

LAPORAN PENELITIAN HIBAH BERSAING (XIV-2)
TAHUN ANGGARAN 2007

**PENGEMBANGAN DIAGNOSIS TOXOCARIASIS MENGGUNAKAN TEKNIK
SANDWICH-ELISA DENGAN ANTIBODI MONOKLONAL ANTI-PROTEIN
SPESIFIK *Toxocara canis* ISOLAT LOKAL**

Oleh

Prof. Dr. Setiawan Koesdarto, MSc., drh.

Kusnoto, MSi., drh.

Dr. Suwarno, MSi., drh.

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai oleh Direktorat Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional
Sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Penelitian dan
Pengabdian kepada Masyarakat Nomor: 016/SP2H/PP/DP2M/III/2007
Tanggal 29 Maret 2007

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Tahun 2007

g-131



kk
kfc
LP.59/10
100e
P

**LAPORAN PENELITIAN HIBAH BERSAING (XIV-2)
TAHUN ANGGARAN 2007**

**PENGEMBANGAN DIAGNOSIS TOXOCARIASIS MENGGUNAKAN TEKNIK
SANDWICH-ELISA DENGAN ANTIBODI MONOKLONAL ANTI-PROTEIN
SPESIFIK *Toxocara canis* ISOLAT LOKAL**

Oleh

**Prof. Dr. Setiawan Koesdarto, MSc., drh.
Kusnoto, MSi., drh.
Dr. Suwarno, MSi., drh.**

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai oleh Direktorat Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional
Sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Penelitian dan
Pengabdian kepada Masyarakat Nomor: 016/SP2H/PP/DP2M/III/2007
Tanggal 29 Maret 2007

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
Tahun 2007**

LEMBAR PENGESAHAN

A. Judul: PENGEMBANGAN DIAGNOSIS TOXOCARIASIS MENGGUNAKAN TEKNIK SANDWICH-ELISA DENGAN ANTIBODI MONOKLONAL ANTI-PROTEIN SPESIFIK *Toxocara canis* ISOLAT LOKAL

B. Ketua Peneliti :

Nama : Prof. Dr. Setiawan Koesdarto, M.Sc., drh.
 Jenis Kelamin : Laki-laki
 N I P : 130 687 547
 Pangkat / Golongan : Pembina Utama Muda / IV-C
 Bidang Keahlian : Parasitologi
 Jabatan Sekarang : Guru Besar
 Jurusan / Fakultas / Pusat Penelitian : Fakultas Kedokteran Hewan
 Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

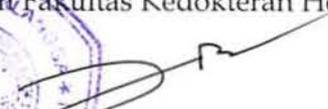
C. Tim Peneliti

No	Nama Gelar Akademik	Bidang Keahlian	Instansi
1	Prof.Dr.H. Setiawan Koesdarto, drh.,MSc.	Parasitologi	FKH, Unair
2	Kusnoto, MSi., drh.	Imuno-parasitologi	FKH Unair
3	Dr. Suwarno, MSi., drh.	Imunologi	FKH, Unair

D. Pendanaan dan Jangka Waktu Penelitian

Jangka waktu penelitian yang diusulkan: 3 tahun
 Biaya total yang diusulkan : Rp150.000.000,-
 Biaya yang disetujui th I Anggaran 2006 : Rp35.000.000,-
 Biaya yang disetujui th II Anggaran 2007 : Rp35.000.000,-

Mengetahui
 Dekan Fakultas Kedokteran Hewan,


 Prof. Hj. Romziah Sidik, PhD., drh.
 NIP. 130 687 305

Surabaya, 21 Desember 2007
 Peneliti Utama,


 Prof. Dr. H. Setiawan Koesdarto, drh., MSc.
 NIP. 130 687 547



Mengetahui,
 Ketua Lembaga Penelitian
 Universitas Airlangga


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

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT yang telah banyak melimpahkan rahmat dan karunia-Nya sehingga laporan PHB XIV-1 ini dapat terselesaikan.

Kami mengucapkan banyak terima kasih kepada Pemerintah Indonesia cq tim pengelola dana Hibah Bersaing Perguruan Tinggi XIV, yang telah memberikan kesempatan kepada kami untuk memperoleh dana sehingga kami dapat melakukan penelitian ini.

Dengan selesainya laporan ini, perkenankanlah kami juga mengucapkan banyak terima kasih kepada:

- ✧ Rektor Universitas Airlangga Prof. Dr. Med. Puruhito, dr. atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya, untuk mengikuti seleksi proposal Penelitian Hibah Bersaing Perguruan Tinggi XIV.
- ✧ Ketua Lembaga Penelitian Universitas Airlangga Prof. Dr. Sarmanu, drh. atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada kami, untuk mengikuti seleksi proposal Penelitian Hibah Bersaing Perguruan Tinggi XIV.
- ✧ Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Prof. Dr. Ismudiono, MS., drh. atas kesempatan dan rekomendasi yang diberikan kepada kami untuk mengikuti seleksi proposal Penelitian Hibah Bersaing Perguruan Tinggi XIV.
- ✧ Ketua Tropical Disease Center Prof. Dr. H. Yoes Prijatna Dachlan, MSc., dr. yang memberikan izin penggunaan fasilitas penelitian kepada kami hingga laporan ini dapat terselesaikan.

Tak lupa kami ucapkan terima kasih kepada semua pihak yang membantu selama kami melakukan penelitian hingga laporan ini terselesaikan, semoga Allah SWT membalas dengan kebaikan yang berlipat. Amin.

Surabaya, Nopember 2006

Tim Peneliti

RINGKASAN

PENGEMBANGAN DIAGNOSIS TOXOCARIASIS MENGGUNAKAN TEKNIK sandwich-ELISA DENGAN ANTIBODI MONOKLONAL ANTI-PROTEIN SPESIFIK *Toxocara canis* ISOLAT LOKAL (Setiawan Koesdarto¹, Kusnoto¹, dan Suwarno², 73 halaman)

¹Bagian Parasitologi; ²Bagian Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

Hingga saat ini protein *Toxocara canis* isolat lokal dengan spesifisitas tinggi untuk diagnosis secara imunologis pada infeksi toxocariasis belum diketahui. Padahal protein tersebut penting untuk diagnosis mengingat penyakit ini tergolong penting untuk diperhatikan karena selain bersifat zoonosis dan berdampak sangat berat, juga memiliki gejala klinis yang variatif serta pada infeksi bentuk larva tidak bisa didiagnosis secara konvensional (dengan pemeriksaan feses).

Penelitian ini bertujuan untuk standarisasi teknik *indirect capture*-ELISA (IC-ELISA) dengan antibodi monoklonal (AbMo) anti-*T. canis* sebagai sarana diagnosis dini, cepat, dan akurat dalam mendeteksi antibodi anti-*T. canis* melalui pemeriksaan serum darah dan penjajagan DAS-ELISA pada *coproantigen* hewan tersangka toxocariasis, melalui tahapan: 1) Persiapan, pada tahap ini dilakukan isolasi telur, larva dan cacing dewasa (*T. canis* dan *T. vitulorum*), pembuatan homogenat (*whole worm extract*) cacing dewasa, homogenat larva kedua (L2), L2 jaringan, protein *excretory-secretory* (ES) L2J, dan pembuatan antibodi poliklonal; 2) Analisis protein, pada tahap ini dilakukan preparasi protein antigen dari larva dan cacing dewasa dengan teknik *sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE), *semi-dry blotting*, dan *blotting*; 3) Isolasi protein dengan preparasi gel elektroforesis; dan 4) Uji antigenesitas dan imunogenesitas protein murni hasil isolasi dengan teknik *indirect-ELISA*; 5) Memproduksi AbMo yang sangat spesifik terhadap *Toxocara canis*.

Hasil analisis BM protein cacing dewasa *T. canis* didapatkan beberapa macam pita protein, yaitu 208,4, 147,9; 120,2, 107,2, 87,1, 79,4, 70,8, 63,1, 50,1, 49,0, 45,7, 42,7, 40,7, 37,2, 34,7, 32,4, 30,2, 28,2, 24,5, 22,9, 20,0, 19,5, 18,2, dan 10,7 kDa. Pada ES L2J didapatkan protein yang sama kecuali pita protein dengan BM 208,4, 50,1, 34,7 dan 18,2 kDa tidak tampak pada ES L2J, sedangkan protein dengan BM 95,5 dan 55,0 kDa hanya tampak pada ES L2J.

Hasil identifikasi protein dengan teknik *Western blot* menggunakan antibodi poliklonal anti- L2J *T. canis* dapat dikarakterisasi beberapa protein. Beberapa pita reaksi antara serum anti-L2J *T. canis* terjadi pada protein dengan BM 208,4, 120,2, 107,2, 70,8,

63,1, 50,1 dan 37,2 kDa, protein tersebut selain menunjukkan pita reaksi dengan protein cacing dewasa *T. canis* juga menggambarkan pita reaksi silang antara serum anti-L2J *T. canis* dengan antigen cacing dewasa *T. vitulorum*. Untuk pita reaksi antara serum anti-L2J *T. canis* dengan antigen ES L2J *T. canis* terjadi pada protein dengan BM 45,7, 42,7, 37,2, 32,4, 24,5, dan 10,7 kDa. Di antara beberapa pita reaksi antara serum anti-L2J *T. canis* dengan antigen ES L2J *T. canis* tersebut pita reaksi pada protein dengan 37,2 kDa tampak lebih tegas dibandingkan dengan yang lain, hal ini menggambarkan antigenitas yang lebih tinggi dibanding dengan protein lain.

Telah berhasil diisolasi protein spesifik L2J *T. canis*, yaitu protein dengan BM 120,2, 70,8, 63,1, 45,7, 42,7, 37,2, 32,4, 24,5 dan 10,7 kDa. Di antara protein tersebut telah dilakukan pengujian imunogenesitas dan antigenesitas dengan teknik *indirect-ELISA* terhadap 3 macam protein dengan hasil berturut-turut dari tingkat tertinggi adalah p32, p120 dan p70.

Frekuensi hasil fusi pada penelitian ini tergolong cukup tinggi yakni sekitar 55,21% dari total sumuran. Namun demikian pada skrining terhadap kemampuan sel hibrid dalam menghasilkan antibodi terlihat frekuensi yang rendah yakni sekitar 34,34% dari sumuran dengan koloni sel hibrid. Pada kloning pertama diperoleh nilai OD sebesar 0,287 hingga 0,730, sedangkan pada kloning berikutnya (rekloning) nilai OD sebesar 0,330 hingga 0,994. Pada penelitian ini ditemukan kendala, yaitu klon yang semula positif menghasilkan antibodi berubah menjadi negatif. Diperoleh sembilan klon hibridoma spesifik penghasil antibodi monoklonal terhadap protein-32 *T. canis* (Tcn-1 sampai dengan Tcn-9). Antibodi monoklonal terhadap protein-32 *T. canis* yang telah berhasil diproduksi adalah terdiri dari berbagai kelas dan subkelas imunoglobulin, yaitu Ig A, Ig G1, Ig G2a, Ig G2b, Ig G3, dan Ig M.

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa: 1) Telah diketahui profil protein *T. canis*, yaitu 208,4, 147,9; 120,2, 107,2, 87,1, 79,4, 70,8, 63,1, 50,1, 49,0, 45,7, 42,7, 40,7, 37,2, 34,7, 32,4, 30,2, 28,2, 24,5, 22,9, 20,0, 19,5, 18,2, dan 10,7 kDa. Pada ES L2J didapatkan protein yang sama kecuali pita protein dengan BM 208,4, 50,1, 34,7 dan 18,2 kDa tidak tampak pada ES L2J, sedangkan protein dengan BM 95,5 dan 55,0 kDa hanya tampak pada ES L2J; 2) Telah berhasil dikarakterisasi protein spesifik *T. canis* dewasa terhadap anti-L2J *T. canis* yaitu pada protein dengan BM 208,4, 120,2, 107,2, 70,8, 63,1, 50,1 dan 37,2 kDa, dan antara protein ES L2J *T. canis* dengan serum anti-L2J *T. canis* yaitu pada protein dengan BM 45,7, 42,7, 37,2, 32,4, 24,5, dan 10,7 kDa; dan 3) Beberapa protein spesifik L2 Jaringan (L2J) *T. canis* dengan imunogenitas dan antigenitas tinggi berturut-turut adalah p32, p120 dan p70 kDa; 4) Telah diperoleh sembilan klon hibridoma spesifik penghasil antibodi monoklonal

terhadap protein-32 *T. canis* (Tcn-1 sampai dengan Tcn-9); 5) Telah diproduksi antibodi monoklonal terhadap protein-32 *T. canis* yang terdiri dari berbagai kelas dan subkelas imunoglobulin, yaitu Ig A, Ig G1, Ig G2a, Ig G2b, Ig G3, dan Ig M.

Saran yang diajukan berdasarkan hasil penelitian ini adalah: 1) Protein dengan BM 32 kDa merupakan protein spesifik *T. canis* yang dapat dikembangkan untuk bahan diagnostik toxocariasis; 2) Perlu dilanjutkan pemurnian, pelabelan dan pengujian antibodi monoklonal dengan teknik IC-ELISA, serta pembakuan teknik IC-ELISA dengan antibodi monoklonal sebagai sarana diagnosis dini, cepat dan akurat dalam mendeteksi antibodi *anti-T. canis* melalui pemeriksaan serum hewan coba dan tersangka.

(Dibiayai oleh Direktorat Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional, melalui Proyek Penelitian Hibah Bersaing XIV, Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Universitas Airlangga, Fakultas Kedokteran Hewan, Kontrak Nomor: 016/SP2H/PP/DP2M/III/2007 Tanggal 29 Maret 2007)

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR PENGESAHAN	ii
RINGKASAN DAN SUMMARY	iii
PRAKATA	vii
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Rumusan masalah	3
BAB 2 TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN TAHUN II.....	5
2.1 Tujuan penelitian	5
2.1.1 Tujuan khusus jangka pendek	5
2.1.2 Tujuan khusus jangka panjang	5
2.2 Manfaat Penelitian	5
BAB 3 TINJAUAN PUSTAKA	6
3.1 Toxocariasis	6
3.1.1 Hospes dan penyebab toxocariasis	6
3.1.2 Transmisi toxocariasis dan siklus hidup <i>Toxocara canis</i>	7
3.1.3 Aspek zoonosis toxocariasis	9
3.2 Diagnosis Toxocariasis	10
3.3 Antigen Parasit	11
3.3.1 Aspek biologi antigen parasit	11
3.3.2 Antigen cacing <i>Toxocara</i> spp	12
3.4 Respon Imun terhadap Parasit	15
3.4.1 Respons imun non-spesifik terhadap parasit	15
3.4.2 Respons imun spesifik terhadap parasit	15
3.5 Patogenesis Toxocariasis	16
3.5.1 <i>Visceral larvae migrans</i> (VLM)	16
3.5.2 <i>Ocular larvae migrans</i> (OLM)	17
3.5.3 Pembentukan jaringan granuloma dan larva dorman	18

3.6	Imunopatogenesis Toxocariasis	19
3.7	Antibodi Monoklonal	21
3.7.1	Pengertian antibodi	21
3.7.2	Hibridoma	21
3.7.3	Seleksi Hibridoma	22
BAB 4	METODE PENELITIAN	24
4.1	Isolasi Berbagai Stadium <i>Toxocara canis</i>	24
4.1.1	Isolasi cacing dewasa dan telur cacing <i>T. canis</i>	24
4.1.2	Isolasi larva kedua (L2) <i>T. canis</i>	24
4.1.3	Isolasi larva kedua jaringan (L2J) <i>T. canis</i>	24
4.2	Pembuatan Homogenat	25
4.2.1	Pembuatan homogenat cacing dewasa	25
4.2.2	Pembuatan homogenat larva <i>T. canis</i>	25
4.2.3	Pembuatan antigen ES larva kedua jaringan (L2J) <i>T. canis</i>	25
4.3	Peneraan Kadar Protein Homogenat dan Protein ES	25
4.4	Pembuatan Antibodi Poliklonal	26
4.5	Analisis Protein	26
4.5.1	<i>Sodium dodecyl polyacrilamid gel electrophoresis</i>	26
4.5.2	<i>Semi-dry blotting</i>	28
4.5.3	<i>Blotting</i>	28
4.6	Isolasi Protein <i>Preparative Gel Electrophoresis</i>	28
4.7	Uji Immunogenesitas dan Antigenesitas	29
4.8	Produksi Antibodi Monoklonal	29
4.8.1	Fusi sel dan skrining	29
4.8.2	Kloning dan rekloning	29
4.8.3	Penentuan subklas imunoglobulin	30
BAB 5	HASIL DAN PEMBAHASAN	31
5.1	Isolasi Larva Stadium Kedua (L2) <i>Toxocara canis</i>	31
5.2	Analisis Protein L2 <i>T. canis</i>	34
5.3	Karakterisasi Protein	37
5.4	Analisis Protein Hasil Elusi	39
5.5	Uji Immunogenesitas dan Antigenesitas	41

5.6 Produksi Antibodi Monoklonal	43
5.6.1 Persiapan fusi	43
5.6.2 Fusi sel dan skrining	44
5.6.3 Kloning dan rekloning	46
5.6.4 Penentuan subklas imunoglobulin	47
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN	49
6.1 Kesimpulan	49
6.2 Saran	49
DAFTAR PUSTAKA	59
LAMPIRAN	65

DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
5.1	Penghitungan BM Protein Menggunakan Persamaan Regresi antara Nilai <i>Retardation Faktor</i> (rf) dengan Log BM pada Marker	33
5.2	Hasil Pembacaan <i>Optical Density</i> dengan ELISA-reader ($\lambda=405$ nm) Antibodi Anti-L2J <i>T. canis</i> terhadap Antigen ES L2J <i>T. canis</i>	40
5.3	Tabulasi Nilai OD Berdasarkan 2 x COV Kontrol Negatif.....	40
5.4	Tabulasi Silang antara Imunisasi pada Mencit dengan Nilai OD Positif	41

DAFTAR GAMBAR

Gambar		Halaman
5.1	Cacing dewasa <i>Toxocara canis</i> , hasil bedah saluran pencernaan anjing	29
5.2	Telur cacing <i>T. canis</i> yang berhasil dimurnikan, diamati dengan bantuan mikroskop inverted pada pembesaran 40x	30
5.3	Hasil pengamatan telur cacing <i>T. canis</i> dan perkembangannya hingga mencapai L2 dengan bantuan mikroskop inverted pada pembesaran 400x	30
5.4	Hasil pengamatan L2J <i>T. canis</i> dari jaringan mencit dengan bantuan mikroskop pada pembesaran 100x	31
5.5	Hasil pengamatan L2J <i>T. canis</i> dari jaringan mencit dengan bantuan mikroskop pada pembesaran 400x	31
5.6	Hasil analisis protein berbagai stadium <i>T. canis</i> menggunakan teknik SDS-PAGE dengan pewarnaan <i>coumassi blue</i>	32
5.7	Gambar hasil identifikasi beberapa protein <i>T. canis</i> terhadap serum anti-L2J	35
5.8	Gambar Analisis SDS-PAGE hasil isolasi protein antigenik L2 <i>Toxocara canis</i>	38
5.9	Dokumentasi hasil pembacaan <i>optical density</i> dengan ELISA-reader ($\lambda=405$ nm) antibodi anti-L2J <i>T. canis</i> terhadap antigen ES L2J <i>T. canis</i>	39
5.10	Persentase OD positif dan negatif berdasarkan nilai 2x COV kontrol negatif	42

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Penghitungan BM Protein Menggunakan Persamaan Regresi antara Nilai <i>Retardation Factor</i> (rf) dengan Log BM pada Marker	58
Lampiran 2. Hasil Pembacaan ELISA-reader (Nilai <i>Optical Density</i>) dengan Panjang Gelombang 405nm	61
Lampiran 3. Analisis Statistik Hasil Pembacaan ELISA-reader (Nilai <i>Optical Density</i>) dengan Panjang Gelombang 405nm dengan Uji Anava	62
Lampiran 4. Analisis Statistik Hasil Pembacaan ELISA-reader (Nilai <i>Optical Density</i>) dengan Panjang Gelombang 405nm dengan Uji <i>Chi Square</i>	65

BAB 1 PENDAHULUAN



1.1 Latar Belakang Masalah

Pemeriksaan konvensional pada kasus toxocariasis mempunyai beberapa kelemahan, yaitu: 1) Tidak dapat dilakukan pada *parathenic host*, yaitu selain anak anjing dan anjing jantan dewasa, karena perkembangan larva stadium kedua (L2) akan berhenti dan tinggal di jaringan sebagai L2 dorman; 2) Tidak dapat mendeteksi pada infeksi dini, karena pada masa prepaten telur cacing belum ada dalam feses; 3) Sensitivitas rendah karena mengandalkan penglihatan pemeriksa dengan bantuan mikroskop (Kusnoto dkk., 2005a; Kusnoto dkk., 2005b). Toxocariasis perlu mendapat perhatian karena tergolong penyakit zoonosis dengan berbagai akibat yang ditimbulkan, yaitu *visceral larvae migrans* dan *ocular larvae migrans* bahkan larva dapat mencapai otak. Oleh karena itu perlu dikembangkan teknik diagnosis secara imunologis. Secara imunologik, antibodi anti-*Toxocara* dapat diukur dengan uji *indirect-enzym linked immunosorbent assay* (*indirect-ELISA*), namun apabila antigen yang digunakan adalah *crude protein*, maka akan memberikan sensitivitas tinggi, tetapi spesifisitasnya rendah (Safar *et al.*, 1992; Abdel-Rahman, 2000). Kelemahan lain teknik ini adalah tak dapat mendeteksi status infeksi, yaitu infeksi masih berlangsung atau sudah lewat (Kusnoto dkk., 2005b). Oleh karena itu perlu dicoba mengembangkan teknik tersebut dengan mempertimbangkan protein dengan antigenisitas maupun imunogenisitas yang tinggi dan mengisolasiinya guna memperoleh antigen yang sangat spesifik terhadap *T. canis*. Sejauh ini protein *Toxocara canis* isolat lokal dengan spesifisitas tinggi untuk diagnosis secara imunologis pada infeksi toxocariasis belum diketahui. Padahal protein tersebut penting untuk diagnosis toxocariasis.

Di Indonesia Biomolekuler *Toxocara canis* belum pernah diteliti, sehingga karakteristiknya belum diketahui. Bahan diagnostik yang ada sekarang berasal dari

negara maju seperti Eropa, Amerika dan Jepang yang memungkinkan terdapat perbedaan karakter akibat pengaruh iklim dan geografi. Oleh karena itu perlu dilakukan eksplorasi protein imunogenik spesifik *T. canis* isolat lokal.

Untuk mengatasi kendala tersebut, penelitian ini akan mencoba mengembangkan teknik diagnostik *sandwich*-ELISA menggunakan antibodi monoklonal (AbMo) yang diperoleh dari mencit (yang sebelumnya dipapar dengan protein imunogenik spesifik *T. canis*) agar didapatkan uji dengan sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi. Adapun untuk mempermudah aplikasi akan dicoba mendeksi *coproantigen* dalam feses dengan teknik *double antibody sandwich*-ELISA (DAS-ELISA) yang dibandingkan dengan pemeriksaan antibodi dalam serum darah penderita toxocariasis dengan *indirect capture*-ELISA (IC-ELISA). Pemeriksaan *coproantigen* dengan DAS-ELISA memiliki kelebihan yaitu dapat mendeteksi infeksi sedang berlangsung atau sudah lewat dan pengambilan sampel juga lebih mudah serta lebih bersahabat karena tidak melukai hewan. Pembakuan kedua teknik diagnostik ini mengacu pada sensitivitas dan spesifisitas AbMo yang dihasilkan, yang dapat diuji dengan menggunakan antigen *T. canis* yang telah berhasil dikarakterisasi. Reaksi silang antar stadium dan spesies *Toxocara* perlu dilakukan, demikian juga terhadap cacing lain yang memiliki kemiripan antigenesitas, sehingga perbedaan reaktivitasnya dapat diketahui.

Pada tahun pertama telah berhasil dilakukan analisis protein untuk mengetahui berat molekul (BM) protein cacing *Toxocara canis* yang dilakukan dengan teknik SDS-PAGE menunjukkan beberapa pita protein, yaitu 208,4, 147,9, 120,2, 107,2, 87,1, 70,8, 63,1, 55,0, 50,1, 46,8, 42,7, 40,7, 37,2, 34,7, 32,4, 30,2, 28,2, 24,5, 20,0, 19,5, 18,2, dan 10,7 kDa. Hasil identifikasi protein dengan teknik *Western blot* menggunakan antibodi poliklonal anti-L2 dorman *T. canis* dapat dikarakterisasi beberapa protein. Beberapa pita reaksi antara serum anti-L2 dorman *T. canis* terjadi pada protein dengan BM 208,4, 120,2, 107,2, 70,8, 63,1, 50,1 dan 37,2 kDa, protein tersebut selain menunjukkan pita

reaksi dengan protein cacing dewasa *T. canis* juga menggambarkan pita reaksi silang antara serum anti-L2J *T. canis* dengan antigen cacing dewasa *T. vitulorum*. Untuk pita reaksi antara serum anti-L2J *T. canis* dengan antigen ES L2J *T. canis* terjadi pada protein dengan BM 45,7, 42,7, 37,2, 32,4, 24,5, dan 10,7 kDa. Di antara beberapa pita reaksi antara serum anti-L2J *T. canis* dengan antigen ES L2J *T. canis* tersebut pita reaksi pada protein dengan 37,2 kDa tampak lebih tegas dibandingkan dengan yang lain, hal ini menggambarkan antigenitas yang lebih tinggi dibanding dengan protein lain. Pada tahap ini juga telah berhasil diisolasi protein spesifik L2 dorman *T. canis*, yaitu protein dengan BM 120,2, 70,8, 63,1, 45,7, 42,7, 37,2, 32,4, 24,5 dan 10,7 kDa. Di antara protein tersebut telah dilakukan pengujian imunogenesitas dan antigenesitas dengan teknik *indirect-ELISA* terhadap 3 macam protein dengan hasil berturut-turut dari tingkat tertinggi adalah p32, p120 dan p70.

Aplikasi AbMo dengan teknik *sandwich-ELISA* adalah mereaksikan AbMo pada fase padat dengan antigen *T. canis* dan antibodi penderita yang diuji. Selanjutnya ditambahkan konjugat anti-spesies yang kedua dilabel dengan enzim alkalin fosfatase.

Pembakuan teknik *sandwich-ELISA* menggunakan AbMo sebagai sarana diagnostik dini, cepat, dan akurat diharapkan dapat dimanfaatkan untuk menegakkan diagnosis toxocariasis. Uji ini dapat mendeteksi penyakit lebih dini dengan sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi, karena mampu mendeteksi antibodi penderita toxocariasis pada hewan tersangka maupun penderita sekalipun dalam kadar yang sangat kecil. Secara khusus deteksi *coproantigen* dengan DAS-ELISA dapat mendeteksi status infeksi dengan aplikasi yang lebih mudah.

Bertitik tolak dari permasalahan di atas maka perlu kiranya dikaji lebih mendalam mengenai protein imunogenik *T. canis* yang bersifat spesifik dengan memproduksi antibodi monoklonal anti-*T. canis* dan memanfaatkan teknik DAS-ELISA dalam upaya mendapatkan perangkat diagnostik dini, cepat dan akurat.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang penelitian ini dapat dirumuskan berbagai masalah antara lain:

- 1) Apakah cacing *T. canis* mengandung protein spesifik dengan spesifisitas dan sensitivitas tinggi?
- 2) Apakah protein cacing *T. canis* dapat digunakan sebagai imunogen pada pembuatan antibodi monoklonal?
- 3) Apakah teknik *sandwich*-ELISA (IC-ELISA & DAS-ELISA) dengan menggunakan AbMo dapat dibakukan sebagai sarana diagnosis toxocariasis melalui pemeriksaan serum darah dan *coproantigen*?

BAB 2 TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN TAHUN I DAN II

2.1 Tujuan Penelitian

2.1.1 Tujuan khusus jangka pendek

Beberapa tujuan penelitian pada tahun pertama dan kedua adalah sebagai berikut.

- 1) Untuk mengetahui profil protein berbagai stadium *Toxocara canis*.
- 2) Mengetahui karakter setiap antigen berbagai stadium *T. canis*.
- 3) Mengetahui imunogenitas dan antigenitas beberapa protein spesifik L2 dorman atau L2 Jaringan (L2J) *T. canis*.
- 4) Mendapatkan klon hibridoma spesifik yang berasal dari satu subklas tertentu.
- 5) Memproduksi AbMo yang sangat spesifik terhadap *Toxocara canis*.
- 6) Menentukan klas dan subklas imunoglobulin (Ig) dari AbMo.

2.1.2 Tujuan khusus jangka panjang

Standarisasi teknik *indirect capture-ELISA* (IC-ELISA) dengan antibodi monoklonal (AbMo) anti-*T. canis* sebagai sarana diagnosis dini, cepat, dan akurat dalam mendeteksi antibodi anti-*T. canis* melalui pemeriksaan serum darah dan peninjauan DAS-ELISA pada *coproantigen* hewan tersangka toxocariasis.

2.2 Manfaat Penelitian

Dengan dibakukannya teknik IC-ELISA dan DAS-ELISA menggunakan AbMo sebagai sarana diagnostik dini, cepat, dan akurat khususnya melalui pemeriksaan *coproantigen* hewan tersangka ini, diharapkan dapat dimanfaatkan untuk penegakan diagnosis terhadap kasus toxocariasis. Dengan demikian, uji ini mudah dilakukan dan memerlukan waktu lebih cepat karena tanpa harus mengambil darah penderita, serta dapat mendeteksi penyakit lebih dini dengan sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi, karena mampu mendeteksi antibodi maupun *coproantigen* penderita toxocariasis sekalipun dalam kadar yang sangat kecil.

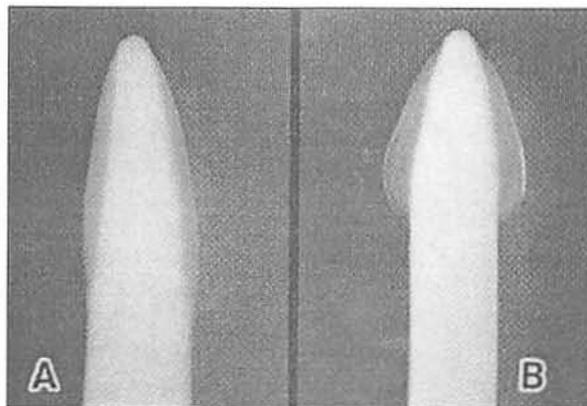
BAB 3 TINJAUAN PUSTAKA

3.1 Toxocariasis

3.1.1 Hospes dan penyebab toxocariasis

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

Panjang cacing jantan *T. canis* mencapai 10 cm, cacing betina mencapai 18 cm. Mempunyai *cervical alae* (pelebaran kutikula) besar. Tubuh bagian anterior membengkok ke ventral. Organ kelamin betina meluas ke bagian anterior dan posterior dan berakhir pada vulva. Cacing jantan mempunyai *terminal tail* (ekor), *caudal alae* dan spikula. Telur sub-globuler, berkulit tebal, berukuran 90 x 75 mikron (Soulsby, 1986; Kusumamihardja, 1993). Gambar 3.1 menunjukkan perbedaan *cervical alae* antara *T. canis* dan *T. cati*.



Gambar 3.1 Spesifikasi bagian anterior *T. canis* (a) dan *T. cati* (b). Sumber: Rai *et al.* (1996).

Hospes definitif *T. canis* adalah anak anjing dan anjing jantan dewasa juga ditemukan dalam lumen usus halus srigala, sedangkan cacing tanah, kecoa, ayam, anak kambing dan tikus dapat berperan sebagai hospes transpor (Levine, 1978).

3.1.2 Transmisi toxocariasis dan siklus hidup *Toxocara canis*

Transmisi *Toxocara* spp dapat melalui beberapa cara, kemungkinan meliputi *prenatal transmission (trans uterine)*, *lactogenic transmission (colostral)*, *soil transmission* atau *direct transmission* dan dapat juga *paratenic host transmission* bergantung umur, jenis kelamin dan jenis hospes.

Potensi tanah sebagai sumber infeksi *Toxocara* spp telah dibuktikan dengan hasil beberapa penelitian, diantaranya penelitian yang dilakukan di Santiago didapatkan sampel positif 33,3% dari sampel tanah lapangan (*squares*) dan 66,7% dari sampel tanah taman (*parks*). Angka prevalensi keseluruhan di kota tersebut adalah 13,5% dari 288 total sampel tanah (Castillo *et al.*, 2000). Hasil penelitian serupa yang dilakukan di La Plata, Argentina oleh Fonrouge *et al.* (2000), didapatkan sampel positif 13,2% dari 242 sampel tanah dari *squares* dan *parks*. Adapun di Indonesia juga telah dilakukan penelitian terhadap tanah di sekitar *playgrounds*, Rumah Potong Hewan dan peternakan sapi perah di Surabaya, didapatkan hasil 28,2% sampel positif mengandung telur *Toxocara* spp dari 188 sampel yang diamati (Kusnoto dkk., 2000).

Toxocara spp mempunyai ciri khusus pada siklus hidupnya yang setiap kali berubah sesuai dengan stadium hidupnya. Sering kali setiap stadium tersebut memerlukan hospes tertentu, dan masing-masing mempunyai sifat antigenik yang berbeda, sehingga menimbulkan respon yang berbeda pula. Siklus hidup *T. cati* berbeda dengan *T. canis* dalam hal keberadaan infeksi prenatal, terdapat lebih sedikit perkembangan pada saat cacing berada dalam saluran pencernaan dan relatif penting keberadaan hospes transpor (Levine, 1978). Parsons (1987) menyatakan, bahwa sebenarnya seluruh anak anjing dapat terinfeksi *T. canis*, dipastikan terjadi *prenatal transmission* pada hewan ini. Adapun pada kucing, *transmammary transmission* mungkin merupakan *rute mayor* dari infeksi *T. cati* pada anak kucing.

Telur *T. canis*, yang keluar bersama feses hospes definitif, berkembang menjadi larva stadium pertama (L1) dalam waktu 7 - 8 hari dan larva stadium kedua (L2) sebagai

larva infeksi dicapai dalam waktu 28 hari, tetapi tidak menetas. Siklus hidup *Toxocara* spp kompleks, bergantung umur induk semang dan rute penularan dapat melalui *prenatal transmission (trans uterine)*, *lactogenic transmission (colostral)*, *direct transmission* dan bisa *paratenic host transmission*.

Siklus hidup *T. canis* adalah sebagai berikut: 1) Pada anjing umur beberapa minggu sampai menjelang 3 bulan umumnya terjadi *tracheal migration*. Bila telur infeksi tertelan oleh anjing, telur akan menetas pada usus. Larva stadium kedua (L2) menembus dinding usus melalui pembuluh limfe sampai *glandula mesenterica* dan terbawa aliran darah portal menuju ke liver kemudian ke jantung, paru lalu alveoli, bronchioli dan akhirnya sampai ke trachea. Larva stadium ketiga (L3) terjadi di paru, trakhea atau esofagus, selanjutnya tertelan dan sampai pada lambung kembali pada hari ke 10 setelah infeksi. Larva stadium keempat (L4) ditemukan di usus halus kurang lebih 2 minggu setelah infeksi, selanjutnya menyilih menjadi L5 dan stadium dewasa dicapai antara 3-4 minggu setelah infeksi; 2) Bila telur infeksi ditelan oleh anjing jantan dari segala umur perkembangan akan berlangsung seperti di atas (pada poin 1); 3) Tipe siklus hidup lainnya yang sering terjadi ialah *somatic migration*. Tipe yang ini ditunjukkan ketika telur infeksi *T. canis* tertelan oleh anjing betina dewasa. Di sini larva tidak kembali ke usus untuk menjadi dewasa melainkan tetap tinggal di otot atau jaringan lain tanpa berkembang lebih lanjut sampai anjing betina bunting. Delapan hari setelah infeksi, L2 ditemukan dalam berbagai jaringan tubuh (misalnya: hati, paru, ginjal) dan larva ini tidak berkembang dan tinggal di dalam jaringan tersebut untuk beberapa waktu. Perkembangan larva tersebut selanjutnya tidak diketahui dengan jelas, tetapi bila anjing dewasa itu bunting larva-larva tersebut migrasi ke uterus kemudian masuk fetus, sehingga terjadi *prenatal infection*. Pada anjing bunting sebagian larva migrasi ke ambing dan keluar melalui air susu, sehingga terjadi penularan pada anak anjing melalui air susu (*colostral infection/ transmamary infection*). Larva yang keluar bersama kolostrum akan berkembang langsung menjadi cacing dewasa pada usus

halus anak anjing dalam waktu satu minggu setelah lahir. Pada *prenatal infection* setelah larva sampai pada hati fetus terjadi *moulting* menjadi L3, kemudian *moulting* lagi menjadi L4 pada minggu pertama setelah fetus lahir dan larva terdapat pada paru dan lambung fetus. Pada minggu kedua setelah lahir terjadi *moulting* menjadi L5 dan cacing dewasa dapat ditemukan pada minggu ketiga setelah lahir. Periode prepaten dari *prenatal infection* bervariasi antara 23-40 hari setelah lahir; 4) Pada waktu menyusui induk anjing suka menjilat-jilat (membersihkan anaknya). Bila kebetulan ada cacing yang belum dewasa keluar bersama tinja anak anjing dan terjilat lalu tertelan oleh induknya, maka cacing tersebut akan langsung menjadi dewasa dalam waktu 3 minggu (Levine, 1978); 5) Telur yang tertelan oleh induk semang paratensis, seperti tikus dan mencit, maka larva akan tinggal dalam otot. Bila tikus tersebut termakan oleh anjing maka larva akan langsung menjadi dewasa dalam waktu 3 minggu, tanpa migrasi lagi; 6) Dalam induk semang paratensis beberapa larva menyelesaikan migrasi trakhealnya dan kembali ke usus hanya untuk dikeluarkan bersama tinja. Bila larva ini kemudian tertelan oleh anjing maka akan menjadi dewasa dalam waktu 3 minggu tanpa migrasi lagi. Larva dalam jaringan somatik tahan hidup lebih dari satu tahun (Kusumamihardja, 1993) dan tidak dimobilisasi sekaligus dalam satu kali kebuntingan.

3.1.3 Aspek zoonosis toxocariasis

Toxocariasis bersifat zoonosis dan telah dikenal di dunia dapat menimbulkan infeksi pada manusia yang disertai manifestasi klinik *visceral* atau *ocular* (Hubner *et al.*, 2001), bahkan data terbaru menunjukkan, bahwa terjadi infeksi pada anak-anak sebanyak 10.000 kasus baru setiap tahun. Pendidikan tentang siklus hidup parasit, hygiene, dan penjadwalan pemberian anthelmintik diperlukan karena adanya resiko zoonotik dari toxocariasis (Overgaauw, 1997^a).

Manusia dapat tertular toxocariasis karena termakannya telur infeksius yang terdapat dalam feses anak anjing, anak kucing, kucing jantan dewasa, anak sapi dan tanah

terkontaminasi atau larva yang berada pada jaringan maupun air susu (Ito *et al.*, 1986; Alonso *et al.*, 2000; Radman *et al.*, 2000). 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 imunologik (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 berdasarkan gejala klinik (Uga *et al.*, 1990). 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).

Toxocara spp tampaknya memainkan peran yang lebih penting daripada kesan secara umum. Kontak langsung dengan hewan tidak dianggap berpotensi resiko, karena pembentukan embrio dari telur *Toxocara* yang dikeluarkan membutuhkan waktu minimum 2 minggu. Anak-anak sering mendapatkan simtoma klinis karena kontak erat dengan tanah terkontaminasi di halaman dan *sandpits*, higiene yang kurang dan karena makanan yang kotor (Overgaauw, 1997^b).

3.2 Diagnosis Toxocariasis

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

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

3.3 Antigen Parasit

3.3.1 Aspek biologi 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.*, 2003). 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 (Tizard, 1982; Manus 1986). Respon imun juga dipengaruhi oleh tingkat solubilitas protein antigen. Antibodi hanya akan mengikat pada bagian khusus makromolekul, yang kemudian disebut sebagai penentu antigenik

(*epitope*). Pada satu makromolekul mungkin terdapat sejumlah epitop yang masing-masing akan berikatan dengan antibodi yang sesuai (Abbas *et al.*, 2003).

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 tubuhnya; 4) parasit yang hidup secara utuh; 5) cairan tubuh nematoda; dan 6) cairan kista larva cacing pita. Adapun berdasarkan stadium dan siklus hidup parasit antara lain terdiri dari: 1) spesifikasi genus, spesies, strain dan stadium hidup; dan 2) parasit yang mengalami perubahan bentuk (Tizard, 1982; Page *et al.*, 1991; Warren, 1993; el-Massry, 1999).

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 (Anders, 1982). Keistimewaan antigen yang berasal dari parasit adalah anti-antigen terhadap hospes maupun parasit itu sendiri. Sebagian antigen dihasilkan parasit dapat memicu respon imun hospes (*antigen host protective*), tetapi sebagian lagi justru untuk pertahanan parasit tersebut terhadap pengenalan oleh hospes (*antigen parasite protective*).

3.3.2 Antigen cacing *Toxocara* spp

Cacing *T. canis* yang selama hidupnya mengalami beberapa generasi memiliki perangkat antigen yang berbeda-beda, hal ini dimanfaatkan agar terhindar dari sistem imun hospes. Adanya perbedaan struktur morfologi pada berbagai generasi tersebut menyebabkan perbedaan imunogenisitas dalam memicu terbentuknya antibodi (Warren,

1993). Mengingat siklus hidup yang kompleks dari *Toxocara* spp, maka pengamatan terhadap protein antigen cacing tersebut dapat dilakukan terhadap telur, larva pada berbagai stadium (L1, L2, L3, L4, L5), dan cacing dewasa. Pada telur cacing, protein antigenik dapat diperoleh pada kulit telur (*egg shell*), membrana vitelina (*vitelline membrane*) dan *granular layer* (Abdel-Rahman *et al.*, 2000). Adapun pada stadium larva dan dewasa yang paling sering digunakan adalah E-S *antigen*, disamping itu juga ada beberapa sumber antigen yang dipakai, misalnya: antigen somatik (el-Massry, 1999), *surface antigen* (Bowman *et al.*, 1987; Kennedy *et al.*, 1987), ekstrak larva (Starke *et al.*, 1996), dan ekstrak cacing dewasa (Safar *et al.*, 1992; Abdel-Rahman and Megeed, 2000).

Abdel-Rahman *et al.* (2000), telah melakukan pengamatan terhadap telur *T. vitulorum* dengan teknik *immunoblotting* didapatkan protein dengan komponen 240 kDa dan 206 kDa yang dapat dikenali oleh antibodi anti-cacing dewasa, namun spesifisitasnya rendah karena dapat dikenali pula oleh antibodi anti-cacing dewasa *Fasciola gigantica* dan *Moniezia expansa*. Trisunuwati (1997) melakukan analisis protein pada berbagai stadium larva *T. vitulorum* memperoleh gambaran, bahwa setiap stadium menunjukkan pita protein dengan berat molekul yang berbeda. Pada L1 diperoleh protein dengan BM 56 kDa dan 42 kDa. Larva stadium kedua (L2) selain menunjukkan protein dengan BM seperti pada L1, juga ditemukan protein 97 kDa, 34 kDa, dan 32 kDa. Protein L3 hampir sama dengan L2 tetapi juga didapatkan protein dengan BM 66 kDa. Pada *T. vitulorum* dewasa dapat ditemukan protein dengan BM 97 kDa dan 66 kDa, yang sama dengan protein pada *A. lumbricoides* dewasa. Abdel-Rahman and Megeed (2000) juga mendapatkan reaksi silang dari ekstrak cacing utuh (*whole worm extract*) dengan uji ELISA, yaitu antara antigen *T. vitulorum*, *F. gigantica* dan *M. expansa* dewasa. Berdasarkan teknik *immunoblotting* dapat diketahui, bahwa antigen *F. gigantica* dikenali oleh antibodi *T. vitulorum* pada BM 109 kDa, bila komponen ini ditambahkan satu dengan yang lain pada 52 kDa akan dideteksi oleh antibodi *M. expansa* dengan ekstrak yang sama. Lebih jauh diketahui, bahwa terjadi reaksi silang antara antigen *T. vitulorum*

dengan *F. gigantica* pada 133 kDa dan dengan *M. expansa* pada 143 kDa. Lebih lanjut dinyatakan oleh Abdel-Rahman (2000), bahwa antigen spesifik spesies *T. vitulorum* dewasa hanya dua polipeptida, yaitu pada BM 92 kDa dan 87 kDa.

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

Reaksi silang yang terjadi pada penggunaan antigen ekstrak *crude protein* membuktikan bahwa pada uji imunodiagnostik membutuhkan bahan uji yang lebih spesifik. Purifikasi terhadap protein cacing dewasa *T. vitulorum* menghasilkan fraksi protein yang dapat meningkatkan spesifisitas (*specific activity*) dibanding dengan *crude extract* (Abdel-Rahman, 2000). Pengamatan terhadap fraksi ekstrak protein cacing dewasa *T. canis*, *A. vitulorum* dan *A. lumbricoides*, mendapatkan hasil yang bervariasi, yaitu pada berat molekul antara 6-70 kDa. Dengan teknik *double gel diffusion*, *crude extract* dari cacing dewasa *T. canis* menunjukkan reaksi silang dengan antibodi terhadap kedua spesies *Ascaris* tersebut, tetapi reaksi silang tidak terjadi bila menggunakan *partially purified antigen* (Safar *et al.*, 1992).

Berdasarkan pemeriksaan antibodi terhadap larva *T. vitulorum* dengan teknik *Western blot*, terjadi reaksi antara antibodi yang dibuat dari homogenat L3 dengan

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

3.4 Respon Imun Terhadap Parasit

3.4.1 Respon imun non-spesifik terhadap parasit

Respon imun alami biasanya tidak mampu mengeliminasi sebagian besar parasit. Parasit (protozoa dan cacing) yang masuk aliran darah atau jaringan sering mampu bertahan dan melakukan replikasi karena parasit tersebut dapat beradaptasi terhadap sistem imun alami dari hospes. Pada umumnya, parasit resisten dari lisis oleh komplemen. Makrofag dapat memfagosit protozoa, tetapi tegumen dari parasit cacing membuatnya resisten terhadap mekanisme sitosidal dari netrofil dan makrofag (Abbas *et al.*, 2003; Ozeretskovskaia, 2000).

3.4.2 Respon imun spesifik terhadap parasit

Respon 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. Respon tersebut dilengkapi dengan kecenderungan dari cacing untuk menstimulasi subset $Th_2CD_4^+$ dari sel Th, yang mensekresi IL-4 dan IL-5. Interleukin-4 (IL-4) menstimulasi produksi Ig E, dan IL-5 menstimulasi perkembangan

dan aktivasi eosinofil. Eosinofil kemungkinan lebih efektif untuk mematikan cacing daripada leukosit lain, karena protein granula eosinofil mungkin lebih toksik dibanding enzim proteolitik dan oksigen reaktif dari netrofil maupun makrofag. Respon imun spesifik terhadap parasit juga menambah jejas jaringan. Beberapa parasit dan produknya menginduksi respon granulomatous yang diikuti dengan fibrosis (*fibrosis concomitant*) (Roitt *et al.*, 1998; Abbas *et al.*, 2003).

3.5 Patogenesis Toxocariasis

3.5.1 Visceral larva migrans (VLM)

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

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

Infeksi cacing dengan migrasi larva melalui jaringan merupakan salah satu predisposisi penyebab *pyogenic liver abcess*, khususnya di negara tropis yang umumnya banyak terdapat penyakit parasitik ini (Rayes, 2001). Aktivasi sel Th₂ dan penurunan regulasi sel Th₁ yang diinduksi oleh cacing dapat mengurangi aktivitas fagositosis terhadap mikrobial, seperti reaksi *granulomatous* di sekeliling larva menyebabkan bakteri terperangkap dalam liver (Moreira-Silva and Pereira, 2000). Schulze *et al.* (2000) melakukan pengamatan post mortem terhadap anjing yang menderita *atresia billiary extra hepatic* ternyata ditemukan *T. canis* yang menginvasi sistem *billiary* via anastomosis antara *gall bladder* dan duodenum. Hal ini menyebabkan *billiary* dan *hepatic toxocariasis*.

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

3.5.2 Ocular larva migrans (OLM)

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

Park *et al.* (2000) melaporkan adanya 5 kasus *ocular toxocariasis* pada orang-orang dewasa di Korea. Pada pemeriksaan funduskopik, 4 kasus dinyatakan mengalami *retinal detachment* bersama dengan eksudat. Atopi ini memberi kesan ada hubungannya dengan level tinggi dari antibodi Ig E. Bilamana lesi *uniocular inflammatory* ditemui pada retina periferal tanpa penyakit sistemik, maka perlu dicermati adanya *ocular toxocariasis*. Yoshida *et al.* (1999) menyatakan, adanya perbedaan profil klinik dari *ocular toxocariasis* yang terjadi di Jepang. Berdasarkan lokasi lesi, dapat terjadi di posterior fundus, perifer fundus, dan keduanya, juga dapat terjadi *papillary oedema (redness)*, lesi chorioretinal dan *traction retinal detachment*.

3.5.3 Pembentukan jaringan granuloma dan larva dorman

Ketidakberhasilan hospes untuk mengeliminasi larva *Toxocara spp* secara tuntas, serta gangguan patologi yang terjadi akibat respon imun merupakan fenomena imunopatobiologik. Dilaporkan bahwa kegagalan tersebut menimbulkan rangsangan terbentuknya jaringan ikat kolagen dan fibronektin yang akan menyelubungi larva dorman berupa jaringan ikat granuloma (Warren, 1993). Kegagalan tersebut akan berakibat terhadap resistensi antibodi hospes, misalnya robeknya hidatida akan menyebabkan pelepasan sebagian antigen yang dapat memicu timbulnya shock anafilaktik akut (Roitt *et al.*, 1998). Penderita toxocariasis ternyata juga menampakkan gejala urtikaria dan prurigo (Humbert *et al.*, 2000), hal ini didukung oleh Glickman *et al.* (1981) yang menyatakan bahwa, pada ascariasis terjadi reaksi hipersensitivitas cepat tipe I, dengan gejala urtikaria dan angioderma.

Infeksi larva *Toxocara spp* pada sapi betina dewasa juga memberikan gambaran respon imun seluler kronis, misalnya pembentukan jaringan granuloma di sekitar lokasi larva (Roberts, 1992). Hipersensitivitas tipe lambat kemungkinan juga terjadi pada infeksi bentuk larva, yaitu pada 2-3 minggu sebelum hospes melahirkan. Fenomena ini besar kemungkinan berkaitan dengan keberadaan hormon laktogenik yang akan menurunkan

respon imun secara tidak langsung dengan kompetisi penggunaan kalsium (Ca) sebagai bahan penyusun air susu, hal ini memungkinkan L2 aktif kembali menjadi L3. Tidak semua L2 yang berada di jaringan paru, ginjal, dan hati akan terbebas keluar pada saat kelahiran yang sama, sebagian dapat bertahan hingga kelahiran berikutnya (Roberts, 1993). Terbentuknya sel fibroblas dari sel limfosit ikut berperan dalam pembentukan kapsul dan jaringan granuloma yang mengelilingi larva. Apabila kapsulasi tersebut terjadi pada waktu yang lama dapat terjadi pengapuran (Soulsby, 1989).

3.6 Imunopatogenesis 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 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.*, 2003). Penyuntikan IL-5 pada tikus yang dilakukan oleh Amerasinghe *et al.* (1992), berakibat terjadi peningkatan jumlah sel eosinofil dalam darah dan jaringan. Jika IL-5 rendah akan menyebabkan terjadinya granuloma dan fibrosis hati. Interleukin (IL)-4 dan IL-5, yang dihasilkan oleh $Th_2CD_4^+$, berperan dalam kontrol produksi Ig E dan Ig G₁. Sedangkan $Th_1CD_8^+$ menghasilkan interferon gamma (IFN γ) yang menghambat reaksi hipersensitivitas dan memacu produksi Ig G₂. Menurut Rajapakse (1992), Ig G₂ lebih berperan dalam infeksi *T. vitulorum* dari pada imunoglobulin yang lain.

Pada peruntutan respon imun terhadap patogenitas larva, ditemukan puncak kadar antibodi sapi dewasa pada 7 hari pasca infeksi. Puncak kedua terjadi pada saat 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).

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 (Trisunuwati, 1997). Jumlah sel eosinofil dan makrofag sangat bergantung kepada keberadaan dan aktivitas sel limfosit T. Titer Ig G spesifik yang tinggi ada hubungannya dengan manifestasi klinis dari toxocariasis. Infeksi larva juga dapat menstimulasi eosinofil (Kincekova, 1999).

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

Infeksi pada anak sapi dapat terjadi terutama disebabkan karena belum memiliki aktivitas sistem imun sendiri. 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 respon yang terjadi pada infeksi buatan dengan beberapa penyebab penyakit. Namun belum diketahui secara pasti apakah imunoglobulin tersebut berasal dari induk atau respon fetus, karena timus dan limfo noduli sudah ditemukan pada fetus sapi 45 hari setelah konsepsi.

3.7 Antibodi Monoklonal

3.7.1 Pengertian Antibodi

Bila darah dibiarkan membeku akan meninggalkan serum yang mengandung berbagai bahan larut tanpa sel. Bahan tersebut adalah molekul antibodi yang digolongkan dalam protein yang disebut globulin dan sekarang dikenal dengan imunoglobulin (Ig). Dua ciri yang penting adalah spesifisitas dan aktivitas biologiknya (Baratawidjaja, 2000). Secara umum antibodi adalah protein serum terlarut yang dihasilkan sebagai akibat keberadaan imunogen, yang beredar di seluruh jaringan dan sirkulasi darah. Antibodi berupa Ig yang mempunyai struktur *gamma globuline* (γ -*globuline*) dalam serum, karena berbentuk sferis atau globuli (Roitt *et al.*, 1998).

Antibodi monoklonal adalah antibodi yang spesifik terhadap satu macam epitop. Dalam pembuatan antibodi monoklonal dapat dilakukan dengan cara *in vivo* dan *in vitro*. Secara *in vitro* antibodi monoklonal diproduksi dengan cara hibridisasi sel *myeloma* dan sel limfa kemudian dibiakkan pada mikropate 96 well dan diinkubasikan pada inkubator 37°C yang mengandung CO₂ 5%, sedangkan secara *in vivo* setelah hibridisasi

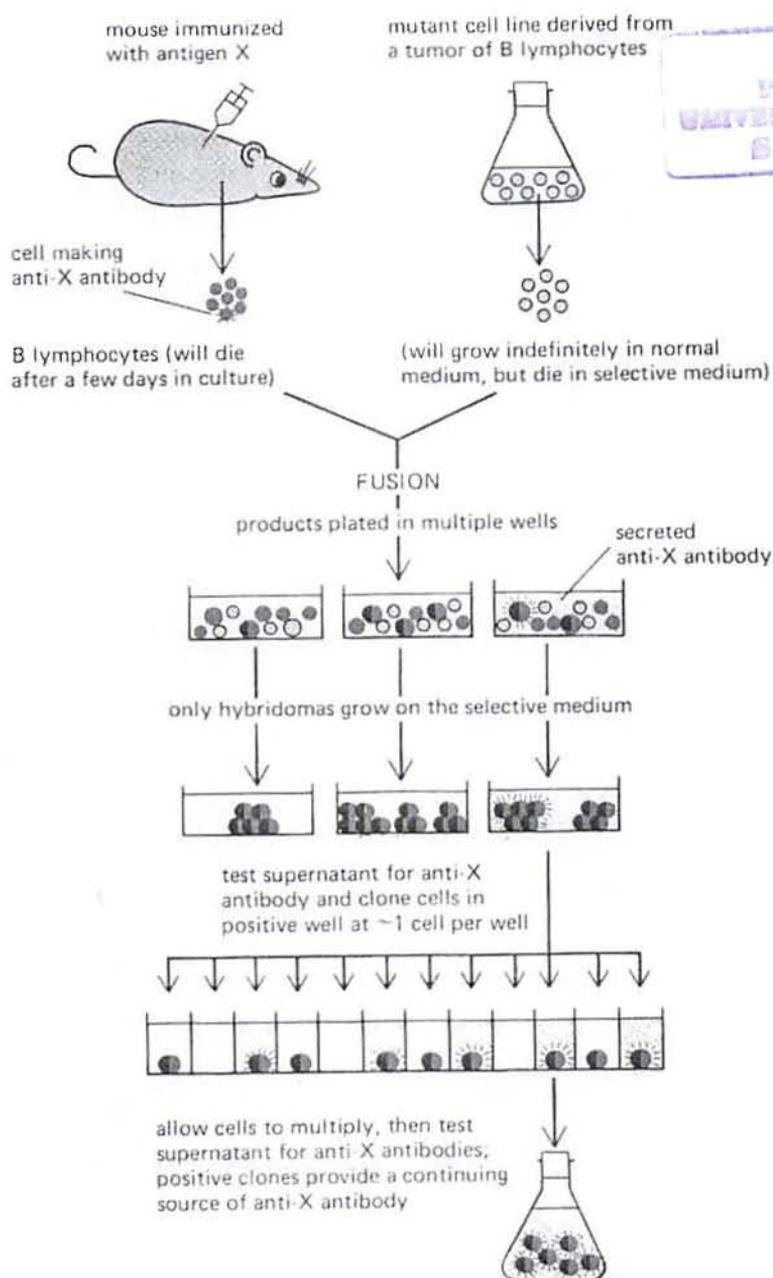
diinokulasikan pada ruang *peritoneal* mencit, kemudian cairan ascites diisolasi dan dimurnikan sebagai antibodi monoklonal (Rantam, 2003).

3.7.2 Hibridoma

Hibridoma adalah hasil turunan limfosit B dan sel mieloma yang mampu menghasilkan antibodi monoklonal. Limfosit B normal memiliki enzim hipoksantin guanin fosforibosil transferase (HGPRT+) dan timidin kinase (TK+), serta mampu hidup dalam kultur selama kurang lebih sepuluh hari; sedangkan sel mieloma defek terhadap kedua enzim tersebut (HGPRT- dan TK-) dan mempunyai sifat immortal (dapat dibiakkan terus-menerus). Hibridoma memiliki sifat dari kedua induk, yakni mempunyai enzim HGPRT dan TK, serta bersifat immortal (Roitt *et al.*, 1998; Abbas *et al.*, 2000). Skema pembuatan hibridoma dapat dilihat pada Gambar 3.4.

3.7.3 Seleksi Hibridoma

Untuk menentukan keberhasilan fusi antara limfosit B dengan sel mieloma digunakan medium selektif HAT (hipoksantin, aminopterin, timidin). Adanya aminopterin akan menghambat sintesis nukleotida dari fosforibosil pirofosfat melalui hambatan terhadap tetrahidrofolat pada jalur *de novo*, sehingga sel yang defek terhadap enzim HGPRT dan TK akan mati dalam medium selektif. Sel mieloma (HGPRT- dan TK-) akan mati dalam waktu 24 jam karena tidak mampu mengubah timidin menjadi timin dan hipoksantin menjadi guanin melalui jalur pintas. Limfosit B (HGPRT+, TK+) akan tetap hidup karena dapat menggunakan timidin dan hipoksantin untuk sintesis timin dan guanin dalam jalur pintas, namun jangka waktu hidup limfosit B hanya sekitar 7-10 hari. Karena hibridoma memiliki sifat dari kedua induknya (HGPRT+, TK+, immortal), maka hibridoma akan tetap hidup dalam medium selektif dan dibiakkan terus-menerus (Artama, 1996; Roitt *et al.*, 1998).



Gambar 3.4 Skema produksi antibodi monoklonal. Sumber: Alberts *et al.* (1989) *Molecular Biology of The Cell* 2nd Ed. Garland Pub. Inc. New York. p 179

BAB 4 METODE PENELITIAN

Metode penelitian tahun I adalah meliputi isolasi berbagai stadium *Toxocara canis* (L1, L2 aktif, L2 dorman, dan cacing dewasa), analisis protein, isolasi dan identifikasi protein spesifik, uji imunogenesitas dan antigenesitas protein murni.

4.1 Isolasi Berbagai Stadium Cacing *Toxocara canis*

4.1.1 Isolasi cacing dewasa dan telur cacing *T. canis*

Cacing dewasa *Toxocara canis*, diisolasi dari anjing yang diperoleh dari rumah potong anjing di Surabaya. Cacing dewasa yang diperoleh dicuci dengan *phosphat buffer saline* (PBS) dan diidentifikasi kemudian diinkubasikan dalam medium yang sama di dalam inkubator pada 37°C selama 3-4 hari untuk memperoleh telur cacing. Telur diambil tiap hari dengan menggantikan PBS dan dibersihkan dari jaringan dengan teknik preparasi gradien (DrenchRite, 1996). Setelah 3-4 hari inkubasi cacing dewasa disimpan pada suhu -30°C hingga diproses untuk pembuatan homogenat (*whole extract*).

4.1.2 Isolasi larva kedua (L2) *T. canis*

Telur cacing yang diperoleh dari inkubasi cacing *T. canis* dewasa diidentifikasi, kemudian dipupuk dalam media PBS pada suhu kamar selama 28 hari untuk memperoleh larva kedua (L2) (Koga *et al.*, 1992).

4.1.3 Isolasi larva kedua jaringan (L2J) *T. canis*

Larva stadium kedua dari jaringan hospes (L2J) *T. canis* diperoleh dengan jalan menginfeksi beberapa ekor mencit dengan telur infeksi (mengandung L2) dengan dosis 30 butir/gram BB secara per oral. Setelah 4 hari beberapa mencit tersebut dikorbankan untuk diambil organ visceralnya (hati, jantung, ginjal dan paru) dan jaringan somatiknya, kemudian dilakukan preparasi untuk memperoleh L2J.

4.2 Pembuatan Homogenat (*Whole Extract*)

4.2.1 Pembuatan homogenat cacing dewasa

Hasil isolasi berupa cacing *T. canis* sebagian dibedah untuk memisahkan jaringan somatik, intestinum dan jaringan lain. Cacing utuh (*T. canis* dan *T. vitulorum*), jaringan somatik dan intestinum dihancurkan dengan mortir secara manual, kemudian dilakukan sonikasi 3x60 detik dengan interval istirahat 60 detik pada frekuensi 35-40 kHz serta dipusingkan pada 5.000 rpm selama 5 menit. Supernatan *worm extract* (*T. canis* dan *T. vitulorum*), somatik dan intestin diambil kemudian disimpan pada suhu -30°C, selanjutnya digunakan sebagai bahan antigen untuk analisis protein maupun untuk karakterisasi protein.

4.2.2 Pembuatan homogenat larva *T. canis*

Hasil isolasi berupa L2 dan L2J *T. canis* kemudian dihancurkan dengan sonikator 3x60 detik dengan interval istirahat 60 detik pada frekuensi 35-40 kHz, kemudian dipusingkan pada 5.000 rpm selama 5 menit. Supernatan diambil dan disimpan pada suhu -30°C, selanjutnya digunakan sebagai bahan antigen untuk imunisasi dan analisis protein dan untuk karakterisasi protein.

4.2.3 Pembuatan antigen ES larva kedua jaringan (L2J) *T. canis*

Pembuatan antigen *excretory-secretory* (ES) dilakukan dengan menginkubasikan L2J *T. canis* dalam RPMI pada suhu inkubator 37°C selama 4 jam. Larva kedua jaringan (L2J) kemudian dipisahkan dari medium dengan jalan RPMI disaring dengan alat saring ukuran T200 ($\pm 25 \mu\text{m}$). Filtrat diambil dan disimpan pada suhu -30°C, selanjutnya digunakan sebagai bahan antigen untuk analisis protein, karakterisasi protein dan ELISA.

4.3 Peneraan Kadar Protein Homogenat dan Protein ES

Kadar protein homogenat L2, L2J, cacing dewasa dan ES L2J *T. canis* ditera dengan menggunakan spektrofotometer.

4.4 Pembuatan antibodi poliklonal

Antibodi poliklonal dibuat dengan jalan menginjeksikan homogenat L2J *T. canis* pada kelinci ras Angora jantan sebanyak tiga ekor. Imunisasi awal diberikan sebanyak 1000 µg/ml protein dengan penambahan *complete Freund's adjuvant* sama banyak. *Booster* dilakukan tiga kali, selang waktu 2 minggu dengan dosis 1000 µg/ml protein dengan penambahan *incomplete Freund's adjuvant* sama banyak. Dua minggu setelah *booster* terakhir darah kelinci diambil masing-masing sebanyak 5-10 ml, kemudian disentrifugasi pada 2000 rpm selama 5 menit untuk mendapatkan serumnya. Pengujian terhadap antibodi yang terbentuk dilakukan dengan teknik ELISA. Pembuatan antibodi poliklonal digunakan untuk *immunoblotting*, direaksikan dengan protein dari L2J dan jaringan somatik, intestin maupun *whole worm extract* cacing dewasa *T. canis* dan cacing dewasa *T. vitulorum*.

4.5 Analisis protein

Berbagai homogenat *whole worm extract* (*T. canis* dan *T. vitulorum*), jaringan somatik, intestin, maupun ES L2J *T. canis*) yang telah disiapkan kemudian dilisiskan dengan *buffer* dan dilakukan SDS-PAGE. Protein kemudian ditransfer pada kertas nitroselulose dan selanjutnya dilakukan *blotting* (Rantam, 1997).

4.5.1 Sodium dodecyl polyacrylamid gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Analisis protein dilakukan dengan teknik *sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) dengan komposisi *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 µl Temed dan 30 µl 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 µl TEMED dan 20 µl APS 10%).

Setelah larutan gel pemisah 15% 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 akuades).

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

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

4.5.2 *Semi-dry blotting*

Protein dari gel kemudian ditransfer ke membran nitroselulosa (PVDF) dengan cara memotong kertas Whatman dan PVDF 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 PVDF di inkubasikan pada anoda bufer II selama 5 menit kemudian disusun 6 *sheets* kertas absorben dari bufer I, 3 *sheets* dari bufer II, PVDF, 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, PVDF dicuci dengan aquadest selama 10 menit dan larutan TBS selama 10 menit yang selanjutnya dilakukan *blotting*.

4.5.3 *Blotting*

Membran PVDF *blot* diblok dengan 10 % BSA kemudian dicuci dengan larutan TBS dua kali. Direaksikan dengan antibodi poliklonal. PVDF diinkubasi pada suhu ruang, dicuci dengan larutan TBS tiga kali, kemudian ditambahkan konjugat *anti-rabbit* yang dilabel alkalin fosfatase dan substrat 4-NPP dan diwarnai dengan teknik pewarnaan *Western blue*. Akhirnya dikeringkan di udara pada suhu ruang. Dari hasil ini kemudian ditentukan protein spesifik dan seterusnya dilakukan isolasi protein (Rantam, 1997).

4.6 *Isolasi Protein dengan Preparative Gel Electrophoresis*

Gel silinder dimasukkan melalui sistem selang dan protein eluinsi di-*transport* sampai bawah membran dialisa. Selanjutnya sampel dicampur dengan *Laemmli bufer*. Untuk gel pemisah protein digunakan konsentrasi 17% acrylamid kemudian dibiarkan polimerisasi pada suhu ruang. Setelah itu ditambahkan acrylamid 4 %, kemudian 750 μl sampel dimasukkan. Arus listrik yang dipakai 99,9 Volt, 50 mA dan 12 Watt dan selanjutnya protein ditampung pada 125 tabung 4 ml dan jika sudah bereaksi sampai

bawah, maka koleksi protein dihentikan. Selanjutnya protein ditaruh pada suhu 4°C dan dilakukan analisis protein lagi secara biokimiawi (Rantam, 1997).

4.7 Uji Imunogenesitas dan Antigenesitas

Sebanyak 24 ekor mencit Balb/C jantan umur 6 minggu dibagi secara acak menjadi 4 perlakuan. P0 (plasebo), diinjeksi ajuvan vaksin; P1, diinjeksi dengan protein 120 kDa (p120); P2, diinjeksi dengan protein 70 kDa (p70); dan P3, diinjeksi dengan protein 32 kDa (p32) hasil isolasi dari ES-L2J *T. canis*. Injeksi dilakukan secara *sub cutan* sebanyak 1 kali menggunakan *complete Freund adjuvant* (CFA) dan 1 kali dengan *incomplete Freund adjuvant* (IFA) dengan interval waktu 2 minggu. Pada minggu ke-2 pasca imunisasi terakhir, dilakukan pengambilan darah untuk pemeriksaan antibodi pada uji imunogenisitas dan antigenesitas dengan uji *indirect-ELISA*.

4.8 Produksi Antibodi Monoklonal

4.8.1 Fusi sel dan skrining

Fusi sel antara sel limfosit asal limpa dengan sel mieloma dilakukan dengan bantuan polietilen glikol (PEG-6000) dengan konsentrasi 45%. Sel hasil fusi kemudian dibiakkan dalam medium selektif HAT dalam mikrolat-96 sumuran khusus untuk kultur sel. Pada hari ke-11, hibridoma yang terbentuk sudah mulai tampak membentuk koloni dan bila koloni sudah melebihi 30% dari sumuran mikrolat dapat segera dilakukan skrining. Skrining terhadap hibridoma dilakukan dengan menggunakan uji *indirect-ELISA*. Klon-klon hibridoma yang positif selanjutnya dipropagasi dalam plat 24 sumuran untuk memperbanyak populasi hibridoma.

4.8.2 Kloning dan rekloning

Proses selanjutnya adalah melakukan kloning dengan teknik *dilution limiting*. Kloning dilakukan sebanyak 3 kali, sehingga diperoleh klon-klon hibridoma yang spesifik mensekresi antibodi monoklonal seperti yang dikehendaki. Proses kloning sangat

diandalkan untuk memperoleh klon-klon spesifik, khususnya yang memiliki afinitas tinggi terhadap epitop protein dari berbagai stadium *T. canis* isolat lokal.

4.8.3 Penentuan subklas imunoglobulin

Penentuan klas dan subklas terhadap antibodi monoklonal yang terbentuk dilakukan dengan teknik *antibody capture-ELISA* dengan menggunakan *subclass typing kit* produksi Bio-rad (Harlow dan Lane, 1999).

4.8.4 Pemurnian imunoglobulin

Pemurnian antibodi monoklonal dilakukan dengan teknik *column chromatography* dengan menggunakan protein A, yang dipreparasi dalam protein A-Ultrogel column (25 ml) (Harlow dan Lane, 1999).

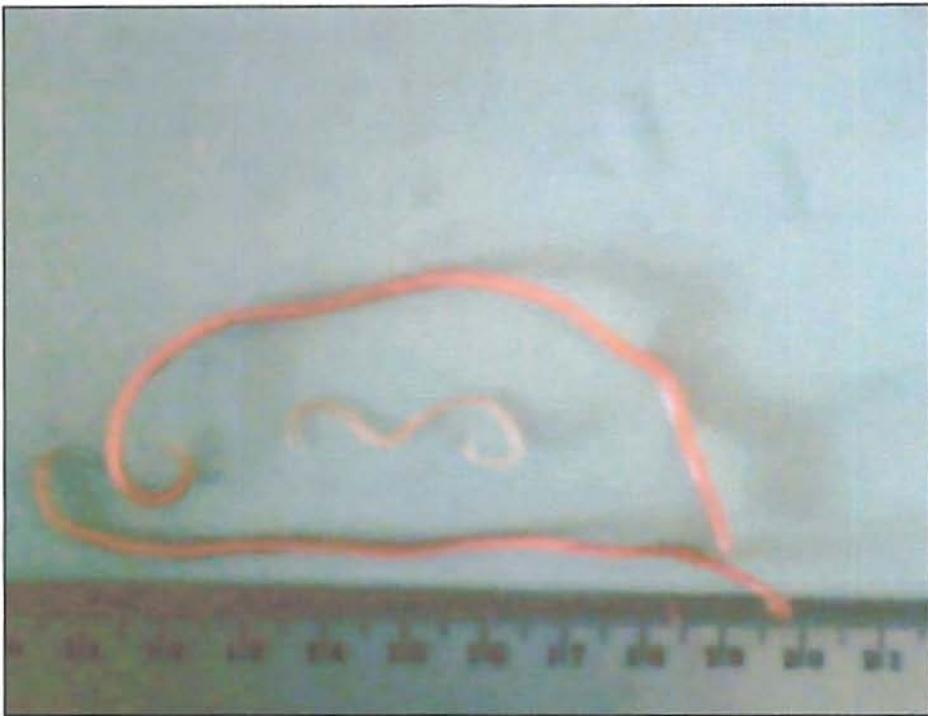
4.8.5 Pelabelan antibodi monoklonal

Pemberian label enzim alkalin fosfatase pada antibodi monoklonal (dipilih yang mempunyai reaktivitas lebih tinggi terhadap salah satu ujung antigen determinan protein imunogenik berbagai stadium *T. canis*), dilakukan dengan teknik prosedural 1 tahap dengan glutaraldehida (Harlow dan Lane, 1999).

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Isolasi Larva Stadium Kedua (L2) *Toxocara canis*

Untuk memperoleh larva stadium kedua (L2) *Toxocara canis* pada penelitian ini dilakukan isolasi telur cacing dari inkubasi cacing dewasa dari anjing penderita toxocariasis yang dipotong di tempat pemotongan anjing di Surabaya. Dokumentasi cacing dewasa *T. canis* dapat dilihat pada Gambar 5.1.



Gambar 5.1 Cacing dewasa *Toxocara canis*, hasil bedah saluran pencernaan anjing.

Telur cacing yang diperoleh dimurnikan dari jaringan dan kotoran lain dengan metode preparasi gradien (Gambar 5.2). Dokumentasi perkembangan telur hingga mencapai L2 disajikan pada Gambar 5.3. Perkembangan telur cacing *Toxocara canis* hingga larva stadium pertama (L1) dicapai pada hari ke-7 hingga 8, sedangkan L2 dicapai pada hari ke-28, hasil pengamatan ini sesuai dengan pendapat Levine (1978); Soulsby (1986); dan Kusumamihardja (1993). Berdasarkan hasil pengamatan, dapat dinyatakan bahwa telur cacing yang dapat berkembang hingga mencapai L2 adalah hampir 100%.

HAZARDOUS WASTE

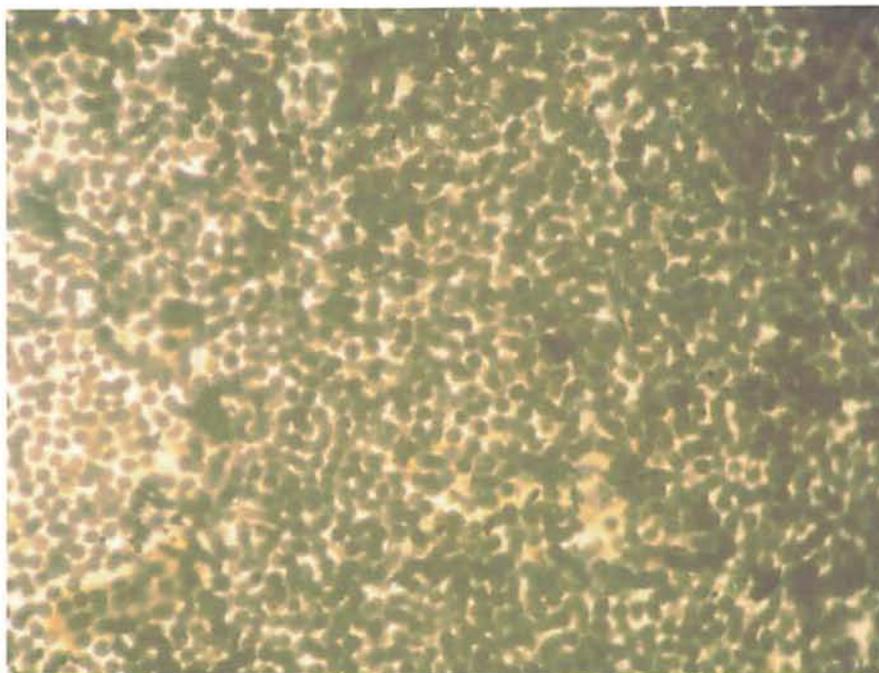
3. *Industrial Waste* (2) *Waste*

(a) In the industrial sector, hazardous waste is defined as any waste which is dangerous to the health of humans, animals, plants or the environment, or which is otherwise harmful to the environment. It is defined as any waste which is dangerous to the health of humans, animals, plants or the environment, or which is otherwise harmful to the environment. It is defined as any waste which is dangerous to the health of humans, animals, plants or the environment, or which is otherwise harmful to the environment.

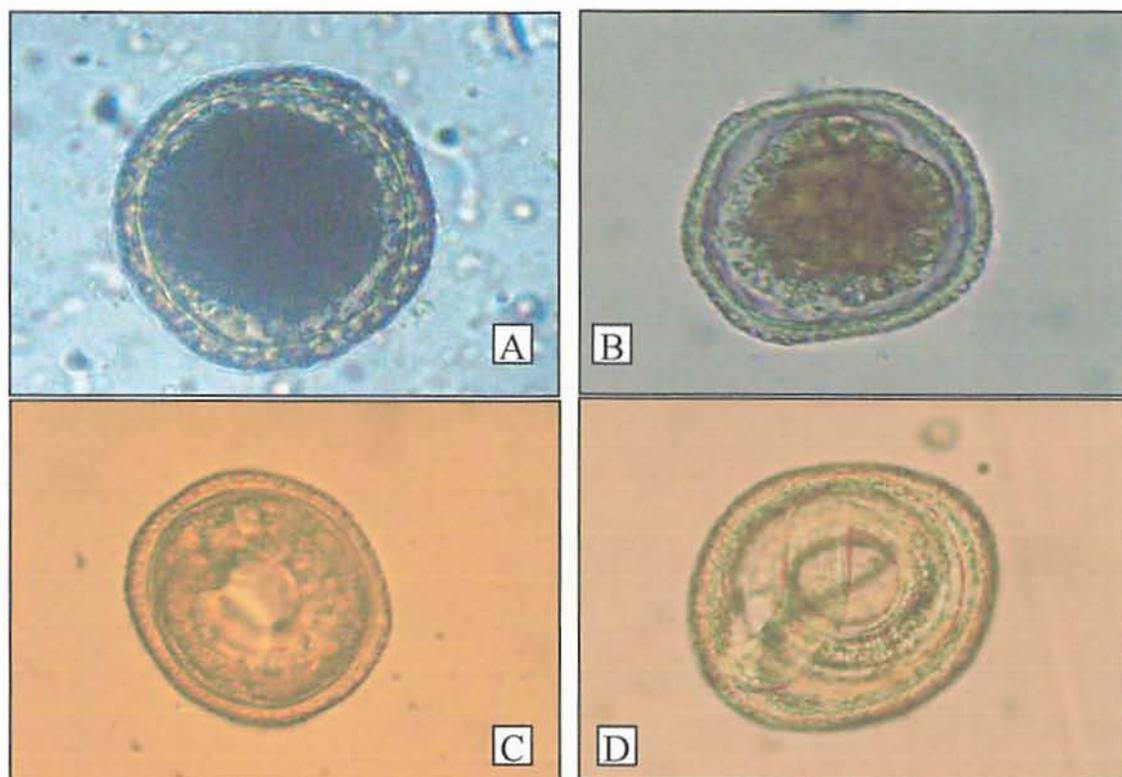


Figure 2.1. A large piece of industrial waste lying on a light-colored surface.

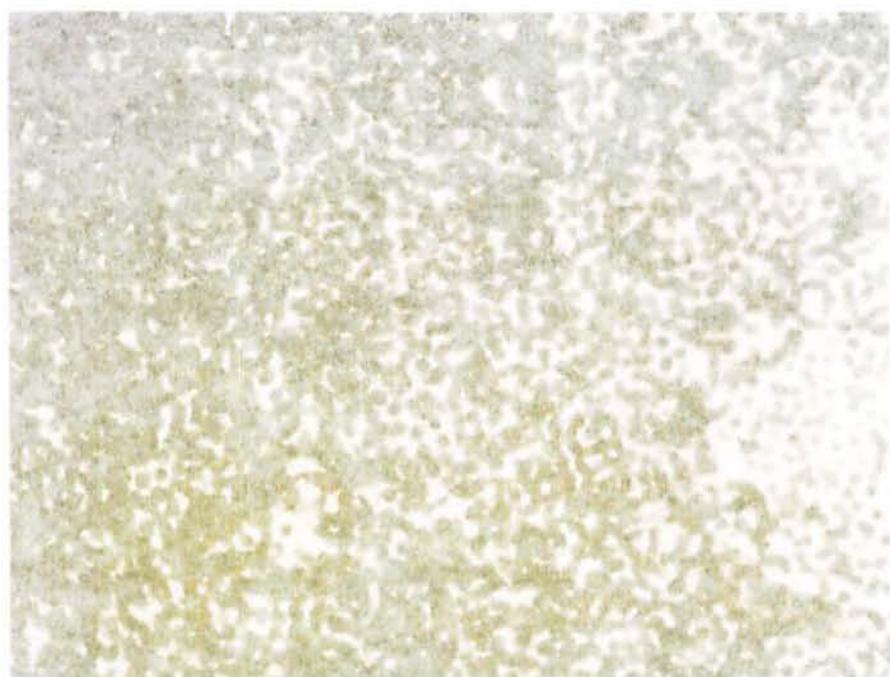
The waste is a large, dark, irregularly shaped object, possibly a piece of industrial waste, lying on a light-colored, textured surface. The object has a curved, somewhat elongated shape with some internal structure visible. The background is a plain, light-colored surface.



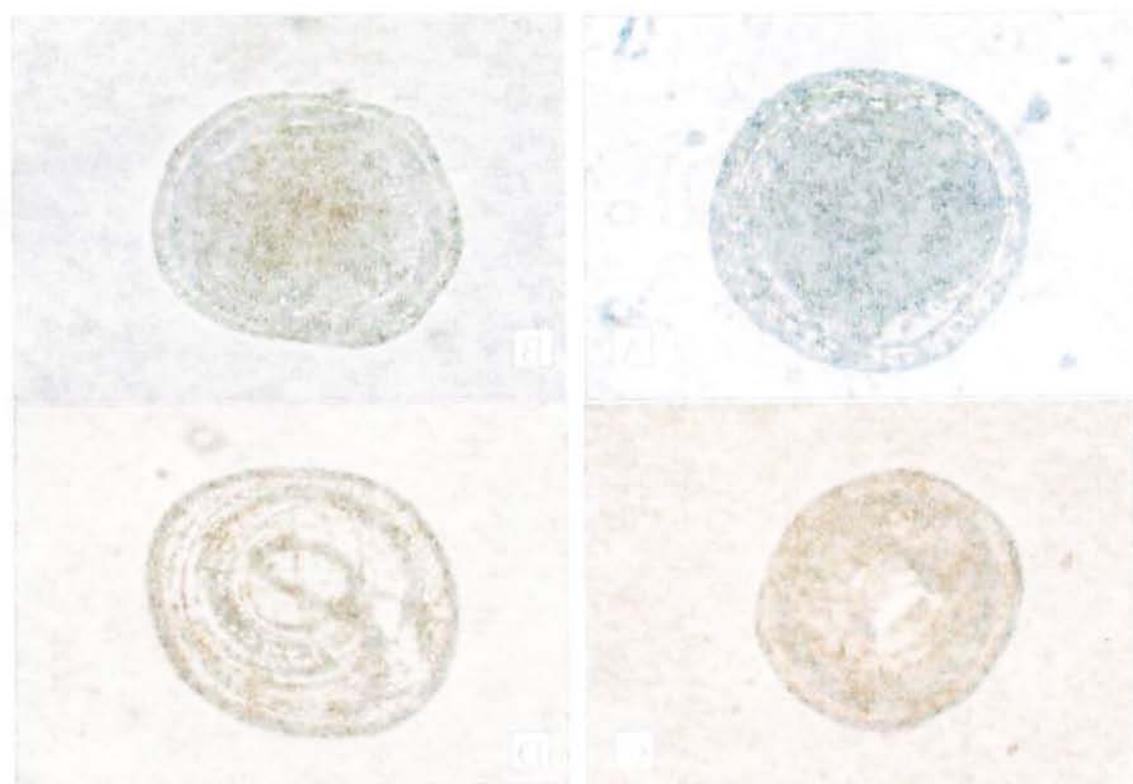
Gambar 5.2 Telur cacing *T. canis* yang berhasil dimurnikan, diamati dengan bantuan mikroskop inverted pada pembesaran 40x.



Gambar 5.3 Hasil pengamatan telur cacing *T. canis* dan perkembangannya hingga mencapai L2 dengan bantuan mikroskop inverted pada pembesaran 400x. A = 1 sel, B = Morula, C = Larva stadium pertama (L1), dan D = Larva stadium kedua (L2).

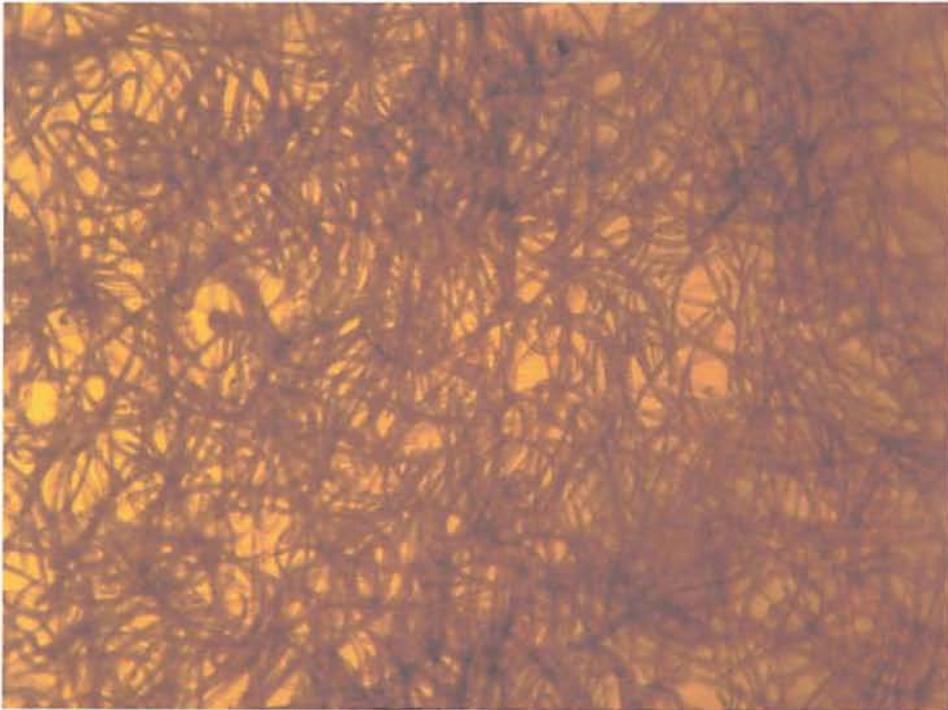


gambar 2.2. Kultur cacing *A. caryacae* yang berbuah ditunjukkan di bawah dengan keadaan mikroskop inverted pada pembesaran 40x



gambar 2.3. Hasil pengamatan kultur cacing *A. caryacae* yang telah berbuah dengan menggunakan 2.1. Injeksi mikrospora *A. caryacae* ke dalam mikrospora inverted pada pembesaran 40x. A = 1.000x, B = 1.000x, C = 1.000x, D = 1.000x

Hasil preparasi jaringan mencit (4 hari setelah diinfeksi L2J *T. canis*) berupa larva stadium kedua jaringan (L2J) *T. canis* dapat dilihat pada Gambar 5.4 dan 5.5.



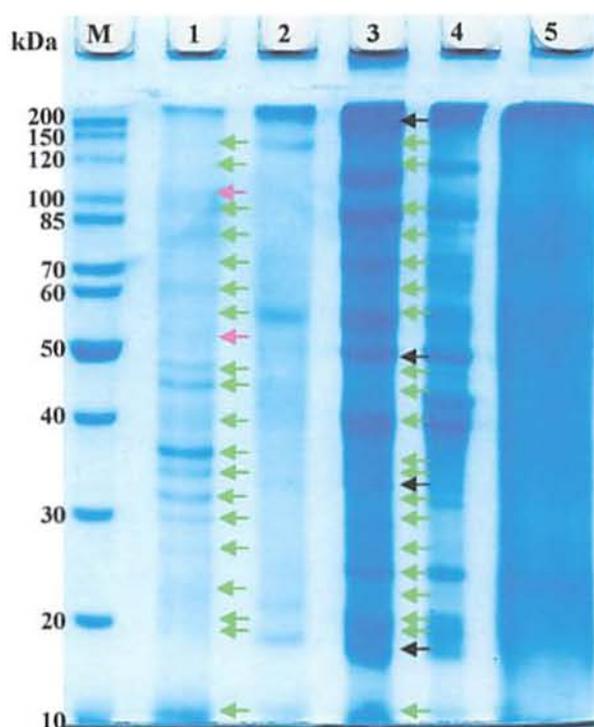
Gambar 5.4 Hasil pengamatan L2J *T. canis* dari jaringan mencit dengan bantuan mikroskop pada pembesaran 100x.



Gambar 5.5 Hasil pengamatan L2J *T. canis* dari jaringan mencit dengan bantuan mikroskop pada pembesaran 400x.

5.2 Analisis Protein *Toxocara canis*

Untuk mengetahui berat molekul (BM) protein *T. canis* dilakukan analisis protein dengan teknik *sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE). Hasil *running* SDS-PAGE dengan pewarnaan *coumasi blue* disajikan pada Gambar 5.6.

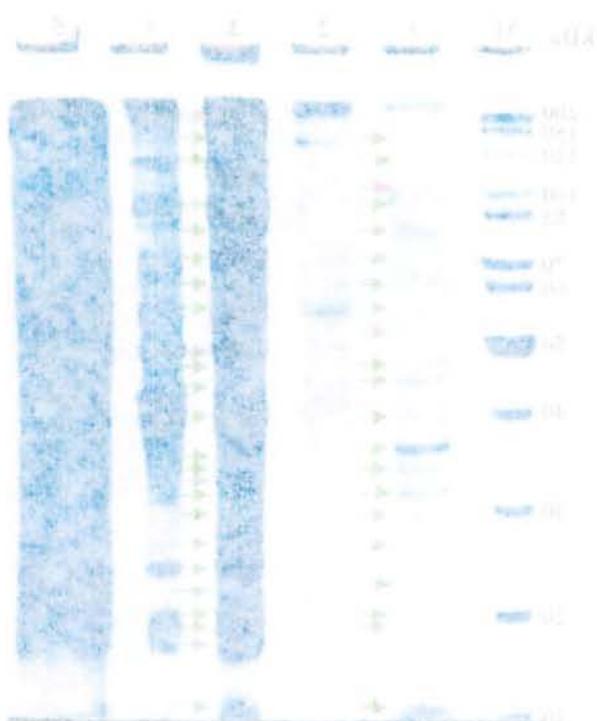


Gambar 5.6 Hasil analisis protein berbagai stadium *T. canis* menggunakan teknik SDS-PAGE dengan pewarnaan *coumasi blue*. M, marker; kolom 1, *escretory-secretory* (ES) L2J *T. canis*; kolom 2, *intestine T. canis*; kolom 3, *whole worm extract T. canis*; kolom 4, *somatic antigen T. canis*; kolom 5, *whole worm extract T. vitulorum*.

Untuk keperluan penghitungan BM protein dilakukan pengukuran gel hasil *running*, yaitu panjang gel dan jarak antara gel preparasi dengan pita yang terbentuk pada marker maupun sampel. Penghitungan BM protein menggunakan persamaan regresi antara nilai *retardation factor* (rf) dengan log BM pada marker. Nilai rf diperoleh dari pembagian jarak (antara gel preparasi dengan pita yang terbentuk pada marker) dengan panjang gel (Tabel 5.1).

The following table shows the results of the experiment. The first column shows the amount of protein synthesized in each lane. The second column shows the amount of protein synthesized in the presence of the inhibitor. The third column shows the amount of protein synthesized in the presence of the inhibitor and the substrate. The fourth column shows the amount of protein synthesized in the presence of the inhibitor and the substrate and the product. The fifth column shows the amount of protein synthesized in the presence of the inhibitor and the substrate and the product and the substrate. The sixth column shows the amount of protein synthesized in the presence of the inhibitor and the substrate and the product and the substrate and the product and the substrate.

Table 1



The results of the experiment are shown in the following table. The first column shows the amount of protein synthesized in each lane. The second column shows the amount of protein synthesized in the presence of the inhibitor. The third column shows the amount of protein synthesized in the presence of the inhibitor and the substrate. The fourth column shows the amount of protein synthesized in the presence of the inhibitor and the substrate and the product. The fifth column shows the amount of protein synthesized in the presence of the inhibitor and the substrate and the product and the substrate. The sixth column shows the amount of protein synthesized in the presence of the inhibitor and the substrate and the product and the substrate and the product and the substrate.

The following table shows the results of the experiment. The first column shows the amount of protein synthesized in each lane. The second column shows the amount of protein synthesized in the presence of the inhibitor. The third column shows the amount of protein synthesized in the presence of the inhibitor and the substrate. The fourth column shows the amount of protein synthesized in the presence of the inhibitor and the substrate and the product. The fifth column shows the amount of protein synthesized in the presence of the inhibitor and the substrate and the product and the substrate. The sixth column shows the amount of protein synthesized in the presence of the inhibitor and the substrate and the product and the substrate and the product and the substrate.

Table 2

Tabel 5.1 Penghitungan BM Protein Menggunakan Persamaan Regresi antara Nilai *Retardation Factor* (rf) dengan Log BM pada Marker

Jarak ¹	Rf ²	BM (y KDa)	BM (y Da)	log y (Da)
10.0	0.104	200.0	200000	5.301
12.0	0.125	150.0	150000	5.176
15.0	0.156	120.0	120000	5.079
21.0	0.219	100.0	100000	5.000
24.0	0.250	85.0	85000	4.929
31.0	0.323	70.0	70000	4.845
34.0	0.354	60.0	60000	4.778
43.0	0.448	50.0	50000	4.699
52.5	0.547	40.0	40000	4.602
66.0	0.688	30.0	30000	4.477
81.5	0.849	20.0	20000	4.301
95.0	0.990	10.0	10000	4.000

¹jarak (antara gel preparasi dengan pita yang terbentuk pada marker; ²rf = pembagian jarak dengan panjang gel.

Hasil analisis regresi menggunakan *statistical product and service solution* (SPSS) *rel. 13 for Windows* antara nilai rf dan log BM (Da) protein pada marker didapatkan bentuk kubik (Lampiran 1, halaman 58) dengan nilai $b_0 = 5,599$, $b_1 = -3,841$, $b_2 = 5,524$, $b_3 = -3,322$ sehingga didapatkan persamaan garis $y = 5,599 - 3,841x + 5,524x^2 - 3,322x^3$ (Lampiran 1, halaman 59). Persamaan garis ini digunakan untuk penghitungan BM protein pada sampel, dengan $y = \log \text{BM (Da)}$ dan x adalah nilai rf pada sampel. Hasil analisis BM protein cacing dewasa *T. canis* didapatkan beberapa macam pita protein, yaitu 208,4, 147,9; 120,2, 107,2, 87,1, 79,4, 70,8, 63,1, 50,1, 49,0, 45,7, 42,7, 40,7, 37,2, 34,7, 32,4, 30,2, 28,2, 24,5, 22,9, 20,0, 19,5, 18,2, dan 10,7 kDa. Pada ES L2J didapatkan protein yang sama kecuali pita protein dengan BM 208,4, 50,1, 34,7 dan 18,2 kDa tidak tampak pada ES L2J. sedangkan protein dengan BM 95,5 dan 55,0 kDa hanya tampak pada ES L2J. Penghitungan BM protein pada sampel secara lengkap dapat dilihat pada Lampiran 1 (halaman 60).

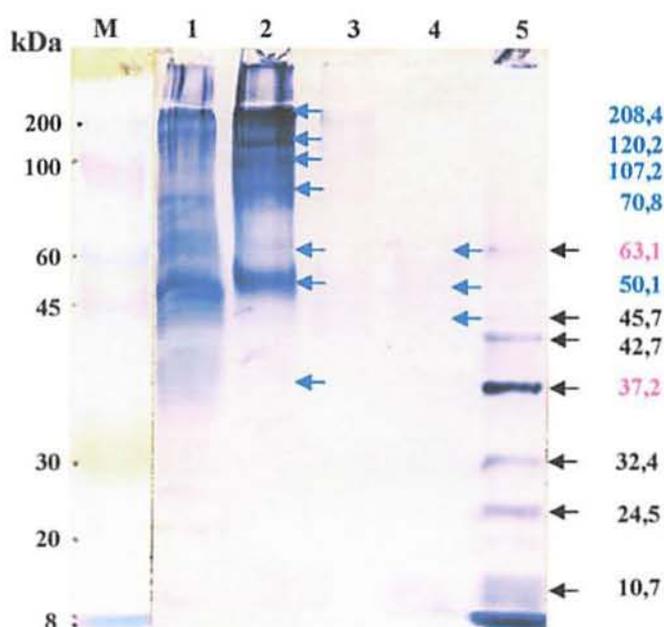
Hasil analisis BM protein *T. canis* pada penelitian ini terdapat BM yang sama maupun yang berbeda dengan peneliti terdahulu, kemungkinan ini dapat terjadi karena resiko dari penggunaan rumus regresi, perbedaan waktu maupun *setting* peralatan saat *running*, dan optimasi pembuatan homogenat. Kusnoto dkk. (2005a) menyatakan, bahwa akibat penggunaan rumus regresi dan perbedaan relatif dalam menentukan jarak pita protein maupun panjang dan awal pengukuran gel, maka kemungkinan ada beberapa pita protein yang memiliki sedikit perbedaan dengan peneliti lain, tetapi sebenarnya yang dimaksud adalah pita protein yang sama.

Dari Gambar 5.6 dapat dilihat perbedaan ketajaman pita pada masing-masing kolom, hal ini menunjukkan perbedaan kadar protein baik protein total dalam homogenat maupun protein tertentu terhadap protein total. Kusnoto (2003) menyatakan bahwa beberapa faktor yang mempengaruhi hasil *running* adalah kebersihan homogenat, kemurnian isolat, dan kadar protein dalam homogenat. Kebersihan homogenat akan mempengaruhi kualitas pita yang terbentuk pada gel, homogenat yang bersih akan memberikan kolom yang terang sehingga pita protein terlihat jelas dan kontras dengan latar belakang (kolom). Isolat yang murni dengan kadar protein yang optimal di dalam homogenat akan memberikan pita protein yang tajam dan tegas, sehingga memudahkan analisis. Kemungkinan lain, perbedaan pita yang terbentuk memang menunjukkan karakter protein yang berbeda pula, hal ini sesuai dengan pendapat Tung *et al.* (1995) yang menyatakan, bahwa meskipun berat molekul sama tetapi bila ekspresinya terdapat perbedaan, maka secara genetik terdapat perbedaan pula. Namun demikian untuk mengetahui spesifisitas dan sensitivitas protein tersebut masih memerlukan karakterisasi protein lebih lanjut (Kusnoto dkk., 2005b).

5.3 Karakterisasi Protein

Hasil identifikasi protein dengan teknik *Western blot* dan pewarnaan *Western blue* menggunakan antibodi poliklonal anti-L2J *T. canis* dapat dikarakterisasi masing-masing protein yang telah berhasil dipreparasi seperti tampak pada Gambar 5.7.

Beberapa pita reaksi antara serum anti-L2J *T. canis* terjadi pada protein dengan BM 208,4, 120,2, 107,2, 70,8, 63,1, 50,1 dan 37,2 kDa, protein tersebut selain menunjukkan pita reaksi dengan protein cacing dewasa *T. canis* juga menggambarkan pita reaksi silang antara serum anti-L2J *T. canis* dengan antigen cacing dewasa *T. vitulorum*. Untuk pita reaksi antara serum anti-L2J *T. canis* dengan antigen ES L2J *T. canis* terjadi pada protein dengan BM 45,7, 42,7, 37,2, 32,4, 24,5, dan 10,7 kDa. Di antara beberapa pita reaksi antara serum anti-L2J *T. canis* dengan antigen ES L2J *T. canis* tersebut pita reaksi pada protein dengan 37,2 kDa tampak lebih tegas dibandingkan dengan yang lain, hal ini menggambarkan antigenitas yang lebih tinggi dibanding dengan protein lain. Namun demikian pada uji yang lebih peka tidak menutup kemungkinan pita yang lebih tipis justru lebih spesifik (Kusnoto dkk., 2005b).



Gambar 5.7 Hasil identifikasi beberapa protein *T. canis* terhadap serum anti-L2J. M, marker Rainbow (Sigma); kolom 1, *whole worm extract T. vitulorum*; kolom 2, *somatic antigen T. canis*; kolom 3 *whole worm extract T. canis*; kolom 4, *intestine T. canis*; kolom 5, ES L2J *T. canis*.

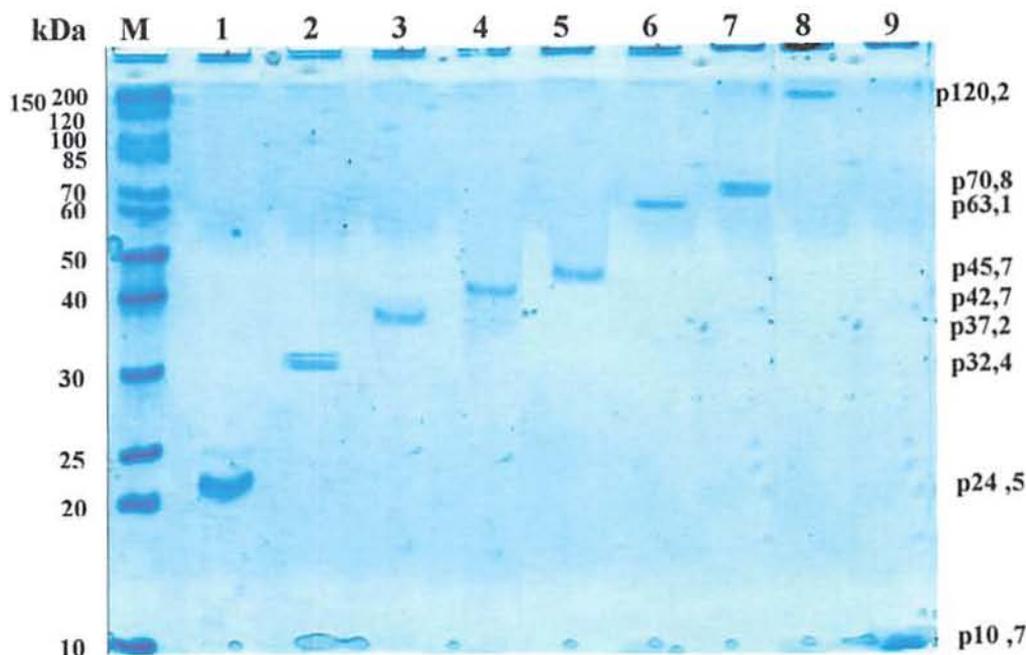
Pita reaksi silang antara serum anti-L2J *T. canis* dengan antigen *T. vitulorum* kebanyakan terdapat pada protein dengan BM lebih dari 45 kDa. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Kusnoto (2003) yang menyatakan, bahwa reaksi silang ini dapat terjadi dengan cacing dari klas lain dan biasanya terjadi pada protein dengan BM tinggi. Pengamatan dengan *immunoblotting* menunjukkan polipeptida dari telur *F. gigantica* dikenali oleh antiserum kelinci anti-cacing dewasa. Komponen protein dengan BM 240 dan 206 kDa dari telur *F. gigantica*, *Toxocara viulorum* dan *Moniezia expansa* dikenali oleh antiserum anti-cacing dewasa yang berbeda (Abdel-Rahman *et al.*, 2000). Kusnoto (2003) menyatakan, bahwa dengan teknik *Western blot* antigen *F. gigantica* dikenali oleh antiserum terhadap larva kedua (anti-L2) *T. cati* pada BM 133 kDa. Pengamatan terhadap *whole worm extract* dengan teknik *immunoblotting* menunjukkan hasil, bahwa antiserum anti-*F. gigantica* terjadi reaksi silang dengan antigen *T. vitulorum* pada BM 109 dan 133 kDa, dan antigen *M. expansa* pada BM 210 kDa, sedangkan antigen *F. gigantica* terjadi reaksi silang dengan antiserum anti-*T. vitulorum* pada BM 133 kDa dan anti-*M. expansa* pada BM 52 kDa (Abdel-Rahman and Megeed, 2000). Reaksi silang antara antiserum anti-L2 *T. cati* dengan antigen cacing lain dapat terjadi karena sebagian besar jenis parasit sering kali mempunyai profil protein yang hampir sama, sehingga sering kali mengakibatkan reaksi silang (Troncy, 1989). Namun pita reaksi silang yang terjadi tidak sebanyak kesamaan pita protein yang terdapat pada hasil analisis protein antara beberapa cacing yang berhasil dipreparasi, karena protein dengan BM yang sama tetapi apabila mempunyai epitop berbeda maka belum tentu terjadi ikatan dengan antibodi sehingga reaksi silang tidak terjadi (Harlow and Lane, 1988). Hal ini menunjukkan bahwa protein tersebut memiliki spesifisitas yang rendah karena dapat dikenali oleh antiserum cacing lain.

Berdasarkan hasil penelitian ini antigen ES L2J *T. canis* berpeluang untuk digunakan sebagai bahan diagnostik toxocariasis. Hal ini sesuai dengan pendapat

Despommier (2003) yang menyatakan, bahwa pengamatan terhadap biologi molekuler *Toxocara* dapat difokuskan pada protein sekresi stadium *migrating juvenile*, protein ini memungkinkan dapat digunakan sebagai immunodiagnosis dari *visceral larvae migrans* (VLM) dan *ocular larvae migrans* (OLM). Kenyataannya beberapa protein ES dari stadium *juvenile* setidaknya terdapat 6 macam mucin dengan antigenisitas tinggi (Doedens *et al.*, 2001) berkaitan dengan permukaan kutikula memperkuat konsep ini (Loukas *et al.*, 2000). Sekret mucin secara temporer menempel pada permukaan tubuh cacing (Page *et al.*, 1992) dan mengalir pada hospes secara periodik (Badley *et al.*, 1987). Penggunaan *crude extract* dari cacing *T. canis* menunjukkan reaksi silang dengan antibodi terhadap *T. vitulorum* dan *Ascaris lumbricoides*, tetapi reaksi silang tidak terjadi bila menggunakan *partially purified antigen* (Safar *et al.*, 1992). Purifikasi protein akan meningkatkan spesifisitas antigen dibanding dengan *crude extract*. Isolat fraksi protein yang didapatkan mempunyai potensi untuk digunakan sebagai bahan diagnostik dengan angka sensitivitas sebesar 100% (Abdel-Rahman, 2000). Untuk mendapatkan uji yang lebih spesifik pada diagnosis *visceral* dan *ocular larvae migrans* akibat toxocariasis dapat dicapai dengan penggunaan antibodi monoklonal anti-*T. canis* sebagai bahan uji (Bowman *et al.*, 1987).

5.4 Analisis Protein dari Hasil Elusi

Berdasarkan hasil preparasi protein dengan teknik SDS-PAGE telah dilakukan isolasi protein dengan teknik elusi, kemudian masing-masing hasil isolasi dilakukan SDS-PAGE kembali. Hasil analisis protein murni L2J *T. canis* yang difokuskan pada protein dengan BM 120,2, 70,8, 63,1, 45,7, 42,7, 37,2, 32,4, 24,5 dan 10,7 kDa ditampilkan pada Gambar 5.8.

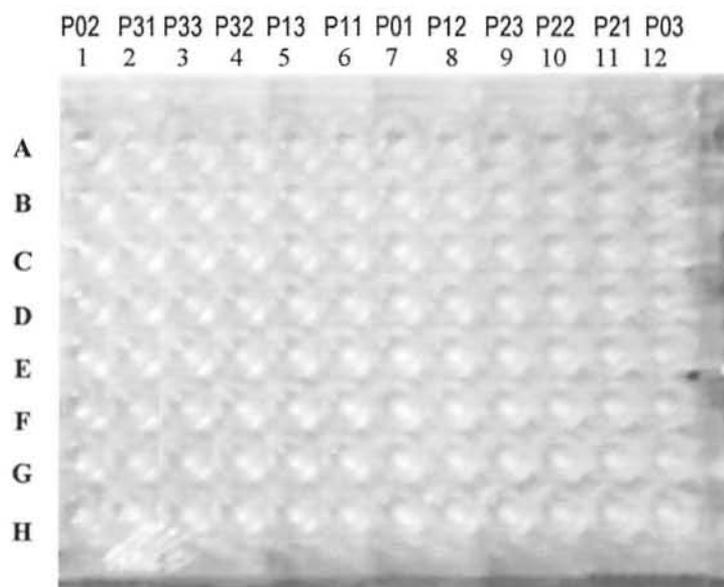


Gambar 5.8 Analisis SDS-PAGE hasil isolasi protein antigenik L2 *Toxocara canis*. M, marker; Kolom 1, p24,5; kolom 2, p32,4; kolom 3, p37,2; kolom 4, p42,7; kolom 5, p45,7; kolom 6, p63,1; dan kolom 7, p70,8; kolom 8, p147,9; dan kolom 9, p10,7 kDa.

Pada Gambar 5.8 terlihat bahwa protein dengan BM 24,5 kDa tampak diekspresikan lebih dominan dibanding protein yang lain, kemudian diikuti protein dengan BM 32,4, 70,8 dan 120,2 kDa. Perbedaan ini menunjukkan perbedaan secara genetik di antara ketiga protein tersebut, karena meskipun berat molekul sama tetapi bila ekspresinya terdapat perbedaan, maka secara genetik terdapat perbedaan pula (Tung *et al.*, 1995). Hal ini sesuai dengan pendapat Maizels *et al.* (2000) yang menyatakan bahwa larva *T. canis* memiliki gen utama yang diekspresi sehingga dapat *survive* di dalam *immunocompetent host*, mampu menghindari dari reaksi inflamasi atau bentuk lain dari respon imun dan mampu bertahan hidup dalam jaringan hospes hingga beberapa bulan atau beberapa tahun tanpa mengalami pertumbuhan atau diferensiasi lebih lanjut. Beberapa di antara protein tersebut homolog dengan protein mamalia yang menonjol seperti *C-type lectins* yang direpresentasikan oleh produk sekresi TES-32, TES-70 dan *mucins* TES-120.

5.5 Uji Immunogenesitas dan Antigenesitas

Hasil pembacaan *optical density* (OD) antibodi anti-p120, p70, dan anti p32 dari L2J *T. canis* terhadap antigen ES L2J *T. canis* dan analisis statistiknya secara lengkap dapat dilihat pada Lampiran 3 dan 4. Dokumentasi hasil pembacaan ELISA-reader ($\lambda=405$ nm) disajikan pada Gambar 5.9.



Gambar 5.9 Dokumentasi hasil pembacaan *optical density* dengan ELISA-reader ($\lambda=405$ nm) antibodi anti-L2J *T. canis* terhadap antigen ES L2J *T. canis*. P01-P03, placebo; P11-P13, diimunisasi dengan p120 kDa; P21-P23, dengan p70 kDa; P31-P33, dengan p32 kDa.

Hasil analisis statistik OD serum mencit dengan uji Anava menunjukkan perbedaan sangat bermakna ($p<0,01$) di antara berbagai perlakuan. Berdasarkan uji *honesty significant different* (HSD) 5%, nilai OD serum tertinggi didapatkan pada mencit yang diimunisasi dengan p32 kDa yaitu sebesar $0,091 \pm 0,020$, hasil yang sama ($p>0,05$) didapatkan pada mencit yang diimunisasi dengan p120 kDa yaitu sebesar $0,070 \pm 0,019$. Nilai OD terendah didapatkan pada mencit yang diinjeksi plasebo yaitu sebesar $0,025 \pm 0,004$, yang menunjukkan perbedaan bermakna ($p<0,05$) dengan mencit yang diimunisasi (dengan p32, p70 dan p120 kDa), di samping itu juga diketahui bahwa mencit yang diimunisasi dengan p120 kDa menunjukkan nilai OD yang sama ($p>0,05$) dengan mencit yang diimunisasi dengan p70 kDa maupun p32 kDa (Tabel 5.2).

Tabel 5.2 Hasil Pembacaan *Optical Density* dengan ELISA-reader ($\lambda=405$ nm) Antibodi Anti-L2J *T. canis* terhadap Antigen ES L2J *T. canis*

Kode	Imunisasi	Rata-rata OD \pm SD
P0	Plasebo	0,025 ^a \pm 0,004
P1	p120 kDa	0,070 ^{bc} \pm 0,019
P2	p70 kDa	0,059 ^b \pm 0,015
P3	p32 kDa	0,091 ^c \pm 0,020

^{a, b, c}superskrip berbeda pada kolom sama menunjukkan perbedaan bermakna ($p < 0,05$)

Optical density tersebut dinyatakan positif bila didapatkan nilai lebih dari atau sama dengan 2xCOV kontrol negatif (de Savigny, 1980), berkaitan dengan hal ini dilakukan tabulasi nilai OD seperti tampak pada Lampiran 2 dan Tabel 5.3. Setelah dilakukan analisis statistik terhadap hasil tabulasi dengan *chi square test* (Lampiran 4) dapat dinyatakan, bahwa nilai OD positif tertinggi didapatkan pada serum mencit yang diimunisasi dengan p32 yaitu sebesar 100%, pada mencit yang diimunisasi dengan p120 sebesar 83.3%, sedangkan pada mencit yang diimunisasi dengan p70 sebesar 66,7% dan pada plasebo sebesar 0%. Berdasarkan analisis statistik tersebut juga diketahui bahwa nilai OD positif pada seluruh mencit yang diimunisasi (dengan p32, p70 maupun p120) secara bermakna ($p < 0,05$) lebih tinggi dibanding serum mencit plasebo.

Tabel 5.3 Tabulasi Silang antara Imunisasi pada Mencit dengan Nilai OD Positif

Kode	Imunisasi	2 x COV kontrol negatif*		Total
		Negatif	Positif	
P0	Plasebo	6	0	6
P1	p120	1	5	6
P2	p70	2	4	6
P3	p32	0	6	6
Total		9	15	24

*Rata-rata kontrol negatif = 0.02467; 2 x COV kontrol negatif = 0,0493; (-) $< 0,0493$; (+) $> 0,0493$

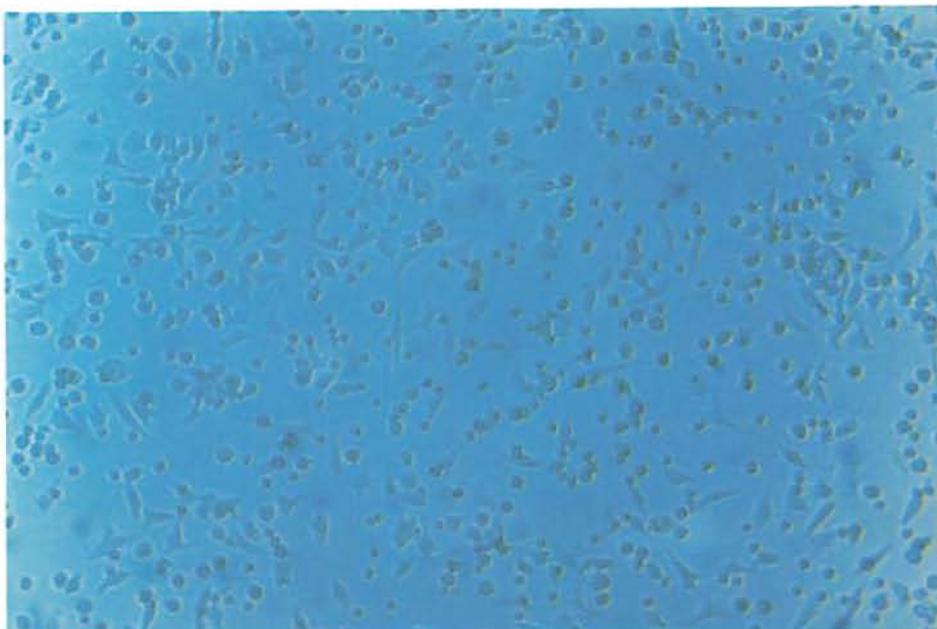
Hasil tersebut menunjukkan bahwa p32, p70 dan p120 dari ES L2J *T. canis* bersifat imunogenik karena dapat memicu terbentuknya antibodi dalam serum mencit. Baratawidjaja (2000) menyatakan, bahwa proses terbentuknya antibodi dalam serum merupakan bagian dari respon imun dalam tubuh mencit dalam menanggapi antigen *T. canis* yang diimunisasikan. Proses tersebut diawali dengan penangkapan antigen oleh *antigen presenting cell* (APC) yang merupakan bagian dari makrofag untuk dipresentasikan kepada sel limfosit dalam bentuk yang dikenalnya.

Pada suatu pemeriksaan dengan *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) serum manusia menunjukkan antibodi terhadap antigen ES L₂ *T. canis*. Pada survei epidemiologi dengan menggunakan metode tersebut pada anak, menunjukkan eosinofilia dibandingkan dengan grup seronegatif (van Knapen *et al.*, 1983). Fakta lain menunjukkan bahwa hiperimun pada mencit dengan antigen ES *T. canis* dalam ajuvan menyebabkan resistensi terhadap infeksi *T. canis* (Nicholas *et al.*, 1984). Dalam imunisasi ditambahkan ajuvan untuk meningkatkan reaksi kebal dengan peningkatan ekspresi kostimulator dan produksi sitokin seperti interleukin 12 (IL-12) yang menstimulasi pertumbuhan dan diferensiasi sel T (Abbas *et al.*, 2003). Pada uji *indirect*-ELISA ini konjugat yang digunakan adalah konjugat *anti mouse* yang berlabel enzim *alkaline fosfatase*. Pemilihan enzim ini berdasarkan atas spesifisitas, homogenitas, stabilitas dan efisien karena harganya murah (Rantam, 2003).

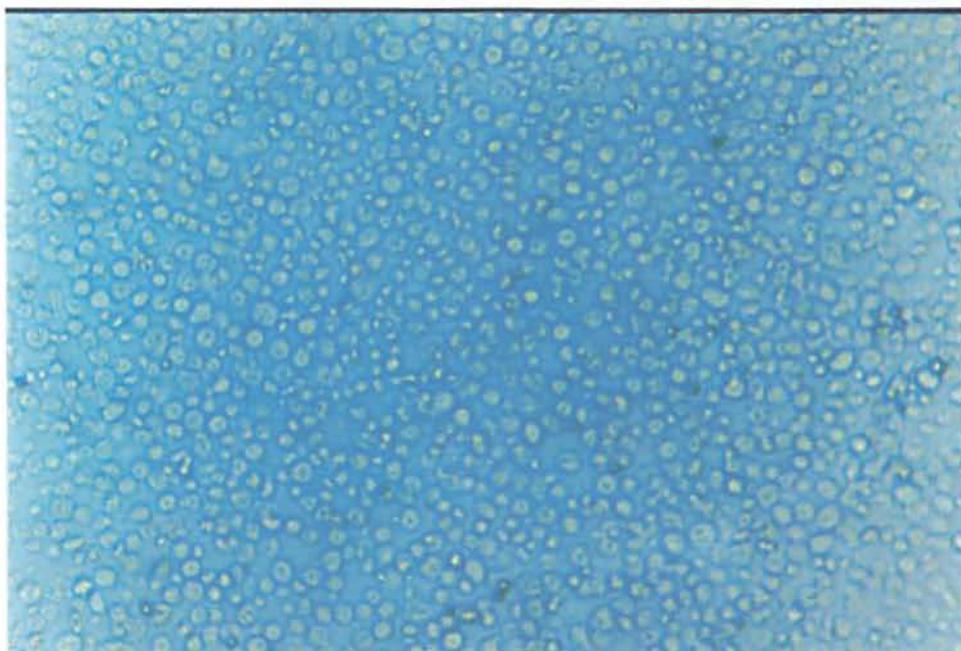
5.6 Produksi Antibodi Monoklonal

5.6.1 Persiapan fusi

Untuk mempersiapkan fusi dilakukan pengembangan sel peritoneal mencit dan sel mieloma NS-1. Dokumentasi sel peritoneal mencit disajikan pada Gambar 5.10, sedangkan sel mieloma NS-1 disajikan pada Gambar 5.11.



Gambar 5.10 Sel peritoneal mencit.



Gambar 5.11 Sel mieloma NS-1.

5.6.2 Fusi sel dan skrining

Sel mieloma yang digunakan pada penelitian ini adalah NS-1, sedangkan splenosit berasal dari limpa mencit yang sebelumnya diimunisasi protein-32 *T. canis*. Dokumentasi hasil fusi antara sel B dengan mieloma dapat dilihat pada Gambar 5.12 A,

Figure 1. The effect of the inhibitor on the growth of the cells. The cells were grown in the presence of the inhibitor for 24 hours. The results are shown in the following table.

Condition	Cell Count (x10 ⁶)
Control	1.2
Inhibitor	0.8

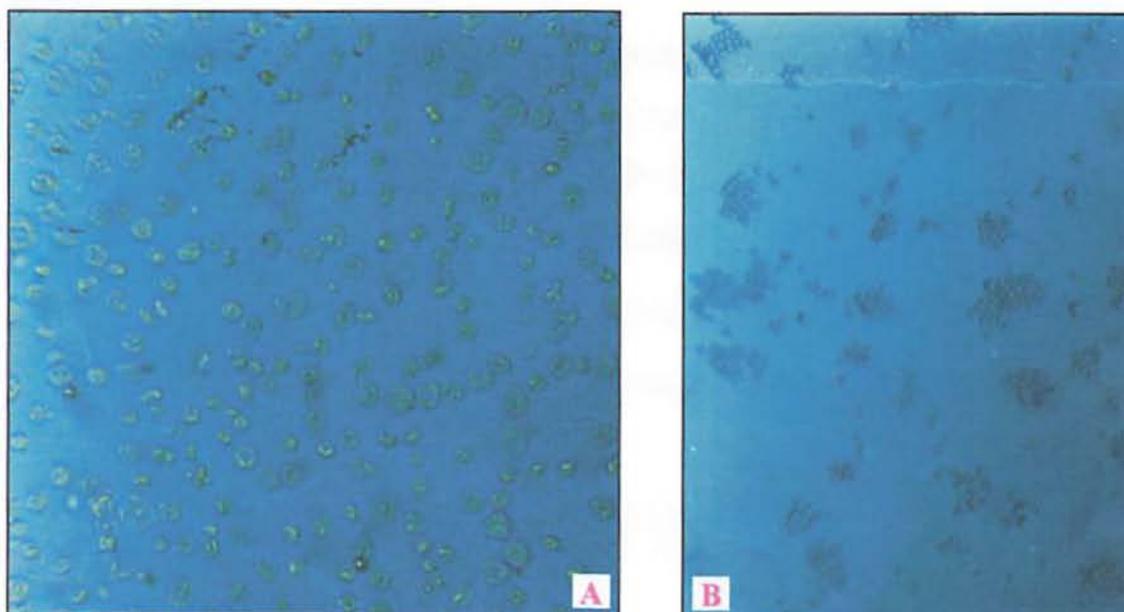
Figure 1. The effect of the inhibitor on the growth of the cells.



Figure 2. The effect of the inhibitor on the growth of the cells.



sedangkan sel hibrid dapat dilihat pada Gambar 5.12 B. Frekuensi hasil fusi antara spenosit dengan sel mieloma NS-1 dalam membentuk koloni sel hibrid dan hasil skrining terhadap kemampuan sel hibrid dalam menghasilkan antibodi dapat dilihat pada Tabel 5.4.



Gambar 5.12 Hasil fusi antara sel B dan mieloma (A); sel hibrid (B)

Tabel 5.4 Frekuensi Hasil Fusi Berdasarkan Jumlah Koloni Sel Hibrid dan Kemampuan Menghasilkan Antibodi

No. mikroplate	Total sumuran	Koloni sel hibrid		Koloni sel hibrid dengan antibodi		Kisaran OD
		Σ sumuran	Frekuensi(%)	Σ sumuran	Frekuensi (%)	
1	96	48	50.00	18	37.50	0.249-0.826
2	96	58	60.42	19	32.76	0.304-0.849
3	96	47	48.96	18	38.30	0.253-0.783
4	96	59	61.46	17	28.81	0.247-0.819
Total	384	212	220.83	72	33.96	
Rata-rata		53	55.21	18	34.34	0.247-0.849

Sifat fusi yang baik adalah dapat menghasilkan sel hibridoma yang banyak. Jika sel *line* tumor sesuai dengan kriteria sebagai persyaratan membuat hibridoma maka

terhadap sel hidup dalam pada Gambar 2.12 B. Terdapat hasil tes utama
 dalam diagram sel tersebut (A-B) dalam menunjukkan bahwa sel hidup dan tidak
 mampu melakukan fermentasi sel hidup dalam menunjukkan bahwa sel hidup

ada Tabel 2.1



Gambar 2.12 Hasil uji kultur sel B dan campuran (A) sel hidup (B)

Tabel 2.1 Fermentasi Hasil Tes Biokimia Jamur Koloni Sel Hidup dan
 Konsentrasi Nitrogen dalam Jamur

Konsentrasi (%)	Konsentrasi sel hidup dalam jamur		Konsentrasi sel hidup		Total sintesis nitrogen	Konsentrasi nitrogen
	1 jamur (%)	2 jamur (%)	1 jamur (%)	2 jamur (%)		
0.00-0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.06-0.10	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06
0.11-0.15	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11
0.16-0.20	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16
0.21-0.25	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21
0.26-0.30	0.26	0.26	0.26	0.26	0.26	0.26

Setelah hasil uji kultur sel hidup dalam dan konsentrasi nitrogen dalam jamur

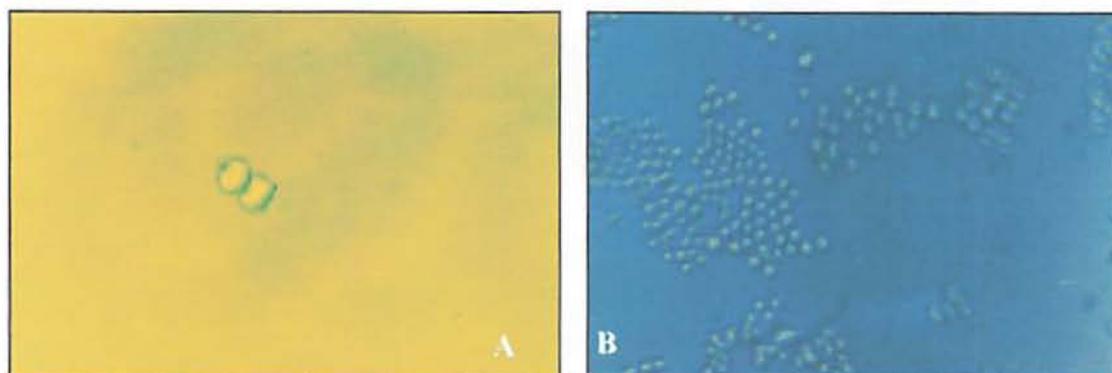
ada dan menunjukkan bahwa sel hidup dalam dan konsentrasi nitrogen dalam jamur

akan mendapatkan sel partner yang baik, dan otomatis akan menghasilkan sel hibridoma yang baik pula, serta tidak ditemukan mutasi sel pada tingkat subklone (Rantam, 2003).

Frekuensi koloni sel B dengan antibodi ini menunjukkan jumlah sel B yang terstimulasi dengan P32 *T. canis*, sehingga frekuensi pembentukan hibridoma penghasil antibodi dapat diketahui. Pada penelitian ini frekuensi hasil fusi tergolong cukup tinggi yakni sekitar 55,21% dari total sumuran. Hal ini menunjukkan bahwa sel B cukup responsif terhadap sel mieloma dan fase perkembangan sel mieloma yang cukup seragam atau proses fusi yang baik. Namun demikian pada skrining terhadap kemampuan sel hibrid dalam menghasilkan antibodi terlihat frekuensi yang rendah yakni sekitar 34,34% dari sumuran dengan koloni sel hibrid. Suwarno (2003) menyatakan, bahwa keberhasilan mendapatkan hibridoma penghasil antibodi ini dipengaruhi oleh teknik imunisasi dan dosis imunogen yang digunakan.

5.6.3 Kloning dan rekloning

Dari hasil kloning terhadap sel hibrid yang mampu menghasilkan antibodi menunjukkan adanya peningkatan jumlah sekresi antibodi. Pada penelitian ini pengujian antibodi dilakukan terhadap koloni sel hibrid yang berasal dari satu sel. Hasil kloning dan rekloning terhadap hibridoma yang berasal dari satu sel dapat dilihat pada Tabel 5.5 dan Gambar 5.13 A, sedangkan pertumbuhan klon hibridoma hasil kloning dengan subklas Ig tertentu dapat dilihat pada Gambar 5.13 B.



Gambar 5.13 Hasil kloning dan rekloning. A, Koloni satu sel yang mulai membelah; B, Pertumbuhan klon hibridoma hasil kloning dengan subklas Ig tertentu.

Tabel 5.5 Kisaran Nilai *Optical Density* Hasil Kloning dan Rekloning Hibridoma Penghasil Antibodi Terhadap P30 *Toxocara canis*

Asal plate	Kloning	Rekloning
1B6	0,288-0,648	0,363-0,946
2F7	0,295-0,674	0,357-0,858
3D4	0,310-0,710	0,330-0,857
3E10	0,314-0,624	0,358-0,938
4A3	0,320-0,730	0,369-0,757
4C7	0,287-0,586	0,385-0,994

Pada kloning pertama diperoleh nilai OD sebesar 0,287 hingga 0,730, sedangkan pada kloning berikutnya (rekloning) nilai OD sebesar 0,330 hingga 0,994. Pada penelitian ini ditemukan kendala, yaitu klon yang semula positif menghasilkan antibodi berubah menjadi negatif. Hal ini terjadi karena pertumbuhan sel hibrid non-produser 100 kali lebih kuat daripada sel hibrid produser (Artama, 1992). Untuk menghindari hal tersebut, maka sel hibrid yang pertumbuhannya konfluen harus cepat dikloning. Keberhasilan kloning dan rekloning sangat menentukan dalam penentuan jenis subklas imunoglobulin (Ig) dari antibodi monoklonal (AbMo) yang dikehendaki. Klon yang benar-benar berasal dari satu sel akan menghasilkan satu jenis subklas Ig tertentu. Penggunaan P32 *T. canis* spesifik untuk imunisasi mencit dan sistem penangkapan antibodi menggunakan P32 *T. canis* untuk *coating antigen*, akan mempercepat terbentuknya AbMo terhadap P32 *T. canis*.

5.6.4 Penentuan subklas imunoglobulin

Penentuan jenis subklas imunoglobulin dari hasil kloning dan rekloning antibodi monoklonal terhadap P32 *T. canis* dapat dilihat pada Tabel 5.6.

Pada proses kloning dilakukan dengan cara kloning berulang, sehingga diperoleh AbMo yang benar-benar berasal dari satu klon hibridoma, dengan demikian dapat dihasilkan satu jenis subklas imunoglobulin. Proses kloning berulang dilakukan karena biasanya pada awal proses kloning, antibodi yang dihasilkan oleh hibridoma

masih merupakan campuran dari beberapa subklas Ig. Jenis subklas Ig dari AbMo yang dihasilkan banyak dipengaruhi oleh rute imunisasi dan keberhasilan proses kloning (Suwarno, 2003).

Tabel 5.6 Jenis Suklas Immunoglobulin dari Hasil Kloning dan Rekloning Antibodi Monoklonal terhadap Protein-32 *Toxocara canis*

Asal plate	Jenis subklas Ig		Nama klon
	Kloning	Rekloning	
1B6	Ig G1; Ig A; Ig G3	Ig G1	Tcn-1
		Ig G3	Tcn-2
2F7	Ig A; Ig G2a; Ig M	Ig A	Tcn-3
		Ig G2a	Tcn-4
3D4	Ig G2b	Ig G2b	Tcn-5
3E10	Ig M	Ig M	Tcn-6
4A3	Ig G1; Ig M	Ig G1	Tcn-7
4C7	Ig G2a; Ig G3	Ig G2a	Tcn-8
		Ig G3	Tcn-9

BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan beberapa hal sebagai berikut:

- 1) Didapatkan beberapa macam pita protein cacing dewasa *T. canis*, yaitu 208,4, 147,9; 120,2, 107,2, 87,1, 79,4, 70,8, 63,1, 50,1, 49,0, 45,7, 42,7, 40,7, 37,2, 34,7, 32,4, 30,2, 28,2, 24,5, 22,9, 20,0, 19,5, 18,2, dan 10,7 kDa. Pada ES dorman dalam jaringan hospes didapatkan protein yang sama kecuali pita protein dengan BM 208,4, 50,1, 34,7 dan 18,2 kDa tidak tampak pada ES L2J, sedangkan protein dengan BM 95,5 dan 55,0 kDa hanya tampak pada ES L2J.
- 2) Telah berhasil dikarakterisasi protein spesifik *T. canis* dewasa terhadap anti-L2J *T. canis* yaitu pada protein dengan BM 208,4, 120,2, 107,2, 70,8, 63,1, 50,1 dan 37,2 kDa, dan antara protein ES L2J *T. canis* dengan serum anti-L2J *T. canis* yaitu pada protein dengan BM 45,7, 42,7, 37,2, 32,4, 24,5, dan 10,7 kDa.
- 3) Beberapa protein spesifik L2 dorman dalam jaringan hospes (L2J) *T. canis* dengan imunogenitas dan antigenitas tinggi berturut-turut adalah p32, p120 dan p70 kDa.
- 4) Telah diperoleh sembilan klon hibridoma spesifik penghasil antibodi monoklonal terhadap protein-32 *T. canis* (Tcn-1 sampai dengan Tcn-9).
- 5) Telah diproduksi antibodi monoklonal terhadap protein-32 *T. canis* yang terdiri dari berbagai kelas dan subkelas imunoglobulin, yaitu Ig A, Ig G1, Ig G2a, IgG2b, Ig G3, dan Ig M.

6.2 Saran

Saran yang diajukan berdasarkan hasil penelitian ini adalah:

- 1) Protein dengan BM 32 kDa merupakan protein spesifik *T. canis* yang dapat dikembangkan untuk bahan diagnostik toxocariasis.

- 2) Perlu dilanjutkan pemurnian, pelabelan dan pengujian antibodi monoklonal dengan teknik *sandwich*-ELISA.
- 3) Perlu penelitian lebih lanjut untuk pengembangan teknik *sandwich*-ELISA dengan antibodi monoklonal sebagai sarana diagnosis dini, cepat dan akurat dalam mendeteksi antibodi *anti-T. canis* melalui pemeriksaan serum dengan teknik IC-ELISA serta pemeriksaan feses (*copro antigen*) dengan teknik DAS-ELISA pada hewan coba dan tersangka toxocariasis.

BAB 7

RINCIAN PENELITIAN TAHAP SELANJUTNYA (TAHUN III)

Rencana penelitian untuk tahun III adalah melanjutkan produksi antibodi monoklonal (AbMo) hingga pengujiannya sebagai komponen kit diagnostik pada pemeriksaan toxocariasis dengan teknik *sandwich*-ELISA meliputi: uji sensitivitas dan spesifisitas terhadap teknik DAS-ELISA untuk deteksi *coproantigen* dalam feses dan IC-ELISA untuk deteksi antibodi dalam serum darah serta dibandingkan dengan penyakit cacing lain.

7.1 Tujuan Khusus

- 1) Mendapatkan antibodi monoklonal (AbMo) yang sangat spesifik terhadap *Toxocara canis*.
- 2) Melakukan labeling Ig yang akan dijadikan sebagai komponen kit diagnostik.
- 3) Menunjukkan bahwa teknik *sandwich*-ELISA dengan AbMo anti-*T.canis* mempunyai sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi dalam mendeteksi antibodi anti-*Toxocara canis* isolat lokal dan *coproantigen* pada hewan tersangka dan penderita toxocariasis.

7.2 Metode Penelitian

Untuk memperoleh hasil yang optimal maka pada penelitian tahun ketiga ini dilakukan beberapa tahapan penelitian.

7.2.1 Pemurnian imunoglobulin

Pemurnian antibodi monoklonal dilakukan dengan teknik *coloum chromatography* dengan menggunakan protein A. yang dipreparasi dalam protein A-*Ultrogel coloumn* (25 ml) (Harlow dan Lane, 1999).

7.2.2 Pelabelan

Pemberian label enzim alkalin fosfatase pada antibodi monoklonal (dipilih yang mempunyai reaktivitas lebih tinggi terhadap salah satu ujung antigen determinan protein

cacing *T. canis*), dilakukan dengan teknik prosedural 1 tahap dengan glutaraldehida (Harlow dan Lane, 1999).

7.2.3 Kultivasi hibridoma

Hibridoma yang telah menghasilkan antibodi monoklonal dikultivasi secara *invitro* dan *invivo*. Secara *invitro* hibridoma dibiakkan pada kultur sel pada medium RPMI yang mengandung 10 % FCS, 25 mMol Hepes, 25 mMol NaHCO₃, 100 IU Penstrep.

Secara *invivo*, hibridoma dibiakkan pada rongga peritoneal mencit Balb/c. Sebanyak 5 x 10⁶ sel diinjeksikan pada mencit Balb/c per ekor. Sebelum perlakuan semua mencit diinjeksi dengan Pristane 0.5 ml per ekor. Bila sudah terlihat timbulnya ascites, maka diadakan pengambilan cairan ascites secara aseptis. Antibodi monoklonal kemudian dimurnikan.

7.2.4 Teknik penularan *Toxocara canis* pada mencit

Sebanyak 60 ekor mencit Balb/c umur 8 minggu, dibagi menjadi lima kelompok. Kelompok I, diinfeksi dengan telur infeksi *T. canis* isolat lokal dengan dosis 10 butir per gram berat badan secara per oral; Kelompok II, diinfeksi dengan telur infeksi *T. cati* dengan dosis dan cara yang sama; Kelompok III, diinfeksi dengan telur infeksi *T. vitulorum* dengan dosis dan cara yang sama. Kelompok IV, diinfeksi dengan *Ancylostoma sp* dengan dosis dan cara yang sama; Kelompok V, diinfeksi dengan telur infeksi *Acaris lumbricoides* Suum dengan dosis dan cara yang sama, kelompok II-V digunakan sebagai diagnosa banding dari penyakit toxocariasis yang disebabkan oleh *T. canis*; dan Kelompok VI, sebagai kontrol hanya diberi PBS dengan aplikasi yang sama dengan perlakuan. Mencit-mencit tersebut diamati dan mulai dilakukan pengambilan serum darah dan feses pada hari ke-3. Apabila selama pengamatan terdapat mencit yang mati, dilakukan pemeriksaan organ visceral (hati, jantung dan paru) terhadap keberadaan

larva. Semua mencit pada hari ke-21 dikorbankan dan dilakukan pengambilan serum darah, feses, dan organ visceral. Serum darah dan feses kemudian diperiksa masing dengan teknik IC-ELISA dan DAS-ELISA. Sementara itu organ visceral (hati, jantung dan paru) dilakukan pemeriksaan mikroskopik terhadap keberadaan larva stadium kedua atau larva migran (larva dorman).

7.2.5 Uji sensitivitas dan spesifisitas

Untuk menentukan sensitivitas dan spesifisitas teknik DAS-ELISA maupun IC-ELISA dilakukan pengujian masing-masing terhadap serum darah dan feses, dari mencit yang menderita toxocariasis, dan yang diinfeksi dengan cacing lain. Sensitivitasnya dinyatakan tinggi apabila kedua teknik tersebut yang menggunakan antibodi monoklonal (yang diperoleh pada Tahap II) dapat mendeteksi semua hewan yang menderita toxocariasis. Spesifisitas dinyatakan tinggi apabila kedua teknik tersebut yang menggunakan antibodi monoklonal (yang diperoleh pada Tahap II) dapat mendeteksi semua hewan yang menderita toxocariasis, tetapi tidak didapatkan *false positive* dengan penyakit cacing lain selain *Toxocara* (sebagai pembandingan digunakan infeksi buatan dengan telur infeksi cacing *Ancylostoma* dan *Ascaris lumbricoides* Suum). Hasil pembacaan teknik DAS-ELISA maupun IC-ELISA berupa nilai *optical density* (OD) dari ELISA-reader akan digunakan untuk menentukan nilai sensitivitas dan spesifisitas. Nilai OD dinyatakan positif (+) apabila nilai *cut of value* (COV) menunjukkan nilai lebih $\geq 2x$ OD kontrol negatif (de Savigny, 1980).

Sensitivitas dihitung berdasarkan nilai yang diperoleh dari perbandingan antara OD+ dengan jumlah antara OD + dan OD – dari hasil pemeriksaan serum toxocarosis + dengan yang dinyatakan dalam persen.

Spesifisitas dihitung berdasarkan nilai yang diperoleh dari perbandingan antara *optical density* (OD) – dengan jumlah antara OD + dan OD – dari hasil pemeriksaan serum darah toxocarosis – yang dinyatakan dalam persen.

Untuk memperjelas tentang nilai sensitivitas dan spesifisitas dapat dilihat Tabulasi silang sebagai berikut:

	Hasil ELISA-reader		Jumlah
	OD +	OD -	
Toxocariasis +	a	b	a + b
Toxocariasis -	c	d	c + d
Total	a + c	b + d	

$$\text{Sensitivitas} = \frac{a}{a + b} \times 100 \%$$

$$\text{Spesifisitas} = \frac{d}{c + d} \times 100 \%$$

7.2.6 Uji presisi dan akurasi teknik IDAS-ELISA dengan *indirect*-ELISA

Untuk membakukan teknik *sandwich*-ELISA dilakukan uji presisi dan akurasi pada kasus toxocariasis di lapangan terhadap 64 sampel feses dan serum darah anjing. Sampel feses dan serum darah diperoleh dari anjing yang dipotong untuk dikonsumsi manusia. Pengambilan sampel dilakukan untuk tempat pemotongan anjing di Nganjuk dan Surabaya, Jawa Timur. Sampel feses yang diperoleh juga diperiksa secara konvensional dengan *formol ether test* ini diperlukan untuk *recovery check* terhadap teknik DAS-ELISA untuk pemeriksaan *coproantigen* dan IC-ELISA untuk pemeriksaan antibodi dalam serum darah. Secara keseluruhan hasil uji tersebut dibandingkan juga dengan keberadaan infeksi cacing lain.

7.3 Jadwal Kerja

Rencana jadwal kegiatan penelitian untuk tahap selanjutnya (tahun III) dapat dilihat pada Tabel 7.1.

**RINCIAN USUL PEMBIAYAAN PENELITIAN HIBAH BERSAING X-3
PERGURUAN TINGGI TAHUN ANGGARAN 2008/2009**

Justifikasi Anggaran Tahun Ketiga 2008/2009

A. Anggaran pelaksanaan penelitian	Besar anggaran (Rupiah)
Honorarium pelaksanaan penelitian	
Peneliti utama (10 jam/minggu) Rp7.000x10x4x10x1	2.800.000,00
Anggota tim pemeliti (6 jam/minggu) Rp5.000x6x4x10x3	3.600.000,00
Teknisi (6 jam/minggu) Rp3.685x6x4x10x2	1.768.800,00
Jumlah	8.168.000,00
 B. Anggaran untuk bahan aus	
ATK (Alat tulis kantor)	
Kertas HVS ukuran folio 2 rim @ Rp30.000	60.000,00
Kertas HVS ukuran A4 2 rim @ Rp25.000	50.000,00
Spidol transparansi 1 set	75.000,00
Inkjet transparency films 50 sheets Fullmark	250.000,00
Disket	25.000,00
Pembuatan slide	75.000,00
Repro foto Polaroid	62.500,00
Penggandaan foto	37.500,00
Surat menyurat	125.000,00
Jumlah	760.000,00
 Pembelian bahan habis	
Biaya pengambilan serum anjing	250.000,00
Mencit Balbc 50 ekor	187.500,00
Pakan mencit 100 kg	250.000,00
Kandang mencit 10 buah	300.000,00
Aluminium foil	62.500,00
Gloves disposable	62.500,00
Mini eppy storage tubes	312.500,00
Tissue	62.500,00
Pippetes tips 0.2 ml 1000	343.500,00
Pippetes tips 10 µl 1000	250.000,00
Pippetes tips 2 µl 1000	187.500,00
Plastic cling wrap	37.500,00
Syringe 2.5 ml 100	125.000,00
Syringe 1.0 ml 100	125.000,00
Dipindahkan	2.556.000,00

	Pindahan	2.556.000,00
Microplate ELISA 2 box		1.500.000,00
Plate 24 TC 2 box		750.000,00
Tabung centrifuge 1,5 ml 1 box		250.000,00
Tabung centrifuge 15 ml 2 box		500.000,00
Tabung centrifuge 50 ml 2 box		375.000,00
Filter 0,2 mikron 1 box		375.000,00
Filter 0,45 mikron 1 box		375.000,00
Flash 25 cm 3 box		1.000.000,00
	Jumlah	7.681.000,00
Pembelian bahan kimia		
Ether PA 2 liter @ 175.000,00		350.000,00
Chloroform PA 1 liter		253.500,00
FBS 2 botol		4.375.000,00
RPMI 2 pak		750.000,00
DMEM 2 pak		750.000,00
Conjugate anti-dog		4.000.000,00
Enzim alkalin fosfatase		4.375.000,00
Glutaraldehida		587.500,00
Etilenamin		375.000,00
BSA 25 gram		675.000,00
Diethanolamine 100 ml		800.000,00
Aceton		750.000,00
PNPP 1 pak		637.500,00
Amonium sulfat pa		275.000,00
Conjugate goat antimouse 0,25 ml		4.000.000,00
Sodium fosfat		500.000,00
Gliserin		437.500,00
Pristane		1.875.000,00
DMSO 100 ml		500.000,00
Metanol pa		500.000,00
	Jumlah	26.766.000,00
	Jumlah point B	35.207.000,00
C. Peralatan		
Pemeliharaan/perbaikan alat		3.500.000,00
	Jumlah	3.500.000,00
D. Anggaran untuk Perjalanan		
Dalam kota (koleksi sampel)		1.875.000,00
	Jumlah	1.875.000,00

E. Pengeluaran lain-lain	
Penyusunan/perbanyak laporan	187.500,00
Seminar	250.000,00
Pertemuan/rapat	187.500,00
Fotocopy	312.500,00
Bahan pustaka	312.500,00
	Jumlah
	1.250.000,00
JUMLAH BIAYA SELURUHNYA	50.000.000,00

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. 2003. Cellular and Molecular Immunology. 5th ed. Philadelphia Saunders Company. pp. 360-362
- Abdel-Rahman EH. 2000. Isolation and structural characterization of *Toxocara vitulorum* specific antigen and its potency in diagnosis of toxocariasis among buffalo calves. Abstract. J. Egypt. Soc. Parasitol. 30(2): 387-400
- Abdel-Rahman EH and Abdel-Megeed KN. 2000. Molecular identity of major cross-reactive adult antigens in *Fasciola gigantica*, *Toxocara vitulorum* and *Moniezia expansa*. Abstract. J. Egypt. Soc. Parasitol. 30(2): 561-71
- Abdel-Rahman EH, Abdel-Megeed KN, and Hassanain MA. 2000. Structural characterization dan immunocatalization of egg antigens cross-react with *Toxocara vitulorum*, *Fasciola gigantica* and *Moniezia expansa*. Abstract. J. Egypt. Soc. Parasitol. 30(2): 581-91
- Alonso JM, Bojanich MV, Chamarro M, Gorodner JO. 2000. Toxocara seroprevalence in children from a subtropical city in Argentina. Abstract. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 42(4): 235-7
- Amerasinghe PH, Rajapakse RP, Lloyd S, Fernando ST. 1992. Antigen-induced protection against infection with *Toxocara vitulorum* larvae in mice. Parasitol. Res. 78(8):643-7
- Amin HI, McDonald HR, Han DP, Jaffe GJ, Johnson MW, Lewis H, Lopez PF, Mieler F, Neuwirth J, Sternberg P Jr, Werner JC, Ai E, Johnson RN. 2000. Vitrectomy update for macular traction in ocular toxocariasis. Retina. 20(1):80-5
- Anders RF., Howard RJ, and Mitchell GF. 1982. Parasitic and methods of analysis. In: Immunology of Parasit Infections. Oxford, Blackwell Scientific Publication. pp: 529-539
- Badley JE, Grieve RB, and Bowman DD. 1987. Immune-mediated adherence of eosinophils to *Toxocara canis* infective larvae: the role of the excretory-secretory antigens. Parasite Immunol. 9: 133-143.
- Bambell FWR. 1970. Transmission of passive immunity from mother to young. Amsterdam: North Holland Publishing & Co. pp: 158-159.
- Barriga OO, and Omar HM. 1992. Immunity to *Toxocara vitulorum* repeated infections in a rabbit model. Vet. Immunol. Immunopathol. 33(3):249-60
- Bowman DD, Mika-Grieve M, and Grieve RB. 1987. *Toxocara canis*: monoclonal antibodies to larval excretory-secretory antigens that bind with genus and species specificity to the cuticular surface of infective larvae. Exp. Parasitol. 64(3): 458-65
- Castillo D, Paredes C, Zanartu C, Castillo G, Mercado R, Munoz V, and Schenone H. 2000. Environment contamination with *Toxocara* sp eggs in public squares and parks from Santiago, Chile, 1999. Bol Chil Parasitol; 55(3-4): 86-91

- Chappell H, Haeney M. 1992. Essential of Clinical Immunology. Mellbouerne. pp. 65
- Cohen S, and Warren KS. 1982. Immunology of Parasitic Infections. 2nd Ed. Melbourne, Blackwell Sci. Publ. pp. 284-5
- de Savigny. 1980. The cummunication of ELISA data from laboratory to clinician. J. of Immunoassay. 1(1): 105-128.
- Despommier D. 3003. Toxocariasis: Clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects. Clin. Microbiol. Reviews, 16(2): 265-272
- Doedens A, Loukas A, and Maizels RM. 2001. A cDNA encoding Tc-MUC-5, a mucin from *Toxocara canis* larvae identified by expression screening. Acta Trop. 79: 211-217.
- DrenchRite. 1996. Larval Development Assay. A product of Csiro reseach. Horizon Technology Pty Limited. Roseville, Australia.
- el-Massry AA. 1999. Characterization of antigenic property of *Toxocara canis* and *Toxascaris leonine* adults and larvae through immunodiagnostic electrophoresis (SDS-PAGE) and western blot technique. J. Egypt. Soc. Parasitol. 29(2): 335-45
- Fonrouge R, Guardis MV, Radman NE, and Archelli SM. 2000. Soil contamination with *Toxocara* sp. eggs in squares and public places from the city of La Plata, Buenos Aires Argentina. Bol Chil Parasitol; 55(3-4): 83-5
- Glickman LT, Dubey JP, Winslow LJ. 1981. Serological responses of *Ascarids* free dog to *Toxocara canis* infection. J. Parasitol. 82: 382-387
- Goffette S, Jeanjean AP, Duprez TP, Bigaignon G, Sindic CJ. 2000. Eosinophilic pleocytosis and myelitis related to *Toxocara canis* infection. Eur. J. Neurol. 7(6): 703-6
- Harlow E and Lane D. 1999. Production of monoklonal antibodies. In: Antibodies. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Lab. New York.
- Hubner J, Uhlikova M, and Leissova M. 2001. Diagnosis of the early phase of larval toxocariasis using IgG avidity. Epidemiol Mikrobiol Imunol. Apr;50(2):67-70
- Humbert P, Niezborala M, Salembier R, Aubin F, Piarroux R, Buchet S, and Barale T. 2000. Skin manifestations associated with toxocariasis: a case-control study. Dermatology; 201(3):230-4
- Husband AJ, Brandon MR, and Lascelles AK. 1972. Absorbtion and endogenous production of immunoglobulin in calves. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci; 50: 490-498.
- Ito K, Sakai K, Okajima T, Quchi K, Funakoshi A, Nishimura J, Ibayashi H, and Tsuji M. 1986. Three cases of visceral larva migrans due to ingestion of raw chickens or cow liver. Nihon Naikagaku Zassi. 75: 759-66
- Koesdarto S. 2002. Penentuan prevalensi toxocariasis pada anjing konsumsi di Kota Surabaya. J. Biosains Pascasarjana Unair, 4(3).

- Kincekova J, Reiterova K, Dubinsky P. 1999. Larval toxocariasis and its clinical manifestation in childhood in the Slovak Republic. *J. Helminthol.* 73(4): 323-8
- Koga K, Kasuya S, Handa Y, Keawvichit R, Wongworapat K, Khamboonruang C, and Ohtomo H. 1992. Agar plate method, a new stool examination method for the diagnosis of strongyloidiasis: Field applicability and sensitivity. *J. Parasitol.*, 78(1): 155-6
- Kondo K. 1989. Toxocariasis. *Saisin-Igaku.* 44: 774-779.
- Kusnoto. 2003. Isolasi dan karakterisasi protein imunogenik larva stadium II *Toxocara cati* isolat lokal. Thesis, Pascasarjana, Universitas Airlangga.
- Kusnoto, 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.
- Kusnoto, Suwarno, Koesdarto S. dan Juniastuti T. 2005a. Produksi Antibodi Monoklonal Menggunakan Antigen Spesifik *Toxocara cati* untuk Diagnosis Dini dengan IDAS-ELISA. Laporan Penelitian Hibah Bersaing XI. Lemlit, Universitas Airlangga, Surabaya.
- Kusnoto, Sri Mumpuni Sosiawati, dan Sri Subekti. 2005b. Isolasi dan karakterisasi protein cathepsin-L dari excretory/secretory material *Fasciola* spp untuk pengembangan diagnosis distomatosis dengan teknik ELISA. Seminar Nasional Biomolekuler dalam Bidang Peternakan. Elmi Hotel, FKH UNAIR.
- Kusnoto, Uga S, Machfudz, Koesdarto S. dan Sri Mumpuni S. 2000. Deteksi telur *Toxocara sp.* dalam tanah di sekitar *playground*, peternakan sapi perah dan rumah potong hewan di Surabaya. Seminar Kajian Epidemiologi Zoonosis Penyakit Cacingan di Wilayah Jatim, Tropical Disease Center, Surabaya.
- Kusumamihardja S. 1993. Parasit dan Parasitosis pada Hewan Ternak dan Hewan Piaraan di Indonesia. PAU Bioteknologi, IPB, Bogor.
- Levine ND. 1978. *Textbook of Veterinary Parasitology.* Burgers Publishing Company. Diterjemahkan oleh: Ashadi G. 1990. Wardiarso Ed. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Lloyd S, and Soulsby E.J.L. 1987. Immunology of G.I. nematode of ruminants. In: Immune Responses in Parasitic Infections, Immunology, Immunopathology and Immunoprophylaxis. Vol I. Soulsby E.J.L. Ed. New York Academic Press; pp: 231-240
- Loukas A, Hintz M, and Linder D. 2000. A family of genes active during the resting stage of the parasite were cloned and their cDNA sequences determined. Secreted mucins from the parasite nematode *Toxocara canis* bears diverse mucin domains but shares similar flanking six-cysteine repeat motifs. *J. Biol. Chem.* 275: 39600-39607.
- Maizels RM, Tetteh KKA, and Loukas A. 2000. *Toxocara canis* genes expressed by the arrested infective larval stage of a parasitic nematode. *Int. J. for Parasitology*, 30(4): 495-508.

- Manus DPM. 1986. Intermediary metabolism in parasitic helminth. In: Howell. Procc. Of the Sixth International Congress of Parasites. pp. 79-89.
- Matsumura K, Kazuta Y, Endo R, and Tanaka K. 1983. The Ig M antibody in relation to the parasite statues of *Toxocrz canis* in dogs. Zentralblat Bacteriol. Microbiol. Hyg. A. 255: 402-405
- Moreira-Silva SF, Pereira FE. 2000. Intestinal nematodes, *Toxocara* infection, and pyogenic liver abscess in children: a possible association.. J Trop Pediatr. Jun;46(3):167-72
- Nicholas WL, Stewart AC and Mitchell GF. 1984. Antibody Responses to *Toxocara canis* Using Sera from Parasite-Infected Mice and Protection from Toxocariasis by Immunisation with ES Antigens. J Exp Biol Med Sci; 62 (5):619-26.
- Overgaaauw PA. 1997^a. Aspects of *Toxocara* epidemiology: toxocariasis in dogs and cats. Crit. Rev. Microbiol. 23(3): 233-51
- Overgaaauw PA. 1997^b. Aspects of *Toxocara* epidemiology: human toxocariasis. Crit. Rev. Microbiol. 23(3): 215-31
- Ozeretskovskaia NN. 2000. The organ pathology in the acute stage of tissue 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, Rudin W, Fluri E, Blaxter ML, and Maizels RM. 1992. *Toxocara canis*: a labile antigenic coat overlying the epicuticle of infective larvae. Exp. Parasitol. 75: 72-86.
- Park SP, Huh S, Magnaval JF, and Park I. 1999. A case of presumed ocular toxocariasis in a 28-year old woman. Korean J Ophthalmol. Dec;13(2):115-9
- Park SP, Park I, Park HY, Lee SU, Huh S, and Magnaval JF. 2000. Five cases of ocular toxocariasis confirmed by serology. Korean J Parasitol. Dec;38(4):267-73
- Parsons JC. 1987. Ascarid infections of cats and dogs. Vet. Clin. Noth. Am. Pract. 17(6): 1307-39
- Pearse EJ and Sher A. 1990. immunity to helminth. In: Current Opinion Immunology. USA National Institute for Allergy and Infectious Diseases. 2: 235-379
- Petithory JC, Beddok A, and Quedoc M. 1994. Ascariasis zoonosis: visceral larva migrans syndromes. Bull. Acad. Natl. Med. 178(4): 635-47
- Playfair JHL. 1992. Immunology at a Glance. 5th Ed. Blackwell Scientific Publications. University Press, Cambridge.
- Prokopowicz D and Sosnowska D. 1990. Toxocariasis. Abstrac. Przegl. Epidemiol. 44(3): 193-8
- Prunier F, Delepine S, Victor J, de Gentile L, Moreau C, Laporte J, Dupuis JM, Geslin P. 2001. Loffler's fibroblastic endocarditis. A report of a case complicating toxocarosis. Arch. Mal. Coeur. Vaiss. 94(3): 226-30

- Radman NE, Archelli SM, Fonrouge RD, del V Guardis M, and Linzitto OR. 2000. Human toxocarosis. Its seroprevalence in the city of La Plata. Mem Inst Oswaldo Cruz May-Jun;95(3):281-5
- Rajapakse RPVJ. 1992. Immunological response of buffalo cows and calves to *Toxocara vitulorum* infection. Dissertation. Submitted for the Degree of Doctor of Philosophy. University of Paradeniya. Sri Lanka.
- Rantam, FA. 1997. Bornavirus and cells culture. Isolation infections *Bornavirus* from human and animal and their characterization. Dissertation. Vet. Med. FV-Berlin.
- Rantam, FA. 2003. Metode Imunologi. Airlangga University Press. Surabaya. Hal.3-9.
- Rayes AA, Teixeira D, Serufo JC, Nobre V, Antunes CM, and Lambertucci JR. 2001. Human toxocariasis and pyogenic liver abscess: a possible association. Am J Gastroenterol; 96(2): 563-6
- Robert JA. 1992. The persistence larvae of *Toxocara vitulorum* in the tissues of Asian buffalo cows. J Buffalo. Accepted for Publication.
- Robert JA. 1993. *Toxocara vitulorum* in ruminant. Vet. Bull. 63(6): 545-568.
- Roitt I, Brostoff J, and Male D. 1998. Immunology. 4th Ed. Barcelona, Spain: Mosby, Times Mirror International Publishers Limited.
- Safar EH, el-Rifaei F, and Maklad KM. 1992. Protein chromatographic study on adult *Ascaris lumbricoides*, *Ascaris vitulorum* and *Toxocara canis*. J. Egypt. Soc. Parasitol. 22(1): 171-6
- Schulze C, Rothuizen J, van Sluijs FJ, Hazewinkel HA, van den Ingh TS. 2000. Extrahepatic biliary atresia in a border collie. J Small Anim Pract. Jan;41(1):27-30
- Smith H.A, Jones T.C, Hunt R.D. 1972. Veterinary Pathology. Lea & Febiger. United States of America. P.734-737.
- Soulsby E.J.L. 1986. Helminth, Arthropods and Protozoa of Domestic Animals. London: Bailliere Tindall and Cassell.
- Soulsby E.J.L. 1989. Toxocariasis. Brit.Vet. J. 139: 471-475.
- Starke WA, Machado RZ, Bechara GH, and Zocoller MC. 1996. Skin hypersensitivity test in buffaloes parasitized with *Toxocara vitulorum*. Vet Parasitol; 63(3-4): 283-90
- Stites DP, Terr AI, Parlow TG. 1997. Medical Immunology. 9th Ed. USA: A Simon & Schuster Company, Prentice-Hall International Inc.
- Tizard Ian R. 1982. An Introduction to Veterinary Immunology. WB Saunders Company. Diterjemahkan oleh Masduki Partodiredjo dan Soehardjo Hardjosworo. 1987. Airlangga University Press. hal. 303-324
- Trisunuwati P. 1997. Penemuan protein imunogen larva *Toxocara vitulorum*, sebagai usaha menemukan metode imunodiagnosis dini *Toxocariasis* pada induk sapi. Disertasi. Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

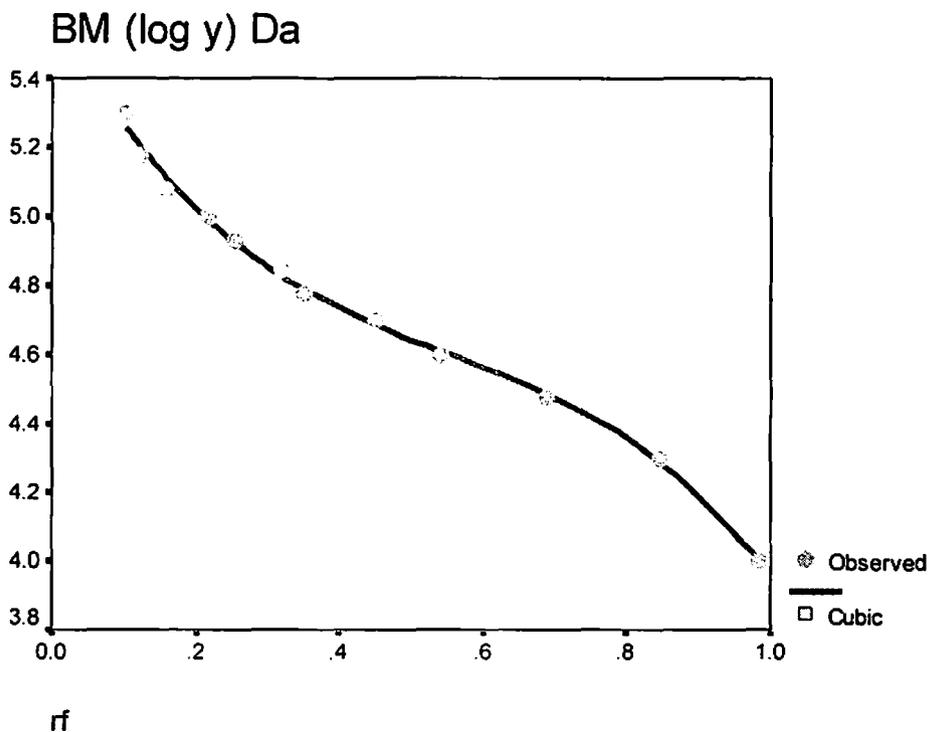
- Tung YC, Chang SF, Ko YC, Chen HY, and Lin KH. 1995. Comparison of the genetic variation in type I Dengue Virus isolates in Taiwan 1987-1992. *Kaohsiung J. Med. Sci.* 11: 243-249.
- Uga S, Matsumura T, Fujisawa K, Okubo K, Kataoka N, and Kondo K. 1990. Incidence of seropositivity to human toxocariasis in Hyogo Prefecture, Japan, and Its possible role in ophthalmic disease. *Jpn. J. Parasitol.* 39(5): 500-502.
- van Knapen F, van Leusden J, Polderman A.M, and Franchimont J.H. 1983. Visceral Larva Migrans : Examination by Means of Enzyme Linked Immunosorbent Assay of Human Sera for Antibodies to Excretory-Secretory Antigens of the Second-Stage Larvae of *Toxocara canis*. *Z. Parasitenkd* ;69(1):113-8.
- Warren KS. 1993. *Immunology and Molecular Biology of Parasit Infections*. Eidinburg, Blackwell Sc. pp. 55.
- Yoshida M, Shirao Y, Asai H, Nagase H, Nakamura H, Okazawa T, Kondo K, Takayanagi TH, Fujita K, Akao N. 1999. A retrospective study of ocular toxocariasis in Japan: correlation with antibody prevalence and ophthalmological findings of patients with uveitis. *J. Helminthol.* 73(4): 357-61

Lampiran 1. Penghitungan BM Protein Menggunakan Persamaan Regresi antara Nilai *Retardation Factor* (rf) dengan Log BM pada Marker

No	Jarak ¹	Rf ²	BM (y KDa)	BM (y Da)	log y (Da)
1	10.0	0.104	200.0	200000	5.301
2	12.0	0.125	150.0	150000	5.176
3	15.0	0.156	120.0	120000	5.079
4	21.0	0.219	100.0	100000	5.000
5	24.0	0.250	85.0	85000	4.929
6	31.0	0.323	70.0	70000	4.845
7	34.0	0.354	60.0	60000	4.778
8	43.0	0.448	50.0	50000	4.699
9	52.5	0.547	40.0	40000	4.602
10	66.0	0.688	30.0	30000	4.477
11	81.5	0.849	20.0	20000	4.301
12	95.0	0.990	10.0	10000	4.000

jarak (antara gel preparasi dengan pita yang terbentuk pada marker; ²rf = pembagian jarak dengan panjang gel.

Curve Fit



Lanjutan Lampiran 1

Penghitungan Berat Molekul (kDa) Protein pada Sampel

No	Jarak ¹	Rf ²	BM (log y ³ kDa)	BM (antilog y Da)	BM (antilog y kDa)	Keterangan
1	10.0	0.082	5.32	208449.0	208.4	Dewasa
2	16.5	0.135	5.17	147910.8	147.9	
3	21.0	0.172	5.08	120226.4	120.2	
4	24.0	0.197	5.03	107152.0	107.2	
5	27.0	0.221	4.98	95499.3	95.5	ES L2J
6	30.0	0.246	4.94	87096.3	87.1	
7	33.0	0.270	4.90	79432.8	79.4	
8	37.0	0.303	4.85	70794.6	70.8	
9	42.0	0.344	4.80	63095.7	63.1	
10	47.5	0.389	4.74	54954.1	55.0	ES L2J
11	53.0	0.434	4.70	50118.7	50.1	Dewasa
12	55.0	0.451	4.69	48977.9	49.0	
13	58.0	0.475	4.66	45708.8	45.7	
14	63.0	0.516	4.63	42658.0	42.7	
15	67.0	0.549	4.61	40738.0	40.7	
16	72.5	0.594	4.57	37153.5	37.2	
17	77.0	0.631	4.54	34673.7	34.7	Dewasa
18	81.0	0.664	4.51	32359.4	32.4	
19	85.0	0.697	4.48	30199.5	30.2	
20	89.0	0.730	4.45	28183.8	28.2	
21	96.0	0.787	4.38	23988.3	24.0	
22	98.0	0.803	4.36	22908.7	22.9	
23	102.5	0.840	4.30	19952.6	20.0	
24	103.5	0.848	4.29	19498.5	19.5	
25	105.5	0.865	4.26	18197.0	18.2	Dewasa
26	119.0	0.975	4.03	10715.2	10.7	

*Pita protein didapatkan pada cacing dewasa maupun ESL2J; ¹jarak antara gel preparasi dengan pita yang terbentuk pada marker; ²rf = pembagian jarak dengan panjang gel (=122mm); ³y = 5.599 - 3,841x + 5,524x² - 3,322 x³

Lampiran 2. Hasil Pembacaan ELISA-reader (Nilai *Optical Density*) dengan Panjang Gelombang 405nm

Plate-1

	P0-1	P0-2	P0-3	P1-1	P1-2	P1-3	P2-1	P2-2	P2-3	P3-1	P3-2	P3-3
A	0,007	0,007	0,001	0,003	0,002	0,010	0,008	0,007	0,006	0,001	0,009	0,008
B	0,446	0,246	0,266	0,627	0,450	0,257	0,570	0,428	0,495	0,548	0,591	0,376
C	0,307	0,149	0,187	0,408	0,304	0,200	0,343	0,286	0,369	0,379	0,480	0,270
D	0,215	0,086	0,128	0,286	0,187	0,114	0,196	0,174	0,227	0,291	0,323	0,189
E	0,121	0,063	0,069	0,226	0,136	0,117	0,129	0,131	0,125	0,237	0,214	0,116
F	0,056	0,045	0,038	0,145	0,106	0,059	0,078	0,088	0,073	0,143	0,150	0,074
G	0,031	0,027	0,021	0,084	0,067	0,036	0,047	0,055	0,044	0,104	0,095	0,050
H	0,016	0,020	0,041	0,042	0,042	0,014	0,029	0,025	0,044	0,075	0,062	0,022
0493	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+

A, PBS; B-E sampel dengan pengenceran semakin tinggi.

Plate-2

	P0-4	P0-5	P0-6	P1-4	P1-5	P1-6	P2-4	P2-5	P2-6	P3-4	P3-5	P3-6
A	0,002	0,007	0,003	0,005	0,005	0,008	0,006	0,005	0,004	0,006	0,002	0,003
B	0,260	0,246	0,261	0,620	0,451	0,624	0,620	0,420	0,452	0,581	0,533	0,590
C	0,188	0,149	0,186	0,403	0,307	0,403	0,402	0,281	0,311	0,482	0,479	0,482
D	0,122	0,086	0,123	0,280	0,184	0,281	0,296	0,177	0,189	0,328	0,290	0,325
E	0,068	0,063	0,068	0,228	0,139	0,229	0,236	0,121	0,146	0,264	0,247	0,223
F	0,032	0,045	0,037	0,147	0,109	0,142	0,175	0,078	0,114	0,153	0,152	0,151
G	0,021	0,027	0,021	0,084	0,067	0,084	0,084	0,055	0,067	0,095	0,104	0,095
H	0,014	0,020	0,011	0,047	0,045	0,045	0,052	0,035	0,043	0,060	0,072	0,065
0493	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

A, PBS; B-E sampel dengan pengenceran semakin tinggi.

Lampiran 3. Analisis Statistik Hasil Pembacaan ELISA-reader (Nilai *Optical Density*) dengan Panjang Gelombang 405nm dengan Uji Anava

Summarize

Case Summaries^a

			Optical Density	
Imunisasi	Plasebo	1	.031	
		2	.027	
		3	.021	
		4	.021	
		5	.027	
		6	.021	
		Total	Sum	.148
			Mean	.02467
			Std. Deviation	.004274
		p120 kDa	1	.084
	2		.067	
	3		.036	
	4		.084	
	5		.067	
	6		.084	
	Total	Sum	.422	
		Mean	.07033	
		Std. Deviation	.018769	
	p70 kDa	1	.047	
		2	.055	
		3	.044	
		4	.084	
		5	.055	
		6	.067	
	Total	Sum	.352	
		Mean	.05867	
		Std. Deviation	.014760	
	p32 kDa	1	.104	
		2	.095	
		3	.050	
		4	.095	
		5	.104	
		6	.095	
	Total	Sum	.543	
		Mean	.09050	
		Std. Deviation	.020325	
	Total	Sum	1.465	
		Mean	.06104	
		Std. Deviation	.028518	

a. Limited to first 100 cases.

Lanjutan Lampiran 3

Oneway

Descriptives

Optical Density

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Minimum	Maximum
Plasebo	6	.02467	.004274	.001745	.021	.031
p120 kDa	6	.07033	.018769	.007662	.036	.084
p70 kDa	6	.05867	.014760	.006026	.044	.084
p32 kDa	6	.09050	.020325	.008298	.050	.104
Total	24	.06104	.028518	.005821	.021	.104

ANOVA

Optical Density

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.014	3	.005	18.236	.000
Within Groups	.005	20	.000		
Total	.019	23			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Optical Density

Tukey HSD

(I) Imunisasi	(J) Imunisasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Plasebo	p120 kDa	-.045667*	.009136	.000	-.07124	-.02010
	p70 kDa	-.034000*	.009136	.007	-.05957	-.00843
	p32 kDa	-.065833*	.009136	.000	-.09140	-.04026
p120 kDa	Plasebo	.045667*	.009136	.000	.02010	.07124
	p70 kDa	.011667	.009136	.587	-.01390	.03724
	p32 kDa	-.020167	.009136	.155	-.04574	.00540
p70 kDa	Plasebo	.034000*	.009136	.007	.00843	.05957
	p120 kDa	-.011667	.009136	.587	-.03724	.01390
	p32 kDa	-.031833*	.009136	.012	-.05740	-.00626
p32 kDa	Plasebo	.065833*	.009136	.000	.04026	.09140
	p120 kDa	.020167	.009136	.155	-.00540	.04574
	p70 kDa	.031833*	.009136	.012	.00626	.05740

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

Homogeneous Subsets**Optical Density**Tukey HSD^a

Imunisasi	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
Plasebo	6	.02467		
p70 kDa	6		.05867	
p120 kDa	6		.07033	.07033
p32 kDa	6			.09050
Sig.		1.000	.587	.155

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

Lampiran 4. Analisis Statistik Hasil Pembacaan ELISA-reader (Nilai *Optical Density*) dengan Panjang Gelombang 405nm dengan Uji *Chi Square*

Crosstabs

Imunisasi * 2 x COV K-(0,0493) Crosstabulation

		2 x COV K-(0,0493)		Total	
		Negatif ($<2 \times \text{COV K-}$)	Positif ($>2 \times \text{COV K-}$)		
Imunisasi	Plasebo	Count	6	0	6
		Expected Count	2.3	3.8	6.0
		% within Imunisasi	100.0%	.0%	100.0%
		% within 2 x COV K-(0,0493)	66.7%	.0%	25.0%
		% of Total	25.0%	.0%	25.0%
p120 kDa		Count	1	5	6
		Expected Count	2.3	3.8	6.0
		% within Imunisasi	16.7%	83.3%	100.0%
		% within 2 x COV K-(0,0493)	11.1%	33.3%	25.0%
		% of Total	4.2%	20.8%	25.0%
p70 kDa		Count	2	4	6
		Expected Count	2.3	3.8	6.0
		% within Imunisasi	33.3%	66.7%	100.0%
		% within 2 x COV K-(0,0493)	22.2%	26.7%	25.0%
		% of Total	8.3%	16.7%	25.0%
p32 kDa		Count	0	6	6
		Expected Count	2.3	3.8	6.0
		% within Imunisasi	.0%	100.0%	100.0%
		% within 2 x COV K-(0,0493)	.0%	40.0%	25.0%
		% of Total	.0%	25.0%	25.0%
Total		Count	9	15	24
		Expected Count	9.0	15.0	24.0
		% within Imunisasi	37.5%	62.5%	100.0%
		% within 2 x COV K-(0,0493)	100.0%	100.0%	100.0%
		% of Total	37.5%	62.5%	100.0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	14.756 ^a	3	.002
Likelihood Ratio	18.710	3	.000
Linear-by-Linear Association	9.847	1	.002
N of Valid Cases	24		

a. 8 cells (100.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2.25.

Lanjutan Lampiran 4

Crosstabs

Imunisasi * 2 x COV K-(0,0493) Crosstabulation

			2 x COV K-(0,0493)		Total
			Negatif (<2xCOV K-)	Positif (>2xCOV K-)	
Imunisasi	Plasebo	Count	6	0	6
		Expected Count	4.0	2.0	6.0
		% within Imunisasi	100.0%	.0%	100.0%
		% within 2 x COV K-(0,0493)	75.0%	.0%	50.0%
		% of Total	50.0%	.0%	50.0%
p70 kDa		Count	2	4	6
		Expected Count	4.0	2.0	6.0
		% within Imunisasi	33.3%	66.7%	100.0%
		% within 2 x COV K-(0,0493)	25.0%	100.0%	50.0%
		% of Total	16.7%	33.3%	50.0%
Total		Count	8	4	12
		Expected Count	8.0	4.0	12.0
		% within Imunisasi	66.7%	33.3%	100.0%
		% within 2 x COV K-(0,0493)	100.0%	100.0%	100.0%
		% of Total	66.7%	33.3%	100.0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	6.000 ^b	1	.014		
Continuity Correction ^a	3.375	1	.066		
Likelihood Ratio	7.638	1	.006		
Fisher's Exact Test				.061	.030
Linear-by-Linear Association	5.500	1	.019		
N of Valid Cases	12				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 4 cells (100.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2.00.