

1 JUL 2003



LAPORAN PENELITIAN DOSEN MUDA
TAHUN ANGGARAN 2001

PAMERAN

SELESAI

**IMUNOGENITAS SUSPENSI HOMOGENAT BERBAGAI
STADIUM *Toxocara vitulorum* SEBAGAI PEMICU
PEMBENTUKAN ANTIBODI PADA MENCIT**

Peneliti:

Drh. KUSNOTO
Drh. SUWARNO, M.S.
Drh. TUTIK JUNIASTUTI, M.Kes.

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai Oleh Bagian Proyek Peningkatan Kualitas Sumber Daya Manusia
DIP Nomor : 059/XXIII/--/2001 Tanggal 1 Januari 2001
Kontrak Nomor : 021/LIT/BPPK-SDM/III/2001
Ditbinlitabmas, Ditjen, Dikti, Depdiknas
Nomor Urut: 25

**TROPICAL DISEASE CENTER
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Nopember, 2001

1. WORMS AS CARRIERS OF DISEASES.

IR - Perpustakaan Universitas Airlangga

2. IMMUNOGENITAS BERBAGAI



LAPORAN PENELITIAN DOSEN MUDA
TAHUN ANGGARAN 2001

KKC

KK

636.089 696 2.

Kus

i

**IMUNOGENITAS SUSPENSI HOMOGENAT BERBAGAI
STADIUM *Toxocara vitulorum* SEBAGAI PEMICU
PEMBENTUKAN ANTIBODI PADA MENCIT**

Peneliti:

Drh. KUSNOTO

Drh. SUWARNO, M.S.

Drh. TUTIK JUNIASTUTI, M.Kes.

3000321023141



LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai Oleh Bagian Proyek Peningkatan Kualitas Sumber Daya Manusia

DIP Nomor : 059/XXIII/--/2001 Tanggal 1 Januari 2001

Kontrak Nomor : 021/LIT/BPPK-SDM/III/2001

Ditbinlitabmas, Ditjen, Dikti, Depdiknas

Nomor Urut: 25

**TROPICAL DISEASE CENTER
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Nopember, 2001



IMUNOGENITAS SUSPENSI HOMOGENAT BERBAGAI STADIUM TOXOCARA VITULORUM SEBAGAI PEMICU PEMBENTUKAN ANTIBODI PADA MENCIT

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

TROPICAL DISEASE CENTER
UNIVERSITAS AIRLANGGA

DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL
UNIVERSITAS AIRLANGGA
LEMBAGA PENELITIAN

Jl. Mulyorejo Telp. (031) 5995246, 5995248, 5995247 Faks. (031) 5995246, Surabaya 60115

IDENTITAS DAN PENGESAHAN
LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN DOSEN MUDA

1.	a. Judul Penelitian: IMUNOGENITAS SUSPENSI HOMOGENAT BERBAGAI STADIUM <i>Toxocara vitulorum</i> SEBAGAI PEMICU PEMBENTUKAN ANTIBODI PADA MENCIT
	b. Macam Penelitian: I / II / III
2.	<u>Kepala Proyek Penelitian:</u>
	a. Nama lengkap dengan gelar: Drh. Kusnoto
	b. Jenis Kelamin: Laki-laki
	c. Pangkat/Golongan dan NIP: Penata Muda/III-a/132161171
	d. Jabatan fungsional: Asisten Ahli
	e. Fakultas/Puslit/Jurusan: Tropical Disease Center (TDC)
	f. Universitas: Universitas Airlangga
	g. Bidang Ilmu Yang Diteliti: Immunologi – Parasitologi
3.	Jumlah Tim Peneliti: 3 orang
4.	Lokasi Penelitian: Tropical Disease Center (TDC) Unair
5.	Bila penelitian ini merupakan peningkatan kerjasama kelembagaan sebutkan:
	a. Nama Instansi (kalau ada): -
	b. Alamat: -
6.	Jangka Waktu Penelitian: 6 bulan
7.	Biaya Yang Diperlukan: Rp5.000.000,- (Lima juta rupiah)

Mengetahui
Ketua Tropical Disease Center,

Prof. Dr. Yoes Prijatna D., MSc., dr.
NIP. 130 359 278



Mengetahui
Ketua Lembaga Penelitian
Universitas Airlangga,

Prof. Dr. H. Sarmanu, MS., drh.
NIP. 130 701 125

Surabaya, 10 Desember 2001
Peneliti Utama,

Drh. Kusnoto
NIP. 132 161 171

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

RINGKASAN

IMUNOGENITAS SUSPENSI HOMOGENAT BERBAGAI STADIUM *Toxocara vitulorum* SEBAGAI PEMICU PEMBENTUKAN ANTIBODI PADA MENCIT (Kusnoto, Suwarno, dan Tutik Juniastuti. 2001: 30 halaman)

Problem diagnosis terhadap penyakit *toxocariasis* yang saat ini muncul adalah diagnosis berdasarkan pemeriksaan telur, larva atau dengan menemukan cacing dewasa tidak mutlak dapat dilakukan, mengingat parasit ini memiliki hospes pada tingkatan umur yang berbeda. Telur cacing dan cacing dewasa hanya mungkin dapat ditemukan pada anak sapi umur kurang dari 6 bulan. Larva stadium 1 (L1) yang merupakan perkembangan dari telur infeksi amat sulit ditemukan karena siklusnya amat pendek. Sementara itu L2 dapat ditemukan pada organ dalam (hati, ginjal, dan paru) sapi dewasa terinfeksi dan L3 dalam air susu dari sapi terinfeksi yang baru melahirkan (kolostrum).

Penelitian ini mencoba untuk mengetahui imunogenesitas dari masing-masing stadium parasit (L1, L2 dan cacing dewasa) sebagai pemicu pembentukan antibodi pada mencit. Dengan melakukan uji ELISA-*indirect* dapat diketahui daya antigenesitas dan imunogenesitas suspensi homogenat masing-masing stadium parasit terhadap antibodi yang dihasilkan. Uji antigenesitas dan imunogenesitas ditentukan berdasarkan nilai *optical density* (OD) yang terdeteksi dengan Teknik ELISA-*indirect*.

Penelitian ini dibagi menjadi 4 tahap sebagai berikut. 1) Tahap pertama, isolasi *T. vitulorum* dari berbagai stadium dari sapi dengan umur yang berbeda. Telur berembrio (L1) dan cacing dewasa diisolasi dari feses anak sapi yang menderita *Toxocariasis*. Larva stadium 2 diperoleh dengan mengisolasi jaringan hati, ginjal dan paru mencit Balb/c, yang telah diinfeksi dengan telur *T. vitulorum* infeksi, sebagai stok Larva 2. 2) Tahap kedua, pembuatan imunogen dari suspensi homogenat, masing-masing isolat kemudian dimurnikan dengan jalan dipisahkan dari feses, jaringan hati, ginjal dan paru untuk selanjutnya dibuat suspensi homogenat 1:10. Suspensi homogenat selanjutnya dicampur dengan adjuvan dalam volume sama banyak (*Complete Freund Adjuvant* atau *Incomplete Freund Adjuvant*). 3) Tahap ketiga, uji imunogenesitas, untuk mengetahui imunogenitas dari masing-masing stadium parasit dilakukan penyuntikan suspensi homogenat pada mencit Balb/c betina

umur 8 minggu. Sebanyak 24 ekor mencit dibagi menjadi empat kelompok. Kelompok I diinjeksi dengan suspensi homogenat L1. Kelompok II dengan L2, Kelompok III dengan cacing dewasa, dan Kelompok IV diinjeksi dengan PBS sebagai kontrol negatif. Injeksi dilakukan sebanyak dua kali (injeksi pertama dengan *Complete Freund Adjuvant* dan injeksi kedua dengan *Incomplete Freund Adjuvant*) secara subkutan dengan dosis 0,5 ml per ekor dan interval waktu 2 minggu. 4) Tahap keempat, uji ELISA *indirect* menggunakan konjugat *goat antimouse* yang dilabel dengan enzim alkalin fosfatase dan pembacaan dilakukan dengan ELISA *reader* dengan panjang gelombang 405 nm. Pengamatan dilakukan pada minggu ke-1, 2 dan 3 pasca injeksi yang pertama.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa, daya imunogenisitas pada waktu pengamatan (minggu) berbeda dari cacing *Toxocara vitulorum* menunjukkan perbedaan sangat nyata ($p < 0,01$). Daya antigenesitas masing-masing stadium *T. vitulorum*, dalam mengenali antibodi, menunjukkan perbedaan sangat nyata ($p < 0,01$). Pada penelitian ini terdapat interaksi ($p < 0,01$) antara waktu pengamatan antibodi dengan stadium *T. vitulorum* yang digunakan sebagai sumber antigen.

(Lembaga Penelitian, Tropical Disease Center Universitas Airlangga, Kontrak Nomor: 021/LIT/BPPK-SDM/III/2001, 15 Maret 2001).

SUMMARY

IMMUNOGENECITY OF HOMOGENATE SUSPENSION FROM MANY STAGE OF *Toxocara vitulorum* AS INDUCER ANTIBODY FORMING IN MICE (Kusnoto, Suwarno, dan Tutik Juniastuti. 2001: 30 pages)

Diagnostic problem of *toxocariasis* disease it was found nowadays diagnostic by egg examination, larva and to get adult worm not always have doing, because this parasite have many host in the different age levels. The egg of worm and adult worm were founded only in the young cattle that ages less than sixth mounts. Larvae-1, that developing from infective egg difficult to found because the cycle very short. Larvae-2, could be founded in the inner organ (heart, kidney, and lung) from adult cattle that infected by *T. vitulorum*, and Larvae-3 in the cattle milk after birth average less than 7 days (called colostrums).

This experiment will be trying to know immunogenicity from each stage of parasite (L1, L2 and adult worm) as inducing antibody forming in the mice. By doing indirect ELISA test can be know antigenicity and immunogenicity of homogenate suspension from each stage of parasite for producing antibody. Antigenicity and immunogenicity test were determine according to optical density (OD) value than can be detected by indirect ELISA technique.

This experiment consist 4 step i.e. 1) First step, isolation of many stage of *T. vitulorum* from many cattle with different age. Infective egg (L1) and adult worm were isolated from fecal of young cattle that natural infected with *T. vitulorum* called toxocariasis. Stage 2 of larvae founded in heart, kidney and lung tissue of Balb/c mice that were infected with infective eggs of *T. vitulorum* as stock of second larvae. 2) Second Step, immunogen making from homogenate suspension, after each of isolate were separate from fecal, heart tissue, kidney and lung, than to continue were made homogenate suspension with 1:10, and than homogenate suspension were mixed with adjuvant in same volume. 3) Third step, immunogenicity test, to knowing immunogenicity of each stage of parasite by doing injection female Balb/c mice with homogenate suspension. A number of 24 mice divided by four groups, group-1 were injected with L1 homogenate suspension; group-2 were injected with L2 homogenate suspension; group-3 were injected with adult worm homogenate

suspension; and group-4 were injected with PBS as negative control (first injection with *complete Freund adjuvant* and the second with *incomplete Freund adjuvant*) by subcutaneous with dose 0.5 ml per mice and the interval time by two weeks. 4) Fourth step, *indirect ELISA* with goat anti mouse conjugate that labeled by alkaline phosphatase enzyme and reading by *ELISA reader* with $\lambda=405$ nm. Antibody of mice serum examined for the first, second, and third week after the first injection.

The result of the experiment showed, that immunogenisitas with different time of *T. vitulorum* there were high significantly different ($p<0,01$). Antigenecity of each stage of *T. vitulorum*, there were high significantly different ($p<0,01$) to recognize antibody. There were interaction ($p<0,01$) between time of examination and the stage of *T. vitulorum* used as antigen.

(Research Institution, Tropical Disease Center Airlangga University, Number of Contract: 021/LIT/BPPK-SDM/III/2001, 15 Maret 2001).

KATA PENGANTAR

Diagnosis secara serologis atau imunologis pada toxocariasis diperlukan karena gejala klinisnya bervariasi sehingga diagnosis berdasarkan gejala klinis sulit dilakukan. Sedangkan diagnosis berdasarkan pemeriksaan telur, larva atau dengan menemukan cacing dewasa tidak mutlak dapat dilakukan, mengingat parasit ini memiliki hospes pada tingkatan umur yang berbeda dengan manifestasi klinis yang berbeda pula. Telur cacing dan *T. vitulorum* dewasa hanya mungkin dapat ditemukan pada anak sapi umur kurang dari 6 bulan. Larva stadium 1 (L1) yang merupakan perkembangan dari telur infeksiif amat sulit ditemukan karena siklusnya amat pendek. Sementara itu L2 dapat ditemukan pada organ dalam (hati, ginjal, dan paru) sapi dewasa terinfeksi dan L3 dalam air susu (kolostrum) dari sapi terinfeksi yang baru melahirkan.

Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada Prof. Dr. Ir. Hj. Jajah Koeswara, selaku Pimpinan Proyek Pengkajian dan Penelitian Ilmu Pengetahuan Terapan/DP3M Ditjen Dikti Depdiknas; Prof. Dr. H. Soedarto, dr., DTM&H., selaku Rektor Universitas Airlangga; Prof. Dr. H. Sarmanu, drh. MS., selaku Ketua Lembaga Penelitian Unair; Prof. Dr. H. Yoes Prijatna Dachlan, dr., MSc., selaku Ketua Tropical Disease Center Unair dan semua pihak yang secara langsung ataupun tidak langsung turut membantu dalam kegiatan penelitian ini dari awal hingga terselesainya laporan ini.

Semoga penelitian ini dapat bermanfaat khususnya bagi yang membutuhkan informasi tentang penggunaan diagnosis toxocariasis secara serologis dan secara umum dapat meningkatkan kinerja sumberdaya manusia dalam bidang penelitian di laboratorium maupun penerapannya di lapangan. Tentu penelitian ini masih banyak kekurangannya, untuk itu penulis mengharapkan kritik dan saran demi kesempurnaannya.

Surabaya, Desember 2001
Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
RINGKASAN	ii
SUMMARY	iv
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Penelitian	1
1.2 Rumusan Masalah	3
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Transmisi dan Siklus Hidup <i>Toxocara vitulorum</i>	4
2.2 Aspek Zoonosis <i>Toxocariasis</i>	5
2.3 Immunopatobiogenesis <i>Toxocariasis</i>	6
BAB 3 TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	10
3.1 Tujuan Penelitian	10
3.2 Manfaat Penelitian	10
BAB 4 METODE PENELITIAN	11
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian	11
4.2 Jenis Penelitian	11
4.3 Sampel	11
4.4 Peralatan Penelitian	11
4.5 Unit Analisis	11
4.6 Variabel Penelitian	12

4.7 Tahap Penelitian	12
4.7.1 Isolasi <i>Toxocara vitulorum</i>	12
4.7.2 Pembuatan imunogen dari suspensi homogenat...	12
4.7.3 Uji imunogenesitas	13
4.7.4 Uji ELISA <i>indirect</i>	13
4.8 Rancangan Penelitian dan Analisis Data	14
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN	15
5.1 Hasil Penelitian	15
5.2 Pembahasan	18
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN	21
6.1 Kesimpulan	21
6.2 Saran	21
DAFTAR PUSTAKA	23
LAMPIRAN	26

DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
5.1	Nilai OD pada Pemeriksaan Antibodi Mencit yang Diimunisasi Berbagai Antigen <i>T. vitulorum</i> dengan Uji ELISA Tak Langsung	15
5.2	Nilai T/N pada Pemeriksaan Antibodi Mencit yang Diimunisasi Berbagai Antigen <i>T. vitulorum</i> dengan Uji ELISA Tak Langsung	15
5.3	Rata-rata dan Simpangan Baku (SD) Nilai OD Berdasarkan Waktu Pengamatan pada Berbagai Stadium <i>T. vitulorum</i>	16
5.4	Rata-rata dan Simpangan Baku (SD) Nilai OD Berdasarkan Stadium <i>T. vitulorum</i> pada Berbagai Waktu Pengamatan.....	16
5.5	Rata-rata dan Simpangan Baku (SD) Nilai OD Berdasarkan Waktu Pengamatan dan Stadium <i>T. vitulorum</i> yang Berbeda	17

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran		Halaman
1	Analisis Statistik Nilai <i>Optical Density</i> (OD⁴⁰⁵) Antibodi Mencit Akibat Perlakuan Waktu Pengamatan, Pemberian Antigen <i>T. vitulorum</i> pada Berbagai Stadium dan Interkasinya	26

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Toxocariasis pada sapi dan kerbau disebabkan oleh cacing *Toxocara vitulorum*, kejadian penyakit ini dilaporkan dapat mencapai 76% (Trisunuwati dkk., 1992). Penyakit ini bersifat zoonosis, karena manusia dapat tertular apabila minum susu atau makan daging yang terkontaminasi (mengandung larva) dengan pemasakan kurang sempurna (Ito *et al.*, 1986). Uga *et al.* (1990) melaporkan kasus *Toxocariasis* pada manusia dapat mencapai 29,3%.

Problem yang saat ini muncul adalah bahwa diagnosis penyakit berdasarkan pemeriksaan telur, larva atau dengan menemukan cacing dewasa tidak mutlak dapat dilakukan, mengingat parasit ini memiliki hospes pada tingkatan umur yang berbeda. Telur cacing dan cacing dewasa hanya mungkin dapat ditemukan pada anak sapi umur kurang dari 6 bulan. Larva stadium 1 (L1) yang merupakan perkembangan dari telur infeksi amat sulit ditemukan karena siklusnya amat pendek. Sementara itu L2 dapat ditemukan pada organ dalam (hati, ginjal, dan paru) sapi dewasa terinfeksi dan L3 dalam air susu dari sapi terinfeksi yang baru melahirkan (kolostrum) (Robert, 1993).

Suatu hal yang menarik pada kasus *toxocariasis* adalah L2 tidak pernah berkembang menjadi L3 apabila menyerang sapi jantan dewasa atau sapi betina dewasa yang tidak bunting dan melahirkan. Pada pengamatan dengan sincilasi dapat ditemukan L3 pada air susu sapi dari hari 1-5 pasca melahirkan yang prevalensinya mencapai 75% (Robert, 1990).

Toxocariasis adalah infeksi paling penting di antara infeksi oleh nematoda, karena menyebabkan penyakit yang luas pada anak-anak, dan kerusakan mata pada orang dewasa (Playfair, 1992). Di Indonesia belum pernah dilakukan survey seroepidemiologi *toxocariasis* pada manusia sehingga

angka kejadiannya belum banyak diketahui. Hal ini sangat berbeda dengan beberapa negara lain misalnya Korea, Jepang, Argentina, Amerika Serikat dan lain-lain sudah banyak dilakukan survey tersebut sehingga angka kejadiannya sudah diketahui. Mengingat dampak yang ditimbulkan sangat berat terutama bila terjadi ocular larva migrans maupun bila larva sampai ke otak, maka perlu dikaji lebih lanjut tentang penyakit tersebut dengan mempersiapkan perangkat diagnostik yang mempunyai nilai sensitivitas dan spesifisitas tinggi, sehingga penyakit tersebut dapat didiagnosis lebih dini, cepat tepat dan akurat. Radman *et al.* (2000) menyetujui bahwa diagnosis dini dan treatment dapat menyelamatkan hidup penderita toxocariasis.

Protein imunogenik L1 pada pemeriksaan menggunakan *immunoblotting* ialah pada berat molekul (BM) 66 kDa, 56 kDa, 42 kDa, 40 kDa, dan 31 kDa. Protein imunogen L2 pada BM 56 kDa, 42 kDa, 34 kDa dan 31 kDa, sedangkan L3 mempunyai protein imunogenik pada BM 97 kDa, 42 kDa, 40 kDa, 34 kDa dan 32 kDa (Trisunuwati, 1997). Menurut Abdel-Rahman (2000), karakterisasi struktural dari fraksi isolat protein *T. vitulorum* dewasa terdiri dari dua polipeptida yaitu pada BM 92 kDa dan 87 kDa.

Bertitik tolak dari latar belakang masalah tersebut maka penelitian ini mencoba untuk mengetahui imunogenesitas dari masing-masing stadium parasit (L1, L2 dan cacing dewasa) sebagai pemicu pembentukan antibodi pada mencit. Dengan melakukan uji ELISA *indirect* dapat diketahui antigenesitas dan imunogenesitas suspensi homogenat masing-masing stadium parasit terhadap antibodi yang dihasilkan. Uji antigenesitas dan imunogenesitas ditentukan berdasarkan nilai *optical density* (OD) yang terdeteksi dengan teknik ELISA-*indirect*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang permasalahan di atas dapat dirumuskan beberapa masalah sebagai berikut.

- 1) Apakah waktu pengamatan (minggu) berpengaruh terhadap pembentukan antibodi pada mencit?
- 2) Apakah suspensi homogenat dari masing-masing stadium (L1, L2 dan cacing dewasa) *Toxocara vitulorum* dapat memicu pembentukan antibodi pada mencit?
- 3) Apakah terdapat interaksi antara waktu pengamatan antibodi dengan stadium *T. vitulorum* yang digunakan sebagai antigen?

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Transmisi dan Siklus Hidup *Toxocara vitulorum*

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

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

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

Apabila hal ini terjadi pada sapi/kerbau jantan dewasa, maka L2 tidak mengalami perkembangan lebih lanjut, larva tersebut menjadi penghuni jaringan somatik. Akan tetapi bila sapi/kerbau betina dewasa yang tertular maka akan terjadi migrasi L2 menuju kelenjar susu menjadi L3 pada saat hospes tersebut bunting pada bulan ke 8 dan seterusnya. Larva mungkin

dapat melewati plasenta dan masuk ke cairan amnion, yang selanjutnya tertelan oleh fetus dan menjadi dewasa sesudah fetus lahir. Disamping itu larva dapat bermigrasi ke kelenjar susu dan keluar bersama kolostrum (larva ditemukan antara 2-18 hari sesudah sapi atau kerbau beranak), sehingga anak sapi atau kerbau dapat terinfeksi melalui kolostrum (Warren, 1971 dikutip oleh Supan, 1993; Roberts, 1992).

2.2 Aspek Zoonosis *Toxocariasis*

Manusia dapat tertular *Toxocariasis* karena termakannya telur infeksius yang terdapat dalam feses anjing, kucing, sapi dan tanah terkontaminasi atau larva yang berada pada jaringan (daging) maupun air susu. Berdasarkan gejala klinik, *Toxocariasis* pada manusia diklasifikasikan menjadi *visceral toxocariasis* dan *ocular toxocariasis*. Kedua penyakit tersebut didefinisikan sebagai *visceral larva migrans* (VLM) dan *ocular larva migrans* (OLM) yang membutuhkan diagnosis secara imunologis (Uga *et al.*, 1990). *Toxocariasis* pada manusia dilaporkan telah terjadi di Jepang sebanyak 42 kasus (Kondo, 1989). *Toxocara* ternyata dapat menyerang manusia dewasa maupun anak-anak. Gejala *Toxocariasis* bervariasi sehingga sulit untuk didiagnosis dari gejala klinik (Uga *et al.*, 1990; Savigny, 1980). Lebih lanjut dinyatakan bahwa dengan uji ELISA terhadap orang-orang yang tinggal di Kota Kobe dan sekitarnya didapatkan hasil 4,6 % positif dari 196 kelompok orang dewasa (100 orang pria dan 96 wanita), 6,3 % positif dari 80 kelompok anak-anak (45 pria dan 35 wanita), dan 29,3 % positif dari 75 kelompok orang yang menunjukkan gejala/tersangka penderita (pasien 41 pria dan 34 wanita, umur 9-69 tahun).

2.3 Imunopatobiogenesis *Toxocariasis*

Pada umumnya infeksi oleh parasit, khususnya cacing, ditandai dengan keberadaan imunoglobulin (Ig) E dan peningkatan kadar eosinofil. Peningkatan kedua sel-sel sistem imun tersebut di bawah kontrol limfosit (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 (Chappell and Haeney, 1992). Sedangkan IL-5 merupakan stimulus potensial terhadap pembentukan eosinofil pada medium buatan (Southern and Southern, 1992). Penyuntikan IL-5 pada tikus yang dilakukan oleh Amerasinghe *et al.* (1992), berakibat terjadi peningkatan jumlah sel eosinofil dalam darah dan jaringan. Jika IL-5 rendah akan menyebabkan terjadinya granuloma dan fibrosis hati. IL-4 dan IL-5, yang dihasilkan oleh $Th_2CD_4^+$, berperan dalam kontrol produksi Ig E dan Ig G₁. Sedangkan $Th_1CD_8^+$ menghasilkan interferon gamma (IFN γ) yang menghambat reaksi hipersensitivitas dan memacu produksi Ig G₂. Menurut Rajapakse (1992), Ig G₂ lebih berperanan dalam infeksi *T. vitulorum* dari pada Ig yang lain.

Pada peruntutan respon imun terhadap patogenitas larva, ditemukan puncak kadar antibodi sapi dewasa pada 7 hari pasca infeksi. Puncak kedua terjadi pada saat L1 menetas dan berkembang menjadi L2, serta pada saat migrasi larva ke organ visceral yang lain. Respon imun terhadap *T. vitulorum* ternyata menggugah semua kelas imunoglobulin (Barriga and Omar, 1991). Semakin tinggi kadar Ig G semakin sedikit jumlah L3 yang berhasil keluar bersama air susu induk. Sebaliknya pada saat terjadi penembusan L2 terhadap jaringan granuloma, ternyata kadar Ig G₁ menurun 50% sedangkan Ig A dan Ig M meningkat sampai 7 kali (Rajapakse, 1992).

Ketidakberhasilan hospes untuk mengeliminasi larva *T. vitulorum* secara tuntas, serta gangguan patologi yang terjadi akibat respons imun merupakan

fenomena imunopatologi. Dilaporkan bahwa kegagalan tersebut menimbulkan rangsangan terbentuknya jaringan ikat kolagen dan fibronektin yang akan menyelubungi larva dorman berupa jaringan ikat granuloma (Warren, 1993). Kegagalan tersebut akan berakibat terhadap resistensi antibodi hospes, misalnya pada *Ascariasis*, terjadi reaksi hipersensitivitas cepat tipe I, dengan gejala urtikaria dan angioderma (Glickman *et al.*, 1981). Contoh lain adalah pada infeksi larva cacing pita, robeknya hidatida akan menyebabkan pelepasan sebagian antigen yang dapat memicu timbulnya shock anafilaktik akut (Roitt *et al.*, 1998). Sedangkan respons imun seluler terhadap deposit telur-telur cacing dalam jaringan sering kali berhubungan dengan pembentukan portal fibrosis dan hipertensi organ paru (Chappel and Haeney, 1992). Migrasi larva melalui paru menyebabkan *asthma-like reactions* seperti pada *T. canis* dan *tropical pulmonary eosinophilia* (Roitt *et al.*, 1998; Playfair, 1992). Menurut Stites (1997), termakannya telur-telur nematoda diikuti dengan menetasnya telur tersebut dan penetrasi larva pada mukosa, yang mana akhirnya mencapai paru melalui aliran darah, reaksi hipersensitivitas di dalam paru akibat tingginya Ig E dapat menyebabkan pneumonitis serius.

Infeksi larva *T. vitulorum* pada sapi betina dewasa juga memberikan gambaran respons imun seluler kronis, misalnya pembentukan jaringan granuloma di sekitar lokasi larva (Roberts, 1992). Hipersensitivitas tipe lambat kemungkinan juga terjadi pada infeksi bentuk larva, yaitu pada 2-3 minggu sebelum hospes melahirkan. Fenomena ini besar kemungkinan berkaitan dengan keberadaan hormon-hormon laktogenik yang akan menurunkan respons imun secara tidak langsung dengan kompetisi penggunaan kalsium (Ca) sebagai bahan penyusun air susu, hal ini memungkinkan L2 aktif kembali menjadi L3. Akan tetapi, tidak semua L2 yang berada di jaringan paru, ginjal, dan hati akan terbebas keluar pada saat kelahiran yang sama, sebagian dapat

bertahan sampai kelahiran berikutnya (Roberts, 1993). Terbentuknya sel fibroblas dari sel limfosit ikut berperan dalam pembentukan kapsul dan jaringan granuloma yang mengelilingi larva. Apabila kapsulasi tersebut terjadi pada waktu yang lama dapat berakibat terjadi pengapuran (Soulsby, 1989).

Bentuk imunitas protektif yang lain terhadap cacing dewasa masih bersifat spekulatif. Salah satu teori ialah *self cure* yang menyebabkan pengeluaran cacing dewasa dari tubuh hospes (Lloyd and Soulsby, 1987). Pada saat itu kadar Ig E meningkat, hal ini dibuktikan oleh Matsumura *et al.* (1983). Pengeluaran cacing dari lumen usus merupakan kerja sama antara antibodi, sel limfosit dan sel myeloid. Namun sepenuhnya fenomena tersebut belum dapat dijelaskan secara tepat. Sedangkan pada bentuk muda seringkali terjadi migrasi dari satu organ ke organ lain, kemudian akan membentuk jaringan ikat di sekitarnya. Keadaan ini akan merangsang kenaikan jumlah sel eosinofil yang berlangsung kronis, dan akan berkaitan dengan produksi Ig M dan Ig G di sekitar fibrosis dan di dalam granuloma tersebut. Sedangkan kadar eosinofil darah perifer terlihat mulai dari normal hingga terjadi peningkatan (Ogilvie and de Savigny, 1982 dikutip oleh Trisunuwati, 1997). Jumlah sel eosinofil dan makrofag sangat bergantung kepada keberadaan dan aktivitas sel limfosit T.

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

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

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

BAB 3

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1 Tujuan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan beberapa tujuan, antara lain.

- 1) Untuk mengetahui pengaruh waktu pengamatan (minggu) terhadap pembentukan antibodi pada mencit
- 2) Untuk mengetahui antigenitas dan imunogenitas suspensi homogenat dari masing-masing stadium (L1, L2 dan cacing dewasa) *Toxocara vitulorum* dalam memicu pembentukan antibodi pada mencit.
- 3) Untuk mengetahui pengaruh interaksi antara waktu pengamatan antibodi dengan stadium *T. vitulorum* yang digunakan sebagai antigen.

3.2 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat dijadikan tolok ukur dalam studi awal pembuatan kit diagnostik melalui pemeriksaan antibodi. Dengan diketahuinya antigenesitas dan imunogenesitas dari masing-masing stadium parasit, akan dapat diketahui adanya kemampuan stadium *T. vitulorum* sebagai antigen dalam memicu pembentukan antibodi. Dengan demikian, penelitian ini diharapkan dapat memberikan sumbangan ilmu bagi perkembangan Kedokteran Hewan dan Bioteknologi.

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Helminthiasis, Tropical Disease Center, Universitas Airlangga, Surabaya, sejak bulan Juni hingga September 2001.

4.2 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan rancangan *Factorial Post-test Only Control Group Design* untuk pengujian terhadap antibodi pada mencit (Zainuddin, 2000).

4.3 Sampel

Sampel yang digunakan berupa mencit Balb/c betina umur 8 minggu sebanyak 40 ekor, yang terbagi menjadi dua, yaitu 24 ekor sebagai hewan percobaan yang dibagi menjadi empat kelompok percobaan dan sisanya, diinfeksi dengan telur infeksi *T. vitulorum*, sebagai stok L2.

4.4 Peralatan Penelitian

Peralatan penelitian meliputi untuk uji ELISA, alat untuk pembuatan homogenat (*magnetic bar stirrer*), tabung serum, kandang mencit, inkubator CO₂, ELISA reader.

4.5 Unit Analisis

Penelitian ini menggunakan unit analisis berupa serum yang diambil pada minggu 1, 2, dan 3 pasca imunisasi pertama.



4.6 Variabel Penelitian

Sebagai variabel kendali adalah: *strain* mencit (Balb/c), jenis kelamin, umur dan berat badan.

Variabel bebas pada penelitian ini adalah waktu pengamatan (pengambilan serum), yaitu minggu I, II dan III setelah injeksi pertama, dan antigen dari berbagai stadium cacing *Toxocara vitulorum* (L1, L2 dan cacing dewasa), yang dibuat dalam bentuk suspensi homogenat, yang akan diuji imunogenesitasnya.

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah antibodi mencit yang diukur dengan uji ELISA *indirect*.

4.7 Tahap Penelitian

Penelitian ini dibagi menjadi 4 tahap sebagai berikut.

4.7.1 Isolasi *Toxocara vitulorum*

Toxocara vitulorum dari berbagai stadium diisolasi dari sapi dengan umur yang berbeda. Telur berembrio (L1) dan cacing dewasa diisolasi dari feses anak sapi yang menderita Toxocariasis. Larva stadium 2 diperoleh dengan mengisolasi jaringan hati, ginjal dan paru mencit Balb/c, yang telah diinfeksi dengan telur *T. vitulorum* infeksi, sebagai stok L2. Teknik isolasi menurut cara yang biasa dikerjakan di Lab. Helminthologi FKH Unair (Sri Subekti dkk., 1999).

4.7.2 Pembuatan imunogen dari suspensi homogenat

Masing-masing isolat kemudian dimurnikan dengan jalan dipisahkan dari feses, jaringan hati, ginjal dan paru untuk selanjutnya dibuat suspensi homogenat 1:10. Konsentrasi homogenat dari masing-masing stadium

disamakan dengan cara mengukur kadar protein homogenat dengan spektrofometer pada panjang gelombang 570 nm. Suspensi homogenat selanjutnya dicampur dengan adjuvan dalam volume sama banyak (*Complete Freund Adjuvant* atau *Incomplete Freund Adjuvant*) untuk meningkatkan daya imunogenesitasnya (Harlow dan Lane, 1993).

4.7.3 Uji imunogenesitas

Untuk mengetahui imunogenitas dari masing-masing stadium parasit dilakukan penyuntikan suspensi homogenat pada mencit Balb/c betina umur 8 minggu. Sebanyak 24 ekor mencit dibagi menjadi empat kelompok. Kelompok I diinjeksi dengan suspensi homogenat telur *Toxocara vitulorum* infeksi (L1). Kelompok II dengan L2, Kelompok III dengan cacing dewasa, dan Kelompok IV diinjeksi dengan PBS sebagai kontrol negatif. Injeksi dilakukan sebanyak dua kali (injeksi pertama dengan *Complete Freund Adjuvant* dan injeksi kedua dengan *Incomplete Freund Adjuvant*) secara subkutan dengan dosis 0,5 ml per ekor dan interval waktu 2 minggu (Harlow dan Lane, 1993).

Pada minggu ke-1, 2 dan 3 pasca injeksi yang pertama dilakukan pengambilan darah untuk pemeriksaan antibodi dengan menggunakan teknik ELISA *indirect*.

4.7.4 Uji ELISA *indirect*

Serum yang telah dikumpulkan dari keempat kelompok perlakuan kemudian diperiksa kemampuannya mengenali antigen dari keempat suspensi homogenat. Pada teknik ini digunakan konjugat *goat antimouse* yang dilabel dengan enzim alkalin fosfatase dan pembacaan dilakukan dengan ELISA *reader* dengan panjang gelombang 405 nm. Hasil dikatakan positif berdasarkan nilai *cut of value* (COV) dimana $COV = 2 \times$ rata-rata kontrol negatif (Savigny, 1980).

4.8 Rancangan Penelitian dan Analisis Data

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *Factorial Post-test Only Control Group Design* (Zainuddin, 2000) dengan 3 waktu pengamatan x 3 stadium *T. vitulorum* x 6 ulangan. Data yang terkumpul dianalisis dengan *Statistical Product and Service Solution (SPSS) rel 10.0 for Windows* (Santoso, 2001).

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Hasil Penelitian

Hasil pengamatan berupa nilai *optical density* (OD) antibodi mencit dapat dilihat pada Tabel 5.1. Sedangkan hasil perhitungan serum tes per serum negatif (T/N) dapat dilihat pada Tabel 5.2.

Tabel 5.1 Nilai OD pada Pemeriksaan Antibodi Mencit yang Diimunisasi Berbagai Antigen *T. vitulorum* dengan Uji ELISA Tak Langsung

Waktu	Stadium	Replikasi (n)						Kontrol	
		1	2	3	4	5	6	(-)	PBS
Minggu I	Larva-1	0.305	0.278	0.344	0.299	0.237	0.346	0.137	0.011
	Larva-2	0.299	0.487	0.383	0.44	0.489	0.316	0.160	0.008
	Dewasa	0.217	0.315	0.328	0.295	0.257	0.318	0.127	0.023
Minggu II	Larva-1	0.445	0.426	0.512	0.454	0.525	0.462	0.141	0.019
	Larva-2	0.777	0.659	0.762	0.850	0.789	0.628	0.156	0.016
	Dewasa	0.426	0.446	0.411	0.425	0.49	0.536	0.137	0.015
Minggu III	Larva-1	0.677	0.499	0.762	0.495	0.739	0.628	0.144	0.025
	Larva-2	1.004	0.885	0.883	1.014	0.954	0.917	0.159	0.019
	Dewasa	0.475	0.546	0.489	0.575	0.535	0.644	0.136	0.014

Tabel 5.2 Nilai T/N pada Pemeriksaan Antibodi Mencit yang Diimunisasi Berbagai Antigen *T. vitulorum* dengan Uji ELISA Tak Langsung

Waktu	Stadium	Replikasi (n)						Kontrol	
		1	2	3	4	5	6	(-)	PBS
Minggu I	Larva-1	2.226	2.029	2.511	2.182	1.730	2.526	0.137	0.011
	Larva-2	1.869	3.044	2.394	2.750	3.056	1.975	0.160	0.008
	Dewasa	1.709	2.480	2.583	2.323	2.024	2.504	0.127	0.023
Minggu II	Larva-1	3.156	3.021	3.631	3.220	3.723	3.277	0.141	0.019
	Larva-2	4,981	4,224	4,885	5,449	5,058	4,026	0.156	0.016
	Dewasa	3,109	3,255	3,000	3,102	3,577	3,912	0.137	0.015
Minggu III	Larva-1	4,701	3,465	5,292	3,438	5,292	4,361	0.144	0.025
	Larva-2	6,314	5,566	5,553	6,377	6,000	5,767	0.159	0.019
	Dewasa	3,493	4,015	3,596	4,228	3,934	4,735	0.136	0.014

Berdasarkan waktu pengamatan terhadap daya imunogenisitas dari cacing *Toxocara vitulorum* tampak adanya perbedaan yang sangat nyata ($p < 0,01$) dalam memicu pembentukan antibodi pada minggu ke-1 hingga minggu ke-3, seperti terlihat pada Tabel 5.3. Pada minggu pertama nilai OD antibodi yang terdeteksi masih relatif rendah yaitu $0,331 \pm 0,076$. Hasil ini secara berangsur-angsur meningkat menjadi $0,557 \pm 0,148$ pada minggu kedua dan $0,707 \pm 0,192$ pada minggu ketiga.

Tabel 5.3 Rata-rata dan Simpangan Baku (SD) Nilai OD Berdasarkan Waktu Pengamatan pada Berbagai Stadium *T. vitulorum*

Waktu Pengamatan	$\bar{x} \pm SD$	T/N	Kontrol negatif
Minggu I	$0,331^c \pm 0,076$	$2,3 \pm 0,399$	$0,141 \pm 0,017$
Minggu II	$0,557^b \pm 0,148$	$3,8 \pm 0,795$	$0,145 \pm 0,010$
Minggu III	$0,707^a \pm 0,192$	$4,8 \pm 1,010$	$0,146 \pm 0,012$

^{a, b, c} Superskrip berbeda pada kolom sama menunjukkan perbedaan sangat nyata ($p < 0,01$).

Berdasarkan daya antigenisitas dari berbagai stadium *T. vitulorum* tampak adanya perbedaan dalam mengenali antibodi, seperti terlihat pada Tabel 5.4. Antigen dari cacing dewasa menunjukkan nilai OD terendah yaitu sebesar $0,429 \pm 0,119$. Hasil ini secara statistik tidak berbeda nyata ($p > 0,05$) dengan nilai OD dari antigen lava stadium 1 (L1) yaitu sebesar $0,469 \pm 0,156$. Sementara itu L2 menunjukkan nilai OD tertinggi yaitu sebesar $0,696 \pm 0,241$ dan berbeda sangat nyata ($p < 0,01$) dengan antigen cacing dewasa maupun L1.

Tabel 5.4 Rata-rata dan Simpangan Baku (SD) Nilai OD Berdasarkan Stadium *T. vitulorum* pada Berbagai Waktu Pengamatan

Stadium <i>T. vitulorum</i>	$\bar{x} \pm SD$	T/N	Kontrol negatif
Larva1	$0,469^b \pm 0,156$	$3,3 \pm 1,045$	$0,141 \pm 0,004$
Larva2	$0,696^a \pm 0,241$	$4,4 \pm 1,527$	$0,158 \pm 0,002$
Cacing Dewasa	$0,429^b \pm 0,119$	$3,1 \pm 0,816$	$0,133 \pm 0,006$

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

Pada penelitian ini terdapat interaksi ($p < 0,01$) antara waktu pengamatan antibodi dengan stadium *T. vitulorum* yang digunakan sebagai sumber antigen. Berdasarkan uji Duncan (5%) dapat diketahui bahwa, nilai OD antibodi terendah didapatkan pada perlakuan interaksi cacing dewasa pada minggu pertama, yaitu sebesar $0,288 \pm 0,043$. Hasil yang juga sama didapatkan pada L1 minggu pertama yaitu sebesar $0,302 \pm 0,041$. Sedangkan nilai OD antibodi yang tertinggi terdapat pada perlakuan interaksi L2 pada minggu ketiga, yaitu sebesar $0,943 \pm 0,058$. Adapun hasil pengamatan terhadap perlakuan interaksi antara waktu pengamatan antibodi dengan stadium *T. vitulorum*, yang digunakan sebagai sumber antigen, selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 5.5.

Tabel 5.5 Rata-rata dan Simpangan Baku (SD) Nilai OD Berdasarkan Waktu Pengamatan dan Stadium *T. vitulorum* yang Berbeda

Perlakuan Interaksi	$\bar{x} \pm SD$	T/N	Kontrol negatif
Minggu I - Larva 1	$0,302^f \pm 0,041$	$2,2 \pm 0,301$	0,137
Minggu I - Larva 2	$0,402^e \pm 0,083$	$2,5 \pm 0,520$	0,160
Minggu I - Dewasa	$0,228^f \pm 0,043$	$2,3 \pm 0,339$	0,127
Minggu II - Larva 1	$0,471^{de} \pm 0,039$	$3,3 \pm 0,301$	0,141
Minggu II - Larva 2	$0,744^b \pm 0,084$	$4,8 \pm 0,539$	0,156
Minggu II - Dewasa	$0,456^e \pm 0,048$	$3,3 \pm 0,351$	0,137
Minggu III - Larva 1	$0,633^c \pm 0,012$	$4,4 \pm 0,803$	0,144
Minggu III - Larva 2	$0,943^a \pm 0,058$	$5,9 \pm 0,362$	0,159
Minggu III - Dewasa	$0,544^d \pm 0,061$	$4,0 \pm 0,451$	0,136

^{a, b, c, d, e, f} Superskrip berbeda pada kolom sama menunjukkan perbedaan sangat nyata ($p < 0,01$).

5.2 Pembahasan

Bila dilihat daya imunogenesitasnya dari semua antigen (Tabel 5.3) terlihat bahwa serum (antibodi) yang diperiksa dari waktu ke waktu (minggu pertama hingga minggu ketiga) menunjukkan nilai OD mengalami peningkatan yang berarti ($p < 0,01$). Hal ini menunjukkan bahwa, semua antigen dari berbagai stadium *T. vitulorum* (L1, L2 dan cacing dewasa) mampu memicu pembentukan antibodi. Namun demikian pada minggu pertama antibodi yang terdeteksi dengan teknik ELISA *indirect* belum menunjukkan nilai positif, karena nilai T/N kurang dari 3,3. Uga *et al.* (1990) menyatakan bahwa, apabila dalam suatu pemeriksaan didapatkan nilai T/N kurang dari 1,8 maka sampel dinyatakan negatif, sampel dinyatakan positif apabila memiliki nilai T/N lebih dari atau sama dengan 3,3. Berdasarkan ketentuan ini, maka pemeriksaan antibodi pada minggu pertama pada penelitian ini belum menunjukkan hasil positif, sedangkan pada minggu kedua sudah mulai menunjukkan hasil positif dan keadaan ini menjadi positif kuat pada pemeriksaan minggu ketiga. Oleh karena itu berdasarkan hasil penelitian ini dapat dinyatakan bahwa, untuk mendapatkan hasil positif kuat pada pemeriksaan respons imun humoral (antibodi) yang terbentuk terhadap antigen *T. vitulorum* sekurang-kurangnya diperlukan waktu tiga minggu.

Pada hasil penelitian telah ditunjukkan bahwa, antigen *T. vitulorum* pada berbagai stadium, bersifat antigenik dan imunogenik. Bersifat antigenik karena antigen dari masing-masing stadium (L1, L2 dan cacing dewasa) mampu mengikat antibodi dengan spesifik. Hal ini seperti ditunjukkan pada Tabel 5.4, di mana semua antigen mampu mengikat antibodi dengan menimbulkan nilai OD yang lebih besar dari rata-rata kontrol negatif. Pada penelitian ini rata-rata kontrol negatif diperoleh pada nilai OD sebesar $0,144 \pm 0,0116$. Menurut Savigny (1980), hasil pemeriksaan dikatakan positif apabila

sampel memiliki nilai OD dua sampai tiga kali dari rata-rata kontrol negatif, atau apabila sampel menunjukkan nilai OD sebesar 0,55 dianggap positif lemah. Pada penelitian ini nilai OD yang memenuhi kedua persyaratan antigenitas tersebut adalah antigen L2. Hal ini berarti L2 berpeluang besar untuk dimanfaatkan sebagai bahan diagnostik untuk pemeriksaan antibodi. Hal ini sesuai dengan pendapat Trisunuwati (1997) yang menyatakan bahwa, antigen L1 *T. vitulorum* memiliki daya antigenitas yang terbatas. Ini terbukti pada pemeriksaan *Western Blot*, di mana identifikasi antigen L1 dengan menggunakan antibodi anti L1 menunjukkan hasil negatif.

Berdasarkan hasil pengamatan terhadap perlakuan interaksi antara waktu pengamatan dengan stadium *T. vitulorum* dapat dinyatakan bahwa, pada minggu pertama untuk semua stadium *T. vitulorum*, sebagai sumber antigen, belum menunjukkan hasil positif. Pada minggu kedua hanya stadium larva 2 yang sudah menunjukkan hasil positif kuat, sedangkan stadium larva 1 dan dewasa masih menunjukkan hasil positif lemah. Untuk minggu ketiga, stadium larva 2 menunjukkan hasil positif paling kuat (sangat kuat), kemudian diikuti stadium larva 1 dan cacing dewasa. Hal ini sesuai dengan pendapat Patterson (1995) yang menyatakan bahwa, pembentukan respons pada cacing sangat tergantung pada stadium daur hidup yang berbeda dan waktu infestasi yang cukup lama. Adanya persamaan antigenesitas antara stadium daur hidup cacing dan antara/di dalam filum cacing perlu dipertimbangkan terhadap timbulnya reaksi silang.

Dengan mempertimbangkan daya antigenesitas, imunogenesitas dan waktu pengamatan antibodi terhadap berbagai stadium antigen *T. vitulorum* (Tabel 5.5), maka antigen L2 sangat memungkinkan untuk dikembangkan sebagai bahan diagnostik pada uji ELISA. Menurut More (1995), berbagai jenis antigen cacing, seperti antigen permukaan, antigen internal yang dilepas pada

saat pemangsaan, eksresi ganti kulit dan berbiak (fraksi ekskretori/sekretori) serta antigen somatik, dapat dimanfaatkan untuk perangkat uji diagnostik.

BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan sebagai berikut.

- 1) Daya imunogenisitas pada waktu pengamatan (minggu) berbeda dari cacing *Toxocara vitulorum* menunjukkan perbedaan sangat nyata ($p < 0,01$). Pada minggu pertama belum menunjukkan hasil positif, pada minggu kedua mulai menunjukkan hasil positif, sedangkan hasil positif kuat didapatkan pada minggu ketiga.
- 2) Daya imunogenisitas masing-masing stadium *T. vitulorum*, dalam membentuk antibodi, menunjukkan perbedaan sangat nyata ($p < 0,01$). Nilai OD terendah didapatkan pada antigen dari cacing dewasa dan L1, sedangkan nilai OD tertinggi didapatkan pada L2.
- 3) Pada penelitian ini terdapat interaksi ($p < 0,01$) antara waktu pengamatan antibodi dengan stadium *T. vitulorum* yang digunakan sebagai sumber antigen. Nilai OD antibodi tertinggi terdapat pada perlakuan interaksi pada minggu ketiga dengan antigen stadium L2.

6.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disarankan beberapa hal sebagai berikut.

- 1) Semua antigen dari berbagai stadium *T. vitulorum* (L1, L2 dan cacing dewasa) mampu memicu pembentukan antibodi. Namun dengan mempertimbangkan daya antigenesitas, imunogenesitas dan waktu pengamatan antibodi terhadap berbagai stadium *T. vitulorum*, maka disarankan antigen L2 yang paling memungkinkan untuk dikembangkan sebagai bahan diagnostik pada uji ELISA.
- 2) Untuk mendapatkan hasil positif kuat pada pemeriksaan respons imun humoral (antibodi) yang terbentuk terhadap *T. vitulorum* sekurang-kurangnya diperlukan waktu tiga minggu.

DAFTAR PUSTAKA

- Amerasinghe, P.H., R.P.V.J. Rajapakse, S. Lloyd, and S.T. Fernando. 1992. Antigen induced protection against infection with *Toxocara vitulorum* larvae in mice. *J.Parasitol.Res.* 78: 643-647.
- Bambell, F.W.R. 1970. Transmission of passive immunity from mother to young. Amsterdam: North Holland Publishing & Co. pp: 158-159.
- Barriga, O.O., and H.M. Omar. 1991. Immunity to *Toxocara vitulorum* reaped infection in rabbit model. *J. Vet. Immunol. Immunopathol.* 33: 249-260.
- Brandon, M.R. and A.K. Lascelles. 1971. Relative efficiency of absorbtion Ig G1, Ig G2 and Ig M in the newborn calf. *Aust.J.Exp.Biol. Med.Sci.* 49: 629-633.
- Chappell, H. and M. Haeney. 1992. Essential of Clinical Immunology. Mellbouerne. pp. 65
- Glickman, L.T., J.P. Dubey, L.J. Winslow. 1981. Serological responses of *Ascarids* free dog to *Toxocara canis* infection. *J.Parasitol.* 82: 382-387
- Harlow, E. and D. Lane. 1988. Antibodies. A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Husband, A.J., E.J.L. 1972. Absorbtion and endogenous production of immunoglobulin in calves. *Aust.J.Exp.Biol. Med.Sci.* 50: 490-498.
- Ito, K., K. Sakai, T. Okajima, K. Quchi, A. Funakoshi, J. Nishimura, H. Ibayashi, and M. Tsuji. 1986. Three cases of visceral larva migrans due to ingestion of raw chickens or cow liver. *Nihon Naikagaku Zassi.* 75: 759-766
- Janeway, C.A. Jr., P. Travers, M. Walport, and J.D. Capra. 1999. Immunobiology. The immune system in health and disease. 4th ed. Elsevier Science Ltd/Garland Publishing. New York, US.
- Kondo, K. 1989. Toxocariasis. *Saisin-Igaku.* 44: 774-779.
- Lloyd, S. and E.J.L. Soulsby. 1987. Immunology of G.I. nematode of ruminants. In: Soulsby, E.J.L. Immun Responses in Parasitic Infection, Immunology, Immunopathology, and Immunoprophylaxis. Vol. I. New York Academic Press. pp. 231-240.
- Manus, D.P.M. 1986. Intermediary metabolism in parasitic helminth. In: Howell. Procc. Of the Sixth International Congress of Parasites. pp. 79-89.



- Matsumura, K., Y. Kazuta, R. Endo, and K. Tanaka. 1983. The Ig M antibody in relation to the parasite statues of *Toxocrz canis* in dogs. *Zentralblat Bacteriol.Microbiol.Hyg.A.* 255: 402-405.
- More, S. 1995. Struktur antigen parasit. Dalam: *Teknologi ELISA dalam Diagnosis dan Penelitian.* Graham W. Burgess Ed. Gajah Mada University Press. hal 457-497.
- Pandey, V.S., D.G. Hill, D.G. Hensman, L.C. Baragwanath. 1990. *Toxocara vitulorum* in beef calves kept on effluent irrigated pastures in Zimbabwe. *J. Vet. Parasitol.* 35: 349-355.
- Patterson, R.M. 1995. Respon imun terhadap parasit cacing. Dalam: *Teknologi ELISA dalam Diagnosis dan Penelitian.* Graham W. Burgess Ed. Gajah Mada University Press. hal 499-533.
- Playfair, J.H.L. 1992. *Immunology at a Glance.* 5th Ed. Blackwell Scientific Publications. University Press, Cambridge.
- Radman NE, Archelli SM, Fonrouge RD, del V Guardis M, Linzitto OR. 2000. Human toxocarosis. Its seroprevalence in the city of La Plata. *Mem Inst Oswaldo Cruz* May-Jun;95(3):281-5
- Rajapakse, R.P.V.J. 1992. Immunological response of buffalo cows and calves to *Toxocara vitulorum* infection. Dissertation. Submitted for the Degree of Doctor of Philosophy. University of Paradeniya. Sri Lanka.
- Robert, J.A. 1990. The eggs production of *Toxocara* infection in Asean buffalo. *J.Parasitol.* 37: 113-120.
- Robert, J.A. 1990^b. The life cycle of *Toxocara vitulorum* in Asian buffalo (*Bubalis bubalis*). *Intern.J.Parasitol.* 20(7): 853-840.
- Robert, J.A. 1993. *Toxocara vitulorum* in ruminant. *Vet.Bullt.* 63(6): 545-568.
- Roitt, I., J. Brostoff, and D. Male. 1998. *Immunology.* 4th ed. Mosby, Times Mirror International Publisers Limited. Barcelona, Spain.
- Santoso, S. 2001. *Mengolah Data Statistik Secara Profesional.* SPSS versi 10. Penerbit PT Elex Media Komputindo Kelompok Gramedia, Jakarta.
- Savigny, D. 1980. The cummunication of ELISA data from laboratory to clinician. *J. of Immunoassay.* 1(1): 105-128.
- Simon, H. dan H. Syahrial. 1992. Infeksi alamiah *Toxocara vitulorum* pada anak sapi perah di Bayongbong Garut. *Hemerozoa.* 75 (1): 70-76.
- Soulsby, E.J.L. 1989. Toxocariasis. *Brit.Vet.J.* 139: 471-475.

- Sourthern, S.O. and J. Sourthern. 1992. Current protocols in molecular biology. USA. Harvard Medical School. pp. 108.
- Sri Subekti, Kusnoto, S. Koesdarto, Sri Mumpuni, dan H. Puspitaswati. 1999. Petunjuk Praktikum Ilmu Penyakit Helminth Veteriner. Laboratorium Helminthologi, FKH Unair.
- Stites, D.P., A.I. Terr, T.G. Parlow. 1997. Medical Immunology. 9th Ed. A Simon & Schuster Company, Prentice-Hall International Inc. USA.
- Supan, K. 1993. Parasit dan Parasitosis pada Hewan Ternak dan Hewan Piaraan di Indonesia. PAU Bioteknologi, IPB, Bogor.
- Trisunuwati, P. 1997. Penentuan antigen determinan larva *Toxocara vitulorum*: sebagai upaya menemukan metode imunodiagnostik dini toxocariasis pada induk sapi. Disertasi, Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Surabaya.
- Trisunuwati, P., T. Cornelissen and Nasich. 1992. A parasitological study on the impact of Nematodes on the production of livestock in the limestone area of South Malang. Interdisciplinary Research J. Landbouw Agricultural University of Wageningen. The Netherlands.
- Uga S., T. Matsumura, K. Fujisawa, K. Okubo, N. Kataoka, and K. Kondo. 1990. incidence of seropositivity to Human Toxocariasis in Hyogo Prefecture, Japan, and Its posible role in ophthalmic disease. Jpn. J. Parasitol. 39(5): 500-502.
- Warren, K.S. 1993. Immunology and molecular biology of parasit infections. Eidinburg, Blackwell Sc. Pp. 55.
- Zainuddin, M. 2000. Metodologi penelitian. Diktat Kuliah. Program Pascasarjana, Universitas Airlangga.

LAMPIRAN

Univariate Analysis of Variance

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
Waktu pengamatan (Minggu)	1	Minggu I	18
	2	Minggu II	18
	3	Minggu III	18
Stadium Toxocara vitulorum	1	Larva 1 Tv	18
	2	Larva 2 Tv	18
	3	Tv Dewasa	18

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Nilai OD

Waktu pengamatan	Stadium Toxocara	Mean	Std. Deviation	N
Minggu I	Larva 1 Tv	.30150	4.1273E-02	6
	Larva 2 Tv	.40233	8.3191E-02	6
	Tv Dewasa	.28833	4.3080E-02	6
	Total	.33072	7.6340E-02	18
Minggu II	Larva 1 Tv	.47067	3.9160E-02	6
	Larva 2 Tv	.74417	8.4089E-02	6
	Tv Dewasa	.45567	4.8044E-02	6
	Total	.55683	.14774	18
Minggu III	Larva 1 Tv	.63333	.11562	6
	Larva 2 Tv	.94283	5.7485E-02	6
	Tv Dewasa	.54400	6.1371E-02	6
	Total	.70672	.19218	18
Total	Larva 1 Tv	.46850	.15594	18
	Larva 2 Tv	.69644	.24051	18
	Tv Dewasa	.42933	.11931	18
	Total	.53143	.21226	54

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Nilai OD

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	2.179 ^a	8	.272	58.593	.000
Intercept	15.250	1	15.250	3281.117	.000
WAKTU	1.290	2	.645	138.752	.000
STADIUM	.749	2	.375	80.579	.000
WAKTU * STADIUM	.140	4	3.496E-02	7.521	.000
Error	.209	45	4.648E-03		
Total	17.638	54			
Corrected Total	2.388	53			

a. R Squared = .912 (Adjusted R Squared = .897)

Post Hoc Tests

Waktu pengamatan (Minggu)

Homogeneous Subsets

Nilai OD

Duncan^{a,b}

Waktu pengamatan (Minggu)	N	Subset		
		1	2	3
Minggu I	18	.33072		
Minggu II	18		.55683	
Minggu III	18			.70672
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 4.648E-03.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 18.000.

b. Alpha = .05.

Stadium Toxocara vitulorum

Homogeneous Subsets

Nilai OD

Duncan^{a,b}

Stadium Toxocara vitulorum	N	Subset	
		1	2
Tv Dewasa	18	.42933	
Larva 1 Tv	18	.46850	
Larva 2 Tv	18		.69644
Sig.		.092	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

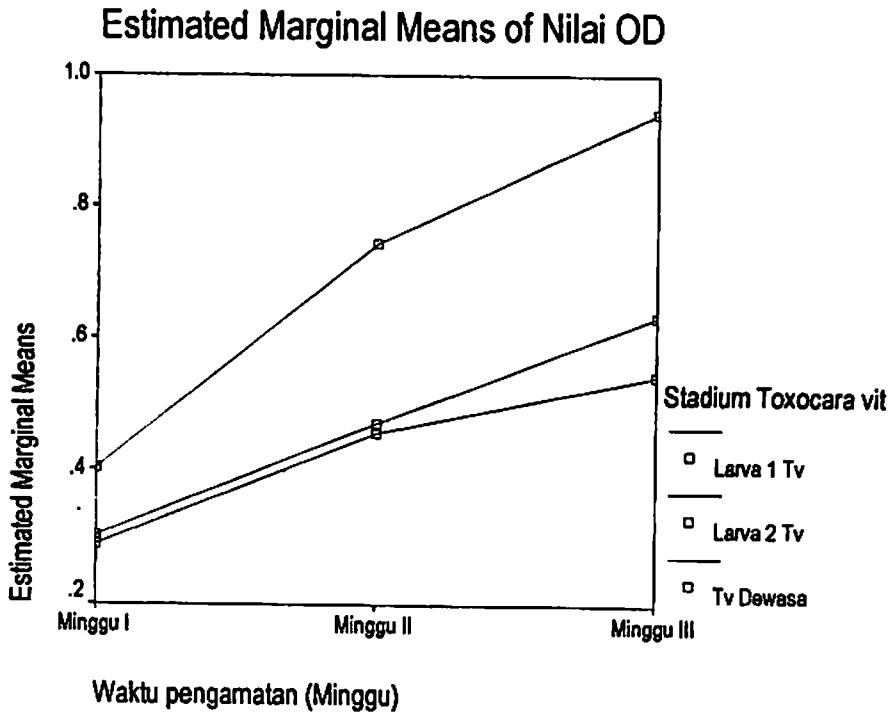
Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 4.648E-03.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 18.000.

b. Alpha = .05.

Profile Plots



Descriptive Statistics untuk Perlakuan interaksi Waktu*Stadium

Descriptives

Nilai OD

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Minimum	Maximum
Minggu I-Larva 1 Tv	6	.30150	4.1273E-02	1.6850E-02	.237	.346
Minggu I-Larva 2 Tv	6	.40233	8.3191E-02	3.3962E-02	.299	.489
Minggu I-Tv Dewasa	6	.28833	4.3080E-02	1.7587E-02	.217	.328
Minggu II-Larva 1 Tv	6	.47067	3.9160E-02	1.5987E-02	.426	.525
Minggu II-Larva 2 Tv	6	.74417	8.4089E-02	3.4329E-02	.628	.850
Minggu II-Tv Dewasa	6	.45567	4.8044E-02	1.9614E-02	.411	.536
Minggu III-Larva 1 Tv	6	.63333	.11562	4.7201E-02	.495	.762
Minggu III-Larva 2 Tv	6	.94283	5.7485E-02	2.3468E-02	.883	1.014
Minggu III-Tv Dewasa	6	.54400	6.1371E-02	2.5055E-02	.475	.644
Total	54	.53143	.21226	2.8885E-02	.217	1.014

Waktu pengamatan* Stadium *Toxocara vitulorum*

Homogeneous Subsets

Nilai OD

Duncan^a

Duncan	N	Subset for alpha = .05					
		1	2	3	4	5	6
Minggu I-Tv Dewasa	6	.28833					
Minggu I-Larva 1 Tv	6	.30150					
Minggu I-Larva 2 Tv	6		.40233				
Minggu II-Tv Dewasa	6		.45567				
Minggu II-Larva 1 Tv	6		.47067	.47067			
Minggu III-Tv Dewasa	6			.54400			
Minggu III-Larva 1 Tv	6				.63333		
Minggu II-Larva 2 Tv	6					.74417	
Minggu III-Larva 2 Tv	6						.94283
Sig.		.740	.107	.069	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

