

Bidang Ilmu: Pertanian

Laporan Hasil Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi
Tahun Anggaran 2012



**DETEKSI SUBKELAS IMUNOGLOBULIN DALAM SERUM MENCIT
YANG DIINFEKSI *Toxocara cati* SEBAGAI BIOMARKER PADA
PEMERIKSAAN ANTIBODI DENGAN ELISA**

Oleh :

Prof. Dr. Sri Subekti Bendryman, DEA., drh.
Tutik Juniastuti, MKes., drh.

Dibiayai oleh DIPA Universitas Airlangga Sesuai dengan
Surat Keputusan Rektor Tentang Kegiatan Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi
Tahun Anggaran 2012 Nomor: 2613/H3/KR/2012 Tanggal 9 Maret 2012

Universitas Airlangga
2012

Bidang Ilmu: Pertanian

Laporan Hasil Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi
Tahun Anggaran 2012



**DETEKSI SUBKELAS IMUNOGLOBULIN DALAM SERUM MENCIT
YANG DIINFEKSI *Toxocara cati* SEBAGAI BIOMARKER PADA
PEMERIKSAAN ANTIBODI DENGAN ELISA**

Oleh :

**Prof. Dr. Sri Subekti Bendryman, DEA., drh.
Tutik Juniastuti, MKes., drh.**

Dibiayai oleh DIPA Universitas Airlangga Sesuai dengan
Surat Keputusan Rektor Tentang Kegiatan Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi
Tahun Anggaran 2012 Nomor: 2613/H3/KR/2012 Tanggal 9 Maret 2012

**Universitas Airlangga
2012**

HALAMAN PENGESAHAN

1. Judul Penelitian : Deteksi Subkelas Immunoglobulin dalam Serum Mencit yang Diinfeksi *Toxocara cati* sebagai Biomarker pada Pemeriksaan Antibodi dengan ELISA
2. Peneliti Utama
- a. Nama lengkap : Prof. Dr. Sri Subekti Bendryman, DEA., drh.
 - b. Jenis Kelamin : ~~Laki-laki~~ / Perempuan
 - c. N I P : 1952 05 17 1978 03 2 001
 - d. Pangkat / Golongan : Pembina Utama Madya / IV-D
 - e. Jabatan fungsional : Guru Besar
 - g. Bidang Keahlian : Ilmu Penyakit Parasit
 - f. Fakultas / Jurusan : Fakultas Kedokteran Hewan
 - h. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Tim Peneliti

No.	Nama Peneliti	Bidang Keahlian	Fakultas / Jurusan	Perguruan Tinggi
1.	Prof.Dr. Sri Subekti B., DEA.,drh.	Parasitologi	FKH	Universitas Airlangga
2.	Tutik Juniastuti, MKes., drh.	I. Ked. Dasar	FKH	Universitas Airlangga

3. Pendanaan dan Jangka Waktu Penelitian

- a. Jangka waktu penelitian yang diusulkan : 2 tahun (Tahun II)
- b. Biaya yang diusulkan : Rp60.000.000,00
- c. Biaya yang disetujui tahun ini : Rp30.000.000,00

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan

Prof. Hj. Romziah Sidik, drh., PhD.

NIP. 1953 12 16 1978 06 2 001

Surabaya, 30 Oktober 2012
Ketua Peneliti,

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

NIP.1952 05 17 1978 03 2 001

Mengetahui,
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat Universitas Airlangga

Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt., M.Si

NIP. 1959 08 05 1987 01 1 001

PROFIL IMUNOGLOBULIN SERUM MENCIT ANTI-PROTEIN SPESIFIK *Toxocara cati* SEBAGAI DASAR PEMILIHAN MARKER PADA PEMERIKSAAN ANTIBODI (Sri Subekti Bendryman dan Tutik Juniastuti; 74 halaman)

RINGKASAN

Penegakan diagnosis toxocariasis memerlukan uji dan bahan uji dengan sensitivitas dan spesifisitas tinggi. Spesifisitas bahan uji diperlukan mengingat banyak dijumpai protein yang tidak spesifik pada infeksi parasit. Penggunaan protein murni dari larva stadium kedua ditengarai dapat meningkatkan sensitivitas dan spesifisitas uji. Teknik ELISA memiliki sensitivitas tinggi yang dapat dikembangkan untuk diagnosis toxocariasis. Teknik ini diperlukan mengingat pada toxocariasis tidak selalu dapat dilakukan pemeriksaan feses (untuk menemukan telur cacing), karena bila cacing dewasa belum ditemukan pada hospes definitif atau bahkan tidak dapat ditemukan pada hospes *aberrant* (selain hospes definitif), maka telur cacing dalam feses juga tidak dapat ditemukan.

Penelitian ini secara umum bertujuan memperoleh protein spesifik *T. cati* dan mengetahui imunoglobulin spesifik yang dapat digunakan sebagai biomarker pada pembuatan *kit diagnostic* untuk diagnosis toxocariasis melalui pemeriksaan antibodi dengan teknik *indirect-ELISA*.

Pada penelitian ini dilakukan isolasi dan karakterisasi protein *T. cati* yang berasal dari material *excretory-secretory* (ES) larva stadium kedua (L2) dorman *T. cati* dengan cara mereaksikan protein murni dengan antibodi poliklonal. Pada tahap I, L2 dorman dihancurkan dengan sonikasi 3x30 detik dan diidentifikasi melalui SDS-PAGE dengan pewarnaan silver. Kedua, protein ditransfer ke membran nitroselulose menggunakan antibodi poliklonal anti-L2 dorman *T. cati* yang kemudian divisualisasikan melalui konjugat *goat-anti rabbit* dan pewarnaan *Western blue*. Ketiga, menentukan fraksi protein spesifik dilakukan berdasarkan pada berat molekul dan kemudian dilakukan isolasi protein spesifik dengan preparatif gel elektroforesis. Keempat mempelajari profil imunoglobulin sebagai respon terhadap infeksi *T. cati* pada mencit.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa: 1) Telah diketahui 19 macam fraksi protein *T. cati* dewasa, antara lain protein dengan MR 137,1; 125,0; 100,2; 84,3; 64,1; 53,8; 47,0; 45,2; 38,3; 34,0; 32,8; 29,4; 27,3; 23,9; 22,1; 20,6; 13,6; dan 9,1 kDa.

Sedangkan pada protein L2 dorman *T. cati* ditemukan beberapa protein antara lain dengan MR 134,5; 120,7; 70,5; 53,2; 42,3; 36,6; 35,4; 32,8; 30,8; 28,5; 27,5; 24,3; 21,3; 19,3; 18,3; 14,5; 12,2 dan 8,8 kDa; 2) Pada karakterisasi protein dengan *Western blot* didapatkan protein yang memiliki afinitas kuat terhadap antibodi anti-L2 dorman, yaitu protein L2 dan L2 dorman *T. cati* dengan MR 32,8; 28,5; 18,5 dan 8,8 kDa, sedangkan protein dengan MR 134,5 dan 120,7 tampak memiliki afinitas lemah. Pada *T. cati* dewasa terdapat 11 pita ikatan protein yaitu dengan MR 134,5; 120,7; 100,2; 53,8; 38,3; 32,8; 28,5; 23,9; 18,3; 13,6 dan 8,8 kDa; 3) Ditinjau dari nilai OD pada ELISA, protein murni *Toxocara cati* memiliki antigenisitas yang sama terhadap serum anti-*T. cati* dan anti-*T. canis*, tetapi memiliki antigenisitas yang lebih rendah terhadap cacing lain (*Ancylostoma* spp. dan *D. caninum*); 4) Berdasarkan hasil ELISA-isotyping, subkelas Ig G spesifik (dominan) dalam serum mencit yang diinfeksi dengan L2 *T. cati* adalah IgG2 β .

Berdasarkan karakter dari protein L2 dan L2 dorman *T. cati* dan daya antigeniknya terhadap antibodi secara spesifik, maka disarankan bahwa protein dengan MR 32,8, 28,5, 18,5 dan 8,8 kDa dapat digunakan sebagai bahan diagnostik terhadap kasus toxocariasis. Untuk itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mencoba membuktikan keempat protein tersebut sebagai bahan diagnostik pada kasus toxocariasis, baik pada infeksi dini maupun lanjut. Untuk meningkatkan nilai spesifisitas hasil pemeriksaan antibodi terhadap anti-*T. cati* dengan teknik ELISA, dapat digunakan subkelas Ig G sebagai antibodi ke-3, yaitu IgG2 β .

Dibiayai oleh DIPA Universitas Airlangga Sesuai dengan Surat Keputusan Rektor Tentang Kegiatan Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi, Tahun Anggaran 2012 Nomor: 2613/H3/KR/2012 Tanggal 9 Maret 2012

THE PROFILE OF MOUSE SERA IMMUNOGLOBULINE AGAINST SPECIFIC PROTEIN OF *Toxocara cati* AS A BASE OF MARKER CHOICE IN THE ANTIBODY EXAMINATION (Sri Subekti Bendryman and Tutik Juniastuti; 74 pages)

SUMMARY

The confirmation of Toxocariasis diagnosis needs a test and an material test with the high sensitivity and specificity. Specificity of material test is needed because a lot of protein were found, is not specificity to parasite infection. It is showed that using the pure protein from Larva II could increase sensitivity and specificity tests. ELISA technique has high sensitivity that could be improved to Toxocariasis diagnosis. This technique is needed because stool examination couldn't always be done to Toxocariasis diagnosis, if adult worm is not found yet in definitive host nor in aberrant host, therefore the egg worm is not found in feces.

The objective on this study was to get specific protein of *T cati* and to investigate specific immunoglobulin that could be used as biomarker in kit diagnostic to Toxocariasis diagnosis through antibody test by Indirect-ELISA technique.

In this study was done to isolate and characterize *T cati* protein from *excretory-excretory* (ES) material of Larva II dormant *T. cati* by pure protein that was reactive with polyclonal antibody. In first step, L2 dormant were homogenized by sonication 3X30 seconds and identified by SDS-PAGE with silver staining. The second step, protein was transferred to nitrocellulose membrane used polyclonal antibody of anti-L2 dormant of *T cati* that was visualized through goat-anti rabbit conjugate and Western blue staining. The third step was decided specific of protein fractions that was done base on molecule weight and specific protein was isolated by electrophoresis gel preparation. The fourth was to study immunoglobulin profile as response to *T cati* infection toward mice.

The result of the study showed that : 1). There were 19 kinds of protein fractions of *T cati* adult as follow with MR 137,1; 125,0; 100,2; 84,3; 64,1; 53,8; 47,0; 45,2; 38,3; 34,0; 32,8; 29,4; 27,3; 23,9; 22,1; 20,6; 13,6; and 9,1 kDa. From L2 protein dormant of *T cati* were found some protein as follow with MR 134,5; 120,7; 70,5; 53,2; 42,3; 36,6; 35,4; 32,8; 30,8; 28,5; 27,5; 24,3; 21,3; 19,3; 18,3; 14,5; 12,2 and 8,8 kDa; 2). Protein characterized by Western Blot were found protein which has strong affinity to anti-L2 dormant antibody of *T. cati* , that were L2-protein and L2

dormant of *T. cati* with MR 32,8; 28,5; 18,5; and 8,8 kDa, therefore protein with MR 134,5 and 120,7 showed weak affinity. In adult of *T. cati* were found 11 bands of protein bounds as follow with MR 134,5; 120,7; 100,2; 53,8; 38,3; 32,8; 28,5; 23,9; 18,3; 13,6 and 8,8 kDa. It's concluded that protein with MR 32,8; 28,5; 18,5 and 8,8 kDa have a prospect to improve as material test toward Toxocariasis cases; 3) Evaluated from OD value at ELISA, pure protein of *Toxocara cati* has the same antigenicity with anti-*T. cati* and anti-*T. canis* sera, but having lower antigenicity to other worm (*Ancylostoma* spp. and *D. caninum*); 4) Based on result of ELISA-Isotyping, specific G Ig subclass in white mouse serum infection with L2 *T. cati* is IgG2 β .

Based on character from protein L2 and L2 dorman *T. cati* and its the antigenicity against antibody in specifically, hence it is suggested that protein with MR 32,8, 28,5, 18,5 and 8,8 kDa serve the purpose of diagnostic material to case toxocariasis. For the purpose need to be done further research to try proves fourth of the protein as component of diagnostic at case toxocariasis, either at infection early and also continuation. Subclass of Ig G especially IgG2 β serve the purpose of third antibody to increase specificity value at antibody examination against anti-*T. cati* with ELISA technique.

Financed by DIPA Airlangga University As According To Rector Decree about Superior Research Activity of College, Year Budget 2012 Number: 2613/H3/KR/2012 Date of 9 March 2012

**PROFIL IMUNOGLOBULIN SERUM MENCIT ANTI-PROTEIN SPESIFIK
Toxocara cati SEBAGAI DASAR PEMILIHAN MARKER PADA
PEMERIKSAAN ANTIBODI**

Sri Subekti Bendryman dan Tutik Juniastuti

ABSTRAK

Penelitian ini secara umum bertujuan memperoleh protein spesifik *T. cati* dan mengetahui imunoglobulin spesifik yang dapat digunakan sebagai biomarker pada pembuatan *kit diagnostic* untuk diagnosis toxocariasis melalui pemeriksaan antibodi dengan teknik *indirect-ELISA*. Pada penelitian ini dilakukan isolasi dan karakterisasi protein *T. cati* yang berasal dari material *excretory-secretory* (ES) larva stadium kedua (L2) dorman *T. cati* dengan cara mereaksikan protein murni dengan antibodi poliklonal. Pada tahap I, dilakukan identifikasi protein menggunakan teknik SDS-PAGE dengan. Kedua, karakterisasi protein menggunakan teknik *Western blot*. Ketiga, isolasi protein spesifik. Keempat mempelajari profil imunoglobulin sebagai respon terhadap infeksi *T. cati* pada mencit.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa: 1) Telah diketahui 19 macam fraksi protein *T. cati*, antara lain protein dengan BM 137,1; 125,0; 100,2; 84,3; 64,1; 53,8; 47,0; 45,2; 38,3; 34,0; 32,8; 29,4; 27,3; 23,9; 22,1; 20,6; 13,6; dan 9,1 kDa. 2) Pada karakterisasi protein dengan *Western blot* didapatkan protein yang memiliki afinitas kuat terhadap antibodi anti-L2 dorman, yaitu protein L2 dan L2 dorman *T. cati* dengan MR 32,8; 28,5; 18,5 dan 8,8 kDa, sedangkan protein dengan MR 134,5 dan 120,7 tampak memiliki afinitas lemah. Pada *T. cati* dewasa terdapat 11 pita ikatan protein yaitu dengan MR 134,5; 120,7; 100,2; 53,8; 38,3; 32,8; 28,5; 23,9; 18,3; 13,6 dan 8,8 kDa; 3) Ditinjau dari nilai OD pada ELISA, protein murni *Toxocara cati* memiliki antigenisitas yang sama terhadap serum anti-*T. cati* dan anti-*T. canis*, tetapi memiliki antigenisitas yang lebih rendah terhadap cacing lain (*Ancylostoma* spp. dan *D. caninum*); 4) Berdasarkan hasil ELISA-*isotyping*, subkelas Ig G spesifik (dominan) dalam serum mencit yang diinfeksi dengan L2 *T. cati* adalah IgG2 β .

Berdasarkan karakter dari protein L2 dan L2 dorman *T. cati* dan daya antigeniknya terhadap antibodi secara spesifik, maka disarankan bahwa protein dengan MR 32,8, 28,5, 18,5 dan 8,8 kDa dapat digunakan sebagai bahan diagnostik terhadap kasus toxocariasis. Untuk meningkatkan nilai spesifisitas hasil pemeriksaan antibodi terhadap anti-*T. cati* dengan teknik ELISA, dapat digunakan subkelas Ig G sebagai antibodi ke-3, yaitu IgG2 β .

Key words: diagnosis, toxocariasis, subkelas IgG, protein spesifik, ELISA.

THE PROFILE OF MOUSE SERA IMUNOGLOBULINE AGAINST SPECIFIC PROTEIN OF *Toxocara cati* AS A BASE OF MARKER CHOICE IN THE ANTIBODY EXAMINATION

Sri Subekti Bendryman and Tutik Juniastuti

ABSTRACT

The objective on this study was to get specific protein of *T. cati* and to investigate specific immunoglobulin that could be used as biomarker in kit diagnostic to Toxocariasis diagnosis through antibody test by Indirect-ELISA technique.

In this study was done to isolate and characterize *T. cati* protein from excretory-excretory (ES) material of Larva II dormant *T. cati* by pure protein that was reactive with polyclonal antibody. In first step, L2 dormant were identified by SDS-PAGE. The second step, protein was characterized by using Western blot. The third step was decided specificity of protein fractions and specific protein was isolated. The fourth was to study immunoglobulin profile as response to *T. cati* infection toward mice.

The result of the study showed that : 1). There were 19 kinds of protein fractions of *T. cati* as follow with MR 137,1; 125,0; 100,2; 84,3; 64,1; 53,8; 47,0; 45,2; 38,3; 34,0; 32,8; 29,4; 27,3; 23,9; 22,1; 20,6; 13,6; and 9,1 kDa; 2). Protein characterized by Western Blot were found protein which has strong affinity to anti-L2 dormant antibody of *T. cati*, that were L2-protein and L2 dormant of *T. cati* with MR 32,8; 28,5; 18,5; and 8,8 kDa, therefore protein with MR 134,5 and 120,7 showed weak affinity. In adult of *T. cati* were found 11 bands of protein bounds as follow with MR 134,5; 120,7; 100,2; 53,8; 38,3; 32,8; 28,5; 23,9; 18,3; 13,6 and 8,8 kDa. It's concluded that protein with MR 32,8; 28,5; 18,5 and 8,8 kDa have a prospect to improve as material test toward Toxocariasis cases; 3) Evaluated from OD value at ELISA, pure protein of *Toxocara cati* has the same antigenicity with anti-*T. cati* and anti-*T. canis* sera, but having lower antigenicity to other worm (*Ancylostoma* spp. and *D. caninum*); 4) Based on result of ELISA-Isotyping, specific G Ig subclass in white mouse serum infection with L2 *T. cati* is IgG2 β .

Based on character from protein L2 and L2 dormant *T. cati* and its the antigenicity against antibody in specifically, hence it is suggested that protein with MR 32,8, 28,5, 18,5 and 8,8 kDa serve the purpose of diagnostic material to case toxocariasis. For the purpose need to be done further research to try proves fourth of the protein as component of diagnostic at case toxocariasis, either at infection early and also continuation. Subclass of Ig G especially IgG2 β serve the purpose of third antibody to increase specificity value at antibody examination against anti-*T. cati* with ELISA technique.

Key words: diagnosis, toxocariasis, IgG subclass, specific protein, ELISA technique

PRAKATA

Beberapa uji serologis saat ini banyak diterapkan untuk menegakkan diagnosis terhadap kasus penyakit parasitik di Indonesia. Beberapa prosedur untuk diagnosis helminthiasis diantaranya menggunakan homogenat *whole worm extract*, material ES, telur maupun larva cacing atau komponen darinya (protein murni) sebagai antigen pada pemeriksaan serologis. Spesifikasi antigen yang digunakan dalam mengikat antibodi penderita sangat menentukan sensitivitas dan spesifisitas dari uji tersebut. Dalam beberapa prosedur, penggunaan komponen dari ES, larva infeksi maupun larva dapat meningkatkan sensitivitas dan spesifisitas uji yang digunakan. Di pihak lain pada pemeriksaan serum untuk kasus helminthiasis juga diperlukan pengetahuan tentang imunoglobulin spesifik sebagai respon terhadap infeksi parasit yang dapat digunakan sebagai dasar pemilihan biomarker.

Penelitian ini dilakukan untuk isolasi dan karakterisasi protein beberapa sumber antigen khususnya L2 dan L2 dorman *Toxocara cati*. Dengan teknik SDS-PAGE yang dilanjutkan dengan *Western blot* dapat diketahui karakter dari protein *T. cati* tersebut, akhirnya dilakukan pengamatan terhadap imunoglobulin yang dibentuk oleh hospes sebagai respon terhadap infeksi *T. cati*.

Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional; Prof. Dr. H. Fasich, drs., Apt., selaku Rektor Universitas Airlangga; Prof. Dr. H. Sarmanu, drh. MS. dan Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt., M.Si., selaku mantan dan Ketua Lembaga Penelitian Unair; Prof. Dr. Hj. Romziah Sidik, drh., Ph.D. selaku Dekan FKH Unair; Dr. Nasronudin, dr., SpPD., K., PTI, selaku Ketua Tropical Disease Center Unair; Prof. Dr. Setiawan Koesdarto, drh., MSc. selaku Ketua Bagian Parasitologi FKH Unair dan semua pihak yang turut membantu dalam kegiatan penelitian ini dari awal hingga terselesainya laporan ini.

Akhirnya semoga penelitian ini dapat bermanfaat bagi yang membutuhkan informasi yang berkaitan dengan teknik isolasi dan karakterisasi protein spesifik maupun biomarker pada infeksi cacing khususnya toxocariasis. Penulis juga mengharap kritik dan saran demi kesempurnaan tulisan ini.

Surabaya, 1 Oktober 2012
Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
RINGKASAN.....	ii
SUMMARY	iv
ABSTRAK	vi
ABSTRACT	vii
PRAKATA	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Penelitian	1
1.2 Rumusan Masalah	7
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1 Hospes dan penyebab toxocariasis	8
2.2 Siklus hidup <i>Toxocara cati</i> dan Transmisi toxocariasis	8
2.3 Aspek Zoonosis Toxocariasis	10
2.4 Antigen Cacing <i>Toxocara</i> spp	11
2.5 Patogenesis Toxocariasis	14
2.6.1 <i>Visceral larvae migrans</i> (VLM)	14
2.6.2 <i>Ocular larvae migrans</i> (OLM)	16
2.6.3 Pembentukan jaringan granuloma dan larva dorman	16
2.6 Imunopatogenesis Toxocariasis	17
2.7 Diagnosis Toxocariasis	20
BAB 3 TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	21
3.1 Tujuan Penelitian	21
3.2 Manfaat Penelitian	21
BAB 4 METODE PENELITIAN	22
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian	22
4.2 Jenis dan Rancangan Penelitian	22

4.3	Klasifikasi Variabel	22
4.3.1	Variabel bebas	22
4.3.2	Variabel tergantung	22
4.3.3	Variabel kendali	23
4.4	Materi Penelitian	23
4.4.1	Unit analisis	23
4.4.2	Hewan percobaan	23
4.4.3	Bahan penelitian	23
4.5	Bahan penelitian	24
4.6	Prosedur Penelitian Tahun I	25
4.6.1	Sampel <i>Toxocara cati</i>	25
4.6.1.1	Isolasi cacing dewasa dan telur cacing	25
4.6.1.2	Isolasi larva stadium pertama (L1) dan L2	25
4.6.1.3	Isolasi larva stadium kedua (L2) dorman	25
4.6.1.4	Isolasi material <i>excretory-secretory</i> (ES).....	26
4.6.1.5	Pembuatan homogenat <i>Toxocara cati</i>	27
4.6.2	Analisis Protein dengan SDS-PAGE	27
4.6.3	Pembuatan Antibodi Poliklonal.....	28
4.6.4	Identifikasi Protein dengan <i>Western Blot</i>	29
4.7	Prosedur Penelitian Tahun II	29
4.7.1	Koleksi Cacing Dewasa <i>Toxocara</i> spp., <i>D. caninum</i> dan <i>Ancylostoma</i> spp. dan Pemupukan Telur Cacing untuk Mendapatkan L2 Infektif	29
4.7.2	Isolasi material <i>excretory-secretory</i> (ES) sbg Ag pd Ig G ELISA	30
4.7.3	Pembuatan Homogenat Cacing Dewasa	31
4.7.4	Isolasi dan Pembuatan homogenat L2D <i>T. cati</i>	31
4.7.5	Identifikasi Cacing <i>T. cati</i>	32
4.7.6	Pembuatan preparat permanen (Pewarnaan <i>Semichen- Acetic Carmine</i>).....	32
4.7.7	Perlakuan pada mencit (Imunisasi dan Infeksi)	34
4.8	Analisis Data	34
BAB 5	HASIL DAN PEMBAHASAN	36
5.1	Hasil Penelitian Tahun I	36

5.1.1 Hasil isolasi cacing <i>Toxocara cati</i>	36
5.1.2 Kadar Protein Homogenat Berbagai Stadium <i>T. cati</i>	39
5.1.3 Hasil analisis protein <i>T. cati</i>	40
5.1.4 Produksi Antibodi Poliklonal Anti- <i>T. cati</i> pada Kelinci ...	42
5.1.5 Hasil identifikasi protein <i>T. cati</i> dengan teknik <i>Western blot</i>	43
5.2 Hasil Penelitian Tahun II	47
5.2.1 Hasil Isolasi Cacing Dewasa	47
5.2.2 Identifikasi Cacing Dewasa <i>Toxocara</i> spp.	48
5.2.3 Isolasi dan Pembuatan homogenat L2D <i>Toxocara cati</i> ...	48
5.2.4 Pengujian Antigen Spesifik <i>Toxocara</i> spp.	49
5.2.5 Hasil Pengamatan Deteksi Subkelas Immunoglobulin (Ig) G Serum Mencit yang Diinfeksi <i>Toxocara cati</i> dengan ELISA- <i>Isotyping Kit</i>	50
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN	55
6.1 Kesimpulan	55
6.2 Saran	55
DAFTAR PUSTAKA	57
LAMPIRAN	63

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
5.1 Kadar Protein Homogenat Berbagai Stadium <i>T. cati</i>	40
5.2 Nilai <i>Optical Density</i> Serum Kelinci Sebelum dan Sesudah Dipapar dengan Protein <i>T. cati</i>	43
5.3 Rata-rata Nilai <i>Optical Density</i> Hasil Pengujian Antigenesitas Protein Murni terhadap Serum Mencit yang Diimunisasi Berbagai Homogenat	49
5.4 Nilai OD Rata-rata dan Standar Deviasi (SD) Serum Mencit Anti- <i>T. cati</i> Terhadap Waktu Pengamatan pada Berbagai Subkelas Ig G	50
5.5 Nilai OD Rata-rata dan Standar Deviasi (SD) Serum Mencit Anti- <i>T. cati</i> Terhadap Subkelas Ig G pada Berbagai Waktu Pengamatan	51
5.6 Nilai OD Rata-rata dan Standar Deviasi Serum Mencit Anti- <i>T. cati</i> Terhadap pada Perlakuan Kombinasi Waktu dan Subkelas Ig G	52

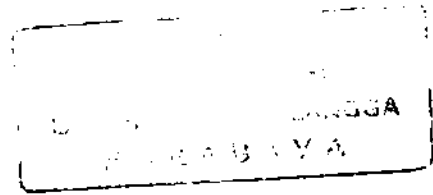
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
5.1 Cacing <i>Toxocara cati</i> dewasa hasil isolasi dari saluran pencernaan kucing liar	36
5.2 Hasil identifikasi telur cacing <i>T. cati</i> dan perkembangannya hingga mencapai L1	37
5.3 Larva stadium kedua (L2) cacing <i>T. cati</i> hasil pemupukan telur <i>T. cati</i>	37
5.4 Larva stadium kedua dorman (L2 dorman) cacing <i>T. cati</i> hasil isolasi dari jaringan mencit yang diinfeksi L2 <i>T. cati</i>	38
5.5 Hasil analisis protein dari berbagai homogenat <i>Toxocara cati</i> dengan teknik SDS-PAGE	41
5.6 Hasil analisis protein L2 dorman <i>T. cati</i> dengan teknik SDS-PAGE	42
5.7 Hasil karakteriai protein <i>T. cati</i> dengan antibodi poliklonal anti-L2 dorman dari serum kelinci menggunakan teknik <i>Western blot</i>	44
5.8 Hasil isolasi cacing dewasa dari saluran pencernaan anjing dan kucing	47
5.9 Bagian anterior <i>Toxocara spp.</i>	48

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
<p>Lampiran 1. Penghitungan Masa Molekular Relatif (MR) Protein <i>T. cati</i> Dewasa (Intestin, Material ES, dan <i>whole worm extract</i>) dan Analisis Regresi Antara Nilai <i>Retardation Factor</i> (RF) dan MR pada marker</p>	63
<p>Lampiran 2. Penghitungan MR Protein L2 Dorman dan Analisis Regresi antara Nilai <i>Retardation Factor</i> (RF) dan Massa Molekul Relatif (MR) pada Marker</p>	65
<p>Lampiran 3. Hasil Pemeriksaan Antigenisitas Protein Murni <i>Toxocara</i> spp. Terhadap Serum Darah Mencit dengan Teknik <i>indirect-ELISA</i> dan Analisis Statistik Nilai <i>Optical Density</i> dengan Uji Anava ...</p>	67
<p>Lampiran 4. Nilai OD dan Analisis Statistik Hasil Pemeriksaan Profil Subkelas Imunoglobulin G dengan Teknik ELISA Terhadap Serum Mencit yang Diinfeksi <i>T. cati</i> Menggunakan Uji Anava Faktorial</p>	69

BAB I PENDAHULUAN



1.1 Latar Belakang Penelitian

Cacing *T. cati* yang selama hidupnya mengalami beberapa stadium, yakni stadium telur, larva stadium pertama (L1), kedua (L2), ketiga (L3), keempat (L4), dan cacing dewasa. Suatu hal yang menarik pada kasus toxocariasis adalah L2 tidak pernah berkembang menjadi L3 kecuali apabila infeksi terjadi pada anak kucing dan kucing jantan dewasa atau kucing betina dewasa yang bunting dan menjelang melahirkan. Cacing tanah, kecoa, ayam, anjing, anak kambing dan khususnya mencit dapat berfungsi sebagai hospes karier (Levine, 1978). Mengingat telur dan cacing dewasa *T. cati* tidak dapat ditemukan pada hospes *aberrant* (transpor) termasuk manusia, maka diagnosis secara konvensional berdasarkan pemeriksaan telur cacing dalam feses tidak dapat dilakukan pada hospes *aberrant*, begitu juga diagnosis berdasarkan gejala klinis sulit dilakukan, karena gejala klinisnya sangat bervariasi. Oleh karena itu, diperlukan diagnosis secara imunologik.

Diagnosis toxocariasis secara imunologik melalui pemeriksaan serum hewan tersangka memerlukan uji dan bahan uji dengan sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi. *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) merupakan teknik yang dapat diandalkan karena memiliki sensitivitas yang tinggi, namun teknik ini juga memerlukan bahan uji yang spesifik agar diperoleh hasil pemeriksaan yang akurat. Bahan uji yang diperlukan pada teknik *indirect*-ELISA untuk pemeriksaan antibodi dalam serum hewan tersangka adalah konjugat berupa antibodi monoklonal berlabel enzim sebagai biomarker, antigen *T. cati*, dan serum hewan tersangka yang mengandung antibodi poliklonal (Harlow dan Lane, 1988). Agar diperoleh hasil pemeriksaan yang akurat maka diperlukan pemilihan biomarker dan penggunaan antigen yang spesifik, mengingat terdapat beberapa

imunoglobulin sebagai respon pada infeksi toxocariasis dan banyaknya protein pada *T. cati*.

Penyakit yang disebabkan oleh infeksi *Toxocara* spp bersifat zoonosis, khususnya pada anak-anak, namun demikian pernah dilaporkan terjadi juga pada orang dewasa. *Toxocariasis* yang disebabkan oleh *T. cati* perlu mendapat perhatian khusus karena populasi kucing di Indonesia cukup tinggi dan kedekatan hewan kesayangan ini dengan manusia. Kebiasaan kucing menimbun fesesnya dengan tanah setelah berak dapat memperlama daya tahan telur cacing di dalam tanah, hal ini perlu diwaspadai mengingat anak-anak punya kecenderungan senang bermain-main di tanah gembur. Di samping itu prevalensi *toxocariasis* pada kucing di Surabaya cukup tinggi, yaitu sebesar 74% (Sudiana dkk., 1994). Keadaan ini dapat meningkatkan resiko terjadinya toxocariasis pada manusia (Beer *et al.*, 1999). Hal ini sesuai dengan pendapat Kilpatrick (1992) yang menyatakan, bahwa toxocariasis pada manusia merupakan hasil infeksi dengan telur infeksi (mengandung L2) *T. canis* dari anjing dan *T. cati* dari kucing, atau mungkin spesies *Toxocara* lain. 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 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 infeksi atau larva jaringan terutama apabila pemasakan produk daging atau organ dari ternak yang kurang sempurna (Ito *et al.*, 1986). Namun demikian dinyatakan, bahwa

sumber utama infeksi pada manusia adalah tanah terkontaminasi dengan telur infeksi yang mengandung L2 (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 infeksi, yang mengandung larva 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 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 (Havasiova-Reiterova *et al.*, 1995; Uga *et al.*, 1990).

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 Resistencia 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 larvae 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 cacing untuk menstimulasi subset $Th_2CD_4^+$ dari sel Th mensekresi interleukin-4 (IL-4) dan IL-5. Interleukin-4 merupakan limfokin yang merangsang sel B untuk berdeferensiasi menjadi sel plasma dan menghasilkan Ig E, sedangkan IL-5 merupakan pemicu potensial terhadap pembentukan eosinofil (Abbas *et al.*, 2000). Jadi IL-4 dan IL-5 berperan dalam kontrol produksi Ig E dan Ig G₁, sedangkan $Th_1CD_4^+$ menghasilkan interferon gamma (IFN γ) yang menghambat reaksi hipersensitivitas dan memicu produksi Ig G₂. Antibodi yang dihasilkan oleh sel-sel sistem imun tubuh tersebut bersifat spesifik terhadap *T. cati* dan sebagian beredar dalam darah perifer, sehingga dapat dideteksi dengan teknik imunodiagnostik, yang pada prinsipnya adalah mendeteksi ikatan antigen-antibodi spesifik terhadap *T. cati* dalam serum penderita. Karena dalam pemeriksaan tersebut diperlukan antibodi dan antigen spesifik terhadap *T. cati*, maka perlu dikaji lebih lanjut tentang imunogenisitas dan antigenisitas penyebab penyakit tersebut dengan mempersiapkan perangkat diagnostik yang mempunyai nilai

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

Pengamatan terhadap telur *T. vitulorum* didapatkan protein dengan BM 240 kDa dan 206 kDa yang dapat dikenali oleh antibodi terhadap cacing dewasa, namun dapat dikenali pula oleh antibodi terhadap cacing lain (Abdel-Rahman *et al.*, 2000). Adapun pengamatan terhadap *surface antigen* dan E-S antigen dari larva infeksi *T. canis* didapatkan reaksi silang dengan antibodi terhadap *T. canis* dan *T. cati* pada BM 200 kDa, sedangkan yang lebih spesifik kira-kira pada BM 80 kDa (Bowman *et al.*, 1987). Pada *T. vitulorum* dewasa dapat ditemukan protein dengan BM 133 kDa dan 143 kDa (Abdel Rahman and Megeed, 2000), BM 92 kDa dan 87 kDa (Abdel-Rahman, 2000), namun protein tersebut memberikan reaksi silang dengan antibodi terhadap cacing lain. Telah diketahui 14 macam fraksi protein L2 dorman *T. cati*, yaitu protein 134,5, 120,7, 70,5, 53,2, 42,3, 36,6, 35,4, 32,8, 30,8, 28,5, 18,3, 14,5, 12,3, dan 8,8 kDa. Di antara beberapa protein tersebut telah berhasil diidentifikasi protein spesifik L2 dorman *T. cati*, yaitu sebanyak enam ikatan protein, yaitu protein 133, 119, 32, 28, 18, dan 8 kDa (Koesdarto dkk., 2005).

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 oleh 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 cacing dewasa (Kusnoto dkk., 2001). Berdasarkan hasil uji *skin tests*, respons imun humoral berupa reaksi hipersensitifitas yang ditunjukkan pada anak kerbau terhadap ekstrak larva infeksi *T. vitulorum* lebih tinggi dibandingkan dengan antigen E-S (Starke *et al.*, 1996). Kusnoto (2003) menyatakan bahwa dengan teknik *Western blot* antigen *F. gigantica* dikenali oleh antiserum terhadap larva kedua (anti-L2) *Toxocara cati* pada MR 133 kDa. Kenyataan tersebut memberikan indikasi bahwa ekstrak larva infeksi dapat digunakan sebagai sumber protein dengan imunogenisitas dan antigenisitas 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 tinggi.

Adanya reaksi silang pada penggunaan antigen ekstrak *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 (*specific 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 *Ascaris vitulorum* dan *A. lumbricoides*, tetapi reaksi silang tidak terjadi bila menggunakan *partially purified antigen* (Safar *et al.*, 1992).

Ikatan antara protein antigenik dengan molekul antibodi dapat dijadikan dasar untuk menciptakan perangkat *kit diagnostic* pada toxocariasis. Bertitik tolak dari permasalahan di atas maka perlu kiranya dikaji lebih mendalam mengenai biomarker toxocariasis dan protein antigenik *T. cati* yang bersifat spesifik, khususnya sensitifitas dan spesifisitas protein L2 dan L2 dorman dalam upaya mendapatkan perangkat diagnostik dini, cepat dan akurat.

1.2 Rumusan Masalah

Permasalahan yang timbul adalah:

- 1) Protein *T. cati* dengan BM berapakah yang bersifat spesifik dan mempunyai afinitas yang kuat dengan antibodi terhadap antibodi anti-*T. cati*? dan
- 2) Immunoglobulin apakah yang bersifat spesifik dengan kadar yang memadai untuk diagnosis baik pada infeksi dini maupun lanjut, sehingga dapat digunakan sebagai biomarker pada pemeriksaan antibodi pada hewan tersangka toxocariasis?

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Hospes dan Penyebab Toxocariasis

Toxocariasis adalah penyakit yang disebabkan oleh infeksi cacing *Toxocara* spp terdapat beberapa spesies, yaitu *Toxocara vitulorum* menyerang anak sapi, anak kerbau dan hejan jantan, *Toxocara canis* menyerang anak anjing dan anjing jantan, serta *Toxocara cati* menyerang anak kucing dan kucing jantan.

Nama lain dari *T. cati* adalah *T. mystax*. Cacing ini mempunyai cervical alae sangat lebar dan bergaris. Panjang cacing jantan 3-6 cm, spikula *unequal* dengan panjang 1,63-2,08 mm. Panjang cacing betina 4-10 cm. Adapun ukuran telurnya adalah 65-75 mikron (Soulsby, 1986; Kusumamihardja, 1993). Hospes definitif *T. cati* adalah anak kucing dan kucing jantan dewasa, selain itu juga dapat menyerang felidae lain dan mustelidae. Adapun cacing tanah, kecoa, ayam, anak kambing dan tikus dapat berperan sebagai hospes transpor (Levine, 1978). Angka prevalensi tertinggi didapatkan pada anak kucing umur 12-24 minggu, dan tidak ditemukan pada anak kucing umur 0-4 minggu (O'Lorcain, 1994).

2.2 Siklus Hidup *Toxocara cati* dan Transmisi Toxocariasis

Transmisi *Toxocara* spp dapat melalui beberapa cara tergantung umur, jenis kelamin dan jenis hospes, kemungkinan meliputi *prenatal transmission (trans uterine)*, *lactogenic transmission (colostral)*, *soil transmission* atau *direct transmission* dan dapat juga *parathenic host transmission*. Potensi tanah sebagai sumber infeksi *Toxocara* spp telah dibuktikan oleh beberapa peneliti, yaitu Castillo *et al.* (2000) melaporkan bahwa, di Santiago didapatkan hasil 33,3% positif dari sampel tanah lapangan (*squares*) dan 66,7% dari sampel tanah taman (*parks*). Angka prevalensi keseluruhan di kota tersebut adalah 13,5% dari 288 total sampel tanah. Hasil serupa yang dilakukan di La Plata, Argentina oleh Fonrouge *et al.* (2000),

didapatkan hasil 13,2% positif dari 242 sampel tanah dari *squares* dan *parks*. Adapun di Indonesia juga telah dilakukan penelitian terhadap tanah di sekitar *playgrounds*, Rumah Potong Hewan dan peternakan sapi perah di Surabaya, didapatkan hasil 28,2% sampel positif mengandung telur *Toxocara* spp dari 188 sampel yang diamati (Kusnoto dkk., 2000).

Siklus hidup *T. cati* berbeda dengan *T. canis* dalam hal tidak adanya infeksi prenatal, terdapatnya sedikit perkembangan pada saat cacing berada dalam saluran pencernaan, dan relatif penting adanya hospes transpor (Levine, 1978). Parsons (1987) menyatakan, bahwa sebenarnya seluruh anak anjing dapat terinfeksi *T. canis*, dipastikan terjadi *prenatal transmission* pada hewan ini. Adapun pada kucing, *transmammary transmission* mungkin merupakan *rute mayor* dari infeksi *T. cati* pada anak kucing.

Toxocara cati dewasa mengeluarkan telur bersama tinja hospes, mencapai tahap infeksi dalam waktu 10-15 hari bila kondisi lingkungan mendukung. Infeksi terjadi karena telur infeksi yang mengandung larva kedua (L2) termakan anak kucing dan atau kucing jantan dewasa bersama makanan atau minuman terkontaminasi. Selama dua hari pertama, L2 ditemukan pada dinding lambung. Pada hari ketiga L2 ditemukan pada organ paru dan hati, pada hari kelima L2 ditemukan pada trachea dan pada hari ke-10 sudah ditemukan kembali dalam lambung dan jumlahnya akan meningkat banyak pada hari ke-21, sebagian larva ada yang tertinggal di dalam organ paru hospes, larva juga ditemukan pada isi usus dan lambung. Sebagian besar larva ketiga (L3) terjadi pada dinding lambung, sedangkan larva keempat (L4) terdapat pada isi lambung, dinding usus dan lumen usus, selanjutnya berkembang menjadi cacing dewasa. Larva kedua juga dapat ditemukan pada jaringan otot tikus, cacing tanah, kecoak, ayam, domba dan hewan lain yang terinfeksi oleh telur infeksi (Kusumamihardja, 1993).

Telur cacing *T. cati*, pada keadaan lingkungan mendukung akan berkembang hingga mengandung larva pertama (L1). Selanjutnya L1 berkembang menjadi L2 yang merupakan stadium infeksi dan L2 masih berada di dalam telur hingga termakan oleh anak kucing atau kucing dewasa jantan. Sementara itu, L2 keluar dari telur setelah telur menetas di dalam lambung hospes, sebagian besar larva tersebut berpindah melalui sistem portal hati, organ hati dan paru menuju trakhea dan kembali ke lambung. Larva memasuki dinding lambung dan usus halus, berubah menjadi L3 dan kemudian menjadi L4, dan kembali ke lumen usus untuk menjadi cacing dewasa (Levine, 1978).

Apabila infeksi terjadi pada selain hospes definitif, maka setelah telur menetas di lambung, L2 akan terjadi *visceral larvae migrans* dan L2 tinggal di jaringan organ dalam maupun somatik bahkan dapat terjadi *ocular larvae migrans* sehingga L2 dapat mencapai mata dan otak. Dalam hal ini perkembangan L2 mengalami jalan buntu dan terbentuk larva jaringan yang statis (dorman) (Levine, 1978).

2.3 Aspek Zoonosis Toxocariasis

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. Pendidikan tentang siklus hidup parasit, higiene dan penjadwalan pemberian antelmintik diperlukan karena adanya resiko zoonotik dari toxocariasis (Overgaauw, 1997^a).

Manusia dapat tertular toxocariasis karena termakannya telur infeksi yang terdapat dalam feses anak anjing, anak kucing, kucing jantan dewasa, anak sapi dan tanah terkontaminasi atau larva yang berada pada jaringan maupun air susu (Ito *et al.*, 1986; Alonso *et al.*, 2000; Radman *et al.*, 2000). Kontak langsung dengan hewan tidak dianggap berpotensi resiko, karena pembentukan embrio dari telur *Toxocara* spp yang

dikeluarkan membutuhkan waktu minimum 2 minggu. Anak-anak sering mendapatkan simtoma klinis karena kontak erat dengan tanah terkontaminasi di halaman dan *sandpits*, higiene yang kurang dan karena makanan yang kotor (Overgaauw, 1997^b).

Berdasarkan gejala klinik, toxocariasis pada manusia diklasifikasikan menjadi *visceral toxocariasis* atau *visceral larva migrans* (VLM) dan *ocular toxocariasis* atau *ocular larva migrans* (OLM) yang membutuhkan diagnosis secara imunologik (Uga *et al.*, 1990). Toxocariasis pada manusia dilaporkan terjadi di Jepang sebanyak 42 kasus (Kondo, 1989). Uga *et al.* (1990) melakukan uji ELISA terhadap orang-orang yang tinggal di 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/tersangka penderita (pasien 41 pria dan 34 wanita, umur 9-69 tahun).

2.4 Antigen Cacing *Toxocara* spp

Cacing *T. cati* yang selama hidupnya mengalami beberapa generasi memiliki perangkat antigen yang berbeda-beda, hal ini dimanfaatkan agar terhindar dari sistem imun hospes. Adanya perbedaan struktur morfologi pada berbagai generasi tersebut menyebabkan perbedaan imunogenisitas dalam memicu terbentuknya antibodi (Warren, 1993). Cacing *T. cati* dewasa yang panjangnya mencapai 12 cm, memiliki induk semang dengan tingkatan umur yang berbeda dengan manifestasi klinik yang berbeda pula. Bentuk larva (L2) dapat ditemukan pada kucing betina dewasa, kambing dan manusia sebagai hospes aberan, selain itu juga dapat ditemukan pada *paraternalic host* misalnya tikus, kecoa, ayam serta hewan lain, sedangkan bentuk dewasa mudah didapatkan pada usus halus anak kucing dan kucing jantan dewasa sebagai hospes definitif (Levine, 1978; Kusumamihardja, 1990).

Mengingat siklus hidup yang kompleks dari *Toxocara* spp, maka pengamatan terhadap protein antigen cacing tersebut dapat dilakukan terhadap telur, larva pada

berbagai stadium (L1, L2, L3, L4), dan cacing dewasa. Pada telur cacing, protein antigenik dapat diperoleh pada kulit telur (*egg shell*), membrana vitelina (*vitelline membrane*) dan *granular layer* (Abdel-Rahman *et al.*, 2000). Adapun pada stadium larva dan dewasa yang paling sering digunakan adalah *E-S antigen*, disamping itu juga ada beberapa sumber antigen yang dipakai, misalnya: antigen somatik (el-Massry, 1999), *surface antigen* (Bowman *et al.*, 1987; Kennedy *et al.*, 1987), ekstrak larva (Starke *et al.*, 1996), dan ekstrak cacing dewasa (Safar *et al.*, 1992; Abdel-Rahman and Megeed, 2000).

Protein antigen yang telah banyak diamati adalah protein antigen *T. vitulorum* dan *T. canis*, sedangkan *T. cati* belum banyak dilakukan. Abdel-Rahman *et al.* (2000), telah melakukan pengamatan terhadap telur *T. vitulorum* dengan teknik *immunoblotting* didapatkan protein dengan komponen 240 kDa dan 206 kDa yang dapat dikenali oleh antibodi anti-cacing dewasa, namun spesifisitasnya rendah karena dapat dikenali pula oleh antibodi anti-cacing dewasa *Fasciola gigantica* dan *Moniezia expansa*.

Trisunuwati (1997) melakukan analisis protein pada berbagai stadium larva *T. vitulorum* memperoleh gambaran, bahwa setiap stadium menunjukkan pita protein dengan berat molekul yang berbeda. Pada L1 diperoleh protein dengan BM 56 kDa dan 42 kDa. Larva stadium kedua (L2) selain menunjukkan protein dengan BM seperti pada L1, juga ditemukan protein 97 kDa, 34 kDa, dan 32 kDa. Protein L3 hampir sama dengan L2 tetapi juga didapatkan protein dengan BM 66 kDa.

Pada *T. vitulorum* dewasa dapat ditemukan protein dengan BM 97 kDa dan 66 kDa, yang sama dengan protein pada *A. lumbricoides* dewasa (Trisunuwati, 1997). Abdel-Rahman and Megeed (2000) juga mendapatkan reaksi silang dari ekstrak cacing utuh (*whole worm extract*) dengan uji ELISA, yaitu antara antigen *T. vitulorum*, *F. gigantica* dan *M. expansa* dewasa. Berdasarkan teknik *immunoblotting* dapat diketahui bahwa, antigen *F. gigantica* dikenali oleh antibodi *T. vitulorum* pada BM 109 kDa, bila komponen ini ditambahkan satu dengan yang lain pada 52 kDa akan dideteksi

oleh antibodi *M. expansa* dengan ekstrak yang sama. Lebih jauh diketahui, bahwa terjadi reaksi silang antara antigen *T. vitulorum* dengan *F. gigantica* pada 133 kDa dan dengan *M. expansa* pada 143 kDa. Lebih lanjut dinyatakan oleh Abdel-Rahman (2000), bahwa antigen spesifik spesies *T. vitulorum* dewasa hanya dua polipeptida, yaitu pada BM 92 kDa dan 87 kDa.

Pengamatan terhadap antigen permukaan (*surface antigen*) kutikula dan antigen E-S dari larva infeksi *T. canis* dengan teknik *enzyme-linked immunoelectrotransfer blotting* didapatkan reaksi silang antara antibodi terhadap *T. canis* dan *T. cati* dengan protein antigen pada BM sekitar 200 kDa, sedangkan yang lebih spesifik kira-kira pada BM 80 kDa (Bowman *et al.*, 1987). el-Massry (1999), telah melakukan pengamatan terhadap perbedaan secara molekuler antara antigen somatik larva dan cacing dewasa *T. canis* dan *Toxascaris leonina* dengan teknik *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE). Kedua antigen somatik cacing dewasa tersebut menampakkan dua pita yang mirip (90,00, 91,95 kDa dan 69,25-70,56 kDa). Sementara itu, pada antigen somatik larva *T. canis* menunjukkan profil antigenik yang sangat berbeda bila dibanding dengan antigen *T. leonina* kecuali pada satu *band* (66,85-66,89 kDa). *Western blot* menunjukkan reaksi silang antara antigen somatik *T. canis* dan *T. leonina* pada dua *band* (90,00 kDa, 91,95 kDa dan 69,25-70,56 kDa). Adapun pita yang menunjukkan reaksi spesifik untuk *T. canis* dewasa adalah polipeptida pada 125,37 kDa dan 117,73 kDa, sedangkan untuk *T. leonina* dewasa pada 119,04 kDa.

Reaksi silang yang terjadi pada penggunaan antigen ekstrak *crude protein* membuktikan bahwa pada uji imunodiagnostik membutuhkan bahan uji yang lebih spesifik. Abdel-Rahman (2000), melakukan proses purifikasi terhadap protein cacing dewasa *T. vitulorum* menghasilkan fraksi protein yang dapat meningkatkan spesifisitas (*specific activity*) dibanding dengan *crude extract*. Sedangkan Safar *et al.* (1992), melakukan pengamatan terhadap fraksi ekstrak protein cacing dewasa *T. canis*, *A. vitulorum* dan *A. lumbricoides*, mendapatkan hasil yang bervariasi, yaitu pada berat

molekul antara 6-70 kDa. Dinyatakan pula, bahwa dengan menggunakan teknik *double gel diffusion*, *crude extract* dari cacing dewasa *T. canis* menunjukkan reaksi silang dengan antibodi terhadap kedua spesies *Ascaris* tersebut, tetapi reaksi silang tidak terjadi bila menggunakan *partially purified antigen*.

Berdasarkan pemeriksaan antibodi terhadap larva *T. vitulorum* dengan teknik *Western blot*, terjadi reaksi antara antibodi yang dibuat dari homogenat L3 dengan protein 34 kDa dan 32 kDa, baik dari L2 maupun L3, tetapi memberikan hasil negatif dengan protein pada L1. Protein dengan BM 34 kDa dan 32 kDa ternyata bersifat imunogenik, karena bereaksi positif dengan antibodi yang dibuat dari homogenat L2 (Trisunuwati, 1997). Ekstrak larva *T. vitulorum* ternyata menunjukkan respon imun lebih tinggi dibanding antigen E-S, hal ini tampak dari reaksi hipersensitifitas yang ditunjukkan dengan *skin test* pada anak kerbau (Starke *et al.*, 1996). Kenyataan ini memberikan kesan bahwa ekstrak larva mempunyai prospek untuk dikembangkan sebagai sumber antigen, walaupun masih perlu dianalisis lebih lanjut agar didapatkan antigen yang sangat spesifik.

2.5 Patogenesis Toxocariasis

2.5.1 *Visceral larvae migrans* (VLM)

Toxocariasis adalah penyakit paling penting di antara infeksi oleh nematoda, karena menyebabkan gangguan yang luas pada anak-anak, dan kerusakan mata pada orang dewasa (Playfair, 1992). Perkembangan patologi *visceral* pada tahap awal dari toxocariasis berhubungan dengan over produksi modulator yang tidak seimbang dan aksi langsung dari substansi agen parasitik. Enzim parasitik mengekspresikan protein hospes, baru-baru ini dinyatakan sebagai protein miogenik parasitik, epitop jaringan normal hospes tak terekspresi, misalnya autoantigen dari jaringan rusak akan dianggap sebagai faktor penting untuk proses imunopatologik (*autoimmunopathologic*) (Ozeretskovaia, 2000).

Pembentukan portal fibrosis dan hipertensi organ paru sering kali berhubungan dengan respons imun seluler terhadap deposit telur cacing dalam jaringan (Chappel and Haeney, 1992). Migrasi larva melalui paru menyebabkan *asthma-like reaction* seperti pada *T. canis* dan *tropical pulmonary eosinophilia* (Playfair, 1992; Roitt *et al.*, 1998). Menurut Stites (1997), termakannya telur infeksiif nematoda diikuti dengan menetasnya telur tersebut dan penetrasi larva pada mukosa, yang mana akhirnya mencapai paru melalui aliran darah, reaksi hipersensitivitas di dalam paru akibat tingginya Ig E dapat menyebabkan pneumonitis serius.

Infeksi cacing dengan migrasi larva melalui jaringan merupakan salah satu predisposisi penyebab *pyogenic liver abscess*, khususnya di negara tropis yang umumnya banyak terdapat penyakit parasitik ini (Rayes, 2001). Aktivasi sel Th₂ dan penurunan regulasi sel Th₁ yang diinduksi oleh cacing dapat mengurangi aktivitas fagositosis terhadap mikrobial, seperti reaksi *granulomatous* di sekeliling larva menyebabkan bakteri terperangkap dalam liver (Moreira-Silva and Pereira, 2000). Schulze *et al.* (2000) melakukan pengamatan post mortem 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*.

Sindroma *visceral larvae migrans* 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 jantung yang terus-menerus disertai oleh hiper-eosinofilia 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 serebro spinal menunjukkan *eosinophilic pleocytosis*. Diketahui pula bahwa titer antibodi dalam cairan serebro spinal lebih tinggi dibanding dalam serum.

2.5.2 *Ocular larvae migrans* (OLM)

Produk sekresi oleh invasi larva cacing dan ekspresi substansi dari 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* spp dapat berperan penting pada *traction retinal detachment* dari *macula*. Penampakan keadaan ini mungkin diawali dengan uveitis (Park *et al.*, 1999; Amin *et al.*, 2000).

Park *et al.* (2000) melaporkan adanya 5 kasus *ocular toxocariasis* pada orang-orang dewasa di Korea. Pada pemeriksaan funduskopik, 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*.

2.5.3 Pembentukan jaringan granuloma dan larva dorman

Ketidakberhasilan hospes untuk mengeliminasi larva *Toxocara* spp secara tuntas, serta gangguan patologi yang terjadi akibat respon imun merupakan fenomena imunopatobiologik. Dilaporkan bahwa kegagalan tersebut menimbulkan rangsangan terbentuknya 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 bahwa, pada ascariasis terjadi reaksi hipersensitivitas cepat tipe I, dengan gejala urtikaria dan angioderma.

Infeksi larva *Toxocara* spp pada sapi betina dewasa juga memberikan gambaran respons imun seluler kronis, misalnya pembentukan jaringan granuloma di sekitar lokasi larva (Roberts, 1992). Hipersensitivitas 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 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 hingga 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).

2.6 Imunopatogenesis Toxocariasis

Pada umumnya infeksi oleh parasit, khususnya cacing, ditandai dengan keberadaan imunoglobulin (Ig) E dan peningkatan kadar eosinofil. Peningkatan kedua 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.*, 2000). 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 G₁. Sedangkan Th₁CD₄⁺ menghasilkan interferon gamma (IFN γ) yang menghambat reaksi hipersensitivitas dan memacu produksi Ig G₂. Menurut Rajapakse (1992), Ig G₂ lebih berperan dalam infeksi *Toxocara* spp dari pada imunoglobulin yang lain.

Pada peruntutan respon imun terhadap patogenitas larva, ditemukan puncak kadar antibodi sapi dewasa pada 7 hari pasca infeksi. Puncak kedua terjadi pada saat L2 menetas dan 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 G₁ 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 (Lloyd and Soulsby, 1987). Pada saat itu kadar Ig E meningkat, hal ini dibuktikan oleh Matsumura *et al.* (1983). Pengeluaran cacing dari lumen usus merupakan kerja sama antara antibodi, sel limfosit dan sel mieloid. 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 (Trisunuwati, 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 respon 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). Respon 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. Immunoglobulin 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-59 kebuntingan dan Ig G1 pada hari ke-135 penelitian ini dilakukan dengan teknik gel difusi (Husband *et al.*, 1972). Demikian pula respon yang terjadi pada infeksi buatan dengan beberapa penyebab penyakit. Namun belum diketahui secara pasti apakah imunoglobulin tersebut berasal dari induk atau respon 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 dapat terjadi transfer imunoglobulin ialah pada saat menyusui anak 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 diabsorpsi oleh anak sapi, sehingga tidak seluruh imunoglobulin maternal dapat dimanfaatkan oleh anak sapi. Sel plasma induk ternyata dapat terikut bersama kolostrum pada saat anak sapi menyusui pada minggu pertama.

2.7 Diagnosis Toxocariasis

Pemeriksaan feses untuk menemukan telur *T. cati* hanya dapat dilakukan terhadap anak kucing dan kucing dewasa jantan. Akan tetapi pada induk betina dan hewan lain maupun pada manusia, hal ini tidak dapat dilakukan karena dalam feses selain hospes definitif tidak dapat ditemukan telur cacing, sehingga diperlukan cara lain untuk melakukan diagnosis pada hospes tersebut.

Diagnosis toxocariasis berdasarkan gejala klinis sulit dilakukan, karena gejala toxocariasis sangat bervariasi (Uga *et al.*, 1990), tidak spesifik dan organ yang diinfeksi berganti-ganti (Prokopowicz and Sosnowska, 1990). Karena larva gagal untuk migrasi secara lengkap dalam siklusnya pada manusia (selain hospes definitif), diagnosis untuk infeksi toxocariasis hanya tinggal secara imunologik (Petithory *et al.*, 1994). Beberapa metode yang dapat dikembangkan untuk imunodiagnostik pada infeksi nematoda adalah: 1) uji aglutinasi cepat; 2) imunodifusi; 3) imunoelektroforesis; 4) ELISA; 5) *imunoblotting*; dan 6) imunohistokimia (Warren, 1993). Namun sebagian besar dari teknik tersebut tetap memerlukan antigen yang lebih spesifik agar reaksi antigen-antibodi yang diharapkan sebagai petanda dapat terwujud (Harlow and Lane, 1988). Kesulitan yang dihadapi adalah, bahwa nematoda mempunyai sumber antigen yang bervariasi menurut stadium hidupnya dan hampir selalu berbeda, karena perubahan stadium dan perbedaan hospes (Cohen and Warren, 1993).

BAB 3

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1 Tujuan Penelitian

3.1.1 Tujuan umum

Penelitian ini secara umum bertujuan untuk mengetahui karakter protein *Toxocara cati*, mendapatkan protein antigenik dan mengetahui respon imun (imunoglobulin dominan) terhadap imunogen L2 dorman sebagai dasar pembuatan *kit diagnostic* untuk diagnosis melalui pemeriksaan antibodi.

3.1.2 Tujuan khusus

- 1) Pada tahun pertama penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakter protein *Toxocara cati* berdasarkan masa molekuler relatif (MR) protein spesifik yang memiliki afinitas kuat terhadap antibodi spesifik *T. cati*.
- 2) Pada tahun kedua penelitian ini bertujuan untuk mengetahui profil imunoglobulin mencit akibat infeksi *T. cati*.

3.2 Manfaat Penelitian

Penelitian ini difokuskan untuk mendapatkan dua hal, yaitu protein spesifik dan imunoglobulin dominan sebagai perangkat *kit diagnostic*. Hasil yang diperoleh dapat digunakan sebagai antigen (protein spesifik) dan sebagai dasar (marker) pada pemilihan antibodi sekunder untuk keperluan diagnosis melalui pemeriksaan antibodi dengan uji ELISA atau digunakan sebagai imunogen pada pembuatan antibodi monoklonal.

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini berlangsung selama dua tahun, tahun kedua berlangsung selama 7 bulan, sejak bulan April hingga Oktober 2012, bertempat di Lab. Helminthologi, Lab. Biomolekuler Fakultas Kedokteran Hewan, dan Lab. Helminthiasis Institute Tropical Disease, Universitas Airlangga.

4.2 Jenis dan Rancangan Penelitian

Dilakukan dua macam penelitian, yaitu: 1) Penelitian deskriptif, untuk menentukan karakter morfologi, biokimiawi protein *Toxocara* spp., dan imunologik *Toxocara* spp. dengan uji *blotting*; 2) *True experimental study*, yaitu menggunakan: a) *Posttest only control groups design* untuk mempelajari respons imun humoral mencit dalam memproduksi imunoglobulin G (Ig G) terhadap imunogen yang berbeda; b) *Factorial posttest only control groups design* untuk mempelajari respons imun humoral mencit dalam memproduksi Ig G terhadap penggunaan subkelas Ig G dan waktu berbeda (Campbell and Stanley, 1963; Zainuddin, 2000).

4.3 Klasifikasi variabel

4.3.1 Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah protein *T. cati* dari kucing, imunogen (homogenat cacing), subkelas IgG dan waktu penelitian.

4.3.2 Variabel tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah respons imun humoral mencit yang diukur melalui nilai *optical density* (OD) Ig G dari serum mencit baik yang diimunisasi maupun yang diinfeksi dengan L2 *T. cati*.

4.3.3 Variabel kendali

Variabel kendali terdiri dari: 1) pakan mencit; 2) strain, umur, jenis kelamin mencit; dan 3) ajuvan vaksin.

4.4 Materi Penelitian

4.4.1 Unit analisis

Unit analisis dalam penelitian ini adalah, protein cacing *Toxocara cati*, *Toxocara canis*, material ES L2J *Toxocara cati*, serum kelinci, dan serum mencit.

4.4.2 Hewan percobaan

Hewan percobaan yang digunakan pada penelitian ini terdapat beberapa jenis, yaitu: 1) sebagai sumber cacing adalah anjing (dari depot yang melakukan pemotongan anjing di Surabaya) dan kucing liar (dari beberapa pasar di Surabaya); 2) sebagai penghasil antibodi poliklonal adalah kelinci ras Angora jantan umur 4 bulan; dan 3) sebagai hewan coba untuk pengamatan respons imun humoral adalah mencit Balb/c jantan umur 8 minggu.

4.4.3 Bahan penelitian

Bahan yang diperlukan antara lain: *phospate buffer saline* (PBS, Merck), Chloroform (Merck), *destilate water* (dH₂O), Alkohol 70%, 85% dan 95% (Merck), Alkohol gliserin 5% (Merck), Hung's I, Hung's II (Merck), Larutan bibit Carmin (Merck), Alkohol asam, HCl, Alkohol basa, RPMI-1640 (Gibco cat no. 1640-430-1800), DMEM (Gibco cat no. 430-1600), FBS (Gibco cat no. 200-6140), Penstrep (Gibco cat no. 514), Amphotericin B (Sigma cat no. A-2411), tripsin (Merck), HCl 1N (Flow lab cat no. 16-680-45), NaOH 1N (Flow lab cat no. 16-681-45), *deionized water*, antibodi poliklonal anti-*Toxocara* spp., *rabbit anti-mouse Ig alkaline phosphatase labeled* (Sigma cat no. A-4312), *goat anti-rabbit Ig alkaline phosphatase labeled*

(Sigma cat no. H-3375), *Mouse typer Sub-Isotyping kit* (BioRad cat. no.172-2051), *Mouse typer Sub-Isotyping panel* (BioRad cat. no.172-2055), NaN_3 (Merck), NaCl (Merck), Na_2CO_3 (Merck), NaHCO_3 (Merck), Na_2PO_4 (Merck), KH_2PO_4 (Merck), dietanolamin (Sigma cat no. D-2286), p-NPP (Sigma cat no. N-2765), H_2SO_4 (Merck), H_2O_2 (Merck), Tris-HCl, (Promega 608-274-4330), BSA (Sigma cat. no. A-9647), Tween-20 (USB cat. no. 20605), MgCl_2 (Merck), asam sitrat (Merck), Trizol-LS (Invitrogen cat. no. 10296-010), propanol-2 (Merck), ethanol (Merck), *complete adjuvant* (Sigma cat. no. F-5881), *incomplete adjuvant* (Sigma cat no. F-5506), *acrylamide* (Sigma cat. no. A-9909), *acrylamide/bis-acrylamide* (Sigma cat no. A-2917), TEMED (Sigma cat. no. 7024), APS (BioRad cat no. 161-0700), SDS, Tris-aminomethan, glisin (Sigma cat. no.G-7403), glycerol (Sigma cat no. G-5516), *bromophenolblue* (Merck), *mercaptoethanol* (Sigma cat. no. M-7154), methanol (Merck), asam asetat (Merck), glutaraldehida (Sigma cat. no. G-7526), AgNO_3 , NH_3 , formaldehida (Merck), nitroselulose (Merck), *western blue* (Promega cat. no. 53841), protein marker (Promega), aseton (Merck), *ethidium bromide* (Sigma cat. no. E-1510).

4.5 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini adalah sebagai berikut: *electrophoresis equipment* (SDS-PAGE), inkubator (Beckman), ultrasentrifus berpendingin 4°C (Beckman), sentrifus 3000 g (5000 rpm), *sprit disposable* berbagai ukuran, nampan plastik, gunting, skalpel, pinset, petridish, gelas beker berbagai ukuran, *micro tube*, tabung sentrifus, filter 25 μm , 120 μm dan 150 μm , *water bath*, pipet eppendorf berbagai ukuran, pipet Pasteur, mikroskop cahaya, mikroskop inverted mikroskop *disecting*, kamera mikroskopik (DP12), sonikator, *autoclave*, *ELISA plate*, *ELISA-reader* dan printer, *Freezer* -20°C dan -80°C , *gel electrophoresis apparatus* (Bio-

Rad), *vortex*, *freezer*, almari es, *micropipete adjustable*, *homogenizer*, *electroblotting transfer apparatus* (Bio-Rad), membran dialisis dan *electro elusi* (Bio-Rad).

4.6 Prosedur Penelitian Tahun I

4.6.1 Sampel *Toxocara cati*

Penelitian ini difokuskan pada larva stadium kedua (L2) dorman *T. cati*. Oleh karena itu untuk mendapatkan isolat tersebut dapat dilakukan isolasi telur baik dari feses penderita maupun inkubasi cacing dewasa *T. cati*.

4.6.1.1 Isolasi cacing dewasa dan telur cacing

Cacing *T. cati* dewasa diisolasi dari anak kucing penderita toxocariasis, yang diperoleh dari beberapa pasar dan rumah sakit di Surabaya. Setelah cacing diidentifikasi, kemudian diinkubasikan di dalam inkubator pada 27°C untuk memperoleh telur cacing.

4.6.1.2 Isolasi larva stadium pertama (L1) dan larva stadium kedua (L2)

Telur yang diperoleh dari cacing *T. cati* dewasa tersebut kemudian dipisahkan kotoran maupun reruntuhan jaringan dengan teknik preparasi gradien (DrenchRite, 1996). Selanjutnya telur cacing yang diperoleh dipupuk dalam medium *phosphate buffers saline* (PBS), dengan penambahan formalin 1% pada suhu ruang, untuk memperoleh L1 dan L2. Larva stadium pertama diperoleh pada hari ke 7, sedangkan L2 diperoleh pada hari ke 21-28.

4.6.1.3 Isolasi larva stadium kedua (L2) dorman

Larva stadium kedua yang diperoleh dari pemupukan diinfeksi ke mencit secara per oral dengan dosis 30 butir/gram BB, kemudian setelah 3-5 hari mencit dikorbankan untuk diambil organ visceral (hati, jantung dan paru) maupun jaringan

somatik, kemudian dilakukan preparasi dengan penambahan tripsin 1% untuk memperoleh L2 dorman.

4.6.1.4 Isolasi material *excretory-secretory* (ES)

Cacing *Toxocara cati* yang dikoleksi dari anjing dan kucing penderita toxocarosis dimasukkan ke dalam dua gelas piala yang berbeda. Larutan PBS sebelum digunakan dihangatkan dalam *waterbath* pada suhu 37°C; Setiap 20 ekor cacing ditambah 50 ml PBS dalam gelas piala diinkubasikan dalam *waterbath* dengan suhu 37°C selama 15-20 menit, larutan PBS diganti dengan PBS yang baru dan diinkubasikan dalam *waterbath* pada suhu 37°C selama 15 menit sampai 1 jam; seluruh cacing yang masih hidup dan bersih dipindahkan ke dalam PBS yang baru dan diinkubasikan dalam *waterbath* pada suhu 37°C selama 4 jam; Kemudian cacing diambil, cairan yang tertinggal disaring dengan filter plastik T200 (setara dengan 25 µm), filtrat merupakan material ES dikoleksi dan disimpan pada suhu -80°C (50 ml/botol), sedangkan residu mengandung telur *Toxocara cati* (Kusnoto, 2009).

Material ES L2 dorman diperoleh dengan cara memasukkan L2 dorman *Toxocara cati* yang dikoleksi dari jaringan mencit ke dalam tabung reaksi yang berisi PBS. Larutan PBS sebelum digunakan dihangatkan dalam *waterbath* pada suhu 37°C; Tabung reaksi berisi L2 dorman dan PBS diinkubasikan dalam *waterbath* dengan suhu 37°C selama 15-20 menit, larutan PBS diganti dengan PBS baru (yang telah dihangatkan) dan diinkubasikan dalam *waterbath* pada suhu 37°C selama 15 menit; PBS diganti lagi dan diinkubasikan dalam *waterbath* pada suhu 37°C selama 4 jam; Kemudian cairan disaring dengan filter plastik T200 (setara dengan 25 µm), filtrat merupakan material ES dikoleksi dan disimpan pada suhu -80°C (50 ml/botol), sedangkan residu mengandung L2 dorman *Toxocara cati* (Kusnoto, 2009).

4.6.1.5 Pembuatan homogenat *Toxocara cati*

Hasil isolasi berupa cacing dewasa, L2 dan L2 dorman *T. cati* dihancurkan dengan bantuan sonikator dengan frekuensi ± 35 kHz selama 3 x 1 menit dengan interval istirahat 1 menit. Untuk memastikan tingkat kehancuran dilakukan pengambilan sampel satu tetes, diteteskan di atas *object glass* dan diperiksa dengan mikroskop 100x. Apabila tingkat kehancuran sudah mencapai 90%, sonikasi dihentikan kemudian homogenat disentrifus dengan kecepatan 5000 rpm selama 5 menit, supernatan diambil dan ditera kadar proteinnya selanjutnya siap untuk digunakan pada proses lebih lanjut (analisis protein, karakterisasi, isolasi, dan pembuatan antibodi poliklonal).

4.6.2 Analisis Protein dengan Teknik SDS-PAGE

Homogenat cacing dewasa, ES, L2 dan L2 dorman *T. cati* yang diperoleh dilakukan *running* dengan teknik *sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE).

Komposisi SDS-PAGE yang dipakai adalah *separating gel* 12% (2,5 ml *acrylamide*; 1,2 ml Tris-HCl pH 8,8; 1,2 ml SDS 0,5%; 1,1 ml aquadest, 50 μ l Temed dan 30 μ l APS 10%) dan *stacking gel* 10% (0,66 ml *acrylamide*; 0,8 ml Tris-HCl pH 6,8; 0,8 ml SDS 0,5%; 0,74 ml aquadest; 4 μ l TEMED dan 20 μ l APS 10%).

Setelah larutan gel pemisah 12% dimasukkan pada gel *plate* pada posisi vertikal kemudian di atasnya diberi butanol sampai mengeras dan kemudian butanol dibuang dan dibersihkan dengan PBS dan dikeringkan dengan kertas *Whatman*. Selanjutnya ditambahkan *stacking gel* dan setelah itu dimasukkan *comb* dan ditunggu sampai betul-betul set. *Plate* berisi gel kemudian dipasang pada *Minigel Twin G-42 slab* dan dituangkan *electrophoresis buffer* (30,29 g Tris aminomethan; 144,13 g glisin; 10 g SDS dalam 1000 ml aquadest).

Sebanyak 15 μ l sampel berupa homogenat L2 dorman *T. cati* ditambah *Laemmli buffer* sama banyak. Kemudian sampel didenaturasi dengan *Laemmli buffer* (Tris-HCl pH 6,8 1,0 ml, gliserin 0,8 ml, SDS 10% 1,6 ml, bromfenolblue 0,5% 0,4 ml, merkaptotanol 5% 50 μ l, aquadest 3,8 ml) pada pemanasan 100°C selama 5 menit, dimasukkan pada sumuran *stacking gel*. Sebagai marker digunakan protein dengan berat molekul pada kisaran 14,5-200 kDa produksi BIO-RAD. Elektrophoresis dinyalakan dengan tegangan 40 V dengan kuat arus 10 mA dan ditingkatkan menjadi 120 V 25 mA ketika sampel telah melewati *stacking gel*; kira-kira selama 1-2 jam.

Pencucian terhadap gel hasil *running* dilakukan 3 tahap, yaitu: 1) Pencucian pertama, menggunakan 25 ml metanol 50%, 3,75 ml asam asetat 7,5% dan 71,25 ml aquadest selama 30 menit; 2) Pencucian kedua, menggunakan 2,5 ml metanol 5%, 3,75 ml asam asetat 7,5% dan 93,75 ml aquadest selama 20 menit; dan 3) Pencucian ketiga, menggunakan glutaraldehida 10% selama 25 menit. Gel kemudian diwarnai dengan teknik pewarnaan silver (1,6 g AgNO₃ dalam 8 ml aquadest; 42 ml NaOH 0,36%; 2,8 ml NH₃ 25% dalam 147 ml aquadest) selama 15 menit, dilanjutkan pencucian 2 kali 2 menit dengan 100 ml aquadest dan kemudian ditambahkan larutan pengembang warna (200 μ l asam sitrat 5%; 100 μ l formaldehid 37% dalam aquadest 200ml) dan dilakukan pencucian kembali selama 2 kali 2 menit dengan 100 ml aquadest. Setelah gel terwarnai kemudian dimasukkan dalam larutan asam asetat 10% untuk menghentikan proses pengecatan. Selanjutnya gel dapat disimpan pada larutan gliserin 10% (Harlow dan Lane, 1988).

4.6.3 Pembuatan Antibodi Poliklonal

Antibodi poliklonal dibuat dengan jalan menyuntikkan protein homogenat L2 dorman *T. cati* pada kelinci. Sebanyak empat ekor kelinci jantan lokal umur 3 bulan diinjeksi dengan homogenat L2 dorman dengan dosis 500-1000 μ g, injeksi dilakukan

secara subkutan dengan menambahkan *complete Freund's adjuvant* (CFA) pada imunisasi pertama dan *incomplete Freund's adjuvant* (IFA) pada imunisasi ulang dengan perbandingan 1:1. Imunisasi dilakukan sebanyak lima kali dengan interval dua minggu. Dua minggu setelah *booster* terakhir dilakukan pengambilan darah kelinci kemudian disentrifugasi untuk mendapatkan serum yang mengandung antibodi poliklonal anti-L2 dorman *T. cati*. Pembuatan antibodi poliklonal digunakan untuk uji identifikasi protein dengan teknik *Western blot*.

4.6.4 Identifikasi Protein dengan Teknik *Western Blot*

Protein dalam gel yang diperoleh dari *running* SDS-PAGE, lebih lanjut ditransfer ke membran nitroselulosa (PVDF). Selanjutnya PVDF-*blot* diblok dengan 10% BSA kemudian dicuci dengan larutan TBS dua kali. Direaksikan dengan antibodi poliklonal (serum kelinci). Membran nitroselulosa diinkubasi pada suhu ruang, dicuci dengan larutan TBS tiga kali, kemudian ditambahkan konjugat *anti-rabbit* yang dilabel alkalin fosfatase dan substrat 4-NPP dan diwarnai dengan *Western blue*. Akhirnya dikeringkan di udara pada suhu ruang. Dari hasil ini kemudian ditentukan MR protein (Rantam, 1997). Penentuan MR protein dilakukan dengan mencari hubungan (korelasi) antara nilai *retardation factor* (RF) dengan log berat molekul (BM) protein marker. Nilai RF diperoleh dengan menghitung hasil pembagian jarak pergerakan pita protein dari tempat awal (jarak pita) dengan jarak pergerakan warna dari tempat awal (panjang gel) (Hostettmann *et al.*, 1986).

4.7 Prosedur Penelitian Tahun II

4.7.1 Koleksi Cacing Dewasa *Toxocara* spp., *D. caninum* dan *Ancylostoma* spp. dan Pemupukan Telur Cacing untuk Mendapatkan L2 Infektif

Kucing liar yang berhasil ditangkap dari beberapa pasar di Surabaya dimasukkan kandang dan dilakukan pemeriksaan feses terhadap keberadaan telur *Toxocara*

spp. Kucing yang tidak menderita toxocariasis dilepas, sedangkan yang menderita toxocariasis diberikan anthelmintika *piperazine adipate* dosis 50 mg/kg berat badan, kemudian diamati beberapa hari untuk mendapatkan cacing dewasa (*Toxocara* spp., *D. caninum* dan *Ancylostoma* spp.) yang keluar bersama feses kucing. Sedangkan *Toxocara canis* diperoleh dengan cara melakukan pengobatan terhadap anjing penderita toxocariasis dengan cara dan dosis yang sama.

Cacing *Toxocara* spp. yang didapat dibersihkan dengan dH₂O dan NaCl fisiologis, kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri yang berisi *phosphat buffer saline* (PBS) dan diinkubasi pada suhu 37°C untuk mendapatkan telur dan antigen-ES, selanjutnya telur cacing dipupuk dalam media PBS pada suhu kamar selama 21-28 hari, hingga didapatkan L2 (Koga *et al.*, 1992). Kemudian L2 dimurnikan dari kotoran dan jaringan dengan larutan sukrosa bertingkat atau teknik *gradien of preparation* (DrenchRite, 1996). Sebagian L2 diinfeksi pada mencit untuk mendapatkan L2 dorman dalam jaringan mencit (L2D).

4.7.2 Isolasi material *excretory-secretory* (ES) sbg Ag pd Ig G ELISA

Cacing *Toxocara cati* yang dikoleksi dari anjing dan kucing penderita toxocariasis dimasukkan ke dalam dua gelas piala yang berbeda. Larutan PBS sebelum digunakan dihangatkan dalam *waterbath* pada suhu 37°C; Setiap 20 ekor cacing ditambah 50 ml PBS dalam gelas piala diinkubasikan dalam *waterbath* dengan suhu 37°C selama 15-20 menit, larutan PBS diganti dengan PBS yang baru dan diinkubasikan dalam *waterbath* pada suhu 37°C selama 15 menit sampai 1 jam; seluruh cacing yang masih hidup dan bersih dipindahkan ke dalam PBS yang baru dan diinkubasikan dalam *waterbath* pada suhu 37°C selama 4 jam; Kemudian cacing diambil, cairan yang tertinggal disaring dengan filter plastik T200 (setara dengan 25 µm), filtrat

merupakan material ES dikoleksi dan disimpan pada suhu -80°C (50 ml/botol), sedangkan residu mengandung telur *Toxocara cati* (Kusnoto, 2009).

4.7.3 Pembuatan Homogenat Cacing Dewasa

Cacing Dewasa *Toxocara* spp., *D. caninum* dan *Ancylostoma* spp. hasil koleksi dibersihkan dengan PBS kemudian masing-masing diambil 10 ekor dimasukkan cawan porselin dan digerus secara manual. Ke dalam cawan porselin ditambahkan PBS 10 ml, setelah diratakan larutan dimasukkan ke dalam tabung sentrifus kemudian disonikasi pada frekuensi 35 kHz dengan pola 3 x 60 detik dengan interval istirahat 60 detik. Suspensi tersebut kemudian dihancurkan lagi dengan bantuan 10% detergen garam natrium N-lauroilsarkosin serta dipusingkan pada 5.000 rpm (3000 g) selama 15 menit. Supernatan diambil dan dipusingkan kembali pada 35.000 rpm (10.000 g) selama 25 menit. Pelet dan supernatan dipisahkan, selanjutnya pelet disimpan untuk bahan imunisasi (Imunogen) pada mencit.

4.7.4 Isolasi dan Pembuatan homogenat L2D *T. cati*

Sebanyak 5 ekor mencit diinfeksi L2 *T. cati* dengan dosis tinggi (2000/ekor), empat hari kemudian mencit tersebut dikorbankan. Jaringan cacing dewasa disiapkan untuk pembuatan hotubuh mencit dicuci dengan PZ, kemudian dicincang kecil-kecil (hingga berbentuk kubus dengan sisi 0,5 ml). Jaringan yang sudah dicincang dicuci kembali dengan PBS, kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri, ditambahkan tripsin 10% dan diinkubasi dengan suhu 37°C selama 90 menit. Larva stadium kedua (L2D) yang keluar dari jaringan mencit dipisahkan dari jaringan dan dikumpulkan, kemudian dimasukkan ke dalam tabung sentrifus ukuran 12 ml yang berisi PBS 2 ml.

Selanjutnya pembuatan homogenat L2D dilakukan dengan sonikasi pada frekuensi 35 kHz selama 3x30 detik, kemudian dihancurkan lagi dengan bantuan 10% detergen garam natrium N-lauroilsarkosin serta dipusingkan pada 2.000 rpm selama 5

menit (mulai tahap ini juga dilakukan terhadap antigen-ES). Supernatan dipanen dan dipusingkan kembali pada 35.000 rpm selama 35 menit pada suhu 4°C dengan penambahan 1% detergen. Pelet dan supernatan dipisahkan, selanjutnya pelet diresuspensi dengan PBS 1 ml, kemudian ditera kadar proteinnya dengan spektrofotometer dan disimpan untuk selanjutnya digunakan sebagai antigen pada pemeriksaan imunoglobulin dengan ELISA *sub-isotyping kit*.

4.7.5 Identifikasi cacing *T. cati*

Setelah diinkubasi, cacing dipotong bagian anterior dan posteriornya dan masing-masing bagian dimasukkan ke dalam *microtube* berlabel dan disimpan di dalam *freezer* atau langsung diproses. Bagian anterior dan posterior dibuat preparat permanen untuk keperluan identifikasi spesies berdasarkan morfologi secara mikroskopik, sedangkan tubuh bagian tengah (somatik) disiapkan untuk pembuatan homogenat. Preparat permanen *Toxocara* spp. yang sudah jadi dilakukan identifikasi berdasarkan Sprent (1958) dan Soulsby (1986) dan dilakukan dokumentasi dengan bantuan mikroskop Olympus dan Camera DP12.

4.7.6 Pembuatan preparat permanen (Pewarnaan *Semichen-Acetic Carmine*)

Untuk keperluan identifikasi spesifik spesies terhadap cacing *Toxocara* spp. yang diperoleh dari kucing, dilakukan pewarnaan bagian anterior dan posterior cacing dengan teknik *Semichen-Acetic Carmine*.

Beberapa bahan yang perlu disiapkan sebelum melakukan pewarnaan cacing adalah: Alkohol 70%, 85% dan 95%, Alkohol gliserin 5%, Hung's I, Hung's II, Larutan bibit Carmin, Alkohol asam dan Alkohol basa. Hung's I, larutan ini digunakan untuk *mounting*. Hung's II digunakan sebagai pengawet dan perekat *cover glass*.

Larutan bibit Carmin dibuat dengan cara berikut: 1) Asam glacial dimasukkan ke dalam Erlenmeyer ditambahkan air suling (dH₂O) sama banyak; 2) Ditambah-

kan Carmine (bubuk) berlebih; 3) Erlenmeyer disumbat dengan penyumbat tabung berlubang untuk memasukkan termometer ke dalam tabung; 4) Dipanaskan pada penangas air pada suhu 96-100°C 15 menit; 5) Tabung dan isi didinginkan secara cepat (dimasukkan ke dalam air dingin) dan bubuk Carmine yang tidak larut dibiarkan mengendap; 6) Kemudian disaring dengan kertas saring; 7) Filtrat yang diperoleh merupakan larutan bibit Carmine; 8) Saat akan digunakan diencerkan dengan alkohol 70% dengan perbandingan 1:2.

Alkohol asam dibuat dengan cara: 20 ml Alkohol 70% + 4-5 tetes HCl.

Alkohol basa dibuat dengan cara: 20 ml Alkohol 70% + NaHCO₃ secukupnya.

Cacing yang digunakan pada pembuatan preparat permanen dengan pewarnaan *Semichen-Acetic Carmine* dapat berupa cacing segar (*fresh*) maupun yang telah diawetkan dalam medium reservasi (alkohol gliserin 5%). Adapun teknik pewarnaannya adalah sebagai berikut: 1) Cacing difiksasi di antara dua *object glass*, kedua ujung *glass* diikat dengan benang (rafia); 2) *Object glass* dan cacing dimasukkan alkohol glicerin 5% selama 24 jam; 3) Kemudian dimasukkan ke dalam alkohol 70% selama 5 menit; 4) Dipindahkan ke dalam larutan Carmine yang sudah diencerkan, dibiarkan selama ± 8 jam bergantung ketebalan kutikula cacing; 5) Cacing dapat dilepas dari fiksasi (*object glass*) dan dimasukkan ke dalam alkohol asam selama 2 menit; 6) Dipindahkan ke dalam larutan alkohol basa selama 20 menit; 7) Kemudian dilakukan dehidrasi bertingkat dengan alkohol, sebagai berikut: Alkohol 70% ⇒ selama 5 menit, Alkohol 85% ⇒ selama 5 menit dan Alkohol 95% ⇒ selama 5 menit; 8) Dilakukan *mounting* dalam larutan Hung's I selama 20 menit; 9) Cacing diambil dari larutan Hung's I, diletakkan pada *object glass* yang bersih dan ditetaskan larutan Hung's II secukupnya di atas cacing tersebut, kemudian ditutup dengan *cover glass*; dan 10) Preparat permanen dikeringkan dalam inkubator pada suhu 37°C, kemudian ditaruh di suhu ruang untuk pendinginan dan siap digunakan.

4.7.7 Perlakuan pada mencit (Imunisasi dan Infeksi)

Penelitian tahap I, yaitu tahap pengujian antigen spesifik *Toxocara* spp., Sebanyak 40 ekor mencit dibagi menjadi lima kelompok perlakuan secara acak, perlakuan (P1-P4) diimunisasi dengan protein dari homogenat sebagai berikut: P1, cacing dewasa *T. cati*; P2, cacing dewasa *T. canis.*; P3, cacing dewasa *Ancylostoma* sp.; P4, cacing dewasa *D. caninum*; dan P5, diberi adjuvan vaksin sebagai kontrol. Penyuntikan pertama dilakukan dengan penambahan *complete Freund's adjuvant* sama banyak, kemudian setiap dua minggu di-*booster* dengan protein yang sama dan penambahan *incomplete Freund's adjuvant*. *Booster* dilakukan sebanyak dua kali dengan dosis protein sebesar 200 µg/ekor untuk semua penyuntikan. Dua minggu setelah *booster* terakhir dilakukan pengambilan darah mencit. Serum dipisahkan dan ditera antibodinya terhadap antigen spesifik *T. cati* dengan *indirect-ELISA*.

Penelitian tahap II, uji subkelas IgG dominan. Sebanyak 6 ekor mencit diinfeksi dengan L2 *T. cati*. Aplikasi infeksi dilakukan secara per oral. Pengambilan darah mencit dilakukan melalui ekor pada hari 0, 7, 14, dan 28, serum dipisahkan untuk ditera subkelas imunoglobulinnya, yaitu IgG1, IgG2 α , IgG2 β dan IgG3 dengan *ELISA sub-isotyping kit*.

4.8 Analisis Data

Data yang diperoleh pada Tahun I berupa karakter morfologi, berat molekul protein cacing dan karakter protein spesifik cacing *T. cati* disajikan secara diskriptif, akan tetapi penghitungan BM protein hasil *running* dilakukan dengan menggunakan rumus korelasi regresi.

Data yang diperoleh dari Penelitian Tahun II terdapat dua macam. Tahap I, yaitu nilai *optical density* (OD) serum mencit yang diimunisasi dengan berbagai

homogenat, dianalisis dengan *Oneway Anova*. Tahap II, nilai *optical density* (OD) serum mencit yang diimunisasi L2 *T. cati* dengan waktu pengamatan (hari) dan jenis subkelas IgG yang berbeda dianalisis dengan *Anova Factorial*.

Analisis statistik menggunakan *statistical product and service solution* (SPSS) for Windows rel. 20.

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Hasil Penelitian Tahun I

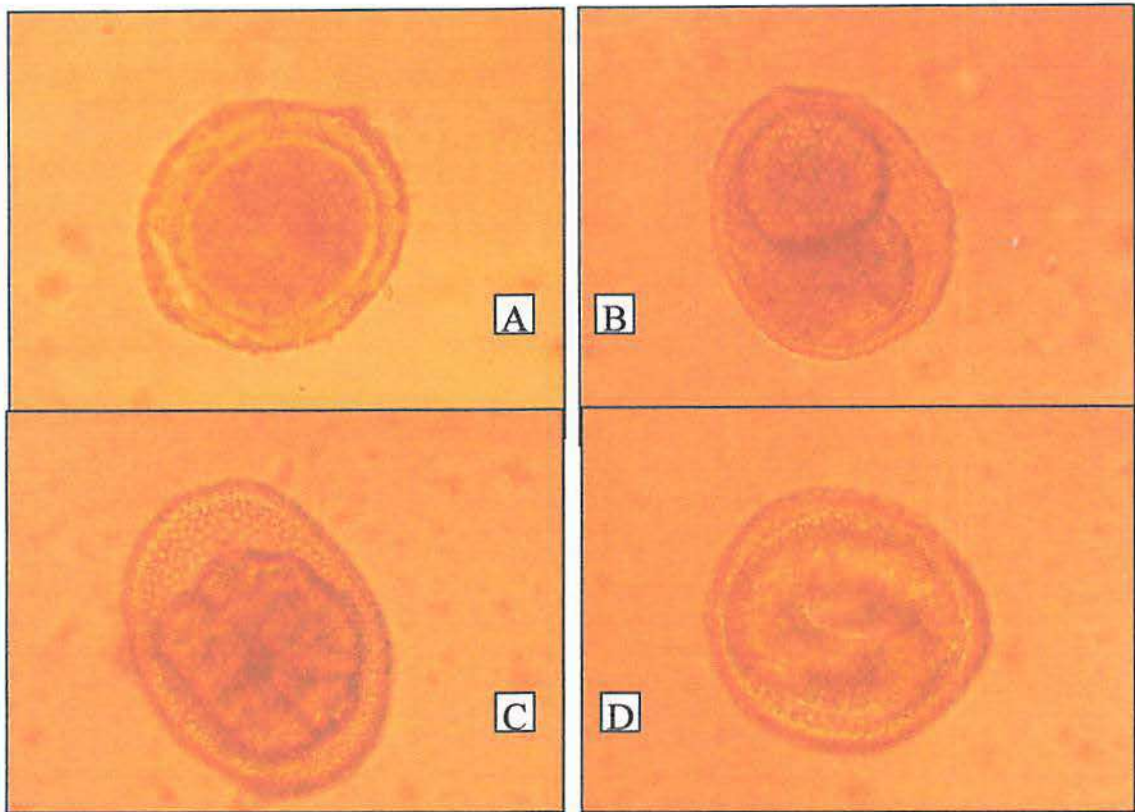
5.1.1 Hasil isolasi cacing *Toxocara cati*

Untuk mengidentifikasi *Toxocara cati* secara morfologik telah dilakukan pengamatan dengan bantuan mikroskop inverted, sinar dan bisekting. Hasil pengamatan tersebut tampak pada Gambar 5.1 sampai dengan 5.4.

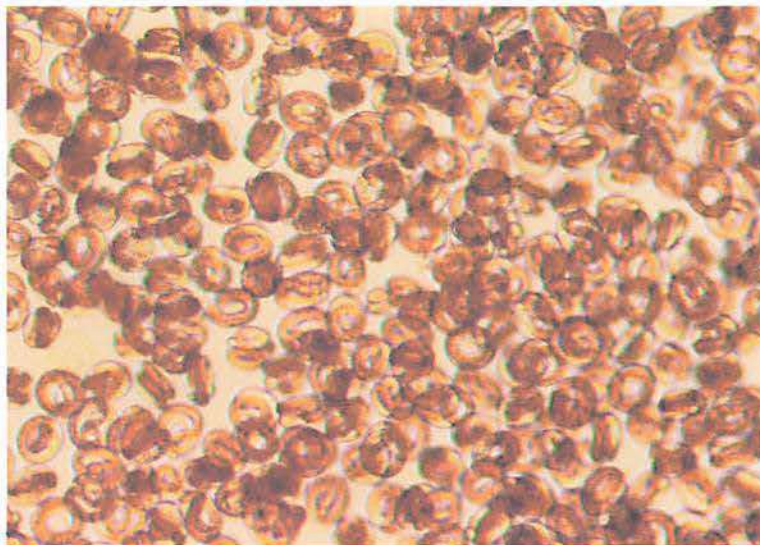


Gambar 5.1 Cacing *Toxocara cati* dewasa hasil isolasi dari saluran pencernaan kucing .

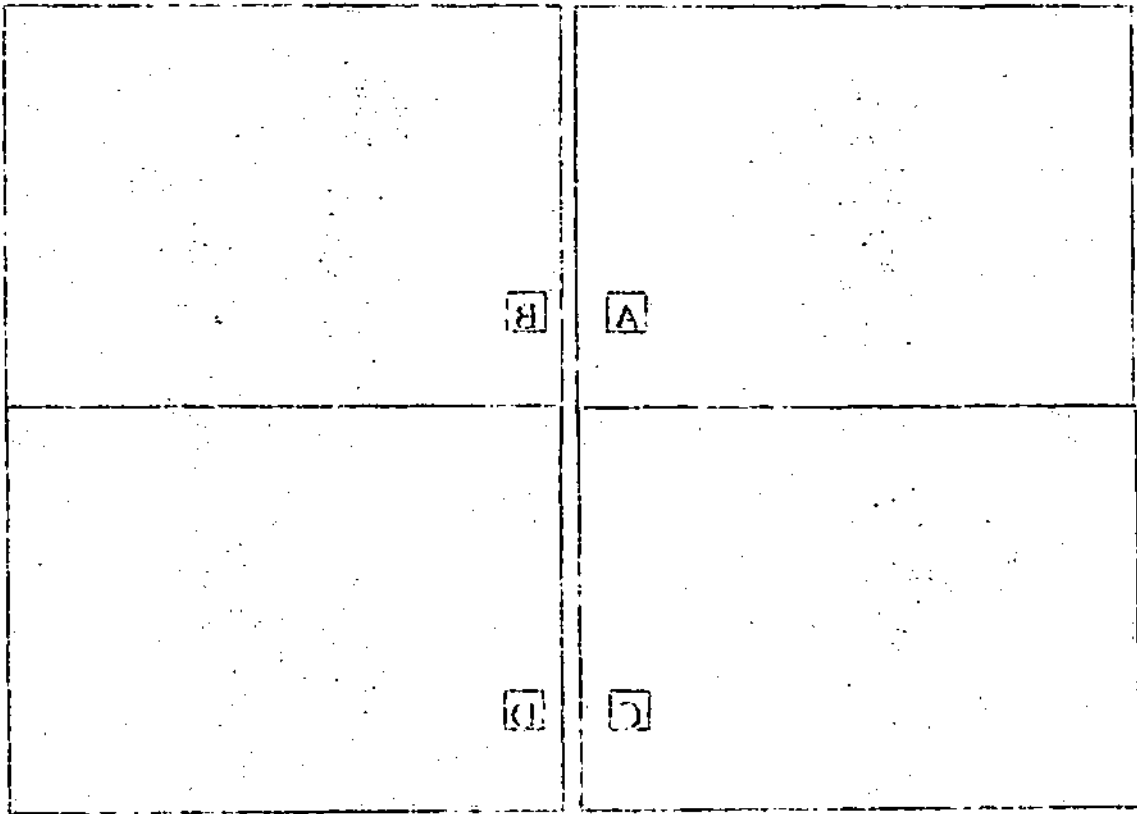
Hasil isolasi telur cacing baik dari inkubasi cacing dewasa maupun dari feses kucing penderita toxocariasis dan perkembangannya hingga larva stadium pertama (L1) didokumentasikan pada Gambar 5.2. Untuk memperoleh larva stadium kedua (L2) pada penelitian ini dilakukan pemupukan telur *T. cati* dalam petridish berisi media *phosphate buffer saline* (PBS) pada suhu kamar. Perkembangan telur hingga mencapai L2 diamati dengan menggunakan mikroskop inverted (M=100x dan 400x). setelah 28 hari pasca pemupukan dilakukan pemanenan L2, seperti tampak pada Gambar 5.3.



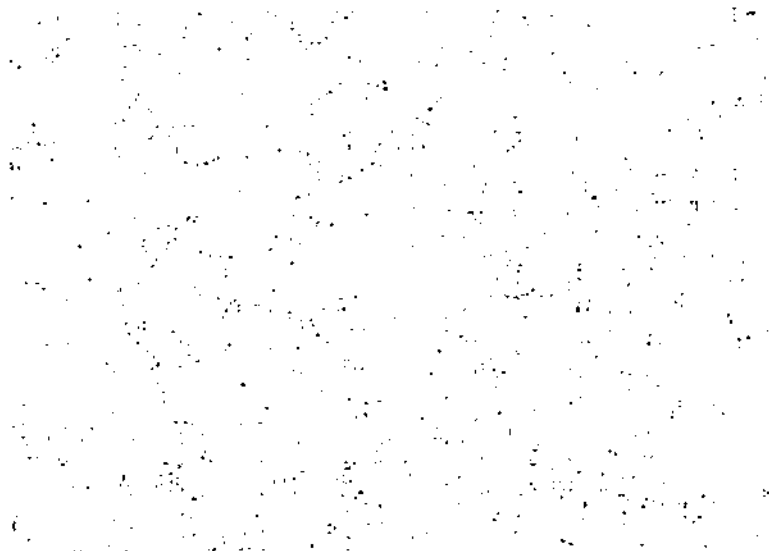
Gambar 5.2 Hasil identifikasi telur cacing *T. cati* dan perkembangannya hingga mencapai L1. Pembesaran = 400x, A = Telur cacing (1 sel), B = 2 sel, C = Morula, dan D = L1.



Gambar 5.3 Larva stadium kedua (L2) cacing *T. cati* hasil pemupukan telur *T. cati*. Pembesaran 100x



Gambar 2.5 Hasil identifikasi sel sel cacing A dan perkembangan sel sel cacing B = 2 sel. C = Motile dan D = L1.
 Gambar 2.6 Hasil identifikasi sel sel cacing A dan perkembangan sel sel cacing B = 2 sel. C = Motile dan D = L1.



Gambar 2.7 Hasil identifikasi sel sel cacing A dan perkembangan sel sel cacing B = 2 sel. C = Motile dan D = L1.
 Gambar 2.8 Hasil identifikasi sel sel cacing A dan perkembangan sel sel cacing B = 2 sel. C = Motile dan D = L1.

Larva stadium kedua dorman (L2 dorman) cacing *T. cati* yang berhasil dipreparasi dari jaringan mencit diamati menggunakan mikroskop inverted (M=100x dan 400x). Hasil pengamatan L2 dorman *T. cati* didokumentasikan dengan bantuan mikroskop dan camera digital DP 12 seperti tampak pada Gambar 5.4.



Gambar 5.4 Larva stadium kedua dorman (L2 dorman) cacing *T. cati* hasil isolasi dari jaringan mencit yang diinfeksi L2 *T. cati*. Pembesaran 100x

Telur cacing yang diperoleh dari inkubasi cacing dewasa, selanjutnya dilakukan pemupukan untuk mendapatkan larva stadium kedua (L2). Pengamatan perkembangan telur *T. cati* secara mikroskopik dengan pembesaran 400x dapat memperlihatkan perbedaan perkembangan telur cacing mulai satu sel (Gambar 5.2.A), dua sel (Gambar 5.2.B), morula (Gambar 5.2.C), dan L1 (Gambar 5.2.D). Larva stadium pertama dicapai dalam waktu 7-8 hari, sedangkan L2 dicapai 21-28 hari pada masa pemupukan, hal ini sesuai dengan pendapat Levine (1978) dan Soulsby (1986). Larva stadium pertama (L1) dapat dibedakan dengan L2, yaitu pada L1 tampak struktur masih kompak berisi larva dengan ukuran masih besar, pendek dan warna yang gelap dari bagian anterior sampai

posterior, sedangkan L2 (Gambar 5.3) tampak berisi larva dengan ukuran lebih kecil tetapi panjang dengan warna terang (putih) kurang lebih separo panjang tubuh dari bagian anterior.

Untuk keperluan pembuatan L2 dorman diperlukan L2 dalam jumlah besar, karena untuk pembuatan homogenat L2 dorman diperlukan $\pm 5 \times 10^5$ agar diperoleh kadar protein yang cukup, baik untuk keperluan *running* SDS-PAGE, *blotting* maupun imunisasi. Mengingat L2 dorman dibuat dengan menginfeksi L2 pada mencit kemudian L2 dorman dipreparasi dari jaringan mencit, maka jumlah L2 yang diinfeksi harus banyak sehingga diperoleh L2 dorman yang cukup. Namun kadar protein yang didapatkan pada homogenat L2 dorman ini tergolong rendah, sehingga pada *running* pertama pita protein (*band*) tidak jelas. Oleh karena itu, untuk meningkatkan kadar protein dalam homogenat dilakukan pemadatan dengan sentrifugasi 40.000 rpm pada suhu 4°C. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Kusnoto (2003) yang menyatakan, bahwa kadar protein spesimen dan kandungan zat lain selain protein dapat mempengaruhi ketebalan dan kejelasan *band* yang terbentuk, sehingga perlu optimasi lebih lanjut pada tahap ini sebelum dilanjutkan identifikasi protein.

5.1.2 Kadar Protein Homogenat Berbagai Stadium *T. cati*

Setelah dilakukan sonikasi, homogenat yang diperoleh ditera kadar proteinnya dengan teknik elektrokromatografi seperti terlihat pada Tabel 5.1.

Setelah dilakukan pengukuran kadar protein dengan teknik elektrokromatografi ternyata didapatkan kadar protein yang berbeda-beda. Hal ini karena secara material bahan yang ditera juga berbeda karena tidak dilakukan penghitungan jumlah larva dengan pasti. Hasil peneraan protein tersebut digunakan sebagai dasar penentuan dosis imunisasi pada pembuatan antibodi poliklonal dan pengenceran antigen pada uji ELISA.

Tabel 5.1 Kadar Protein Homogenat Berbagai Stadium *T. cati*

No.	Jenis Sampel (Homogenat)	Absorben		Kadar Protein ($\mu\text{g/ml}$)
		Sampel	Standart	
1	L1 <i>Toxocara cati</i>	0,060	0,866 ¹	3.034,642
2	L2 <i>Toxocara cati</i>	0,052	0,842 ²	2.704,988
3	L2-jaringan <i>T. cati</i>	0,058	0,854 ³	2.974,707
4	ESP <i>Toxocara cati</i>	0,065	0,866 ¹	3.287,529
5	Cacing Dewasa <i>T. cati</i>	0,376	0,866 ¹	19.017,090
6	Intestin <i>T. cati</i>	0,301	0,866 ¹	15.223,788

Keterangan: Kadar protein standart = 4,38 g%; 1 = Absorben standart pada pemeriksaan I; 2 = Absorben standart pada pemeriksaan II; 3 = Absorben standart pada pemeriksaan III.

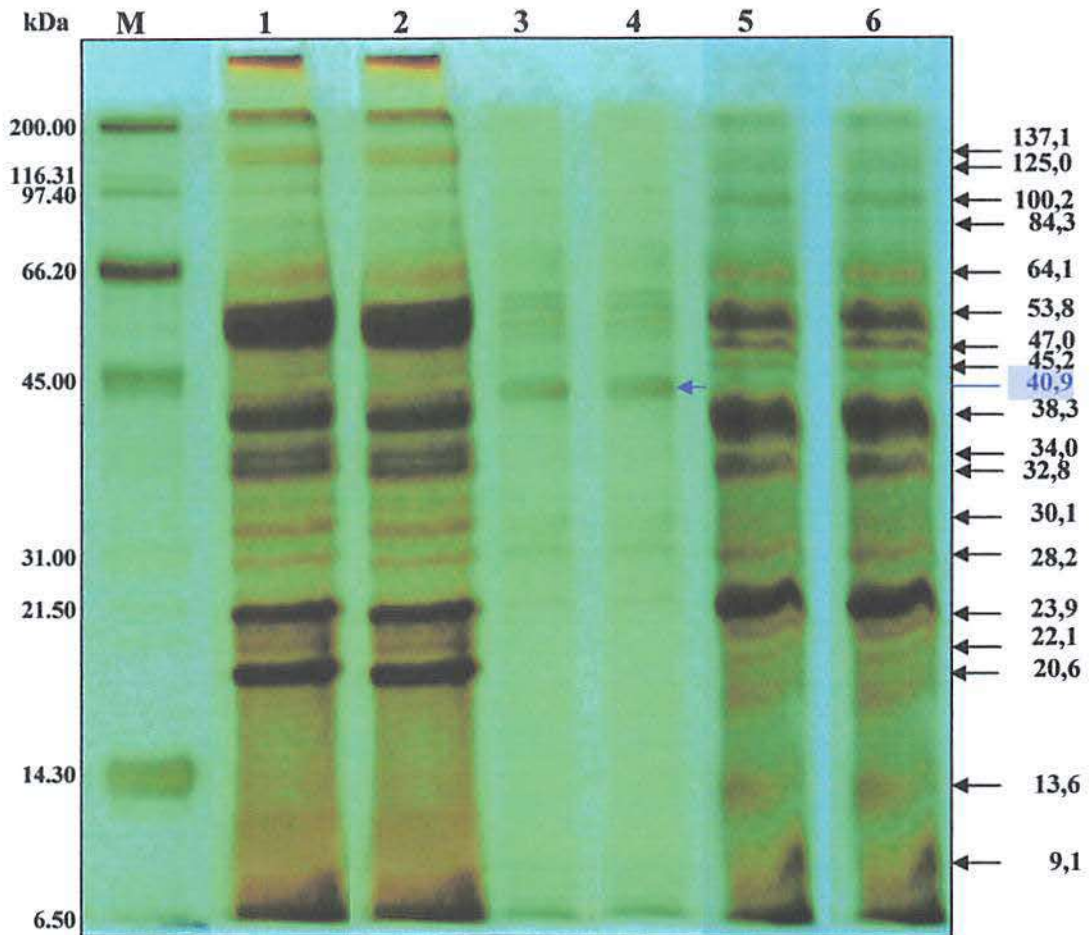
5.1.3 Hasil analisis protein *T. cati*

Hasil analisis protein cacing *Toxocara cati* dewasa dan L2 dorman yang dilakukan dengan teknik *sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) dapat dilihat pada Gambar 5.5 dan 5.6. Penghitungan masa molekular relatif (MR) protein *T. cati* dewasa (intestin, material ES, dan *whole worm extract*) secara lengkap maupun analisis regresi antara nilai *retardation factor* (RF) dan MR pada marker dapat dilihat pada Lampiran 1. Berdasarkan analisis regresi tersebut didapatkan nilai $b_0 = 5,574$; $b_1 = - 4,398$; $b_2 = 6,399$; dan $b_3 = -3,794$ sehingga diperoleh persamaan garis regresi, $y = 5,574 - 4,398x + 6,399 x^2 - 3,794 x^3$.

Pada Gambar 5.5 tampak beberapa pita protein berturut-turut dari atas ke bawah adalah protein dengan MR 137,1, 125,0, 100,2, 84,3, 64,1, 53,8, 47,0, 45,2, 38,3, 34,0, 32,8, 29,4, 27,3, 23,9, 22,1, 20,6, 13,6, dan 9,1 kDa dengan ekspresi yang bervariasi. Adapun pita protein dengan MR 40,9 kDa hanya tampak pada kolom 3-4 yaitu protein ES *T. cati*.

Hasil analisis protein L2 dorman *T. cati* dapat dilihat pada Gambar 5.6, sedangkan penghitungan MR protein L2 dorman secara lengkap maupun analisis regresi antara nilai RF dan MR pada marker dapat dilihat pada Lampiran 2. Berdasarkan analisis

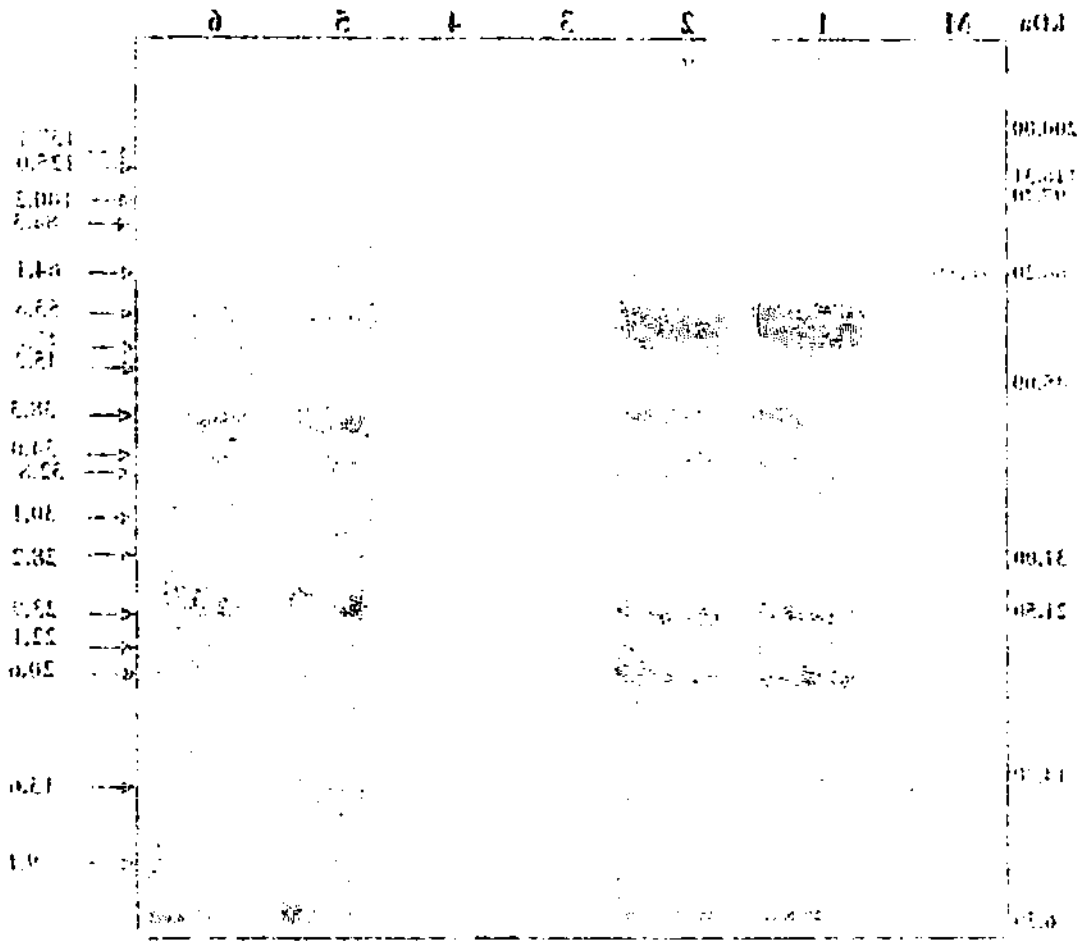
regresi tersebut didapatkan nilai $b_0 = 5,476$; $b_1 = -4,475$; $b_2 = 7,64$; dan $b_3 = -4,836$ sehingga diperoleh persamaan garis regresi, $y = 5,476 - 4,475x + 7,64x^2 - 4,836x^3$.



Gambar 5.5 Hasil analisis protein dari berbagai homogenat *Toxocara cati* dengan teknik SDS-PAGE. M = marker; 1-2= intestin *T. cati* dewasa; 3-4 = ES *T. cati*; 5-6 = whole worm extract.

Pada Gambar 5.6 kolom 1 dan 2 adalah pelet dari homogenat setelah disentrifugasi, terlihat 18 *band* yang terbentuk, sedangkan pada kolom 3 dan 4 adalah supernatannya tidak terbentuk *band* sama sekali. Namun, di antara 18 *band* yang terbentuk terdapat tujuh *band* yang tampak lebih jelas, yaitu protein dengan MR 36,6, 32,8, 30,8, 28,5, 18,3, 12,2 dan 8,8 kDa, sedangkan *band* yang lain tampak

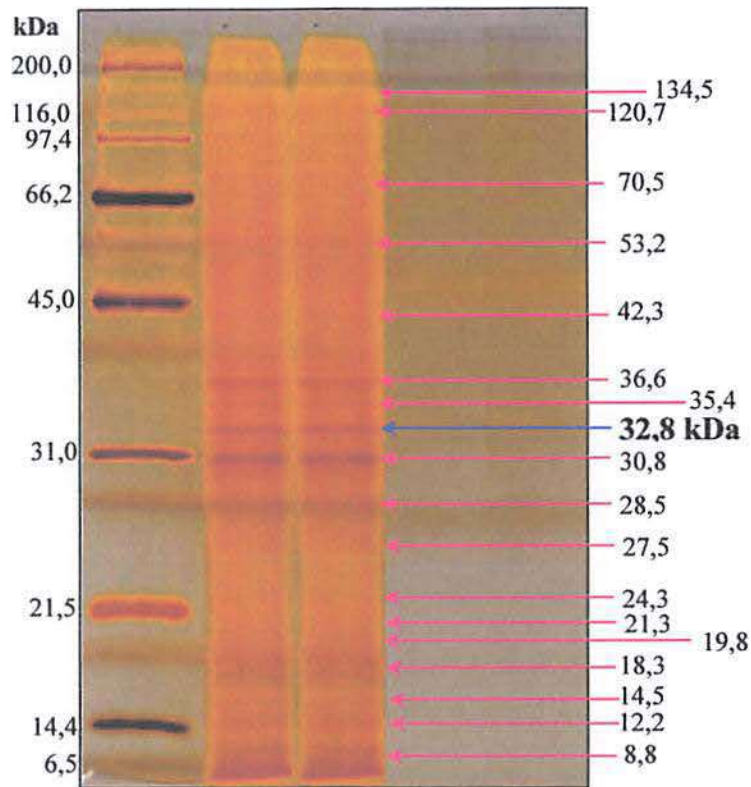
regresi tersebut didapatkan nilai $b_1 = -1,432$; $b_2 = 7,04$; dan $b_3 = -1,230$ sehingga diperoleh persamaan garis regresi $\hat{y} = 24,70 - 1,432x_1 + 7,04x_2 - 1,230x_3$



Gambar 2. Hasil analisis protein dari berbagai fraksi serum Wistar-Kyoto cow dengan teknik SDS-PAGE. M = marker 1-10, fraksi X cow dengan 2-4 = 1-2. X cow 2-8 = *Wistar-Kyoto cow*.

Pada Gambar 2.6 kolom 1 dan 2 adalah hasil dari homogenisasi sel darah putih dari sapi. Hasilnya menunjukkan bahwa pada kolom 1 dan 2 adalah hasil dari homogenisasi sel darah putih dari sapi. Hasilnya menunjukkan bahwa pada kolom 1 dan 2 adalah hasil dari homogenisasi sel darah putih dari sapi. Hasilnya menunjukkan bahwa pada kolom 1 dan 2 adalah hasil dari homogenisasi sel darah putih dari sapi.

diekspresikan lebih *smear* yaitu protein dengan MR 134,5, 120,7, 70,5, 53,2, 42,3, 35,4, 27,5, 24,3, 21,3, 19,3, dan 14,5 kDa.



Gambar 5.6 Hasil analisis protein L2 dorman *T. cati* dengan teknik SDS-PAGE. M = marker (Sigma); kolom 1-4 = homogenat L2 dorman *T. cati*; kolom 1-2 = pelet; kolom 3-4 = supernatan.

5.1.4 Produksi Antibodi Poliklonal Anti-*T. cati* pada Kelinci

Untuk mengetahui imunogenisitas protein L2, L2-jaringan dan cacing dewasa *Toxocara cati* dan memenuhi kebutuhan antibodi anti-*T. cati* tersebut yang akan digunakan pada proses karakterisari protein dengan teknik *Western blot*, maka dilakukan imunisasi pada kelinci sebanyak lima kali. Setelah delapan minggu pasca-imunisasi pertama dilakukan pengambilan darah kelinci dan dilakukan pemisahan serum dengan sentrifugasi pada 2000 rpm selama 5 menit. Serum yang didapat ditera terhadap kadar antibodinya dengan teknik *indirect-ELISA* menggunakan konjugat Ig G

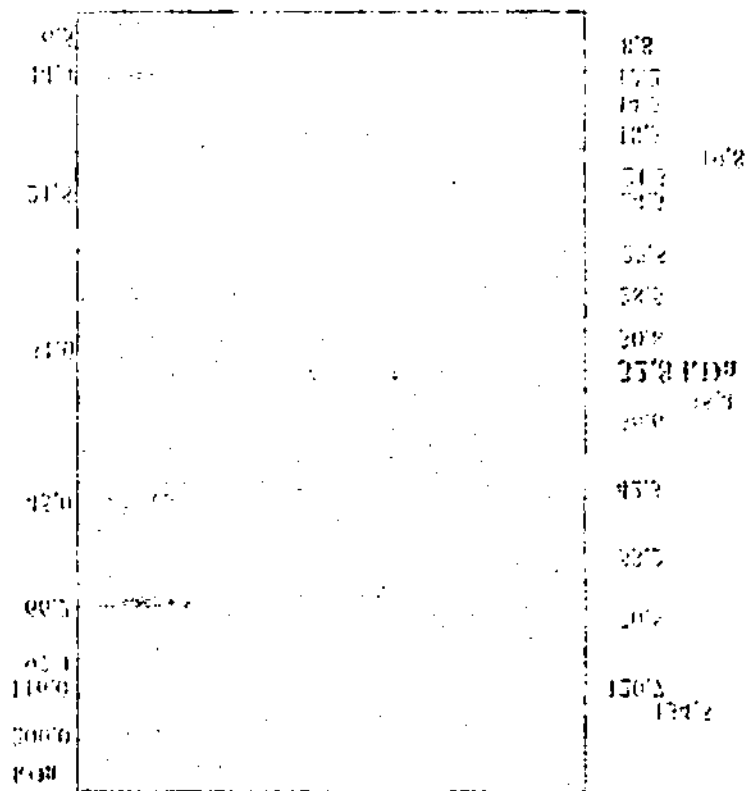
terhadap kadar antibodi yang terakumulasi dalam kondisi ini di dalam tubuh selanjutnya pada tahun 2000 dan tahun 2001. Selain itu, uji coba ini bertujuan untuk mengetahui bagaimana respon imun yang dihasilkan oleh tubuh manusia terhadap infeksi virus. Selain itu, uji coba ini bertujuan untuk mengetahui bagaimana respon imun yang dihasilkan oleh tubuh manusia terhadap infeksi virus. Selain itu, uji coba ini bertujuan untuk mengetahui bagaimana respon imun yang dihasilkan oleh tubuh manusia terhadap infeksi virus.

2.1.4. Produksi Antibodi Terhadap Anti-A yang pada kerusi

berisi kolom 3-4 = subkultur

masukan (titik): kolom 1-4 = respon imun 17 golongan A yang kolom 1-3 =

kolom 2-4 (titik) menunjukkan bahwa 17 golongan A yang terakumulasi dalam



51'2' 54'7' 31'2' 18'2' dan 14'2' 10'8'

tersebut menunjukkan bahwa jumlah virus yang terakumulasi dalam 17'4'2' 130'2' 10'2' 22'5' 45'2' 12'4'

anti-rabbit yang dinyatakan dalam titer antibodi dan dinyatakan dengan nilai *optical density* (OD) seperti terlihat pada Tabel 5.2.

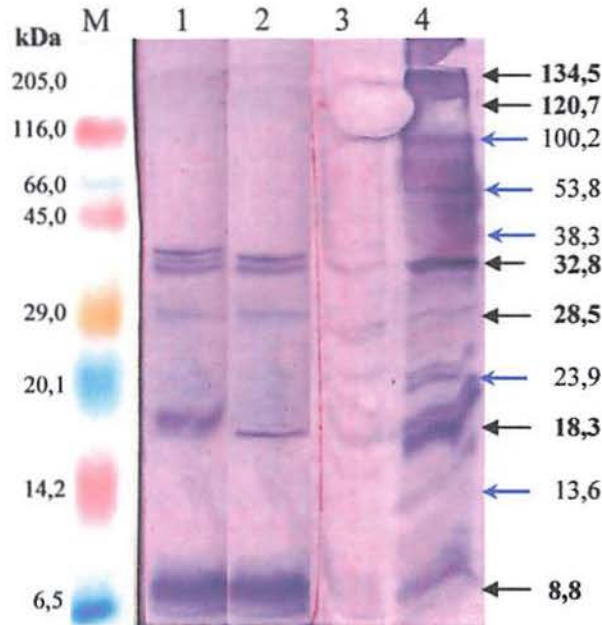
Tabel 5.2 Nilai *Optical Density* Serum Kelinci Sebelum dan Sesudah Dipapar dengan Protein *T. cati*

Perlakuan	Titer	Kisaran OD
Serum Kontrol	0	0,002-0,030
Imunisasi dengan homogenat L2 <i>T. cati</i>	40960	0,072-0,523
Imunisasi dengan homogenat L2 jaringan <i>T. cati</i>	640	0,024-0,555
Imunisasi dengan homogenat cacing dewasa <i>T. cati</i>	20480	0,067-0,688

Pada pemeriksaan titer antibodi dengan menggunakan antigen spesifik diperoleh hasil seperti tampak pada Tabel 5.2. Antibodi hasil imunisasi dengan L2 menghasilkan nilai titer paling tinggi dibanding kelompok lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa stadium L2 *T. cati* mengandung protein imunogenik yang dapat membangkitkan respon imun. Sementara itu pada L2 jaringan hanya mampu menghasilkan titer antibodi sebesar 640, hal ini karena masa imunisasi pada kelompok tersebut kurang lama, sehingga antigen L2 jaringan belum optimal dalam merangsang pembentukan antibodi.

5.1.5 Hasil identifikasi protein *T. cati* dengan teknik *Western blot*

Gambar 5.7 menunjukkan hasil *Western blot*, terdapat beberapa pita protein spesifik yang berbeda antar homogenat (kolom). Pada kolom 1 (L2 *T. cati*) tampak pita ikatan protein dengan antibodi anti-L2 dorman yang sama dengan kolom 2 (L2 dorman *T. cati*), yaitu pada protein dengan MR 134,5, 120,7, 32,8, 28,5 18,3 dan 8,8 kDa. Adapun pada kolom 3 (ES *T. cati*) dan kolom 4 (*whole worm extract* cacing dewasa *T. cati*) terdapat pita ikatan yang sama, hanya pada kolom 3 pita ikatan protein tampak lebih *smear*. Pita ikatan tersebut dari atas ke bawah masing-masing adalah pada protein dengan MR 134,5, 120,7, 100,2, 53,8, 38,3, 32,8, 28,5 23,9, 18,3, 13,6 dan 8,8 kDa. Semua pita ikatan pada kolom 1 dan 2 juga terdapat pada kolom 3 dan 4.



Gambar 5.7 Hasil karakterisasi protein *T. cati* dengan antibodi poliklonal anti-L2 dorman dari serum kelinci menggunakan teknik *Western blot*. M=marker; kolom 1 = L2 *T. cati*; kolom 2 = L2 dorman *T. cati*; kolom 3= ES *T. cati*; kolom 4 = *whole worm extract T. cati*.

Untuk menunjukkan afinitas protein *T. cati* terhadap antibodi kelinci anti-L2 dorman *T. cati* telah dilakukan identifikasi dengan teknik *Western blot*. Beberapa protein yang berhasil ditransfer pada membran nitroselulosa dan terikat secara spesifik terhadap antibodi anti-L2 dorman *T. cati* dari serum kelinci tampak dengan intensitas berbeda. Sebanyak 19 macam protein pada *T. cati* dewasa dan 18 macam protein pada L2 dorman yang dianalisis dengan SDS-PAGE tidak semua merupakan protein spesifik. Hasil identifikasi protein menunjukkan sebelas ikatan protein *T. cati* dewasa dengan antibodi anti L2 dorman dengan karakter yang berbeda. Ikatan tersebut terjadi pada protein dengan MR 134,5, 120,7, 100,2, 53,8, 38,3, 32,8, 28,5, 23,9, 18,3, 13,6 dan 8,8 kDa. Semua pita ikatan pada protein L2 dan L2 dorman juga terdapat pada *T. cati* dewasa. Adapun pita ikatan protein L2 *T. cati* dengan antibodi anti-L2 dorman sama dengan pada L2 dorman *T. cati*, yaitu pada protein dengan MR 134,5, 120,7, 32,8, 28,5, 18,3 dan 8,8 kDa. Hasil serupa didapatkan oleh Koedarto dkk. (2005) yang melakukan

penelitian karakterisasi protein 32 kDa dari L2 dorman *T.cati* menunjukkan enam ikatan protein dengan karakter yang berbeda, yaitu pada protein 133, 119, 32, 28, 18, dan 8 kDa.

Pada protein 134,5 dan 120,7 kDa menunjukkan pita ikatan yang amat tipis, hal ini berarti kedua protein tersebut kurang bersifat antigenik dan tidak banyak bermanfaat untuk bahan diagnostik. Meskipun teknik *Western blot* belum bisa menjamin sensitivitas protein tersebut sebagai bahan uji dan masih memerlukan uji lebih lanjut dengan teknik yang lain misalnya *dot blot* maupun ELISA. Namun demikian Kusnoto (2003) menyatakan, bahwa protein dengan MR tinggi biasanya terjadi reaksi silang dengan cacing lain bahkan lain klas. Lebih lanjut dinyatakan, bahwa dengan teknik *Western blot* antigen *F. gigantica* dikenali oleh antiserum terhadap larva kedua (anti-L2) *Toxocara cati* pada MR 133 kDa. Hal ini sesuai dengan pendapat beberapa peneliti lain, misalnya pengamatan dengan *immunoblotting* menunjukkan, bahwa komponen protein dengan MR 240 dan 206 kDa dari telur *F. gigantica*, *Toxocara vitulorum* dan *Moniezia expansa* dikenali oleh antiserum anti-cacing dewasa yang berbeda (Abdel-Rahman *et al.*, 2000). Antiserum anti-*F. gigantica* terjadi reaksi silang dengan antigen *T. vitulorum* pada MR 133 kDa, dan antigen *M. expansa* pada MR 210 kDa (Abdel-Rahman and Megeed, 2000). Hal ini menunjukkan bahwa polipeptida tersebut spesifisitasnya rendah karena dapat dikenali oleh antisera cacing lain dan pada pemeriksaan akan menghasilkan reaksi silang (*false possitive*).

Larva stadium kedua (L2) *T. cati* memiliki peranan penting pada perkembangan dan penyebaran toxocariasia karena merupakan stadium infeksi dari *Toxocara spp.* Toxocariasis bersifat zoonosis dan telah dikenal di dunia dapat menimbulkan infeksi pada manusia yang disertai manifestasi klinik *visceral* atau *ocular* (Hubner *et al.*, 2001). Manusia dapat tertular karena makanan atau minuman terkontaminasi oleh telur infeksi atau larva jaringan terutama apabila pemasakan produk daging atau organ dari ternak yang kurang sempurna (Ito *et al.*, 1986). Namun demikian dinyatakan, bahwa sumber

utama infeksi pada manusia adalah tanah terkontaminasi dengan telur infeksius yang mengandung L2 (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). Larva dorman (L2) dapat ditemukan dalam jaringan somatik, organ paru, hati, ginjal dan mata bahkan dapat mencapai otak (Havasiova-Reiterova *et al.*, 1995; Uga *et al.*, 1990).

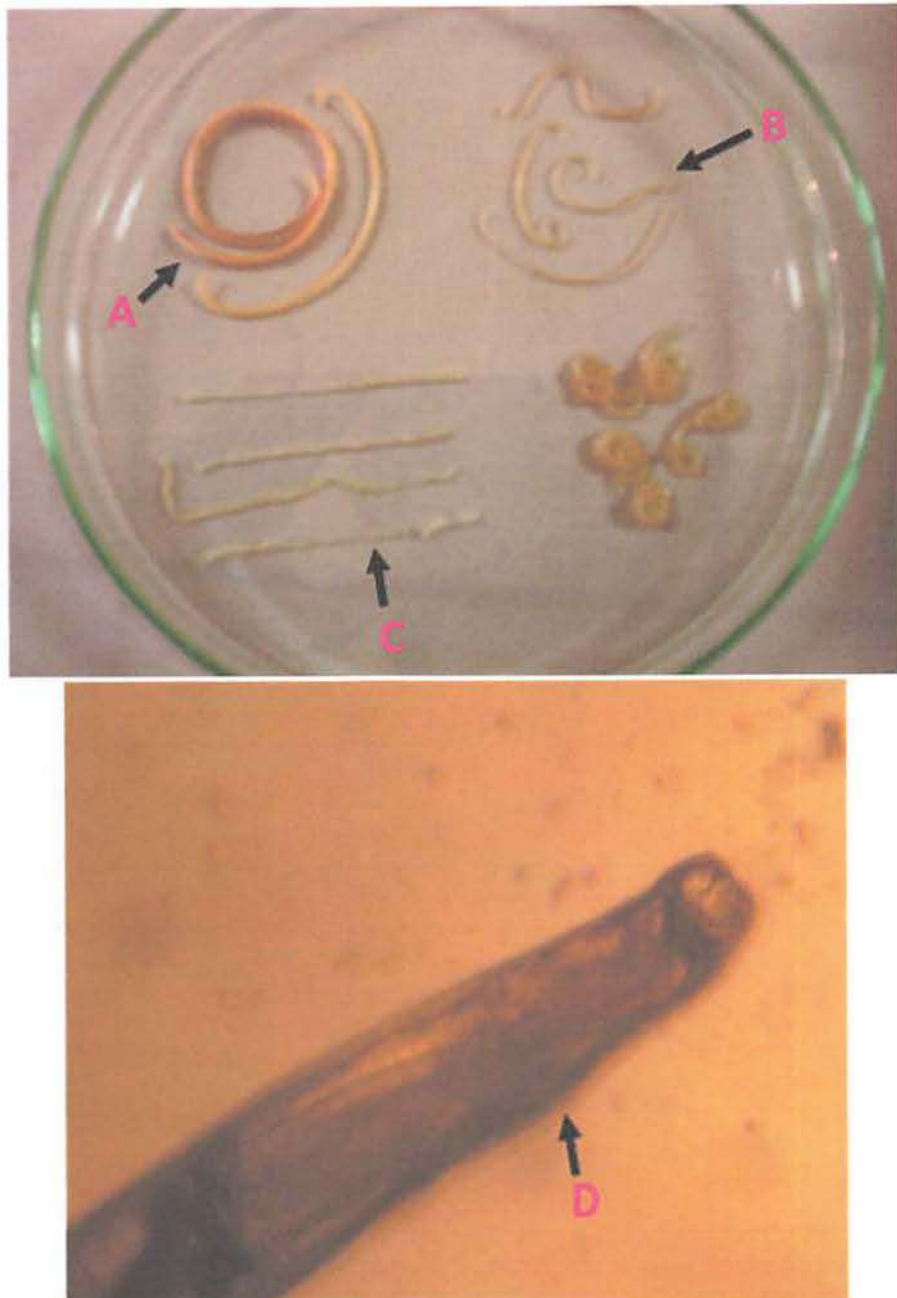
Berdasarkan gejala klinik, toxocariasis pada manusia diklasifikasikan menjadi *visceral toxocariasis* atau *visceral larva migrans* (VLM) dan *ocular toxocariasis* atau *ocular larva migrans* (OLM). Mengingat telur dan cacing dewasa *Toxocara* spp tidak dapat ditemukan pada hospes transport, termasuk manusia, maka diagnosis secara konvensional berdasarkan pemeriksaan telur cacing dalam feses tidak dapat dilakukan, begitu juga diagnosis berdasarkan gejala klinis sulit dilakukan, karena gejala klinisnya sangat bervariasi sehingga memerlukan diagnosis secara imunologik (Uga *et al.*, 1990). Oleh karena itu pengamatan terhadap antibodi anti-L2 dorman menjadi penting karena stadium ini yang memicu respon imun hospes dalam membentuk imunoglobulin. Hal ini juga didukung kenyataan pada hasil identifikasi protein dengan *Western blot* bahwa protein (antigen) dari L2, L2 dorman maupun cacing dewasa baik protein ES maupun *whole worm extract* dapat berikatan dengan antibodi anti-L2 dorman dari serum kelinci.

Berdasarkan hasil preparasi protein dengan teknik SDS-PAGE maupun identifikasi protein dengan *Western blot*, tampak spesifikasi protein dengan MR 134,5, 120,7, 32,8, 28,5 18,3 dan 8,8 kDa. Dari keenam pita ikatan dengan antibodi anti-L2 dorman pada protein 32,8, 18,3 dan 8,8 kDa tampak lebih jelas, hal ini menunjukkan bahwa protein tersebut merupakan antigen sangat potensial untuk dikembangkan menjadi bahan diagnostik, walaupun masih memerlukan uji lebih lanjut.

5.2 Hasil Penelitian Tahun II

5.2.1 Hasil Isolasi Cacing Dewasa

Hasil isolasi cacing dewasa dari saluran pencernaan anjing dan kucing disajikan pada Gambar 5.8.



Gambar 5.8 Hasil isolasi cacing dewasa dari saluran pencernaan anjing dan kucing. A = *Toxocara canis*; B = *Toxocara cati*; C = *Diphylidium caninum* dan D = *Ancylostoma caninum*.

2.2 Hasil Penelitian Tahap II

2.2.1 Hasil Isolasi Cacing Besaran

Hasil isolasi cacing besaran dari saluran pencernaan sapi yang disajikan pada Gambar 2.8.

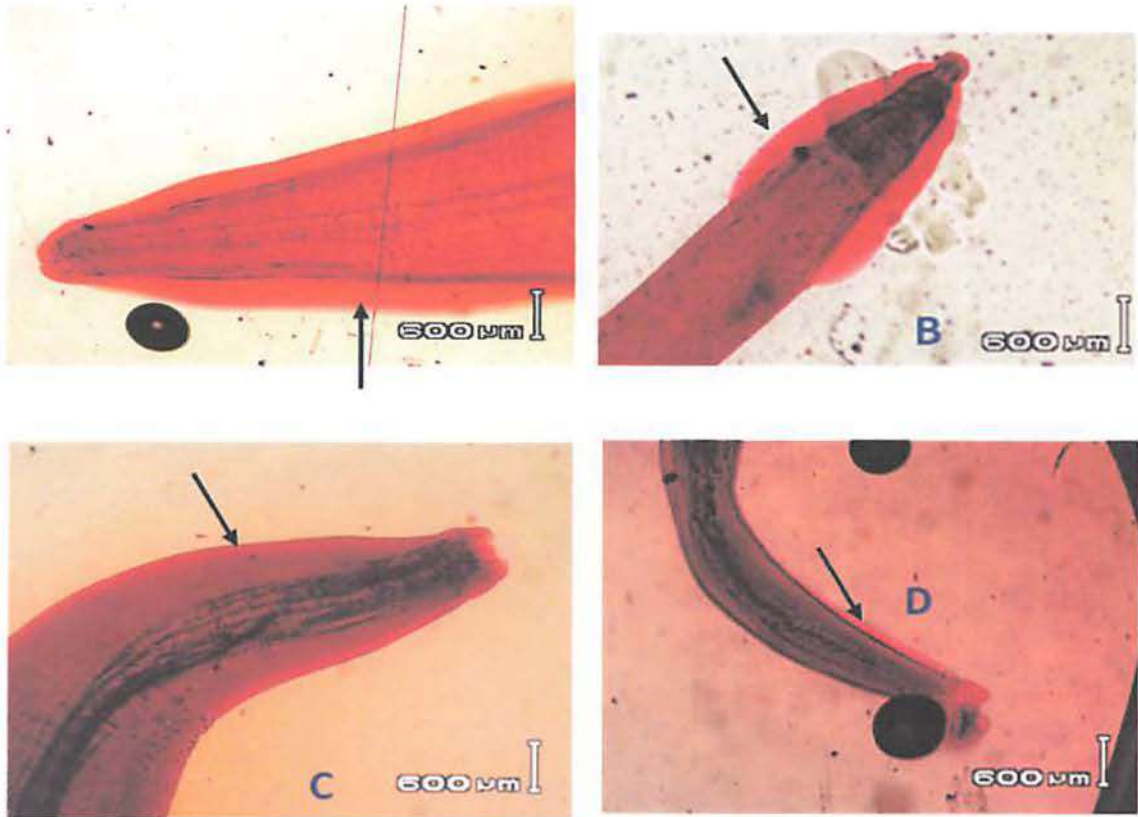
Gambar 2.8.



Gambar 2.8. Hasil isolasi cacing besaran dari saluran pencernaan sapi yang disajikan pada Gambar 2.8. A = Yolk cell, B = Yolk cell, C = Lipid droplet, D = Intestine, E = Intestine, F = Intestine, G = Intestine, H = Intestine, I = Intestine.

5.2.2 Identifikasi Cacing Dewasa *Toxocara* spp.

Identifikasi cacing dewasa *Toxocara* spp. dilakukan dengan pembuatan preparat permanen pada bagian anterior cacing menggunakan pewarnaan *Semichen-Acetic Carmine*. Hasil pembuatan preparat tersebut disajikan pada Gambar 5.9.



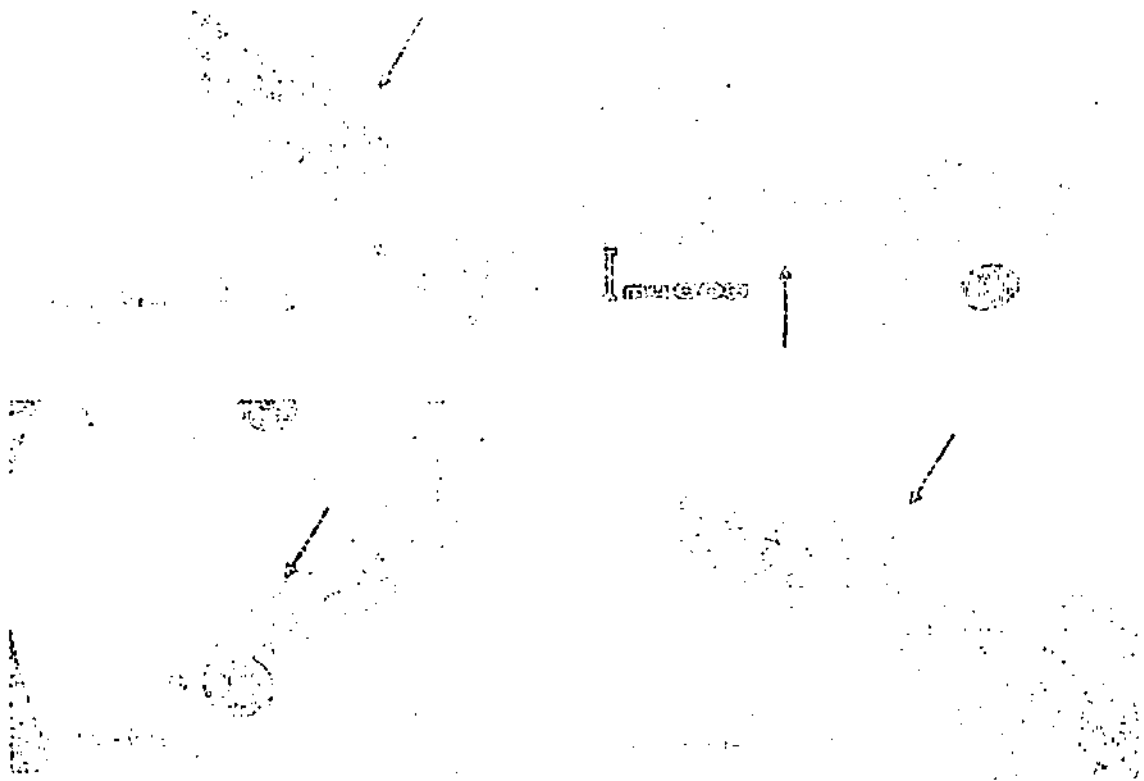
Gambar 5.9 Bagian anterior *Toxocara* spp. Tanda panah (→) = *cervical allae*; A-B = teridentifikasi sebagai *T. canis* (A) dan *T. cati* (B), C-D = tidak teridentifikasi.

5.2.3 Isolasi dan Pembuatan homogenat L2D *Toxocara cati*

Dokumentasi hasil isolasi larva stadium II dorman (L2D) *Toxocara cati* disajikan pada Gambar 5.4. Larva tersebut kemudian dihancurkan dengan sonikator, selanjutnya homogenat digunakan sebagai antigen pada pemeriksaan serum dengan teknik ELISA.

2.2.3 Identifikasi Cacing Dewasa *Ascarum* spp.

Identifikasi cacing dewasa *Ascarum* spp. dilakukan dengan peninjauan preparat pembenihan pada bagian anterior cacing menggunakan mikroskop cahaya. Hasil preparat preparat tersebut disajikan pada Gambar 2.9.



Gambar 2.9. Bagian anterior *Ascarum* spp. (tanda panah (-)) dan posterior *Ascarum* spp. (tanda panah (+)) dan *Ascarum* spp. (tanda panah (-)) dan *Ascarum* spp. (tanda panah (+))

2.2.3 Isolasi dan Pembenihan Homogenat L2D *Ascarum* spp.

Dokumentasi hasil isolasi larva stadium II domain II domain (L2D) *Ascarum* spp. disajikan pada Gambar 2.4. Larva tersebut kemudian dibenarkan dengan serbuk sari.

teknik LISA.

5.2.4 Pengujian Antigen Spesifik *Toxocara* spp.

Hasil pemeriksaan antigenisitas protein *Toxocara cati* pada diagnosis toxocariasis dalam serum darah mencit yang diimunisasi berbagai homogenat cacing dengan teknik *indirect-ELISA* dan analisis statistik terhadap nilai OD yang diperoleh secara lengkap dapat dilihat pada Lampiran 3.

Antigen yang digunakan pada uji antigenisitas dengan teknik *indirect-ELISA* ini adalah protein 70 kDa dari ES L2D *T. cati*. Rata-rata nilai OD pada mencit yang diimunisasi dengan homogenat *T. cati* adalah sebesar 0,558 pada mencit yang diimunisasi homogenat *T. canis* 0,550 pada mencit yang diimunisasi homogenat *Ancylostoma* spp. sebesar 0,254, pada mencit yang diimunisasi homogenat *D. caninum* sebesar 0,247, sedangkan pada kontrol adalah sebesar 0,207. Setelah dilakukan analisis statistik dengan uji Anava terhadap hasil pembacaan nilai OD serum mencit tersebut dapat diketahui, bahwa terdapat perbedaan sangat bermakna ($p < 0,01$) diantara nilai OD serum mencit pada berbagai perlakuan.

Berdasarkan hasil analisis statistik dengan uji HSD 5% dapat diketahui bahwa, hasil pembacaan nilai OD serum mencit yang diimunisasi homogenate *T. cati* dan homogenat *T. canis* secara bermakna menunjukkan hasil lebih tinggi ($p < 0,05$) dibanding serum mencit yang diimunisasi *Ancylostoma* spp., *D. caninum* dan serum kontrol (Tabel 5.3).

Tabel 5.3 Rata-rata Nilai *Optical Density* Hasil Pengujian Antigenisitas Protein Murni terhadap Serum Mencit yang Diimunisasi Berbagai Homogenat

Antibodi	Rata-rata Nilai OD ₄₀₅ ± SD
Anti- <i>T. cati</i>	0,558 ^b ± 0,322
Anti- <i>T. canis</i>	0,550 ^b ± 0,322
Anti- <i>Ancylostoma</i> spp.	0,254 ^a ± 0,145
Anti- <i>D. caninum</i>	0,247 ^a ± 0,145
Kontrol (-) Serum	0,208 ^a ± 0,208

^{a, b} superskrip berbeda pada kolom sama menunjukkan perbedaan sangat bermakna ($p < 0,01$)

5.2.5 Hasil Pengamatan Deteksi Subkelas Imunoglobulin (Ig) G Serum Mencit yang Diinfeksi *Toxocara cati* dengan ELISA-Isotyping Kit

Pengamatan profil subkelas imunoglobulin (Ig) G serum mencit yang diinfeksi *Toxocara* spp. dengan ELISA-isotyping kit dilakukan terhadap Ig G1, Ig G2 α , Ig G2 β dan Ig G3. Data yang diperoleh berupa nilai *optical density* (OD) dianalisis dengan Anava Faktorial dengan variabel bebas subkelas Ig G dan waktu pengamatan (Lampiran 4).

Nilai OD serum mencit anti-*T. cati* terhadap waktu pengamatan berbeda pada berbagai subkelas Ig G juga menunjukkan perbedaan sangat bermakna ($p < 0,01$). Nilai OD rata-rata tertinggi didapatkan pada hari ke-28 yaitu sebesar $0,384 \pm 0,199$ yang menunjukkan perbedaan bermakna dengan waktu lain ($p < 0,05$), kemudian diikuti hari ke-7 dan ke-14 yaitu masing-masing sebesar $0,279 \pm 0,099$ dan $0,275 \pm 0,119$ yang keduanya tidak berbeda bermakna ($p > 0,05$) akan tetapi menunjukkan perbedaan bermakna ($p < 0,05$) dengan hari ke 28 maupun hari ke-0 (Tabel 5.4).

Tabel 5.4 Nilai OD Rata-rata dan Standar Deviasi (SD) Serum Mencit Anti-*T. cati* Terhadap Waktu Pengamatan pada Berbagai Subkelas Ig G

Waktu pengamatan (Hari ke...)	Rata-rata OD \pm SD
Hari ke-0	$0,175^a \pm 0,057$
Hari ke-7	$0,279^b \pm 0,099$
Hari ke-14	$0,275^b \pm 0,119$
Hari ke-28	$0,384^c \pm 0,199$

^{a, b} Superkrip berbeda pada kolom sama menunjukkan perbedaan bermakna ($p < 0,05$); SD= Standar Deviasi

Nilai OD rata-rata serum mencit anti-*T. cati* terhadap Ig G1, IgG2 α , IgG2 β dan IgG3 pada berbagai waktu pengamatan masing-masing adalah 0,227, 0,342, 0,374 dan 0,170 (Tabel 5.5). Nilai OD tersebut menunjukkan perbedaan sangat bermakna ($p < 0,01$)

antar subkelas Ig G tanpa memperhatikan waktu pengamatan. Berdasarkan uji HSD 5% dapat diketahui bahwa nilai OD tertinggi didapatkan pada Ig G2 β yang menunjukkan perbedaan tidak bermakna dengan Ig G2 α ($p>0,05$) akan tetapi keduanya berbeda bermakna dengan Ig G1 dan Ig G3 ($p<0,05$).

Tabel 5.5 Nilai OD Rata-rata dan Standar Deviasi (SD) Serum Mencit Anti-*T. cati* Terhadap Subkelas Ig G pada Berbagai Waktu Pengamatan

Subkelas Ig G	Rata-rata OD \pm SD
Ig G1	0,227 ^a \pm 0,084
Ig G2 α	0,342 ^b \pm 0,162
Ig G2 β	0,374 ^b \pm 0,148
Ig G3	0,170 ^a \pm 0,076

^{a, b}Superkrip berbeda pada kolom sama menunjukkan perbedaan bermakna ($p<0,05$); SD= Standar Deviasi

Berdasarkan hasil analisis statistik OD serum mencit anti-*T. cati* dengan uji Anava Faktorial diketahui terdapat interaksi ($p<0,05$) antara waktu pengamatan dan subkelas Ig G. Rata-rata, notasi dan SD nilai OD perlakuan kombinasi dapat dilihat pada Tabel 5.6. Rata-rata nilai OD untuk perlakuan kombinasi tertinggi didapatkan pada Hari-28 subkelas IgG2 β , hasil yang sama juga didapatkan Hari-28 subkelas Ig G2 α , Hari-14 subkelas IgG2 β dan Hari-7 pada IgG2 β , sedangkan nilai OD terendah didapatkan pada Hari-0 subkelas IgG3, yang tidak menunjukkan perbedaan bermakna ($p>0,05$) dengan Hari-0 subkelas IgG1, Ig G2 α , Ig G2 β ; Hari-7 subkelas IgG1, IgG3; Hari-14 subkelas IgG1, IgG3; Hari-28 subkelas IgG1 dan IgG3.

Tabel 5.6 Nilai OD Rata-rata dan Standar Deviasi Serum Mencit Anti-*T. cati* Terhadap pada Perlakuan Kombinasi Waktu dan Subkelas Ig G

Waktu	Subkelas Ig G	Rata-rata \pm SD
0 hari PI	Ig G1	0,168 ^{ab} \pm 0,019
	Ig G2 α	0,232 ^{abcd} \pm 0,046
	Ig G2 β	0,190 ^{abc} \pm 0,052
	Ig G3	0,110 ^a \pm 0,013
7 hari PI	Ig G1	0,230 ^{abcd} \pm 0,038
	Ig G2 α	0,314 ^{bcd} \pm 0,053
	Ig G2 β	0,365 ^{cde} \pm 0,072
	Ig G3	0,207 ^{abc} \pm 0,128
14 hari PI	Ig G1	0,243 ^{abcd} \pm 0,085
	Ig G2 α	0,306 ^{bcd} \pm 0,115
	Ig G2 β	0,400 ^{de} \pm 0,072
	Ig G3	0,153 ^{ab} \pm 0,029
28 hari PI	Ig G1	0,267 ^{abcd} \pm 0,129
	Ig G2 α	0,516 ^e \pm 0,222
	Ig G2 β	0,540 ^e \pm 0,115
	Ig G3	0,212 ^{abcd} \pm 0,022

^{a-e}Superskrip berbeda pada kolom sama menunjukkan perbedaan bermakna ($p < 0,05$)

Nilai OD serum mencit anti-*T. cati* tertinggi didapatkan pada hari ke-28 yang menunjukkan perbedaan bermakna dengan waktu lain ($p < 0,05$), kemudian diikuti hari ke-7 dan ke-14, sedangkan nilai OD terendah adalah hari ke-0. Pada serum mencit anti-*T. canis* OD tertinggi juga didapatkan pada hari ke-28, sedangkan nilai OD terendah adalah hari ke-0 yang tidak menunjukkan perbedaan bermakna ($p > 0,05$) dengan hari ke-7 dan ke-14. Hasil ini memberikan gambaran bahwa antigenisitas protein *T. cati* tampaknya lebih tinggi dibanding *T. canis*, pada sisi lain juga tampak bahwa antibodi yang terbentuk sebagai respons terhadap *Toxocara* spp. membutuhkan waktu yang cukup, dalam hal ini pada hari ke-28 merupakan waktu yang sudah mencukupi untuk respons tersebut. Hasil ini sesuai dengan pendapat Nunes *et al.* (1999) yang menyatakan, bahwa pengamatan dengan teknik ELISA menggunakan rabbit-IgG spesifik anti-

Toxocara canis dan antigen *excretory-secretory* untuk diagnosis toxocariasis sudah menunjukkan hasil positif setelah 20 hari setelah inokulasi. Morales *et al.* (2002) melakukan infeksi buatan, menyatakan bahwa respons imun kelinci terhadap *T. canis* terjadi sejak awal cenderung meningkat hingga hari-60 kemudian stabil hingga hari-210. Titer antibodi pertama kali dideteksi pada hari-15 setelah inokulasi dan peningkatan lebih cepat pada hari-28 hingga hari-58.

Nilai OD rata-rata serum mencit yang diinfeksi L2 *T. cati* tertinggi tanpa memperhitungkan waktu pengamatan didapatkan pada Ig G2 β yang menunjukkan perbedaan tidak bermakna dengan Ig G2 α ($p>0,05$), sedangkan nilai OD rata-rata terendah didapatkan pada Ig G1 dan Ig G3. Pada serum mencit anti-*T. canis* nilai OD tertinggi didapatkan pada Ig G2 α yang menunjukkan perbedaan tidak bermakna ($p>0,05$) dengan Ig G2 β , sedangkan OD terendah adalah Ig G1 dan Ig G3. Rata-rata nilai OD serum mencit yang diinfeksi L2 *T. cati* untuk perlakuan kombinasi tertinggi didapatkan pada Hari-28 subkelas Ig G2 β , hasil yang sama juga didapatkan pada Hari-28 subkelas Ig G2 α , Hari-14 subkelas Ig G2 β dan Hari-7 subkelas Ig G2 β , sedangkan OD serum mencit yang diinfeksi L2 *T. canis* untuk efek interaksi tidak menunjukkan perbedaan signifikan. Hasil pengamatan nilai OD secara kuantitatif tersebut seolah memberikan hasil yang sama antara serum mencit dari kedua kelompok (yang diinfeksi dengan L2 *T. cati* dan *T. canis*), yaitu subkelas Ig G dominan adalah IgG2 α dan IgG2 β , akan tetapi hasil tersebut belum memberikan gambaran yang jelas dan tepat, oleh karena itu perlu dilakukan pengamatan terhadap nilai OD secara kualitatif.

Respons imun seluler dan humoral dapat meningkat saat terjadi migrasi larva *Toxocara* spp. (Maizels *et al.*, 1993; Pritchard *et al.*, 1997), yang belakangan diketahui terdiri dari empat isotipe utama yaitu Ig M, Ig G, Ig A, dan Ig E (Auer and Aspöck, 1998; Obwaller, 2001; Soedarto, 2003). Pada peruntukan respons imun terhadap

patogenesis larva, ditemukan puncak kadar antibodi sapi dewasa pada 7 hari pasca infeksi. Puncak kedua terjadi pada saat L2 menetas dan migrasi larva ke organ *visceral* yang lain. Respons imun terhadap *Toxocara* spp. ternyata menggugah semua kelas imunoglobulin (Barriga and Omar, 1991), namun tampaknya Ig G2 lebih berperan dalam infeksi *Toxocara* spp. dari pada imunoglobulin yang lain (Rajapakse, 1992). Pada umumnya infeksi oleh parasit, khususnya cacing, ditandai dengan keberadaan imunoglobulin (Ig) E dan peningkatan kadar eosinofil. Peningkatan kedua 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.*, 2000). 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 CD₄⁺-Th₂, berperan dalam kontrol produksi Ig E dan Ig G1, sedangkan CD₈⁺-Th₁ menghasilkan interferon gamma (IFN γ) yang menghambat reaksi hipersensitivitas dan memacu produksi Ig G2.

BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini, dapat disimpulkan beberapa hal sebagai berikut.

- 1) Analisis protein dengan SDS-PAGE terhadap protein *T. cati* dewasa ditemukan beberapa protein antara lain protein dengan MR 137,1, 125,0, 100,2, 84,3, 64,1, 53,8, 47,0, 45,2, 38,3, 34,0, 32,8, 29,4, 27,3, 23,9, 22,1, 20,6, 13,6, dan 9,1 kDa. Sedangkan pada protein L2 dorman *T. cati* ditemukan beberapa protein antara lain protein dengan MR MR 134,5, 120,7, 70,5, 53,2, 42,3, 36,6, 35,4, 32,8, 30,8, 28,5, 27,5, 24,3, 21,3, 19,3, 18,3, 14,5, 12,2 dan 8,8 kDa.
- 2) Pada karakterisasi protein dengan *Western blot* didapatkan protein yang memiliki afinitas kuat terhadap antibodi anti-L2 dorman, yaitu protein L2 dan L2 dorman *T. cati* dengan MR 32,8, 28,5, 18,5 dan 8,8 kDa, sedangkan protein dengan MR 134,5, 120,7 tampak memiliki afinitas lemah. Pada *T. cati* dewasa terdapat 11 pita ikatan protein yaitu dengan MR 134,5, 120,7, 100,2, 53,8, 38,3, 32,8, 28,5 23,9, 18,3, 13,6 dan 8,8 kDa.
- 3) Ditinjau dari nilai OD pada ELISA, protein murni *Toxocara cati* memiliki antigenisitas yang sama terhadap serum anti-*T. cati* dan anti-*T. canis*, tetapi memiliki antigenisitas yang lebih rendah terhadap cacing lain (*Ancylostoma* spp. dan *D. caninum*).
- 4) Berdasarkan hasil ELISA-*isotyping*, subkelas Ig G spesifik (dominan) dalam serum mencit yang diinfeksi dengan L2 *T. cati* adalah IgG2 β .

6.2 Saran

Berdasarkan karakter dari protein L2 dan L2 dorman *T. cati* dan daya antigeniknya terhadap antibodi secara spesifik, maka disarankan bahwa protein dengan MR 32,8, 28,5, 18,5 dan 8,8 kDa dapat digunakan sebagai bahan diagnostik terhadap

kasus toxocariasis. Untuk itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mencoba membuktikan keempat protein tersebut sebagai bahan diagnostik pada kasus toxocariasis, baik pada infeksi dini maupun lanjut.

Untuk meningkatkan nilai spesifisitas hasil pemeriksaan antibodi terhadap anti-*T. cati* dengan teknik ELISA, dapat digunakan subkelas Ig G sebagai antibodi ke-3, yaitu IgG2 β .

BAB 7 DAFTAR PUSTAKA

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. 2000. Cellular and Molecular Immunology. 4th ed. Philadelphia Saunders Company.
- Abdel-Rahman EH and Abdel-Megeed KN. 2000. Molecular identity of major cross-reactive adult antigens in *Fasciola gigantica*, *Toxocara vitulorum* and *Moniezia expanza*. Abstract. J. Egypt. Soc. Parasitol. 30(2): 561-71
- Abdel-Rahman EH, Abdel-Megeed KN, and Hassanain MA. 2000. Structural characterization dan immunocatalization of egg antigens cross-react with *Toxocara vitulorum*, *Fasciola gigantica* and *Moniezia expanza*. Abstract. J. Egypt. Soc. Parasitol. 30(2): 581-91
- Ajayi OO, Duhlińska 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 Paulo. 42(4): 235-7
- Amerasinghe PH, Rajapakse RP, Lloyd S, Fernando ST. 1992. Antigen-induced protection against infection with *Toxocara vitulorum* larvae in mice. Parasitol. Res. 78(8):643-7
- 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. 33(3):249-60
- Beer SA, Novosil'tsev GI, and Mel'nikova LI. 1999. The role of water factor in the dissemination of *Toxocara* eggs and the spread of toxocariasis in a megalopolis. Abstract. Parazitologiya; 33(2): 129-35
- Bowman DD, Mika-Grieve M, and Grieve RB. 1987. *Toxocara canis*: monoclonal antibodies to larval excretory-secretory antigens that bind with genus and species specificity to the cuticular surface of infective larvae. Exp. Parasitol. 64(3): 458-65
- Brandon MR, and Lascelles AK. 1971. Relative efficiency of absorption Ig G1, Ig G2 and Ig M in the newborn calf. Aust. J. Exp. Biol. Med.Sci. 49: 629-633.
- Castillo D, Paredes C, Zanartu C, Castillo G, Mercado R, Munoz V, Schenone H, 2000. Environment contamination with *Toxocara* sp eggs in public squares and parks from Santiago, Chile, 1999. Bol. Chil. Parasitol. 55(3-4): 86-91

- Chappell H, Haeney M. 1992. *Essential of Clinical Immunology*. Mellbouerne. pp. 65
- Cohen S, Warren KS, 1982. *Immunology of parasitic infections*. 2nd Ed. Melbourne, Blackwell Sci. Publ. pp. 284-285
- de Savigny, D. 1980. The cummunication of ELISA data from laboratory to clinician. *J. of Immunoassay*. 1(1): 105-128.
- DrenchRite. 1996. *Larval Development Assay*. A product of Csiro reseach. Horizon Technology Pty Limited. Roseville, Australia.
- el-Massry AA. 1999. Characterization of antigenic property of *Toxocara canis* and *Toxascaris leonine* adults and larvae through immunodiagnostic electrophoresis (SDS-PAGE) and western blot technique. *J. Egypt. Soc. Parasitol*. 29(2): 335-45
- Fonrouge R, Guardis MV, Radman NE, and Archelli SM. 2000. Soil contamination with *Toxocara* sp. eggs in squares and public places from the city of La Plata, Buenos Aires Argentina. *Bol. Chil. Parasitol*. 55(3-4): 83-5
- 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*. 7(6): 703-6
- 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
- Harlow, E. and D. Lane. 1988. *Antibodies. A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Havasiova-Reiterova K, Tomasovicova O, and Dubinsky P. 1995. Effect of various doses of infective *Toxocara canis* and *Toxocara cati* eggs on humoral response and distribution of larvae in mice. *Parasitol. Res*. 81(1): 13-7.
- Hostettmann K, Hostettmann, M and Marston. 1986. *Preparative Chomatography Techniques*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Terj. Padmawinata K dan Sutomo (1995). Penerbit ITB, Bandung.
- Hubner J, Uhlikova M, and 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. *Dermatol*. 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.
- Kennedy MW, Maizels RM, Meghji M, Young L, Qureshi F, and Smith HV. 1987. Species-specific and common epitopes on the secreted and surface antigens of *Toxocara cati* and *Toxocara canis* infective larvae. *Parasite Immunol.* 9(4): 407-20
- 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, Sri Mumpuni S, dan Puspitawati H. 2005. Isolasi dan Karakterisasi P32 L2 Dorman *Toxocara cati* dan Evaluasinya sebagai Bahan Diagnostik Toxocarosis dengan Teknik ELISA. Laporan Penelitian Proyek DUE-Like Batch III Universitas Airlangga
- Koesdarto S, Kusnoto dan Sri Mumpuni S. 2002. Penentuan prevalensi toxocariasis pada anjing konsumsi dan kucing liar di Surabaya melalui bedah saluran pencernaan. Laporan Penelitian DIKS, Lembaga Penelitian, Universitas Airlangga
- 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): 155-6
- Kondo K. 1989. Toxocariasis. *Saisin-Igaku.* 44: 774-779.
- Kusnoto. 2003. Isolasi dan karakterisasi protein imunogenik larva stadium II *Toxocara cati* isolat lokal. Thesis, Pascasarjana, Universitas Airlangga
- Kusnoto. 2008. Molecular characterization of protein of *Toxocara cati* and *Toxocara canis* to diagnostic development of toxocariasis. Dissertation. Doctoral Program of Medical Sciences, Graduate School, University of Airlangga, Surabaya.
- Kusnoto. 2009. Characterization of Specific Protein of *Toxocara canis* for the Development of Diacnostic by Antibodies Examination of Toxocariasis. *Media Kedokteran Hewan.* 25(2): 90-95
- Kusnoto, Uga S, Machfudz, Koesdarto S, dan Sri Mumpuni S. 2000. Deteksi telur *Toxocara* spp. dalam tanah di sekitar *playground*, peternakan sapi perah dan rumah potong hewan di Surabaya. Seminar Kajian Epidemiologi Zoonosis Penyakit Cacingan di Wilayah Jatim, Tropical Disease Center, Surabaya.
- 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. Pusat Antar Universitas, Bioteknologi, IPB, Bandung.
- Levine, ND. 1978. Textbook of Veterinary Parasitology Burgers Publ. Co. Edisi Indonesia: Buku Pelajaran Parasitologi Veteriner. Terj. Ashadi, G. dan Wardiarto. 1990. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 245-247.
- Lloyd S, and Soulsby E.J.L. 1987. Immunology of G.I. nematode of ruminants. In: Immune Responses in Parasitic Infections, Immunology, Immunopathology and Immunoprophylaxis. Vol I. Soulsby E.J.L. 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 *Toxocara 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. 46(3):167-72
- O'Lorcain P. 1994. Epidemiology of *Toxocara spp.* in stray dogs and cats in Dublin, Ireland. J. Helminthol. 68(4): 331-6
- Overgaauw PA. 1997^a. Aspects of *Toxocara* epidemiology: toxocariasis in dogs and cats. Crit. Rev. Microbiol. 23(3): 233-51
- Overgaauw PA. 1997^b. Aspects of *Toxocara* epidemiology: human toxocariasis. Crit. Rev. Microbiol. 23(3): 215-31
- Ozeretskovskaia NN. 2000. The organ pathology in the acute stage of tissue helminthiasis: the role of eosinophilia of the blood and tissues, blood immunoglobulins E and G4 and immune response-inducing factors. Med Parazitol (Mosk). 3: 3-8
- Park SP, Huh S, Magnaval JF, and 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. 38(4):267-73
- Parsons JC. 1987. Ascarid infections of cats and dogs. Vet. Clin. Noth. Am. Pract. 17(6): 1307-39
- Pearse EJ and Sher A. 1990. Immunity to helminth. In: Current Opinion Immunology. USA National Institute for Allergy and Infectious Diseases. 2: 235-379
- Petithory JC, Beddok A, and Quedoc M. 1994. Ascariidiasis zoonosis: visceral larva migrans syndromes. Bull. Acad. Natl. Med. 178(4): 635-47

- Playfair JHL. 1992. *Immunology at a Glance*. 5th Ed. Blackwell Scientific Publications. University Press, Cambridge.
- Prokopowicz D and Sosnowska D. 1990. Toxocariasis. *Abstrac. Przegl. Epidemiol.* 44(3): 193-8
- Prunier F, Delepine S, Victor J, de Gentile L, Moreau C, Laporte J, Dupuis JM, Geslin P. 2001. Löffler's fibroblastic endocarditis. A report of a case complicating toxocarosis. *Arch. Mal. Coeur. Vaiss.* 94(3): 226-30
- Radman NE, Archelli SM, Fonrouge RD, del V Guardis M, and 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. Submitted 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, and Lambertucci JR. 2001. Human toxocariasis and pyogenic liver abscess: a possible association. *Am J Gastroenterol*; 96(2): 563-6
- 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. Bull.* 63(6): 545-568.
- Roitt I, Brostoff J, and Male D. 1998. *Immunology*. 4th Ed. Barcelona, Spain: Mosby, Times Mirror International Publisers Limited.
- 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
- 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
- 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.* 41(1): 27-30
- Soulsby E.J.L. 1986. *Helminth, Arthropods and Protozoa of Domestic Animals*. London: Bailliere Tindall and Cassell.
- Soulsby E.J.L. 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. USA: A Simon & Schuster Company, Prentice-Hall International Inc.
- Sudiana IK, Putra ST, dan Dachlan YP. 1994. Studi perubahan prosentase leukosit dan kadar hemoglobin darah kucing yang mengidap toxocariasis. *Perkumpulan Pemberantasan Penyakit Parasit Indonesia*, Surabaya.
- 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
- Trisunuwati, P. 1997. Penentuan protein imunogen larva *Toxocara vitulorum*, sebagai usaha menemukan metode imunodiagnosis dini *Toxocariasis* pada induk sapi. Disertasi. Program Pascasarjana Universitas Airlangga.
- Uga S., T. Matsumura, K. Fujisawa, K. Okubo, N. Kataoka, and K. Kondo. 1990. incidence of seropositivity to Human Toxocariasis in Hyogo Prefecture, Japan, and its possible 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.* 73(4): 357-61

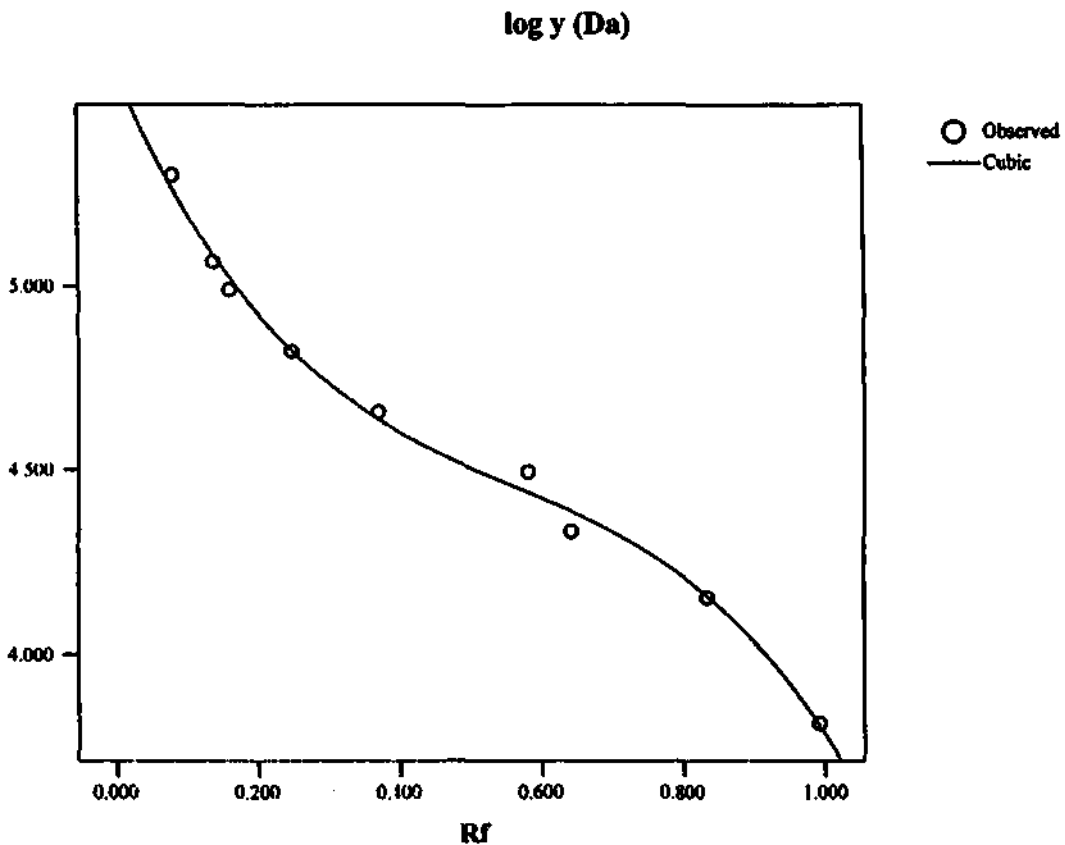
Lampiran 1. Penghitungan masa molekular relatif (MR) protein *T. cati* dewasa (intestin, material ES, dan *whole worm extract*) dan analisis regresi antara nilai *retardation factor* (RF) dan MR pada marker

Summarize

No.	jarak marker	Rf	BM (y KDa)	BM (y Da)	log y (Da)
1	9.0	0.079	200.0	200000	5.301
2	15.5	0.136	116.3	116310	5.066
3	18.0	0.158	97.4	97400	4.989
4	28.0	0.246	66.2	66200	4.821
5	42.0	0.368	45.0	45000	4.653
6	66.0	0.579	31.0	31000	4.491
7	73.0	0.640	21.5	21500	4.332
8	95.0	0.833	14.3	14300	4.155
9	113.0	0.991	6.5	6500	3.813

Panjang Gel=114mm

Curve Fit



Lanjutan Lampiran 1

Cubic

Model Summary

R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
.997	.995	.992	.043

The independent variable is Rf.

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Regression	1.798	3	.599	325.587	.000
Residual	.009	5	.002		
Total	1.807	8			

The independent variable is Rf.

Coefficients

	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
Rf	-4.398	.621	-3.037	-7.082	.001
Rf** 2	6.399	1.348	4.662	4.748	.005
Rf** 3	-3.794	.825	-2.693	-4.600	.006
(Constant)	5.574	.071		78.772	.000

No.	Jarak sampel	Rf	y*	Antilog y (BM Da)	BM kDa
1	13.5	0.118	5.137	137088.2	137.1
2	15.0	0.132	5.097	125025.9	125.0
3	19.0	0.167	5.001	100230.5	100.2
4	22.5	0.197	4.926	84333.5	84.3
5	29.0	0.254	4.807	64120.9	64.1
6	34.0	0.298	4.731	53826.9	53.8
7	38.5	0.338	4.672	46989.4	47.0
8	44.0	0.386	4.612	40926.1	40.9
9	47.0	0.412	4.583	38282.5	38.3
10	53.0	0.465	4.531	33962.5	34.0
11	55.0	0.482	4.516	32809.5	32.8
12	60.0	0.526	4.479	30130.1	30.1
13	64.0	0.561	4.450	28183.8	28.2
14	74.0	0.649	4.378	23878.1	23.9
15	78.0	0.684	4.345	22130.9	22.1
16	81.5	0.715	4.314	20606.3	20.6
17	96.5	0.846	4.135	13645.8	13.6
18	106.5	0.934	3.957	9057.3	9.1

$$*y = 5,574 - 4,398x + 6,399 x^2 - 3,794 x^3$$

Lampiran 2. Penghitungan MR Protein L2 Dorman dan Analisis Regresi antara Nilai *Retardation Factor* (RF) dan Massa Molekul Relatif (MR) pada Marker

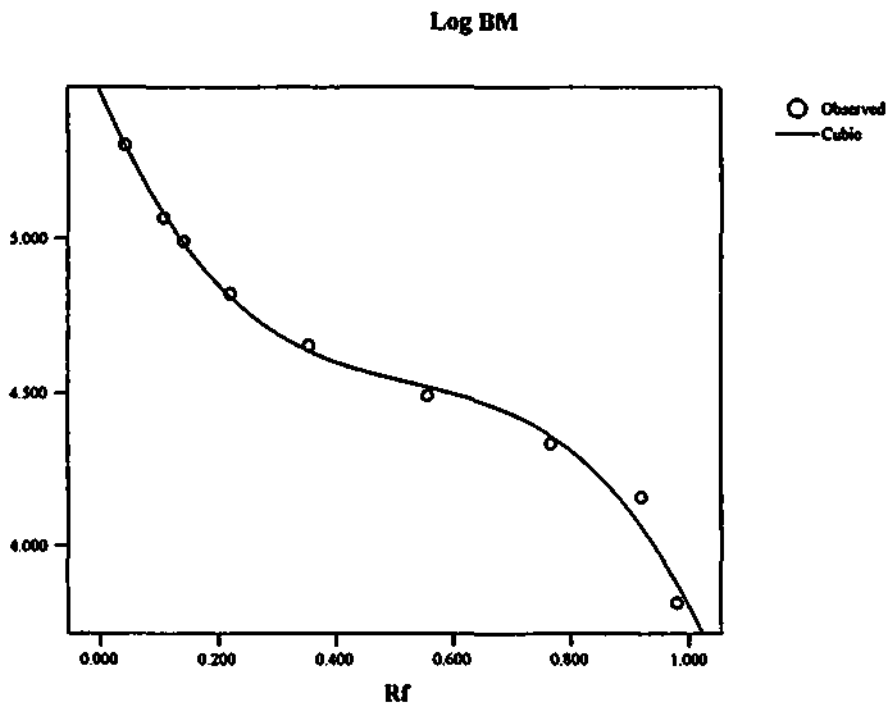
Summarize

Case Summaries*

		Rf	Log BM
1		,042	5,301
2		,106	5,066
3		,141	4,989
4		,220	4,821
5		,354	4,653
6		,556	4,491
7		,766	4,332
8		,921	4,158
9		,980	3,813
Total	Sum	4,086	41,624
	Mean	,45400	4,62489
	Std. Deviation	,363333	,474920

*. Limited to first 100 cases.

Curve Fit



Lanjutan Lampiran 2

Cubic

Model Summary

R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
,996	,992	,986	,055

The independent variable is Rf.

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Regression	1,789	3	,596	195,117	,000
Residual	,015	5	,003		
Total	1,804	8			

The independent variable is Rf.

Coefficients

	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
Rf	-4,475	,654	-3,421	-6,845	,001
Rf**2	7,640	1,537	6,112	4,972	,004
Rf**3	-4,836	,995	-3,747	-4,858	,005
(Constant)	5,476	,067		82,100	,000

Hasil Penghitungan Berat Molekul Protein L2 Dorman Cacing *T. casti* pada Gel SDS-PAGE

No.	Jarak	Rf ¹⁾	Log y ²⁾ Da	MR ³⁾ Da	MR ³⁾ kDa
1	9,0	0,091	5,1287	134493,0	134,5
2	10,5	0,106	5,0816	120670,0	120,7
3	19,8	0,200	4,8479	70453,0	70,5
4	27,0	0,273	4,7257	53174,0	53,2
5	36,0	0,364	4,6264	42305,0	42,3
6	45,5	0,460	4,5636	36610,0	36,6
7	48,5	0,490	4,5487	35375,0	35,4
8	55,5	0,561	4,5163	32832,0	32,8
9	61,0	0,616	4,4880	30760,0	30,8
10	66,0	0,667	4,4553	28529,0	28,5
11	82,0	0,828	4,2628	18314,0	18,3
12	87,0	0,879	4,1616	14507,0	14,5
13	90,0	0,909	4,0885	12260,0	12,3
14	95,0	0,960	3,9437	8784,0	8,8

¹⁾Rf = Retardation factor, merupakan jarak pergerakan protein dari tempat awal dibundung jarak pergerakan warna dari tempat awal; ²⁾y, dihitung berdasarkan persamaan garis regresi $y = 5,476 - 4,475 x + 7,64 x^2 + 4,836 x^3$; ³⁾MR = masa molekular relatif.

Lampiran 3. Hasil Pemeriksaan Antigenisitas Protein Murni *Toxocara* spp. Terhadap Serum Darah Mencit dengan Teknik *indirect-ELISA* dan Analisis Statistik Nilai *Optical Density* dengan Uji Anava

Nilai OD Serum Mencit Terhadap Protein Murni *Toxocara* spp.

Ulangan	L2J <i>T. cati</i>	L2J <i>T. canis</i>	<i>Ancylostoma</i> spp.	<i>D. caninum</i>	Kontrol
1	0,566	0,593	0,312	0,165	0,204
2	0,545	0,607	0,363	0,186	0,211
3	0,579	0,555	0,136	0,099	0,205
4	0,567	0,518	0,246	0,136	0,210
5	0,581	0,488	0,125	0,233	0,211
6	0,500	0,571	0,337	0,344	0,210
7	0,507	0,549	0,452	0,365	0,204
8	0,556	0,581	0,057	0,451	0,205

Uji Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		OD Tcn	OD Tm	OD Anc	OD Dcn	OD Ko
N		8	8	8	8	8
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	.55013	.55775	.25350	.24738	.20750
	Std. Deviation	.031069	.039485	.136682	.125251	.003251
Most Extreme Differences	Absolute	.200	.162	.180	.188	.279
	Positive	.167	.106	.180	.188	.279
	Negative	-.200	-.162	-.166	-.155	-.279
Kolmogorov-Smirnov Z		.566	.459	.509	.532	.789
Asymp. Sig. (2-tailed)		.906	.984	.958	.940	.562

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Oneway

Descriptives

Optical Density

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Minimum	Maximum
L2J <i>T. canis</i>	8	.55013	.031069	.010984	.500	.581
L2J <i>T. cati</i>	8	.55775	.039485	.013960	.488	.607
<i>Ancylostoma</i> spp	8	.25350	.136682	.048324	.057	.452
<i>D. caninum</i>	8	.24738	.125251	.044283	.099	.451
Kontrol	8	.20750	.003251	.001150	.204	.211
Total	40	.36325	.178181	.028173	.057	.607

Lanjutan Lampiran 3

ANOVA

Optical Density

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.980	4	.245	33.189	.000
Within Groups	.258	35	.007		
Total	1.238	39			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Optical Density

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	99% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
L2J T. canis	L2J T. cati	-.007625	.042956	1.000	-.15890	.14365
	Ancylostoma spp	.296625*	.042956	.000	.14535	.44790
	D. caninum	.302750*	.042956	.000	.15147	.45403
	Kontrol	.342625*	.042956	.000	.19135	.49390
L2J T. cati	L2J T. canis	.007625	.042956	1.000	-.14365	.15890
	Ancylostoma spp	.304250*	.042956	.000	.15297	.45553
	D. caninum	.310375*	.042956	.000	.15910	.46165
	Kontrol	.350250*	.042956	.000	.19897	.50153
Ancylostoma spp	L2J T. canis	-.296625*	.042956	.000	-.44790	-.14535
	L2J T. cati	-.304250*	.042956	.000	-.45553	-.15297
	D. caninum	.006125	.042956	1.000	-.14515	.15740
	Kontrol	.046000	.042956	.820	-.10528	.19728
D. caninum	L2J T. canis	-.302750*	.042956	.000	-.45403	-.15147
	L2J T. cati	-.310375*	.042956	.000	-.46165	-.15910
	Ancylostoma spp	-.006125	.042956	1.000	-.15740	.14515
	Kontrol	.039875	.042956	.884	-.11140	.19115
Kontrol	L2J T. canis	-.342625*	.042956	.000	-.49390	-.19135
	L2J T. cati	-.350250*	.042956	.000	-.50153	-.19897
	Ancylostoma spp	-.046000	.042956	.820	-.19728	.10528
	D. caninum	-.039875	.042956	.884	-.19115	.11140

*. The mean difference is significant at the .01 level.

Homogeneous Subsets

Optical Density

Tukey HSD^a

Perlakuan	N	Subset for alpha = .01	
		1	2
Kontrol	8	.20750	
D. caninum	8	.24738	
Ancylostoma spp	8	.25350	
L2J T. canis	8		.55013
L2J T. cati	8		.55775
Sig.		.820	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

^a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 8.000.

Lampiran 4. Nilai OD dan Analisis Statistik Hasil Pemeriksaan Profil Subkelas Imunoglobulin G dengan Teknik ELISA Terhadap Serum Mencit yang Diinfeksi *T. cati* Menggunakan Uji Anava Faktorial

Nilai OD dan Analisis Statistik Hasil Pemeriksaan Profil Subkelas

Imunoglobulin G dengan Teknik ELISA Terhadap Serum Mencit yang Diinfeksi *T.*

cati adalah sebagai berikut.

Waktu Pengamatan	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3
T0	0.190	0.299	0.178	0.100
	0.189	0.169	0.118	0.096
	0.147	0.268	0.163	0.101
	0.176	0.204	0.272	0.130
	0.152	0.222	0.190	0.114
	0.155	0.232	0.219	0.118
T7	0.230	0.235	0.486	0.105
	0.185	0.312	0.385	0.096
	0.292	0.400	0.309	0.396
	0.212	0.298	0.354	0.226
	0.208	0.316	0.379	0.100
	0.255	0.322	0.279	0.317
T14	0.211	0.385	0.273	0.141
	0.148	0.179	0.460	0.116
	0.146	0.183	0.470	0.130
	0.333	0.475	0.368	0.163
	0.316	0.299	0.408	0.191
	0.301	0.314	0.418	0.177
T28	0.195	0.541	0.642	0.212
	0.164	0.326	0.342	0.204
	0.464	0.836	0.648	0.242
	0.230	0.452	0.513	0.189
	0.159	0.248	0.503	0.190
	0.392	0.695	0.590	0.235

Lanjutan Lampiran 4

Analisis statistik hasil pemeriksaan profil subkelas imunoglobulin G dengan teknik ELISA terhadap serum mencit yang diinfeksi *T. cati* menggunakan uji Anava Faktorial adalah sebagai berikut.

Univariate Analysis of Variance**Between-Subjects Factors**

	Value Label	N
Waktu	1 0 hari PI	24
	2 7 hari PI	24
	3 14 hari PI	24
	4 28 hari PI	24
Subkelas Ig G	1 Ig G1	24
	2 Ig G2a	24
	3 Ig G2b	24
	4 Ig G3	24

Descriptive Statistics

Dependent Variable: OD T. cati

Waktu	Subkelas Ig G	Mean	Std. Deviation	N
0 hari PI	Ig G1	.16817	.019260	6
	Ig G2a	.23233	.046124	6
	Ig G2b	.19000	.052196	6
	Ig G3	.10983	.013091	6
	Total	.17508	.056647	24
7 hari PI	Ig G1	.23036	.038194	6
	Ig G2a	.31383	.052849	6
	Ig G2b	.36533	.071957	6
	Ig G3	.20667	.128340	6
	Total	.27905	.099366	24
14 hari PI	Ig G1	.24250	.085146	6
	Ig G2a	.30583	.115042	6
	Ig G2b	.39950	.072166	6
	Ig G3	.15300	.028851	6
	Total	.27521	.119231	24
28 hari PI	Ig G1	.26733	.129042	6
	Ig G2a	.51633	.222299	6
	Ig G2b	.53967	.114777	6
	Ig G3	.21204	.022373	6
	Total	.38384	.198721	24
Total	Ig G1	.22709	.083587	24
	Ig G2a	.34208	.162184	24
	Ig G2b	.37363	.147969	24
	Ig G3	.17039	.075757	24
	Total	.27830	.147235	96

Lanjutan Lampiran 4

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: OD T. cati

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Model	8.807 ^a	16	.550	64.019	.000
Waktu	.523	3	.174	20.287	.000
sk_IgG	.658	3	.219	25.517	.000
Waktu * sk_IgG	.190	9	.021	2.458	.016
Error	.688	80	.009		
Total	9.494	96			

a. R Squared = .928 (Adjusted R Squared = .913)

Post Hoc Tests

Waktu

Multiple Comparisons

Dependent Variable: OD T. cati
Tukey HSD

(I) Waktu	(J) Waktu	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0 hari PI	7 hari PI	-.10397*	.026767	.001	-.17420	-.03373
	14 hari PI	-.10013*	.026767	.002	-.17036	-.02989
	28 hari PI	-.20376*	.026767	.000	-.27899	-.13853
7 hari PI	0 hari PI	.10397*	.026767	.001	.03373	.17420
	14 hari PI	.00384	.026767	.999	-.06639	.07407
	28 hari PI	-.10479*	.026767	.001	-.17503	-.03456
14 hari PI	0 hari PI	.10013*	.026767	.002	.02989	.17036
	7 hari PI	-.00384	.026767	.999	-.07407	.06639
	28 hari PI	-.10864*	.026767	.001	-.17887	-.03840
28 hari PI	0 hari PI	.20876*	.026767	.000	.13853	.27899
	7 hari PI	.10479*	.026767	.001	.03456	.17503
	14 hari PI	.10864*	.026767	.001	.03840	.17887

Based on observed means.

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

Homogeneous Subsets

OD T. cati

Tukey HSD^{a,b}

Waktu	N	Subset		
		1	2	3
0 hari PI	24	.17508		
14 hari PI	24		.27521	
7 hari PI	24		.27905	
28 hari PI	24			.38384
Sig.		1.000	.999	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = .009.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 24.000.

b. Alpha = .05.

Lanjutan Lampiran 4

Subkelas Ig G

Multiple Comparisons

Dependent Variable: OD T. cati

Tukey HSD

(I) Subkelas Ig G	(J) Subkelas Ig G	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Ig G1	Ig G2a	-.11499*	.026767	.000	-.18523	-.04476
	Ig G2b	-.14653*	.026767	.000	-.21677	-.07630
	Ig G3	.05671	.026767	.156	-.01353	.12694
Ig G2a	Ig G1	.11499*	.026767	.000	.04476	.18523
	Ig G2b	-.03154	.026767	.642	-.10177	.03869
	Ig G3	.17170*	.026767	.000	.10147	.24193
Ig G2b	Ig G1	.14653*	.026767	.000	.07630	.21677
	Ig G2a	.03154	.026767	.642	-.03869	.10177
	Ig G3	.20324*	.026767	.000	.13301	.27347
Ig G3	Ig G1	-.05671	.026767	.156	-.12694	.01353
	Ig G2a	-.17170*	.026767	.000	-.24193	-.10147
	Ig G2b	-.20324*	.026767	.000	-.27347	-.13301

Based on observed means.

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

Homogeneous Subsets

OD T. cati

Tukey HSD^{a,b}

Subkelas Ig G	N	Subset	
		1	2
Ig G3	24	.17039	
Ig G1	24	.22709	
Ig G2a	24		.34208
Ig G2b	24		.37363
Sig.		.156	.642

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = .009.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 24.000.

b. Alpha = .05.

Lanjutan Lampiran 4

Interaksi Waktu*Subkelas Ig G

Homogeneous Subsets

OD T. catl

Tukey HSD^a

Perlakuan Kombinasi	N	Subset for alpha = .05				
		1	2	3	4	5
T0*Ig G3	6	.10983				
T14*Ig G3	6	.15300	.15300			
T0*Ig G1	6	.16817	.16817			
T0*Ig G2b	6	.19000	.19000	.19000		
T7*Ig G3	6	.20667	.20667	.20667		
T28*Ig G3	6	.21204	.21204	.21204	.21204	
T7*Ig G1	6	.23036	.23036	.23036	.23036	
T0*Ig G2a	6	.23233	.23233	.23233	.23233	
T14*Ig G1	6	.24250	.24250	.24250	.24250	
T28*Ig G1	6	.26733	.26733	.26733	.26733	
T14*Ig G2a	6		.30583	.30583	.30583	
T7*Ig G2a	6		.31383	.31383	.31383	
T7*Ig G2b	6			.36533	.36533	.36533
T14*Ig G2b	6				.39950	.39950
T28*Ig G2a	6					.51633
T28*Ig G2b	6					.53967
Sig.		.218	.191	.101	.055	.106

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.