

LAPORAN AKHIR TAHUN
PENELITIAN TERAPAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI
(PTUPT)



PENDEKATAN PROTEOMIK DAN GENOMIK TERHADAP KARAKTER
CACING *Moniezia* spp. SEBAGAI DASAR PENGEMBANGAN
DIAGNOSIS HELMINTIASIS

TAHUN KE - 2 DARI RENCANA 3 TAHUN

Prof. Dr. SETIAWAN KOESDARTO, drh., MSc. NIDN. 0028095203
SRI-MUMPUNI SOSIAWATI, drh., MKes. NIDN. 0028015303
Prof. Dr. RAHAJU ERNAWATI, drh., MSc. NIDN. 0003105002

DIBLAYAI OLEH:
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN
KEPADA MASYARAKAT
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018

UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018

LAPORAN AKHIR TAHUN
PENELITIAN TERAPAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI
(PTUPT)



KKC
FK
LP 53/19
Koe
P

PENDEKATAN PROTEOMIK DAN GENOMIK TERHADAP KARAKTER
CACING *Moniezia* spp. SEBAGAI DASAR PENGEMBANGAN
DIAGNOSIS HELMINTIASIS

TAHUN KE – 2 DARI RENCANA 3 TAHUN

Prof. Dr. SETIAWAN KOESDARTO, drh., MSc. NIDN. 0028095203
SRI MUMPUNI SOSIAWATI, drh., MKes. NIDN. 0028015303
Prof. Dr. RAHAJU ERNAWATI, drh., MSc. NIDN. 0003105002

DIBIYAI OLEH:
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN
KEPADA MASYARAKAT
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018

UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : PENDEKATAN PROTEOMIK DAN GENOMIK
TERHADAP KARAKTER CACING *Moniezia* spp.
SEBAGAI DASAR PENGEMBANGAN DIAGNOSIS
HELMINTIASIS

Peneliti/Pelaksana
Nama Lengkap : Dr. drh. SETIAWAN KOESDARTO,
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
NIDN : 0028095203
Jabatan Fungsional : Guru Besar
Program Studi : Sains Veteriner
Nomor HP : 0818593074
Alamat surel (e-mail) : skoesdarto@yahoo.com

Anggota (1)
Nama Lengkap : Dr. drh. RAHAYU ERNAWATI M.Sc.
NIDN : 0003105002
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Anggota (2)
Nama Lengkap : SRI MUMPUNI SOSIAWATI M.Kes
NIDN : 9990405927
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Institusi Mitra (jika ada)
Nama Institusi Mitra : -
Alamat : -
Penanggung Jawab : -
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 2 dari rencana 3 tahun
Biaya Tahun Berjalan : Rp 50,000,000
Biaya Keseluruhan : Rp 142,032,000



Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
(Prof. Dr. Pudji Srianto, drh., MKes)
NIP/NIK 195601051986011001

Kota Surabaya, 14 - 11 - 2018
Ketua,

(Dr. drh. SETIAWAN KOESDARTO,)
NIP/NIK 195209281978031002



Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi Unair
(Prof. H. Hery Purnobasuki, drs., MSi., PhD.)
NIP/NIK 196705071991021001



RINGKASAN

Cacing pada hewan ruminansia secara luas dibagi menjadi tiga kelas, yaitu kelas nematoda, trematoda dan cestoda. Cacing pita (cestoda) pada ruminansia adalah *Moniezia* spp., terdapat dua spesies, yaitu *M. Expanza* dan *M. benedeni*. Cacing tersebut hidup di dalam saluran pencernaan dan menyebar melalui inang antara (*oribated mites*) yang mengandung sistiserkoid. Telur cacing pita termakan oleh *oribated mites* untuk melengkapi siklus hidupnya. Morfologi kedua cacing tersebut pada stadium telur hingga dewasa sangat mirip, sehingga pada hasil pemeriksaan rutin (feses) secara mikroskopis sulit dibedakan. Oleh karena itu sebagai dasar identifikasi dan klasifikasi, hasil pemeriksaan konvensional dengan menemukan telur dalam feses memiliki akurasi yang rendah.

Teknik biokimia, imunologik dan molekuler merupakan pendekatan alternatif untuk mempelajari sistematika parasit. Khususnya penggunaan teknik DNA untuk identifikasi parasit cacing memiliki tingkat akurasi yang kuat. *Nuclear ribosomal* DNA dapat digunakan sebagai marker genetik, rDNA dari ITS-2 menunjukkan hasil yang sangat spesifik pada identifikasi cacing pita.

Penelitian ini bertujuan untuk: mengetahui karakter protein dan imunologis serta menentukan antigenesitas, nilai sensitivitas serta spesifisitas protein cacing *M. expanza* dan *M. benedeni* yang dapat dikembangkan untuk kit diagnostik; dan mendapatkan data homologi yang dapat dimanfaatkan untuk mengetahui hubungan kekerabatan (*phylogenetic tree*) cestoda pada ruminansia, untuk identifikasi, dan diagnosis etiologik.

Tahapan penelitian ini adalah sebagai berikut: **Tahun pertama** meliputi beberapa tahap, yaitu: 1) Koleksi sampel; 2) Identifikasi *Moniezia* spp. dari ruminansia yang diamati berdasarkan morfologi cacing dewasa; 3) Identifikasi protein berdasarkan berat molekul (BM); 4) Karakterisasi protein dan uji antigenesitas dengan teknik *Western blot*. **Tahun kedua**, meliputi: 1) Uji reaksi silang protein antar spesies *Moniezia* spp. terhadap serum kelinci yang diimunisasi homogenat cacing *Moniezia* spp. dari spesies yang berbeda menggunakan teknik *Western blot*.; 2) Uji antigenesitas, sensitivitas dan spesifisitas protein cacing *Moniezia* spp. terhadap serum mencit yang diimunisasi homogenat cacing *Moniezia* spp. dengan spesies berbeda menggunakan teknik *indirect-ELISA*. **Tahun ketiga**, meliputi beberapa tahap, yaitu: 1) Persiapan sampel; 2) Isolasi DNA; 3) Amplifikasi DNA; 4) Elektroforesis DNA; 5) Pemetaan restriksi; 6) Perbanyakkan produk PCR; 7) Pemurnian DNA produk PCR; 8) Isolasi DNA dari gel agarose; 9) Sekuensing; dan 10) Analisis homologi nukleotida.

Hasil *running* SDS-PAGE pada *M. benedeni* didapatkan beberapa protein dengan berat molekul 244, 176, 143, 119, 82, 74, 61, 51, 44, 43, 36, 31, 29, 27, 26, 24, 19, 15, 12 dan kDa. Pada *M. expanza* hasil *running* menunjukkan pita pada BM 240, 119, 90, 66, 61, 54, 44, 39, 36, 32, 30, 27, 26, 24, 15, 13, 9 dan 7 kDa.

Hasil karakterisasi protein *Moniezia* spp. menggunakan teknik *Western blot* diketahui bahwa protein *M. benedeni* dapat berikatan dengan serum anti *M. benedeni* pada BM 244, 119, 82, 74, 61, 51, 44, 36, 31, 15 dan 9 kDa. Pada protein *M. expansa* menunjukkan ikatan dengan serum anti-*M. expansa* pada BM 244, 176, 143, 119, 82, 74, 61, 51, 44, 43, 31, 29, 26, 23, 12 dan 9 kDa.

Pada protein *M. expansa* menunjukkan ikatan dengan serum anti-*M. benedeni* pada BM 244, 206, 176, 143, 119, 82, 74, 61, 44, 43, 36, 31, 29, 27, 24, 15, 12 dan 9 kDa. Pada protein *M. benedeni* menunjukkan ikatan dengan serum anti-*M. expansa* pada BM 244, 206, 176, 143, 119, 82, 74, 61, 44, 43, 36, 31, 29, 27, 24, 15, 12 dan 9 kDa.

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat diketahui bahwa protein *M. expansa* yang tidak terjadi reaksi silang dengan serum anti-*M. benedeni* yaitu pada BM 26 dan 23 kDa, sedangkan protein *M. benedeni* yang tidak mengalami reaksi silang dengan serum anti-*M. expansa* adalah pada BM 51 kDa. Protein dengan BM 244, 119, 82, 74, 61, 44, 36, 31, 15 dan 9 kDa baik dari *M. benedeni* maupun *M. expansa* merupakan protein yang mengalami reaksi silang baik dengan serum anti-*M. benedeni* maupun anti-*M. expansa*.

Protein spesifik spesies dapat dikembangkan untuk kit diagnosis etiologik, sedangkan protein yang mengalami reaksi silang dapat dikembangkan sebagai kandidat vaksin.

PRAKATA

Monesiasis adalah penyakit infeksi pada ruminansia yang disebabkan oleh cacing pita (cestoda), yaitu *Moniezia* spp. Terdapat dua spesies *Moniezia*, yaitu *M. Expanza* dan *M. benedeni*. Cacing tersebut hidup di dalam saluran pencernaan dan menyebar melalui inang antara (*oribated mites*) yang mengandung sistiserkoid. Telur cacing pita termakan oleh *oribated mites* untuk melengkapi siklus hidupnya. Morfologi kedua cacing tersebut pada stadium telur hingga dewasa sangat mirip, sehingga pada hasil pemeriksaan rutin (feses) secara mikroskopis sulit dibedakan. Sebagai dasar identifikasi dan klasifikasi, hasil pemeriksaan konvensional dengan menemukan telur dalam feses memiliki akurasi yang rendah. Teknik biokimia, imunologik dan molekuler merupakan pendekatan alternatif untuk mempelajari sistematika parasit. Khususnya penggunaan teknik DNA untuk identifikasi parasit cacing memiliki tingkat akurasi yang kuat. *Nuclear ribosomal* DNA dapat digunakan sebagai marker genetik, rDNA dari ITS-2 menunjukkan hasil yang sangat spesifik pada identifikasi cacing pita.

Penelitian ini bertujuan untuk: mengetahui karakter protein dan imunologis serta menentukan antigenesitas, nilai sensitivitas serta spesifisitas protein cacing *M. expanza* dan *M. benedeni* yang dapat dikembangkan untuk kit diagnostik; dan mendapatkan data homologi yang dapat dimanfaatkan untuk mengetahui hubungan kekerabatan (*phylogenetic tree*) cestoda pada ruminansia, untuk identifikasi, dan diagnosis etiologik.

Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada Prof. Dr. Mohammad Nasih, SE., MT., Ak., CMA., Rektor Universitas Airlangga; Prof. H. Hery Purnobasuki, drs., MSi., Ph.D., Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi Unair; Prof. Dr. Pudji Srianto, drh., MKes., Dekan Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, dan semua pihak yang secara langsung ataupun tidak langsung 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 diagnosis Toxocariasis baik pada sapi, kerbau maupun hospes lain termasuk manusia. Penulisan ini masih banyak kekurangan, untuk itu penulis mengharap kritik dan saran untuk kesempurnaan tulisan ini.

Surabaya, September 2018

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	1
HALAMAN PENGESAHAN	2
RINGKASAN.....	3
PRAKATA	5
DAFTAR ISI	6
Bab 1. PENDAHULUAN	7
1.1 Latar Belakang Penelitian	7
1.2 Tujuan Penelitian	9
1.3 Manfaat Penelitian	9
Bab 2. URAIAN KEGIATAN	10
2.1 Penyebab Monieziasis	10
2.2 Siklus Hidup dan Cara Penularan <i>Moniezia</i> spp.	10
2.3 Patogenitas Monieziasis	11
2.4 Gejala Klinis dan Diagnosis Monieziasis	11
2.5 Antigen Parasit	11
2.6 Respons Imun Terhadap Parasit	12
2.7 Perkembangan Diagnosis Penyakit Parasitik	12
Bab 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	15
Bab 4. METODE PENELITIAN	17
Bab 5. HASIL DA LUARAN YANG DICAPAI	25
Bab 6. RENCANA TAHUN BERIKUTNYA	32
Bab 7. KESIMPULAN DAN SARAN	37
DAFTAR PUSTAKA	39
LAMPIRAN	43

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Penelitian

Monieziasis adalah penyakit cacing pita pada hewan yang disebabkan oleh genus moniezia. Diagnosis untuk penyakit parasitik terutama dilakukan berdasarkan identifikasi cacing atau telur secara morfologi (Ishiwata, *et al.*, 2003). Identifikasi spesies parasit usus didasarkan pada morfologi telur, larva dan cacing dewasa (WHO, 1997; Salawu and Moro, 2013), namun klasifikasi awal berdasarkan anatomi cacing dewasa dan telur adalah tidak akurat (Zhu *et al.*, 2000). Pengembangan diagnosis secara imunologik memerlukan protein spesifik sebagai antigen, akan tetapi hingga saat ini protein spesifik untuk cestoda pada saluran pencernaan hewan ruminansia untuk diagnosis etiologik belum banyak diketahui. Di pihak lain diagnosis secara molekular dan genomik belum banyak dilakukan pada infeksi cacing cestodosis khususnya monieziasis pada ruminansia (sapi dan kambing).

Hasil penelitian di Peru dilaporkan informasi tentang *M. expansa* dan *M. benedeni* yang menginfeksi sapi, kambing dan domba (Zaldivar, 1991), pada penelitian berikutnya juga dilaporkan adanya infeksi *M. expansa* pada babi (Go' mez-Puerta *et al.*, 2008). Hal ini menunjukkan bahwa identifikasi spesies parasit sangat penting karena tidak hanya untuk diagnosis tetapi juga untuk survei epidemiologik pada penilaian kesehatan masyarakat, maka metode yang dapat diandalkan (*reliable*) untuk identifikasi yang akurat sangat diperlukan (Ishiwata *et al.*, 2003). Kelemahan dari diagnosis dengan pemeriksaan feses untuk menemukan telur cacing adalah sensitivitas rendah karena metode konvensional yang ada menggunakan sampel 1-3 g feses. Kelemahan lain adalah tidak dapat mendiagnosis secara dini, karena periode prepaten yang panjang (Kusnoto, 2008).

Respons imun hospes terhadap infeksi cacing ditandai dengan keberadaan imunoglobulin E (IgE) dan peningkatan kadar eosinofil, yang dilengkapi dengan kecenderungan dari cacing untuk menstimulasi subset $Th_1CD_8^+$ dan $Th_2CD_4^+$ (Abbas *et al.*, 2000; Tizard, 2009; Maizels, 2013). Sel $Th_2CD_4^+$ mensekresi interleukin (IL)-4 dan IL-5, IL-4 merangsang sel B untuk berdeferensiasi menjadi sel plasma dan menghasilkan Ig E dan Ig G₁, sedangkan IL-5 merupakan pemicu terhadap pembentukan eosinofil (Abbas *et al.*, 2000). Sel $Th_1CD_8^+$

menghasilkan interferon gamma (IFN γ) yang menghambat reaksi hipersensitivitas dan memicu produksi Ig G₂ (Amerasinghe *et al.*, 1992). Antibodi yang dihasilkan oleh sel-sel imun tubuh tersebut bersifat spesifik dan sebagian beredar dalam darah perifer, sehingga dapat dideteksi dengan teknik imunodiagnostik, yang pada prinsipnya adalah mendeteksi ikatan antigen-antibodi spesifik dalam serum hospes (Kusnoto dkk., 2001). Karena dalam pemeriksaan tersebut diperlukan antibodi dan antigen spesifik, maka perlu dikaji lebih lanjut tentang antigenisitas agen penyebab dengan menyiapkan perangkat diagnostik yang mempunyai nilai sensitivitas dan spesifisitas tinggi sehingga penyakit tersebut dapat didiagnosis lebih dini, cepat dan akurat.

Sistematika cestoda selalu memiliki problematik pada berbagai alasan, kesulitan berkaitan dengan sedikit yang dapat diakses atau kelemahan pada spesimen, di bawah standart atau diskripsi taksonomik yang tidak lengkap atau informasi yang didapat berlawanan dari berbagai morfologi kelas dan karakter ontogenik (Brooks *et al.*, 1991). Penelitian tentang filogeni cacing pita (Eucestoda) dapat mencapai perkembangan yang sangat pesat dan mendasari diajukannya hipotesis baru pada data morfologi, siklus hidup, ultrastruktural dan molekular (Hoberg *et al.*, 1999). Klaster ribosomal DNA (rDNA) dapat dimanfaatkan untuk penelitian genetik sebagai region yang *highly repeated* dan mengandung sisi *variable regions* dengan banyak region *conserved* (Hillis and Dixon, 1991). Teknik PCR menggunakan sekuens second internal transcribed spacer (ITS2) (coding regions yang berada antara 5.8S and 28S) terbukti merupakan alat yang dapat dipercaya (*reliable*) dalam identifikasi spesies parasit platyhelminthes dan berhubungan dengan filogenetiknya (Blair *et al.*, 1999; Scholz *et al.*, 2004). Genom mitokondrial juga berguna dalam mempelajari taksonomi dan genomnya dengan perkembangan yang cepat dibandingkan dengan rDNA dan memiliki DNA *noncoding* minimal dan tanpa introns (Mc Manus and Bowles, 1996). Untuk design *primers* oligonucleotide yang digunakan untuk amplifikasi genom *variable region*, *conserved coding regions*, seperti gen *cytochrome oxidase c subunit I* (COI) adalah ideal untuk dipelajari khususnya berhubungan dengan spesies (Mc Manus and Bowles, 1996). Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui karakter dan mendapatkan protein spesifik

Moniezia expanza dan *Moniezia benedeni* dari ruminansia yang dapat dikembangkan untuk kit diagnostik dan kandidat vaksin; dan mendapatkan data homologi yang dapat dimanfaatkan untuk mengetahui hubungan kekerabatan (*phylogenetic tree*) cestoda pada ruminansia, untuk identifikasi, dan diagnosis etiologik.

1.2 Rumusan Masalah

1.2.1 Rumusan masalah tahun I

- 1) Bagaimanakah karakter *Moniezia expanza* dan *Moniezia benedeni* dari ruminansia yang diamati berdasarkan morfologi telur dan cacing dewasa, berat molekul (BM) protein dan antigenisitasnya dengan teknik *blotting*?
- 2) Pada BM berapakah protein spesifik *Moniezia expanza* dan *Moniezia benedeni* terhadap serum kelinci yang diimunisasi homogenat *whole worm* cacing dewasa dengan spesies sama, menggunakan teknik *Western blot*?

1.2.2 Rumusan masalah tahun II

- 1) Protein pada BM berapakah yang dapat terjadi reaksi silang antara *Moniezia expanza* dan *Moniezia benedeni* terhadap serum kelinci yang diimunisasi homogenat *whole worm* cacing dewasa dengan spesies berbeda, menggunakan teknik *Western blot*?
- 2) Bagaimanakah nilai antigenisitas, sensitivitas dan spesifisitas protein baik pada *Moniezia expanza* dan *Moniezia benedeni* terhadap serum mencit yang diimunisasi homogenat *whole worm* cacing dewasa dengan teknik ELISA?

1.2.3 Rumusan masalah tahun III

- 1) Berapakah panjang rDNA *Moniezia expanza* dan *Moniezia benedeni*?
- 2) Bagaimana susunan nukleotida DNA *Moniezia expanza* dan *Moniezia benedeni*?
- 3) Bagaimanakah tingkat homologi dari ITS-2 serta hubungan kekerabatan cacing cestoda yang menginfeksi ruminansia di Surabaya?



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Penyebab monieziasis

Secara umum perkembangan cestoda melalui tiga stadium, yaitu telur, larva (metacestoda) dan dewasa. Cestoda pada ruminansia termasuk pada genus moniezia, yang terdapat dua spesies, yaitu *Moniezia expansa* dan *Moniezia benedeni* (Soulsby, 1986; Urquhart *et al.*, 1996). *Moniezia expansa* menyerang kambing, domba, sapi dan ruminansia lain, sedangkan *Moniezia benedeni* terutama menyerang sapi dan juga bisa menyerang ruminansia lain (Subekti dkk., 2013). *Moniezia expansa* adalah parasit yang umum pada usus halus hewan ruminan (Schmidt, 1986; Cordero-del Campillo and Rojo-Va'zquez, 1999).

Panjang *Moniezia expansa* dapat mencapai 600 cm dan lebar 1,6 cm. Cacing ini sudah tersebar di seluruh dunia (kosmopolitan). Diagnosis penyakit ini biasanya dengan pemeriksaan tinja untuk menemukan telur yang bentuknya segitiga atau segi empat dan berisi onkosfer, atau untuk mencari segmen/proglotid. Perbedaan antara *M. benedeni* dengan *M. expansa* terletak pada: 1) *M. benedeni* lebih besar dari pada *M. expansa*. (lebar dapat mencapai 2,6 cm); 2) Inter proglottidal glands tersusun pendek dan berderet rapat pada bagian tengah segmen (Levine, 1990; Subekti dkk., 2013).

2.2 Siklus hidup dan cara penularan *Moniezia spp.*

Parasit ini memerlukan *oribated mite* untuk melengkapi siklus hidupnya. Transmisinya melalui termakannya *oribated mite* yang terinfeksi cysticeroid (Barriga, 1994). Sistiserkoid berkembang di dalam *Oribated mites* dari genus *Galumna*, *Peloribates*, *Protoschleroribates*, *Scheloribates*, *Scutovertex* dan *Zygoribatula*. Telur cacing dikeluarkan bersama tinja inang definitif satu persatu atau berkelompok dalam segmen yang terlihat seperti butiran beras. Bila segmen dimakan oleh Familia Oribatidae maka dinding segmen akan sobek dan seluruh telur termakan oleh mites, selanjutnya onkosfer akan tumbuh membesar dan dalam waktu 15 minggu menjadi bentuk sistiserkoid. Suhu dan kondisi lingkungan sangat mempengaruhi proses perkembangan telur. Misal: Pada suhu 6°C perlu

waktu 7 bulan untuk mencapai bentuk sistiserkoid, sedangkan pada suhu 26–28 °C perlu waktu 3 - 4 bulan. Kambing, domba dan sapi akan terinfeksi bila memakan *mites* yang mengandung sistiserkoid yang infeksiif, biasanya bersama dengan rumput.

2.3 Patogenesis monieziasis

Pada umumnya anak kambing, domba dan sapi di bawah umur 6 bulan paling sering terinfeksi. Infeksi yang hebat pada kambing dan domba berhubungan erat dengan jumlah *oribated mites* yang ada di padang rumput. Bila penggembalaan dilakukan pada padang rumput yang sama/tetap maka jumlah *mites* akan banyak sekali baik pada rumput maupun tanah. *Mites* ini mempunyai kebiasaan pada malam hari/senja naik ke ujung rumput atau bagian rumput yang gelap dan pada siang hari bersembunyi di dasar rumput yang tidak tercapai oleh sinar atau di permukaan tanah (bersifat fototropisme negatif). Cacing muda maupun dewasa dapat menimbulkan iritasi pada usus sehingga menyebabkan gangguan pencernaan pada usus.

2.4 Gejala klinis dan diagnosis monieziasis

Bentuk akut dapat terjadi intoksikasi akibat dari racun yang dihasilkan (diekskresi) oleh cacing dewasa. Pada infeksi ringan menyebabkan gangguan pencernaan dan pertumbuhan lambat. Gejala klinis pada umumnya tidak jelas dan biasanya terlihat kelemahan dan kekurusan. Pada infeksi yang berat bisa menimbulkan anemia, diare profus, pertumbuhan lambat, kekurusan, kelemahan dan bisa bersifat fatal terutama sering terjadi pada anak sapi.

Pemeriksaan tinja untuk melihat/mencari telur yang bentuknya segitiga atau segi empat dan berisi onkosfer, atau untuk mencari segmen/proglotid.

2.5 Antigen parasit

Secara umum, pengertian antigen adalah substansi yang dapat dikenali sebagai benda asing (*non self*) oleh sistem imun tubuh. Antigen ialah benda asing yang diukur berdasarkan keberhasilan dalam mengikat antibodi. Adapun imunogen, merupakan bagian dari antigen,

diukur berdasarkan kemampuan dalam memicu sistem imun adaptif untuk menghasilkan antibodi (Abbas *et al.*, 2000). Pada umumnya, molekul yang bersifat imunogen ialah apabila terjamin keasingannya dan mempunyai berat molekul (BM) lebih dari 5 kDa. Pada molekul yang lebih kecil, dapat menjadi imunogenik apabila terikat pada makromolekul sebagai karier (Manus, 1986). Respons imun juga dipengaruhi oleh tingkat solubilitas protein antigen. Antibodi hanya akan mengikat pada bagian khusus makromolekul, yang kemudian disebut sebagai penentu antigenik (epitop). Pada satu makromolekul mungkin terdapat sejumlah epitop yang masing-masing akan berikatan dengan antibodi yang sesuai (Abbas *et al.*, 2000).

Antigen yang berasal dari parasit akan menjadi imunogenik apabila dikenali sebagai *non self* dengan berat molekul tertentu. Secara kimiawi, zat imunogen parasit dapat berupa protein, lipida, karbohidrat, glikoprotein, dan glikolipida. Masing-masing komponen kimiawi tersebut mempunyai karakteristik ukuran, susunan rantai dan jumlah determinan yang mungkin berbeda (Abbas *et al.*, 2000).

Berdasarkan stadium dan siklus hidup parasit antara lain terdiri dari: spesifikasi genus, spesies, strain dan stadium hidup; dan parasit yang mengalami perubahan bentuk. Berbagai jenis antigen yang berasal dari parasit dapat diperinci berdasarkan sumber dan lokasi parasit, maupun populasi dan siklus hidup parasit. Berdasarkan sumber dan lokasi parasit antara lain terdiri dari: 1) exoantigen terlarut, berasal dari parasit hidup atau parasit dalam media buatan merupakan produk ekskresi berupa metabolit; 2) somatik antigen terlarut, berasal dari cacing stadium dewasa atau larva yang hancur atau dari sel permukaan tubuh parasit; 3) parasit yang mati atau fragmen-fragmen tubuhnya; 4) parasit yang hidup secara utuh; 5) cairan tubuh nematoda; dan 6) cairan kista larva cacing pita. Adapun (Page *et al.*, 1991; Warren, 1993; el-Massry, 1999).

2.6 Respons imun terhadap parasit

Respons imun spesifik terhadap infeksi beberapa cacing diperantarai oleh Ig E dan eosinofil, yang merupakan tipe khusus dari *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*

(ADCC). Antibodi (IgE) mengikat bagian permukaan dari cacing, kemudian eosinofil menyerang melalui Fc reseptor, dan eosinofil teraktivasi mensekresi granula enzim yang menghancurkan parasit. Respons tersebut dilengkapi dengan kecenderungan dari cacing untuk menstimulasi subset CD₄Th₂, yang mensekresi IL-4 dan IL-5. Interleukin-4 (IL-4) menstimulasi produksi Ig E, dan IL-5 menstimulasi perkembangan dan aktivasi eosinofil. Eosinofil kemungkinan lebih efektif untuk mematikan cacing daripada leukosit lain, karena protein granula eosinofil mungkin lebih toksik dibanding enzim proteolitik dan oksigen reaktif dari netrofil maupun makrofag. Respons imun spesifik terhadap parasit juga menambah jejas jaringan. Beberapa parasit dan produknya menginduksi respons granulomatous yang diikuti dengan fibrosis (*fibrosis concomitant*) (Roitt *et al.*, 1998; Abbas *et al.*, 2000). Pada umumnya infeksi parasit cacing ditandai dengan keberadaan imunoglobulin (Ig) E dan peningkatan kadar eosinofil. Peningkatan kedua sel 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). Amerasinghe *et al.* (1992) menyatakan, bahwa penyuntikan IL-5 pada tikus, 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 IFN γ yang menghambat reaksi hipersensitivitas dan memacu produksi Ig G2.

2.7 Perkembangan diagnosis penyakit parasitik

Beberapa metode yang dikembangkan untuk imunodiagnostik pada infeksi cacing adalah: uji biokimia (*blotting*); uji intradermal menggunakan antigen *Fasciola* spp.; uji fiksasi komplemen; hemaglutinasi tak langsung; uji aglutinasi cepat; imunodifusi; ELISA; dan imunohistokimia (Warren, 1993; Noordin *et al.*, 2005). 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).

Teknik molekular dalam bidang Parasitologi Kedokteran telah dibakukan oleh Marr *et al.* (2003) dalam bukunya *Molecular Medical Parasitology*. Teknik molekular secara luas juga telah digunakan untuk mendeteksi protozoa patogen pada lingkungan (Wendrychowicz, 2000). Teknik ini telah diterapkan dalam studi pada siklus hidup ascaridoid, sistematika dan hasil diagnosis (Zhu *et al.* 2001) serta sebagai penentu kontaminasi tanah dengan telur *geohelminth* (Fogt-Wyrwas *et al.*, 2007).

Studi molekular pada *Toxocara* dikerjakan lebih dari satu dekade yang lalu. Wu *et al.* (1997) menggunakan teknik PCR, menempatkan primer untuk identifikasi kelompok genus *Toxocara*, yang diikuti oleh Jacobs *et al.* (1997) yang mengidentifikasi spesies dari *Toxocara* dan nematoda ascaridoid zoonosis yang lain. Setiap spesies parasit Nematoda memiliki sekuens rDNA khusus (*unique*) yang dapat digunakan sebagai marker untuk membedakan kekerabatan hubungan (kekerabatan) dan atau kemiripan morfologi pada spesies (Gasser *et al.*, 1998). Dua sekuens dari region rDNA yaitu ITS1 dan ITS2, dapat digunakan sebagai marker spesies-spesifik untuk identifikasi genetik (Zhu *et al.*, 2000). Fogt-Wyrwas *et al.* (2007) menggunakan ITS-2 rDNA untuk mengidentifikasi telur cacing *T. canis* dan *T. cati* dari tanah terkontaminasi. Sekuens region ITS dari beberapa parasit ascaroid sekarang tersedia pada database DNA (DDBJ, EMBL, GenBank) (Ishiwata *et al.*, 2003). Berdasarkan data analisis sekuens ITS-1 dan ITS-2 dari *nuclear ribosomal DNA* (rDNA), *Toxocara* spp. dapat dipertimbangkan untuk menunjukkan pemisahan antara *T. canis* dan *T. cati* (Li *et al.*, 2006). Lebih lanjut dinyatakan oleh Zhu *et al.* (2001), bahwa metode PCR menggunakan marker genetik ITS dari rDNA memberikan alternatif yang dapat diandalkan, bagi metode tradisional, untuk identifikasi spesifik pada nematoda untuk diagnosis infeksi dan analisis variasi genetik secara individu di antara nematoda. Ramnath *et al.* (2014) melakukan pengamatan terhadap *R. echinobphtirida* secara morfologi yang dilengkapi dengan analisis secara molekular terhadap region ITS-2 dari rDNA yang dapat digunakan untuk identifikasi parasit secara tepat. Lebih lanjut dinyatakan bahwa panjang regio ITS-2 adalah 446 bp yang bermanfaat untuk menjelaskan hubungan kekerabatan (*phylogenetic*) dan hubungan antar spesies pada tingkat molekular.

BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1 Tujuan Penelitian

3.1.1 Tujuan khusus jangka pendek tahun I

- 1) Mendiskripsikan karakter *Moniezia expanza* dan *Moniezia benedeni* dari ruminansia yang diamati berdasarkan morfologi telur dan cacing dewasa, berat molekul (BM) protein dan antigeneisitas dengan teknik *blotting*;
- 2) Menentukan protein spesifik *Moniezia expanza* dan *Moniezia benedeni* terhadap serum kelinci yang diimunisasi homogenat *whole worm* cacing dewasa dengan spesies sama, menggunakan teknik *Western blot*.

3.1.2 Tujuan khusus jangka pendek tahun II

- 1) Menentukan reaksi silang antara protein *Moniezia expanza* dan *Moniezia benedeni* terhadap serum kelinci yang diimunisasi homogenat *whole worm* cacing dewasa dengan spesies berbeda, menggunakan teknik *Western blot*;
- 2) Menentukan nilai antigenisitas, sensitivitas dan spesifisitas protein baik pada *Moniezia expanza* dan *Moniezia benedeni* terhadap serum mencit yang diimunisasi homogenat *whole worm* cacing dewasa dengan teknik ELISA.

3.1.3 Tujuan khusus jangka pendek tahun III

- 1) Menentukan panjang dan susunan nukleotida DNA.
- 2) Menentukan tingkat homologi dari ITS-2 serta hubungan kekerabatan cacing cestoda yang menginfeksi ruminansia di Surabaya.

3.1.4 Tujuan khusus jangka panjang

- 1) Mengetahui karakter dan mendapatkan protein spesifik *Moniezia expanza* dan *Moniezia benedeni* dari ruminansia yang dapat dikembangkan untuk kit diagnostik dan kandidat vaksin.
- 2) Mendapatkan data homologi yang dapat dimanfaatkan untuk mengetahui hubungan kekerabatan (*phylogenetic tree*) cestoda pada ruminansia, untuk identifikasi, dan diagnosis etiologik.

3.2 Manfaat Penelitian

3.2.1 Manfaat teoritis

Secara teoritis hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat ilmiah sebagai dasar pengembangan diagnostik monesiasis pada ruminansia.

3.2.2 Manfaat praktis

- 1) Pengetahuan tentang karakter protein dapat digunakan sebagai pedoman untuk menentukan protein spesifik *Moniezia expanza* dan *Moniezia benedeni*;
- 2) Protein spesifik yang diperoleh dapat digunakan sebagai sumber antigen pada pemeriksaan monesiasis dengan teknik ELISA dan sebagai imunogen pada pembuatan antibodi monoklonal dan kandidat vaksin.
- 3) Data homologi yang diperoleh dapat dimanfaatkan untuk mengetahui hubungan kekerabatan (*phylogenetic tree*) cestoda pada ruminansia, untuk identifikasi, dan diagnosis etiologik.

Rencana target capaian tahunan program penelitian ini sesuai luaran yang ditargetkan dan lamanya penelitian yang akan dilakukan dapat dilihat pada Tabel 3.1.

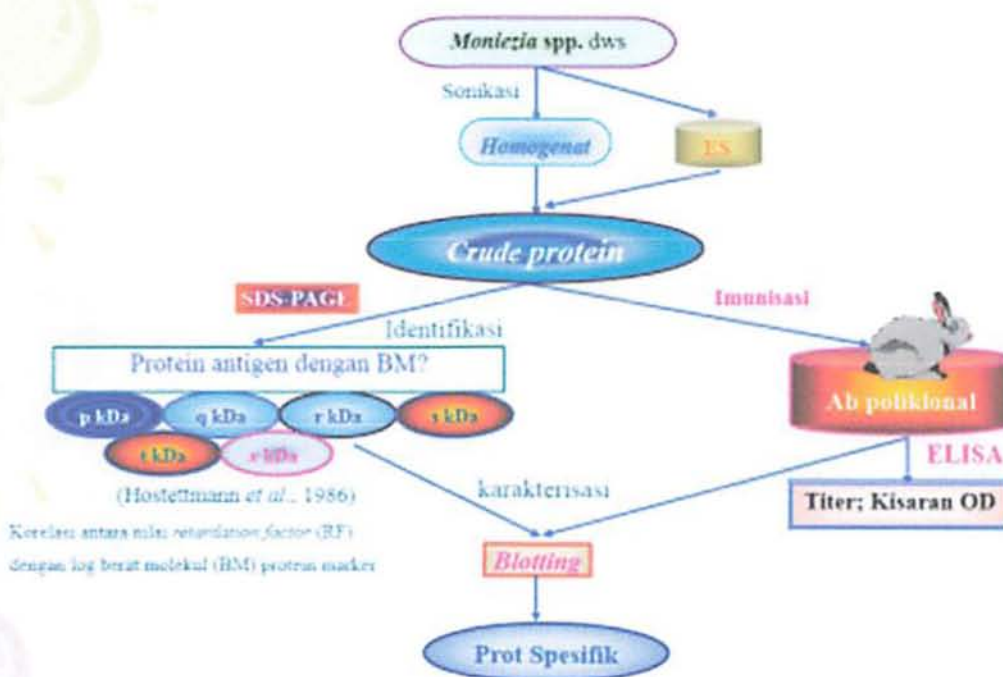
Tabel 3.1 Rencana Target Capaian Tahunan

No	Jenis Luaran	Indikator Capaian			
		TS ¹⁾	TS+1	TS+2	
1	Publikasi ilmiah	Internasional	Draf	<i>submitted</i>	<i>Accepted</i>
		Nasional Terakreditasi			
2	Pemakalah dalam temu Ilmiah	Internasional			
		Nasional	dilaksanakan	dilaksanakan	Dilaksanakan
3	<i>Invited speaker</i> dalam temu Ilmiah	Internasional			Dilaksanakan
		Nasional	dilaksanakan		
4	<i>Visiting Lecturers</i> , Internasional	Internasional			Dilaksanakan
5	Hak Kekayaan Intelektual (HKI)	Paten			
		Paten sederhana			
		Hak Cipta			
		Merek dagang			
		Rahasia dagang			
		Desain Produk Industri			
		Indikasi Geografis			
		Perlindungan Varietas Tanaman			
Perlindungan Topografi Sirkuit Terpadu					
6	Teknologi Tepat Guna				
7	Model/Purwarupa/Desain/Karya seni/ Rekayasa Sosial				
8	Buku Ajar (ISBN)	Draf	produk	Produk	
9	Tingkat Kesiapan Teknologi (TKT)	Skala 1	Skala2	Skala 3	

¹⁾TS = Tahun sekarang (tahun pertama penelitian)

BAB 4. METODE PENELITIAN

Penelitian ini selama tiga tahun, yaitu: **tahun I** tentang identifikasi dan karakterisasi protein *Moniezia* spp. dari ruminansia (*M. expansa* dan *M. benedeni*) secara biokimiawi dan imunologik; **tahun II** uji reaksi silang protein terhadap antibodi antar spesies *Moniezia* spp. dengan *Western blot*, antigenesitas, sensitivitas dan spesifisitas protein *M. expansa* dan *M. benedeni* dengan ELISA; dan **tahun III** tentang identifikasi secara molekuler dengan PCR dan sequencing DNA (Gambar 4.1).



Gambar 4.1 Kerangka operasional penelitian Tahun I

4.1 Prosedur Penelitian Tahun Pertama

Prosedur penelitian tahun pertama meliputi: 1) Koleksi sampel; 2) Identifikasi *Moniezia* spp. dari ruminansia yang diamati berdasarkan morfologi telur dan cacing dewasa; 3) Identifikasi protein berdasarkan berat molekul (BM); 4) Karakterisasi dan uji antigenesitas dengan teknik *Western blot*.

4.1.1 Koleksi sampel cestoda dari ruminansia (*M. expansa* dan *M. benedeni*)

Sampel berupa *Moniezia* spp. diperoleh dari Rumah Potong Hewan di Surabaya. Cacing dewasa kemudian dibersihkan dengan NaCl fisiologis dan diinkubasi dalam medium

NaCl fisiologis dan *phosphat buffer saline* (PBS) pada suhu inkubator 37 °C selama 4 jam. Kemudian cacing dipisahkan dengan cairan supernatan, selanjutnya supernatan disentrifugasi 1000 g selama 5 menit untuk mendapatkan telur cacing.

4.1.2 Identifikasi *M. expansa* dan *M. benedeni* yang diamati berdasarkan morfologi telur dan cacing dewasa

Proglotid *mature* dari cacing dewasa yang diperoleh dibuat preparat permanen dengan pewarnaan *Semichen-Acetic Carmine*, kemudian diamati dengan mikroskop. Telur cacing dan preparat permanen yang sudah jadi dilakukan identifikasi berdasarkan Soulsby (1986) dan dilakukan dokumentasi dengan bantuan kamera mikroskop Optilab.

4.1.3 Identifikasi protein *M. expansa* dan *M. benedeni* berdasarkan berat molekul (BM)

4.1.3.1 Pembuatan homogenat cacing dewasa

Sepanjang 40 cm proglotid cacing dewasa dicincang dengan gunting dan digerus dalam mortar secara manual kemudian disuspensi dengan PBS sebanyak 20 ml. Homogenat dibuat dengan cara melakukan sonikasi dengan frekuensi 20x60 detik dengan interval istirahat 60 detik. Kemudian disentrifus pada 3000g (\pm 5000 rpm) selama 10 menit. Supernatan diambil dan disiapkan untuk analisis protein lebih lanjut.

4.1.3.2 Analisis protein dengan teknik SDS-PAGE

Hasil pembuatan homogenat *M. expansa* dan *M. benedeni* selanjutnya 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 µl sampel berupa homogenat *M. expansa* dan *M. benedeni* 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, merkaptoetanol 5% 50 µl, aquades 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 tiga tahap, yaitu: 1) Pencucian pertama, menggunakan 25 ml metanol 50%, 3,75 ml asam asetat 7,5% dan 71,25 ml akuades 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 Coumassie blue selama 15 menit, dilanjutkan pencucian dua kali 2 menit dengan 100 ml aquadest dan kemudian ditambahkan larutan pengembang warna (200 µl asam sitrat 5%; 100 µl formaldehid 37 % dalam aquadest 200 ml) dan dilakukan pencucian kembali selama dua kali 2 menit dengan 100 ml aquadest. Setelah gel terwarnai kemudian dimasukkan dalam larutan asam asetat 10% untuk menghentikan proses pengecatan. Selanjutnya gel didokumentasi dengan kamera digital (Hostettmann *et al.*, 1986).

4.1.3.3 Penentuan berat molekul (BM) protein

Penentuan berat molekul (BM) protein hasil *running* SDS-PAGE dan *Western blot* dilakukan dengan bantuan protein standar (marker, Biorad). Penentuan BM protein dilakukan dengan mencari hubungan (korelasi) antara nilai *retardation factor* (RF) dengan log 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 yang dimodifikasi oleh Kusnoto, 2008).

Secara praktis penghitungan nilai RF dapat dirumuskan sebagai berikut: $RF = \text{Jarak} / \text{Panjang gel}$; jarak = Jarak pergerakan protein dari tempat awal, Panjang gel = Jarak pergerakan warna dari tempat awal.

Formula yang diperoleh dapat berupa regresi linier, kuadratik atau kubik dan digunakan untuk menghitung BM pada sampel dengan menentukan nilai RF sampel (X) dan BM sampel (Y).

4.1.4 Karakterisasi dan uji antigenisitas dengan teknik *blotting*

4.1.4.1 Produksi antibodi poliklonal

Pembuatan antibodi poliklonal dilakukan dengan cara menyuntikkan homogenat *M. expansa* dan *M. benedeni* pada kelinci ras Angora. Penyuntikan pertama, homogenat ditambah *complete Freund's adjuvant* (CFA) sama banyak, selanjutnya dilakukan *booster* sebanyak 3 kali dengan interval 2 minggu. Pada saat *booster*, homogenat ditambah *incomplete Freund's adjuvant* (IFA) sama banyak. Dua minggu setelah penyuntikan terakhir dilakukan pengambilan darah kelinci untuk mendapatkan serum anti-cacing sesuai dengan homogenat yang disuntikkan. Pembuatan antibodi poliklonal bertujuan untuk *blotting*, direaksikan dengan berbagai protein *M. expansa* dan *M. benedeni* dan cacing lain sehingga dapat dikarakterisasi derajat antigenisitas dan spesifisitasnya.

4.1.4.2 Karakterisasi protein dengan teknik *Western blot*

Homogenat *M. expansa* dan *M. benedeni* dilakukan *running* lagi dengan teknik SDS-PAGE dan akhirnya protein ditransfer ke membran *nitrocellulose* dan selanjutnya dilakukan *blotting*. Adapun prosedur kerja karakterisasi protein adalah meliputi *semi-dry blotting* dan *blotting*. Pada tahap *semi-dry blotting*, dilakukan beberapa hal sebagai berikut: Protein dari gel kemudian ditransfer ke membran *nitrocellulose* dengan cara memotong kertas Whatman dan *nitrocellulose* sesuai dengan besarnya gel. Enam *sheets* kertas absorben pada anoda bufer I dan 3 *sheets* pada anoda bufer II dan 6 *sheets* pada katoda bufer. Membran *nitrocellulose* diinkubasikan pada anoda bufer II selama 5 menit kemudian disusun 6 *sheets* kertas absorben dari bufer I, 3 *sheets* dari bufer II, *nitrocellulose*, poliakrilamid dan 6 *sheets*

kertas absorben dari katoda bufer. Selanjutnya diberi aliran listrik dengan $0,8 \text{ mA/cm}^2$ dari gel. Setelah protein ditransfer, *nitrocellulose* dicuci dengan aquadest selama 10 menit dan larutan TBS selama 10 menit yang selanjutnya dilakukan *blotting*.

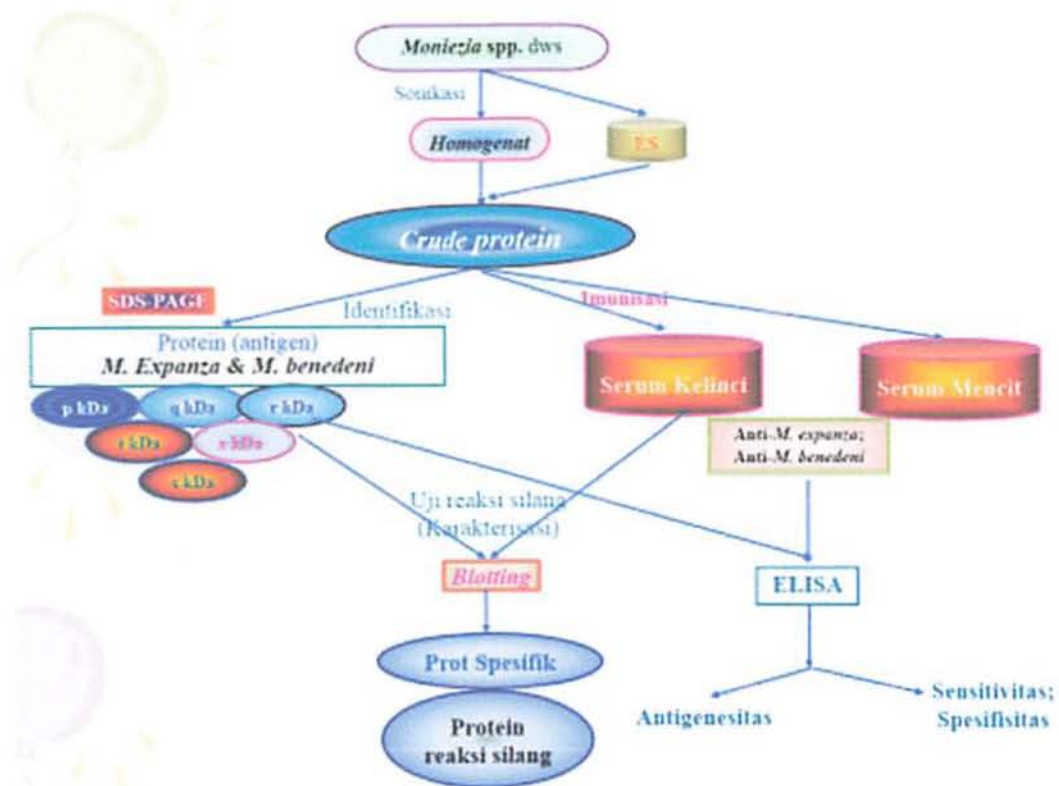
Adapun tahapan *blotting* adalah sebagai berikut: Membran *nitrocellulose blot* diblok dengan BSA 10% selama 30 menit pada temperatur ruangan kemudian dicuci dengan larutan TBS dua kali. Selanjutnya direaksikan dengan konjugat dan antibodi poliklonal (serum anti-*M. expansa* dan anti-*R. benedeni*). Setelah itu diinkubasi pada temperatur ruangan selama satu jam. Setelah dicuci dengan larutan TBS sebanyak tiga kali direaksikan dengan konjugat alkalin fosfatase dan substrat p-NPP dan diwarnai dengan BCIP/NBT. Akhirnya dikeringkan pada temperatur ruangan, kemudian ditentukan BM protein, protein spesifik dan didokumentasi.

4.1.5 Analisis Data Penelitian Tahun I

Data yang diperoleh pada tahun pertama tahap-2 berupa identifikasi secara morfologi terhadap cestoda pada ruminansia (*M. expansa* dan *M. benedeni*) disajikan secara deskriptif. Data yang diperoleh pada tahap-3, 4 dan 5 berupa berat molekul protein cacing dan karakter protein *M. expansa* dan *M. benedeni*, baik yang bersifat spesifik maupun yang terjadi reaksi silang, disajikan secara deskriptif akan tetapi penghitungan BM protein hasil *running* dilakukan dengan menggunakan rumus korelasi regresi (Hostettmann *et al.*, 1986). Analisis korelasi regresi dan tabulasi silang dilakukan dengan menggunakan *statistical product and service solution (SPSS) for Windows rel. 23* (Santoso, 2016).

4.2 Prosedur Penelitian Tahun Kedua

Prosedur penelitian tahun kedua, meliputi: 1) Uji reaksi silang protein *M. expansa* dan *M. benedeni* dari ruminansia terhadap serum mencit yang diimunisasi homogenat *M. expansa* dan *M. benedeni* dengan teknik *Western blot*; 2) Uji antigenisitas, sensitivitas dan spesifisitas protein *M. expansa* dan *M. benedeni* terhadap serum mencit yang diimunisasi homogenat *M. expansa* dan *M. benedeni* dan cacing lain menggunakan teknik *indirect-ELISA* (Gambar 4.2).



Gambar 4.2 Kerangka operasional penelitian Tahun II

4.2.1 Uji reaksi silang protein *M. expansa* dan *M. benedeni* terhadap serum mencit yang diimunisasi homogenat *R. tetragona* dan *R. echinobothrida*

Uji reaksi silang dilakukan terhadap protein *M. expansa* dan *M. benedeni* dari ruminansia terhadap serum hewan coba (mencit) yang diimunisasi homogenat *M. expansa* dan *M. benedeni*. Teknik *Western blot* yang digunakan pada prinsipnya adalah sama dengan karakterisasi protein, akan tetapi antibodi primernya berbeda, yaitu menggunakan serum kelinci yang diimunisasi dengan homogenat cacing yang lain.

4.2.2 Uji antigenisitas protein *Moniezia* spp.

Pemeriksaan antigenisitas dilakukan terhadap protein *M. expansa* dan *M. benedeni* sebagai antigen terhadap serum darah mencit yang diimunisasi dengan homogenat cacing yang berbeda dengan teknik *indirect-ELISA*. Data yang diperoleh berupa nilai *optical density* (OD) diinterpretasikan secara semi kuantitatif.

Pada tahap ini terdapat beberapa kegiatan meliputi: 1) Imunisasi pada mencit; 2) Prosedur *indirect-ELISA*; dan 3) Uji antigenisitas protein *M. expansa* dan *M. benedeni* dengan *indirect-ELISA*.

4.2.2.1 Imunisasi pada mencit

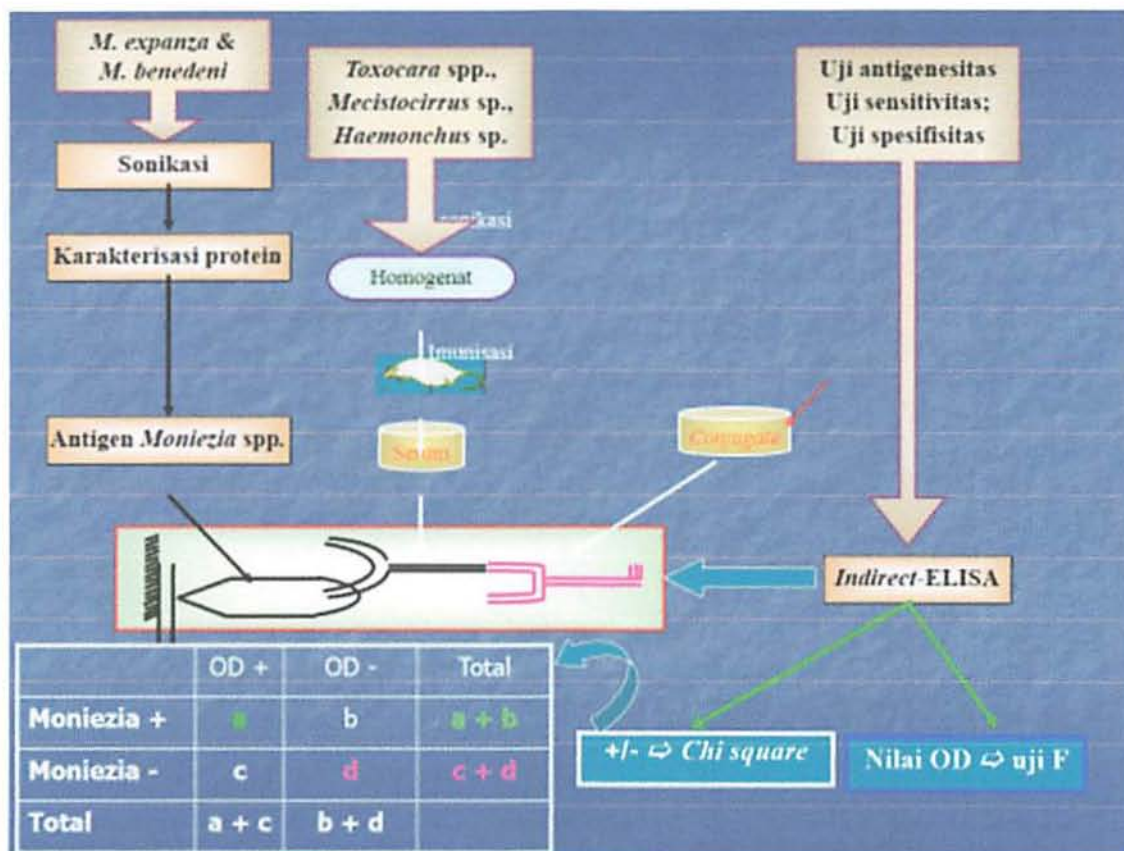
Mencit Balb/c jantan umur 6-8 minggu dibagi menjadi beberapa kelompok: Kelompok 1 diimunisasi dengan homogenat *M. expansa*; Kelompok 2, diimunisasi dengan homogenat cacing *M. benedeni*; Kelompok 3, diimunisasi dengan homogenat cacing *Toxocara vitulorum*; Kelompok 4, diimunisasi dengan homogenat cacing *Fasciola* spp.; Kelompok 5, diinjeksi dengan ajuvan sebagai kontrol. Imunisasi dilakukan sebanyak tiga kali dengan interval waktu 2 minggu. Imunisasi pertama dengan penambahan *complete Freund's adjuvant* sama banyak dan imunisasi berikutnya (*booster*) dilakukan tiga kali dengan protein yang sama dalam *incomplete Freund's adjuvant*. Aplikasi imunisasi dilakukan secara subkutan dengan dosis protein 200 µg/ekor. Dua minggu setelah *booster* terakhir serum dipanen untuk dilakukan uji sensitivitas dan spesifisitas dengan *indirect-ELISA*.

4.2.2.2 Prosedur *indirect-ELISA*

Antigen berupa protein *M. expansa* dan *M. benedeni* ataupun cacing lain sebanyak 2 µg/ml diencerkan dengan bufer karbonat (50 mmol/l karbonat, pH 9,6) kemudian diadsorbsikan pada mikroplat ELISA sebanyak 100 µl/sumuran dan diinkubasi pada suhu 4°C semalam. Mikroplat kemudian diblok dengan *buffer blocking* (1% BSA, 0,02% NaN₃ dalam PBS) dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 jam. Selanjutnya dicuci dengan bufer pencuci (0,15 M NaCl, 0,05 % Triton x-100, 0,02% NaN₃) sebanyak tiga kali. Antibodi yang diuji yang diuji dimasukkan dalam tiap sumuran sebanyak 100 µl dan diinkubasi pada 37 °C selama 1 jam, setelah itu dicuci tiga kali dengan bufer pencuci, kemudian diikuti dengan penambahan konjugat (*rabbit anti-mouse* Ig G yang berlabel enzim alkalin fosfatase) yang diencerkan dengan *buffer blocking* dengan pengenceran 1 : 1000 sebanyak 100 µl/sumuran dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Berikutnya mikroplat dicuci kembali dengan bufer pencuci untuk kemudian ditambahkan substrat (2,7 mmol/l 4-nitrofenil fosfat dalam 1 M dietanolamin; 0,5 M MgCl₂; 0,02 % NaN₃; pH 9,8) sebanyak 100 µl/sumuran dan diinkubasi selama 10-30 menit dalam ruang gelap. Resapan kemudian dibaca dengan *ELISA-reader* pada panjang gelombang 405 nm (Kuno, 1991).

4.2.2.3 Uji antigenisitas protein *M. expansa* dan *M. benedeni*

Uji antigenisitas protein dilakukan dengan melakukan analisis nilai *optical density* (OD) hasil pembacaan dengan ELISA-reader dengan uji Anava. Untuk menentukan sensitivitas dan spesifisitas protein baik untuk *M. expansa* dan *M. benedeni* dilakukan pengujian terhadap serum mencit yang telah diimunisasi protein cacing tertentu yang dibandingkan dengan serum mencit yang diimunisasi homogenat cacing lain dan kontrol.



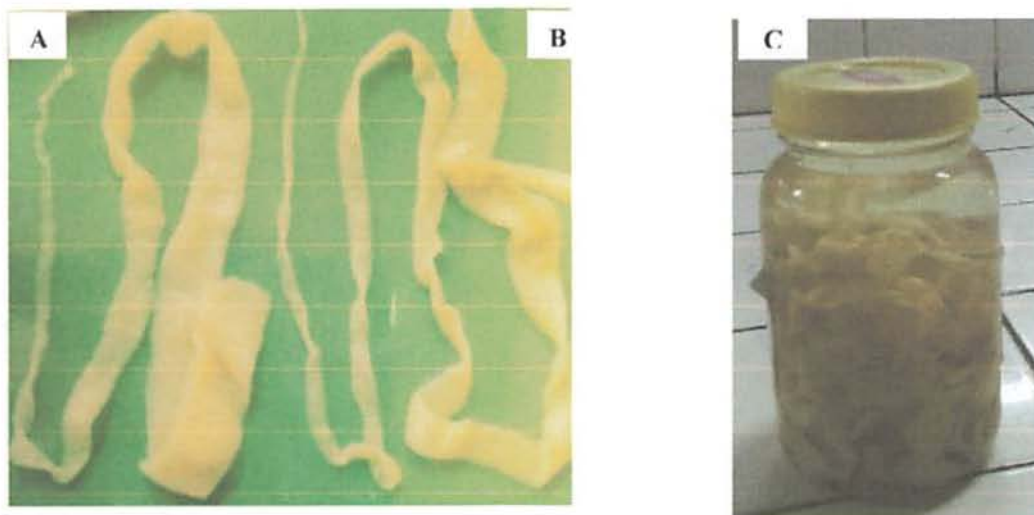
Gambar 4.3 Prosedur uji antigenisitas, sensitivitas dan spesifisitas protein *Moniezia* spp.

4.2.3 Analisis Data Penelitian Tahun II

Data yang diperoleh pada tahun kedua tahap-1 berupa berat molekul protein *M. expansa* dan *M. benedeni* disajikan secara deskriptif, akan tetapi penghitungan BM protein hasil *running* dilakukan dengan menggunakan rumus korelasi regresi (Hostettmann *et al.*, 1986). Data yang diperoleh pada tahun kedua tahap-2 adalah nilai antigenisitas yang diukur berdasarkan nilai OD serum mencit yang diinterpretasikan secara semi kuantitatif (de Savigny, 1980). Analisis statistik (Anava Faktorial dan korelasi regresi) dan tabulasi silang dilakukan dengan menggunakan *Statistical Product and Service Solution (SPSS) for Windows rel. 13* (Santoso, 2000).

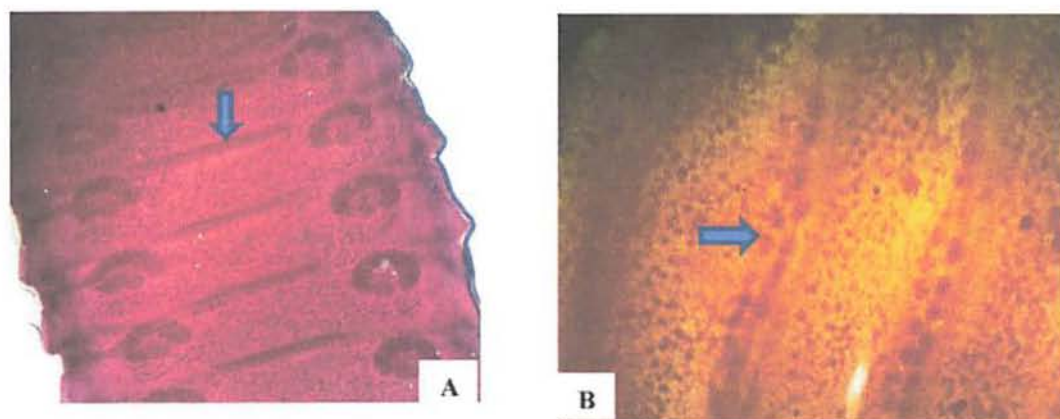
BAB 5
HASIL PENELITIAN5.1 Koleksi Cacing *Moniezia* spp.

Cacing *Moniezia* spp. dikoleksi dari usus halus sapi dan kambing yang dipotong di Rumah Potong Hewan Pegirikan, Surabaya. Dokumentasi hasil koleksi cacing tersebut dapat dilihat pada Gambar 5.1.



Gambar 5.1 Dokumentasi cacing *Moniezia* spp. A = *M. benedeni*, B = *M. expanza*, C = sampel yang dipersiapkan untuk proses berikutnya.

Dokumentasi hasil pewarwaan Carmin terhadap cacing *Moniezia* sp. dapat dilihat pada Gambar 5.2.

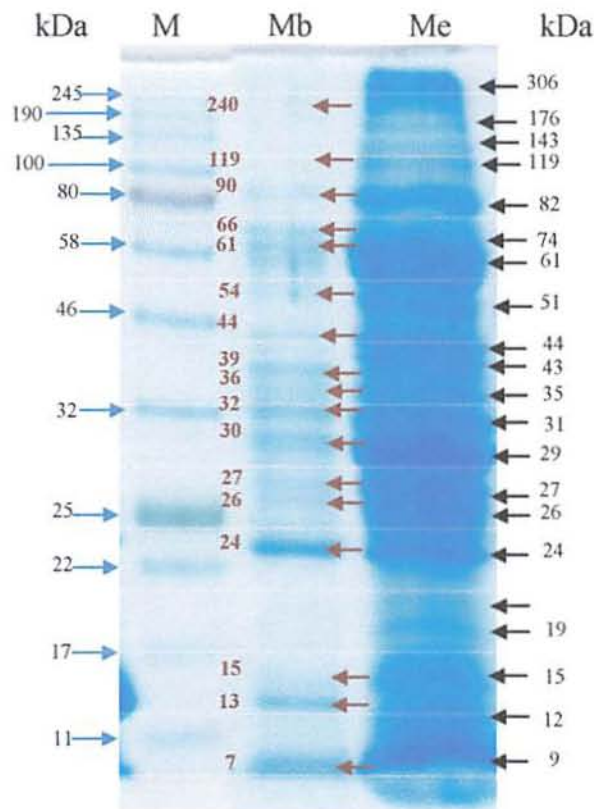


Gambar 5.2 Dokumentasi hasil identifikasi spesies *Moniezia* sp. terhadap preparat permanen dengan pewarnaan Carmin. A = *M. benedeni*. B = *M. expanza*. Anak panah menunjukkan organ interproglotidal glands.

Panjang cacing *Moniezia* spp. dapat mencapai 600 cm dengan lebar 1,6 cm. Lebar skoleks 0,36-0,8 mm dengan *sucker* yang menonjol (*prominent*). Segmen lebih lebar daripada panjang dan tiap-tiap segmen mengandung 2 genital organ. Ovarium dan *viteline gland* berbentuk cincin pada kedua sisi, di sebelah medial ke arah longitudinal terletak *excretory canals*. Testis tersebar di bagian sentral atau berkumpul di kedua sisi. Di tepi posterior tiap-tiap proglotid terdapat 1 deret *interproglottidal gland* tersusun seperti cincin-cincin kecil (Soulsby, 1986; Kusnoto dkk., 2007). Lebih lanjut dinyatakan bahwa *M. benedeni* lebih besar daripada *M. expansa* (lebarnya dapat mencapai 2,6 cm). *Interproglottidal glands* *M. benedeni* tersusun pendek dan berderet rapat pada bagian tengah segmen, sedangkan pada *M. expansa* menyebar sepanjang *interproglottidal gland*.

5.2 Hasil Analisisasi Protein dengan SDS-PAGE

Hasil analisis protein dari *M. benedeni* dan *M. expansa* dengan menggunakan teknik SDS-PAGE diperoleh 17 dan 18 pita protein, secara lengkap analisis protein dapat dilihat pada Gambar 5.3.



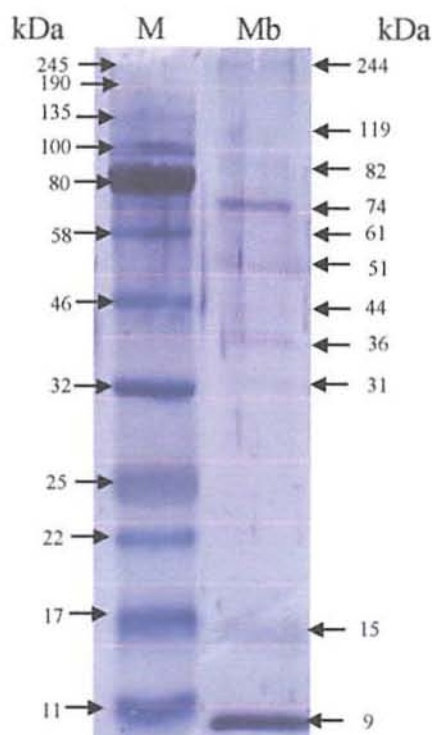
Gambar 5.3 Hasil analisis protein *whole worm ekstrak* *Moniezia* spp. dengan teknik SDS-PAGE. M = Marker (Sigma) Mb = *M. benedeni*; Me = *M. expansa*..

Hasil *running* SDS-PAGE pada *M. benedeni* didapatkan beberapa protein dengan berat molekul 244, 176, 143, 119, 82, 74, 61, 51, 44, 43, 36, 31, 29, 27, 26, 24, 19, 15, 12 dan kDa. Pada *M. expanza* hasil *running* menunjukkan pita pada BM 240, 119, 90, 66, 61, 54, 44, 39, 36, 32, 30, 27, 26, 24, 15, 13, 9 dan 7 kDa. Secara lengkap perhitungan BM pada sampel dapat dilihat pada Lampiran 1.

Keberhasilan *running* tersebut dipengaruhi oleh beberapa hal antara lain kebersihan isolat, tingkat kemurnian isolat, dan kadar protein dalam homogenat (Kusnoto, 2003). Lebih lanjut dinyatakan bahwa, kebersihan isolat juga mempengaruhi kualitas pita protein yang terbentuk pada gel, pita terlihat tajam dan gel terang, sehingga memudahkan analisis protein dan dokumentasi. Isolat yang murni dan kadar protein homogenat yang baik akan menghasilkan pita protein yang baik dan jelas sehingga dapat memudahkan analisis BM pada pita yang terbentuk.

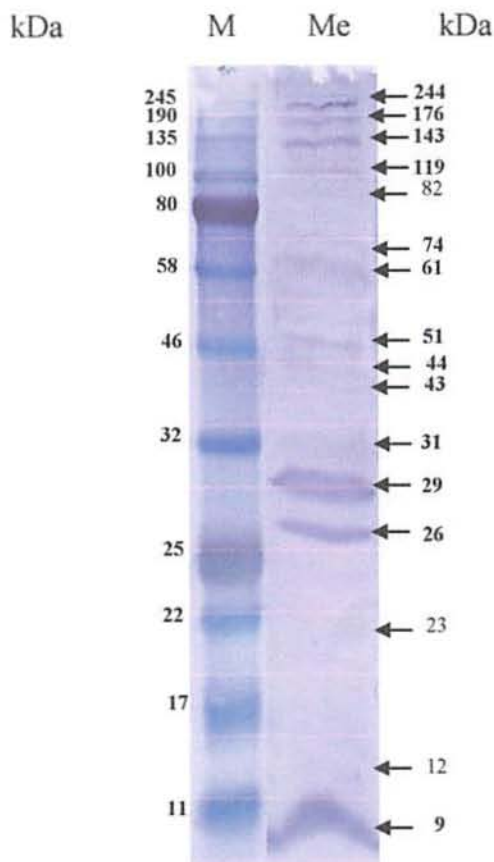
5.3 Hasil Karakterisasi Protein dengan *Western Blot*

Hasil karakterisasi protein *M. benedeni* dan *M. expanza* dengan menggunakan teknik *Western blot* berupa pita yang terpisah, dengan berat molekul yang terdeteksi antara 6 kDa sampai dengan 250 kDa. Pada protein *M. benedeni* terdapat ikatan dengan serum anti *M. benedeni* pada BM 244, 119, 82, 74, 61, 51, 44, 36, 31, 15 dan 9 kDa (Gambar 5.4).



Gambar 5.4 Hasil karakterisasi protein *M. benedeni* terhadap serum anti-*M. benedeni* menggunakan teknik *Western Blot*. M = Marker (Sigma), Mb = *M. benedeni*.

Pada protein *M. expanza* menunjukkan ikatan dengan serum anti-*M. expanza* pada BM 240, 176, 143, 119, 82, 74, 61, 51, 44, 43, 31, 29, 26, 23, 12 dan 9 kDa (Gambar 5.5).



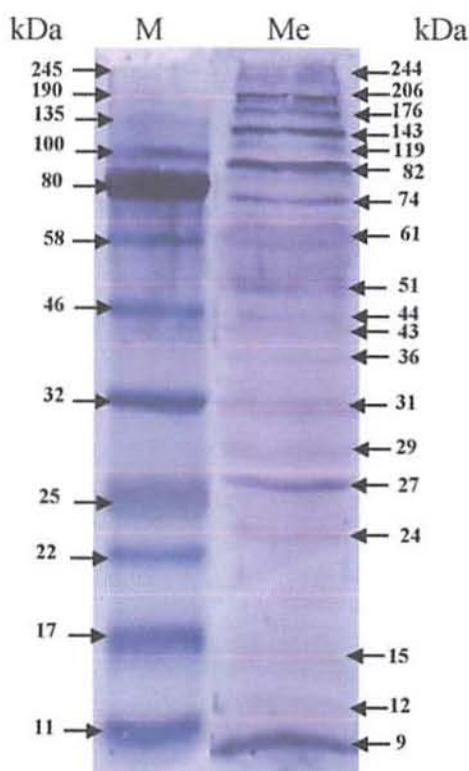
Gambar 5.5 Hasil karakterisasi protein *M. expanza* terhadap serum anti-*M. expanza* menggunakan teknik *Western Blot*. M = Marker (Sigma); Me = *M. expanza*.

Karakterisasi protein *M. benedeni* dan *M. expanza* dilakukan menggunakan teknik *Western blot*. Prinsip dasar teknik ini adalah melakukan analisis protein dengan SDS-PAGE dan didapatkan protein dengan BM yang berbeda yang terpisah pada area gel, kemudian ditransfer dari *polyacrilamid gel* ke *membrane nitroselulose* dengan teknik *Western blot* (Rantam, 2003). Pada Gambar 5.4 dan 5.5 juga terlihat adanya pita (*band*) yang merupakan hasil reaksi antara protein *M. benedeni* dan *M. expanza* dengan serum anti-*M. benedeni* dan anti-*M. expanza*. Ikatan tersebut merupakan protein spesifik, namun demikian masih perlu diuji terhadap serum yang berbeda spesies, genus bahkan klas agar terhindar dari protein yang dapat mengakibatkan reaksi silang. Hal ini karena protein yang dapat mengikat antibodi

terhadap cacing lain dapat menimbulkan hasil, sehingga dengan positif palsu (*false positif*), yang dapat menurunkan spesifisitas diagnosis helminthiasis (Kusnoto, 2010).

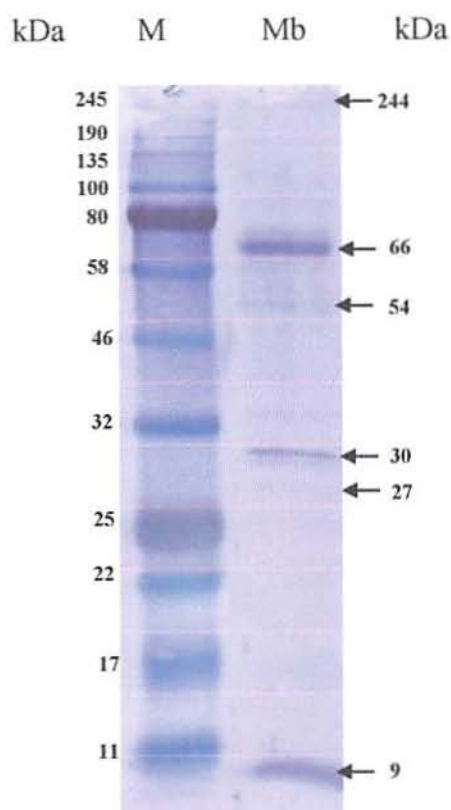
5.4 Deteksi Reaksi Silang antar Spesies *Moniezia* dengan *Western Blot*

Pada protein *M. expanza* menunjukkan ikatan dengan serum anti-*M. benedeni* pada BM 240, 206, 176, 143, 119, 82, 74, 61, 44, 43, 36, 31, 29, 27, 24, 15, 12 dan 9 kDa. Reaksi silang antara protein *M. expanza* dengan serum anti-*M. benedeni* secara lengkap dapat dilihat pada Gambar 5.6.



Gambar 5.6 Reaksi silang antara protein *M. expanza* dengan serum anti-*M. benedeni* menggunakan teknik *Western Blot*. kDa = kilo Dalton, M = Marker (Sigma); Me = protein *M. expanza*.

Pada protein *M. benedeni* menunjukkan ikatan dengan serum anti-*M. expanza* pada BM 244, 206, 176, 143, 119, 82, 74, 61, 44, 43, 36, 31, 29, 27, 24, 15, 12 dan 9 kDa. Reaksi silang antara protein *M. benedeni* dengan serum anti-*M. expanza* secara lengkap dapat dilihat pada Gambar 5.7.



Gambar 5.7 Hasil karakterisasi protein *M. benedeni* terhadap serum anti-*M. expanza* menggunakan teknik *Western Blot*. kDa = kilo Dalton, M = Marker Rainbow (Sigma); 1 = *M. benedeni*.

Pada prinsipnya deteksi reaksi silang dengan *Western blot* adalah karakterisasi protein tetapi menggunakan protein dan anti-serum dari cacing yang berbeda, sehingga hasilnya merupakan ikatan protein yang tidak spesifik. Protein ini memiliki spesifisitas rendah dan tidak baik dikembangkan untuk diagnosis karena dapat menyebabkan *false positive* (Kusnoto, 2008). Ada beberapa faktor yang mempengaruhi efektifitas *Western blot* dalam mendeteksi reaksi silang yaitu tebal dan macam gel yang di gunakan, jenis protein, lama transfer dan macam transfer, tanpa mempengaruhi atau mempengaru ikatan dari protein. Proses *Western Blot* ini akan memberikan kemungkinan mendeteksi protein secara radiografi, enzimatis, dan imunologis (Kusnoto, 2003; Intan, 2008).

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat diketahui bahwa protein *M. expanza* yang tidak terjadi reaksi silang dengan serum anti-*M. benedeni* yaitu pada BM 26 dan 23 kDa. Protein ini dapat dikembangkan untuk kit diagnosis khususnya untuk infeksi *M. expanza*. Protein *M. benedeni* dengan BM 51 kDa merupakan protein yang tidak mengalami reaksi silang

dengan serum anti-*M. expanza* sehingga dapat dikembangkan untuk diagnosis moneziasis khususnya infeksi *M. benedeni*. Protein dengan BM 244, 119, 82, 74, 61, 44, 36, 31, 15 dan 9 kDa baik dari *M. benedeni* maupun *M. expanza* merupakan protein yang mengalami reaksi silang baik dengan serum anti-*M. benedeni* maupun anti-*M. expanza*. Protein tersebut dapat dikembangkan sebagai kandidat vaksin, sehingga dapat memberikan kekebalan silang.

5.4 Hasil Uji Antigenesitas Protein dengan *Moniezia* spp. dengan ELISA

Nilai *optical density* (OD) serum mencit yang diimunisasi dengan homogenat *Moniezia expanza* dan *Moniezia benedeni* terhadap antigen dari protein *Moniezia expanza* dan *Moniezia benedeni* seperti terlihat pada Tabel 5.1.

Tabel 5.1 Nilai Optical Density

Antigen~Antibodi	Mean \pm Std. Deviation
Me~Mb	0,6385 ^a \pm 0,2824
Mb~Mb	0,7423 ^{ab} \pm 0,2658
Me~Me	1,2623 ^b \pm 0,4886
Mb~Me	1,1050 ^{ab} \pm 0,2619

Me = *Moniezia expanza*, Mb = *Moniezia benedeni*

Protein yang digunakan sebagai antigen pada uji ELISA adalah *crude protein*, serum yang digunakan juga serum anti- terhadap homogenat *Moniesia* spp. yang juga *crude protein*. Limfosit T dan B hanya mampu mengenali satu epitop yang spesifik. Jadi adanya respons imun yang diinduksi oleh banyak epitop, maka diperlukan pengaktifan limfosit untuk berdeferensiasi menjadi berbagai limfosit spesifik terhadap epitop. Pengaktifan berbagai limfosit tersebut dapat menumbuhkan banyak klon dari sel yang sama untuk merespons antigen, sehingga mengakibatkan proliferasi dan diferensiasi limfosit dengan spesifisitas yang berbeda, oleh karena itu dikenal dengan antibodi poliklonal (Rantam, 2003).

BAB VI RENCANA TAHUN BERIKUTNYA

6.1 Prosedur Penelitian Tahun Ketiga

Tahun ketiga, meliputi beberapa tahap, yaitu: 1) Persiapan sampel; 2) Isolasi DNA; 3) Amplifikasi DNA; 4) Elektroforesis DNA; 5) Pemetaan restriksi; 6) Perbanyakkan produk PCR; 7) Pemurnian DNA produk PCR; 8) Isolasi DNA dari gel agarose; 9) Sekuensing; dan 10) Analisis homologi nukleotida.

6.1 Persiapan sampel

Homogenat dibuat dengan cara melakukan sonikasi terhadap cacing *M. expansa* dan *M. benedeni* yang diisolasi dari usus halus ruminansia. Sonikasi dilakukan dengan frekuensi 10x60 detik dengan interval istirahat 60 detik. Selanjutnya dilakukan penambahan NP 40 sebanyak 25 µl/ml dan disentrifus pada 5000 rpm selama 10 menit, supernatan diambil dan ditambahkan NP 40 sebanyak 25 µl/ml kemudian disentrifus pada 45.000 rpm selama 25 menit. *Pellet* diambil dan siap untuk analisis protein lebih lanjut.

6.2 Isolasi genomik DNA dan amplifikasi region ITS2

DNA genomik (gDNA) dari seekor cacing dewasa diisolasi menggunakan metode phenol/chloroform/iso-amyl alkohol standart (Sambrook and Russel, 2001). Integritas DNA dianalisis pada 0.8 % (w/v) agarose gel berisi 0,05 % etidium bromid. Sikuen ITS-2 diperoleh dengan melakukan amplifikasi rDNA menggunakan primer universal (Bowles *et al.*, 1995).

ITS1 BD1 (Forward): 5'- GTCGTAACAAGGTTTCCGTA-3'

4S (Reverse): 5'- TCTAGATGCGTTCGAA (G/A) TGTCGATG-3'

ITS2 3S (Forward): 5'- GGTACCGGTGGATCACTCGGCTCGTG-3'

A28 (Reverse): 5'- GGGATCCTGGTTAGTTTCTTTTCCCTCCGC-3'.

COI JB3 (forward): 5'-TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT-3'

JB4 (reverse): 5'-TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG-3'.

Amplifikasi PCR dilakukan dalam 25 µl reaksi campuran berisi buffer 1 x PCR, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 10 pmol pada setiap primer, 1 U pada Taq DNA polimerase dan 30-50 ng pada gDNA menggunakan *automated thermal cycler* (AB Veriti™-4375786). Kondisi *cycling* mengikuti: denaturasi awal pada 90 °C selama 5 menit diikuti dengan 35 siklus pada 95 °C selama 30', 55 °C selama 45', 72 °C selama 60' dan ekstensi terakhir pada 75 °C selama 10 menit. Amplicon dipisahkan pada 1,5 % (w/v) gel agarosa berisi 0,05 % etidium bromid. Produk PCR dipisahkan dari gel dan dimurnikan menggunakan Sigma gel elution kit (GenElute™-NA1111). Amplicon diresuspensi dengan *nuclease-free water* dan disekuensing dengan *automated sequencer* (Ramnath *et al.*, 2014).

6.3 Isolasi DNA

Homogenat *M. expansa* dan *M. benedeni* dicuci tiga kali menggunakan PBS dengan cara sentrifugasi 25.000 rpm suhu 4°C masing-masing selama 10 menit. Endapan sel ditambahkan bufer K (PBS-Tween 20 yang mengandung proteinase 300 µg/ml) volume sama banyak dan diinkubasi pada 56°C selama 45 menit serta 95°C selama 10 menit. Berikutnya sel diekstraksi dengan penambahan larutan fenol : kloroform (1:24) volume sama banyak dan dihomogenkan dengan forték sampai membentuk tiga lapisan. Lapisan atas yang jernih (DNA) diambil kemudian ditambahkan etanol absolut dengan dua kali volume dan disentrifugasi untuk diambil endapan DNA.

6.4 Amplifikasi DNA (PCR)

Hasil isolasi DNA kemudian dilakukan amplifikasi DNA (PCR) dengan menggunakan *Ready to go PCR kit* (Amersham). Bead PCR ditambah dengan 5 µl DNA, 2 µl primer (100 pmol) 3S dan 2 µl primer A28, sehingga total volume 25 µl. Bead kemudian di-*spindown* dan dimasukkan mesin PCR dengan denaturasi awal 95°C 25 menit dan diikuti dengan denaturasi 95°C selama 60 detik, *anealing* 55°C 60 detik, *extention* 72°C 60 detik dan *extention* akhir 72°C 5 menit, sebanyak 30 siklus. Produk PCR kemudian dimasukkan ke dalam es dan disimpan pada -20°C sampai digunakan (Zhu *et al.*, 2000).

6.5 Elektroforesis DNA

DNA produk PCR dilakukan analisis dengan agarose DNA elektroforesis dengan konsentrasi akhir 1%. Marker yang digunakan untuk elektroforesis DNA adalah marker DNA dengan panjang 1 kb (kisaran 250-1000 bp). Agarose 1% dipanaskan kemudian ditambah 0,4 µg/ml etidium bromid dan dicetak pada gel plate yang didalamnya diletakkan *comb*, selanjutnya dituangi dengan buffer TAE (Sambrook *et al.*, 1989). Sebanyak 5 µl DNA ditambah dengan 2 µl *blue juice* dimasukkan ke dalam sumuran *comb* pada agar. Setelah itu *power supply* dinyalakan dengan kekuatan 100 V selama 30 menit. Gel kemudian divisualisasi dengan UV transluminator.

6.6 Pemetaan Restriksi

Pemetaan restriksi digunakan untuk mengetahui sisi pemotongan rDNA dari ITS-2 oleh enzim restriksi. Enzim yang digunakan adalah *TaqI*. Larutan DNA 10 µl ditambah 1 µl enzim restriksi (10 U/µl), 1 µl buffer enzim 10x, kemudian diinkubasi 37°C selama 3 jam. Larutan DNA kemudian di-*running* pada 1% agarose dengan TAE *buffer* dan hasil divisualisasi dengan UV transluminator (Sambrook *et al.*, 1989).

6.7 Perbanyakan Produk PCR / Amplifikasi DNA

Untuk melakukan Sekuensing DNA perlu dilakukan perbanyakan produk PCR dengan melakukan amplifikasi DNA. Masing-masing sampel memerlukan volume sekurang-kurangnya 100 µl *tube bead* PCR. Hasil sintesis cDNA kemudian dilakukan amplifikasi DNA (PCR) dengan menggunakan *Ready to go PCR kit* (Amersham). *Bead* PCR ditambah dengan 5 µl DNA, 2 µl primer (100 pmol) primer sehingga total volume 25 µl. *Bead* kemudian di-*spindown* dan dimasukkan mesin PCR dengan denaturasi awal 95 °C 2 menit dan diikuti dengan denaturasi 95 °C selama 60 detik, *anealing* 55 °C 60 detik, *extention* 72 °C 60 detik dan *extention* akhir 72 °C 5 menit, sebanyak 30 siklus. Produk PCR kemudian dimasukkan ke dalam es dan disimpan pada suhu -20°C sampai digunakan (Zhu *et al.*, 2000).

6.8 Pemurnian DNA dari Larutan Produk PCR

Pemurnian DNA dari larutan produk PCR dilakukan dengan *gen clean kit* (Biogene). Sebanyak 300 μ l larutan DNA ditambah dengan 400 μ l spin glassmilk yang telah diletakkan dalam spin filter. Tabung diinkubasi pada suhu ruang 5 menit dan dicampur tiap 1-2 menit, disentrifus 1 menit atau sampai likuid dapat dipindahkan dari *catchtube* kemudian filter dicuci dengan 500 μ l larutan pencuci dan disentrifus 30 detik, disentrifus ulang 2 menit untuk mengeringkan pelet. Filter kemudian dipindahkan ke *catchtube* baru dan ditambah dengan 15 μ l larutan elusi pada filter. *Spin glass milk* selanjutnya diresuspensi dengan cara memipet, disentrifus 30 detik untuk memindahkan DNA eluat ke dalam *catchtube* baru. *Spinfilter* kemudian dibuang dan DNA dapat disimpan sampai digunakan (Manual Biogene).

6.9 Pemurnian DNA dari TAE Agarose Gel

Teknik pemurnian DNA dari agarose gel hampir sama dengan dari larutan produk PCR, hanya saja larutan DNA diganti dengan gel yang mengandung pita yang telah dipotong. Gel kemudian dipanaskan pada 55°C selama 5 menit untuk melelehkan gel. Selanjutnya sama dengan teknik pemurnian DNA dari produk PCR (Manual Biogene).

6.10 Sekuensing

Sekuensing dilakukan dengan *automated sequencer* ABI Prism 310 dengan menggunakan *ready reaction kit* (Applied Biosystems) dan *big dye terminator kit* (Applied Biosystems). DNA kering dengan konsentrasi 200 ng/ml ditambah 25 μ l *template suppressen reagent*, diforteks, kemudian dipanaskan 95 °C selama 5 menit dan dimasukkan ke dalam es. Sebanyak 30-90 ng DNA ditambah primer 3S, 8 μ l *ready reaction mix* sehingga total volume mencapai 20 μ l. tabung kemudian di-*spin down* dan ditambah 30 μ l *mineral oil*. Tabung kemudian di-running pada mesin *sequencer* dengan program 96 °C 5 menit, 96 °C 30 detik, 50 °C 15 detik dan 40 °C 4 detik sebanyak 25 siklus. Hasil sikuen kemudian di-*loading* dalam mesin *sequencer* dan hasil dibaca melalui monitor dalam bentuk grafik alogram (Sambrook *et al.*, 1989).

6.11 Analisis sikuen dan konstruksi pohon filogenetika

Sikuens nukleotida di-*alignment* dengan ClustalW dan BioEdit softwares (Thompson *et al.*, 1994). Setelah *alignment*, daerah-daerah rancu (yaitu: yang berisi *gap*) dipindahkan. Analisis dilaksanakan di semua penggantian. Pohon filogenetika dikonstruksi dengan membandingkan sikuens ITS2 dari *R. echinobothrida* dengan sikuens ITS2 dari cestoda cyclophyllidea lain yang tersedia di GenBank menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>). Sikuen dimasukkan, diedit, dan di-*align* menggunakan CrustalX, dalam MEGA 5.05 (Tamura *et al.*, 2011). Untuk konstruksi pohon *distance-based neighbor-joining* (NJ) seperti *character-based maximum parsimony* (MP) *methods* digunakan dengan dukungan cabang yang memberikan menyajikan penggunaan 1000 replikat. Sejarah evolusioner diduga menggunakan metoda NJ (Saitou and Nei 1987). Jarak yang evolusiner dihitung dengan metoda maximum composite likelihood dan di dalam unit-unit dari banyaknya substitusi basa per lokasi. Pohon MP diperoleh dengan Close-Neighbor-Interchange algorithm (Nei and Kumar, 2000) dengan pencarian level 3 di mana pohon-pohon yang awal diperoleh dengan penambahan sikuen yang acak (100 replikat). Semua posisi yang berisi data *gap* dan data hilang dihapuskan.

BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN**7.1 Kesimpulan**

Telah berhasil dikarakterisasi protein *Moniezia* spp. terhadap serum kelinci yang diimunisasi homogenat cacing sejenis, sehingga dapat disimpulkan beberapa hal sebagai berikut.

- 1) Hasil *running* SDS-PAGE pada *M. benedeni* didapatkan beberapa protein dengan berat molekul 240, 176, 143, 119, 82, 74, 61, 51, 44, 43, 36, 31, 29, 27, 26, 24, 19, 15, 12 dan kDa. Pada *M. expansa* hasil *running* menunjukkan pita pada BM 240, 119, 90, 66, 61, 54, 44, 39, 36, 32, 30, 27, 26, 24, 15, 13, 9 dan 7 kDa.
- 2) Berdasarkan hasil *Western blot* protein spesifik *M. benedeni* adalah pada BM 244, 119, 82, 74, 61, 51, 44, 36, 31, 15 dan 9 kDa, sedangkan protein spesifik *M. expansa* adalah pada BM 244, 176, 143, 119, 82, 74, 61, 51, 44, 43, 31, 29, 26, 23, 12 dan 9 kDa.
- 3) Reaksi silang antara protein *M. expansa* dengan serum anti-*M. benedeni* terjadi pada protein 244, 206, 176, 143, 119, 82, 74, 61, 44, 43, 36, 31, 29, 27, 24, 15, 12 dan 9 kDa, sedangkan antara protein *M. benedeni* dengan serum anti-*M. expansa* 240, 206, 176, 143, 119, 82, 74, 61, 44, 43, 36, 31, 29, 27, 24, 15, 12 dan 9 kDa.
- 4) Berdasarkan hasil penelitian ini dapat diketahui bahwa protein *M. expansa* yang tidak terjadi reaksi silang dengan serum anti-*M. benedeni* yaitu pada BM 26 dan 23 kDa, sedangkan protein *M. benedeni* dengan BM 51 kDa merupakan protein yang tidak mengalami reaksi silang dengan serum anti-*M. expansa*.
- 5) Protein dengan BM 244, 119, 82, 74, 61, 44, 36, 31, 15 dan 9 kDa baik dari *M. benedeni* maupun *M. expansa* merupakan protein yang mengalami reaksi silang baik dengan serum anti-*M. benedeni* maupun anti-*M. expansa*.

7.2 Saran

Mengingat masih banyak protein spesifik baik *Moniezia benedeni* maupun *Moniezia expansa*, maka disarankan beberapa hal berikut:

- 1) Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang karakterisasi molekuler *Moniezia* spp. hingga sekuensing DNA agar dapat dikarakterisasi hingga tingkat spesies.

- 2) Protein BM 26 dan 23 kDa dari *M. expansa* dan protein BM 51 kDa dari *M. benedeni* dapat dikembangkan untuk kit diagnosis masing-masing untuk infeksi *M. expansa*, dan untuk *M. benedeni*.
- 3) Protein dengan BM 244, 119, 82, 74, 61, 44, 36, 31, 15 dan 9 kDa baik dari *M. benedeni* maupun *M. expansa* kemungkinan dapat memberikan kekebalan silang, sehingga dapat dikembangkan sebagai kandidat vaksin.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. 2000. Cellular and Molecular Immunology. 4th ed. Philadelphia Saunders Company. pp 41-63, 270-291
- 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
- Andrews RH, Chilton NB. 1999. Multilocus enzymes electrophoresis: a valuable technique for providing answers to problems in parasite systematics. Int J Parasitol 29:213-253
- Bowles J, Blair D, McManus DP. 1995. A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus*. Parasitology 110:317-328
- Chilton NB, Gasser RB, Beveridge I. 1995. Differences in a ribosomal DNA sequences of morphologically indistinguishable species within the *Hypodontus macropi* complex (Nematoda : Strongyloidea). Int J Parasitol 25: 647-651
- de Savigny DH. 1980. The communication of ELISA data from laboratory to clinician. J. of Immunoassay. 1(1): 105-128.
- 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
- Fogt-Wyrwas R, Jarosz W and Mizgajska-Wiktor H. 2007. Utilizing a polymerase chain reaction method for the detection of *Toxocara canis* and *Toxocara cati* eggs in soil. Journal of Helminthology; 81: 75-78
- Go'mez-Puerta LA, Lopez-Urbina MT, Gonza'lez AE. 2008. Occurrence of *Moniezia expansa* (Rud, 1810) Blanchard, 1891 (Cestoda: Anoplocephalidae) in domestic pig (*Sus scrofa domestica* Linnaeus, 1758) in Peru. Vet. Parasitol. 158: 380-381.
- Gasser RB. 1999. PCR-based technology in veterinary parasitology. Vet Parasitol 84: 229-258
- Harlow E and Lane D. 1988. Production of monoklonal antibodies. In: Antibodies. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Lab. New York.
- Hostettmann K, Hostettmann, M and Marston. 1986. Preparative Chromatography Techniques. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Terj. Padmawinata K dan Sutomo (1995). Penerbit ITB, Bandung. hal: 3-6, 27-36
- Ishiwata K, Shinohara A, Yagi K, Horii Y, Tsuchiya K and Nawa Y. 2003. Identification of tissue-embedded ascarid larvae by ribosomal DNA sequencing. Parasitol Res 92: 50-52
- Jacobs DE, Zhu XQ, Gasser RB, Chilton NB. 1997. PCR-based methods for identification of potentially zoonotic ascaridoid parasites of the dog, fox and cat. Acta Trop 68: 191-200
- Khayatnouri, Garedaghi, Arbati, and Khalili. 2011. The Effect of Ivermectin Pour-on Administration Against Natural Heterakis gallinarum Infestation and its Prevalence in Native Poultry. Am J Anim and Vet Sci 6(1): 55-58
- Kuno, G. 1991. A manual of reagents with the emphasis on dengue diagnosis. Center for Disease Control Dengue Branch, San Juan Lab, Puerto Rico.
- 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. hal. 8-19

- Kusnoto. 2008. Antigenesitas, Sensitivitas dan Spesifisitas Protein 27-28 kDa dari Material *Excretory-Secretory* (ES) *Fasciola* spp pada Diagnosis Distomatosis Serum Sapi dengan Teknik *Indirect-ELISA*. *Majalah Kedokteran Hewan*; 24(1): 1-8
- Kusumamihardja S. 1993. Parasit dan Parasitosis Pada Hewan Ternak dan Hewan Piharaan di Indonesia. Pusat Antar Universitas Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor. 320.
- Levine ND. 1990. Parasitology Veteriner (terjemahan). Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 271
- Li MW, Zhu XQ, Gasser RB, Lin RQ, Sani RA, Lun ZR, Jacobs DE. 2006. The occurrence of *Toxocara malaysiensis* in cats in China, confirmed by sequence-based analyses of ribosomal DNA. *Parasitology Research*. ©Springer-Verlag. Accessed 3/9/2007.
- Maizels RM. 2013. *Toxocara canis*: Molecular basis of immune recognition and evasion. *Vet. Parasitol.* 193: 365– 374
- Marr JJ, Nilsen TW, Komuniecki RW. 2003. *Molecular Medical Parasitology*. Academic Press, An imprint of Elsevier Science Ltd., Sydney. Pp. 1-66, 171-224, 297-338. This Book is printed on acid-free paper. Accessed 9,24 2013.
- McDougald LR. 2003. *Internal Parasites*. Iowa State Press. 28: 966-967.
- McManus DP and Bowles J. 1996. Molecular genetic approaches to parasite identification: their value in diagnostic parasitology and systematics. *Int J Parasitol* 26: 687-704
- Monti JR, Chilton NB, Qian B-Z, Gasser RB. 1998. Specific amplification of *Necator americanus* or *Ancylostoma duodenale* DNA by PCR using markers in ITS-1 rDNA, and its implications. *Mol Cell Probes* 12: 71-78
- Nadler SA. 1995. Advantages and disadvantages of molecular phylogenetics: a case study of ascaridoid nematodes. *J Nematol* 27: 423-432
- Nadler SA, Hudspeth DDS. 1998. Ribosomal DNA and phylogeny of Ascaridoidea (Nematoda: Secernentea): implications for morphological evolution and classification. *Mol Phylogenet Evol* 10: 221-236
- Nei M, Kumar S. 2000. *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press, New York, p 333
- Newton LA, Chilton NB, Beveridge I, Gasser RB. 1998. Genetic evidence indicating that *Cooperia surnabada* and *Cooperia oncophora* are one species. *Int J Parasitol* 28: 331-336
- Noordin R, Smith HV, Mohamad S, Maizels RM, Fong MY. 2005. Comparison of IgG-ELISA and IgG4-ELISA for *Toxocara* serodiagnosis. *Acta Tropica*; 93: 57-62
- Ozeretskovskaia NN. 2000. The organ pathology in the acute stage of tissue helminthiases: the role of eosinophilia of the blood and tissues, blood immunoglobulins E and G4 and immune response-inducing factors. *Med. Parazitol. (Mosk)*. 3: 3-8
- Page AP, Richards DT, Lewis JW, Omar HM, Maicel RM. 1991. Comparison of Isolate and Species of *Toxocara* and *Toxocaris* by Biosynthetic Labelling of Somatic and ES Protein from Infektif Larvae. *J. parasitol.* 103: 261-265
- Pearse EJ and Sher A. 1990. Immunity to helminth. In: *Current Opinion Immunology*. USA National Institute for Allergy and Infectious Diseases. 2: 235-379
- Poulsen J, Permin A, Hindsbo O, Yelifari L, Nansen P, Boch P. 2000. Prevalence and distribution of gastro-intestinal heminths and haemoparasites in young scavenging

- chickens in upper eastern region of Ghana, West Africa. *Preventive Vet. Med.* 45(3-4): 237-245.
- Ramnath, Jyrwa DB, Dutta, AK. 2014. Molecular characterization of the Indian poultry nodular tapeworm, *Raillietina echinobothrida* (Cestoda: Cyclophyllidea: Davaineidae) based on rDNA internal transcribed spacer 2 region. *J Parasit Dis* 38(1):22–26
- Rantam FA. 2003. *Metode Imunologi*. Airlangga University Press. Surabaya. Hal.3-9.
- Roitt I, Brostoff J and Male D. 1998. *Immunology*. 4th Ed. Barcelona, Spain: Mosby, Times Mirror International Publishers Limited.
- Santoso, S. 2000. *Mengolah Data Statistik Secara Profesional*. SPSS Versi 10. Penerbit PT. Media Komputindo kelompok Gramedia. Jakarta.
- Salawu OT, Moro DD. 2013. *Helminthology*. School of Science and Technology, National Open University of Nigeria. e-Book, accessed 9, 29, 2013. 1-7, 51-85.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406–425
- Sambrook J, Russel D. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd edn. Cold Springs Harbour Press, New York
- Seddiek SA, Ali MM, Khater HF, and El- Shorbagy. 2011. Anthelmintic Activity of the White Wormwood, *Artemisia Herba-alba* Against *Heterakis gallinarum* Infecting Turkey Poults. *Journal of Medicinal Plants Research* 5(16): 3946-3957S
- Soulsby E.J.L. 1986. *Helminth, Arthropods and Protozoa of Domestic Animals*. London: Bailliere Tindall and Cassell.
- Subekti S, Sosiawati SM, Koesdarto S, Kusnoto. 2013. *Helmintologi Veteriner*. Pusat Penerbitan dan Percetakan, Universitas Airlangga, Surabaya.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony method. *Mol Biol Evol* 28:2731–2739
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTALW: improvin the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weightmatrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673–4680
- Tizard IR. 2009. *Veterinary Immunology. An Introduction*. 7th Ed. Saunders. Pp. 105-117.
- Urquhart GM, Armour J, Duncan JL, Dunn AM, Jennings FW. 1996. *Veterinary parasitology*, 2nd ed. Blackwell, Oxford
- Warren KS. 1993. *Immunology and molecular biology of parasit infections*. Eidinburg, Blackwell Sc. Pp. 55
- Wedrychowicz H. 2000. Usability of PCR-based techniques for diagnosis of parasitic infection in ruminants. *Wiadomości Parazytologiczne*. 46: 295-304
- WHO. 1997. *Basic Laboratory Methods in Medical Parasitology*. World Health Organization, Genewa. Macmillan/Clays-7000 England. e-Book, accessed 9, 29, 2013. 1-36, 65-70.

Wu Z, Nagano I, Xu D and Takahashi Y. 1997. Primers for polymerase chain reaction to detect genomic DNA of *Toxocara canis* and *T. cati*. *J. of Helminthol.* 46: 77-78.

Zhu XQ, Gasser RB, Jacobs DE, Hung GC, Chilton NB. 2000. Relationships among some ascaridoid nematodes based on ribosomal DNA sequence data. *Parasitol Res*; 86: 738-744.

LAMPIRAN

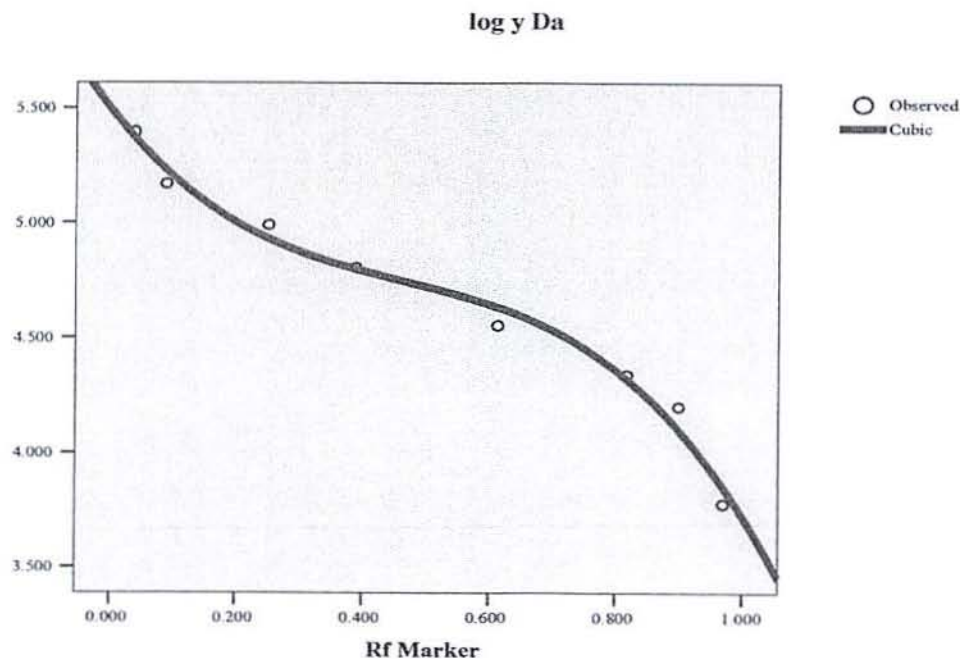
Lampiran 1. Perhitungan Persamaan Regresi pada Marker dan sampel SDS-PAGE

Case Summaries^a

	Jarak Marker	Rf Marker	BM (y kDa)	BM (y Da)	log y Da
1	3.50	.036	250	250000	5.398
2	8.50	.087	148	148000	5.170
3	24.50	.250	98	98000	4.991
4	38.00	.388	64	64000	4.806
5	60.00	.612	36	36000	4.556
6	80.00	.816	22	22000	4.342
7	88.00	.898	16	16000	4.204
8	95.00	.969	6	6000	3.778
Total N	8	8	8	8	8

a. Limited to first 100 cases.

Curve Fit



Lanjutan Lampiran 1

Cubic

Model Summary

R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
.993	.985	.974	.087

The independent variable is Rf Marker.

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Regression	2.003	3	.668	89.208	.000
Residual	.030	4	.007		
Total	2.033	7			

The independent variable is Rf Marker.

Coefficients

	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
Rf Marker	-3.477	.994	-2.378	-3.497	.025
Rf Marker ** 2	6.067	2.441	4.279	2.486	.068
Rf Marker ** 3	-4.360	1.627	-2.955	-2.679	.055
(Constant)	5.489	.096		57.000	.000

Perhitungan Berat Molekul sampel pada SDS-PAGE

No	Jarak	RF	Antilog y Da	Mr kDa
1	3	0.030	244411.7	244.4117
2	5	0.051	212234.5	212.2345
3	8	0.081	175073.7	175.0737
4	14	0.142	126879.4	126.8794
5	17	0.173	111084.6	111.0846
6	23	0.234	89286.13	89.28613
7	28	0.285	77472.22	77.47222
8	31.5	0.321	71354.77	71.35477
9	37.5	0.382	63471.39	63.47139
10	46	0.469	55302.91	55.30291
11	55	0.561	47625.99	47.62599
12	57.5	0.586	45380.26	45.38026
13	64	0.653	39034.89	39.03489
14	68	0.693	34737.62	34.73762
15	75	0.765	26738.01	26.73801
16	83	0.846	176173.6	17.1736
17	93	0.948	8452.535	8.452535

Rf = Reterdation factor, merupakan jarak pergerakan protein dari tempat awal dibanding pergerakan warna dari tempat awal; dihitung berdasarkan persamaan garis regresi $y = 5,849 - 3,477 X + 6,067 X^2 - 4,36 X^3$, Mr= Massa molecular relatif.

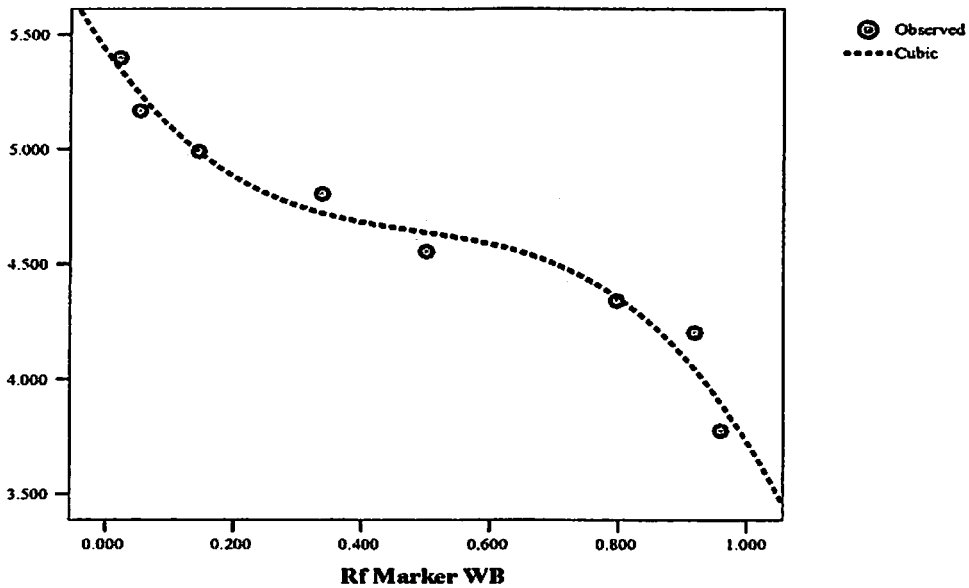
Lampiran 2. Perhitungan Persamaan Regresi pada Marker dan sampel *Western Blot*

Case Summaries ^a

		Jarak Marker WB	Rf Marker WB	BM (y kDa) WB	BM (y Da) WB	log y Da WB
1		2	.020	250	250000	5.398
2		5	.051	148	148000	5.170
3		14	.143	98	98000	4.991
4		33	.337	64	64000	4.806
5		49	.500	36	36000	4.556
6		78	.796	22	22000	4.342
7		90	.918	16	16000	4.204
8		94	.959	6	6000	3.778
Total	N	8	8	8	8	8
	Sum	365	3.724	640	640000	37.245
	Mean	45.63	.46550	80.00	80000.00	4.65563
	Std. Deviation	37.951	.387209	83.646	83645.511	.538950

a. Limited to first 100 cases.

log y Da WB



Model Summary

R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
.985	.970	.948	.123

The independent variable is Rf Marker WB.

Lanjutan Lampiran 2

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Regression	1.972	3	.657	43.114	.002
Residual	.061	4	.015		
Total	2.033	7			

The independent variable is Rf Marker WB.

Coefficients

	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
Rf Marker WB	-4.001	1.386	-2.875	-2.887	.045
Rf Marker WB *	7.399	3.679	5.355	2.011	.115
Rf Marker WB *	-5.096	2.539	-3.522	-2.007	.115
(Constant)	5.426	.113		47.864	.000

No	Jarak	RF	Antilog y Da	Mr kDa
1	3	0.030	240815	240.815
2	5	0.051	206815	206.815
3	22	0.224	69183	69.183
4	25	0.255	63416	63.416
5	42	0.428	46676	46.676
6	44	0.448	45698	45.698
7	46	0.469	44781	44.781
8	51	0.520	42599	42.599
9	59	0.602	38636	38.636
10	65	0.663	34697	34.697
11	68	0.693	32329	32.329
12	90	0.918	11066	11.066
13	92	0.938	9418	9.418

Rf = Reterdation factor, merupakan jarak pergerakan protein dari tempat awal dibanding pergerakan warna dari tempat awal; dihitung berdasarkan persamaan garis regresi $y = 5,849 - 3,477 X + 6,067 X^2 - 4,36 X^3$, Mr = Massa molecular relatif.

Lampiran 3. Luaran Penelitian berupa publikasi (submit) dan acceptance di Jurnal bereputasi Internasional yaitu Veterinary World



VETERINARY WORLD

Open access and peer reviewed journal

Star, Gulshan Park, NH-8A, Chandrapur Road, Wankaner - 363621, Dist. Morbi (Gujarat) India,

Website: www.veterinaryworld.org, Email: editorveterinaryworld@gmail.com

Editor-in-Chief: Anjum V. Sherasiya, Publisher: Veterinary World, EISSN: 2231-0916

NAAS (National Academy of Agricultural Sciences -INDIA) - 5.71

SCOPUS: Citescore - 0.57, SJR - 0.284, SNIP - 0.570

By E-mail

Ref No. VW/Accept/193/2017

23-10-2017

To,
R. Heru Prasetyo
Departement of Parasitology,
Faculty of Medicine,
Universitas Airlangga,
Surabaya, East Java,
Indonesia.
E-mail: rheru_prasetyo@yahoo.co.id

Acceptance of article for publication in Veterinary World

Dear Dr.

I am pleased to inform you that your manuscript titled as -

Immunoglobulin subclass in experimental murine *Toxocara cati* infection - Kusnoto, Setiawan Koesdarto, Sri Mumpuni and R. Heru Prasetyo

is accepted for publication in *Veterinary World*.

We have received the payment for publication (bill no. 138 dated 23-10-2017). So, you will receive the galley proof within 4-5 weeks. You must have to solve the query, if we point out any in galley proof.

After correction of galley proof, your article will be published online at www.veterinaryworld.org in chronological order.

Thanking You.

Yours Sincerely,

Dr. Anjum V. Sherasiya
Editor-in-Chief
Veterinary World



Indexed and Abstracted in Academic Journals Database, AGORA, AGRICOLA, AGRIS, CABI, CAS, DOAJ, EBSCO, ESCI- Thomson Reuters, Gale, Google Scholar, HINARI, Index Scholar, Indian Animal Science Abstracts, Indian Science Abstracts, JournalSeek, Open J-gate, ProQuest, PubMed, PubMed Central, SCOPUS, TEEAL

Veterinary World

Open access and peer reviewed journal

NAAS Rating : 5.71
 Indexed in ESCI-Thomson Reuters, PubMed,
 PubMed Central, DOAJ, Scopus, CABI, CAS etc.



Editorial office
 Veterinary World,
 Star, Guishan Park,
 NH-8A, Chandrapur Road,
 Wankaner - 363621,
 Dist. Morbi, Gujarat, India
 Website: www.veterinaryworld.org
 E-mail: editorveterinaryworld@gmail.com

Veterinary world

Editorial Office: Veterinary World, Star, Guishan Park, NH-8A, Chandrapur Road,
 Wankaner - 363621, Dist. Morbi, Gujarat, India
 ISSN: 0972-8988, EISSN: 2231-0916, www.veterinaryworld.org

Editor-in-Chief
 Anjum V. Shershiya - Ex-Veterinary Officer, Department of Animal Husbandry, Gujarat State, India

Associate Editors
 Shambhupathi Choudhary - Department of Biomedical & Diagnostic Sciences, College of Veterinary Medicine, The University of Tennessee, 2407 River Drive, Room A 201, Knoxville, TN 37996, U.S.A.
 Suresh H. Basagoudanavar - FMD Vaccine Research Laboratory, IVRI, Bangalore, Bangalore - 560024, Karnataka, India

Editorial board
 R. G. Janti - Ex-Coordinator Wildlife Health, Western Region Centre, Indo-US Project, Department of Veterinary Medicine, Veterinary College, Anand - 388001, Gujarat, India
 G. N. Gongal - Technical Officer, WHO South - East Asia Regional Office, New Delhi - 110002, India
 Rangarath Marud - Dr. Julian E Scetizer's Lab, Department of Physiology & Biophysics, Medical School, Case Western Reserve University, Cleveland, OH - 44106, U.S.A.
 Md. Tawfir Rahman - Department of Microbiology and Hygiene, Faculty of Veterinary Science, Bangladesh Agricultural University, Mymensingh-2202, Bangladesh
 Depamla Agrawal - Cancer Prevention Laboratory, Pennington Biomedical Research Center, Baton Rouge, LA, U.S.A.
 Fouad Kasim Mohammed - Professor, Department of Pharmacology & Toxicology, Vice President for Administrative & Financial Affairs, University of Mosul, P.O. Box 11136, Mosul, Iraq
 Abdel-Bazeer Nasir Sayed Ahmed - Professor and Head, Department of Animal Nutrition and Clinical Nutrition, Faculty of Veterinary Medicine, Assiut University, Assiut, Egypt
 Nicole Borel - Department of Pathology, Vetsuisse Faculty, University of Zurich, CH-8057 Zurich, Switzerland
 B. A. Lubidi - Virology, MEd Programme, ARC - Onderstepoort Veterinary Institute, No. 100 Old Soutpan Road, Onderstepoort, Tshwane, 0110, South Africa
 Kumar Venkateshwaran - Associate Professor, Graduate Programs Chair, Honors and Pre-Vet Programs Advisor, Department of Animal Science, University of Connecticut, Storrs, CT 06269, U.S.A.
 Kermi Xu - Department of Veterinary Medicine, University of Maryland, College Park College Park, MD, 20742, U.S.A.
 Vesselin Papadimitrov - Faculty of Veterinary Medicine, Department of Medicine (Porcine Medicine), University of Thessaly, Thessaly, Greece

Matthias Devereese - Laboratory of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Belgium
 Sumet Sharma - Edmonton North Animal Hospital, Edmonton, Alberta, T5X 3Y7, Canada
 K. P. Singh - School of Medicine and Dentistry, University of Rochester, Department of Environmental Medicine, Room: 4-6820, 601 Elmwood Avenue, Box-ESHSC, Rochester, New York-14620, U.S.A.
 Raj Johanan Raja Muthiah - Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, U.S.A.
 K. Chockalingam - Division of Applied Regulatory Science, U.S. Food and Drug Administration, 10903, New Hampshire Avenue, Silver Spring, Maryland 20993, U.S.A.
 Ashraf Wadhwa - Division of High-Consequence Pathogens and Pathology, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, 1600 Clifton Road, NE, Mail Stop C33, Atlanta, GA 30333, U.S.A.

Lutz Cavalio Pereira - Laboratório de Imunomodulação e Proteômica, Oswaldo Cruz Institute, Ministry of Health (Brazil), Pavilhão 108 - Sala: 09, Av. Brasil, 4365 - Mangueiras, Rio de Janeiro - RJ, CEP: 21040-360, Brazil.
Editorial office contact person: Anjum V. Shershiya, email: editorveterinaryworld@gmail.com

Ratings of Veterinary World: NAAS - National Academy of Agricultural Sciences - 5.71, Scimago Journal Rank - 0.284, CiteScore - 0.57, SNIP - Source Normalized Impact per Paper - 0.570
Indexing and abstracting
 Academic Journals Database, AGORA, AGRICOLA, AGRIS, CABI, CAS, DOAJ, EBSCO, ESCI - Thomson Reuters, Gale, Google Scholar, HINARI, Index Scholar, Indian Animal Science Abstracts, Indian Science Abstracts, JournalSeek, Open J-gate, Proquest, PubMed, PubMed Central, SCOPUS, TEAL

Rs.7000 for Indian/USD 175 for Abroad per copy
 Printed and Published by Dr. Anjum V. Shershiya on behalf of Veterinary World, Printed and Published at Star, Guishan Park, N. H. 8A, Chandrapur Road, Wankaner-363621, Dist. Morbi, Gujarat, India.
Editor-in-Chief: Dr. Anjum V. Shershiya

Published, PubMed Central, SCOPUS, TEAL
 We accepts online submission and publication charges, please regarding submission and publication charges, please visit www.veterinaryworld.org
 Veterinary World is an open access journal, each issue available free of cost at www.veterinaryworld.org.
 Publisher: Veterinary World

Immunoglobulin subclass in experimental murine *Toxocara cati* infection

Kusnoto¹, Setiawan Koesdarto¹, Sri Mumpuni¹ and R. Heru Prasetyo²

1. Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, East Java, Indonesia;

2. Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, East Java, Indonesia.

Corresponding author: R. Heru Prasetyo, e-mail: rheru_prasetyo@yahoo.co.idCo-authors: Kusnoto: kk.kusnoto@yahoo.com, SK: skoedarto@yahoo.com, SM: mumpuni-s@yahoo.com

Received: 20-06-2017, Accepted: 23-10-2017, Published online: 13-11-2017

doi: 10.14202/vetworld.2017.1333-1336 How to cite this article: Kusnoto, Koesdarto S, Mumpuni S, Prasetyo RH (2017) Immunoglobulin subclass in experimental murine *Toxocara cati* infection, *Veterinary World*, 10(11): 1333-1336.

Abstract

Aim: The aim of this study was to detect specific immunoglobulin (Ig) that could be used to determine monoclonal antibody in conjugate-making an effort for the indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) diagnostic kit of toxocariasis in human.

Materials and Methods: The study was conducted to assess the Ig profile, based on ELISA-isotyping, in mice infected with second stage larvae eggs of *Toxocara cati*. The optical density values of anti-*T. cati* mice serum IgG subclasses were analyzed by applying ANOVA factorial.

Results: The specific IgG subclass in mice infected with *T. cati* mice was found to be IgG2 β .

Conclusion: Subclass of IgG, especially IgG2 β , can provide leads about the use of the monoclonal antibody in conjugate making an effort for the indirect ELISA diagnostic kit.

Keywords: diagnostic kit, enzyme-linked immunosorbent assay, human, immunoglobulin G subclass, monoclonal antibody, toxocariasis, *Toxocara cati*.

Introduction

The disease caused by *Toxocara cati* infection in humans is a helminth zoonosis, which is mostly found in children [1,2]. However, there were some cases recorded in adults also [3]. Toxocariasis, caused by *T. cati* needs more attention due to the high population of cats in Indonesia and the close association of these pets to humans. The habit of a cat to hide its feces after defecation may prolong the survivability of worm eggs in the soil [4]. Furthermore, we should also be aware of a high prevalence of toxocariasis in Surabaya. It was reported that the prevalence of toxocariasis in stray cats was about 60.9% of 69 samples [5]. About 31.9% of soil around slaughterhouses and about 20.6% of the soil around dairy farms were reported to contain eggs of *Toxocara* spp. included *T. cati* [6]. This situation could increase the risk of toxocariasis [7]. This finding supports the fact that human toxocariasis from infective eggs, containing second-stage (L2) larvae [8]. These infections were called human toxocariasis, referring to one of most common helminth zoonosis [9]. Human toxocariasis was the most prominent of all nematode diseases because it caused major health problems in children

and ocular destruction on adults. Human toxocariasis has been classified into two categories, visceral toxocariasis and ocular toxocariasis due to visceral larvae migrans and ocular larvae migrans [10]. These had been global concern that *T. cati*, including visceral and ocular larvae migrans as their clinical manifestations were the main source of infections in human [11]. Considering the fatality due to ocular or cerebral larvae migrans, immunodiagnosis in human should be conducted. The presence of larvae in body tissues would trigger immune responses marked by IgE and an increase in the count of eosinophils leading to a specific type of antibody-dependent cell mediated cytotoxicity [12].

Immunological diagnosis of human toxocariasis conducted through suspected blood serum examination required high sensitivity and specificity. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) technique is reliable for its high sensitivity. In indirect ELISA technique, in addition to needing *T. cati* antigens and suspect animal serum containing polyclonal antibody, it also requires enzyme-labeled monoclonal antibodies (conjugate) as biomarkers [13].

The aim of this study was to detect specific immunoglobulin (Ig) that could be used to determine monoclonal antibody in conjugate-making effort for the indirect ELISA diagnostic kit of human toxocariasis.

Materials and Methods

Ethical approval

The present study was approved by Ethical Committee vide Ethical Clearance No. 285-KE Animal

Copyright: Kusnoto, et al. Open Access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Lampiran 3. Data Lengkap dan Analisis Statistik Nilai Optical Density Serum Mencit yang Diimunisasi dengan Imunogen dan Antigen *Moniezia* spp. yang Berbeda

Case Summaries^a

		Optical Density
	1	.38
	2	.72
	3	.46
Me~Mb	4	1.00
	Sum	2.55
Total	Mean	.6385
	Std. Deviation	.28244
	1	.50
	2	.87
	3	.54
Mb~Mb	4	1.06
	Sum	2.97
Total	Mean	.7423
	Std. Deviation	.26581
Ag_Ab	1	.88
	2	1.57
	3	.82
Me~Me	4	1.79
	Sum	5.05
Total	Mean	1.2623
	Std. Deviation	.48863
	1	.93
	2	1.22
	3	.85
Mb~Me	4	1.42
	Sum	4.42
Total	Mean	1.1050
	Std. Deviation	.26188
	Sum	14.99
Total	Mean	.9370
	Std. Deviation	.40145

a. Limited to first 100 cases.

Lanjutan Lampiran 3

Oneway

Descriptives

Optical Density

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					Me~Mb	4		
Mb~Mb	4	.7423	.26581	.13291	.3193	1.1652	.50	1.06
Me~Me	4	1.2623	.48863	.24431	.4847	2.0398	.82	1.79
Mb~Me	4	1.1050	.26188	.13094	.6883	1.5217	.85	1.42
Total	16	.9370	.40145	.10036	.7231	1.1509	.38	1.79

ANOVA

Optical Density

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.044	3	.348	3.041	.070
Within Groups	1.373	12	.114		
Total	2.417	15			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

Optical Density

Duncan^a

Ag_Ab	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Me~Mb	4	.6385	
Mb~Mb	4	.7423	.7423
Mb~Me	4	1.1050	1.1050
Me~Me	4		1.2623
Sig.		.087	.060

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.