

PEMBAHASAN UMUM

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa stadium L₃ *A. galli* mengekskresi/sekresikan protease. Sebelum aktivitas enzim diuji, terlebih dahulu dilakukan optimasi pada buffer Tris-HCl (pH 6 - 10), asam fosfat (pH 6 - 8), dan asam asetat (pH 5 - 10). Berdasarkan hasil optimasi buffer dan pH, diketahui bahwa buffer Tris-HCl pH 7 adalah buffer dan pH yang paling sesuai, sehingga untuk pengujian selanjutnya pada riset ini digunakan buffer Tris-HCl pH 7. Aktivitas protease dipertahankan pada antara pH 6,0 – 8,0. Protease aktif pada pH (6,0 – 10,0) (Gambar 1). Berdasarkan hasil yang diperoleh dari optimasi aktivitas enzim pada berbagai konsentrasi ammonium sulfat diketahui bahwa ammonium sulfat 40% adalah konsentrasi yang paling sesuai untuk pengendapan protein dari ekskretori/sekretori stadium L₃ *A. galli* (Gambar 2).

Aktivitas enzimatik terlihat pada dua *peak* (puncak) yang dielusi dari gel filtrasi yaitu fraksi 8 dan 31, dan 2 *peak* protein, yaitu pada fraksi gabungan 4 dan 5, dan fraksi 11 (Gambar 3). Aktivitas enzimatik terlihat pada empat puncak yang dielusi dari *anion exchange* fraksi gabungan 25 dan 30, fraksi 45, fraksi gabungan 55, 60, 65, dan 70, dan fraksi 95, dengan lima *peak* protein, yaitu pada fraksi gabungan 20, 25,30,dan 35, fraksi 45, fraksi gabungan 60 dan 65, 75 dan 80, dan fraksi 90 (Gambar 4). Dari gambar 3 dan 4 terlihat bahwa aktifitas enzim pada fraksi 31 kromatogram gel filtrasi lebih tinggi dibandingkan dengan *anion exchange*. Hasil purifikasi protease dari ekskretori/sekretori stadium L₃ *A. galli* pada setiap tahap purifikasi adalah seperti yang terlihat pada Tabel 1 dan Tabel 2. Aktivitas spesifik enzim murni kira-kira 300 kali lebih tinggi dari pada ekstrak kasar (*crude*), dengan hasil 0,33%.

Temperatur optimum protease ini adalah 70°C (Gambar 5), dengan pH optimum 7,0 (Gambar 6) dan stabil selama 30 menit pada 50°C tetapi aktivitasnya menurun 20% pada inkubasi selama 10 menit dengan temperatur 55°C. Hasil penelitian ini sesuai dengan laporan Rhoads *et al.* (1997) pada L₃ – L₄ *Ascaris suum* aktivitas protease pada rentang pH 6,0 – 8,5, dengan pH optimum 7,0. Berdasarkan pH optimum dan sensitivitas inhibitor protease dengan menggunakan azocasein dan elastin-orcein sebagai

substrat protein, Cock *et al.* (1993) mengkarakterisasi protease dari berbagai stadium cacing parasitik pada sapi, yaitu stadium L₃, L₄, dan stadium dewasa *O. ostertagi*. Aktivitas protease ekskretori/sekretori L₄ *O. ostertagi* cenderung meningkat pada suasana basa, sedangkan ekstrak tubuh *O. ostertagi* cenderung meningkat pada suasana asam. Todorova (2000) melaporkan bahwa aktivitas serin, sistein, dan metalloprotease pada larva *Trichinella spiralis* dapat dikarakterisasi berdasarkan pH optimum pada kisaran 5 – 7.

Visualisasi berat molekul melalui sodium dodecyl sulphate polyacrylamid gel electrophoresis (SDS PAGE) pewarnaan gel dengan *coomassie blue* menunjukkan bahwa berat molekul protein adalah 28 kDa (Gambar 7). Berat molekul protease yang dilepaskan cacing nematoda berbeda-beda tergantung pada jenis dan stadium kehidupannya. Berat molekul aminopeptidase adalah 293 kDa (Rhoads *et al.* 1997), hyaluronidase adalah 47,8 dan 55,0 kDa dilepaskan L₃ – L₄ *A. suum* (Rhoads *et al.* 2001). Hadas dan Stankiewicz (1997) melaporkan bahwa aktivitas protease pada L₃ *Haemonchus contortus* dan *Trichostrongylus colubriformis* dengan berat molekul 32,6 – 53 kDa, dan dua pita protein dalam batasan 53 – 84 kDa. Beberapa enzim yang bercirikan protease berukuran 25 – 55 kDa diidentifikasi oleh Todorova (2000) pada larva *Trichinella spiralis* melalui substrat gel elektroforesis.

Persentase aktivitas protease terhadap inhibitor dan aktivator disajikan dalam Tabel 4. PMSF inhibitor serin protease spesifik secara sempurna menghambat aktivitas protease, inhibitor dan aktivator jenis yang lain tidak mempengaruhi aktivitas protease. Berdasarkan inhibisi komplit oleh inhibitor protease serine (PMSF) maka enzim protease tersebut digolongkan ke dalam golongan protease serin.

Karakterisasi protease serin inhibitor dari nematoda parasitik pada manusia, stadium L₃ *O. volvulus* telah dibuktikan oleh Ford *et al.* (2005) bahwa protease serin inhibitor tersebut berperan multifungsi untuk perkembangan parasit, termasuk *molting*, *establishment*, embriogenesis, dan reproduksi. Protease serin inhibitor dari *O. volvulus* bersifat imunogenik, diketahui terlibat di dalam pengaturan respon imun, dan dianggap sebagai salah satu kandidat vaksin terhadap *O. volvulus*. Karakter protease dari beberapa cacing disajikan pada Tabel 7.

Tabel 7. Karakteristik protease dari cacing

Nama peneliti (tahun)	Nama cacing (Stadium)	Berat molekul (kDa)	Inhibitor	pH optimum	Temperatur optimum (°C)	Jenis protease
Cock <i>et al.</i> (1993)	<i>O. ostertagi</i>	45 - 205	AEBSF, Z-Phe-Ala-FMK, E-64, Pepstatin A	5 dan 6	-	Sistein
Hadas dan Stankiewicz (1997)	<i>T. colubriformis</i>	32 - 300	-	8	-	Sistein
	<i>Haemonchus contortus</i>	32 - 300	-	7,5	-	Sistein
Todorova (2000)	<i>Trichinella spiralis</i>	25 -55	-	7,5	-	Serin, sistein, metal
Rhoads <i>et al.</i> (1997 dan 2001)	<i>A. suum</i>	47,8 55,0 dan 293	Amastatin, bestatin EDTA, 1,10 phenanthroline , pepstatin A	4,7	-	Metal, hyaluronidase, aminopeptidase
Wang <i>et al.</i> (2003)	<i>Eisenia fetida</i>	23 – 30	-		-	Serin
Cho <i>et al.</i> (2004)	<i>Lumbricus rubellus</i>	25 - 33	PMSF, aprotinin, TLCK, TPCK	4 - 12	50	Tripsin

Untuk melangsungkan proses *molting*, cacing melepaskan aminopeptidase yang aktivitasnya dihambat oleh 1,10-phenanthroline (metallo inhibitor) dan amastatin dan bestatin (aminopeptidase inhibitor) seperti dilaporkan Rhoads *et al.* (1997 dan 2001). Aktivitas enzim sedikit dipengaruhi oleh AEBSF (serin protease inhibitor), Z-Phe-Ala-FMK dan E-64 (sistein protease inhibitor), dan Pepstatin A (aspartil protease inhibitor) (Cock *et al.* 1993). Aminopeptidase yang ditemukan oleh Rhoads *et al.* (1997) pada L₃ – L₄ *A. suum* 66% dihambat oleh EDTA, 99% dihambat oleh 1,10 phenanthroline, 7% dihambat oleh pepstatin A, tetapi tidak dihambat oleh E-64. Aminopeptidase dilepaskan oleh *A. suum* berkenaan dengan proses *molting*.

Rhoads *et al.* (2001) membuktikan juga bahwa pada stadium L₃ – L₄ cacing nematoda *A. suum* pada babi melepaskan hyaluronidase dengan berat molekul 55,0 kDa. Aktivitas hyaluronidase optimal pada pH 5,0 dan 6,0, dan tidak dipengaruhi oleh konsentrasi 5 mM kupri sulfat, seng klorida, kalsium klorida, magnesium klorida, atau EDTA. Kadar tertinggi hyaluronidase di dalam medium kultur diperoleh pada hari keempat dan keenam. Proses perkembangan L₃ menjadi L₄ dan proses migrasi larva ke jaringan difasilitasi dan tergantung pada hyaluronidase.

Potensi protease yang diperoleh dari berbagai stadium cacing nematoda parasitik sebagai antigen untuk memicu respons imunitas inang definitif telah banyak dikembangkan. Penelitian Rhoads *et al.* (2001) terhadap *A. suum* pada babi merefleksikan bahwa produk protease berpotensi digunakan untuk pengembangan strategi pengendalian secara imunoprofilaksis. Penelitian Harnett *et al.* (1997) terhadap *Onchocerca gibsoni* pada mencit, Rhoads *et al.* (2001) terhadap *A. suum* pada babi, Vervelde *et al.* (2003) terhadap *H. contortus* pada domba merefleksikan bahwa produk ekskretori/sekretori berpotensi digunakan untuk pengembangan strategi pengendalian secara imunoprofilaksis. Todorova (2000) membuktikan bahwa protease serin yang dilepaskan pada stadium larva *T. spiralis* diketahui menghasilkan respons antibodi lebih menonjol dibandingkan terhadap sistein dan metalloprotease. Interaksi inang parasit tersebut menerangkan relevansi pengembangan vaksin anti trichinellosis.

Antigen yang dilepaskan melalui ekskretori/sekretori merupakan komponen imunogenik yang dihasilkan selama aktivitas anabolik dan katabolik (Chung *et al.* 1997

diacu dalam Kim *et al.* 2000). Antigen ekskretori/sekretori berperan sebagai sumber antigen protektif yang dapat memicu tanggapan kebal inang definitif (Jimenez *et al.* 2000; dan Balqis *et al.* 2007). Lagapa *et al.* (2002) menyatakan bahwa substansi yang diekskresi/sekresikan cacing merupakan target yang potensial untuk memicu respon imun dan dapat dikenal oleh antibodi pada hewan terinfeksi.

Harnett *et al.* (1997) membuktikan bahwa aplikasi 300 µg ekskretori/sekretori *Ochocerca gibsoni* jantan dewasa dengan cara menyuntikkan 50 µg setiap hari selama 6 hari berturut-turut dapat memicu respon imunitas mencit. Pada imunisasi pertama ekskretori/sekretori plus *freund's complete* dan imunisasi kedua plus *incomplete*, sedangkan pada 4 kali *booster* berikutnya plus *phosphate buffered saline* (PBS). Sel-sel *lymphnodus* mencit BALB/c yang difusikan dengan sel-sel *myeloma* lestari dapat memproduksi IgM dan 8 jenis isotype IgG. Semua isotype monoklonal antibodi yang diproduksi bereaksi secara spesifik dengan ES *O. gibsoni*, sehingga ekskretori/sekretori sangat prospektif sebagai target molekul dalam mendesain *immunoassay*.

Imunisasi secara *subcutan* dengan tiga kali 75 µg protein ekskretori/sekretori *H. contortus* plus alhydrogel sebagai adjuvant yang berlangsung dalam interval waktu enam minggu mampu membangkitkan respon imunitas anak domba. Respons imunitas ditandai dengan terjadinya peningkatan secara signifikan level antibodi IgG dalam serum, peningkatan reaksi sel T helper-2 terjadi dalam waktu satu minggu pasca imunisasi terakhir. Anak domba yang diimunisasi dengan ekskretori/sekretori dalam *alhydrogel* dan ditantang dengan 300 L₃/kg bb dapat mereduksi 89% *output* kumulatif telur *H. contortus* dan meningkatkan 54% proteksi antibodi (Vervelde *et al.* 2003).

Beberapa enzim yang bercirikan proteinase berukuran 25 – 55 kDa diidentifikasi pada larva *Trichinella spiralis* melalui substrat gel elektroforesis dan dikarakterisasi berdasarkan pH optimum, spesifisitas substrat, dan sensitivitas inhibitor dengan menggunakan uji azocasein. Aktivitas serine, sisteine, dan metalloproteinase diidentifikasi pada pH 5 – 7. Proteinase serine yang dilepaskan pada stadium larva *T. spiralis* diketahui menghasilkan respon antibodi lebih menonjol. Aktivitas proteinase dihambat oleh IgG yang diisolasi dari mencit yang diinfeksi dengan *T. spiralis*. Aktivitas azolitik dan elastolitik kemungkinan sebagai implikasi penetrasi ke jaringan.

Interaksi host-parasit yang dikaji oleh Todorova (2000) tersebut menerangkan relevansi pengembangan vaksin anti trichinellosis.

Menurut Berasain *et al.* (1997) pelepasan protease serin oleh cacing trematoda *Fasciola hepatica* ditujukan untuk mendegradasi matriks ekstraselular dan komponen membran dasar agar parasit berhasil menginvasi ke jaringan. Hasil identifikasi Rhoads *et al.* (2001) membuktikan bahwa *A. suum* mensekresikan hyaluronidase di dalam cairan kultur yang dikoleksi selama stadium transisi L₃ - L₄. Berdasarkan fenomena yang telah dijelaskan tersebut, maka pelepasan protease serin oleh L₃ *A. galli* mungkin berkaitan dengan proses invasi larva ke jaringan untuk menjalani fase histotrofik, diperlukan untuk aktivasi *molting* dan *establishment* larva *A. galli*. Pelepasan protease sangat esensial sebagai perantara dan menjadi target untuk modulasi mekanisme imun inang definitif.

Hasil penelitian ini membuktikan bahwa aplikasi protease sebagai kandidat vaksin bersifat sebagai perangsang proliferasi sel goblet secara signifikan ($P < 0,05$) terjadi pada duodenum, jejunum, dan ileum ayam yang diimunisasi dengan protease dibandingkan dengan ayam yang tidak diimunisasi (Gambar 8). Proliferasi sel goblet berperan dalam mekanisme pengeluaran larva *A. galli* dengan cara mensekresikan, menyimpan, dan melepaskan musin ke dalam lumen untuk menambah kapasitas lendir sehingga larva dengan cepat dapat dikeluarkan dari tubuh inang definitif (Lagapa *et al.* 2002). Peningkatan rata-rata jumlah sel goblet dibutuhkan untuk menambah kapasitas lendir di dalam lumen sehingga membatasi larva berpenetrasi ke jaringan sehingga larva akan mudah didorong ke caudal oleh kontraksi peristaltik saluran cerna.

Musin yang dihasilkan sel goblet merupakan campuran antara air, glikoprotein, glikolipid, elektrolit-elektrolit, enzim, garam, dan sekresi kelenjar (Castagliuolo *et al.* 1998). Apabila musin sel goblet terlepas ke dalam lumen akan berintegrasi dengan IgA menghasilkan efek antitoksin pada permukaan mukosa dan epitel saluran pencernaan, sehingga dapat merupakan barrier yang protektif bagi sel-sel epitel usus dari ancaman agen penyakit (Harnett *et al.* 1997). Konsekuensinya adalah sel-sel epitel akan terlindungi dari kerusakan fisik oleh substansi material intra luminal dan menghalangi invasi larva (Deplancke dan Gaskins 2001). Untuk memberikan perlindungan secara terus-menerus, maka sel goblet harus diperbaharui secara konstan. Mekanisme laju

pengaturan sel goblet berada dibawah pengaruh rangsangan kolinergik seperti *acetylcholine*, *pilocarpine*, dan *carbachol* (Roitt dan Delves 2001).

Interleukin yang dilepaskan oleh sel Th-2 karena rangsangan imunisasi diketahui memicu proliferasi sel goblet untuk menutupi selaput lendir mukosa di sepanjang permukaan saluran pencernaan. Sitokin proinflamatori (IL-1, IL-6, dan *tumor necrosis factor* = TNF- α) dengan cepat meningkatkan pengaturan ekspresi gen musin (*MUC*) dan merangsang pelepasan musin intestinal. Sel-sel limfosit Th-2 CD4⁺ dapat merangsang fungsi sel goblet (Deplancke dan Gaskins 2001). Peranan sel goblet dan peningkatan sekresi mukus berlangsung dalam eliminasi cacing parasitik nematoda *Nippostrongylus brasiliensis* (Miller dan Nawa 1979). Deplancke dan Gaskins (2001) menjelaskan bahwa ekspresi sitokin IL-4 dan IL-5 yang berasal dari sel CD4⁺ meningkat secara signifikan pada tikus selama *spontaneous recovery* dari infeksi *N. brasiliensis*. Peningkatan pelepasan musin adalah mekanisme yang sering terjadi untuk pembersihan intestinal dari parasit, dan secara kontinyu diperantarai oleh sitokin yang diproduksi oleh Th-2 subset dari sel T CD4⁺ yang diikuti oleh rangsangan produksi imunoglobulin E (IgE). IgE memperantarai sel mast mukosa untuk melepaskan histamin yang akan meningkatkan pelepasan mukus sel goblet ke dalam duodenum tikus.

Jumlah sel mast meningkat pada duodenum, jejunum dan ileum dari kelompok yang diimunisasi dengan *crude* atau *pure* protease dibandingkan dengan kelompok kontrol (Gambar 9). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa protease serin yang dihasilkan oleh L₃ *A. galli* dapat memicu proliferasi sel goblet dan sel mast. Musin yang dihasilkan sel goblet secara berkesinambungan menghasilkan lendir yang mampu menjerat larva *A. galli* dan dengan gerakan peristaltik usus akan dikeluarkan dari saluran cerna ayam petelur. Mucin yang dihasilkan oleh sel goblet dilaporkan berperan sebagai barrier pertahanan fisik non-spesifik terhadap invasi larva. Proliferasi sel goblet usus halus pada nematodosis berimplikasi terhadap kuantitas mucin yang disalurkan ke dalam lumen intestinal. Mucin sel goblet dengan konsentrasi garam-garam sulfat yang lebih banyak dapat berperan pada pengeluaran larva secara cepat (Roitt dan Delves 2001).

Gambaran yang diperoleh dari penelitian ini mendukung hasil penelitian terdahulu bahwa mekanisme pengeluaran cacing *A. galli* secara cepat terjadi karena

kolaborasi antara sel mast dengan sel goblet (Athailah 1999; Tiuria *et al.* 2001; Darmawi 2003; Balqis 2004). Khan *et al* (1993) juga menyatakan bahwa pengeluaran cacing dewasa genus *Strongyloides* dipengaruhi oleh sel mast. Abe *et al.* (1992) melaporkan bahwa protease produk dari ekskretori/sekretori cacing nematoda dewasa *S. ratti* secara *in vitro* dapat merangsang sel limfosit T dari sel-sel limfonodus mesenterik tikus untuk menghasilkan limfokin. Limfokin yang dihasilkan adalah IL-3 yang dapat memicu proliferasi sel mast mukosa intestinal dari differensiasi sel progenitor.

Sel mast mukosa berdegranulasi melepaskan histamin, serotonin, yang berfungsi sebagai mediator inflamasi. Granul sel mast juga mengandung kallikrein yang menghasilkan kinin, bersama dengan mediator inflamasi mempunyai kekuatan sebagai agen vasoaktif (Tizard 1996). Substansi tersebut akan dilepaskan pada kutikula cacing nematoda apabila antibodi telah berikatan dengan antigen. Kolaborasi antigen, antibodi, dan substansi granula sel eosinofil dan sel mast mukosa akan menimbulkan respons inflamasi tipe I untuk menghambat invasi cacing ke jaringan (Kraneveld *et al.* 1998).

Hasil penghitungan sel eosinofil pada jaringan menunjukkan bahwa reaksi sel eosinofil juga berperan dalam mekanisme pertahanan tubuh untuk melawan infeksi cacing yang ditandai dengan peningkatan jumlah sel eosinofil di dalam jaringan (Tabel 5). Salah satu aksi antigen-antibodi adalah memicu produksi kemoatraktan terhadap sel eosinofil. Seiring dengan pelepasan zat vasoaktif oleh sel mast, kemoatraktan seperti *eosinophil chemotactic factor anaphylaxis* (ECF-A) juga dilepaskan untuk memobilisasi sel eosinofil ke daerah invasi cacing (Shin *et al.* 2001). Mobilisasi dan aktivasi sel eosinofil ini meningkatkan kemampuannya untuk membunuh atau merusak parasit dan mendukung peran penyelenggaraan fisiologi tanggap kebal berperantaraan IgE dalam mengontrol parasit cacing. Kejadian eosinofilia merupakan karakter yang berhubungan dengan infestasi cacing parasitik atau reaksi reaksi hipersensitivitas tipe I lainnya.

Salah satu tugas sel eosinofil adalah penghancuran (destruksi) cacing parasitik. Sel eosinofil terikat pada parasit–terlapis antibodi karena sel eosinofil memiliki reseptor Fc. Ketika berikatan, sel eosinofil mendegranulasi dan melepaskan kandungan granulanya di atas permukaan kutikula cacing (Neuhaus *et al.* 1996). Granula ini mengandung produk-produk ledakan respirasi, misalnya superoksida, hidrogen

peroksida dan radikal bebas lainnya. Sel eosinofil juga mengandung peroksidase dan enzim-enzim litik lainnya, seperti lisofosfolipase dan fosfolipase D. Kecenderungan sel eosinofil melepaskan peroksidase secara ekstraseluler menurut McKeand *et al.* (1995), memberi kesan bahwa peran utama sel eosinofil adalah pertahanan jaringan terhadap invasi parasit. *Major basic protein* (MBP) merupakan inti kristal granula khusus yang dapat merusak kutikula *Schistosomula*, *Fasciola* dan *Trichinella* pada konsentrasi yang sangat rendah. Protein kation sel eosinofil adalah suatu ribonukleose yang bersifat lethal bagi cacing. Neurotoksin yang berasal dari sel eosinofil adalah juga sebagai ribonuklease yang sedikit toksik bagi parasit cacing (Tizard 1996).

Hasil penelitian Rothwell *et al.* (1993) didapatkan bahwa kadar eosinofil dalam darah perifer berkaitan dengan tingkat resistensi domba yang diinfeksi *Trichostrongylus colubriformis*. Pendapat ini didukung Buddle *et al.* (1992) yang mengatakan bahwa kadar eosinofil di dalam perifer berbanding terbalik dengan jumlah telur cacing dalam tinja domba *Ramney* yang diinfeksi *T. colubriformis*. Hasil yang sama diperoleh pada infeksi *Ostertagia circumcincta* pada domba *Scottish Blackface* (Stear *et al.* 1995) dan respons eosinofil yang tinggi berkaitan dengan resistensi alam pada domba *Red Maasai* dan *Scottish Blackface* terhadap infeksi *O. circumcincta*.

Jumlah larva L₃ dari kelompok ayam yang telah diimunisasi dengan protease baik dalam bentuk *crude* ataupun *pure* menunjukkan penurunan jumlah yang signifikan bila dibandingkan dengan kelompok kontrol yang tidak diimunisasi dengan protease. Perbedaan yang signifikan antara kelompok yang diimunisasi dengan kelompok kontrol terlihat baik pada duodenum, jejunum maupun ileum. Pada kelompok yang telah diimunisasi dengan protease baik dalam bentuk *crude* maupun *pure* menunjukkan sebagian L₃ tidak dapat *establish* dibandingkan dengan kelompok kontrol (Tabel 6). Kegagalan L₃ bertahan disebabkan hipersensitif/anafilaksis fase akut yang menggertak hipersekresi lendir yang berasal dari proliferasi dan hiperplasia sel goblet usus halus. Selain peranan lendir, antibodi IgA, IgG, IgM serta komplemen membuat larva *A. galli* terperangkap dalam lendir dan dengan gerakan peristaltik akan dikeluarkan dari saluran pencernaan inang. Adanya perubahan fisik dalam saluran pencernaan mencegah larva cacing berpenetrasi ke mukosa untuk melangsungkan siklus hidupnya (Tizard 1996).

Perubahan histopatologi saluran cerna pada kasus nematodosis sering terjadi, terutama berkenaan dengan kehilangan fungsi sel-sel parietal mukosa. Pada penelitian ini lesio patologi yang ditandai dengan hemoragi, hiperemi, dan deskuamasi berat ditemukan pada duodenum, jejunum, dan ileum ayam yang diinfeksi dengan dosis 1000 L₂ *A. galli*. Rusaknya epitel mukosa yang terlihat secara histopatologi dengan penyebaran kerusakan villi terjadi pada beberapa tempat. Struktur duodenum dengan lekukan kriptanya yang dalam, villi yang panjang, dan sebagai tempat yang kaya akan unsur nutrisi, merupakan lingkungan yang nyaman bagi kelangsungan hidup *A. galli*. Sebagai tempat predileksi larva *A. galli*, usus halus akan mengalami perubahan seiring dengan perjalanan infeksi cacing. Pada kelompok ayam yang diimunisasi dan ditantang dengan dosis 1000 L₂ *A. galli* hanya ditemukan hiperemi dan deskuamasi yang ringan.

Iji *et al.* (2001) menyatakan bahwa penurunan luas permukaan villi akan membatasi penyerapan sari-sari makanan. Dengan demikian ayam yang diinfeksi dengan *A. galli* dapat terganggu absorpsi nutrisinya yang berimplikasi pada hambatan penambahan bobot badan ayam. Penelitian terdahulu membuktikan bahwa ayam yang diinfeksi dengan *A. galli* mengalami penurunan bobot badan sebesar 30% (Tiuria 1991). Kehilangan bobot badan erat kaitannya dengan keterbatasan kemampuan absorpsi nutrisi oleh villi saluran cerna yang mengalami kerusakan.

Pada kelompok ayam yang diimunisasi dengan *crude* atau *pure*, kerapatan villi dan penurunan luas villi duodenum dan jejunum tidak secara signifikan berbeda ($P > 0,05$) dengan kelompok kontrol. Terlihat juga bahwa pada kelompok ayam yang diimunisasi dan ditantang dosis 1000 L₂ *A. galli* kerapatan villi dan rataan luas villi duodenum dan jejunum tidak juga berbeda secara signifikan dengan kelompok kontrol. Perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$) terjadi pada kelompok ayam yang diinfeksi dengan dosis 1000 L₂ dibandingkan dengan kelompok percobaan lainnya. Hal ini membuktikan bahwa penggunaan protease serin yang diekskresi/sekresikan oleh stadium L₃ *A. galli* mampu melindungi kerusakan villi usus halus ayam petelur. Perlindungan usus halus dari ancaman infeksi *A. galli* erat kaitannya dengan terpicunya fungsi sistem pertahanan mukosa ayam petelur yang diperankan oleh sel goblet, sel mast mukosa, dan eosinofil sehingga sebagian besar larva *A. galli* dapat dikeluarkan dari saluran cerna ayam petelur.

KESIMPULAN UMUM

1. Hasil purifikasi dengan kromatografi dapat diperoleh protease murni dengan berat molekul 28 kDa dari ekskretori/sekretori stadium L₃ *A. galli*.
2. Stadium L₃ *A. galli* mengekskresi/sekresikan enzim proteolitik berkarakter serin protease.
3. Protease serin yang dilepaskan oleh L₃ *A. galli* dapat memicu respons pertahanan mukosa yang ditandai dengan hiperplasia dan proliferasi sel goblet, sel mast mukosa dan sel eosinofi pada usus halus ayam petelur serta dapat mengurangi jumlah larva *A. galli* di dalam saluran cerna ayam petelur.
4. Protease serin yang dilepaskan oleh L₃ *A. galli* dapat mengurangi lesio patologi usus halus ayam petelur, mempertahankan kerapatan villi dan luas permukaan villi usus halus ayam petelur dari infeksi *A. galli*.

SARAN

Dari hasil penelitian ini diketahui bahwa protease serin mempunyai potensi untuk diaplikasikan sebagai kandidat vaksin terhadap ascaridiosis sehingga disarankan agar dilakukan penelitian selanjutnya yang mengkaji kemungkinan protease serin untuk memicu respons humoral dan seluler ayam petelur.