ADLN-Perpustakaan Universitas Airlangga

LAPORAN PENELITIAN
PROYEK DUE-LIKE BACTH III

Judul Penelitian

ISOLASI DAN KARAKTERISASI PROTEIN IMUNOGENIK LARVA STADIUM II *Toxocara vitulorum* SEBAGAI PERANGKAT KIT DIAGNOSTIK PADA UJI ELISA

Oleh:
Prof. Dr. Sri Subekti Bendryman, DEA., drh.
Sri Mumpuni Sosiawati, MKes., drh.
Dr. Setiawan Koesdarto, MSc., drh.
Halimah Puspitawati, MKes., drh.

PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN

00 5307141

UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
NOPEMBER 2002

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

005307141

ADLN-Perpustakaan Universitas Airlangga

LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN
LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN PROYEK DUE-Like BACTH III

A. Judul Penelitian : Isolasi dan Karakterisasi Protein Imunogenik Larva Stadium II *Toxocara vitulorum* sebagai Perangkat Kit Diagnostik pada Uji ELISA

B. Ketua Peneliti
- a. Nama lengkap dan gelar : Prof. Dr. Sri Subekti Bendryman, DEA., drh
- b. Jenis Kelamin : Perempuan
- c. Pangkat / Golongan / NIP : Pembina Utama Madya / Gol. IVd / 130687296
- d. Bidang Keahlian : Parasitologi
- e. Fakultas / Jurusan : Lab. Helminthologi, Fakultas Kedokteran Hewan
- f. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

C. Tim Peneliti :

Nama	Bidang Keahlian	Fakultas / jurusan	Perguruan Tinggi
1. Sri Mumpuni Sosiawati, MKes., drh.	Parasitologi	Kedokteran Hewan	Universitas Airlangga
2. Dr. H. Setiawan Koesdarto, MSc., drh.	Parasitologi	Kedokteran Hewan	Universitas Airlangga
3. Halimah Puspitawati, MKes., drh.	Parasitologi	Kedokteran Hewan	Universitas Airlangga

D. Pendanaan dan jangka waktu penelitian :

Jangka waktu penelitian yang diusulkan : 6 (enam) bulan

Biaya total yang diusulkan : Rp30.000.000,00 (Tigapuluh juta rupiah)

Biaya yang disetujui Rp30.000.000,00 (Tigapuluh juta rupiah)

Surabaya, 18 Nopember 2002

Ketua Peneliti,

Prof. Dr. Sri Subekti B., DEA., drh.

NIP. 130687296

Mengetahui,

Dekan FKH-Unair,

Dr. Ismudiono, MS., drh.

NIP. 130687297

Menyetujui,

Ketua Eksekutif LPIU

Universitas Airlangga

Tjitjik Sri Tjahjandarie, Ph.D.

NIP. 131 801 627

RINGKASAN

Toxocara vitulorum yang dalam hidupnya mengalami beberapa generasi, yaitu telur, larva stadium pertama (L1), L2, L3, L4 dan cacing dewasa, merupakan parasit yang banyak menginfeksi ternak sapi dan kerbau. Di antara beberapa generasi tersebut, L2 merupakan stadium infektif yang paling banyak kontak dengan sistem imun tubuh, sehingga merupakan stadium terpenting di dalam membangkitkan timbulnya antibodi.

Penelitian ini secara umum bertujuan memperoleh protein imunogenik yang dapat dilakukan untuk pembuatan *kit diagnostik* untuk diagnosis toxocariasis melalui pemeriksaan antibodi dengan teknik *indirect*-ELISA.

Pada penelitian ini dilakukan isolasi dan karakterisasi protein yang berasal dari crude antigen dari L2 *T.vitulorum* dengan cara mereaksikan protein murni dengan antibodi poliklonal. Pada tahap I, protein dihancurkan dengan sonikasi 3x30 detik dan diidentifikasi melalui SDS-PAGE dengan pewarnaan silver. Kedua, protein ditransfer ke membran nitroselulose menggunakan antibodi poliklonal anti-L2 yang kemudian divisualisasikan melalui konjugat *goat-anti mouse* dan pewarnaan *fast red*. Ketiga, menentukan fraksi protein dilakukan berdasarkan pada berat molekul dan kemudian dilakukan isolasi protein dengan preparatif gel elektroforesis. Keempat, uji imunogenesitas dan antigenesitas terhadap masing-masing protein yang berhasil diisolasi pada tahap ketiga.

Hasil penelitian yang baru diselesaikan sekitar 90%, menunjukkan bahwa: 1) Telah berhasil diketahui fraksi protein antigen L2 *T. vitulorum*, yaitu pada BM 34,8 kDa, 44,9 kDa, 55,1 kDa, 65,9 kDa, 85,1 kDa, 96,6 kDa dan 112,7 kDa; 2) Imunogenesitas protein antigen L2 *T. vitulorum*, yang dinyatakan dengan nilai *optical density* (OD), lebih tinggi ($p<0,01$) dibanding serum kontrol; 3) Hasil identifikasi protein dengan teknik *Western blott* menunjukkan protein spesifik yaitu diperkirakan pada BM 34,8 kDa, 44,9 kDa, dan 55,1 kDa; dan 4) Telah berhasil diisolasi tiga fraksi protein spesifik L2 *T. vitulorum* yaitu diperkirakan pada BM 34,8 kDa, 44,9 kDa, dan 55,1 kDa.

SUMMARY

Toxocarisasis in a cattle and a bufallo is a disease that is caused by *Toxocara vitulorum* infection. That case was found in tropical areas. Toxocariasis is dangerous to both ruminants and human. Therefore this disease was confirm as a zoonosis (Uga *et al.*, 1990).

Life cycle of *Toxocara vitulorum* consist of some generations as follows : egg, stage larvae 1 (L1), L2, L3, L4, L5 and adult, which are parasitized to cattle and bufallo. Between them, L2 is infective stage that most contact with respon immune of the body. Therefore, it is the most important stage to stimule antibody activity.

The objective of this research is to get the immunogenic protein that could be done to make diagnostic kit of Toxocariasis diagnose by indirect – *ELISA technique*.

This study was done by protein isolation and caracterization by purified protein reaction with policlonal antibody. The first , protein were destroyed by PBS identified by SDS-PAGE with silver stain. The second, protein were transfered to nitrocellulose membrane used policlonal antibody anti-L2 and then were visualizied by goat anti mouse conjugate and fast red stain. The third, detection of protein fraction according to molecular weight and were done protein isolation by gel electrophoresis. The end, imunogenicity and antigenicity test to each protein that were isolated at third step.

The result of this study has just finished 90%, showed that : 1) It has known the antigen protein fraction of L2 *T.vitulorum*, was MW 34,8 kDa, 44,9 kDa, 55,1 kDa, 65,9 kDa, 85,1 kDa, 96,6 kDa and 112,7 kDa; 2) antigen protein immunogenicity of L2 *T.vitulorum*, that was confirmed by optical density (OD), higher ($p<0,01$) than serum control; 3) Protein identification result by *Western Blot Technique* showed specific protein be estimated in MW 34,8 kDa, 44,9 kDa and 55,1 kDa; and 4) It was isolated three specific protein fraction L2 of *T. vitulorum* that was estimated in MW 34,8 kDa, 44,9 kDa and 55,1 kDa.

PRAKATA

Puji syukur kehadlirat Allah SWT, karena perkenannya jugalah penelitian ini dapat diselesaikan. Penelitian ini terselenggara atas bantuan dana melalui Proyek Due-Like Batch III Unair tahun 2002, Nomor : SKU Proyek PMPT No.P.003.08/P2MPT/2002, tertanggal 5 Maret 2002.

Pada kesempatan ini kami sampaikan terima kasih sebesar-sebesarnya atas bantuan moril maupun materiil kepada :

1. Menteri Pendidikan Nasional
2. Ketua LPIU Universitas Airlangga
3. Dekan FKH Universitas Airlangga
4. Semua pihak yang membantu dalam pelaksanaan penelitian ini yang tidak mungkin kami sebut namanya satu persatu. Semoga Allah SWT memberikan balasan sesuai dengan amal kebaikannya.

Surabaya, Desember 2002

Prof.Dr.Sri Subekti B.S., DEA,drh(Ketua Peneliti)
Sri Mumpuni Sosiawati MKes.,drh. (Peneliti)
Dr. Setiawan Koesdarto MSc.,drh.(Peneliti)
Halimah Puspitawati MKes.,drh (Peneliti)

ADLN-Perpustakaan Universitas Airlangga

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

DAFTAR ISI

Halaman

LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN ii

RINGKASAN DAN SUMMARY iii

PRAKATA v

DAFTAR ISI vi

DAFTAR TABEL viii

DAFTAR GAMBAR ix

DAFTAR LAMPIRAN x

BAB I. PENDAHULUAN 1
- 1.1 Latar Belakang Masalah 1
- 1.2 Subyek Penelitian 5
- 1.3 Lokasi Penelitian 6
- 1.4 Hasil yang Ditargetkan 6

BAB II. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN 7
- 2.1 Tujuan Penelitian 7
- 2.2 Manfaat Penelitian 7

BAB III. TINJAUAN PUSTAKA 8
- 3.1 Transmisi dan Siklus Hidup *Toxocara vitulorum* 8
- 3.2 Diagnosis Toxocariasis 9
- 3.3 Aspek Zoonosis Toxocariasis 9
- 3.4 Imunopatobiogenesis Toxocariasis 10
  - 3.4.1 Respons imun terhadap helminth 10
  - 3.4.2 Larva dorman dan pembentukan jaringan granuloma 14
  - 3.4.3 *Visceral larvae migrans* (VLM) 15
  - 3.4.4 *Ocular larvae migrans* (OLM)..... 17

BAB IV. METODE PENELITIAN 18
- 4.1 Sampel *Toxocara vitulorum* 18
- 4.2 Antibodi Poliklonal 18
- 4.3 Analisis Protein 19
  - 4.3.1 SDS-PAGE 19
  - 4.3.2 *Bloting* 20

4.4 Isolasi Protein 20
4.4.1 Preparasi matriks antibodi 20
4.4.2 Pengikatan antigen pada matriks antibodi 21
4.4.3 *Elusi* antigen 21
4.5 Uji Serologis Terhadap Protein Spesifik yang Dihasilkan 22

BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN 23
5.1 Isolasi Larva Stadium Kedua (L2) *T. vitulorum* 23
5.2 Pembuatan Ekstrak (*Whole Extract*) L2 24
5.3 Analisis Protein dari L2 *T. vitulorum* 25
5.4 Karakterisasi Protein 27
5.5 Analisis Protein Hasil Elusi 28

BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN 30
6.1 Kesimpulan 30
6.2 Saran 30

DAFTAR PUSTAKA 31

LAMPIRAN 36

ADLN-Perpustakaan Universitas Airlangga

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 5.1 Nilai OD Serum Darah Kelinci Setelah Diimunisasi dengan Protein Antigen L2 *T. vitulorum* 25

DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 5.1 Hasil identifikasi telur cacing *T. vitulorum* dan perkembangannya hingga mencapai L2 23

Gambar 5.2 Hasil analisis protein L2 *T. vitulorum* dengan SDS-PAGE..... 26

Gambar 5.3 Hasil karakterisasi protein antigen L2 *T. vitulorum* dengan teknik *Western blot* 28

Gambar 5.3 Hasil analisis protein antigen L2 *T. vitulorum* yang diuji kembali dengan SDS-PAGE 28

DAFTAR LAMPIRAN

		Halaman
Lampiran 1.	Analisis Statistik Produksi Antibodi Poliklonal Kelinci.....	36
Lampiran 2.	Analisis Linier Regresi untuk Menentukan BM pada SDS-PAGE Protein L2	38
Lampiran 3.	Analisis Linier Regresi untuk Menentukan BM pada SDS-PAGE Hasil Elusi	39
Lampiran 4.	Abstrak Hasil Penelitian Mahasiswa Peserta Hibah Due-Like..	40

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

BAB I
PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Spesifisitas diagnosis secara imunologis toxocariasis hingga saat ini masih rendah. Hal ini karena protein antigen diagnosis yang digunakan kebanyakan memakai antigen ekskretori dan sekretori (E-S *antigen*).

Penyakit yang disebabkan oleh infeksi *Toxocara sp* bersifat zoonosis, khususnya pada anak-anak, namun demikian pernah dilaporkan terjadi juga pada orang dewasa. Toxocariasis yang disebabkan oleh *T. vitulorum* perlu mendapat perhatian karena populasi sapi perah di Indonesia cukup tinggi dan kedekatan ternak ini dengan manusia. Kontrol terhadap penyakit parasitik ini tidak mudah karena intensitas dan distribusi penyakit sangat dipengaruhi oleh faktor-faktor geografik, klimatik, dan ekonomik. Pemeriksaan sampel feses untuk mendeteksi toxocariasis telah banyak dilakukan di Indonesia. Angka prevalensi toxocariasis yang diperoleh pada anak kerbau di Malang Selatan adalah 76 % (Pratiwi dkk., 1991). Pada anak sapi Bali juga pernah diteliti oleh Gunawan dan Putra (1981), yaitu didapatkan angka prevalensi sebesar 75 %, dan pada anak sapi perah di Garut didapatkan angka prevalensi 54,24 % (Simon dan Syahrial, 1992), sedangkan di Surabaya prevalensi toxocariasis pada pedet umur kurang dari 6 bulan sebesar 43,3% (Koesdarto dkk., 1999). Dinyatakan pula bahwa, angka prevalensi tersebut menurun dengan bertambahnya umur pedet, yaitu pada pedet umur kurang dari 2 bulan, umur 2-4 bulang dan umur 4-6 bulan berturut-turut sebesar 68,2%, 51,4% dan 25,2%. Pada pengamatan dengan sincilasi dapat ditemukan L3 pada air susu sapi dari hari 1-5 pasca melahirkan yang prevalensinya mencapai 75% (Robert, 1990). Keadaan ini dapat meningkatkan resiko terjadinya toxocariasis pada manusia (Beer *et al.*, 1999). Penyakit tersebut pada manusia dikenal dengan sebutan *human toxocariasis*, yang merupakan salah satu penyakit cacing zoonosis yang sangat umum (Humbert *et al.*, 2000). Toxocariasis pada manusia adalah penyakit paling penting di antara infeksi oleh

ADLN-Perpustakaan Universitas Airlangga

nematoda, karena menyebabkan penyakit yang luas pada anak-anak, dan kerusakan mata pada orang dewasa (Playfair, 1992). Toxocariasis pada manusia terdapat dua bentuk yaitu *visceral toxocariasis* dan *ocular toxocariasis*, kedua bentuk ini masing-masing diakibatkan adanya *visceral larvae migrans* dan *ocular larvae migrans* (Uga *et al.*, 1990; Hubner *et al.*, 2001).

Manusia dapat tertular karena makanan atau minuman terkontaminasi oleh telur infektif (*embryonated egg*) atau larva jaringan terutama apabila pemasakan kurang sempurna (Ito *et al.*, 1986). Namun demikian dinyatakan bahwa, sumber utama infeksi pada manusia adalah tanah terkontaminasi dengan telur infektif (Radman *et al.*, 2000), terutama pada anak yang masih mempunyai sifat *geophagia* dan kontak dengan hewan penderita (Alonso *et al.*, 2000), maupun yang memasukkan jarinya ke mulut (Marx, 1991). Apabila telur infektif, yang mengandung larva stadium kedua (L2) dari tanah dan tangan terkontaminasi, tertelan manusia maka telur akan menetas dan mengeluarkan larva dalam usus halus bagian proksimal, kemudian terjadi penetrasi larva pada mukosa dan terbawa sirkulasi darah sampai hati melalui sistem portal. Beberapa larva tinggal di dalam hati menyebabkan pembentukan granuloma, yang lain terbawa ke paru dan kemudian beberapa masuk sistem sirkulasi dan terbawa ke berbagai organ tubuh hingga mencapai pembuluh darah kecil. Larva menembus pembuluh darah dan migrasi menuju jaringan di sekitarnya (Kilpatrick, 1992). Larva tidak kembali ke usus halus untuk berkembang lebih lanjut tetapi mengalami jalan buntu, sehingga tetap tinggal di jaringan dan statis yang lazim disebut larva dorman (Levine, 1978). Larva dorman (L2) dapat ditemukan dalam jaringan somatik, organ paru, hati, ginjal dan mata bahkan dapat mencapai otak (Uga *et al.*, 1990; Havasiova-Reiterova *et al.*, 1995).

Suatu hal yang menarik pada kasus toxocariasis adalah L2 tidak pernah berkembang menjadi L3 apabila infeksi terjadi pada selain anak kucing dan kucing jantan dewasa atau kucing betina dewasa yang tidak bunting dan melahirkan. Cacing tanah, kecoa, ayam, anjing, anak kambing dan khususnya mencit dapat berfungsi sebagai hospes

tranpor. Dengan kata lain di dalam tubuh selain hospes definitif, perkembangan larva mengalami jalan buntu, sehingga tetap tinggal di jaringan dan statis yang lazim disebut larva dorman (Levine, 1978). Mengingat telur cacing dan *T. cati* dewasa tidak dapat ditemukan pada hospes transpor, termasuk manusia, maka diagnosis secara konvensional, yaitu berdasarkan pemeriksaan feses untuk menemukan telur cacing tidak dapat dilakukan, sedangkan diagnosis berdasarkan gejala klinis juga sulit dilakukan karena gejala klinisnya sangat bervariasi. Oleh karena itu, diperlukan diagnosis secara serologik.

Di Indonesia belum pernah dilakukan survei seroepidemiologi toxocariasis pada manusia, sehingga angka kejadiannya belum diketahui. Hal ini sangat berbeda dengan beberapa negara lain misalnya di Argentina telah diketahui angka prevalensi toxocariasis pada anak-anak di kota Resistensia sebesar 37,9% dari 206 sampel yang diamati (Alonso *et al.*, 2000), sedangkan di Chaco Salteno 20,4% dari 98 sampel (Taranto *et al.*, 2000), di Shiraz 25,6% dari 519 sampel (Sajjadi *et al.*, 2000), dan di Jos, Plateau State, Nigeria 29,6%, sedangkan pada orang dewasa 30,4% dari 104 sampel (Ajayi *et al.*, 2000). Park *et al.* (2000) juga melaporkan, adanya lima kasus toxocariasis terjadi pada orang dewasa di Korea.

Telah diketahui di seluruh dunia, bahwa *T. canis* dan *T. cati* memungkinkan sebagai penyebab infeksi pada manusia, termasuk manifestasi klinisnya, yaitu *visceral* dan *ocular lavae migrans* (Hubner *et al.*, 2001). Mengingat dampak yang ditimbulkan sangat berat terutama bila terjadi *ocular larva migrans* maupun bila larva sampai ke otak (Havasiova-Reiterova *et al.*, 1995), maka perlu dipikirkan penggunaan imunodiagnosis pada manusia. Keberadaan larva dalam jaringan akan menimbulkan jejas, sehingga timbul respons imun yang ditandai dengan keberadaan imunoglobulin E (IgE) dan peningkatan kadar eosinofil yang merupakan jenis khusus dari *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* (ADCC). Respons tersebut dilengkapi dengan kecenderungan dari helminth untuk menstimulasi subset $Th_2CD_4^+$ dari sel Th, yang mensekresi interleukin-4 (IL-4) dan IL-5. Interleukin-4 merupakan limfokin yang merangsang sel B untuk

ADLN-Perpustakaan Universitas Airlangga

berdeferensiasi menjadi sel plasma dan menghasilkan Ig E, sedangkan IL-5 merupakan pemicu potensial terhadap pembentukan eosinofil (Abbas *et al.*, 2000). Interleukin (IL)-4 dan IL-5 berperan dalam kontrol produksi Ig E dan Ig G_1, sedangkan $Th_1CD_8^+$ menghasilkan interferon gamma (IFNγ) yang menghambat reaksi hipersensitivitas dan memicu produksi Ig G_2. Antibodi tersebut sebagian beredar dalam darah perifer, sehingga dapat dideteksi dengan teknik imunodiagnosis. Radman *et al.* (2000) menyetujui bahwa, diagnosis dini dan pengobatan dapat menyelamatkan hidup penderita toxocariasis.

Cacing *T. vitulorum* yang selama hidupnya mengalami beberapa generasi, yakni stadium telur, larva stadium pertama (L1), kedua (L2), ketiga (L3), keempat (L4), dan cacing dewasa, memiliki perangkat antigen yang berbeda-beda. Adanya perbedaan struktur morfologi pada berbagai generasi menyebabkan perbedaan imunogenesitas dalam memicu terbentuknya antibodi (Warren, 1993). Oleh karena itu pengamatan terhadap protein antigen cacing tersebut dapat dilakukan terhadap telur, larva, maupun cacing dewasa. Pada telur cacing, protein antigenik dapat diperoleh dari kulit telur, membran vitelin dan *granular layer*. Adapun pada stadium larva dan dewasa yang paling sering digunakan adalah E-S *antigen*, disamping itu juga *surface antigen*, dan antigen somatik (*whole extract*).

Karena L2 merupakan larva migran yang berasal dari saluran usus dan kemudian masuk ke dalam sistem *portal hepatic*, ke dalam hati, paru, dan organ visceral lain, sangat memungkinkan L2 lebih dikenali perangkat imun tubuh hospes, sehingga dapat memicu terbentuknya antibodi lebih kuat. Hal ini dapat dibuktikan dengan pemeriksaan antibodi terhadap *T. vitulorum* dengan uji ELISA, bahwa penggunaan antigen L2 pada mencit memberikan nilai *optical density* (OD) yang lebih tinggi dibanding jika digunakan antigen L1 maupun dewasa (Kusnoto dkk., 2001). Berdasarkan pemeriksaan antibodi dengan teknik *Western blot*, terjadi reaksi antara antibodi terhadap L3 *T. vitulorum* dengan protein 34 kDa dan 32 kDa dari L2 maupun L3, tetapi memberikan hasil negatif

ADLN-Perpustakaan Universitas Airlangga

dengan protein pada L1 (Pratiwi, 1997). Respons imun yang ditunjukkan ekstrak larva infektif *T. vitulorum* lebih tinggi dibanding antigen E-S, hal ini tampak dari hasil uji *skin tests* pada anak kerbau, yaitu berupa reaksi hipersensitifitas (Starke *et al.*, 1996). Kenyataan tersebut memberikan kesan bahwa ekstrak larva infektif dapat digunakan sebagai sumber protein dengan imunogenesitas dan antigenesitas yang tinggi, namun masih perlu dianalisis lebih lanjut agar nantinya dapat ditemukan antigen yang sangat spesifik untuk digunakan sebagai bahan uji imunodiagnostik terhadap toxocariasis dengan sensitifitas dan spesifisitas yang dapat diandalkan.

Adanya reaksi silang pada penggunaan antigen ektrak *crude protein* memberikan isyarat bahwa pada uji imunodiagnostik membutuhkan bahan uji yang lebih spesifik. Purifikasi protein cacing dewasa *T. vitulorum* ternyata menghasilkan fraksi protein yang dapat meningkatkan spesifisitas (*spesific activity*) dibanding dengan *crude extract* (Abdel-Rahman (2000). Hal ini juga tampak pada penggunaan *crude extract* dari cacing *T. canis* yang menunjukkan reaksi silang dengan antibodi terhadap *A. vitulorum* dan *A. lumbricoides*, tetapi reaksi silang tidak terjadi bila menggunakan *partially purified antigen* (Safar *et al.*, 1992).

Bertitik tolak dari permasalahan di atas maka perlu kiranya dikaji lebih mendalam mengenai protein imunogenik *T. vitulorum* yang bersifat spesifik, khususnya sensitifitas dan spesifisitas protein imunogenik L2 dalam upaya mendapatkan perangkat diagnostik dini, cepat dan akurat.

1.2 Subyek Penelitian

Penelitian ini menggunakan larva stadium kedua (L2) *Toxocara vitulorum*. Telur cacing diisolasi dari cacing dewasa dan feses (yang diperoleh dari anak sapi penderita toxocariasis) dengan teknik *preparation of gradients*, kemudian dibiakkan dalam *phosphat buffer saline* pada suhu kamar untuk memperoleh L2.

ADLN-Perpustakaan Universitas Airlangga

1.3 Lokasi Penelitian

Laboratorium Helminthologi, Lab. Virologi dan Imunologi, Lab. Biomolekuler Fakultas Kedokteran Hewan, dan Lab. Dengue, Tropical Disease Center, Universitas Airlangga, Surabaya.

1.4 Hasil yang Ditargetkan

Mendapatkan protein imunogenik spesifik *T. vitulorum* sebagai komponen bioaktif yang dapat digunakan sebagai perangkat kit diagnostik pada pemeriksaan antibodi penderita toxocariasis dengan uji *indirect–enzym linked immunosorbentassay* (*indirect*-ELISA).

BAB II
TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

2.1 Tujuan Penelitian

2.1.1 Tujuan khusus jangka pendek

Penelitian ini mempunyai beberapa tujuan yaitu:

1) Menentukan fraksi protein larva stadium kedua (L2) *T. vitulorum.*
2) Menentukan imunogenitas protein antigen L2 cacing *T. vitulorum.*
3) Mendapatkan protein imunogenik L2 cacing *T. vitulorum* pada berat molekul (BM) tertentu dengan sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi dalam mendeteksi antibodi terhadap berbagai stadium *T. vitulorum* pada hewan tersangka toxocariasis.

2.1.2 Tujuan khusus jangka panjang

Tujuan jangka panjang dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan protein imunogenik murni yang dapat digunakan sebagai imunogen pada pembuatan antibodi monoklonal.

2.2 Manfaat Penelitian

Dengan diketahuinya protein imunogenik murni dari *Toxocara vitulorum*, akan dapat dimanfaatkan untuk diagnosis toxocariasis dengan pemeriksaan antibodi. Hasil penelitian ini dapat diharapkan dapat digunakan tolok ukur dalam pembuatan kit diagnostik.

BAB III
TINJAUAN PUSTAKA

3.1 Transmisi dan Siklus Hidup *Toxocara vitulorum*

Transmisi *Toxocara sp* dapat melalui beberapa cara tergantung umur hospes, meliputi *prenatal transmission (trans uterine)*, *lactogenic transmission* (*colostral*), *direct transmission*, *paratenic host transmission*, serta *soil transmission*.

Siklus hidup *T. vitulorum* sangat kompleks karena mempunyai stadium spesifik pada setiap hospes yang tertular. Periode prepaten pada anak kerbau adalah 20-27 hari, sedangkan pada anak sapi 13-53 hari (Roberts, 1990[b]).

T. vitulorum dewasa mengeluarkan telur, yang ke luar tubuh hospes bersama tinja, mencapai tahap infektif dalam waktu 10-15 hari bila kondisi lingkungan mendukung. Telur cacing tersebut berukuran 69,5 x 69,5 hingga 99 x 79,2 μm, berdinding tebal karena terbungkus membran khitin. Sesudah tertelan oleh anak sapi atau anak kerbau, telur cacing menetas dalam usus halus. Delapan hari sesudah infeksi L2 sudah dapat ditemukan dalam berbagai jaringan (hati, paru-paru, dan ginjal). L2 menembus dinding usus melalui pembuluh limfe sampai glandula mesenterica dan terbawa aliran darah portal menuju ke hepar kemudian ke jantung, paru hingga sampai trachea, akhirnya tertelan menuju ke lambung kembali (*tracheal migration*) dan menjadi cacing dewasa di dalam usus halus pada masa 3-4 minggu setelah infeksi (Roberts, 1992).

Apabila hal ini terjadi pada sapi/kerbau jantan dewasa, maka L2 tidak mengalami perkembangan lebih lanjut, larva tersebut menjadi penghuni jaringan somatik. Akan tetapi bila sapi/kerbau betina dewasa yang tertular maka akan terjadi migrasi L2 menuju kelenjar susu menjadi L3 pada saat hospes tersebut bunting pada bulan ke 8 dan seterusnya. Larva mungkin dapat melewati plasenta dan masuk ke cairan amnion, yang selanjutnya mencapai usus halus fetus dan menjadi dewasa sesudah fetus lahir. Disamping itu larva dapat bermigrasi ke kelanjar susu dan keluar bersama

ADLN-Perpustakaan Universitas Airlangga

kolostrum (larva ditemukan antara 2-18 hari sesudah sapi atau kerbau beranak), sehingga anak sapi atau kerbau dapat terinfeksi melalui kolostrum (Roberts, 1992; Kusumamihardja, 1993).

3.2 Diagnosis Toxocariasis

Pemeriksaan feses untuk menemukan telur *T. vitulorum* hanya dapat dilakukan terhadap anak sapi dan kerbau umur kurang dari 6 bulan, karena cacing dewasa hanya dapat ditemukan pada hospes tersebut. Akan tetapi pada induk jantan dan betina serta pada manusia, hal ini tidak dapat dilakukan karena dalam feses dari hospes tersebut tidak dapat ditemukan telur cacing. Hal ini karena mereka hanya sebagai hospes perantara, sehingga diperlukan cara lain untuk melakukan diagnosis pada hospes tersebut.

Diagnosis toxocariasis berdasarkan gejala klinis sulit dilakukan, karena gejala toxocariasis sangat bervariasi, sehingga membutuhkan diagnosis yang lebih spesifik, misalnya secara imunologis (Uga *et al.*, 1990). Untuk memperjelas kenyataan ini ada baiknya dibahas secara singkat mengenai siklus hidup *Toxocara vitulorum* dan aspek zoonosis dari toxocariasis.

2.3 Aspek Zoonosis Toxocariasis

Manusia dapat tertular toxocariasis apabila telur infektif atau larva infektif dari *Toxocara sp.* termakan. Telur infektif terdapat dalam feses anjing, kucing, anak sapi dan dan kerbau, dan tanah terkontaminasi, sedangkan larva berada pada jaringan (daging) maupun air susu. Berdasarkan gejala klinik, toxocariasis pada manusia diklasifikasikan menjadi *visceral toxocariasis* dan *ocular toxocariasis*. Kedua penyakit tersebut didefinisikan sebagai *visceral larva migrans* (VLM) dan *ocular larva migrans* (OLM) yang membutuhkan diagnosis secara imunologis (Uga *et al.*, 1990).

Toxocariasis pada manusia dilaporkan telah terjadi di Jepang sebanyak 42 kasus (Kondo, 1989). *Toxocara* ternyata dapat menyerang baik pada manusia dewasa maupun anak-anak. Gejala toxocariasis bervariasi sehingga sulit untuk didiagnosis dari gejala klinik (Uga *et al.*, 1990). Lebih lanjut dinyatakan bahwa dengan uji ELISA terhadap orang yang tinggal di Kota Kobe dan sekitarnya didapatkan hasil 4,6 % positif dari 196 kelompok orang dewasa (100 orang pria dan 96 wanita), 6,3 % positif dari 80 kelompok anak-anak (45 pria dan 35 wanita), dan 29,3 % positif dari 75 kelompok orang yang menunjukkan gejala atau dugaan penderita (pasien 41 pria dan 34 wanita, umur 9-69 tahun).

3.4 Imunopatobiogenesis Toxocariasis

3.4.1 Respons imun terhadap helminth

Toxocariasis adalah penyakit yang disebabkan oleh infeksi cacing *Toxocara sp.* terdapat beberapa spesies Toxocara, yaitu *Toxocara vitulorum* menyerang anak sapi dan kerbau, *Toxocara canis* menyerang anjing, dan *Toxocara cati* menyerang kucing. Larva dari ketiga spesies Toxocara tersebut dapat menginfeksi manusia, oleh karena itu penyakit ini tergolong zoonosis (Uga *et al.*, 1990).

Biasanya, respons imun alami tidak mampu mengeliminasi sebagian besar parasit. Parasit (protozoa dan helminth) yang masuk aliran darah atau jaringan sering mampu bertahan dan melakukan replikasi karena parasit tersebut dapat beradaptasi terhadap sistem imun alami dari hospes. Pada umumnya, parasit resisten dari lisis oleh complemen. Makrofag dapat memfagositosis protozoa, tetapi tegumen dari parasit helminth membuat resisten terhadap mekanisme sitosidal dari netrofil dan makrofag (Abbas *et al.*, 1997; Ozeretskovskaia, 2000).

Respons imun spesifik terhadap infeksi beberapa helminth diperantarai oleh Ig E dan eosinofil, yang merupakan jenis khusus dari *antibody-dependet cellular cytotoxicity*

ADLN-Perpustakaan Universitas Airlangga

(ADCC). Antibodi (Ig E) mengikat bagian permukaan dari helminth, kemudian eosinofil menyerang melalui Fc reseptor, dan eosinofil teraktivasi mensekresi granula enzim yang menghancurkan parasit. Respons tersebut dilengkapi dengan kecenderungan dari helminth untuk menstimulasi subset $Th_2CD_4^+$ dari sel Th, yang mensekresi IL-4 dan IL-5. interleukin-4 (IL-4) menstimulasi produksi Ig E, dan IL-5 menstimulasi perkembangan dan aktivasi eosinofil. Eosinofil kemungkinan lebih efektif untuk mematikan helminth daripada leukosit lain, karena protein granula eosinofil mungkin lebih toksik dibanding enzim proteolitik dan oksigen reaktif dari netrofil maupun makrofag. Respons imun spesifik terhadap parasit juga menambah jejas jaringan. Beberapa parasit dan produknya menginduksi respons granulomatous dengan *fibrosis concominant* (Abbas *et al.*, 1997)

Suatu hal yang menarik pada kasus Toxocariasis adalah L2 tidak pernah berkembang menjadi L3 apabila menyerang selain hospes definitif, yaitu sapi dan kerbau umur muda, demikian juga bila menginfeksi manusia. Pada pengamatan dengan sincilasi dapat ditemukan L3 pada air susu sapi dari hari 1-5 pasca melahirkan (Robert, 1990).

Toxocara sp. mempunyai ciri khusus pada siklus hidupnya yang setiap kali berubah sesuai dengan stadium hidupnya. Sering kali setiap stadium tersebut memerlukan hospes tertentu, dan masing-masing mempunyai sifat antigenik yang berbeda, sehingga menimbulkan respons yang berbeda pula. Toxocariasis bersifat zoonosis dan telah dikenal di dunia dapat menimbulkan infeksi pada manusia yang disertai manifestasi klinik visceral atau ocular (Hubner *et al.*, 2001), bahkan data terbaru menunjukkan bahwa terjadi infeksi pada anak-anak sebanyak 10.000 kasus baru setiap tahun. Oleh karena itu, perlu dikaji lebih mendalam mengenai aspek imunopatobiologi dari toxocariasis agar diperoleh gambaran tentang sistem imun sebagai penyebab, akibat maupun proses

ADLN-Perpustakaan Universitas Airlangga
MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

terjadinya penyakit tersebut, dalam upaya mendapatkan cara diagnosis dini, cepat dan akurat.

Pada umumnya infeksi oleh parasit, khususnya cacing, ditandai dengan keberadaan imunoglobulin (Ig) E dan peningkatan kadar eosinofil. Peningkatan kedua sel-sel sistem imun tersebut di bawah kontrol sel T (Pearse and Sher, 1990). Interleukin (IL) 4, merupakan limfokin yang merangsang sel B yang teraktivasi oleh lipopolisakarida untuk menghasilkan Ig E dalam tubuh hospes. Sedangkan IL-5 merupakan stimulus potensial terhadap pembentukan eosinofil pada medium buatan (Abbas *et al.*, 1997). Penyuntikan IL-5 pada tikus yang dilakukan oleh Amerasinghe *et al.* (1992), berakibat terjadi peningkatan jumlah sel eosinofil dalam darah dan jaringan. Jika IL-5 rendah akan menyebabkan terjadinya granuloma dan fibrosis hati. Interleukin (IL)-4 dan IL-5, yang dihasilkan oleh $Th_2CD_4^+$, berperan dalam kontrol produksi Ig E dan Ig G_1. Sedangkan $Th_1CD_8^+$ menghasilkan interferon gamma (IFNγ) yang menghambat reaksi hipersensitivitas dan memacu produksi Ig G_2. Menurut Rajapakse (1992), Ig G_2 lebih berperanan dalam infeksi *T. vitulorum* dari pada Ig yang lain.

Pada perunutan respon imun terhadap patogenitas larva, ditemukan puncak kadar antibodi sapi dewasa pada 7 hari pasca infeksi. Puncak kedua terjadi pada saat L1 menetas dan berkembang menjadi L2, serta pada saat migrasi larva ke organ visceral yang lain. Respon imun terhadap *T. vitulorum* ternyata menggugah semua kelas imunoglobulin (Barriga and Omar, 1991). Semakin tinggi kadar Ig G semakin sedikit jumlah L3 yang berhasil keluar bersama air susu induk. Sebaliknya pada saat terjadi penembusan L2 terhadap jaringan granuloma, ternyata kadar Ig G_1 menurun 50% sedangkan Ig A dan Ig M meningkat sampai 7 kali (Rajapakse, 1992).

Bentuk imunitas protektif yang lain terhadap cacing dewasa masih bersifat spekulatif. Salah satu teori ialah *self cure* yang menyebabkan pengeluaran cacing dewasa dari tubuh hospes (Lioyd and Soulsby, 1987). Pada saat itu kadar Ig E meningkat, hal ini dibuktikan oleh Matsumura *et al.* (1983). Pengeluaran cacing dari

ADLN-Perpustakaan Universitas Airlangga

lumen usus merupakan kerja sama antara antibodi, sel limfosit dan sel myeloid. Namun sepenuhnya fenomena tersebut belum dapat dijelaskan secara tepat. Sedangkan pada bentuk muda seringkali terjadi migrasi dari satu organ ke organ lain, kemudian akan membentuk jaringan ikat di sekitarnya. Keadaan ini akan merangsang kenaikan jumlah sel eosinofil yang berlangsung kronis, dan akan berkaitan dengan produksi Ig M dan Ig G di sekitar fibrosis dan di dalam granuloma tersebut. Sedangkan kadar eosinofil darah perifer terlihat mulai dari normal hingga terjadi peningkatan (Pratiwi, 1997). Jumlah sel eosinofil dan makrofag sangat bergantung kepada keberadaan dan aktivitas sel limfosit T. titer Ig G spesifik yang tinggi ada hubungannya dengan manifestasi klinis dari toxocariasis. Infeksi larva juga dapat menstimulasi eosinofil (Kincekova, 1999).

Pola respons imun sapi betina berupa peningkatan jumlah sel eosinofil di sekitar jaringan granuloma pada paru, ginjal, dan hati. Demikian pula terjadi peningkatan kadar Ig E, Ig M, dan Ig G (Husband *et al.* (1972). Adanya respons imun tersebut menyebabkan fenomena ini dapat menjadi salah satu parameter terhadap infeksi *T. vitulorum* bentuk larva pada sapi betina. Agar tidak terjadi kekeliruan dengan adanya infeksi cacing yang lain, lebih tepat apabila dapat ditentukan protein spesifik dari cacing tersebut yang bersifat imunogen (Manus, 1986).

Infeksi pada anak sapi dapat terjadi terutama disebabkan karena belum memiliki aktivitas sistem imun sendiri. Imunogobulin yang dipunyai oleh anak sapi neonatal ini ialah antibodi maternal (Brandon and Lascelles, 1971), sampai pada saat terjadinya perkembangan organ imunokompeten sebagai bentuk protektif. Hal ini karena pada sapi tidak terjadi transfer imunoglobulin melalui plasenta, tetapi hanya melalui kolostrum. Dalam darah fetal sebenarnya sudah didapatkan sel limfosit pada 45 hari setelah konsepsi, sedangkan Ig M pada hari ke-359 kebuntingan dan Ig G1 pada hari ke-135. penelitian ini dilakukan dengan teknik gel difusi (Husband *et al.*, 1972). Demikian pula respons yang terjadi pada infeksi buatan dengan beberapa penyebab

ADLN-Perpustakaan Universitas Airlangga

penyakit. Namun belum diketahui secara pasti apakah imunoglobulin tersebut berasal dari induk atau respons fetus, karena timus dan limfo noduli sudah ditemukan pada fetus sapi 45 hari setelah konsepsi.

Tipe plasentasi hemochoreial pada primata memberikan kemungkinan transfer imunoglobulin intra uterin secara langsung, yaitu Ig G. Sedangkan tipe plasentasi pada sapi adalah sindesmochoreial, yaitu terjadi perlekatan langsung antara sel chorion dengan mukosa uterus, tidak memberikan kesempatan transfer imunoglobulin induk ke fetus. Pada sapi, kuda, dan babi terjadinya transfer imunoglobulin ialah pada saat menyusui anaknya melalui kolostrum yang kaya akan Ig G dan Ig A, sedikit Ig E dan Ig M. kadar Ig G pada kolostrum mencapai 3400-3900 mg/ml yang akan berangsur menurun, dalam air susu setelah melampaui masa kolostral menjadi 50-750 mg/ml (Bambell, 1970). Tetapi dilaporkan bahwa 25% dari jumlah imunoglobulin tersebut gagal diabsorbsi oleh anak sapi, sehingga tidak seluruh imunoglobulin maternal dapat dimanfaatkan oleh anak sapi. Sel plasma induk ternayata dapat terikut bersama kolostrum pada saat anak sapi menyusui pada minggu pertama.

2.4.2 Larva dorman dan pembentukan jaringan granuloma

Ketidakberhasilan hospes untuk mengeliminasi larva *T. vitulorum* secara tuntas, serta gangguan patologi yang terjadi akibat respons imun merupakan fenomena imuno-patobiologi. Dilaporkan bahwa kegagalan tersebut menimbulkan rangsangan terbentuk-nya jaringan ikat kolagen dan fibronektin yang akan menyelubungi larva dorman berupa jaringan ikat granuloma (Warren, 1993). Kegagalan tersebut akan berakibat terhadap resistensi antibodi hospes, misalnya robeknya hidatida akan menyebabkan pelepasan sebagian antigen yang dapat memicu timbulnya shock anafilaktik akut (Roitt *et al.*, 1998). Penderita toxocariasis ternyata juga menampakkan gejala urtikaria dan prurigo (Humbert *et al.*, 2000), hal ini didukung oleh Glickman *et al.* (1981) yang menyatakan

ADLN-Perpustakaan Universitas Airlangga

bahwa, pada ascariasis terjadi reaksi hipersensitivitas cepat tipe I, dengan gejala urtikaria dan angioderma.

Infeksi larva *T. vitulorum* pada sapi betina dewasa juga memberikan gambaran respons imun seluler kronis, misalnya pembentukan jaringan granuloma di sekitar lokasi larva (Roberts, 1992). Hipersensitifitas tipe lambat kemungkinan juga terjadi pada infeksi bentuk larva, yaitu pada 2-3 minggu sebelum hospes melahirkan. Fenomena ini besar kemungkinan berkaitan dengan keberadaan hormon-hormon laktogenik yang akan menurunkan respons imun secara tidak langsung dengan kompetisi penggunaan kalsium (Ca) sebagai bahan penyusun air susu, hal ini memungkinkan L2 aktif kembali menjadi L3. Tidak semua L2 yang berada di jaringan paru, ginjal, dan hati akan terbebas keluar pada saat kelahiran yang sama, sebagian dapat bertahan sampai kelahiran berikutnya (Roberts, 1993). Terbentuknya sel fibroblas dari sel limfosit ikut berperan dalam pembentukan kapsul dan jaringan granuloma yang mengelilingi larva. Apabila kapsulasi tersebut terjadi pada waktu yang lama dapat terjadi pengapuran (Soulsby, 1989).

2.4.3 *Visceral larvae migrans* (VLM)

Perkembangan patologi viscera pada tahap awal dari toxocariasis berhubungan dengan kelebihan produksi modulator yang tidak seimbang dan aksi langsung dari substansi agen parasitik. Enzim-enzim parasitik mengekspresikan protein hospes, baru-baru ini dinyatakan sebagai protein myogenik parasitik, epitop jaringan normal hospes tak terekspresi, misalnya autoantigen dari jaringan rusak akan dianggap sebagai faktor penting untuk proses imunopatologik/autoimunopatologik (Ozeretskovskaia, 2000).

Pembentukan portal fibrosis dan hipertensi organ paru sering kali berhubungan dengan respons imun seluler terhadap deposit telur-telur cacing dalam jaringan (Chappel and Haeney, 1992). Migrasi larva melalui paru menyebabkan *asthma-like*

reactions seperti pada *T. canis* dan *tropical pulmonary eosinophylia* (Roitt *et al.*, 1998; Playfair, 1992). Menurut Stites (1997), apabila telur nematoda termakan, maka telur tersebut akan menetas dan terjadi penetrasi larva pada mukosa, yang akhirnya mencapai paru melalui aliran darah, reaksi hipersensitivitas di dalam paru akibat tingginya Ig E dapat menyebabkan pneumonitis serius. *Toxocariasis* adalah paling penting di antara infeksi oleh nematoda, karena menyebabkan penyakit yang luas pada anak-anak, dan kerusakan mata pada orang dewasa (Playfair, 1992).

Infeksi helminth dengan migrasi larva melalui jaringan merupakan salah satu predisposisi penyebab *pyogenic liver abcess*, khususnya di negara tropis yang umumnya banyak terdapat penyakit parasitik ini (Rayes, 2001). Aktivasi sel Th_2 dan penurunan regulasi sel Th_1 yang diinduksi oleh cacing dapat mengurangi aktivitas fagositosis terhadap mikrobial, seperti reaksi granulomatous di sekeliling larva menyebabkan bakteri terperangkap dalam liver (Moreira-Silva dan Pereira, 2000). Schulze *et al.* (2000) melakukan pengamatan pasca mati terhadap anjing yang menderita *atresia billiary extra hepatic* ternyata ditemukan *T. canis* yang menginvasi sistem *billiary* via anastomosis antara *gall bladder* dan duodenum. Hal ini menyebabkan *billiary* dan *hepatic toxocariasis*.

Visceral larvae migrans syndrome biasanya bersifat asimtomatik dan jarang melibatkan nervus, sehingga kejadian ini jarang teramati, yaitu keterlibatan cerebral dihubungkan dengan *symptomatic Loffler's endocarditis*. Hal ini merupakan bentuk yang tidak umum pada penyakit cardiac yang terus-menerus disertai oleh hipereosinofilia dalam waktu lama (Prunier *et al.*, 2001). Sementara itu Goffete *et al.* (2000) melaporkan kejadian toxocariasis pada wanita umur 40 tahun yang menunjukkan hipersensitivitas sampai pada spinal cord. Berdasarkan pemeriksaan cairan cerebro spinal menunjukkan *eosinophilic pleocytosis*. Diketahui pula bahwa titer antibodi dalam cairan cerebro spinal lebih tinggi dibanding dalam serum.

ADLN-Perpustakaan Universitas Airlangga

2.4.4 *Ocular larvae migrans* (OLM)

Produk sekresi oleh invasi larva cacing dan ekspresi substansi-substansi atas permukaan kutikula tegumen menampilkan modulator nonspesifik dan spesifik pada proses inflamasi hospes atau menginduksi inflamasi secara langsung (Ozeretskovskaia, 2000). Inflamasi yang ditimbulkan dalam respons terhadap larva Toxocara dapat berperan penting pada *traction retinal detachment* dari macula (Amin *et al.*, 2000). Penampakkan keadaan ini mungkin diawali dengan uveitis (Park *et al.*, 1999).

Park *et al.* (2000) melaporkan adanya 5 kasus *ocular toxocariasis* pada orang-orang dewasa di Korea. Pada pemeriksaan fundoskopik, 4 kasus dinyatakan mengalami *retinal detachment* bersama dengan eksudat. Atopi ini memberi kesan ada hubungannya dengan level tinggi dari antibodi Ig E. Bilamana lesi *uniocular inflammatory* ditemui pada retina periferal tanpa penyakit sistemik, maka perlu dicermati adanya *ocular toxocariasis*.

Yoshida *et al.* (1999) menyatakan, adanya perbedaan profil klinik dari *ocular toxocariasis* yang terjadi di Jepang. Berdasarkan lokasi lesi, dapat terjadi di posterior fundus, perifer fundus, dan keduanya, juga dapat terjadi *papillary oedema* (*redness*), lesi chorioretinal dan *traction retinal detachment*.

BAB IV
METODE PENELITIAN

4.1. Sampel *Toxocara vitulorum*

Toxocara vitulorum dewasa, hasil isolasi dari anak sapi (pedet) penderita toxocariasis diinkubasikan pada suhu 37°C untuk mendapatkan telur cacing. Selain dari cacing dewasa untuk mempercepat tersedianya stok telur cacing, juga dilakukan isolasi dari feses pedet penderita. Telur cacing dari inkubasi cacing dewasa maupun feses pedet kemudian dimurnikan dengan teknik *preparation of gradients* (DrenchRite, 1996). Selanjutnya telur cacing diidentifikasi, kemudian dipupuk di dalam media *phosphat buffer saline* (Koga *et al.*, 1992) untuk memperoleh L1 dan L2. Larva stadium II (L2) kemudian diisolasi dan dihancurkan dengan sonikasi 3 x 30 detik, kemudian diperiksa dengan mikroskop cahaya (M=100x) untuk keberhasilan penghancuran tersebut. Apabila keberhasilan kurang dari 95% maka dilakukan sonikasi ulang.

Ekstrak L2 yang didapatkan kemudian dilakukan pemeriksaan kadar protein dengan spektrofotometer selanjutnya disimpan pada suhu –30°C hingga digunakan pada proses lebih lanjut.

4.2 Antibodi Poliklonal

Antibodi poliklonal dibuat dengan jalan menyuntikkan homogenat (*whole extract*) L2 *T. vitulorum* pada kelinci. Sebanyak empat ekor kelinci betina ras Anggora umur 3-5 bulan diinjeksi dengan *whole extract* larva stadium kedua (L2) *T. vitulorum* yang telah berhasil dimurnikan. Injeksi dilakukan secara subkutan dengan menggunakan *complete Freund adjuvant* (CFA) pada imunisasi pertama dan *incomplete Freund adjuvant* (IFA) pada imunisasi ulang. Imunisasi ulang dilakukan dua minggu setelah imunisasi pertama. Pada minggu ke-4 dilakukan pengambilan darah kelinci kemudian disentrifugasi untuk mendapatkan serum yang mengandung antibodi poliklonal anti-L2 *T. vitulorum*. Untuk

ADLN-Perpustakaan Universitas Airlangga

memastikan pembentukan antibodi tersebut dilakukan pemeriksaan titer antibodi dengan teknik *indirect*-ELISA yang hasilnya dinyatakan dengan nilai *optical density* (OD). Pembuatan antibodi poliklonal digunakan untuk proses *blotting*.

4.3 Analisis Protein

Ekstrak hasil penghancuran L2 kemudian dilisiskan dengan *buffer lisis* dan dilakukan SDS-PAGE. Protein kemudian ditransfer pada kertas nitroselulose dan selanjutnya dilakukan *blotting*.

4.3.1 SDS - PAGE

Setelah larutan gel pemisah 15 % dimasukkan pada *gel plate* pada posisi vertikal, kemudian di atasnya ditambahkan butanol sampai mengeras. Butanol kemudian dibuang, dibersihkan dengan PBS dan dikeringkan dengan kertas Whatman. Proses selanjutnya adalah penambahan *stocking gel* dan setelah itu dimasukkan *comb* dan ditunggu sampai betul-betul set. *Comb* kemudian diambil dan dicuci dengan aquades untuk selanjutnya diberi bufer.

Sampel yang sudah dicampur dengan bufer lisis I/II dipanaskan 65°C, kemudian 10 μl sampel dimasukkan ke lubang. *Power supply* dinyalakan dengan kekuatan 30 mA selama 5 jam dan jika gel sudah sampai ke bawah kemudian dimatikan. *Plate* dibuka dan dipisahkan, selanjutnya dicuci dengan bufer.

Protein gel kemudian ditransfer ke kertas nitroselulose (PUDF) dengan cara memotong kertas Whatman dan PUDF sesuai dengan besarnya gel. Kertas PUDF diinkubasi pada anode bufer II, kemudian disusun 6 sheet kertas absorben dari bufer I, 3 sheet dari bufer II, PUDF dan polyacrylamid dan 6 sheet pada katode bufer. Selanjutnya diberi aliran listrik 0,8 mA/cm^2 dari gel. Setelah protein ditransfer, PUDF dicuci dengan aquades dan larutan TBS, untuk kemudian, untuk kemudian di-*blotting* (Rantam, 1997).

ADLN-Perpustakaan Universitas Airlangga

4.3.2 *Blotting*

PUDF *blot* diblok dengan 10 % BSA kemudian dicuci dengan larutan TBS dua kali. Direaksikan dengan antibodi monoklonal dan sebagai kontrol direaksikan dengan HMAF. PUDF diinkubasi pada suhu ruang, dicuci dengan larutan TBS tiga kali, kemudian ditambahkan konjugat *anti-mouse* yang dilabel alkalin fosfatase dan substrat 4-NPP dan diwarnai dengan *fast red*. Akhirnya dikeringkan di udara pada suhu ruang. Dari hasil ini kemudian ditentukan protein spesifik, berat molekul protein dan seterusnya dilakukan isolasi protein (Rantam, 1997).

4.4 Isolasi Protein

Isolasi protein dilakukan dengan teknik kromatografi. Isolasi protein dengan teknik ini terdapat tiga tahap, meliputi: 1) preparasi matriks antibodi; 2) pengikatan antigen pada matriks antibodi; dan 3) elusi antigen (Harlow and Lane, 1988).

4.4.1 Preparasi matriks antibodi

Langkah-langkah yang dilakukan pada preparasi matriks antibodi (matriks-Ab) ini adalah sebagai berikut:

- Antibodi dicampurkan kepada protein A. Antibodi dicampur dengan *beads* protein A, inkubasi pada suhu ruang 1 jam. Campuran Ab dimasukkan ke dalam kolom yang mengandung *beads* maka akan terbentuk gradien konsentrasi Ab.
- Cuci *beads* 2 x dengan 10 volume 0,2 M sodium borate pH 9 kemudian disentrifugasi 3000 G selama 5 menit.
- *Beads* diresuspensi ke dalam 10 volume 0,2 M sodium borate dan dipindahkan 10 µl *beads* tambahkan dimetilpimelimidat secukupnya sampai konsentrasi akhir mencapai 20 mmol.
- Kemudian dicampur dengan bantuan *shaker* selama 30 menit pada suhu ruang, dipindahkan sebanyak 10 µl ke dalam *coupled beads*.

- Stop reaksi dengan mencuci *beads* dengan 0,2 M etanolamin pH 8 satu kali dan diinkubasi 2 jam pada suhu ruang dengan cara diaduk.
- Setelah pencucian terakhir *beads* diresuspensi dalam PBS dengan 0,01% mertiolat.
- Kemudian dilakukan pengecekkan efisiensi coupling dari *beads* dengan teknik SDS-PAGE.

4.4.2 Pengikatan antigen pada matriks antibodi

Langkah-langkah yang dilakukan untuk mengikatkan antigen (Ag) pada matriks antibodi (matriks-Ab) adalah sebagai berikut:

- Antigen L2 *Toxocara vitulorum* dicampur dengan Ab-*beads*.
- Kemudian diinkubasi pada suhu 4°C 1 jam dengan pengadukan konstan selama satu malam.
- Pengadukan dihentikan.
- Bufer yang terikat dengan aspirasi sebagian besar dipindahkan, kemudian ditambahkan bufer *binding* dalam kondisi dingin ke dalam volume semula. Ambil *beads* masukkan ke dalam suspensi selama beberapa detik. Dilakukan gravitasi pada suhu 4°C, kemudian sebagian besar bufer pencuci dipindahkan dengan aspirasi.
- *Beads* ditransfer ke dalam kolom cuci dengan 20 *bed* volume bufer *binding*.
- Kolom siap dilakukan proses elusi.

4.4.3 Elusi antigen

Langkah-langkah yang dilakukan untuk elusi antigen (Ag) adalah sebagai berikut:

- Kolom dicuci dengan memasukkan 10 *bed* volume ke dalam kolom.
- Kemudian masing-masing fraksi dikumpulkan ke dalam tabung terpisah. Gradien elusi dicuci dengan memasukkan buffer elusion ke dalam kolom.
- Keberadaan antigen dicek dengan teknik SDS-PAGE.

ADLN-Perpustakaan Universitas Airlangga

4.5 Uji Serologis Terhadap Protein Spesifik yang Dihasilkan

Dlakukan pengambilan darah sapi muda (pedet) dari dua kelompok pedet terinfeksi *T. vitulorum* dan yang tidak terinfeksi masing-masing sebanyak 10 ekor. Untuk memastikan kondisi pedet terinfeksi atau bebas infeksi *T. vitulorum* dilakukan pemeriksaan feses dengan metode formol ether. Serum kemudian dipisahkan untuk pemeriksaan antibodi dengan uji *indirect*-ELISA dengan menggunakan bahan uji protein antigen spesifik hasil isolasi dari L2 *T. vitulorum*.

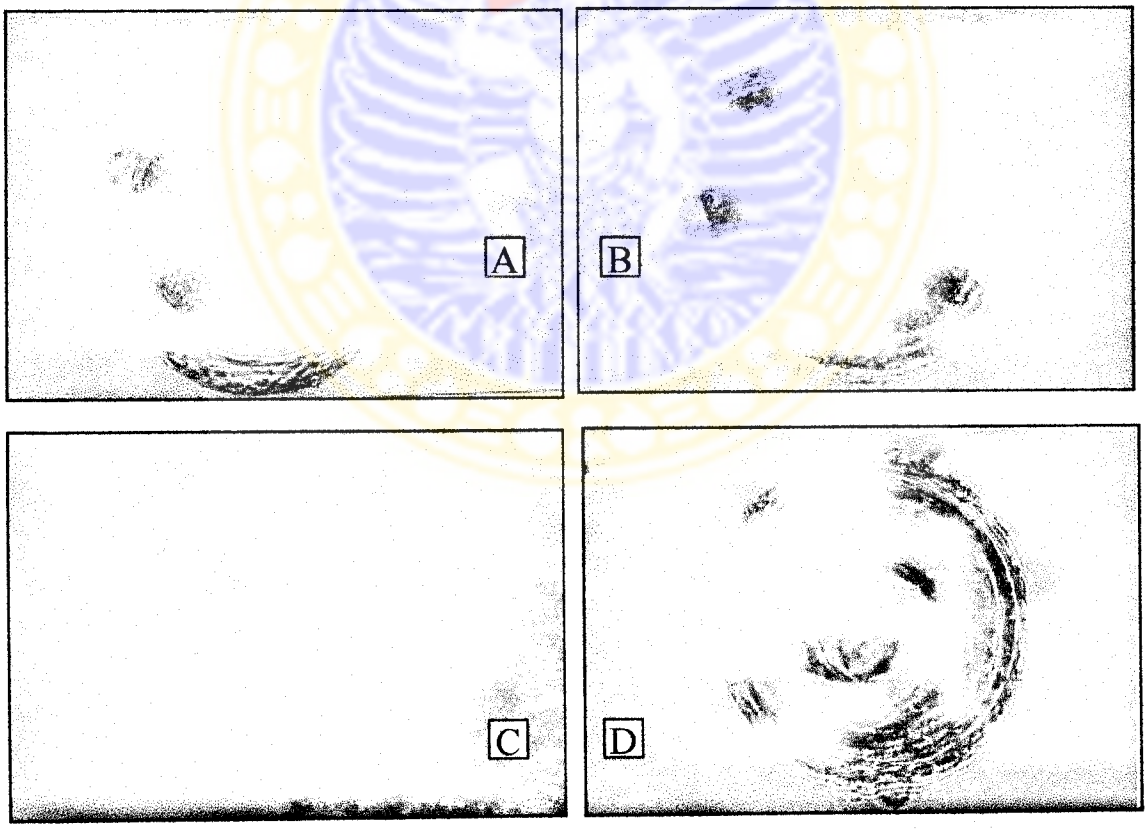
ADLN-Perpustakaan Universitas Airlangga

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

BAB V
HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Isolasi Larva Stadium Kedua (L2) *T. vitulorum*

Untuk mememperoleh L2 *T. vitulorum* pada penelitian ini dilakukan isolasi telur cacing baik dari inkubasi cacing dewasa maupun dari feses pedet penderita toxocariasis. Telur kemudian dimurnikan dari jaringan dan feses dengan metode preparasi gradien, selanjutnya dipupuk dalam petridish berisi media PBS pada suhu kamar. Perkembangan telur hingga mencapai L2 diikuti dengan memeriksa dengan mikroskop inverted (M=100x dan 400x). Dua puluh delapan hari pasca pemupukan dilakukan pemanenan L2, seperti tampak pada Gambar 5.1.



Gambar 5.1 Hasil identifikasi telur cacing *T. vitulorum* dan perkembangannya hingga mencapai L2. A=1 sel, B=8 sel, C=L1, dan D=L2.

Gambar 5.1 menunjukkan perkembangan telur cacing *T. vitulorum* mulai dari tahap 1 sel hingga L2. Perkembangan telur hingga mencapai L1 membutuhkan waktu 7-8 hari, sedangkan L2 terbentuk pada hari ke-21 hingga hari ke-28 (Kusumamihardja, 1986; Soulsby, 1986). Telur cacing dinyatakan infektif apabila telur tersebut sudah berisi L2 hidup, yang perkembangannya dipengaruhi oleh keadaan lingkungan misalnya suhu dan kelembaban.

5.2 Pembuatan Ekstrak (*Whole Extract*) L2

Pembuatan ekstrak L2 dilakukan dengan sonikasi dengan waktu 3 kali 30 detik, pada sonikasi pertama didapatkan hasil yang kurang memuaskan karena kadar L2 kurang mencukupi dan apabila sonikasi hanya dilakukan satu kali maka L2 yang hancur ±70% sehingga perlu dilakukan sonikasi kedua. Sonikasi kedua dengan kadar L2 yang lebih tinggi dibanding sonikasi pertama. Setelah dilakukan sonikasi, ekstrak L2 kemudian disentrifugasi pada kecepatan 2000 rpm selama 5 menit, kemudain supernatan dan pelet dipisahkan dan keduaduanya dilakukan analisis protein untuk dilihat hasil yang terbaik. Pelet kemudian dikumpulkan dan silakukan sonikasi ulang, ternyata setelah diperiksa secara mikroskopis hasilnya jauh lebih baik. Artinya L2 yang hancur lebih banyak, yaitu lebih dari 95%.

Setelah ekstrak diperoleh dilakukan pengukuran kadar protein dengan teknik eletrokromatografi. Hal ini terutama dilakukan terhadap ekstrak yang menunjukkan hasil baik pada analisis protein dengan SDS-PAGE, yaitu supernatan dari sonikasi kedua. Hasil yang diperoleh adalah sebesar 606,5 μg/ml, hasil ini digunakan sebagai dasar penentuan dosis imunisasi pada pembuatan antibodi poliklonal dan pengenceran antigen pada uji ELISA.

5.3 Produksi Antibodi Poliklonal Anti-L2 *T. vitulorum* pada Kelinci

Untuk mengetahui imunogenesitas protein antigen L2 *T. vitulorum* dan memenuhi kebutuhan antibodi anti-L2 *T. vitulorum* untuk karakterisari protein dengan teknik

Western blott, maka dilakukan infeksi buatan dan imunisasi pada kelinci sebanyak tiga kali. Setelah enam minggu pasca imunisasi pertama dilakukan pengambilan serum darah kelinci dan dilakukan uji *indirect*-ELISA terhadap serum tersebut dengan menggunakan antigen L2 *T. vitulorum*. Adapun hasil pemeriksaan antibodi dengan uji indirect-ELISA dinyatakan dengan nilai optical density (OD) seperti terlihat pada Tabel 5.1 dan Lampiran 1.

Tabel 5.1. Nilai OD Serum Darah Kelinci Setelah Diinfeksi dengan L2 *T. vitulorum* maupun Diimunisasi dengan Protein Antigen L2 *T. vitulorum*

No. Kelinci	Nilai OD		
	Kontrol (Injeksi dg PBS)	Infeksi buatan	Imunisasi
1	0,328	1,742	1,493
2	0,124	1,740	1,452
3	0,197	1,736	1,441
4	-	1,724	1,453
Rata-rata ± SD	$0,216^{a} \pm 0,103$	$1,736^{b} \pm 0,008$	$1,460^{c} \pm 0,023$

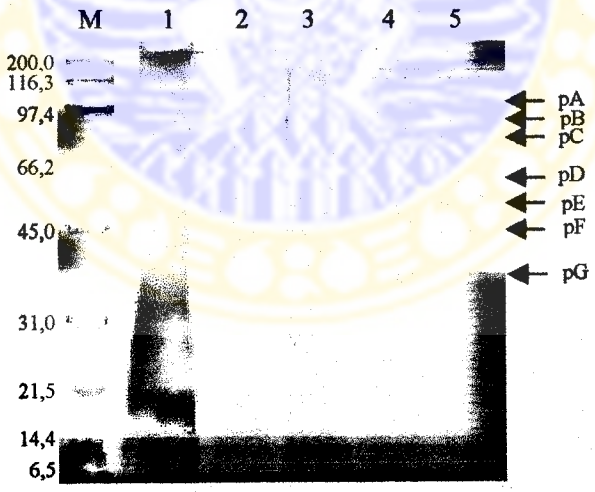
a, b superskrip berbeda pada baris sama menunjukkan perbedaan nyata ($p < 0,05$)

5.3 Analisis Protein dari L2 *T. vitulorum*

Untuk mengetahui berat molekul (BM) protein antigen L2 *T. vitulorum* pada penelitian ini, dilakukan preparasi protein dengan tehnik SDS-PAGE. *Whole extract* L2 hasil sonikasi pertama, kedua dan ketiga baik supernatan maupun peletnya dilakukan analisis protein. Hasil analisis protein selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 5.2.

Gambar 5.2 menunjukkan bahwa hasil preparasi protein didapatkan pita-pita protein berturut-turut dari atas ke bawah adalah protein pA, pB, pC, pD, pE, pF dan pG. Protein pA terletak antara marker dengan BM 97,4-116,3 kDa sesuai perhitungan menggunakan linier regresi antara nilai Rf dan log BM (Da), pA diperkirakan pada BM 112,7 kDa. Di bawah pita protein pA terdapat dua pita protein yaitu pB dan pC yang terletak antara marker dengan BM 66,2-97,4 kDa, pB dan pC diperkirakan masing-

masing pada BM 96,6 kDa dan 85,1 kDa. Di bawah protein pC terlihat dua pita protein yaitu pD dan pE yang berada di antara marker dengan BM 45,0-66,2 kDa, pD dan pE diperkirakan masing-masing pada BM 65,9 kDa dan 55,1 kDa. Paling bawah terdapat dua pita protein, yaitu pF dan pG yang terletak pada marker dengan BM 31,0-45,0 kDa, pF dan pG diperkirakan masing-masing pada BM 44,9 kDa dan 34,8 kDa. Dari ketujuh jenis protein tersebut protein pE terlihat lebih dominan diantara protein lainnya, kemudian diikuti pG dan pB, sementara protein pA, pC, pD dan pF terlihat diekspresikan dengan bentuk yang lebih tipis dan intensitas warna yang berkurang. Hal ini menunjukkan perbedaan secara genetik di antara protein-protein tersebut. Tung *et al.* (1995) menyatakan bahwa, meskipun berat molekul sama tetapi bila ekspresinya terdapat perbedaan, maka secara genetik terdapat perbedaan pula. Namun demikian untuk mengetahui spesifisitas protein antigen tersebut masih memerlukan karakterisasi protein dengan teknik *Western blot*.



Gambar 5.2 Hasil analisis protein L2 *T. vitulorum* dengan SDS-PAGE. M: marker, kolom 1, ekstrak L2 supernatan sonikasi ke-3; kolom 2, ekstrak L2 supernatan + pelet; kolom 3, ekstrak L2 supernatan sonikasi 1+2+3; kolom 4, ekstrak L2 supernatan sonikasi ke-2; dan kolom 5, ekstrak L2 pelet.

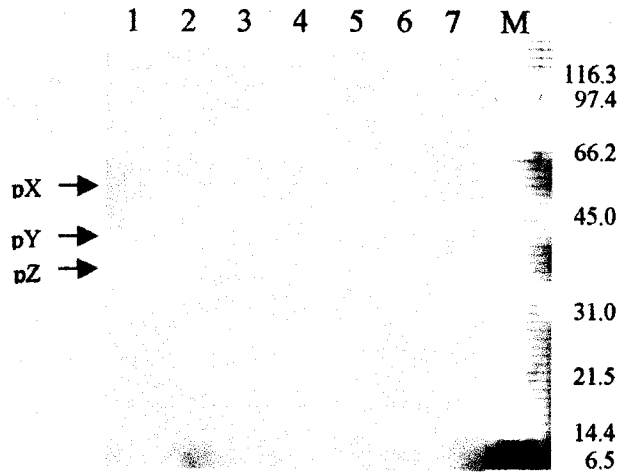
ADLN-Perpustakaan Universitas Airlangga

Apabila diamati berdasarkan jenis antigen yang digunakan dapat dinyatakan bahwa antigen pada kolom 2, yaitu ekstrak L2 setelah disonikasi kemudian disentrifugasi dan diambil supernatannya, pelet kemudian disonikasi ulang selanjutnya disentrifugasi lagi. Supernatan dari sonikasi pelet diambil dan ditambahkan pada supernatan sonikasi pertama. Ini tampak memberikan hasil yang lebih baik, hal ini ada hubungannya dengan jumlah L2 yang hancur saat sonikasi pertama masih sedikit, sedangkan pada sonikasi ulang L2 yang hancur hampir 100%. Di samping itu, konsentrasi L2 yang dipakai sebaiknya diusahakan sepekat mungkin. Kemurnian L2 juga mempengaruhi kualitas protein antigen yang digunakan. Apabila protein yang digunakan masih terlihat keruh karena masih banyak jaringan atau kotoran, maka akan menghasilkan pita protein yang tidak baik, hal ini tampak pada kolom 1 yaitu pada sonikasi ketiga dengan hasil yang lebih gelap sehingga pita protein yang terbentuk tidak terbaca.

5.4 Karakterisasi Protein

Hasil identifikasi protein dengan teknik *Western blott* menggunakan antibodi poliklonal anti Larva kedua (L2) *T. vitulorum* dapat dikarakterisasi masing-masing protein yang telah berhasil dipreparasi seperti tampak pada Gambar 5.3.

Dari Gambar 5.3 dapat terlihat bahwa pita protein antigen L2 yang spesifik terhadap antibodi poliklonal anti L2 terdapat dua pita protein yaitu pX dan pY pada kolom 1 dan 2 masing-masing diperkirakan pada BM 55,1 kDa dan 44,9. Pada cacing dewasa *T. vitulorum* juga terdapat dua pita reaksi silang, seperti tampak pada kolom 7 yaitu pada pY dan pZ, masing-masing diperkirakan pada BM 44,9 kDa dan 34,8. Oleh karena itu dapat dinyatakan bahwa protein antigen L2 dengan BM sekitar 55,1 kDa, 44.9 kDa dan 34,8 kDa kemungkinan merupakan protein spesifik yang dapat dimanfaatkan sebagai atigen diagnostik.



Gambar 5.3 Hasil karakterisasi protein antigen L2 *T. vitulorum* dengan teknik *Western blott.* M, marker; kolom 1 dan 2, ekstrak L2 *T. vitulorum* dengan pengenceran 3:1; kolom 3 dan 4, ekstrak L2 *T. vitulorum* dengan pengenceran 2:1; kolom 5, ekstrak L2 *T. vitulorum* dengan pengenceran 1:1; kolom 6 dan 7, ekstrak cacing dewasa *T. vitulorum* dengan pengenceran 1:1.

5.4 Analisis Protein dari Hasil Elusi

Berdasarkan hasil preparasi protein dengan teknik SDS-PAGE telah dilakukan isolasi protein, kemudian masing-masing hasil isolasi dilakukan SDS-PAGE kembali. Hasil analisis protein antigen L2 *T.vitulorum* yang dofokuskan pada protein dengan BM 55,1 kDa, 44,9 kDa dan 34,8 kDa ditampilkan pada Gambar 5.4.

Gambar 5.4 Hasil isolasi protein antigen L2 *T. vitulorum* yang diuji kembali dengan SDS-PAGE. M, marker; Kolom 1 dan 2, pX, kolom 3-5, pY; dan kolom 6-8, pZ.

ADLN-Perpustakaan Universitas Airlangga

Pada Gambar 5.4 protein pX dengan BM 55,1 kDa tampak lebih dominan daripada pY dan pZ masing-masing dengan BM 44,9 kDa dan 34,8 kDa. Perbedaan ini menunjukkan perbedaan secara genetik di antara protein-protein tersebut, karena meskipun berat molekul sama tetapi bila ekspresinya terdapat perbedaan, maka secara genetik terdapat perbedaan pula (Tung *et al.*, 1995). Berdasarkan hasil penelitian ini fraksi protein antigen dengan BM 55,1 kDa, 44,9 kDa, dan 34,8 kDa berpeluang untuk digunakan sebagai bahan diagnostik yang spesisik. Abdel-Rahman (2000) menyatakan bahwa, purifikasi protein antigen akan meningkatkan spesifisitas dibanding dengan *crude extract*. Lebih lanjut dinyatakan bahwa isolat fraksi protein yang didapatkan mempunyai potensi untuk digunakan sebagai bahan diagnostik dengan angka sessitivitas sebesar 100%. Bahkan Barriga and Omar (1992) menyatakan bahwa, kemungkinan empat protein antigen dari telur berembrio (mengandung L2) dengan BM antara 32,5-41,0 kDa mempunyai hubungan dengan proteksi pada hospes.

BAB VI
KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang baru diselesaikan sekitar 90%, maka dapat disimpulkan bahwa :

1) Telah berhasil diketahui fraksi protein antigen L2 *T. vitulorum*, yaitu pada BM 34,8 kDa, 44,9 kDa, 55,1 kDa, 65,9 kDa, 85,1 kDa, 96,6 kDa dan 112,7 kDa.
2) Imunogenesitas protein antigen L2 *T. vitulorum*, yang dinyatakan dengan nilai *optical density* (OD), lebih tinggi ($p<0,01$) dibanding serum kontrol.
3) Hasil identifikasi protein dengan teknik *Western blott* menunjukkan protein spesifik yaitu diperkirakan pada BM 34,8 kDa, 44,9 kDa, dan 55,1 kDa.
4) Telah berhasil diisolasi tiga fraksi protein spesifik L2 *T. vitulorum* yaitu diperkirakan pada BM 34,8 kDa, 44,9 kDa, dan 55,1 kDa.

6.2 Saran

Dari hasil penelitian ini masih perlu dilanjutkan pengujian untuk mengetahui imunogenesitas masing-masing protein murni yang telah berhasil diisolasi dari L2 *Toxocara vitulorum* serta dilanjutkan dengan produksi antibodi monoklonal untuk meningkatkan sensitifitas dan spesifisitas uji yang lebih tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. 2000. Cellular and Mollecular Immunology. 4th ed. Saunders Company. Philadelphia

Abdel-Rahman EH. 2000. Isolation and structural characterization of *Toxocara vitulorum* specific antigen and its potency in diagnosis of toxocariasis among buffalo calves. J Egypt Soc Parasitol, Aug;30(2):387-400

Ajayi OO, Duhlinska DD, Agwale SM, Njoku M. 2000. Frequency of human toxocariasis in Jos, Plateau State, Nigeria. Mem Inst Oswaldo Cruz; 95(2): 147-9

Alonso JM, Bojanich MV, Chamarro M. Gorodner JO. 2000. Toxocara seroprevalence in children from a subtropical city in Argentina. Abstract. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paolo. 42(4): 235-7

Amin HI, McDonald HR, Han DP, Jaffe GJ, Johnson MW, Lewis H, Lopez PF, Mieler F, Neuwirth J, Sternberg P Jr, Werner JC, Ai E, Johnson RN. 2000. Vitrectomy update for macular traction in ocular toxocariasis. Retina; 20(1):80-5

Bambell FWR. 1970. Transmission of passive immunity from mother to young. Amsterdam: North Holland Publishing & Co. pp: 158-159.

Barriga OO. and Omar HM. 1992. Immunity to *Toxocara vitulorum* repeated infections in a rabbit model. Vet Immunol Immunopathol. Aug;33(3):249-60

Beer SA, Novosil'tsev GI, and Mel'nikova LI. 1999. The role of the water factor in dissemination of Toxocara eggs and the spread of toxocariasis in a megalopolis. Parazitologiia. 33(2): 129-35

Brandon MR, and Lascelles AK. 1971. Relative efficiency of absorbtion Ig G1, Ig G2 and Ig M in the newborn calf. Aust.J.Exp.Biol. Med.Sci. 49: 629-633.

Chappell H, and Haeney M. 1992. Essential of Clinical Immunology. Mellbouerne. pp. 65

DrenchRite. 1996. Larval Development Assay. A product of Csiro reseach. Horizon Technology Pty Limited. Roseville, Australia.

Glickman LT, Dubey JP, Winslow LJ. 1981. Serological responses of *Ascarids* free dog to *Toxocara canis* infection. J.Parasitol. 82: 382-387

Goffette S, Jeanjean AP, Duprez TP, Bigaignon G, Sindic CJ. 2000. Eosinophilic pleocytosis and myelitis related to Toxocara canis infection. Eur J Neurol. Nov;7(6):703-6

Gunawan M, dan Putra AAG. 1981. Survailen sapi Bali di Bali *Neoascaris vitulorum* pada pedet. Dalam: Laporan Tahunan Hasil Penyidikan Penyakit Hewan di Indonesia. Periode tahun 1978-1981. Halaman 7-15

Harlow EN and Lane D. 1988. Antibodies. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laboratory. USA.

Havasiova-Reiterova K, Tomasovicova O, and Dubinsky P. 1995. Effect of various doses of infective *Toxocara canis* and *Toxocara cati* eggs on humoral renponse and distribution of larvae in mice. Parasitol. Res. 81(1): 13-7.

Hubner J, Uhlikova M, Leissova M. 2001. Diagnosis of the early phase of larval toxocariasis using IgG avidity. Epidemiol Mikrobiol Imunol. Apr;50(2):67-70

Humbert P, Niezborala M, Salembier R, Aubin F, Piarroux R, Buchet S, and Barale T. 2000. Skin manifestations associated with toxocariasis: a case-control study. Dermatology; 201(3):230-4

Husband AJ, Brandon MR, and Lascelles AK. 1972. Absorbtion and endogenous production of immunoglobulin in calves. Aust J Exp Biol Med.Sci; 50: 490-498.

Ito K, Sakai K, Okajima T, Quchi K, Funakoshi A, Nishimura J, Ibayashi H, and Tsuji M. 1986. Three cases of visceral larva migrans due to ingestion of raw chickens or cow liver. Nihon Naikagaku Zassi. 75: 759-766

Kilpatrick ME. 1992. Toxocariasis. In: Tropical Medicine. 7th ed. London: W.B. Saunders Company; pp. 761-4

Kincekova J, Reiterova K, Dubinsky P. 1999. Larval toxocariasis and its clinical manifestation in childhood in the Slovak Republic. J Helminthol. 73(4): 323-8

Koesdarto S., Kusnoto, Uga S, Machfudz, Sri Mumpuni, and Puspitawati H. 1999. The prevalence of *Toxocara vitulorum* in dairy cows in Surabaya. Proceeding Seminar on Infectious Diseases in The Tropics. TDC Airlangga University, Surabaya. 46-49.

Koga K, Kasuya S, Handa Y, Keawvichit R, Wongworapat K, Khamboonruang C, and Ohtomo H. 1992. Agar plate method, a new stool examination method for the diagnosis of strongyloidiasis: Field applicability and sensitivity. J Parasitol., 78(1): 155-156

Kondo K. 1989. Toxocariasis. Saisin-Igaku. 44: 774-779.

Kusnoto, Suwarno, dan Juniastuti T. 2001. Imunogenitas suspensi homogenat berbagai stadium *Toxocara vitulorum* sebagai pemicu pembentukan antibodi pada mencit. Laporan Penelitian Dosen Muda. Lemlit, Universitas Airlangga, Surabaya.

Kusumamihardja S. 1993. Parasit dan Parasitosis pada Hewan Ternak dan Hewan Piaraan di Indonesia. PAU Bioteknologi, IPB, Bogor.

Levine ND. 1978. Texkbook of Veterinary Parasitology. Burgers Publishing Company. Ditertemahkan oleh: Ashadi G. 1990. Wardiarto Ed. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.

Lloyd S, and Soulsby EJL. 1987. Immunology of G.I. nematode of ruminants. In: Immune Responses in Parasitic Infections, Immunology, Immunopathology and Immunoprophylaxis. Vol I. Soulsby EJL. Ed. New York Academic Press; pp: 231-240

Manus DPM. 1986. Intermediary metabolism in parasitic helminth. In: Howell. Procc. Of the Sixth International Congress of Parasites. pp. 79-89.

Marx MB. 1991. Parasites, pets, and people. Abstract. Prim. Care. 18(1): 153-65

Matsumura K, Kazuta Y, Endo R, and Tanaka K. 1983. The Ig M antibody in relation to the parasite statues of Toxoczrz canis in dogs. Zentralblat Bacteriol. Microbiol. Hyg. A. 255: 402-405

Moreira-Silva SF, Pereira FE. 2000. Intestinal nematodes, Toxocara infection, and pyogenic liver abscess in children: a possible association.. J Trop Pediatr. Jun;46(3):167-72

Ozeretskovskaia NN. 2000. The organ pathology in the acute stage of tissue helminthiases: the role of eosinophilia of the blood and tissues, blood immunoglobulins E and G4 and immune response-inducing factors. Med Parazitol (Mosk). Jul-Sep;(3):3-8

Pandey VS, Hill DG, Hensman DG, and Baragwanath LC. 1990. *Toxocara vitulorum* in beef calves kept on effluent irrigated pastures in Zimbabwe. J. Vet. Parasitol. 35: 349-355.

Park SP, Huh S, Magnaval JF, Park I. 1999. A case of presumed ocular toxocariasis in a 28-year old woman. Korean J Ophthalmol. Dec;13(2):115-9

Park SP, Park I, Park HY, Lee SU, Huh S, and Magnaval JF. 2000. Five cases of ocular toxocariasis confirmed by serology. Korean J Parasitol. Dec;38(4):267-73

Pearse EJ and Sher A. 1990. immunity to helminth. In: Current Opinion Immunology. USA National Institute for Allergy and Infectious Diseases. 2: 235-379

Playfair JHL. 1992. Immunology at a Glance. 5th Ed. Blackwell Scientific Publications. University Press, Cambridge.

Pratiwi T, Cornelissen T, and Nasich. 1992. A parasitological study on the impact of Nematodes on the production of livestock in the limestone area of South Malang. Interdiciplinary Research J. Landbouw Agricultural University of Wageningen. The Netherlands.

Pratiwi T. 1997. Penetuan protein imunogen larva *Toxocara vitulorum*, sebagai usaha menemukan metode imunodiagnosis dini *Toxocariasis* pada induk sapi. Disertasi. Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Prunier F, Delepine S, Victor J, de Gentile L, Moreau C, Laporte J, Dupuis JM, Geslin P. 2001. Loffler's fibroblastic endocarditis. A report of a case complicating toxocarosis. Arch Mal Coeur Vaiss. Mar; 94(3):226-30

Radman NE, Archelli SM, Fonrouge RD, del V Guardis M, Linzitto OR. 2000. Human toxocarosis. Its seroprevalence in the city of La Plata. Mem Inst Oswaldo Cruz May-Jun;95(3):281-5

Rajapakse RPVJ. 1992. Immunological response of buffalo cows and calves to *Toxocara vitulorum* infection. Dissertation. Submiteed for the Degree of Doctor of Philosophy. University of Paradeniya. Sri Lanka.

Rantam FA. 1997. Bornavirus and cells culture. Isolation infections *Bornavirus* from human and animal and their characterization. Diss. Vet. Med. FV – Berlin.

Rayes AA, Teixeira D, Serufo JC, Nobre V, Antunes CM, Lambertucci JR. 2001. Human toxocariasis and pyogenic liver abscess: a possible association. Am J Gastroenterol. Feb;96(2):563-6

Robert JA. 1990. The eggs production of *Toxocara* infection in Asean buffalo. J.Parasitol. 37: 113-120.

Robert JA. 1990[b]. The life cycle of *Toxocara vitulorum* in Asian buffalo (*Bubalis bubalis*). Intern.J.Parasitol. 20(7): 853-840.

Robert JA. 1992. The persistence larvae of *Toxocara vitulorum* in the tissues of Asian buffalo cows. J Buffalo. Accepted for Publication.

Robert JA. 1993. *Toxocara vitulorum* in ruminant. Vet.Bullt. 63(6): 545-568.

Roitt I, Brostoff J, and Male D. 1998. Immunology. 4th ed. Mosby, Times Mirror International Publisers Limited. Barcelona, Spain.

Sadjjadi SM, Khosravi M, Mehrabani D, and Orya A. 2000. Seroprevalence of Toxocara infection in school children in Shiraz, Southern Iran. Abstract. J. Trop. Pediatr. 46(6): 327-30

Safar EH, el-Rifaei F, and Maklad KM. 1992. Protein chromatographic study on adult *Ascaris lumbricoides*, *Ascaris vitulorum* and *Toxocara canis*. J. Egypt. Soc. Parasitol. 22(1): 171-6

Savigny D. 1980. The cummunication of ELISA data from laboratory to clinician. J. of Immunoassay. 1(1): 105-128.

Schulze C, Rothuizen J, van Sluijs FJ, Hazewinkel HA, van den Ingh TS. 2000. Extrahepatic biliary atresia in a border collie. J Small Anim Pract . Jan;41(1):27-30

Soulsby EJL. 1986. Helminth, Arthropods and Protozoa of Domestic Animals. Bailliere Tindall and Cassell. London.

Soulsby EJL. 1989. Toxocariasis. Brit.Vet.J. 139: 471-475.

Starke WA, Machado RZ, Bechara GH, and Zocoller MC. 1996. Skin hypersensitivity test in buffaloes parasitized with *Toxocara vitulorum*. Vet Parasitol; 63(3-4): 283-90

Stites DP, Terr AI, Parlow TG. 1997. Medical Immunology. 9th Ed. A Simon & Schuster Company, Prentice-Hall International Inc. USA.

Taranto NJ, Passamonte L, Marinconz R, de Marzi MC, Cajal SP, and Malchiodi EL. 2000. Zoonotic parasitosis transmitted by dogs in Chaco Salteno, Argentina. Medicina (B Aires); 60(2): 217-20

Tung YC, Chang SF, Ko YC, Chen HY, and Lin KH. 1995. Comparison of the genetic variation in type I Dengue Virus isolates in Taiwan 1987-1992. Kaohsiung J. med. Sci. 11: 243-249.

Uga S, Matsumura T, Fujisawa K, Okubo K, Kataoka N, and Kondo K. 1990. incidence of seropositivity to Human Toxocariasis in Hyogo Prefecture, Japan, and Its posible role in ophthalmic disease. Jpn. J. Parasitol. 39(5): 500-502.

Warren KS. 1993. Immunology and molecular biology of parasit infections. Eidinburg, Blackwell Sc. Pp. 55.

Yoshida M, Shirao Y, Asai H, Nagase H, Nakamura H, Okazawa T, Kondo K, Takayanagi TH, Fujita K, Akao N. 1999. A retrospective study of ocular toxocariasis in Japan: correlation with antibody prevalence and ophthalmological findings of patients with uveitis. J Helminthol. Dec;73(4):357-61

Lampiran 1. Analisis Statistik Produksi Antibodi Poliklonal Kelinci

Summarize

Case Processing Summary[a]

	Cases					
	Included		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Nilai OD * Perlakuan	11	100.0%	0	.0%	11	100.0%

a. Limited to first 100 cases.

Case Summaries[a]

				Nilai OD
Perlakuan	Kontrol (Injeksi PBS)	1		.328
		2		.124
		3		.197
		Total	N	3
			Sum	.649
			Mean	.21633
			Std. Deviation	.103365
	Infeksi Buatan	1		1.742
		2		1.740
		3		1.736
		4		1.724
		Total	N	4
			Sum	6.942
			Mean	1.73550
			Std. Deviation	.008062
	Imunisasi protein Ag L2	1		1.493
		2		1.452
		3		1.441
		4		1.453
		Total	N	4
			Sum	5.839
			Mean	1.45975
			Std Deviation	.022824
	Total	N		11
		Sum		13.430
		Mean		1.22091
		Std. Deviation		.658638

a. Limited to first 100 cases.

Oneway

Descriptives

Nilai OD

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Minimum	Maximum
Kontrol (Injeksi PBS)	3	.21633	.103365	.059678	.124	.328
Infeksi Buatan	4	1.73550	.008062	.004031	1.724	1.742
Imunisasi protein Ag L2	4	1.45975	.022824	.011412	1.441	1.493
Total	11	1.22091	.658638	.198587	.124	1.742

ANOVA

Nilai OD

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4.315	2	2.157	746.318	.000
Within Groups	.023	8	.003		
Total	4.338	10			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Nilai OD

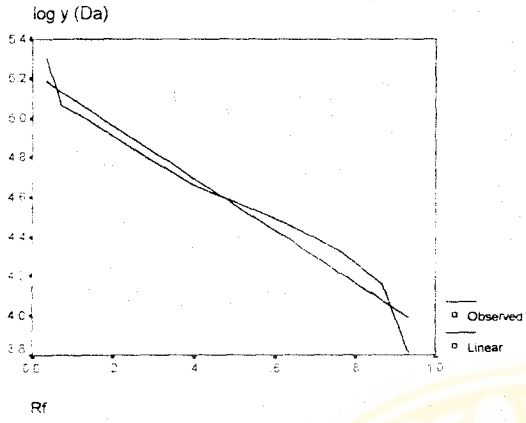
LSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Kontrol (Injeksi PBS)	Infeksi Buatan	-1.51917*	.041065	.000
	Imunisasi protein Ag L2	-1.24342*	.041065	.000
Infeksi Buatan	Kontrol (Injeksi PBS)	1.51917*	.041065	.000
	Imunisasi protein Ag L2	.27575*	.038018	.000
Imunisasi protein Ag L2	Kontrol (Injeksi PBS)	1.24342*	.041065	.000
	Infeksi Buatan	-.27575*	.038018	.000

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Lampiran 2. Analisis Linier Regresi untuk Menentukan BM pada SDS-PAGE Protein L2

Curve Fit



Regression

Variables Entered/Removed[b]

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	Rf[a]	.	Enter

a. All requested variables entered

b. Dependent Variable: log y (Da)

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.978[a]	.957	.951	.105336

a. Predictors: (Constant), Rf

ANOVA[b]

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	1.725	1	1.725	155.510	.000[a]
	Residual	.078	7	.011		
	Total	1.803	8			

a. Predictors: (Constant), Rf

b. Dependent Variable: log y (Da)

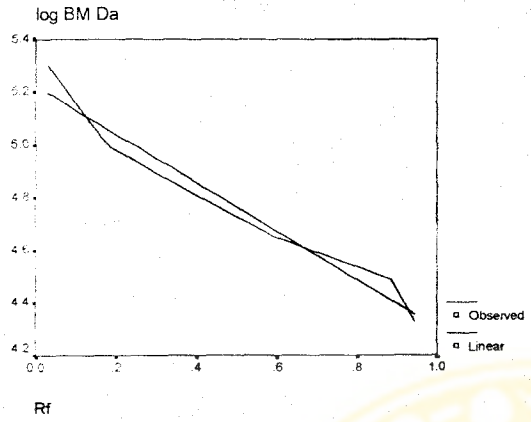
Coefficients[a]

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	5.230	.060		87.303	.000
	Rf	-1.334	.107	-.978	-12.470	.000

a. Dependent Variable: log y (Da)

Lampiran 3. Analisis Linier Regresi untuk Menentukan BM pada SDS-PAGE Hasil Elusi

Curve Fit



Regression

Variables Entered/Removed[b]

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	Rf[a]	.	Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: log BM Da

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.981[a]	.963	.956	.071706

a. Predictors: (Constant), Rf

ANOVA[b]

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	.668	1	.668	129.903	.000[a]
	Residual	.026	5	.005		
	Total	.694	6			

a. Predictors: (Constant), Rf

b. Dependent Variable: log BM Da

Coefficients[a]

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	5.222	.045		115.165	.000
	Rf	-.918	.081	-.981	-11.398	.000

a. Dependent Variable: log BM Da

PENGGUNAAN BEBERAPA MEDIA UNTUK PERKEMBANGAN TELUR CACING *Toxocara vitulorum* PADA PROSES PEMUPUKAN

ETIEK SULISTYAWATIE

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh beberapa media untuk perkembangan telur cacing *Toxocara vitulorum* pada proses pemupukan.

Telur cacing *Toxocara vitulorum* dimurnikan dengan teknik preparation of gradients (Drenchrite, 1996). Telur cacing tersebut kemudian dipupuk pada beberapa media untuk perkembangan. Desain percobaan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap yang terbagi menjadi lima perlakuan dan lima ulangan. Seluruh telur terdiri 100 butir sehingga dalam satu cawan petri terdapat 20 butir telur cacing *Toxocara vitulorum*. Data dianalisis menggunakan Analisis of Variance yang dilanjutkan uji Beda Nyata Terkecil dengan metode SPSS.

Pada perlakuan A menggunakan media NaCl fisiologis (PZ 0,9 %): Phospat Buffer Saline (PBSpH 7,6) dengan perbandingan 4 : 1, perlakuan B menggunakan media Aquadest steril sebagai kontrol, perlakuan C mengunakan media PZ 0,9 %, perlakuan D menggunakan media PBS dan perlakuan E menggunakan media agar. Pengamatan ini dilakukan setiap hari sampai terbentuk larva stadium II (L_2).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penggunaan media PBS, PZ 0,9 %, Aquadest steril, PBS : PZ (4 : 1) tidaklah berbeda. Namun sebaliknya, media agar berbeda dengan keempat media lain karena perkembangan telur cacing *Toxocara vitulorum* kurang baik pada media ini.

IMUNOGENITAS PROTEIN ANTIGEN LARVA STADIUM KEDUA *Toxocara vitulorum* PADA KELINCI

Nikmah Yasmin

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan menentukan imunogenitas protein antigen larva stadium kedua (L_2) *Toxocara vitulorum* baik dalam bentuk telur infektif maupun dalam bentuk ekstrak L_2.

Sejumlah 12 ekor kelinci betina dewasa (*Lepus europaeuns*) ras Angora dengan bobot badan rataan $\pm$ 5 kg. Disain percobaan yang digunakan adalah *The Posttest Only Control Group Design.* Data hasil pengujian ELISA tidak langsung yang diperoleh ditabulasi dan dianalisis dengan uji F.

Selama percobaan, kelinci dibagi menjadi tiga perlakuan yaitu, Po = Injeksi dengan PBS sebagai kontrol ; P_1 = Infeksi buatan dengan telur infektif (L_2) *Toxocara vitulorum* ; P_2 = imunisasi ekstrak L_2 *Toxocara vitulorum.* Pada P_0 kelinci hanya diinjeksi dengan PBS sebanyak 0,6 ml, P_1 diinfeksi buatan dengan telur infektif (L_2 aktif) *Toxocara vitulorum* sebanyak 1000 butir telur / ekor / oral ; P_2 di imunisasi dengan ekstrak L_2 *Toxocara vitulorum* yang ditambah *complete Freund adjuvant,* sebanyak 300µg / ekor / S.C. Pada P_1 dilakukan pengulangan infeksi buatan dengan dosis yang sama, sedangkan pada perlakuan kedua dilakukan pengulangan yang dilengkapi dengan *incomplete Freund adjuvant*, dengan dosis yang sama pula. Kedua pengulangan ini dilakukan pada minggu kedua.

Setelah menempuh empat minggu, ke 12 ekor kelinci tersebut diambil serum darahnya untuk di uji ELISA tidak langsung. Hasil dari uji ELISA berupa angka-angka yang menerangkan titer antibodi pada tiap-tiap kelinci, yang dinyatakan dengan nilai *optical density* (OD)

Hasil penelitian menunjukkan bahwa rata-rata nilai OD pada infeksi buatan lebih tinggi daripada imunisasi, atau dapat dikatakan pula imunogenitas protein antigen L2 *T. vitulorum* dalam bentuk telur infektif lebih tinggi daripada dalam bentuk ekstrak, selain itu tampak adanya perbedaan yang sangat nyata.

ADLN-Perpustakaan Universitas Airlangga

PROFIL PROTEIN ANTIGEN LARVA STADIUM KEDUA (L2) CACING *Toxocara vitulorum*

Maria Agustina Pricilla Rachmawati

ABSTRAK

Penelitian ini dilakukan untuk menjawab permasalahan : Bagaimanakah profil protein antigen larva stadium kedua (L2) cacing *T.vitulorum*, yang dinyatakan dalam berat molekul.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan dan mengetahui berat molekul protein antigen L2 *T.vitulorum* yang nantinya digunakan sebagai bahan untuk penelitian selanjutnya mengenai imunogenitas berbagai antigen L2 *T.vitulorum* pada kelinci, sehingga dapat diketehui sensitifitas dan spesifisitas tinggi untuk keperluan diagnosa toxocariasis.

Cacing dewasa dan feses diidentifikasi dan diisolasi dari pedet penderita *toxocariasis*, cacing dewasa diinkubasi pada suhu 37°C untuk mendapatkan telur cacing, sedangkan feses dimurnikan dengan menggunakan teknik *preparation of gradients* untuk mendapatkan telur cacing *T.vitulorum*. Setelah itu diinkubasi dengan menggunakan media PZ : PBS dengan perbandingan 4:1 sampai didapatkan L2 *T.vitulorum*. Ekstraksi protein menggunakan teknik sonikasi dan dilanjutkan dengan metode SDS-PAGE untuk mendeteksi fraksi protein antigen yang dinyatakan dengan berat molekul.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ada tujuh fraksi protein antigen dari larva stadium kedua cacing *Toxocara vitulorum* yaitu : 112,7 Da; 96,6 Da; 85,1 Da; 65,9 Da; 55 Da; 47,2 Da dan 34,7 Da.

ADLN-Perpustakaan Universitas Airlangga

PENGGUNAAN BEBERAPA MEDIA UNTUK PERKEMBANGAN TELUR CACING *Toxocara Vitulorum* PADA PROSES PEMUPUKAN

Oleh :

ETIEK SULISTYAWATIE
NIM. 069812582

Menyetujui
Komisi Pembimbing

(Prof. Dr. Sri Subekti,DEA, Drh)
Pembimbing Pertama

(Herry Agoes Hermadi,Msi,Drh)
Pembimbing Kedua

ADLN-Perpustakaan Universitas Airlangga

LEMBAR PENGESAHAN PROPOSAL

IMUNOGENITAS PROTEIN ANTIGEN LARVA STADIUM KEDUA *Toxocara vitulorum* PADA KELINCI

Oleh :

NIKMAH YASMIN

069812512

Menyetujui ,

Komisi Pembimbing

Poedji Hastutiek..M.S.,drh

Pembimbing pertama

Sri Mumpuni.S.,MKes.,drh

Pembimbing kedua

LEMBAR PENGESAHAN LAPORAN PENELITIAN

PROFIL PROTEIN ANTIGEN LARVA STADIUM KEDUA (L2)

CACING *Toxocara vitulorum*

Oleh :

MARIA AGUSTINA PRICILLA. R

069812568

Menyetujui,

Komisi Pembimbing

Prof. Dr. Sri Subekti, DEA., drh
Pembimbing pertama

Retno Sri Wahyuni, MS., drh
Pembimbing kedua