dan tepat mikro organisme target dari sampel tanpa gangguan dari komponen non target. Tingkat sensitivitas yang tinggi dari metode molekuler memungkinkan deteksi pra-gejala dan kuantifikasi patogen (Alemu, 2014). PCR waktu nyata memberikan sensitivitas tinggi untuk mendeteksi DNA atau RNA karena kombinasi amplifikasi yang dilakukan oleh langkah PCR dan sistem deteksi (Bustin, 2000).

Spesifisitas teknik pemeriksaan RT-PCR yaitu memiliki kekhususan diagnostik didefinisikan sebagai ukuran sejauh mana metode dipengaruhi oleh komponen non target yang ada dalam sampel, yang dapat menghasilkan respons positif palsu.

Salah satu keunggulan utama RT-PCR adalah kecepatannya dalam

menyediakan data yang andal. Ini menguntungkan karena efisiensi dan laju reaksi dapat dilihat (Schena *et al.*, 2004). Tes diagnostik molekuler ini memberikan keuntungan yang signifikan dan seringkali melengkapi teknik tradisional mikroskop dan identifikasi patogen berbasis kultur. Keuntungan dari diagnostik molekuler termasuk kemampuan untuk mendeteksi organisme tanpa pembiakan sebelumnya, waktu pengerjaan yang lebih cepat, potensi hasil yang tinggi dan kemampuan untuk mengidentifikasi spesies atau strain patogen (Chilvers, 2012).

SIMPULAN

Kesimpulan yang dapat diambil pada studi literatur ini adalah metode yang digunakan untuk mendeteksi *Anisakis sp.* dengan tingkat akurasi rendah yaitu KIT, LAMP Assay dan SEM, sedangkan metode dengan tingkat akurasi tinggi yaitu PCR-RFLP dan RT-PCR.

Metode yang paling efektif digunakan untuk mendeteksi *Anisakis sp.* adalah PCR-RFLP dan RT-PCR karena waktu pengerjaannya cepat dan memberikan potensi hasil yang tinggi.

Saran

Saran yang dapat diberikan dari hasil kajian studi literatur ini adalah perlu dilakukan kajian lebih mendalam mengenai metode lain yang dapat digunakan untuk mendeteksi *Anisakis*, bagi peneliti lain yang ingin mendeteksi *Anisakis* dapat menggunakan metode PCR-RFLP dan RT-PCR karena memberikan hasil yang cukup akurat dalam waktu yang cepat dan bagi pemerintah diharapkan dapat menyediakan laboratorium rujukan dan tambahan alat yang dapat mendukung proses deteksi *Anisakis sp.*

DAFTAR PUSTAKA

- Acha N, Szyfres B. 2003. Zoonoses And Communicable Diseases Common To Man and Animal. Washington D.C : Scientific and Technical Publication No. 580.
- Aibinu IE, Smooker PM, Lopata AL. 2019. *Anisakis* Nematodes in Fish and Shellfish- from infection to allergies. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 9(April), 384–393.
- Alemu K. 2014. *Real-Time PCR and Its Application in Plant Disease Diagnostics*. Vol. 27 : 39–50.
- Anshary H. 2011. Identifikasi molekuler dengan teknik pcr-rflp larva

- parasit *Anisakis* spp (Nematoda: *Anisakidae*) pada ikan tongkol (*Auxis thazard*) dan kembung (*Rastrelliger kanagurta*) dari Perairan Makassar. *Jurnal Perikanan (J. Fish. Sci.)* XIII (2): 70-77
- Anshary H, Sriwulan, Freeman MA, 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.
- Arifudin S, Abdulgani N. (2013). Prevalensi dan Derajat Infeksi *Anisakis* sp. pada Saluran Pencernaan Ikan Kerapu Lumpur (*Epinephelus sexfasciatus*) di TPI Brondong Lamongan. *Jurnal Sains Dan Seni ITS*, 2(1), E34–E37.
- Audicana MT, Kennedy M. 2008. *Anisakis simplex*: from obscure infectious worm to inducer of immune hypersensitivity. *Clin Microbiol Rev* 21: 360-379.
- Baddour MM, Abuelkheir MM, Fatani AJ. 2007. Comparison of *mecA* polymerase chain reaction with phenotypic methods for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Current Microbiology*.
- Bircher AJ, Gysi B, Zenklusen HR, Aerni R. 2000. Eosinophilic oesophagitis associated with recurrent urticaria: Is there a worm (*Anisakis simplex*) in the rose. *Schweiz Med Wochenschr*, 130: 1814-9.
- Bustin SA. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. In *Journal of Molecular Endocrinology*. Vol. 25 : 169-193.
- Cammilleri G, Ferrantelli V, Pulvirenti A, Drago C, Stampone G, Del Rocio G, Macias Q, Drago S, Arcoleo G, Costa A, Geraci F dan Di Bella C. 2020. Validation of a Commercial Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for the Rapid Detection of *Anisakis* spp. DNA in Processed Fish Products. *Foods* 9, 92
- Cavallero S, Brunob A, Arlettib E, Caffarac M, Fioravantic ML, Costad A, Cammillerid G, Gracid S, Ferrantellid V, D'Amelioa S. 2017. Validation of a commercial kit aimed to the detection of pathogenic *Anisakis* nematodes in fish products. *International Journal of Food Microbiology*. 257: 75–79.
- Chilvers MI. 2012. Molecular Diagnostics in Plant Disease Diagnostic Clinics... What's the Status? *Fungal Genomics & Biology*.
- Choudhary OP, Priyanka. 2017. Scanning Electron Microscope: Advantages and Disadvantages in Imaging Components. *International Journal of Current Microbiology*

- and Applied Sciences*. Vol 6 : 5
- Curtis, K. A., Rudolph, D. L., & Owen, S. M. (2008). Rapid detection of HIV-1 by reverse-transcription, loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *Journal of Virological Methods*. Vol 151 (2) : 264-270.
- Detha AIR., Wuri DA, Almet J, Riwu Y, Melky C. 2018. First report of Anisakis sp. in Epinephelus sp. in East Indonesia. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 5(1), 88–92.
- Erwanto Y, Rohman A, Abidin M, Ariyani D. 2012. Identifikasi Daging Babi Menggunakan Metode Pcr-Rflp Gen Cytochrome b dan Pcr Primer Spesifik Gen Amelogenin. *Agritech*, Vol. 32 : 4
- Gutiérrez-Ramos R, Guillén-Bueno R, Madero-Jarabo R, Cuéllar del Hoyo C. 2000. Digestive haemorrhage in patients with anti-Anisakis antibodies. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*.
- Hanaki KI, Sekiguchi JI, Shimada K, Sato A, Watari H, Kojima T, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae T. 2011. Loop-mediated isothermal amplification assays for identification of antiseptic- and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Microbiological Methods*.
- Hibur SO, Detha AIR, Almet J, Irmasuryani. 2016. Tingkat kejadian parasit anisakis sp. pada ikan cakalang (*Katsuwonus pelamis*) dan ikan tongkol (*Auxis thazard*) yang dijual di tempat penjualan ikan pasir panjang kota Kupang. *Jurnal Kajian Veteriner*, 4 (2) : 40-51.
- Lubis K. 2015. Metoda-Metoda Karakterisasi Nanopartikel Perak. *Jurnal Pengabdian Kepada Masyarakat*.
- López MM, Bertolini E, Olmos A, Caruso P, Gorris MT, Llop P, Penyalver R, and Cambra M. 2003. Innovative tools for detection of plant pathogenic viruses and bacteria. In *International Microbiology*. Vol 6 : 233 - 243
- Mattiucci S, Nascetti G. 2006. Molecular systematics phylogeny and ecologi of anisakid nematodes of the genus anisakis dujardin, 1845 : an Update. *Parasite*, 13: 99-113.
- Mattiucci S, Nascetti G. 2008. Advances and trends in the molecular systematics of anisakid nematodes, with implications for their evolutionary ecology and host-parasite co-evolutionary processes. *Adv Parasitol*. 66:47–148.
- Molina-Fernández D, Adroher FJ, Benitez R. 2018. A scanning electron microscopy study of *Anisakis physeteris* molecularly identified: from third stage larvae

- from fish to fourth stage larvae obtained in vitro. *Parasitology Research* 117:2095-2103.
- Moneo I, Caballero ML, Perez RR, Mahillo AIR, Munoz MG. 2007. Sensitization to the fish parasite *Anisakis simplex*: clinical and laboratory aspects. *Parasitol Res*, 101: 1051-1055.
- Muttaqin ZM, Abdulgani N. 2013. Prevalensi dan derajat infeksi anisakis sp. pada saluran pencernaan ikan kakap merah (*Lutjanus malabaricus*) di Tempat Pelelangan Ikan Brondong Lamongan. *Jurnal sains dan seni pomits*, 2 (1): 30-33.
- Nagamine K, Hase T, and Notomi T. 2002. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and Cellular Probes*. Vol 16 (2) : 223-229.
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*.
- Palm HW, Damriyasa IM, Linda, Oka IBM. (2008). Molecular genotyping of *Anisakis Dujardin*, 1845 (Nematoda: Ascaridoidea: Anisakidae) Larvae from marine fish of Balinese and Javanese waters, Indonesia. *Helminthologia*. 45: 3-12.
- Parida MM, Sannarangaiah S, Dash PK, Rao PVL, and Morita K. 2008. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): A new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. In *Reviews in Medical Virology*. Vol 18 : 407-421.
- Rasmussen H. 2012. Gel Electrophoresis - Principles and Basics. In *Gel Electrophoresis - Principles and Basics*.
- Schena L, Nigro F, Ippolito A, and Gallitelli D. 2004. Real-time quantitative PCR: A new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. In *European Journal of Plant Pathology*. Vol 110 : 893-908.
- Shamsi S, Sheorey H. 2018. Seafood-borne parasitic diseases in Australia: are they rare or underdiagnosed? *Internal Medicine Journal*.
- Soewarlan LC. 2016. Potensi alergi akibat infeksi *anisakis typica* pada daging ikan cakalang. *J Teknol dan Industri Pangan*, 27 (2): 200-207.
- Sujatno A, Salam R, Dimiyati A, Bandriyana. 2015. Studi Scanning Electron Microscopy(SEM) untuk Karakterisasi Proses Oksidasi Paduan Zirkonium. *Jurnal Forum*

Nuklir (JFN).

Uga S, Ono K, Kataoka N, Hasan H. 1996. Seroepidemiology of five major zoonotic parasite infections in inhabitants of Sidoarjo, East Java, Indonesia. *J Trop Med Public Health*, 3: 556-61.

White TJ. 1996. The future of PCR technology: Diversification of technologies and applications. In *Trends in Biotechnology*.

Widayat W, Winarni Agustini T, Suzery M, Ni'matullah Al-Baarri A, Rahmi Putri S. 2019. Real Time-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) sebagai Alat Deteksi DNA Babi dalam Beberapa Produk Non-Pangan. *Indonesia Journal of Halal*.

World Organization for Animal Health (OIE). (2016). Chapter 1.1.6. Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases (NB: Version adopted in May 2013). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*.

Yudi. 2011. Scanning Electron Microscope (SEM) dan Optical Emission Spectrocope (OES). *Wordpress*.