

Gizi dan Penyakit Tropis

LAPORAN PENELITIAN STRATEGIS NASIONAL
TAHUN ANGGARAN 2009



MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

PROFIL SUBKELAS IgG SERUM MENCIT ANTI-*Toxocara canis* SEBAGAI
DASAR PEMILIHAN MARKER SPESIFIK UNTUK PEMERIKSAAN ANTIBODI
PADA KASUS TOXOCARIASIS

Ketua Peneliti dan Anggota

Dr. Kusnoto, MSi., drh.

Sri Mumpuni Sosiawati, MKes., drh.

Dibiayai oleh DIPA Universitas Airlangga Tahun Anggaran 2009, sesuai dengan Surat
Keputusan Rektor Universitas Airlangga Tentang Kegiatan Penelitian Strategis Nasional
Nomor: 276/H3/KR/2009, Tanggal 16 Februari 2009

UNIVERSITAS AIRLANGGA
Oktober, 2009

Gizi dan Penyakit Tropis

LAPORAN PENELITIAN STRATEGIS NASIONAL
TAHUN ANGGARAN 2009

klc
klcc
LP.50/110
kus
P



MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

PROFIL SUBKELAS IgG SERUM MENCIT ANTI-*Toxocara canis* SEBAGAI
DASAR PEMILIHAN MARKER SPESIFIK UNTUK PEMERIKSAAN ANTIBODI
PADA KASUS TOXOCARIASIS

Ketua Peneliti dan Anggota

Dr. Kusnoto, MSi., drh.

Sri Mumpuni Sosiawati, MKes., drh.

Dibiayai oleh DIPA Universitas Airlangga Tahun Anggaran 2009, sesuai dengan Surat
Keputusan Rektor Universitas Airlangga Tentang Kegiatan Penelitian Strategis Nasional
Nomor: 276/H3/KR/2009, Tanggal 16 Februari 2009

UNIVERSITAS AIRLANGGA

Oktober, 2009

HALAMAN PENGESAHAN
LAPORAN KEMAJUAN PENELITIAN STRATEGIS NASIONAL

1. Judul Penelitian : Profil Subkelas IgG Serum Mencit Anti-*Toxocara canis* sebagai Dasar Pemilihan Marker Spesifik untuk Pemeriksaan Antibodi pada Kasus Toxocariasis

2. Ketua Peneliti

- a. Nama Lengkap : Dr. Kusnoto, drh., MSi.
- b. Jenis Kelamin : L / P
- c. NIP : 132 161 171
- d. Jabatan Struktural : -.....
- e. Jabatan fungsional : Lektor Kepala
- f. Fakultas/Jurusan : Fakultas Kedokteran Hewan
- g. Pusat Penelitian :
- h. Alamat : Kampus C UNAIR, Jl. Mulyorejo, Surabaya.
- i. Telpon/Faks : 031-5998527; Fax. 031-5993015 e-mail:
vetunair@telkom.net
- j. Alamat Rumah : Jl. Kalikepiting Bhaskara No 41 Surabaya. 60132
- k. Telpon/Faks/E-mail : 031-3818859; e-mail: kusnoto3k@unair.ac.id

3. Jangka Waktu Penelitian: 1 tahun

4. Pembiayaan

- a. Jumlah biaya yang diajukan ke Dikti : Rp 100.000.000,00
- b. Jumlah biaya dari sumber pembiayaan lain : Rp -.....

Mengetahui :

a.n. Dekan Fakultas Kedokteran Hewan,
Wakil Dekan I

Dr. H. Anwar Ma'ruf, drh., Kes.

NIP 132 049 017

Surabaya, 26 Oktober 2009

Ketua Peneliti,

Dr. Kusnoto, drh., MSi.

NIP 132 161 171

Menyetujui :

Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Unair,



Prof. Dr. Bambang Sektiari Lukiswanto, drh., DEA.

NIP 131 837 004

PRAKATA

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

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

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

Dengan selesainya disertasi ini perkenankan saya juga menyampaikan terima kasih yang sebesar besarnya kepada:

Rektor Universitas Airlangga Prof. Dr. H. Fasichul Lisan, Apt. atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya, untuk mengikuti seleksi proposal Penelitian Hibah Strategis Nasional tahun anggaran 2009.

Ketua Lembaga Penelitian Universitas Airlangga Prof. Dr. Bambang Sektiari Lukiswanto, drh., DEA. atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada kami, untuk mengikuti seleksi proposal Penelitian Hibah Strategis Nasional tahun anggaran 2009.

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Prof. Hj. Romziah Sidik, drh., PhD. atas kesempatan dan rekomendasi yang diberikan kepada kami untuk mengikuti seleksi proposal Penelitian Hibah Strategis Nasional tahun anggaran 2009.

Ketua Departemen Parasitologi, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Prof. Dr. H. Setiawan Koesdarto, drh., MSc. dan seluruh Staf Parasitologi atas fasilitas yang diberikan kepada saya untuk melaksanakan penelitian hingga laporan ini dapat terselesaikan.

Ketua Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh. dan seluruh staf atas fasilitas yang diberikan kepada saya untuk melaksanakan penelitian hingga laporan ini dapat terselesaikan.

Ketua Lembaga Penyakit Tropis Universitas Airlangga Dr. Nasronudin, dr., Sp.PD., K-PTI dan seluruh staf atas fasilitas yang diberikan kepada saya untuk melaksanakan penelitian 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.

RINGKASAN

PROFIL SUBKELAS IgG SERUM MENCIT ANTI-*Toxocara canis* SEBAGAI DASAR PEMILIHAN MARKER SPESIFIK UNTUK PEMERIKSAAN ANTIBODI PADA KASUS TOXOCARIASIS (Kusnoto dan Sri Mumpuni Sosiawati, 72 halaman)

Departemen Parasitologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, Surabaya.

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).

Secara keseluruhan penelitian ini merupakan bagian dari payung penelitian dengan target akhir berupa *kit diagnostik* untuk diagnosis etiologik hingga pada tingkat spesies dan vaksin anti-nematoda. Tujuan khusus penelitian ini meliputi: Mendapatkan protein spesifik ES-L2J *T. canis* yang dapat digunakan sebagai antigen pada pemeriksaan dengan ELISA dan imunogen pada pembuatan antibodi monoklonal; Menentukan nilai antigenisitas, sensitivitas dan spesifisitas protein ES *T. canis* pada diagnosis toxocariasis hewan coba (mencit) yang diimunisasi ES-L2J *T. canis* dan homogenat cacing lain dengan teknik *indirect-ELISA*; Menentukan subkelas Ig G spesifik dan dominan pada respon imun humoral mencit terhadap infeksi *T. canis* yang dapat digunakan sebagai biomarker untuk pengembangan diagnosis toxocariasis pada pemeriksaan serum dengan teknik ELISA- *isotyping kit*.

Prosedur penelitian ini meliputi: 1) Koleksi dan Identifikasi *Toxocara spp.* dari Anjing yang terdiri dari: a) Isolasi cacing dewasa, b) Isolasi larva stadium kedua (L2) *T. canis*, c) Isolasi larva stadium kedua dorman dari jaringan mencit (L2J) *T. canis*, d) Pembuatan homogenat L2, L2 dorman dan cacing dewasa; 2) Analisis protein *Toxocara canis* dengan teknik SDS-PAGE; 3) Karakterisasi protein *T. canis*, isolasi protein spesifik dan uji reaksi silang antara antigen *T. cati* dengan serum anti-*T. canis* dengan teknik *Western blot*; 4) Uji Antigenisitas protein dengan teknik *dot blot* dan ELISA pada mencit yang diinfeksi *Toxocara canis*; 5) Uji Antigenisitas, sensitivitas dan spesifisitas protein dengan teknik elisa pada mencit yang diimunisasi berbagai homogenat cacing; dan 6) Pengamatan profil subkelas IgG dengan ELISA-*isotyping kit*.

T. canis memiliki banyak protein dengan BM beragam dari 8 - 200 kDa; Berdasarkan hasil *Western blot* dapat disimpulkan protein spesifik *T. canis* pada BM 168, 120, 91, 80, 70, 62, 51, 48, 45, 42, 38, 35, 32, 24, 18, 14 & 11 kDa dapat dikembangkan untuk diagnostik; sedangkan protein dengan *cross reaction* tinggi untuk kandidat vaksin dan terapi imunologik; Reaksi silang antara Ag *T. cati*-Ab *T. canis* terjadi pada BM 140, 91, 62, 42, 38, 34, 33, 32, 30, 29, 27, 24, 17, 14, 12, dan 10 kDa; reaksi silang antara Ag *T. canis*-Ab *T. cati* terjadi pada BM 160, 140, 120, 91, 80, 70, 54, 42, 38, 35, 34, 33, 32, 30, 29, 27, 24, 20, 18, 14 dan 12 kDa; Reaksi silang tidak terjadi antara Ag *T. cati* dan Ab *T. canis* pada BM 168, 120, 80 dan 70 kDa, dan Ag *T. canis* dan Ab *T. cati* pada BM 168, 51, 48, 45, dan 35 kDa; Berdasarkan nilai OD pada ELISA, protein murni *Toxocara* spp. antigenisitas tinggi terhadap serum anti-*Toxocara* spp., keduanya memiliki antigenisitas yang lebih rendah terhadap cacing lain (*Ancylostoma* spp. dan *D. caninum*), dengan nilai sensitivitas 100% dan spesifisitas 87,5%; Berdasarkan hasil ELISA-*isotyping*, subkelas Ig G dominan dalam serum mencit yang diinfeksi dengan *T. canis* adalah Ig G2 α .

Pada penelitian ini telah dibuktikan bahwa teknik *indirect*-ELISA dengan menggunakan subkelas IgG sebagai antibodi kedua mempunyai peluang untuk dikembangkan sebagai diagnosis etiologik toxocariasis. Subkelas Ig G (IgG2 α) lebih spesifik terhadap infeksi *T. canis*.

ABSTRACT

PROFILE OF SUBCLASS IgG OF MICE'S ANTI- *Toxocara canis* SERA AS A BASIS FOR SPECIFIC MARKER TO ANTIBODIES EXAMINATION IN TOXOCARIASIS

Kusnoto dan Sri Mumpuni Sosiawati

Departement of Parasitology, Faculty of Medicine Veterinary, Airlangga University,
Surabaya.

The objective of this study was to get the specific protein of *T. canis* and to investigate the dominant immunoglobulin that could be used as a biomarker in kit diagnostic to toxocariasis diagnosis through antibody test by indirect-ELISA technique.

This study was done to isolate and characterize *T. canis* protein from *excretory-excretory* (ES) material of L2 dormant by pure protein that was reactive with polyclonal antibody. In the first step, L2 dormant were homogenized by sonication 3X30 seconds and identified by SDS-PAGE with silver staining. The second step, protein was transferred to nitrocellulose membrane used polyclonal antibody of anti-L2 dormant that was visualized through goat-anti rabbit conjugate and BCIP+NBT staining. The third step was decided the specific of protein fractions that was done base on molecule weight (MW) and the specific protein was isolated by elution technique. The fourth was to evaluate the antigenicity, sensitivity and specificity of crude and pure protein by IgG-ELISA as response against *T. canis* infection toward mice and to study the profile IgG and the dominant of subclass IgG as response against *T. canis* infection toward mice.

The results of the study that: 1) *T. canis* have more protein with variation of molecular weight between 8 and 200 kDa; it also the specific and cross reaction proteins of *T. cati* and antibody against *T. canis*; 2) The specific proteins of *T. cati* that not recognized by the anti-*T. canis* sera are as follow proteins of MW 168, 120, 80 and 70 kDa; 3) The specific subclass of Ig G in the anti-*T. canis* mice sera were IgG2 α ; 4) Based on the ELISA OD values, pure protein *Toxocara* spp. have high antigenicity of serum anti-*Toxocara* spp., they have a lower antigenicity against other worms (*Ancylostoma* spp. and *D. caninum*), with a value of 100% sensitivity and specificity of 87.5%.

Key words: toxocariasis, diagnostic, sensitivity, specificity, ELISA.

DAFTAR ISI

	Halaman
SAMPUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
KATA PENGANTAR	iii
RINGKASAN	v
ABSTRACT	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Penelitian	1
1.2 Rumusan Masalah	2
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	3
BAB 3 TUJUAN PENELITIAN	28
1.3.1 Tujuan umum	6
1.3.2 Tujuan khusus	6
BAB 4 METODE PENELITIAN	10
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian	10
4.2 Koleksi dan identifikasi <i>Toxocara</i> spp. dari Anjing	10
4.2.1 Isolasi cacing dewasa	10
4.2.2 Isolasi larva stadium kedua (L2) <i>T. canis</i>	10
4.2.3 Isolasi larva stadium kedua dorman dari jaringan mencit (L2J) <i>T. canis</i>	11
4.2.4 Pembuatan homogenat L2, L2 dorman dan cacing dewasa	11
4.3 Identifikasi protein dengan SDS-PAGE	11
4.3.1 <i>Running</i> SDS-PAGE	11
4.3.2 Penentuan berat molekul (BM) protein	13

4.4	Karakterisasi protein dengan <i>Western blot</i> dan isolasi protein spesifik	13
4.4.1	Pembuatan antibodi poliklonal	14
4.4.2	Karakterisasi protein dan deteksi reaksi silang dengan <i>Western blot</i>	14
4.4.3	Isolasi protein dengan teknik elusi	15
4.4.4	Identifikasi protein murni hasil isolasi	16
4.5	Uji Antigenisitas Protein dengan Teknik <i>Dot Blot</i> dan ELISA pada Mencit yang Diinfeksi <i>Toxocara canis</i>	16
4.5.1	Uji antigenisitas protein murni <i>Toxocara</i> spp.dengan <i>dot-blot</i> ..	16
4.5.2	Produksi L2 <i>Toxocara</i> spp. untuk infeksi buatan	17
4.5.3	Uji antigenisitas <i>crude protein Toxocara</i> spp. dengan <i>indirect-ELISA</i>	17
4.5.4	Uji <i>indirect-ELISA</i>	17
4.6	Uji Antigenisitas, Sensitivitas dan Spesifisitas Protein dengan Teknik ELISA pada Mencit yang Diimunisasi Berbagai Homogenat Cacing	18
4.6.1	Imunisasi pada mencit	18
4.6.2	Uji antigenisitas	19
4.6.3	Uji sensitivitas dan spesifisitas	19
4.7	Pengamatan profil subkelas IgG dengan ELISA- <i>isotyping</i>	20
4.7.1	Koleksi serum mencit	20
4.7.2	Prosedur ELISA- <i>isotyping kit</i>	20
4.8	Rancangan Penelitian dan Analisis Data	21
BAB 5	HASIL DAN PEMBAHASAN	22
5.1	Isolasi Cacing <i>Toxocara</i> spp.	22
5.1.1	Isolasi Cacing Dewasa <i>Toxocara</i> spp.....	22
5.1.2	Isolasi Larva Stadium Kedua (L2) <i>Toxocara canis</i>	22
5.2	Analisis Protein <i>Toxocara canis</i>	25
5.3	Karakterisasi Protein <i>Toxocara canis</i> dan Deteksi Reaksi Silang dengan Teknik <i>Western blot</i>	27
5.3.1	Karakterisasi protein <i>Toxocara canis</i>	27

5.3.2 Deteksi reaksi silang antara antigen <i>T. cati</i> dan serum anti- <i>T. canis</i> dengan teknik <i>Western blot</i>	29
5.4 Identifikasi Protein Murni dari Hasil Isolasi dengan Teknik SDS-PAGE	32
5.5 Hasil Uji Antigenisitas Protein <i>Toxocara canis</i>	34
5.5.1 Hasil uji antigenisitas protein murni <i>T. canis</i> dengan teknik <i>Dot blot</i>	35
5.5.2 Hasil uji antigenisitas protein <i>T. canis</i> terhadap serum mencit pada dosis infeksi berbeda dengan teknik <i>indirect-ELISA</i>	36
5.6 Hasil Uji Antigenisitas, Sensitivitas dan Spesifisitas Protein <i>T canis</i> pada Diagnosis Toxocariasis dalam Serum Darah Mencit yang Diimmunisasi Berbagai Homogenat Cacing	38
5.6.1 Hasil uji antigenisitas protein murni <i>Toxocara canis</i> pada diagnosis toxocariasis dalam serum darah mencit yang diimmunisasi berbagai homogenat cacing	38
5.6.2 Hasil uji sensitivitas dan spesifisitas protein murni pada diagnosis toxocariasis dalam serum darah mencit yang diimmunisasi berbagai homogenat cacing	40
5.7 Hasil Pengamatan Profil Subkelas Imunoglobulin (Ig) G Serum Mencit yang Diinfeksi <i>Toxocara spp.</i> dengan <i>ELISA-Isotyping Kit</i>	43
5.7.1 Hasil pengamatan profil subkelas imunoglobulin (Ig) G serum mencit yang diinfeksi <i>T. canis</i> dengan <i>ELISA-isotyping kit</i> secara kuantitatif	43
5.7.2 Hasil pengamatan profil subkelas imunoglobulin (Ig) G serum mencit yang diinfeksi <i>T. canis</i> dengan <i>ELISA-isotyping kit</i> secara kualitatif	45
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN	50
6.1 Kesimpulan	50
6.2 Saran	51
DAFTAR PUSTAKA	52
LAMPIRAN	56

DAFTAR GAMBAR

Gambar		Halaman
5.1	Hasil isolasi cacing dewasa <i>T. cati</i> (A) dengan pengobatan pada kucing dan <i>T. canis</i> (B) dengan bedah saluran pencernaan anjing	22
5.2	Hasil pengamatan telur cacing <i>T. canis</i> dan perkembangannya hingga mencapai L2	23
5.3	Hasil pengamatan L2 <i>T. cati</i> setelah pemupukan telur selama 28 hari	23
5.4	Hasil pengamatan L2J <i>T. canis</i> dari preparasi jaringan mencit	24
5.5	Hasil pengamatan L2J <i>T. canis</i> dari jaringan mencit (4 hari setelah diinfeksi L2 <i>T. canis</i>) pembesaran 400x	24
5.6	Hasil identifikasi protein berbagai stadium <i>T. canis</i> menggunakan teknik SDS-PAGE dengan pewarnaan <i>coumasi blue</i>	25
5.7	Hasil karakterisasi protein <i>Toxocara canis</i> terhadap serum anti-L2J <i>T. canis</i>	28
5.8	Hasil karakterisasi protein <i>T. cati</i> dengan serum anti- <i>T. canis</i> menggunakan teknik <i>Western blot</i>	30
5.9	Hasil identifikasi protein murni hasil isolasi dari <i>T. canis</i> dengan teknik SDS-PAGE	33
5.10	Hasil uji antigenisitas protein murni ES L2J dan cacing dewasa terhadap serum anti-L2J <i>T. canis</i> dengan teknik <i>dot blot</i>	35
5.11	Profil subkelas Ig G serum mencit yang diinfeksi <i>T. canis</i> pada berbagai waktu pengamatan	46

DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
5.1	Rata-rata dan Standar Deviasi Nilai OD Berdasarkan Uji HSD 1% terhadap Dosis Infeksi Berbeda	37
5.2	Tabulasi Silang Nilai OD (+ dan -) Serum Mencit yang Diinfeksi <i>T. canis</i> terhadap Dosis Berbeda	37
5.3	Rata-rata Nilai <i>Optical Density</i> Hasil Pengujian Antigenesitas Protein Murni terhadap Serum Mencit yang Diimunisasi Berbagai Homogenat	39
5.4	Tabulasi Silang Hasil Penghitungan Nilai Sensitivitas dan Spesifisitas Protein Murni <i>Toxocara</i> spp. pada Diagnosis Toxocariasis Serum Hewan Coba (Mencit)	41
5.5	Nilai OD Rata-rata dan Standar Deviasi (SD) Serum Mencit Anti- <i>T. canis</i> terhadap Waktu Pengamatan pada Berbagai Subkelas IgG	44
5.6	Nilai OD Rata-rata dan SD Serum Mencit Anti- <i>T. canis</i> pada Subkelas Ig G Berbeda dan Berbagai Waktu Pengamatan	44
5.7	Nilai OD Rata-rata dan Standar Deviasi Serum Mencit Anti- <i>T. canis</i> pada Perlakuan Kombinasi antara Waktu Pengamatan dan Subkelas Ig G	45
5.8	Tabulasi Silang OD (+ dan -) Serum Mencit Anti- <i>T. canis</i> Terhadap Waktu Pengamatan Berbeda pada Berbagai Subkelas Ig G	46
5.10	Tabulasi Silang OD (+ dan -) Serum Mencit Anti- <i>T. canis</i> pada Berbagai Subkelas Ig G dengan Berbagai Waktu Pengamatan	47
5.11	Tabulasi Silang OD (+ dan -) Serum Mencit Anti- <i>T. canis</i> pada Perlakuan Kombinasi antara Waktu Pengamatan dan Subkelas Ig G	47

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Penghitungan BM Protein Menggunakan Persamaan Regresi antara Nilai <i>Retardation Facktor</i> (rf) dengan Log BM pada Marker	56
Lampiran 2. Data Hasil Pengamatan dan Analisis Data OD Serum Mencit yang Diinfeksi dengan L2 <i>T. canis</i> dengan Dosis Berbeda secara Kuantitatif dengan Anava Satu Arah	59
Lampiran 3. Analisis Data OD Serum Mencit yang Diinfeksi dengan L2 <i>T. canis</i> dengan Dosis Berbeda secara Kualitatif dengan Tabulasi Silang	61
Lampiran 4. Hasil Pemeriksaan Antigenisitas Protein Murni <i>Toxocara canis</i> terhadap Serum Darah Mencit dengan Teknik <i>indirect</i> -ELISA dan Analisis Statistik Nilai <i>Optical Density</i> dengan Uji Anava..	62
Lampiran 5. Hasil Pemeriksaan Nilai OD Positif (+) dan Negatif (-) Serum Mencit terhadap Protein Murni ES L2 Dorman <i>Toxocara</i> spp. dan Analisis Data dengan Tabulasi Silang	64
Lampiran 6. Nilai OD dan Analisis Statistik Hasil Pemeriksaan Profil Subkelas Imunoglobulin G dengan Teknik ELISA terhadap Serum Mencit yang Diinfeksi <i>T. canis</i> Menggunakan Uji Anava Faktorial	66
Lampiran 7. Tabulasi Silang Nilai OD (+ dan -) Hasil Pemeriksaan Profil Subkelas Imunoglobulin G dengan Teknik ELISA- <i>Isotyping</i> terhadap Serum Mencit yang Diinfeksi <i>T. canis</i>	70



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Penelitian

Toxocariasis bersifat zoonosis dan telah dikenal di dunia dapat menimbulkan infeksi pada manusia yang disertai manifestasi klinik *visceral* dan *ocular larvae migrans* (VLM dan OLM) (Hubner *et al.*, 2001). Mengingat dampak yang ditimbulkan sangat berat terutama bila terjadi OLM maupun bila larva sampai ke otak (Havasiova-Reiterova *et al.*, 1995), maka perlu dipikirkan penggunaan imunodiagnosis, karena diagnosis secara konvensional tidak dapat dilakukan pada hospes aberan.

Keberadaan larva dalam jaringan akan menimbulkan jejas, sehingga timbul respons imun yang ditandai dengan keberadaan imunoglobulin E (IgE) dan peningkatan kadar eosinofil yang merupakan jenis khusus dari *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*. Respons tersebut dilengkapi dengan kecenderungan dari cacing untuk menstimulasi subset $Th_2CD_4^+$ dari sel Th mensekresi IL-4 dan IL-5. Interleukin-4 merupakan limfokin yang merangsang sel B untuk berdeferensiasi menjadi sel plasma dan menghasilkan Ig E, sedangkan IL-5 merupakan pemicu potensial terhadap pembentukan eosinofil (Abbas *et al.*, 2000). Interleukin-4 dan IL-5 berperan dalam kontrol produksi Ig E dan Ig G1, sedangkan $Th_1CD_8^+$ menghasilkan interferon gamma (IFN γ) yang menghambat reaksi hipersensitivitas dan memicu produksi Ig G2.

Antibodi yang dihasilkan oleh sel-sel imun tubuh tersebut bersifat spesifik terhadap spesies *Toxocara spp.* dan sebagian beredar dalam darah perifer, sehingga dapat dideteksi dengan imunodiagnostik, yang pada prinsipnya adalah mendeteksi ikatan antigen-antibodi dalam serum penderita. Karena dalam pemeriksaan tersebut diperlukan antibodi dan antigen spesifik terhadap *Toxocara spp.*, maka perlu dikaji lebih lanjut tentang antigenisitas penyebab penyakit tersebut dengan mempersiapkan perangkat diagnostik yang mempunyai nilai sensitivitas dan spesifisitas tinggi,

sehingga penyakit tersebut dapat didiagnosis lebih dini, cepat, tepat dan akurat. Radman *et al.* (2000) menyetujui bahwa diagnosis dini dan pengobatan dapat menyelamatkan hidup penderita toxocariasis.

Untuk pengembangan imunodiagnosis toxocariasis diperlukan protein dengan sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi, protein spesifik spesies pada *Toxocara* spp. hingga saat ini belum ditemukan. Identifikasi spesies parasit sangat penting karena tidak hanya untuk diagnosis tetapi juga untuk survei epidemiologik pada penilaian kesehatan masyarakat, maka metode yang dapat diandalkan (*reliable*) untuk identifikasi yang akurat sangat diperlukan (Ishiwata, *et al.*, 2003). Penelitian ini akan mencoba mencari metode identifikasi cacing *Toxocara* spp. pada anjing sampai pada tingkat spesies menggunakan metode biokimia dan imunologik yang dapat dimanfaatkan untuk pengembangan diagnosis etiologik pada kasus toxocariasis.

1.2 Rumusan Masalah

Beberapa masalah yang dirumuskan pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

- 1) Apakah protein spesifik ES-L2J *T. canis* dapat digunakan sebagai antigen pada pemeriksaan dengan ELISA?
- 2) Apakah protein ES *T. canis* memiliki nilai antigenisitas, sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi pada diagnosis toxocariasis hewan coba (mencit) yang diimunisasi ES-L2J *T. canis* dan homogenat cacing lain dengan teknik *indirect-ELISA*?
- 3) Apakah terdapat subkelas Ig G spesifik dan dominan pada respon imun humoral mencit terhadap infeksi *T. canis* yang dapat digunakan sebagai biomarker untuk mengembangkan diagnosis toxocariasis pada pemeriksaan serum dengan teknik *ELISA-isotyping kit*?

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

Toxocariasis yang disebabkan oleh *Toxocara canis* tidak saja berbahaya bagi hewan anjing sebagai hospes definitif, tetapi juga dilaporkan dapat meninfeksi manusia, sehingga tergolong penyakit *zoonosis* (Uga *et al.*, 1990). Prevalensi *Toxocariasis* pada hewan, utamanya pada kucing di Surabaya, dapat mencapai 74% (Sudiana dkk., 1994), sedangkan Koesdarto dkk. (2002) yang melakukan penelitian pada anjing konsumsi di wilayah Surabaya mendapatkan angka prevalensi sebesar 31,3% dari 48 total sampel dan kucing liar sebesar 60,9% dari total sampel (69 ekor) kucing liar dari wilayah Surabaya.

Telah diketahui di seluruh dunia, bahwa *Toxocara canis* memungkinkan sebagai penyebab infeksi pada manusia, termasuk manifestasi klinisnya, yaitu *visceral* dan *ocular larvae migrans* (Hubner *et al.*, 2001). Manusia dapat tertular *toxocariasis* karena makanan atau minuman terkontaminasi oleh telur infeksi (*embryonated egg*) atau larva, terutama apabila pemasakan kurang sempurna (Ito *et al.*, 1986). Namun beberapa ahli menyatakan, bahwa tanah terkontaminasi dengan telur infeksi (*embryonated egg*) merupakan sumber utama infeksi pada manusia, terutama pada anak-anak yang masih mempunyai sifat *geophagia* (Alonso *et al.*, 2000) maupun yang kontak dengan hewan penderita (Radman *et al.*, 2000). Uga *et al.* (1990) melaporkan kasus *toxocariasis* pada anak-anak dan orang dewasa di Jepang dapat mencapai 29,3%.

Berdasarkan gejala klinik, *toxocariasis* pada manusia diklasifikasikan menjadi *visceral toxocariasis* dan *ocular toxocariasis*. Kedua penyakit tersebut didefinisikan sebagai *larvae migrans* yaitu masing-masing *visceral larvae migrans* (VLM) dan *ocular larvae migrans* (OLM) yang membutuhkan diagnosis secara imunologik (Uga *et al.*, 1990; de Savigny, 1980).

Cacing *Toxocara cati* yang selama hidupnya mengalami beberapa generasi, yakni larva stadium pertama (L1), kedua (L2), ketiga (L3), keempat (L4), dan cacing dewasa, memiliki perangkat antigen yang berbeda-beda. Hal ini dimanfaatkan *Toxocara cati* agar terhindar dari sistem imun hospes. Adanya perbedaan struktur morfologi pada berbagai generasi menyebabkan perbedaan imunogenisitas dalam memicu terbentuknya antibodi (Warren, 1993). Cacing *T. cati* dewasa yang panjangnya mencapai 12 cm, memiliki induk semang dengan tingkatan umur yang berbeda dengan manifestasi klinik yang berbeda pula. Bentuk larva (L2) dapat ditemukan pada kucing betina dewasa, kambing dan manusia sebagai hospes abean, selain itu juga dapat ditemukan pada *paraterinc host* misalnya tikus, kecoa, ayam serta hewan lain, sedangkan bentuk dewasa mudah didapatkan terutama pada usus halus anak kucing, disamping itu juga dapat ditemukan pada kucing jantan dewasa sebagai hospes defenitif (Kusumamihardja, 1990; Levine, 1978).

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

Kusnoto (2003) yang menganalisis protein L2 *Toxocara cati*, memperoleh gambaran bahwa stadium L2 menunjukkan 7 pita protein yaitu masing-masing dengan berat molekul (BM) 24,0, 30,3, 40,0, 60,7, 86,1, 96,6, 133,7 kDa. Lebih lanjut dinyatakan bahwa protein dengan BM tinggi (lebih dari 60 kDa) lebih banyak terjadi

reaksi silang dengan cacing nematoda lain bahkan dapat terjadi reaksi silang dengan cacing dari kelas lain.

Pengamatan dengan *immunoblotting* menunjukkan bahwa komponen protein dengan berat molekul (BM) 240 kDa dan 206 kDa dari telur *T. vitulorum*, *F. gigantica* dan *Moniezia expansa* dikenali oleh antiserum anti-cacing dewasa yang berbeda. Abdel-Rahman and Megeed (2000) melakukan pengamatan terhadap *whole worm extract* dengan teknik *immunoblotting* menyatakan bahwa, antigen *T. vitulorum* terjadi reaksi silang dengan antiserum anti-*F. gigantica* pada BM 133 kDa. Adapun antiserum anti-*T. vitulorum* dengan BM 133 kDa dan anti-*M. expansa* dengan BM 52 kDa terjadi reaksi silang dengan antigen *F. gigantica*. Berdasarkan pemeriksaan antibodi dengan teknik *Western blot* yang dilakukan oleh Kusnoto (2003) dinyatakan bahwa terjadi reaksi silang antara antibodi yang dibuat dari homogenat L2 (anti-L2) *T. cati* dengan antigen L2 maupun cacing dewasa pada BM 24-32 kDa, bahkan terjadi reaksi silang dengan antigen *Fasciola gigantica* dewasa pada BM 133,7 kDa. Hal ini menunjukkan bahwa protein dengan BM tinggi kemungkinan besar dapat terjadi reaksi silang dengan cacing lain. Sementara itu protein dengan BM rendah (lebih kecil dari 20 kDa) juga tidak spesifik karena tidak terbentuk ikatan antigen-antibodi pada uji *botting*. Hal ini mengindikasikan bahwa protein *T. cati* yang mungkin bersifat imunodominan adalah sekitar 24-32 kDa.

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 kecen-

derungan dari cacing untuk menstimulasi subset CD_4^+ -Th₂, 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 respons granulomatous yang diikuti dengan fibrosis (*fibrosis concomitant*) (Roitt *et al.*, 1998; Abbas *et al.*, 2000).

Pada umumnya infeksi oleh parasit, khususnya cacing, ditandai dengan keberadaan imunoglobulin (Ig) E dan peningkatan kadar eosinofil. Peningkatan kedua sel sistem imun tersebut di bawah kontrol sel T (Pearse and Sher, 1990). Interleukin (IL) 4, merupakan limfokin yang merangsang sel B yang teraktivasi oleh lipopolisakarida untuk menghasilkan Ig E dalam tubuh hospes, sedangkan IL-5 merupakan stimulus potensial terhadap pembentukan eosinofil pada medium buatan (Abbas *et al.*, 2000). Penyuntikan IL-5 pada tikus yang dilakukan oleh Amerasinghe *et al.* (1992), berakibat terjadi peningkatan jumlah sel eosinofil dalam darah dan jaringan. Jika IL-5 rendah akan menyebabkan terjadinya granuloma dan fibrosis hati. Interleukin (IL)-4 dan IL-5, yang dihasilkan oleh CD_4^+ -Th₂, berperan dalam kontrol produksi Ig E dan Ig G1, sedangkan CD_8^+ -Th₁ menghasilkan interferon gamma (IFN γ) yang menghambat reaksi hipersensitivitas dan memacu produksi Ig G2. Menurut Rajapakse (1992), Ig G2 lebih berperan dalam infeksi *Toxocara* spp. dari pada imunoglobulin yang lain.

Migrasi larva *Toxocara* spp. mendatangkan respons imun seluler dan humoral (Maizels *et al.*, 1993; Pritchard *et al.*, 1997), yang belakangan diketahui terdiri dari empat isotipe utama yaitu Ig M, Ig G, Ig A, dan Ig E (Auer and Aspöck, 1998; Obwaller,

2001; Soedarto, 2003). Pada peruntukan respon imun terhadap patogenesis larva, ditemukan puncak kadar antibodi sapi dewasa pada 7 hari pasca infeksi. Puncak kedua terjadi pada saat L2 menetas dan migrasi larva ke organ *visceral* yang lain. Respon imun terhadap *T. vitulorum* ternyata menggugah semua kelas imunoglobulin (Barriga and Omar, 1991). Semakin tinggi kadar Ig G semakin sedikit jumlah L3 yang berhasil keluar bersama air susu induk. Sebaliknya pada saat terjadi penembusan L2 terhadap jaringan granuloma, ternyata kadar Ig G1 menurun 50% sedangkan Ig A dan Ig M meningkat sampai 7 kali (Rajapakse, 1992).

Bentuk imunitas protektif yang lain terhadap cacing dewasa masih bersifat spekulatif. Salah satu teori ialah *self cure* yang menyebabkan pengeluaran cacing dewasa dari tubuh hospes (Lloyd and Soulsby, 1987). Pada saat itu kadar Ig E meningkat, hal ini dibuktikan oleh Matsumura *et al.* (1983). Pengeluaran cacing dari lumen usus merupakan kerja sama antara antibodi, sel limfosit dan sel mieloid. Namun sepenuhnya fenomena tersebut belum dapat dijelaskan secara tepat. Sedangkan pada bentuk muda seringkali terjadi migrasi dari satu organ ke organ lain, kemudian akan membentuk

jaringan ikat di sekitarnya. Keadaan ini akan merangsang kenaikan jumlah sel eosinofil yang berlangsung kronis, dan akan berkaitan dengan produksi Ig M dan Ig G di sekitar fibrosis dan di dalam granuloma tersebut. Kadar eosinofil darah perifer terlihat mulai dari normal hingga terjadi peningkatan (Trisunuwati, 1997). Jumlah sel eosinofil dan makrofag sangat bergantung kepada keberadaan dan aktivitas sel limfosit T. Titer Ig G spesifik yang tinggi ada hubungannya dengan manifestasi klinis dari toxocariasis. Infeksi larva juga dapat menstimulasi eosinofil (Kincekova, 1999).

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

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

BAB 3 TUJUAN PENELITIAN

Penelitian ini untuk mencapai tujuan yang dikelompokkan menjadi tujuan khusus jangka pendek dan tujuan khusus jangka panjang.

3.1 Tujuan Umum

Secara keseluruhan penelitian ini merupakan bagian dari payung penelitian dengan target akhir berupa *kit diagnostik* untuk diagnosis etiologik hingga pada tingkat spesies dan vaksin anti-nematoda.

3.2 Tujuan Khusus

Tujuan khusus jangka pendek meliputi beberapa hal sebagai berikut.

- 1) Mendapatkan protein spesifik ES-L2J *T. canis* yang dapat digunakan sebagai antigen pada pemeriksaan dengan ELISA dan imunogen pada pembuatan antibodi monoklonal.
- 2) Menentukan nilai antigenisitas, sensitivitas dan spesifisitas protein ES *T. canis* pada diagnosis toxocariasis hewan coba (mencit) yang diimunisasi ES-L2J *T. canis* dan homogenat cacing lain dengan teknik *indirect-ELISA*.
- 3) Menentukan subkelas Ig G spesifik dan dominan pada respon imun humoral mencit terhadap infeksi *T. canis* yang dapat digunakan sebagai biomarker untuk mengembangkan diagnosis toxocariasis pada pemeriksaan serum dengan teknik *ELISA- isotyping kit*.

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini berlangsung selama 8 bulan, sejak bulan Maret hingga Nopember 2009, bertempat di Lab. Helminthologi, Lab. Biomolekuler Fakultas Kedokteran Hewan, dan Lab. Helminthiasis Tropical Disease Center, Universitas Airlangga.

4.2 Koleksi dan Identifikasi *Toxocara* spp. dari Anjing

4.2.1 Isolasi cacing dewasa

Sampel berupa saluran pencernaan anjing diperoleh dari tempat pemotongan anjing (Depot) di Surabaya. Usus halus dipisahkan dari bagian lain, kemudian dibedah untuk mendapatkan *Toxocara canis* dewasa, cacing dewasa kemudian dibersihkan dengan NaCl fisiologis dan diinkubasi dalam medium NaCl fisiologis dan *phosphat buffer saline* (PBS) pada suhu inkubator 37°C selama 4 jam. Kemudian telur cacing dipisahkan dengan cairan supernatan dengan penyaring ukuran 25 µm. Telur cacing kemudian dipupuk sedangkan supernatannya yang berisi protein *excretory-secretory* (ES) disimpan dalam *Freezer* -20°C hingga digunakan.

4.2.2 Isolasi larva stadium kedua (L2) *T. canis*

Apabila telur yang diperoleh dari cacing *T. canis* dewasa tersebut jumlahnya kurang maka dilakukan isolasi dari feses anjing penderita dengan jalan memisahkan telur dari kotoran maupun dengan teknik *preparation of gradients* (DrenchRite, 1996). Selanjutnya telur cacing diidentifikasi, kemudian dipupuk dalam medium PBS + NaCl pada suhu ruang selama 21-28 hari (Koga *et al.*, 1992) untuk memperoleh L2. Kemudian L2 yang diperoleh sebagian dibuat homogenat dan sebagian lagi untuk produksi L2 dorman.

4.2.3 Isolasi larva stadium kedua dorman dari jaringan mencit (L2) *T. canis*

Larva stadium kedua dorman dari jaringan mencit (L2) dibuat dengan menginfeksi mencit dengan L2 *T. canis* dengan dosis 10 butir per gram berat badan secara per oral. Empat hari setelah infeksi semua mencit dikorbankan untuk dilakukan isolasi L2 dorman dengan preparasi jaringan. Kemudian L2 dorman yang diperoleh diinkubasi dalam medium RPMI dan PBS pada suhu inkubator 37°C selama 4 jam. Kemudian L2 dipisahkan dengan melakukan sentrifus terhadap cairan medium, supernatan yang berisi protein ES disimpan dalam Freezer -20°C hingga digunakan, sedangkan L2 dorman disiapkan untuk pembuatan homogenat *whole L2 dorman extract*.

4.2.4 Pembuatan homogenat L2, L2 dorman dan cacing dewasa

Homogenat dibuat dengan cara melakukan sonikasi dengan frekuensi 3x60 detik dengan interval istirahat 60 detik. Kemudian diperiksa dengan bantuan mikroskop apabila tingkat kehancuran belum mencapai 80% dilakukan sonikasi ulang dengan pola yang sama. Setelah tingkat kehancuran mencapai > 80% dilakukan penambahan NP 40 sebanyak 25 µl/cc dan disentrifus pada 5000 rpm selama 10 menit, supernatan diambil dan ditambahkan NP 40 sebanyak 25 µl/cc kemudian disentrifus pada 45000 rpm selama 25 menit. *Pellet* diambil dan disiapkan untuk analisis protein lebih lanjut. Untuk cacing dewasa sebelum disonikasi dicincang dengan gunting dan digerus dalam mortar secara manual kemudian disuspensi dengan PBS sebanyak 0,5 ml/ekor.

4.3 Identifikasi Protein dengan SDS-PAGE

4.3.1 Running SDS-PAGE

Hasil pembuatan homogenat *Toxocara* spp. selanjutnya dilakukan *running* dengan teknik *sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE).

Komposisi SDS-PAGE yang dipakai adalah *separating gel* 12% (2,5 ml acrylamide; 1,2 ml Tris-HCl pH 8,8; 1,2 ml SDS 0,5%; 1,1 ml aquadest, 50 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 aquadest).

Sebanyak 15 µl sampel berupa homogenat *Toxocara* spp. 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, merkaptotetanol 5% 50 µl, aquades 3,8 ml) pada pemanasan 100°C selama 5 menit, dimasukkan pada sumuran *stacking gel*. Sebagai marker digunakan protein dengan berat molekul pada kisaran 14,5-200 kDa produksi-BIO-RAD. Elektrophoresis dinyalakan dengan tegangan 40 V dengan kuat arus 10 mA dan ditingkatkan menjadi 120 V 25 mA ketika sampel telah melewati *stacking gel*; kira-kira selama 1-2 jam.

Pencucian terhadap gel hasil *running* dilakukan tiga tahap, yaitu: 1) Pencucian pertama, menggunakan 25 ml metanol 50%, 3,75 ml asam asetat 7,5% dan 71,25 ml akuades selama 30 menit; 2) Pencucian kedua, menggunakan 2,5 ml metanol 5%, 3,75 ml asam asetat 7,5% dan 93,75 ml aquadest selama 20 menit; dan 3) Pencucian ketiga, menggunakan glutaraldehida 10% selama 25 menit. Gel kemudian diwarnai dengan teknik pewarnaan silver (1,6 g AgNO₃ dalam 8 ml aquadest; 42 ml NaOH 0,36%; 2,8 ml NH₃ 25% dalam 147 ml aquadest) selama 15 menit, dilanjutkan pencucian dua kali 2

menit dengan 100 ml aquadest dan kemudian ditambahkan larutan pengembang warna (200 µl asam sitrat 5%; 100 µl formaldehid 37 % dalam aquadest 200 ml) dan dilakukan pencucian kembali selama dua kali 2 menit dengan 100 ml aquadest. Setelah gel terwarnai kemudian dimasukkan dalam larutan asam asetat 10% untuk menghentikan proses pengecatan. Selanjutnya gel dapat didokumentasi dengan kamera digital, disimpan pada larutan gliserin 10% atau dikeringkan (Harlow dan Lane, 1988).

4.3.2 Penentuan berat molekul (BM) protein

Penentuan berat molekul (BM) protein hasil *running* SDS-PAGE dan *Western blot* dilakukan dengan bantuan protein standar (marker, Biorad). Penentuan BM protein dilakukan dengan mencari hubungan (korelasi) antara nilai *retardation factor* (RF) dengan log berat molekul (BM) protein marker. Nilai RF diperoleh dengan menghitung hasil pembagian jarak pergerakan pita protein dari tempat awal (jarak pita) dengan jarak pergerakan warna dari tempat awal (panjang gel) (Hostettmann *et al.*, 1986; Rantam, 2003). Secara praktis penghitungan nilai RF dapat dirumuskan sebagai berikut:

$$RF = \frac{\text{Jarak pergerakan protein dari tempat awal}}{\text{Panjang gel (Jarak pergerakan warna dari tempat awal)}}$$

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

4.4 Karakterisasi Protein dengan *Western blot* dan Isolasi Protein Spesifik

Tahap ketiga terdiri dari: 1) Pembuatan antibodi poliklonal; 2) Karakterisasi protein dengan *Western blot*; 3) Isolasi protein spesifik; dan 4) Identifikasi protein murni hasil isolasi.

4.4.1 Pembuatan antibodi poliklonal

Pembuatan antibodi poliklonal dilakukan dengan cara menyuntikkan protein dari excretory-secretory (ES) larva kedua dorman yang tinggal dalam jaringan hospes (L2) *T. canis* pada kelinci ras Angora. Penyuntikan pertama, homogenat ditambah *complete Freund's adjuvant* sama banyak, selanjutnya dilakukan *booster* sebanyak 4 kali dengan interval 2 minggu. Pada saat *booster*, homogenat ditambah *incomplete Freund's adjuvant* sama banyak. Dua minggu setelah penyuntikan terakhir dilakukan pengambilan darah kelinci untuk mendapatkan serum anti-*Toxocara* spp. Sesuai dengan homogenat yang disuntikkan. Pembuatan antibodi poliklonal bertujuan untuk *blotting*, direaksikan dengan berbagai protein *Toxocara* spp. dan cacing lain sehingga dapat dikarakterisasi derajat antigenisitas dan spesifisitasnya.

4.4.2 Karakterisasi protein dan deteksi reaksi silang dengan *Western blot*

Homogenat *Toxocara* spp. Dilakukan *running* lagi dengan teknik SDS-PAGE dan akhirnya protein ditransfer ke membran *nitrocellulose* dan selanjutnya dilakukan *blotting*. Adapun prosedur kerja karakterisasi protein adalah meliputi *semi-dry blotting* dan *blotting*. Pada tahap *semi-dry blotting*, dilakukan beberapa hal sebagai berikut: Protein dari gel kemudian ditransfer ke membran 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*.

Adapun tahapan *blotting* adalah sebagai berikut: Membran PVDF *blot* diblok dengan BSA 10 % selama 30 menit pada temperatur ruangan kemudian dicuci dengan larutan TBS dua kali. Selanjutnya direaksikan dengan antibodi monoklonal dan poliklonal. Setelah itu diinkubasikan pada temperatur ruangan selama 1 jam. Setelah dicuci dengan larutan TBS sebanyak tiga kali direaksikan dengan konjugat alkalin fosfatase dan substrat p-NPP dan diwarnai dengan *fast-red*. Akhirnya dikeringkan pada temperatur ruangan. Dari hasil ini kemudian ditentukan BM protein, protein spesifik dan didokumentasi, kemudian dilakukan isolasi protein.

4.4.3 Isolasi protein spesifik dengan teknik elusi

Proses preparasi gel ini diawali seperti proses SDS-PAGE, akan tetapi setelah proses *running*, gel hasil *running* tidak diwarnai seperti halnya pada prosedur SDS-PAGE. Perbedaan lainnya terlihat pada jumlah kolom pada gel, pada satu gel SDS-PAGE dapat terdiri dari sepuluh kolom, sedangkan pada gel yang dipakai pada elusi hanya digunakan satu kolom untuk marker dan sisa gel yang lainnya dibuat menjadi satu kolom yang lebar. Sampel yang dibutuhkan untuk proses elusi sebanyak 180 μ l, hal ini dikarenakan sampel yang dibutuhkan untuk satu kolom pada gel kurang lebih 20 μ l, untuk elusi sembilan kolom dijadikan menjadi satu kolom sehingga sembilan kolom tersebut dikalikan dengan 20 μ l menjadi 180 μ l (Rantam, 1997).

Pada proses elusi, setelah *running*, dilanjutkan dengan pemotongan marker untuk selanjutnya marker tersebut diwarnai menggunakan pewarnaan AgNO₃. Marker yang telah diwarnai nantinya berguna sebagai acuan pada proses pemotongan gel band/pita yang diinginkan. Gel hasil pemotongan tersebut kemudian dimasukkan ke dalam plastik selofan. Setelah gel masuk ke dalam selofan, ujung selofan bagian bawah diikat dan dilanjutkan dengan penambahan cairan PBS 1 kali 2 ml. Kemudian ujung selofan diikat pada bagian atasnya. Setelah itu dilakukan proses *running* pada *electro-elusi* yang telah ditambahkan larutan buffer 500 μ l dengan cara meletakkan selofan

tersebut pada kutub anoda katoda yang ada pada *electroelusi* dengan tegangan 125 volt, 40 mA. Proses ini dilakukan kurang lebih selama 45 menit (Bhadwaj, 1999).

Tujuan proses ini adalah memisahkan protein antigen dengan gel sehingga nantinya didapatkan cairan hasil protein antigen yang telah dimurnikan dan gel. Setelah *running* selesai, cairan hasil *running* yang terdapat dalam selofan dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf dan dapat disimpan pada suhu -7°C (Rantam, 1997).

4.4.4 Identifikasi protein murni hasil isolasi

Protein murni hasil isolasi selanjutnya dilakukan identifikasi protein lagi menggunakan teknik SDS-PAGE dengan prosedur yang sama dengan poin 3.2 untuk menentukan protein spesifik yang didapatkan. Gel hasil *running* didokumentasikan dengan bantuan kamera digital.

4.5 Uji Antigenisitas Protein dengan Teknik *Dot Blot* dan ELISA pada Mencit yang Diinfeksi *Toxocara canis*

Tahap keempat dari penelitian ini terdiri dari: 1) Uji antigenisitas protein murni *Toxocara* spp. dengan *dot-blot*; 2) Produksi L2 *Toxocara* spp. untuk infeksi buatan; 3) Uji antigenisitas *crude protein Toxocara* spp. dengan *indirect-ELISA*; dan 4) Uji *indirect-ELISA*.

4.5.1 Uji antigenisitas protein murni *Toxocara* spp. dengan *dot-blot*

Uji ini menggunakan antigen berupa protein spesifik hasil pemurnian pada tahap sebelumnya; antibodi primer berupa serum kelinci anti-*Toxocara* spp. dan antibodi sekunder berupa Ig G anti-rabbit.

Kertas nitroselulosa (NCM) direndam dalam TBS (0,02 M Tris-HCl; 0,5 M NaCl; pH 7,5) selama 15 menit dan dikeringkan selama 5 menit. Setelah itu ditetesi 2 μl protein spesifik *Toxocara* spp. (1-1000 pg/2 μl) selama 5 menit pada suhu ruang, kemudian dicuci 3x5 menit dengan TBS-Tween (TBS yang mengandung 0,05% Tween-20) dan diblocking selama 60 menit dengan bufer blocking (0,9% NaCl; 10 mM Tris-HCl; pH 7,4) yang mengandung 5% creamer. Pasca *blocking*, NCM dicuci 3x5 menit dengan TBS-

Tween, kemudian dikeringkan dan ditambah antibodi primer (serum kelinci) 1:100 dan 1 : 200 dalam TBS-Tween yang mengandung 1% skim milk selama 1 jam sambil digoyang di atas shaker. Berikutnya NCM dicuci dengan TBS-Tween 3 x 5 menit dan ditambah antibodi sekunder (konjugat) *goat anti-rabbit* 1:1000 selama 1 jam dalam TBS-Tween yang mengandung 1% skim. Setelah itu dicuci 3 x 5 menit dengan TBS-Tween dan dicuci 3 x 5 menit dengan TBS tanpa Tween, untuk ditambah substrat *Western blue* sebanyak 25 μ l selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan pencucian dengan aquades dan dikeringkan di udara.

4.5.2 Produksi L2 *Toxocara* spp. untuk infeksi buatan

Telur cacing yang didapatkan dari tahap sebelumnya dipupuk dalam cawan petri berisi PBS selama 28 hari dan diinkubasi pada suhu kamar. Setiap hari selama pemupukan dilakukan pengamatan terhadap perkembangan telur dengan bantuan mikroskop inverted serta didokumentasikan dengan bantuan kamera digital. Larva stadium kedua (L2) *Toxocara canis* yang diperoleh digunakan untuk infeksi buatan pada uji antigenisitas *Toxocara canis*.

4.5.3 Uji antigenisitas *crude protein Toxocara* spp. dengan *indirect-ELISA*

Beberapa kelompok mencit Balb/c betina umur 6 minggu diinfeksi dengan *Toxocara canis* yang diperoleh dari tahap sebelumnya, sehingga terdapat tiga macam perlakuan, yaitu: 1) kontrol hanya diberikan plasebo (PBS); 2) diinfeksi L2 *T. canis* dengan dosis 10 butir/g berat badan (BB); dan 3) diinfeksi L2 *T. canis* dengan dosis 17 butir/g berat badan (BB). Serum darah diambil hari ke-28. Serum yang didapatkan ditera antibodinya dengan teknik *indirect-ELISA*.

4.5.4 Uji *indirect-ELISA*

Antigen sebanyak 2 μ g/ml diencerkan dengan bufer karbonat (50 mmol/l karbonat, pH 9,6) kemudian diadsorbsikan pada mikroplat ELISA sebanyak 100

μ l/sumuran dan diinkubasi pada suhu 4°C semalam. Mikroplat kemudian diblok dengan *buffer blocking* (1 % BSA, 0,02 % NaN_3 dalam PBS) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Selanjutnya dicuci dengan bufer pencuci (0,15 M NaCl, 0,05 % Triton x-100, 0,02% NaN_3) sebanyak tiga kali. Antibodi yang diuji yang diuji dimasukkan dalam tiap sumuran sebanyak 100 μ l dan diinkubasi pada 37°C selama 1 jam, setelah itu dicuci tiga kali dengan bufer pencuci, kemudian diikuti dengan penambahan konjugat (*rabbit anti-mouse Ig G* yang berlabel enzim alkalin fosfatase) yang diencerkan dengan *bufer blocking* dengan pengenceran 1 : 1000 sebanyak 100 μ l/sumuran dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Berikutnya mikroplat dicuci kembali dengan bufer pencuci untuk kemudian ditambahkan substrat (2,7 mmol/l 4-nitrofenil fosfat dalam 1 M dietanolamin; 0,5 M MgCl_2 ; 0,02 % NaN_3 ; pH 9,8) sebanyak 100 μ l/sumuran dan diinkubasi selama 10-30 menit dalam ruang gelap. Resapan kemudian dibaca dengan *ELISA-reader* pada panjang gelombang 405 nm (Kuno, 1991).

4.6 Uji Antigenisitas, Sensitivitas dan Spesifisitas Protein dengan Teknik ELISA pada Mencit yang Diimunisasi Berbagai Homogenat Cacing

Tahap ini meliputi: 1) Imunisasi pada mencit; 2) Uji antigenisitas; dan 3) Uji sensitivitas dan spesifisitas protein murni *Toxocara* spp. dengan *indirect-ELISA*.

4.6.1 Imunisasi pada mencit

Mencit Balb/c jantan umur 6-8 minggu dibagi menjadi beberapa kelompok: Kelompok 1, diimunisasi dengan homogenat *T. canis*; Kelompok 2, diimunisasi dengan homogenat cacing *Ancylostoma* spp.; Kelompok 3, diimunisasi dengan homogenat cacing *D. caninum*; Kelompok 4, diinjeksi dengan ajuvan sebagai kontrol. Imunisasi dilakukan sebanyak lima kali dengan interval waktu 2 minggu. Imunisasi pertama dengan penambahan *complete Freund's adjuvant* sama banyak dan imunisasi berikutnya (*booster*) dengan protein yang sama dalam *incomplete Freund's adjuvant*. Aplikasi imunisasi dilakukan secara subkutan dengan dosis 200 μ g protein/ekor. Dua

minggu setelah *booster* terakhir serum dipanen untuk dilakukan uji sensitivitas dan spesifisitas dengan *indirect-ELISA*.

4.6.2 Uji antigenisitas

Uji antigenisitas protein murni dilakukan dengan melakukan analisis nilai *optical density* (OD) hasil pembacaan dengan *ELISA-reader* dengan uji Anava. Untuk menentukan sensitivitas dan spesifisitas protein murni *Toxocara canis* dilakukan pengujian terhadap serum mencit yang telah diimunisasi protein ES *Toxocara canis* maupun homogenat cacing lain.

4.6.3 Uji sensitivitas dan spesifisitas

Sensitivitas dinyatakan tinggi apabila protein murni dapat mendeteksi antibodi semua hewan yang menderita toxocariasis. Spesifisitas dinyatakan tinggi apabila protein murni (antigenik) tersebut dapat mendeteksi semua hewan yang menderita toxocariasis, tetapi tidak didapatkan *false positive* dengan penyakit cacing lain. Sensitivitas dihitung berdasarkan nilai yang diperoleh dari perbandingan antara OD (+) dengan jumlah antara OD (+) dan OD (-) dari hasil pemeriksaan serum toxocariasis (+) dengan yang dinyatakan dalam persen. Spesifisitas dihitung berdasarkan nilai yang diperoleh dari perbandingan antara OD (-) dengan jumlah antara OD (+) dan OD (-) dari hasil pemeriksaan serum darah toxocariasis (-) yang dinyatakan dalam persen (de Savigny, 1980).

Tabulasi silang penghitungan nilai sensitivitas dan spesifisitas

Hasil pemeriksaan rutin*	Hasil ELISA		Jumlah
	OD +	OD -	
Toxocariasis +	a	b	a + b
Toxocariasis -	c	d	c + d
Total	a + c	b + d	a + b + c + d

Sumber: de Savigny (1980); *pemeriksaan feses secara konvensional

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

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

4.7 Pengamatan Profil Subkelas IgG dengan ELISA-isotyping kit

Pada tahap keenam adalah sebagai berikut: 1) Koleksi serum mencit; dan 2) Prosedur ELISA-Isotyping kit.

4.7.1 Koleksi serum mencit

Dua kelompok mencit Balb/c betina umur 6 minggu diinfeksi L2 *T. canis*. Serum darah diambil hari ke-0, ke-7, ke-14 dan ke-28. Infeksi telur infektif (berisi larva stadium kedua) dilakukan satu kali dengan dosis 17 butir/g berat badan. Serum yang didapatkan dilakukan pemeriksaan profil subkelas IgG dengan teknik ELISA-isotyping kit.

4.7.2 Prosedur ELISA-Isotyping kit

Antigen *Toxocara* spp. sebanyak 2 µg/ml diencerkan dengan bufer karbonat (50 mmol/l karbonat, pH 9,6) kemudian diadsorbsikan pada mikroplat ELISA sebanyak 100 µl/sumuran dan diinkubasi pada suhu 4°C satu malam. Mikroplat kemudian diblok dengan *buffer blocking* (1 % BSA, 0,02 % NaN₃ dalam PBS) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Selanjutnya dicuci dengan bufer pencuci (0,15 M NaCl, 0,05 % Triton x-100, 0,02 % NaN₃) sebanyak 3 kali. Antibodi yang diuji yang diuji dimasukkan dalam tiap sumuran sebanyak 100 µl dan diinkubasi pada 37°C selama 1 jam, setelah itu dicuci 3 kali dengan bufer pencuci, kemudian diikuti dengan penambahan anti-subclass Ig G (*Mouse Typer Sub-Isotyping Kit*, Biorad) yang diencerkan dengan *buffer blocking* dengan pengenceran 1:1000 sebanyak 100 µl/sumuran dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Berikutnya mikroplat dicuci kembali dengan bufer pencuci dan ditambahkan konjugat (*rabbit anti-mouse Ig G* yang dilabel dengan enzim alkalin fosfatase) yang diencerkan dengan *buffer blocking* dengan pengenceran 1:1000

sebanyak 100 μ l/sumuran dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Berikutnya mikroplat dicuci kembali dengan bufer pencuci untuk kemudian ditambahkan substrat (2,7 mmol/l 4-nitrofenil fosfat dalam 1 M dietanolamin; 0,5 M MgCl₂; 0,02 % NaN₃; pH 9,8) sebanyak 100 μ l/sumuran dan diinkubasi selama 10-30 menit dalam ruang gelap. Resapan kemudian dibaca dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 405 nm (Kuno, 1991).

4.8 Rancangan Penelitian dan Analisis Data

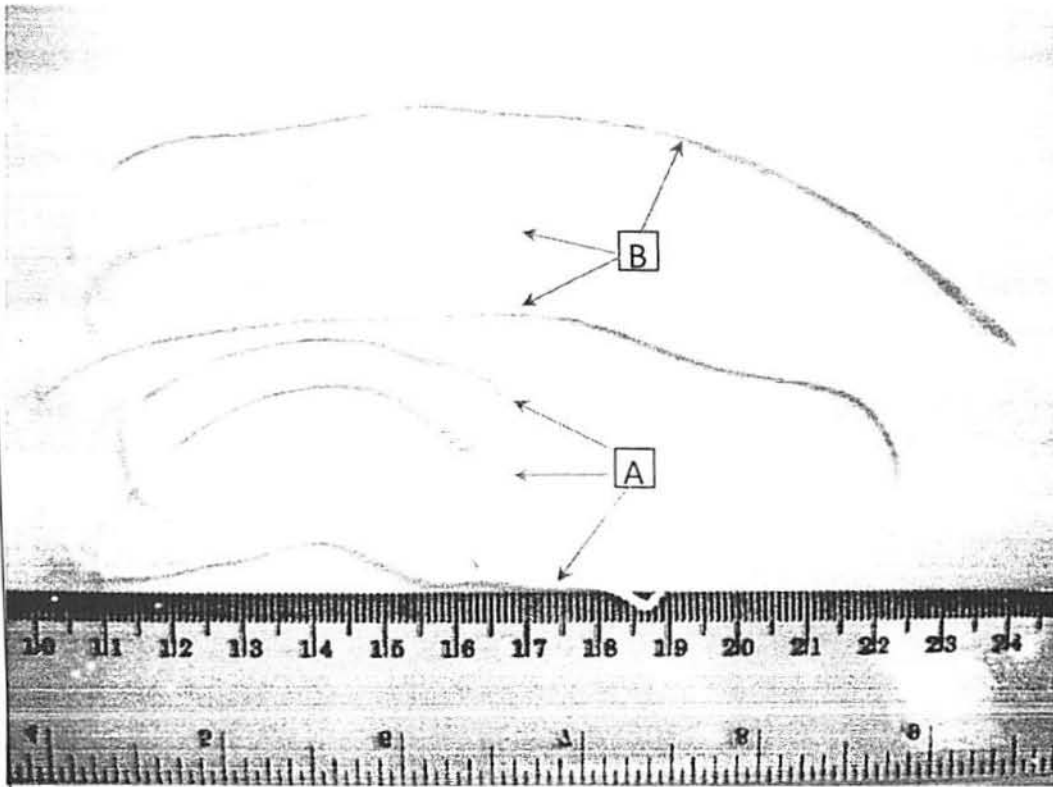
Penelitian ini termasuk *True experimental* dengan rancangan *The posttest only control groups design* (Campbell and Stanley, 1963; Zainuddin, 2000). Data yang diperoleh berupa nilai OD ditabulasikan dan diinterpretasikan secara kuantitatif dan kualitatif. Secara kuantitatif data dianalisis dengan *One way Anova* menggunakan program SPSS rel 13 for Windows, sedangkan secara kualitatif dinyatakan dalam bentuk OD- dan OD+ dan disajikan secara deskriptif dalam bentuk persen (Santoso, 2000).

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Isolasi Cacing *Toxocara* spp.

5.1.1 Isolasi Cacing Dewasa *Toxocara* spp.

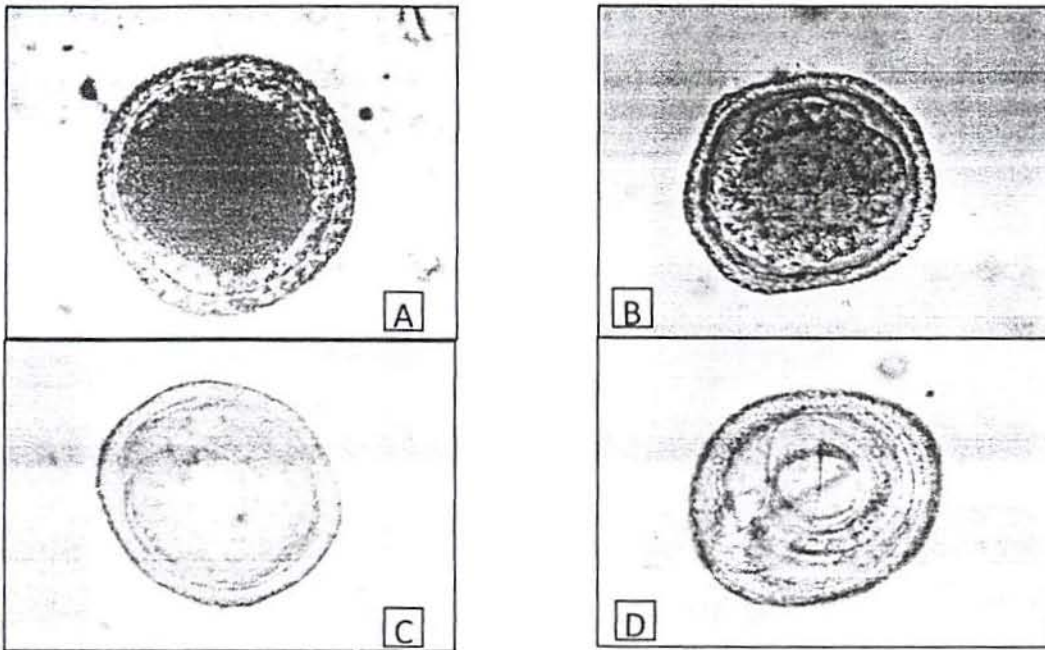
Hasil isolasi cacing *T. canis* dan *T. cati* didokumentasikan dengan kamera digital seperti terlihat pada Gambar 5.1.



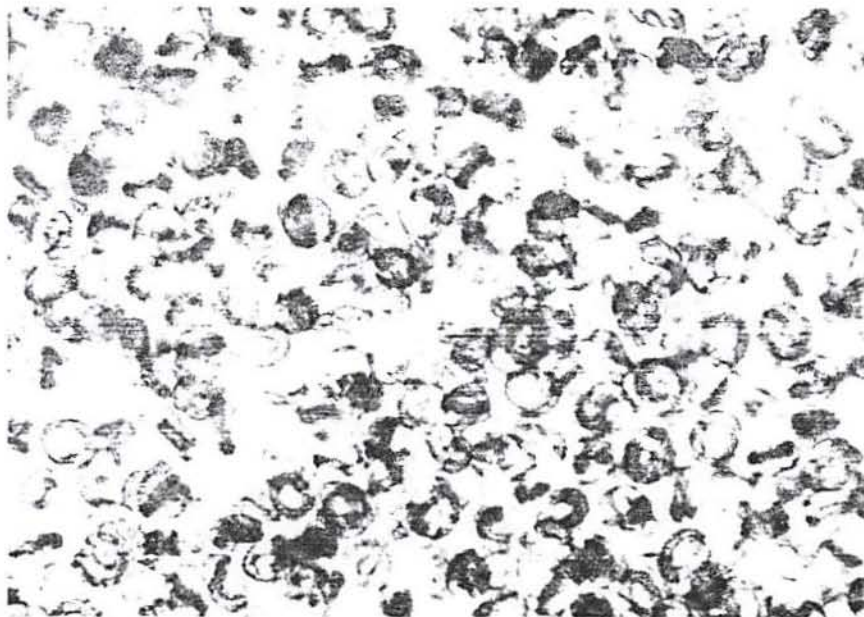
Gambar 5.1 Hasil isolasi cacing dewasa *T. cati* (A) dengan pengobatan pada kucing dan *T. canis* (B) dengan bedah saluran pencernaan anjing.

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

Perkembangan telur hingga mencapai L2 dipelajari dengan memeriksa menggunakan mikroskop inverted dengan pembesaran =100x dan 400x (Gambar 5.2). Dua puluh delapan hari pasca pemupukan dilakukan pemanenan L2, seperti tampak pada Gambar 5.3.



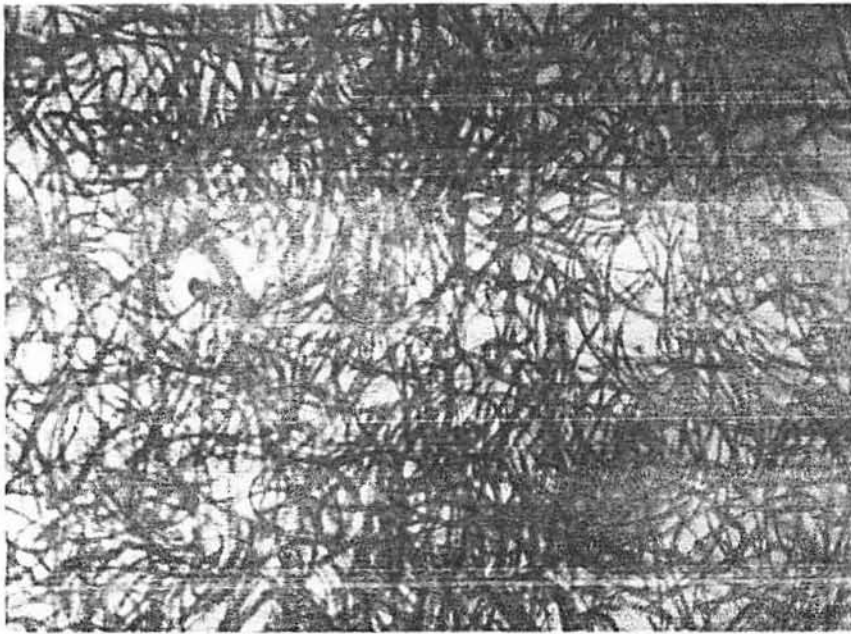
Gambar 5.2 Hasil pengamatan telur cacing *T. canis* dan perkembangannya hingga mencapai L2. Pembesaran 400x, A=1 sel, B=Morula, C=L1 dan D=L2.



Gambar 5.3 Hasil pengamatan L2 *T. canis* setelah pemupukan telur selama 28 hari. Pembesaran 100x.

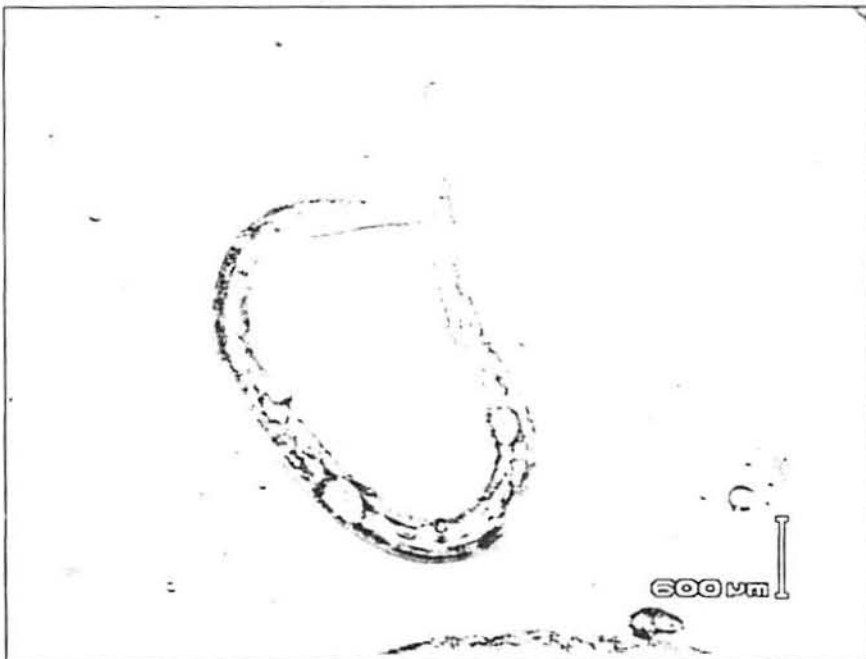
5.1.2 Isolasi Larva Stadium Kedua (L2) *Toxocara canis*

Hasil preparasi jaringan mencit (4 hari setelah diinfeksi L2 *T. canis*) berupa larva stadium kedua dorman dalam jaringan (L2J) *T. canis* dapat dilihat pada 5.4.



Gambar 5.4 Hasil pengamatan L2J *T. canis* hasil preparasi dari jaringan mencit. Pembesaran 100x.

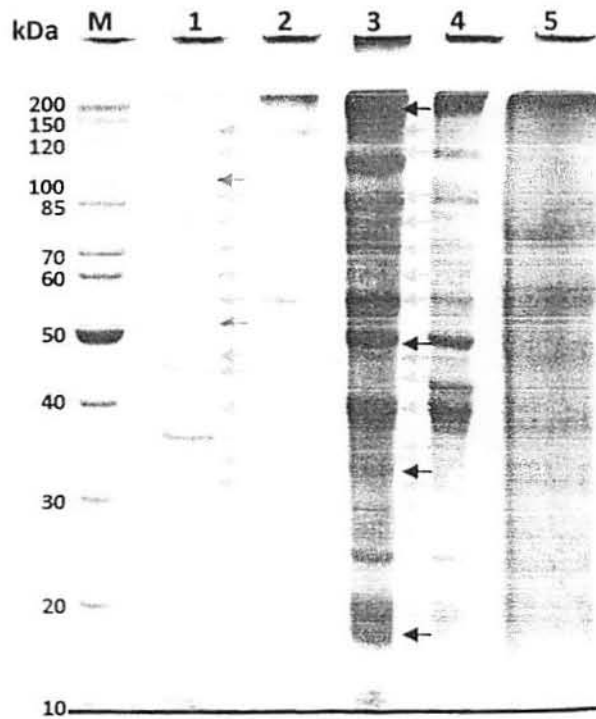
Untuk mendapatkan gambaran yang lebih jelas terhadap L2J *T. canis* hasil preparasi jaringan mencit dilakukan pengamatan menggunakan mikroskop dengan pembesaran 400 kali, kemudian didokumentasikan seperti tampak pada Gambar 5.5.



Gambar 5.5 Hasil pengamatan L2J *T. canis* dari jaringan mencit (4 hari setelah diinfeksi L2 *T. canis*) 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) L2 *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 (Lampiran 1, halaman 56).

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 57) dengan nilai $b_0 = 5,599$, $b_1 = -3,841$, $b_2 = 5,524$, $b_3 = -3,322$ sehingga didapatkan persamaan garis $y = 5,599 - 3,841x + 5,524x^2 - 3,322x^3$. 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 58).

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 *Toxocara canis* dan Deteksi Reaksi Silang dengan Teknik *Western blot*

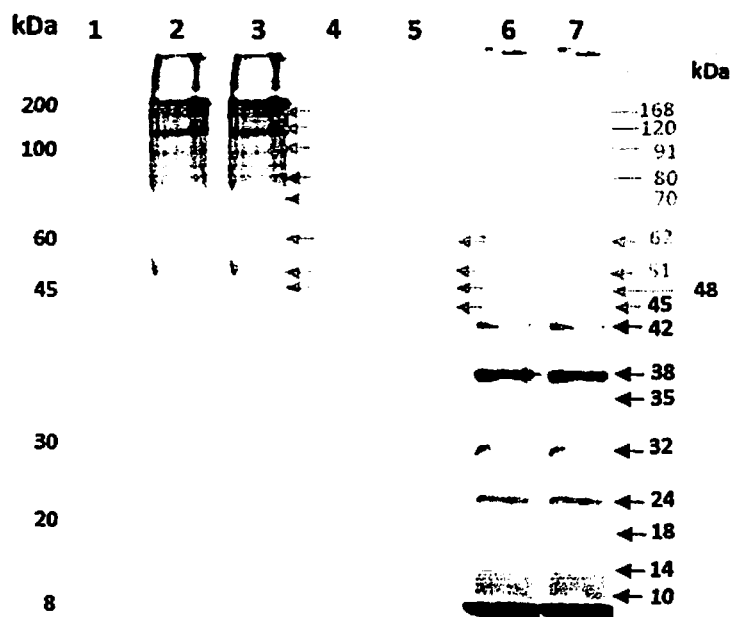
5.3.1 Karakterisasi protein *Toxocara canis*

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

Pada Gambar 5.7 terlihat beberapa pita reaksi antara serum anti-L2J *T. canis* terjadi pada protein cacing dewasa *T. canis* dengan BM 168, 120, 91, 80, 70, 62, 51 dan 48 kDa. Untuk pita reaksi antara serum anti-L2J *T. canis* dengan antigen ES L2J *T. canis* terjadi pada protein dengan BM 62, 51, 48, 45, 42, 38, 35, 32, 24, 18, 14 dan 11 kDa.

Berdasarkan hasil karakterisasi protein *T. canis* dengan serum anti-L2J *T. canis* menggunakan teknik *Western blot* dengan pewarnaan BCIP+NBT dapat dinyatakan bahwa terdapat beberapa protein spesifik terhadap cacing tersebut, yaitu dengan BM 168, 120, 91, 80, 70, 62, 51, 48, 45, 42, 38, 35, 32, 24, 18, 14 dan 11 kDa. Pita reaksi Ag-Ab antara serum anti-L2J *T. canis* terjadi dengan protein cacing dewasa *T. canis* pada BM 168, 120, 91, 80, 70, 62, 51 dan 48 kDa, sedangkan dengan protein ES L2J *T. canis*

terjadi pada BM 62, 51, 48, 45, 42, 38, 35, 32, 24, 18, 14 dan 11 kDa. Di antara beberapa pita reaksi antara serum anti-L2J *T. canis* dengan antigen ES L2J *T. canis* tersebut pita reaksi pada protein dengan 38 kDa dari ES L2J *T. canis* tampak lebih tegas dibandingkan dengan yang lain, hal ini menggambarkan antigenisitas protein tersebut lebih tinggi dibanding dengan protein lain. Penelitian ini menunjukkan hasil protein spesifik yang lebih banyak dibanding penelitian Morales *et al.* (2002) menggunakan teknik yang sama dengan antigen ES L2 dan serum kelinci terinfeksi, diperoleh sembilan pita protein spesifik *T. canis*, yaitu dengan BM 200, 116, 92 dan 35 kDa pada awal bulan pertama, dan BM 92, 80, 66, 45, 31 dan 28 kDa sekitar 30 hari setelah infeksi.



Gambar 5.7 Hasil karakterisasi protein *Toxocara canis* terhadap serum anti-L2J *T. canis*. Kolom 1=marker Rainbow (Sigma), kolom 2-3= somatic antigen, kolom 4-5=intestine, kolom 6-7=ES L2J.

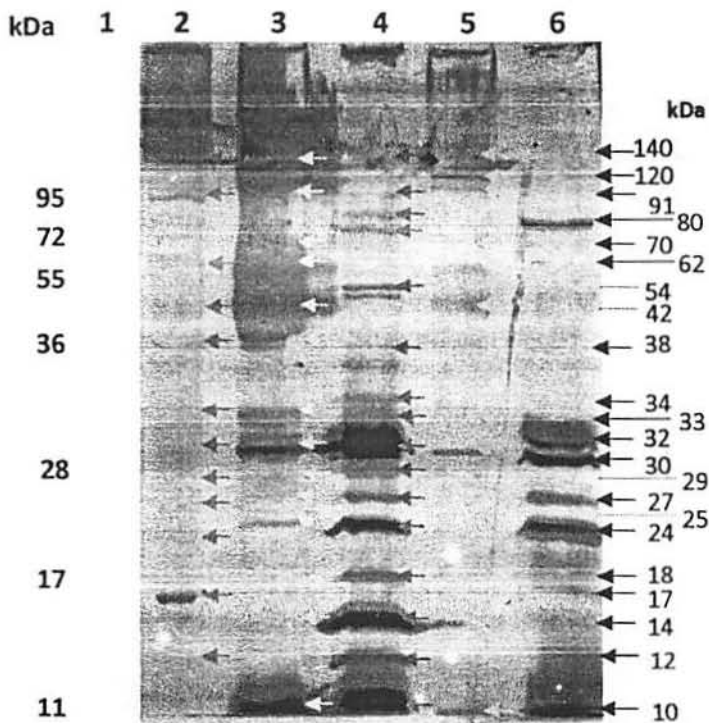
Perbedaan karakter yang terjadi pada pita ikatan antara Ag-Ab baik pada *T. canis* tersebut menunjukkan bahwa kemungkinan selain terdapat perbedaan kadar protein dalam homogenat juga memang protein tersebut berbeda secara genetik walaupun protein tersebut memiliki BM yang sama (Kusnoto, 2008). Konsentrasi

protein yang digunakan sebagai sumber antigen sangat berpengaruh terhadap imunogenisitas antigen tersebut (Abbas *et al.*, 2000), namun demikian pada uji yang lebih peka tidak menutup kemungkinan pita yang lebih tipis justru lebih spesifik (Kusnoto dkk., 2005; Kusnoto, 2008) dan dapat juga memiliki antigenisitas yang lebih tinggi. Hal ini sesuai dengan pendapat Obwaller *et al.* (2001) yang menyatakan, bahwa miosin (*miocin*) dari parasit nematoda memicu respons imun humoral (RIH) dan seluler dengan kuat dan banyak diteliti sebagai kandidat vaksin miosin. Pada parasit nematoda, miosin diperlukan untuk mobilitas parasit, pada waktu yang sama miosin menjadi terbuka dari kutikula bilamana salah satu parasit dihancurkan dan menjadi antigen yang penting. Pada *T. canis* menunjukkan sebagai antigen yang kuat, khususnya bagian rantai berat (*heavy chain*).

5.3.2 Deteksi reaksi silang antara antigen *T. cati* dan serum anti-*T. canis* dengan teknik *Western blot*

Deteksi reaksi silang antar *Toxocara* spp. dari anjing dan kucing menggunakan teknik *Western Blot* dengan pewarnaan *fast red.*, dilakukan untuk protein *T. cati* terhadap serum anti-*T. canis* (Gambar 5.8). Protein yang digunakan dari berbagai organ *T. cati*, yaitu: somatik (kolom 2), intestinum (kolom 3), ES cacing dewasa (kolom 4), *whole worm extract* cacing dewasa (kolom 5), dan ES L2J (kolom 6).

Pada Gambar 5.8 tampak beberapa pita reaksi silang antara protein *T. cati* dengan antibodi poliklonal terhadap *T. canis*, yaitu pada protein *T. cati* dari antigen somatik dengan BM 140, 91, 62, 42, 38, 34, 33, 29-32, 27, 24, 17, 14 dan 12 kDa (kolom 2), intestinum BM 140, 91, 70, 62, 42, 38, 33, 29-32, 27, 24, 14, dan 10 kDa (kolom 3), ES cacing dewasa BM 140, 91, 80, 62, 54, 38, 34, 33, 29-32, 27, 24, 18, 17, 14, 12 dan 10 kDa (kolom 4), *whole worm extract* cacing dewasa BM 140, 120, 91, 70, 62, 54, 42, 33, 29-32, 27, 25, 24, 14 dan 10 kDa (kolom 5), dan ES L2J BM 140, 120, 91, 80, 62, 38, 34, 33, 32, 30, 27, 24, 18, 17, 14, 12 dan 10 kDa (kolom 6).



Gambar 5.8 Hasil karakterisasi protein *T. cati* dengan serum anti-*T. canis* menggunakan teknik *Western blot*. Kolom 1=marker, 2=antigen somatik, 3=intestinum, 4=ES *T. cati* dewasa, 5=*whole worm extract T. cati* dewasa, 6=ES L2J.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa banyak terjadi reaksi silang Ag-Ab antara dua spesies *Toxocara* spp. dari kucing dan anjing, hal ini sesuai dengan pendapat Troncy (1989) yang menyatakan, bahwa reaksi silang antar parasit dapat terjadi karena sebagian besar jenis parasit sering kali mempunyai profil protein yang hampir sama sehingga sering kali mengakibatkan reaksi silang. 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). Pita reaksi silang juga terjadi antara serum anti-L2J *T. canis* dengan antigen *T. vitulorum*, yaitu kebanyakan terdapat pada protein dengan BM lebih dari 45 kDa, bahkan dengan cacing klas lain (Kusnoto, 2003; 2008). Fraksi dengan BM tinggi

memiliki kemungkinan yang lebih besar untuk terjadinya reaksi silang sedangkan fraksi protein dengan BM rendah lebih spesifik untuk genus *Toxocara* (Morales *et al.*, 2002; Kusnoto dkk., 2005; Kusnoto, 2008).

Protein yang menunjukkan reaksi silang antar spesies ini dapat dikembangkan untuk diagnosis toxocariasis tanpa memperhatikan spesies, dapat juga dikembangkan sebagai kandidat vaksin dan untuk produksi hiper imun serum anti-toxocara sebagai terapi alternatif pada kasus toxocariasis. Untuk keperluan itu bahkan dapat menggunakan *crude* protein (de Savigny *et al.*, 1979) karena pada ES *Toxocara* spp. bersifat antigenik kuat dengan unsur pokok glikoprotein (Sugane and Oshima, 1983). Protein yang menunjukkan reaksi silang baik antara antigen *T. cati* dan antibodi *T. canis* maupun antigen *T. canis* dan antibodi *T. cati* adalah pada BM 140, 91, 42, 38, 34, 33, 32, 30, 29, 27, 24, 14 dan 12 kDa. Hal ini mungkin karena banyak peptida (asam amino) yang overlapping dan komposisi asam amino pada epitop dengan kemiripan yang tinggi (Rantam, 2003).

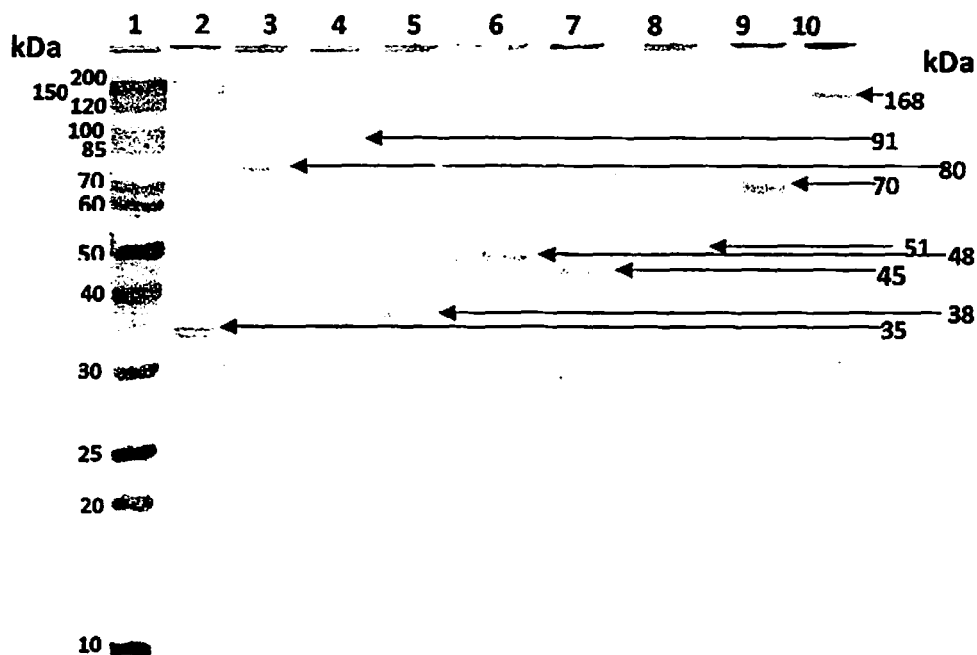
Protein yang tidak menunjukkan reaksi silang antar spesies dapat dikembangkan sebagai antigen untuk diagnosis toxocariasis hingga pada tingkat spesies, misalnya pada *T. cati* adalah protein dengan BM 168, 120, 80 dan 70 kDa, sedangkan pada spesifik *T. canis* adalah protein dengan BM 168, 51, 48, 45, dan 35 kDa. Protein tersebut kemungkinan bersifat spesifik spesies yang dapat dikembangkan dan dikaji lebih lanjut sebagai antigen diagnostik etiologik. Sekilas nampak protein dengan BM 168 kDa tidak dikenali oleh kedua antibodi baik terhadap *T. cati* maupun *T. canis*, namun protein tersebut ditengarai terjadi reaksi silang dengan cacing selain *Toxocara* spp. misalnya *Fasciola* spp., *Moniezia* spp., *Ancylostoma* spp. dan *Dipylidium* sp. (Kusnoto; 2003; Kusnoto dkk., 2005), sehingga pada uji selanjutnya diutamakan untuk menggunakan protein 70 kDa pada *T. cati* dan 45 kDa pada *T. canis*.

Pita reaksi silang juga didapatkan dengan spesies lain dari *Toxocara* spp., misalnya pengamatan dengan *immunoblotting* menunjukkan polipeptida dari telur *F. gigantica* dikenali oleh serum kelinci anti-cacing dewasa. Komponen protein dengan BM 240 dan 206 kDa dari telur *F. gigantica*, *Toxocara vitulorum* dan *Moniezia expansa* dikenali oleh antiserum anti-cacing dewasa yang berbeda (Abdel-Rahman *et al.*, 2000). Kusnoto (2003) menyatakan, bahwa dengan teknik *Western blot* antigen *F. gigantica* dikenali oleh serum anti-L2 *T. cati* pada BM 133 kDa. Pengamatan terhadap *whole worm extract* dengan teknik *immunoblotting* menunjukkan hasil, bahwa serum 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 serum anti-*T. vitulorum* pada BM 133 kDa dan anti-*M. expansa* pada BM 52 kDa (Abdel-Rahman and Megeed, 2000). Hal ini menunjukkan bahwa protein tersebut memiliki spesifisitas yang rendah karena dapat dikenali oleh antibodi terhadap cacing lain. Reaksi silang dilaporkan juga dapat terjadi dengan infeksi cacing misalnya brugiasis, loiasis, trichinellosis, strongyloidiasis, gnathostomiasis, angiostrongylosis, anisakiasis, ascariasis, ancylostomiasis, schistosomiasis, paragonomiasis, fascioliasis, sparganosis dan spirometriasis (Park *et al.*, 2002; Lynch *et al.*, 1988; Ishida *et al.*, 2003; Gillespie *et al.*, 1993; Yamasaki *et al.*, 2000). Reaksi silang antara antibodi dengan antigen ES pada uji imunologik menggambarkan keberadaan antigen atau epitop bersama (Nicholas *et al.*, 1984).

5.4 Identifikasi Protein Murni Hasil Isolasi, dengan Teknik SDS-PAGE

Berdasarkan hasil preparasi protein dengan teknik SDS-PAGE dan karakterisasi protein dengan teknik *Western blot* telah dilakukan isolasi protein dengan teknik elusi, kemudian masing-masing hasil isolasi dilakukan SDS-PAGE kembali. Analisis protein hasil elusi protein cacing *Toxocara* spp. dari anjing dilakukan untuk mendapatkan

protein murni yang akan digunakan pada uji antigenisitas dengan teknik *dot-blot* dan ELISA. Elusi protein dilakukan dari larva kedua dorman (L2J) dari jaringan mencit yang sebelumnya diinfeksi L2 *Toxocara canis*. Isolasi protein *T. canis* dilakukan dari L2J difokuskan pada protein dengan BM 168, 91, 80, 70, 51, 48, 45, 38 dan 35 kDa ditampilkan pada Gambar 5.9.



Gambar 5.9 Hasil identifikasi protein murni hasil isolasi dari *T. canis* dengan teknik SDS-PAGE. Kolom 1 = marker, kolom 2-10 = protein murni *T. canis* hasil isolasi.

Hasil analisis protein murni ES L2J *T. canis* yang difokuskan pada protein dengan BM 120, 70, 62, 45, 42, 32, 24, dan 10, kDa. Protein *T. canis* yang lebih dominan adalah protein dengan BM 70 dan 32 kDa. Perbedaan ini menunjukkan perbedaan secara genetik di antara beberapa 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 respons imun dan mampu bertahan hidup dalam jaringan hospes hingga beberapa bulan hingga 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.

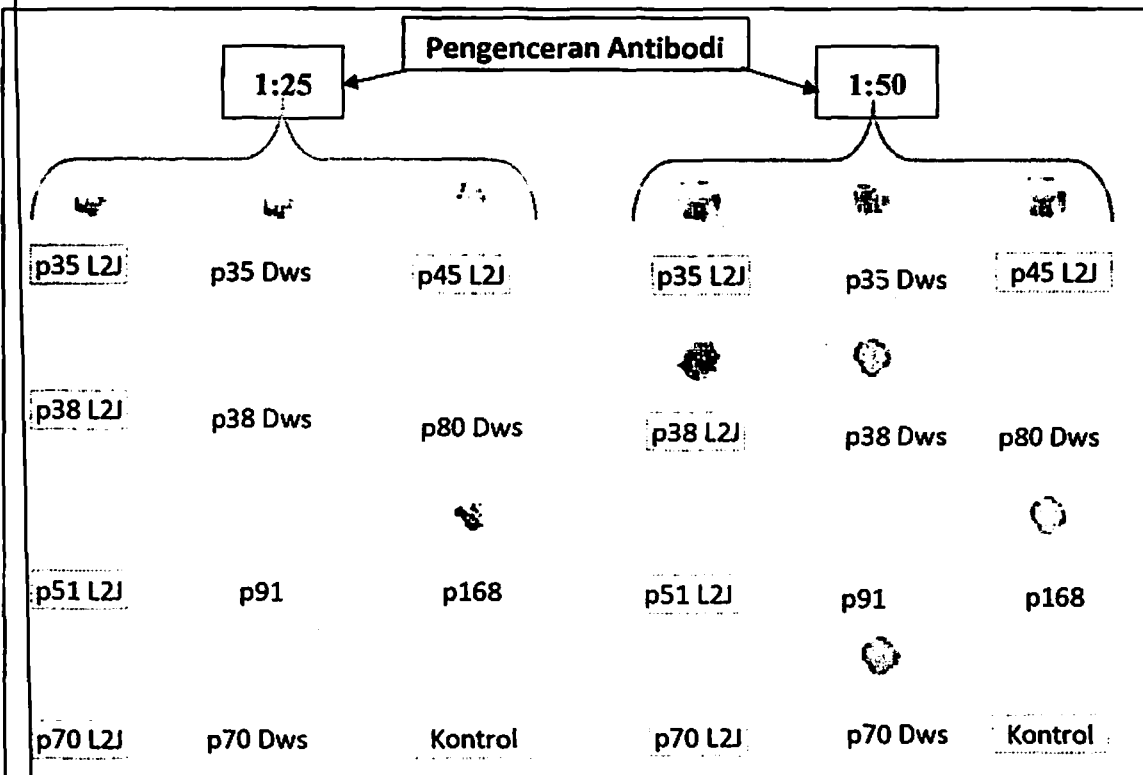
Permukaan (*surface*) larva infeksi dari *Toxocara* spp. merupakan lapisan antigenik, kandungan utama adalah famili dari sekresi *mucin* yaitu TES-120 (Page *et al.*, 1992b). Lapisan *surface* ini lepas dengan cepat bilamana parasit di bawah serangan imun bersama dengan sel efektor *adherent* dan antibodi (Badley *et al.*, 1987), *T. canis* dengan cara damatik mampu menghindar dari destruksi imun (Doedens *et al.*, 2001). Mucin disintesis dalam jumlah banyak oleh *oesophageal* dan glandula sekretoris dari larva (Page *et al.*, 1992a), dan disekresi dalam jumlah banyak oleh parasit yang dipelihara secara *in vitro*, maka dari itu hal ini dipostulatkan bahwa parasit mungkin mengadakan pengalihan imunologik untuk pertahanannya secara *in vivo* (Maizels *et al.*, 2000). Hal ini memberi gambaran bahwa sekresi *mucin* pada *Toxocara* spp. bersama gula hospes untuk memblok infiltrasi leukosit ke dalam jaringan terinfeksi. Dapat dinyatakan bahwa *mucin* mungkin merupakan keistimewaan yang menonjol dalam imunobiologi infeksi nematoda termasuk toxocariasis (Doedens *et al.*, 2001). Pada nematoda, miosin merupakan protein esensial untuk motilitas larva (Obwaller *et al.*, 2001).

5.5 Hasil Uji Antigenisitas Protein *Toxocara canis*

Uji antigenitas dilakukan dengan teknik *dot-blot* dan ELISA, uji *dot-blot* dilakukan terhadap beberapa protein murni hasil isolasi dari ES-L2J sedangkan ELISA dilakukan untuk *crude protein* dan protein murni *T. canis*.

5.5.1 Hasil uji antigenisitas protein murni *T. canis* dengan teknik *Dot blot*

Untuk mengetahui antigenisitas masing-masing protein spesifik yang telah berhasil diisolasi maka dilakukan uji *dot blot*. Uji antigenisitas dengan teknik *dot blot* dilakukan terhadap protein *T. canis* dilakukan terhadap protein L2J dengan BM 35, 38, 45, 51 dan 70 kDa, dan protein cacing dewasa dengan BM 35, 38, 70, 80, 91, dan 168 kDa (Gambar 5.10).



Gambar 5.10 Hasil uji antigenisitas protein murni ES L2J dan cacing dewasa terhadap serum anti-L2J *T. canis* dengan teknik *dot blot*.

Hasil uji antigenisitas protein *Toxocara canis* dengan teknik *dot blot* dengan pengenceran antibodi anti-L2 jaringan sebesar 1/25 belum dapat menunjukkan reaksi yang spesifik, tetapi dengan pengenceran 1/50 sudah mulai tampak spesifitas masing-masing protein. Namun demikian untuk memberikan hasil yang optimal pengenceran sebesar 1/50 tampaknya masih kurang sehingga perlu ditingkatkan lagi.

Hasil tersebut menunjukkan bahwa protein dengan BM 35, 45, 38, 70 dan 168 kDa baik dari L2 maupun cacing dewasa *T. canis* mampu berikatan dengan serum anti-L2 sehingga dapat dinyatakan mempunyai antigenisitas yang tinggi. Hal ini digambarkan dengan hasil uji *Dot-blot* yang lebih tegas terutama pada pengenceran 1/50. Adapun protein dengan BM 51, 80, 91 kDa dieksperimen dengan warna yang lebih terang, namun demikian pada uji yang lebih peka mungkin dapat memberikan hasil yang lebih spesifik dibanding protein yang diekspresikan lebih tegas. Pada penelitian ini, imunisasi pada pembuatan antibodi poliklonal pada kelinci dilakukan dengan penyuntikan homogenat cacing utuh, hal ini dengan maksud memberikan kondisi seperti infeksi alam yang juga terjadi paparan berupa parasit utuh. Rantam (2003) menyatakan bahwa, limfosit T dan B hanya mampu mengenali satu epitop yang spesifik. Jadi adanya respons imun yang diinduksi oleh banyak epitop, maka diperlukan pengaktifan limfosit untuk berdeferensiasi menjadi bermacam-macam limfosit spesifik terhadap epitop. Protein dengan BM yang sama tetapi apabila mempunyai epitop berbeda maka belum tentu terjadi ikatan dengan antibodi sehingga pita reaksi tidak terjadi (Harlow and Lane, 1988).

5.5.2 Hasil uji antigenisitas protein *T. canis* terhadap serum mencit pada dosis infeksi berbeda dengan teknik *indirect-ELISA*

Pemeriksaan antigenisitas protein *Toxocara* spp. terhadap serum darah mencit dengan teknik *indirect-ELISA* dilakukan terhadap antigen cacing *Toxocara canis*. Data yang diperoleh berupa nilai *optical density* (OD) dilakukan analisis statistik dengan Anava terhadap dosis infeksi berbeda, sedangkan secara kualitatif dinyatakan dalam bentuk OD+ dan OD- yang disajikan secara deskriptif.

Hasil pemeriksaan serum darah mencit dengan dosis berbeda menggunakan teknik *indirect-ELISA* dan analisis statistik secara lengkap dapat dilihat pada Lampiran 2, sedangkan rata-rata dan simpangan baku (standar deviasi) pada berbagai perlakuan disajikan pada Tabel 5.1. Nilai OD rata-rata serum mencit kontrol adalah sebesar 0,293

yang menunjukkan perbedaan sangat bermakna ($p < 0,01$) dengan perlakuan lain, yaitu dosis 10 butir/g BB sebesar 0,797, dan 17 butir/g BB sebesar 0,800 (Tabel 5.1). Diketahui pula bahwa kedua dosis (10 dan 17 butir/g BB) tidak menunjukkan perbedaan bermakna ($p > 0,05$).

Tabel 5.1 Rata-rata dan Standar Deviasi Nilai OD Berdasarkan Uji HSD 1% terhadap Dosis Infeksi Berbeda

Dosis infeksi	Rata-rata \pm Std. Deviasi
Kontrol	0,295 ^a \pm 0,050
10 butir/g BB	0,797 ^b \pm 0,220
17 butir/g BB	0,800 ^b \pm 0,213

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

Hasil penghitungan nilai OD secara kualitatif (OD + dan -) serum darah mencit yang diinfeksi dengan *Toxocara* spp. untuk dosis berbeda pada berbagai Ag-Ab secara lengkap dapat dilihat pada Lampiran 3, sedangkan tabulasi silang secara ringkas dapat dilihat pada Tabel 5.2.

Tabel 5.2 Tabulasi Silang Nilai OD Positif (+) dan Negatif (-) Serum Mencit yang Diinfeksi *T. canis* terhadap Dosis Berbeda

Dosis	Optical Density (OD)		Total
	Positif (+)	Negatif (-)	
10 butir/g BB	4	1	5
17 butir/g BB	5	0	5
Total	9	1	10

Dari Tabel 5.2 tampak bahwa nilai OD (+) pada dosis 10 dan 17 butir/g BB masing-masing adalah 4 (80%) dan 5 (100%) dari 5 sampel.

Secara kuantitatif Dosis 10 dan 17 butir/g BB menunjukkan nilai OD yang tidak berbeda bermakna ($p > 0,05$) dan keduanya menunjukkan perbedaan bermakna dengan serum mencit kontrol ($p < 0,05$). Pada dosis 10 butir/g BB, dengan berat mencit 42 g/ekor berarti tiap ekor mencit diinfeksi diinfeksi 420 butir L2 *Toxocara* spp.,

sedangkan pada dosis 17/g BB berarti mencit diinfeksi sebanyak 714 butir/ekor. Nicholas *et al.* (1984) juga mempelajari respons imun mencit yang diinfeksi L2 *T. canis* dengan dosis 1000 butir/ekor mendapatkan antibodi yang tinggi pada minggu keempat hingga ketujuh, dan mulai turun pada minggu kedelapan.

5.6 Hasil Uji Antigenisitas, Sensitivitas dan Spesifisitas Protein *T. canis* pada Diagnosis Toxocariasis dalam Serum Darah Mencit yang Diimunisasi Berbagai Homogenat Cacing

Hasil pemeriksaan antigenisitas protein *Toxocara* spp. pada diagnosis toxocariasis dalam serum darah mencit yang diimunisasi berbagai homogenat cacing dengan teknik *indirect-ELISA* dan analisis statistik terhadap nilai OD yang diperoleh secara lengkap dapat dilihat pada Lampiran 4 dan 5.

5.6.1 Hasil uji antigenisitas protein murni *Toxocara canis* pada diagnosis toxocariasis dalam serum darah mencit yang diimunisasi berbagai homogenat cacing

Antigen yang digunakan pada uji antigenisitas dengan teknik *indirect-ELISA* ini adalah protein 45 kDa dari ES L2J *T. canis*. Rata-rata nilai OD pada mencit yang diimunisasi dengan homogenat L2J *T. cati* adalah sebesar 0,558 pada mencit yang diimunisasi homogenat L2J *T. canis* 0,550 pada mencit yang diimunisasi homogenat *Ancylostoma* spp. sebesar 0,254, pada mencit yang diimunisasi homogenat *D. caninum* sebesar 0,247, sedangkan pada kontrol adalah sebesar 0,207. Setelah dilakukan analisis statistik dengan uji Anava terhadap hasil pembacaan nilai OD serum mencit tersebut dapat diketahui, bahwa terdapat perbedaan sangat bermakna ($p < 0,01$) diantara nilai OD serum mencit pada berbagai perlakuan.

Berdasarkan hasil analisis statistik dengan uji HSD 5% dapat diketahui bahwa, hasil pembacaan nilai OD serum mencit yang diimunisasi L2J *T. cati* dan L2J *T. canis* secara bermakna menunjukkan hasil lebih tinggi ($p < 0,05$) dibanding serum mencit yang diimunisasi *Ancylostoma* spp., *D. caninum* dan serum kontrol (Tabel 5.3).

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

Antibodi (serum)	Rata-rata Nilai OD ₄₀₅ ± SD
Anti-L2J <i>T. cati</i>	0,558 ^b ± 0,322
Anti-L2J <i>T. canis</i>	0,550 ^b ± 0,322
Anti- <i>Ancylostoma</i> spp.	0,254 ^a ± 0,145
Anti- <i>D. caninum</i>	0,247 ^a ± 0,145
Kontrol (-) Serum	0,208 ^a ± 0,208

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

Berdasarkan hasil analisis statistik dengan uji Anava dapat diketahui bahwa, hasil pembacaan nilai OD serum mencit yang diimunisasi L2 dorman *Toxocara* spp. secara sangat bermakna menunjukkan hasil lebih tinggi ($p < 0,01$) dibanding serum mencit yang diimunisasi *Ancylostoma* spp., *D. caninum* dan serum kontrol. Hasil tersebut menunjukkan bahwa nilai antigenesitas protein murni terhadap antibodi anti-L2J *Toxocara* spp. dalam serum mencit lebih tinggi dibandingkan dengan antibodi anti-*Ancylostoma* spp. Hal ini kemungkinan dapat terjadi karena adanya perbedaan antigenik antara protein *Toxocara* spp. dengan *Ancylostoma* spp. dan *D. caninum*, dalam memicu respons imun mencit. Walaupun secara material dalam tubuh cacing terkandung berbagai protein (*crude protein*), masing-masing protein itu dapat memicu respons imun mencit dengan membentuk antibodi yang juga beragam baik klas maupun subklasnya, namun belum tentu dapat berikatan secara spesifik dengan protein murni *Toxocara* spp., sehingga dalam pembacaan dengan ELISA-reader menunjukkan nilai OD yang lebih rendah.

Limfosit T dan B hanya mampu mengenali satu epitop yang spesifik. Jadi adanya respons imun yang diinduksi oleh banyak epitop, maka diperlukan pengaktifan limfosit untuk berdeferensiasi menjadi berbagai limfosit spesifik terhadap epitop. Pengaktifan berbagai limfosit tersebut dapat menumbuhkan banyak klon dari sel yang

sama untuk merespons antigen, sehingga mengakibatkan proliferasi dan diferensiasi limfosit dengan spesifisitas yang berbeda, oleh karena itu dikenal dengan antibodi poliklonal (Rantam, 2003). Karena antigen yang digunakan adalah protein murni dari ES L2J *Toxocara* spp. maka antibodi anti-*Ancylostoma* spp. dan anti-*D. caninum* yang terikat secara spesifik lebih sedikit, dengan demikian dalam pembacaan dengan ELISA-*reader* menunjukkan nilai OD yang lebih rendah.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa antara protein *T. cati* dan *T. canis* memiliki antigenitas yang sama ($p > 0,05$). Material ES *Toxocara* spp. mengandung banyak glikoprotein yang bersifat antigenik kuat (Maizels, 2004). Pengamatan terhadap biologi molekuler *Toxocara* dapat difokuskan pada protein sekresi stadium *migrating juvenile*, protein ini memungkinkan dapat digunakan sebagai immuno-diagnosis dari *visceral larvae migrans* (VLM) dan *ocular larvae migrans* (OLM) (Despommier, 2003). Kenyataan menunjukkan bahwa beberapa protein ES dari stadium *juvenile* setidaknya terdapat 6 macam mucin dengan antigenitas tinggi (Dpedens *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.*, 1992b) dan mengalir pada hospes secara periodik (Badley *et al.*, 1987).

5.6.2 Hasil uji sensitivitas dan spesifisitas protein murni pada diagnosis toxocariasis dalam serum darah mencit yang diimunisasi berbagai homogenat cacing

Hasil pemeriksaan nilai OD positif (+) dan negatif (-) secara lengkap dapat dilihat pada Lampiran 8. Untuk menyatakan hasil positif maka nilai OD pada sampel harus melebihi 2 x COV kontrol (-) atau lebih besar dari nilai rata-rata OD kontrol negatif. Pada penelitian ini nilai OD kontrol negatif sebesar 0,208, sehingga OD dinyatakan positif jika lebih besar dari 2 x 208 ($> 0,415$) dan dinyatakan negatif (-) jika nilai OD yang diperoleh pada sampel (perlakuan) lebih kecil dari 2 x 208 ($< 0,415$).

Penghitungan nilai sensitivitas dan spesifisitas protein murni *Toxocara* spp. pada diagnosis toxocariasis dalam serum darah mencit pada berbagai perlakuan dapat dilihat pada tabulasi silang yang tercantum dalam Tabel 5.4.

Tabel 5.4 Tabulasi Silang Hasil Penghitungan Nilai Sensitivitas dan Spesifisitas Protein Murni *Toxocara* spp. pada Diagnosis Toxocariasis Serum Hewan Coba (Mencit)

Imunisasi <i>Toxocara</i> spp*	Hasil ELISA		Total
	OD +	OD -	
Toxocariasis +	16 (100%)	0 (0%)	16
Toxocariasis -	2 (12,5%)	14 (87,5%)	16
Total	18	14	32

* *Toxocara* + = mencit yang diimunisasi ES L2J *Toxocara* spp., *Toxocara* - = mencit yang diimunisasi homogenat cacing lain (*Ancylostoma* spp. dan *D. caninum*)

Berdasarkan tabulasi silang pada Tabel 5.5, dapat diketahui nilai OD + hasil ELISA sebesar 16 dari 16 sampel serum mencit yang diimunisasi homogenat L2J *Toxocara* spp. sehingga didapatkan nilai sensitivitas 100%. Nilai OD - hasil ELISA sebesar 14 dari 16 sampel serum mencit yang diimunisasi homogenat cacing *Ancylostoma* spp. dan *D. caninum* sehingga didapatkan nilai spesifisitas sebesar 87,5%.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa nilai sensitivitas protein murni hasil isolasi dari ES L2J *Toxocara* spp., yaitu P70 kDa *T. cati* dan P45 kDa *T. canis* terhadap antibodi anti-L2J *Toxocara* spp. dalam serum darah mencit adalah sebesar 100% dan spesifisitas 87,5%. Nilai sensitivitas yang diperoleh pada penelitian ini tergolong sangat tinggi dibandingkan dengan hasil yang diperoleh oleh Glickman *et al.* (1978) yaitu didapatkan nilai sensitivitas yang lebih rendah yaitu sebesar 78,3%, namun nilai spesifisitas yang diperoleh lebih tinggi yaitu sebesar 92,3%. Sementara itu Kusnoto (2008) yang menggunakan protein 27-28 kDa untuk diagnosis distomatosis pada sapi didapatkan nilai sensitivitas sebesar 63,6 % dan spesifisitas 87,5%. Secara umum penggunaan antigen *Toxocara* spp. pada pemeriksaan serum dengan teknik ELISA

sensitivitas dinyatakan tinggi bila pada rentang 80-100% dan spesifisitas dinyatakan sangat tinggi bila pada rentang 86-100% (Park *et al.*, 2002; Dubinsky *et al.*, 2000; Malla *et al.*, 2000; Yamasaki *et al.*, 2000).

Nilai spesifisitas yang diperoleh pada penelitian ini adalah sebesar 87,5%, hal ini berarti masih terjadi *false* positif sebesar 12,5%. Hal ini menggambarkan betapa tinggi kejadian reaksi silang yang terjadi pada infeksi parasit khususnya cacing, bahkan sekalipun kontrol yang digunakan adalah cacing lain klas. Apalagi jika digunakan antigen yang masih berupa *crude protein*. Spesifisitas tidak menjadi masalah besar bagi negara maju karena infeksi parasit tidak bersifat umum dan infeksi cacing dari tanah terkontaminasi (*soil-transmitted*) dengan prevalensi rendah, namun demikian hal ini merupakan masalah yang berarti pada serodiagnosis di negara tropik (Noordin *et al.*, 2005). Seroprevalensi infeksi *Toxocara* spp. yang tinggi didapatkan di negara berkembang dengan iklim lembab yang cocok untuk perkembangan telur cacing di dalam tanah (Magnaval *et al.*, 2001; Kaplan *et al.*, 2002; Kaplan *et al.*, 2008).

Adanya reaksi silang pada penggunaan antigen ekstrak *crude protein* memberikan isyarat bahwa pada uji imunodiagnostik membutuhkan bahan uji yang lebih spesifik. Abdel-Rahman (2000) menyatakan bahwa, purifikasi protein cacing *T. vitulorum* dewasa ternyata menghasilkan fraksi protein yang dapat meningkatkan spesifisitas (*specific activity*) dibanding dengan *crude extract*. Hal ini juga tampak pada penggunaan *crude extract* dari cacing *Toxocara canis* yang menunjukkan reaksi silang dengan antibodi terhadap *Toxocara vitulorum* dan *Ascaris lumbricoides*, tetapi reaksi silang bisa ditekan bila menggunakan *partially purified antigen* (Safar *et al.*, 1992). Hasil yang hampir sama didapatkan oleh Kusnoto (2008) yang menggunakan *crude protein* dari material ES *Fasciola* spp. didapatkan nilai sensitivitas 100% dengan spesifisitas 0%, tetapi bila menggunakan protein murni (P27-28 kDa) didapatkan nilai sensitivitas 63,6% dengan nilai spesifitas 87,5%. Hal ini berarti nilai spesifisitas dapat ditingkatkan

bila menggunakan protein yang lebih murni, walaupun sensitivitasnya menjadi lebih rendah. Hospes yang terinfeksi oleh parasit akan menimbulkan respons imun terhadap banyak epitop, maka perlu dikembangkan bahan uji yang lebih spesifik, yaitu dengan jalan membuat manipulasi sistem imun dengan cara hibridoma, yang merupakan turunan klon tunggal dari sel B yang teraktivasi untuk memproduksi antibodi yang homogen atau *single molecular species of antibody* yang hasilnya dikenal dengan antibodi monoklonal (Rantam, 2003).

5.7 Hasil Pengamatan Profil Subkelas Immunoglobulin (Ig) G Serum Mencit yang Diinfeksi *Toxocara* spp. dengan ELISA-Isotyping Kit

Pengamatan profil subkelas immunoglobulin (Ig) G serum mencit yang diinfeksi *Toxocara* spp. dengan ELISA-isotyping kit dilakukan terhadap Ig G1, Ig G2 α , Ig G2 β dan Ig G3. Data yang diperoleh berupa nilai *optical density* (OD) diinterpretasikan secara kuantitatif dan kualitatif. Secara kuantitatif nilai OD dilakukan analisis statistik secara langsung dengan Anava Faktorial dengan variabel bebas subkelas Ig G dan waktu pengamatan (Lampiran 6), sedangkan secara kualitatif nilai OD dinyatakan dalam bentuk positif (OD+) dan negatif (OD-). Nilai OD dinyatakan positif bila nilai OD serum mencit pada perlakuan lebih besar atau sama dengan 1,5 x COV rata-rata kontrol negatif dan sebaliknya (Lampiran 7).

5.7.1 Hasil pengamatan profil subkelas immunoglobulin (Ig) G serum mencit yang diinfeksi *T. canis* dengan ELISA-isotyping kit secara kuantitatif

Nilai OD serum mencit anti-*T. canis* terhadap berbagai waktu pengamatan pada berbagai subkelas Ig G menunjukkan perbedaan bermakna ($p < 0,05$). Nilai OD rata-rata tertinggi didapatkan pada hari ke-28 yaitu sebesar $0,257 \pm 0,168$ yang tidak menunjukkan perbedaan bermakna ($p > 0,05$) dengan Hari ke-7 dan Hari ke-14 dengan rata-rata OD masing-masing sebesar $0,208 \pm 0,089$ dan $0,217 \pm 0,103$, akan tetapi

menunjukkan perbedaan bermakna ($p < 0,05$) dengan Hari ke-0 dengan rata-rata OD sebesar $0,168 \pm 0,300$ (Tabel 5.5).

Tabel 5.5 Nilai OD Rata-rata dan Standar Deviasi (SD) Serum Mencit Anti-*T. canis* terhadap Waktu Pengamatan pada Berbagai Subkelas IgG

Waktu pengamatan (Hari ke...)	Rata-rata OD \pm SD
Hari ke-0	$0,168^a \pm 0,300$
Hari ke-7	$0,208^{ab} \pm 0,089$
Hari ke-14	$0,217^{ab} \pm 0,103$
Hari ke-28	$0,257^b \pm 0,168$

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

Nilai OD rata-rata serum mencit anti-*T. canis* terhadap berbagai subkelas Ig G pada berbagai waktu pengamatan disajikan pada Tabel 5.6.

Tabel 5.6 Nilai OD Rata-rata dan SD Serum Mencit Anti-*T. canis* pada Subkelas Ig G Berbeda dan Berbagai Waktu Pengamatan

Subkelas Ig G	Rata-rata OD \pm SD
Ig G1	$0,179^{ab} \pm 0,048$
Ig G2 α	$0,271^d \pm 0,091$
Ig G2 β	$0,238^{cd} \pm 0,165$
Ig G3	$0,160^a \pm 0,074$

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

Dari Tabel 5.6 terlihat nilai OD rata-rata serum mencit anti-*T. canis* masing-masing adalah Ig G1 sebesar $0,179 \pm 0,048$, Ig G2 α $0,272 \pm 0,091$, Ig G2 β $0,238 \pm 165$ dan IgG3 $0,160 \pm 0,074$. Nilai OD tersebut menunjukkan perbedaan sangat bermakna ($p < 0,01$) antar subkelas Ig G tanpa memperhatikan waktu pengamatan. Berdasarkan uji HSD 5% dapat diketahui bahwa nilai OD tertinggi didapatkan pada Ig G2 α yang

menunjukkan perbedaan tidak bermakna ($p > 0,05$) dengan Ig G2 β , akan tetapi keduanya berbeda bermakna ($p < 0,05$) dengan Ig G1 dan Ig G3.

Rata-rata dan SD nilai OD perlakuan kombinasi dapat dilihat pada Tabel 5.7. Berdasarkan hasil analisis statistik OD serum mencit anti-*T. canis* dengan uji Anava Faktorial diketahui bahwa interaksi antara waktu pengamatan dan subkelas Ig G tidak signifikan ($p > 0,05$).

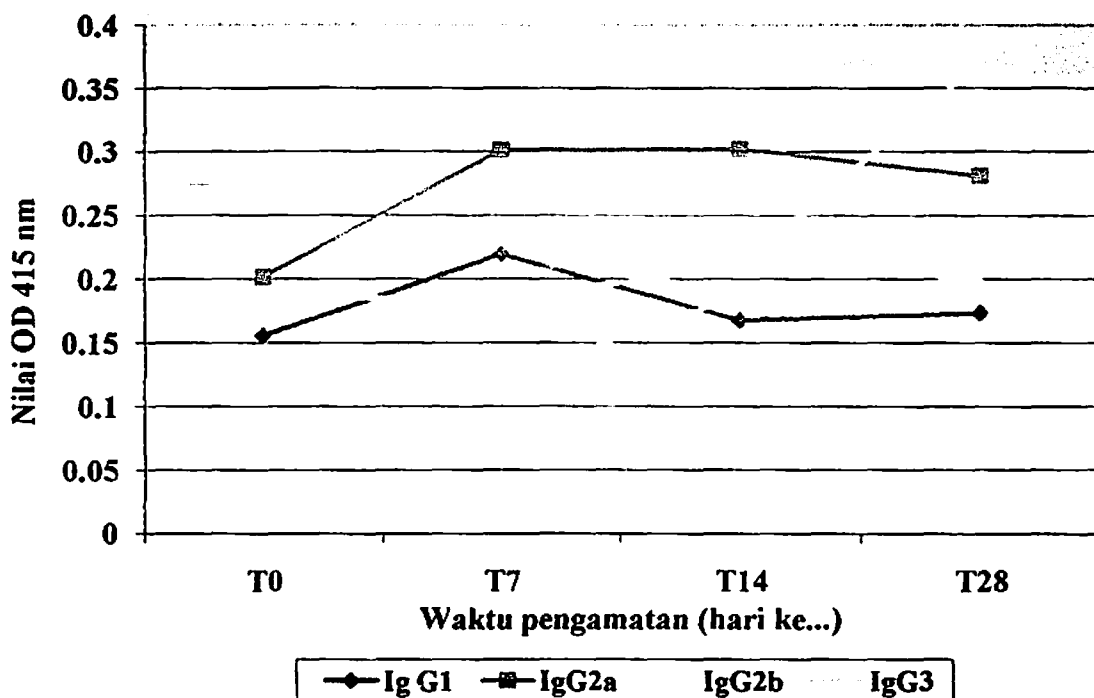
Tabel 5.7 Nilai OD Rata-rata dan Standar Deviasi Serum Mencit Anti-*T. canis* pada Perlakuan Kombinasi antara Waktu Pengamatan dan Subkelas Ig G

Waktu	Rata-rata \pm SD Subkelas Ig G			
	Ig G1	IgG2a	IgG2b	IgG3
Hari-0	0.156 \pm 0.005	0.202 \pm 0.007	0.186 \pm 0.010	0.129 \pm 0.012
Hari-7	0.220 \pm 0.061	0.301 \pm 0.099	0.185 \pm 0.038	0.123 \pm 0.024
Hari-14	0.168 \pm 0.031	0.302 \pm 0.132	0.210 \pm 0.062	0.187 \pm 0.118
Hari-28	0.174 \pm 0.053	0.281 \pm 0.051	0.371 \pm 0.303	0.201 \pm 0.069

Untuk memperjelas gambaran profil subkelas Ig G terhadap *T. canis* pada berbagai waktu pengamatan dapat dilihat pada gambar garis antara waktu pengamatan (Hari) dengan nilai OD serum mencit masing-masing subkelas Ig G yang diperoleh dari ELISA-reader (Gambar 5.11).

5.7.2 Hasil pengamatan profil subkelas imunoglobulin (Ig) G serum mencit yang diinfeksi *T. canis* dengan ELISA-isotyping kit secara kualitatif

Hasil pembacaan ELISA-reader terhadap serum mencit yang diinfeksi *T. canis* dan tabulasi silang secara lengkap dapat dilihat pada Lampiran 12. Hasil pengamatan nilai OD (+ dan -) serum mencit yang diinfeksi *T. canis* tanpa memperhatikan subkelas Ig G pada hari ke-7, ke-14 dan ke-28 berturut-turut adalah sebesar 4, 9 dan 12 masing-masing dari 24 sampel (Tabel 5.8).



Gambar 5.11 Profil subkelas Ig G serum mencit yang diinfeksi *T. canis* pada berbagai waktu pengamatan.

Tabel 5.8 Tabulasi Silang OD (+ dan -) Serum Mencit Anti-*T. canis* Terhadap Waktu Pengamatan Berbeda pada Berbagai Subkelas Ig G

Waktu	OD <i>T. canis</i> = 1.5xCOV hari-0		Total
	Positif (+)	Negatif (-)	
Hari ke-7	4 (16.7%)	20 (83.3%)	24
Hari ke-14	9 (37.5%)	15 (62.5%)	24
Hari ke-28	12 (50.0%)	12 (50.0%)	24
Total	25 (34.7%)	47 (65.3%)	72

COV=cut of value kontrol negatif (hari ke-0)

Hasil pengamatan nilai OD (+ dan -) serum mencit yang diinfeksi *T. canis* pada berbagai waktu untuk subkelas Ig G (Ig G1, Ig G2 α , Ig G2 β dan IgG3) berturut-turut adalah sebesar 3, 13, 3 dan 6 masing-masing dari 18 sampel (Tabel 5.9). Hasil OD + tertinggi didapatkan pada Ig G2 α yaitu 72,2%, sedangkan terendah didapatkan pada Ig G2 β dan Ig G1 yaitu 16,7%.

Tabel 5.9 Tabulasi Silang OD (+ dan -) Serum Mencit Anti-*T. canis* pada Berbagai Subkelas Ig G dengan Berbagai Waktu Pengamatan

Subkelas Ig G	OD <i>T. canis</i> =1.5xCOV hari-0		Total
	Positif (+)	Negatif (-)	
Ig G1	3 (16.7%)	15 (83.3%)	18
Ig G2 α	13 (72.2%)	5 (27.8%)	18
Ig G2 β	3 (16.7%)	15 (83.3%)	18
Ig G3	6 (33.3%)	12 (66.7%)	18
Total	25 (34.7%)	47 (65.3%)	72

Hasil pengamatan nilai OD (+ dan -) pada perlakuan kombinasi antara waktu dan subkelas Ig G secara lengkap dapat dilihat pada Lampiran 7, sedangkan hasil penghitungan dengan tabulasi silang secara ringkas dapat dilihat pada Tabel 5.10.

Tabel 5.10 Tabulasi Silang OD (+ dan -) Serum Mencit Anti-*T. canis* pada Perlakuan Kombinasi antara Waktu Pengamatan dan Subkelas Ig G

Waktu	Subkelas Ig G	COV Tcn		Total
		Positif (+)	Negatif (-)	
Hari ke-7	Ig G1	1 (16.7%)	5 (83.3%)	6
	Ig G2 α	3 (50.0%)	3 (50.0%)	6
	Ig G2 β	0 (0.0%)	6 (100%)	6
	Ig G3	0 (0.0%)	6 (100%)	6
Hari ke-14	Ig G1	1 (16.7%)	5 (83.3%)	6
	Ig G2 α	5 (83.3%)	1 (16.7%)	6
	Ig G2 β	1 (16.7%)	5 (83.3%)	6
	Ig G3	2 (33.3%)	4 (66.7%)	6
Hari ke-28	Ig G1	1 (16.7%)	5 (83.3%)	6
	Ig G2 α	5 (83.3%)	1 (16.7%)	6
	Ig G2 β	2 (33.3%)	4 (66.7%)	6
	Ig G3	4 (66.7%)	2 (33.3%)	6
Total		25 (34.7%)	47 (65.3%)	72.0

Dari Tabel 5.10 dapat diketahui bahwa terdapat dua perlakuan kombinasi yang didapatkan nilai OD (+) paling tinggi adalah sebesar 83,3%, yaitu pada Hari ke-14 subkelas IgG2 α dan Hari ke-28 subkelas Ig G2 α .

Nilai OD serum mencit anti-*T. canis* OD tertinggi juga didapatkan pada hari ke-28, sedangkan nilai OD terendah adalah hari ke-0 yang tidak menunjukkan perbedaan

bermakna ($p > 0,05$) dengan hari ke-7 dan ke-14. Hasil ini memberikan gambaran bahwa antibodi yang terbentuk sebagai respons terhadap *Toxocara canis* membutuhkan waktu yang cukup, dalam hal ini pada hari ke-28 merupakan waktu yang sudah mencukupi untuk respons tersebut. Hasil ini sesuai dengan pendapat Nunes *et al.* (1999) yang menyatakan, bahwa pengamatan dengan teknik ELISA menggunakan *rabbit-IgG* spesifik anti-*Toxocara canis* dan antigen *excretory-secretory* untuk diagnosis toxocariasis sudah menunjukkan hasil positif setelah 20 hari setelah inokulasi. Morales *et al.* (2002) melakukan infeksi buatan, menyatakan bahwa respons imun kelinci terhadap *T. canis* terjadi sejak awal cenderung meningkat hingga hari-60 kemudian stabil hingga hari-210. Titer antibodi pertama kali dideteksi pada hari-15 setelah inokulasi dan peningkatan lebih cepat pada hari-28 hingga hari-58.

Nilai OD rata-rata serum mencit yang diinfeksi L2 *T. canis* tertinggi tanpa memperhitungkan waktu pengamatan didapatkan pada Ig G2 α yang menunjukkan perbedaan tidak bermakna ($p > 0,05$) dengan Ig G2 β , sedangkan OD terendah adalah Ig G1 dan Ig G3. Rata-rata nilai OD serum mencit yang diinfeksi L2 *T. canis* untuk efek interaksi tidak menunjukkan perbedaan signifikan. Hasil pengamatan nilai OD secara kuantitatif tersebut seolah belum memberikan gambaran yang jelas dan tepat, oleh karena itu perlu dilakukan pengamatan terhadap nilai OD secara kualitatif.

Hasil pengamatan nilai OD secara kualitatif untuk mencit yang diinfeksi L2 *T. canis* nilai OD (+) pada sembarang waktu yang tertinggi didapatkan pada Ig G2 α yaitu 72,2%, sedangkan terendah didapatkan pada Ig G2 β dan Ig G1 yaitu 16,7 %. Nilai OD (+) paling tinggi terdapat untuk perlakuan kombinasi adalah sebesar 83,3% didapatkan pada Hari-14 subkelas IgG2 α dan Hari-28 subkelas IgG2 α . Berdasarkan hasil tersebut tampak Ig G2 α lebih dominan pada toxocariasis yang disebabkan oleh infeksi *T. canis*.

Respons imun seluler dan humoral dapat meningkat saat terjadi migrasi larva *Toxocara* spp. (Maizels *et al.*, 1993; Pritchard *et al.*, 1997), yang belakangan diketahui terdiri dari empat isotipe utama yaitu Ig M, Ig G, Ig A, dan Ig E (Auer and Aspöck, 1998; Obwaller, 2001; Soedarto, 2003). Pada peruntutan respons imun terhadap patogenesis larva, ditemukan puncak kadar antibodi sapi dewasa pada 7 hari pasca infeksi. Puncak kedua terjadi pada saat L2 menetas dan migrasi larva ke organ *visceral* yang lain. Respons imun terhadap *Toxocara* spp. ternyata menggugah semua kelas imunoglobulin (Barriga and Omar, 1991), namun tampaknya Ig G2 lebih berperan dalam infeksi *Toxocara* spp. dari pada imunoglobulin yang lain (Rajapakse, 1992). Pada umumnya infeksi oleh parasit, khususnya cacing, ditandai dengan keberadaan imunoglobulin (Ig) E dan peningkatan kadar eosinofil. Peningkatan kedua sel sistem imun tersebut di bawah kontrol sel T (Pearse and Sher, 1990). Interleukin (IL) 4, merupakan limfokin yang merangsang sel B yang teraktivasi oleh lipopolisakarida untuk menghasilkan Ig E dalam tubuh hospes, sedangkan IL-5 merupakan stimulus potensial terhadap pembentukan eosinofil pada medium buatan (Abbas *et al.*, 2000). Penyuntikan IL-5 pada tikus yang dilakukan oleh Amerasinghe *et al.* (1992), berakibat terjadi peningkatan jumlah sel eosinofil dalam darah dan jaringan. Jika IL-5 rendah akan menyebabkan terjadinya granuloma dan fibrosis hati. Interleukin (IL)-4 dan IL-5, yang dihasilkan oleh CD₄⁺-Th₂, berperan dalam kontrol produksi Ig E dan Ig G1, sedangkan CD₈⁺-Th₁ menghasilkan interferon gamma (IFN γ) yang menghambat reaksi hipersensitivitas dan memacu produksi Ig G2.

BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan beberapa hal sebagai berikut.

- 1) *T. canis* memiliki banyak protein dg BM beragam dari 8 - 200 kDa.
- 2) Berdasarkan hasil *Western Blot* dapat disimpulkan protein spesifik *T. canis* pada BM 158, 120, 91, 80, 70, 62, 51, 48, 45, 42, 38, 35, 32, 24, 18, 14 & 11 kDa dapat dikembangkan untuk diagnostik; sedangkan protein dengan *cross reaction* tinggi untuk kandidat vaksin dan terapi imunologik.
- 3) Reaksi silang antara Ag *T. cati*-Ab *T. canis* terjadi pada BM 140, 91, 62, 42, 38, 34, 33, 32, 30, 29, 27, 24, 17, 14, 12, dan 10 kDa; reaksi silang antara Ag *T. canis*-Ab *T. cati* terjadi pada BM 160, 140, 120, 91, 80, 70, 54, 42, 38, 35, 34, 33, 32, 30, 29, 27, 24, 20, 18, 14 dan 12 kDa.
- 4) Reaksi silang tidak terjadi antara Ag *T. cati* dan Ab *T. canis* pada BM 168, 120, 80 dan 70 kDa, dan Ag *T. canis* dan Ab *T. cati* pada BM 168, 51, 48, 45, dan 35 kDa.
- 5) Berdasarkan nilai OD pada ELISA, protein murni *Toxocara* spp. antigenisitas tinggi terhadap serum anti-*Toxocara* spp., keduanya memiliki antigenisitas yang lebih rendah terhadap cacing lain (*Ancylostoma* spp. dan *D. caninum*), dengan nilai sensitivitas 100% dan spesifisitas 87,5%.
- 6) Berdasarkan hasil ELISA-*isotyping*, subkelas Ig G dominan dalam serum mencit yang diinfeksi dengan *T. canis* adalah Ig G2 α .

6.2 Saran

- 1) Protein dengan tingkat reaksi silang tinggi dapat dikembangkan untuk kandidat vaksin dan terapi imunologis.
- 2) Protein spesifik dengan reaksi silang rendah dapat dikembangkan untuk menegakkan diagnosis etiologik toxocariasis hingga pada tingkat spesies dengan memanfaatkan Ab ketiga (subklas IgG).
- 3) Teknik ELISA dapat dikembangkan untuk diagnosis etiologik toxocariasis dengan menggunakan IgG2 β terutama pada infeksi *T. cati* dan Ig G2 α pada infeksi *T. canis*.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas AK, Lichtman AH and Pober JS. 2000. Cellular and Molecular Immunology. 4th ed. Philadelphia Saunders Company. pp 41-63, 270-291
- 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
- Andrews RH, Chilton NB. 1999. Multilocus enzymes electrophoresis: a valuable technique for providing answers to problems in parasite systematics. Int J Parasitol 29:213-253
- Auer H and Aspöck H. 1998. Toxokarose-Forschung in Österreich: Ergebnisse, Probleme, Herausforderungen. Mitt Österr Ges Tropenmed Parasitol 20: 17-28
- Barriga OO and Omar HM. 1992. Immunity to *Toxocara vitulorum* repeated infections in a rabbit model. Vet. Immunol. Immunopathol. 33(3):249-60
- Bertelmann E, Velhagen KH and Pleyer U. 2007. Okuläre Toxokarionose Von der Biologie zur Therapie. Der Ophthalmologe. © Springer Medizin Verlag. Abstract in English.
- Brandon MR and Lascelles AK. 1971. Relative efficiency of absorption Ig G1, Ig G2 and Ig M in the newborn calf. Aust. J. Exp. Biol. Med.Sci. 49: 629-633.
- de Savigny DH, Voller A and Woodruff AW. 1979. Toxocariasis: serological diagnosis by enzyme immunoassay. J. Clin. Pathol. 32: 284-288.
- de Savigny DH. 1980. The communication of ELISA data from laboratory to clinician. J. of Immunoassay. 1(1): 105-128.
- Despommier D. 2003. Toxocariasis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects. Clin Microbiol Rev 16:265-272
- Dick TA, Dixon BR, Choudhury A. 1991. *Diphyllobothrium*, *Anisakis* and other fish-borne parasitic zoonoses. Southeast Asian J Trop Med Public Health 22 [Suppl]: 150-152
- Doedens A, Loukas A, Maizels RM. 2001. A cDNA encoding Tc-MUC-5, a mucin from *Toxocara canis* larvae identified by expression screening. Acta Tropica:1-7; www.parasitology-online.com; Accessed 12/28/2005
- DrenchRite. 1996. Larval Development Assay. A product of Csiro reseach. Horizon Technology Pty Limited. Roseville, Australia.
- Harlow E and Lane D. 1988. Production of monoklonal antibodies. In: Antibodies. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Lab. New York.
- Hostettmann K, Hostettmann, M and Marston. 1986. Preparative Chromatography Techniques. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Terj. Padmawinata K dan Sutomo (1995). Penerbit ITB, Bandung. hal: 3-6, 27-36
- Hubner J, Uhlíkova 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 toxocarasis: 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.
- Ishiwata K, Shinohara A, Yagi K, Horii Y, Tsuchiya K and Nawa Y. 2003. Identification of tissue-embedded ascarid larvae by ribosomal DNA sequencing. *Parasitol Res* 92: 50-52
- 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
- Jacobs DE, Zhu XQ, Gasser RB, Chilton NB. 1997. PCR-based methods for identification of potentially zoonotic ascaridoid parasites of the dog, fox and cat. *Acta Trop* 68: 191-200
- Kilpatrick ME. 1992. Toxocarasis. In: *Tropical Medicine*. 7th ed. London: W.B. Saunders Company. pp. 761-4
- Kincekova J, Reiterova K and Dubinsky P. 1999. Larval toxocarasis and its clinical manifestation in childhood in the Slovak Republic. *J. Helminthol*. 73(4): 323-8
- Koesdarto S. 2002. Penentuan prevalensi toxocarasis pada anjing konsumsi di Kota Surabaya. *J. Biosains Pascasarjana Unair*, 4(3).
- Koga K, Kasuya S, Handa Y, Keawwichit 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
- Kuno, G. 1991. A manual of reagents with the emphasis on dengue diagnosis. Center for Disease Control Dengue Branch, San Juan Lab, Puerto Rico.
- Kusnoto, Suwarno dan Juniastuti T. 2001. Imunogenitas suspensi homogenat berbagai stadium *Toxocara vitulorum* sebagai pemicu pembentukan antibodi pada mencit. Laporan Penelitian Dosen Muda. Lemlit, Universitas Airlangga, Surabaya.
- Kusnoto, Koesdarto S, dan Sri Mumpuni S. 2002. Kontaminasi Tanah di Sekitar Peternakan Sapi Perah dan Rumah Potong Hewan dengan Telur *Toxocara sp.* di Surabaya. Laporan Penelitian Dosen Muda. Lemlit, Universitas Airlangga, Surabaya.
- Kusnoto. 2003. Isolasi dan Karakterisasi Protein Imunogenik Larva stadium II *Toxocara cati* Isolat Lokal. Thesis Program Pascasarjana, Universitas Airlangga, Surabaya.
- Kusnoto. 2005. Prevalensi toxocarosis pada kucing liar di Surabaya melalui bedah saluran pencernaan. *Majalah Kedokteran Hewan*, 21: 12-16.

- Kusumamihardja S. 1993. Parasit dan Parasitosis pada Hewan Ternak dan Hewan Piaraan di Indonesia. Bogor: PAU Bioteknologi, IPB.
- Lee CC, Cheng NABY, Bohari Y. 1993. *Toxocara canis* from domestic cats in Kuala Lumpur. Trop Biomed 10: 79-80
- Levine ND. 1978. Textbook of Veterinary Parasitology. Burgers Publishing Company. Diterjemahkan oleh: Ashadi G. 1990. Wardiarto Ed. Yogyakarta: Gajah Mada University Press.
- Lloyd S, and Soulsby EIL. 1987. Immunology of G.I. nematode of ruminants. In: Immune Responses in Parasitic Infections, Immunology, Immunopathology and Immunoprophylaxis. Vol I. Soulsby EIL. Ed. New York Academic Press. pp: 231-240
- Loukas A, Hintz M, Tetteh KKA, Mullin NP, Maizels RM. 2000. A family of secreted mucins from the parasitic nematode *Toxocara canis* bear diverse mucins domain but share similar flanking six-cysteine (SXC) repeats motifs. J. Biol. Chem. (in press).
- Maizels RM, Bundy DA, Selkirk ME, Smith DF and Anderson RM. 1993. Immunological modulation and evasion by helminth parasites in human populations. Nature 365: 797-805
- 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 *Toxocara canis* in dogs. Zentralblat Bacteriol. Microbiol. Hyg. A. 255: 402-405
- Obwaller A, Duchêne M, Bruhn H, Steipe B, Tripp C, Kraft D, Wiedermann G, Auer H and Aspöck H. 2001. Recombinant dissection of myosin heavy chain of *Toxocara canis* shows strong clustering of antigenic regions. Parasitol Res 87(5): 383-389
- Park SP, Park I, Park HY, Lee SU, Huh S, and Magnaval JF. 2000. Five cases of ocular toxocariasis confirmed by serology. Korean J Parasitol. Dec;38(4):267-73
- Pearse EJ and Sher A. 1990. Immunity to helminth. In: Current Opinion Immunology. USA National Institute for Allergy and Infectious Diseases. 2: 235-379
- Pritchard DI, Hewitt C and Moqbel R. 1997. The relationship between immunological responsiveness controlled by T-helper 2 lymphocytes and infections with parasitic helminths. Parasitology 115: S33-44
- 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
- Rantam FA. 2003. Metode Immunologi. Airlangga University Press. Surabaya. Hal.3-9.

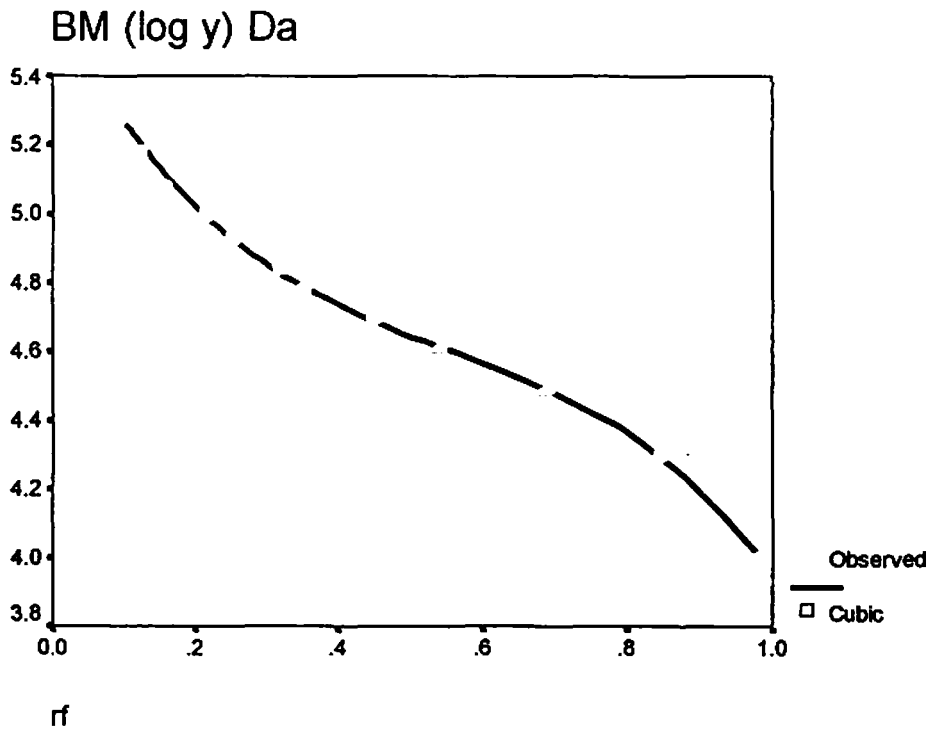
- Rajapakse RPVJ. 1992. Immunological response of buffalo cows and calves to *Toxocara vitulorum* infection. Dissertation. Submitted for the Degree of Doctor of Philosophy. University of Paradeniya. Sri Lanka.
- Roitt I, Brostoff J and Male D. 1998. Immunology. 4th Ed. Barcelona, Spain: Mosby, Times Mirror International Publishers Limited.
- Sadjiadi SM, Khosravi M, Mehrabani D, and Orya A. 2000. Seroprevalence of *Toxocara* infection in school children in Shiraz, Southern Iran. Abstract. J. Trop. Pediatr. 46(6): 327-30
- Santoso, S. 2000. Mengolah Data Statistik Secara Profesional. SPSS Versi 10. Penerbit PT. Media Komputindo kelompok Gramedia. Jakarta.
- Soedarto. 2003. Zoonosis Kedokteran. Cetakan Pertama. Airlangga University Press. Hal. 114-115
- Sudiana IK, Putra ST, dan Dachlan YP. 1994. Studi perubahan prosentase leukosit dan kadar hemoglobin darah kucing yang mengidap toxocariasis. Perkumpulan Pemberantasan Penyakit Parasit Indonesia, Surabaya.
- Trisunuwati P. 1997. Penentuan protein imunogen larva *Toxocara vitulorum*, sebagai usaha menemukan metode imunodiagnosis dini *Toxocariasis* pada induk sapi. Disertasi. Program Pascasarjana Universitas Airlangga.
- Uga S, 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.
- Urquhart GM, Armour J, Duncan JL, Dunn AM, Jennings FW. 1996. Veterinary parasitology. 2nd ed. Blackwell, Oxford
- Warren KS. 1993. Immunology and molecular biology of parasit infections. Eidinburg, Blackwell Sc. Pp. 55.

Lampiran 1. Penghitungan BM Protein Menggunakan Persamaan Regresi antara Nilai Retardation Faktor (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

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

Curve Fit



Lanjutan Lampiran 1

Karena model regresi berbentuk kubik, maka dilakukan analisis regresi kubik untuk mendapatkan formula (model) yang akan digunakan untuk menghitung BM protein pada sampel.

MODEL: MOD_2.

Dependent variable.. Y1

Method.. CUBIC

Listwise Deletion of Missing Data

Multiple R .99854
R Square .99709
Adjusted R Square .99600
Standard Error .02381

Analysis of Variance:

	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	3	1.5533527	.51778423
Residuals	8	.0045362	.00056703

F = 913.15151 Signif F = .0000

----- Variables in the Equation -----

Variable	B	SE B	Beta	T	Sig T
RF	-3.840457	.318509	-2.966570	-12.058	.0000
RF**2	5.524272	.699779	4.570633	7.894	.0000
RF**3	-3.322193	.439116	-2.663923	-7.566	.0001
(Constant)	5.598932	.039320		142.396	.0000

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 dengan nilai $b_0 = 5,599$, $b_1 = -3,841$, $b_2 = 5,524$, $b_3 = -3,322$ sehingga didapatkan persamaan garis $y = 5,599 - 3,841x + 5,524x^2 - 3,322x^3$.

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. Data Hasil Pengamatan dan Analisis Data OD Serum Mencit yang Diinfeksi dengan L2 *T. canis* dengan Dosis Berbeda secara Kuantitatif dengan Anava Satu Arah

Summarize

Case Summaries^a

			Optical Density (OD)	
Dosis infeksi	Kontrol	1	.31	
		2	.36	
		3	.31	
		4	.26	
		5	.24	
		Total	N	5
			Sum	1.48
			Mean	.2950
			Std. Deviation	.04994
	10 butir/g BB		1	1.03
2			1.15	
3			.72	
4			.63	
5			.45	
		Total	N	5
			Sum	3.99
			Mean	.7974
			Std. Deviation	.28539
17 butir/g BB			1	.76
	2		.72	
	3		.97	
	4		.69	
	5		.86	
		Total	N	5
			Sum	4.00
			Mean	.8000
			Std. Deviation	.11675
	Total		N	15
		Sum	9.46	
		Mean	.6308	
		Std. Deviation	.29713	

a. Limited to first 100 cases.

Lanjutan Lampiran 2

Oneway

Descriptives

Optical Density (OD)

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Minimum	Maximum
Kontrol	5	.2950	.04994	.02233	.24	.36
10 butir/g BB	5	.7974	.28539	.12763	.45	1.15
17 butir/g BB	5	.8000	.11675	.05221	.69	.97
Total	15	.6308	.29713	.07672	.24	1.15

ANOVA

Optical Density (OD)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.846	2	.423	13.002	.001
Within Groups	.390	12	.033		
Total	1.236	14			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Optical Density (OD)

Tukey HSD

(I) Dosis infeksi	(J) Dosis infeksi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	99% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	10 butir/g BB	-.50240*	.11406	.002	-.9094	-.0954
	17 butir/g BB	-.50500*	.11406	.002	-.9120	-.0980
10 butir/g BB	Kontrol	.50240*	.11406	.002	.0954	.9094
	17 butir/g BB	-.00260	.11406	1.000	-.4096	.4044
17 butir/g BB	Kontrol	.50500*	.11406	.002	.0980	.9120
	10 butir/g BB	.00260	.11406	1.000	-.4044	.4096

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

Homogeneous Subsets

Optical Density (OD)

Tukey HSD^a

Dosis infeksi	N	Subset for alpha = .01	
		1	2
Kontrol	5	.2950	
10 butir/g BB	5		.7974
17 butir/g BB	5		.8000
Sig.		1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

Lampiran 3. Analisis Data OD Serum Mencit yang Diinfeksi dengan L2 *T. canis* dengan Dosis Berbeda secara Kualitatif dengan Tabulasi Silang

Dosis	OD	OD +/-
10	1.030	+
	1.146	+
	0.723	+
	0.634	+
	0.454	-
17	0.760	+
	0.718	+
	0.973	+
	0.688	+
	0.861	+

COV kontrol (-) = 0.295; 2xCOV kontrol (-) = 0.59; OD+ \geq 0.59; OD- < 0.59.

Tabulasi Silang: Dosis * Hasil ELISA (OD)

Dosis infeksi * Optical Density (OD) Crosstabulation

			Optical Density (OD)		Total
			Positif (+)	Negatif (-)	
Dosis infeksi	10 butir/g BB	Count	4	1	5
		Expected Count	4.5	.5	5.0
		% within Dosis infeksi	80.0%	20.0%	100.0%
		% within Optical Density (OD)	44.4%	100.0%	50.0%
		% of Total	40.0%	10.0%	50.0%
	17 butir/g BB	Count	5	0	5
		Expected Count	4.5	.5	5.0
		% within Dosis infeksi	100.0%	.0%	100.0%
		% within Optical Density (OD)	55.6%	.0%	50.0%
		% of Total	50.0%	.0%	50.0%
Total		Count	9	1	10
		Expected Count	9.0	1.0	10.0
		% within Dosis infeksi	90.0%	10.0%	100.0%
		% within Optical Density (OD)	100.0%	100.0%	100.0%
		% of Total	90.0%	10.0%	100.0%

Lampiran 4. Hasil Pemeriksaan Antigenisitas Protein Murni *Toxocara canis* terhadap Serum Darah Mencit dengan Teknik *Indirect-ELISA* dan Analisis Statistik Nilai *Optical Density* dengan Uji Anava

Nilai OD Serum Mencit terhadap Protein Murni *Toxocara canis*

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

Uji Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

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

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Oneway

Descriptives

Optical Density

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

Lanjutan Lampiran 4

ANOVA

Optical Density

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

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Optical Density

Tukey HSD

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

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

Homogeneous Subsets

Optical Density

Tukey HSD^a

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

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

^a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 8.000.

Lampiran 5. Hasil Pemeriksaan Nilai OD Positif (+) dan Negatif (-) Serum Mencit terhadap Protein Murni ES L2 Dorman *Toxocara* spp. dan Analisis Data dengan Tabulasi Silang

Hasil Pemeriksaan Nilai OD Positif (+) dan Negatif (-) Serum Mencit terhadap Protein Murni L2 Dorman *T. cati* adalah sebagai berikut.

No.	Toxocariasis (+)	Hasil*	Toxocariasis (-)	Hasil*	Kontrol serum (-)	Kontrol PBS
1	0,566	+	0,312	-	0,204	0,030
2	0,545	+	0,363	-	0,211	0,010
3	0,579	+	0,136	-	0,205	0,010
4	0,567	+	0,246	-	0,210	0,024
5	0,581	+	0,125	-	0,211	0,041
6	0,500	+	0,337	-	0,210	0,072
7	0,507	+	0,452	+	0,204	0,037
8	0,556	+	0,057	-	0,205	0,035
9	0,593	+	0,165	-		0,001
10	0,607	+	0,186	-		0,007
11	0,555	+	0,099	-		0,026
12	0,518	+	0,136	-		0,074
13	0,488	+	0,233	-		
14	0,571	+	0,344	-		
15	0,549	+	0,365	-		
15	0,581	+	0,451	+		
	Total Positif	16	Total Positif	2	Rata COV=0,208	Rata PBS 0,031
	Total negatif	0	Total negatif	14	2 x COV=0,415	

*) Nilai rata-rata OD pada kontrol = 0,208 untuk menyatakan hasil positif maka nilai OD pada sampel harus melebihi 2 x COV kontrol (-); jadi OD dinyatakan (+) jika $> (2 \times 0,208)$ atau $> 0,415$

Lanjutan Lampiran 5

Analisis data nilai OD positif (+) dan negatif (-) serum mencit terhadap protein murni ES L2 dorman *Toxocara* spp. dengan Tabulasi Silang adalah sebagai berikut.

Crosstabs

Test (Imunisasi) * Hasil ELISA Crosstabulation

		Hasil ELISA		Total	
		Positif	Negatif		
Test (Imunisasi)	Toxocariasis +	Count	16	0	16
		Expected Count	9.0	7.0	16.0
		% within Test (Imunisasi)	100.0%	.0%	100.0%
		% within Hasil ELISA	88.9%	.0%	50.0%
		% of Total	50.0%	.0%	50.0%
	Toxocariasis -	Count	2	14	16
		Expected Count	9.0	7.0	16.0
		% within Test (Imunisasi)	12.5%	87.5%	100.0%
		% within Hasil ELISA	11.1%	100.0%	50.0%
		% of Total	6.3%	43.8%	50.0%
Total	Count	18	14	32	
	Expected Count	18.0	14.0	32.0	
	% within Test (Imunisasi)	56.3%	43.8%	100.0%	
	% within Hasil ELISA	100.0%	100.0%	100.0%	
	% of Total	56.3%	43.8%	100.0%	

Lampiran 6. Nilai OD dan Analisis Statistik Hasil Pemeriksaan Profil Subkelas Imunoglobulin G dengan Teknik ELISA terhadap Serum Mencit yang Diinfeksi *T. canis* Menggunakan Uji Anava Faktorial

Waktu pengamatan	Subkelas Ig G			
	Ig G1	IgG2a	IgG2b	IgG3
T0	0.157	0.202	0.188	0.116
	0.156	0.206	0.191	0.132
	0.158	0.197	0.186	0.149
	0.148	0.191	0.165	0.121
	0.163	0.204	0.191	0.124
	0.154	0.210	0.193	0.133
T7	0.336	0.485	0.236	0.118
	0.220	0.297	0.195	0.135
	0.211	0.247	0.126	0.165
	0.216	0.312	0.207	0.109
	0.177	0.194	0.160	0.097
	0.162	0.273	0.188	0.114
T14	0.142	0.511	0.242	0.161
	0.169	0.139	0.141	0.099
	0.223	0.392	0.312	0.413
	0.178	0.227	0.163	0.106
	0.154	0.249	0.221	0.212
	0.140	0.294	0.183	0.128
T28	0.115	0.190	0.144	0.140
	0.182	0.292	0.812	0.258
	0.265	0.334	0.214	0.227
	0.192	0.282	0.704	0.288
	0.152	0.266	0.157	0.182
	0.136	0.321	0.196	0.112

Univariate Analysis of Variance

Between-Subjects Factors

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

Lanjutan Lampiran 6

Descriptive Statistics

Dependent Variable: OD Tcn

Waktu	Subkelas Ig G	Mean	Std. Deviation	N
0 hari PI	Ig G1	.15600	.004940	6
	Ig G2a	.20167	.006772	6
	Ig G2b	.18567	.010424	6
	Ig G3	.12917	.011686	6
	Total	.16813	.029608	24
7 hari PI	Ig G1	.22033	.061262	6
	Ig G2a	.30133	.099138	6
	Ig G2b	.18533	.038208	6
	Ig G3	.12300	.024025	6
	Total	.20750	.087898	24
14 hari PI	Ig G1	.16767	.030924	6
	Ig G2a	.30200	.131794	6
	Ig G2b	.21033	.062044	6
	Ig G3	.18650	.118458	6
	Total	.21663	.103175	24
28 hari PI	Ig G1	.17367	.053061	6
	Ig G2a	.28083	.051062	6
	Ig G2b	.37117	.302645	6
	Ig G3	.20117	.068552	6
	Total	.25671	.168182	24
Total	Ig G1	.17942	.047598	24
	Ig G2a	.27146	.090880	24
	Ig G2b	.23813	.165388	24
	Ig G3	.15996	.073876	24
	Total	.21224	.111847	96

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: OD Tcn

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Model	4.744 ^a	16	.296	30.831	.000
Waktu	.095	3	.032	3.299	.025
sk_IgG	.192	3	.064	6.645	.000
Waktu * sk_IgG	.132	9	.015	1.528	.152
Error	.769	80	.010		
Total	5.513	96			

a. R Squared = .860 (Adjusted R Squared = .833)

Lanjutan Lampiran 6

Post Hoc Tests

Waktu

OD Tcn

Tukey HSD^{a,b}

Waktu	N	Subset	
		1	2
0 hari PI	24	.16813	
7 hari PI	24	.20750	.20750
14 hari PI	24	.21663	.21663
28 hari PI	24		.25671
Sig.		.324	.311

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = .010.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 24.000.

b. Alpha = .05.

Subkelas Ig G

OD Tcn

Tukey HSD^{a,b}

Subkelas Ig G	N	Subset		
		1	2	3
Ig G3	24	.15996		
Ig G1	24	.17942	.17942	
Ig G2b	24		.23813	.23813
Ig G2a	24			.27146
Sig.		.902	.171	.643

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = .010.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 24.000.

b. Alpha = .05.

Perlakuan Sederhana

Perbedaan Subkelas Ig pada H-0

OD Tcn

Tukey HSD

Subkelas Ig G Hari-0	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
Ig G3	6	.12917			
Ig G1	6		.15600		
Ig G2b	6			.18567	
Ig G2a	6				.20167
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

Perbedaan Subkelas Ig pada H-7

OD Tcn

Tukey HSD^a

Subkelas Ig G Hari-7	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
Ig G3	6	.12300	
Ig G2b	6	.18533	
Ig G1	6	.22033	.22033
Ig G2a	6		.30133
Sig.		.061	.145

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

Perbedaan Subkelas Ig pada H-14

OD Tcn

Tukey HSD^a

Subkelas Ig G Hari-14	N	Subset for alpha = .05
		1
Ig G1	6	.16767
Ig G3	6	.18650
Ig G2b	6	.21033
Ig G2a	6	.30200
Sig.		.100

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

Perbedaan Subkelas Ig pada H-28

Post Hoc Tests

OD Tcn

Tukey HSD^a

Subkelas Ig G Hari-28	N	Subset for alpha = .05
		1
Ig G1	6	.17367
Ig G3	6	.20117
Ig G2a	6	.28083
Ig G2b	6	.37117
Sig.		.173

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

Lampiran 7. Tabulasi Silang Nilai OD (+ dan -) Hasil Pemeriksaan Profil Subkelas Imunoglobulin G dengan Teknik ELISA-Isotyping terhadap Serum Mencit yang Diinfeksi *T. canis*

Nilai OD subkelas IgG serum mencit yang diinfeksi dengan *T. canis* dinyatakan positif (+) jika menunjukkan nilai $> 1,5 \times \text{COV}$ (*cut of value*) subkelas Ig pada T0. Nilai COV subkelas Ig G *T. canis* pada T0 untuk IgG1=0.222, IgG2a=0.287, IgG2b=0.248, IgG3=0.174. Hasil penghitungannya adalah sebagai berikut.

Waktu pengamatan	Subkelas Ig G dan COV							
	Ig G1	COV	IgG2a	COV	IgG2b	COV	IgG3	COV
T7	0.336	1	0.485	1	0.236	2	0.118	2
	0.220	2	0.297	1	0.195	2	0.135	2
	0.211	2	0.247	2	0.126	2	0.165	2
	0.216	2	0.312	1	0.207	2	0.109	2
	0.177	2	0.194	2	0.160	2	0.097	2
	0.162	2	0.273	2	0.188	2	0.114	2
T14	0.142	2	0.511	1	0.242	2	0.161	2
	0.169	2	0.139	2	0.141	2	0.099	2
	0.223	1	0.392	1	0.312	1	0.413	1
	0.178	2	0.227	1	0.163	2	0.106	2
	0.154	2	0.249	1	0.221	2	0.212	1
	0.140	2	0.294	1	0.183	2	0.128	2
T28	0.115	2	0.190	2	0.144	2	0.140	2
	0.182	2	0.292	1	0.812	1	0.258	1
	0.265	1	0.334	1	0.214	2	0.227	1
	0.192	2	0.282	1	0.704	1	0.288	1
	0.152	2	0.266	1	0.157	2	0.182	1
	0.136	2	0.321	1	0.196	2	0.112	2

Kode pada kolom COV: 1=positif (+), 2=negatif (-)

Lanjutan Lampiran 7

Crosstabs

Waktu_kwl * COV Ten Crosstabulation

			COV Ten		Total
			Positif (+)	Negatif (-)	
Waktu_kwl	7 hari PI	Count	4	20	24
		Expected Count	8.3	15.7	24.0
		% within Waktu_kwl	16.7%	83.3%	100.0%
		% within COV Ten	16.0%	42.6%	33.3%
		% of Total	5.6%	27.8%	33.3%
	14 hari PI	Count	9	15	24
		Expected Count	8.3	15.7	24.0
		% within Waktu_kwl	37.5%	62.5%	100.0%
		% within COV Ten	36.0%	31.9%	33.3%
	28 hari PI	Count	12	12	24
		Expected Count	8.3	15.7	24.0
		% within Waktu_kwl	50.0%	50.0%	100.0%
% within COV Ten		48.0%	25.5%	33.3%	
Total	Count	25	47	72	
	Expected Count	25.0	47.0	72.0	
	% within Waktu_kwl	34.7%	65.3%	100.0%	
	% within COV Ten	100.0%	100.0%	100.0%	
	% of Total	34.7%	65.3%	100.0%	

Subkelas Ig G * COV Ten Crosstabulation

			COV Ten		Total
			Positif (+)	Negatif (-)	
Subkelas Ig G	Ig G1	Count	3	15	18
		Expected Count	6.3	11.8	18.0
		% within Subkelas Ig G	16.7%	83.3%	100.0%
		% within COV Ten	12.0%	31.9%	25.0%
		% of Total	4.2%	20.8%	25.0%
	Ig G2a	Count	13	5	18
		Expected Count	6.3	11.8	18.0
		% within Subkelas Ig G	72.2%	27.8%	100.0%
		% within COV Ten	52.0%	10.6%	25.0%
		% of Total	18.1%	6.9%	25.0%
	Ig G2b	Count	3	15	18
		Expected Count	6.3	11.8	18.0
		% within Subkelas Ig G	16.7%	83.3%	100.0%
		% within COV Ten	12.0%	31.9%	25.0%
		% of Total	4.2%	20.8%	25.0%
	Ig G3	Count	6	12	18
		Expected Count	6.3	11.8	18.0
		% within Subkelas Ig G	33.3%	66.7%	100.0%
% within COV Ten		24.0%	25.5%	25.0%	
% of Total		8.3%	16.7%	25.0%	
Total	Count	25	47	72	
	Expected Count	25.0	47.0	72.0	
	% within Subkelas Ig G	34.7%	65.3%	100.0%	
	% within COV Ten	100.0%	100.0%	100.0%	
	% of Total	34.7%	65.3%	100.0%	

Lanjutan Lampiran 7

Crosstabs

Perlakuan Kombinasi * COV Tcn Crosstabulation

			COV Tcn		Total
			Positif (+)	Negatif (-)	
Perlakuan Kombinasi	T7*Ig G1	Count	1	5	6
		Expected Count	2.1	3.9	6.0
		% within Perlakuan Kombinasi	16.7%	83.3%	100.0%
	T7*Ig G2a	Count	3	3	6
		Expected Count	2.1	3.9	6.0
		% within Perlakuan Kombinasi	50.0%	50.0%	100.0%
	T7*Ig G2b	Count	0	6	6
		Expected Count	2.1	3.9	6.0
		% within Perlakuan Kombinasi	.0%	100.0%	100.0%
	T7*Ig G3	Count	0	6	6
		Expected Count	2.1	3.9	6.0
		% within Perlakuan Kombinasi	.0%	100.0%	100.0%
	T14*Ig G1	Count	1	5	6
		Expected Count	2.1	3.9	6.0
		% within Perlakuan Kombinasi	16.7%	83.3%	100.0%
	T14*Ig G2a	Count	5	1	6
		Expected Count	2.1	3.9	6.0
		% within Perlakuan Kombinasi	83.3%	16.7%	100.0%
	T14*Ig G2b	Count	1	5	6
		Expected Count	2.1	3.9	6.0
		% within Perlakuan Kombinasi	16.7%	83.3%	100.0%
	T14*Ig G3	Count	2	4	6
		Expected Count	2.1	3.9	6.0
		% within Perlakuan Kombinasi	33.3%	66.7%	100.0%
	T28*Ig G1	Count	1	5	6
		Expected Count	2.1	3.9	6.0
		% within Perlakuan Kombinasi	16.7%	83.3%	100.0%
	T28*Ig G2a	Count	5	1	6
		Expected Count	2.1	3.9	6.0
		% within Perlakuan Kombinasi	83.3%	16.7%	100.0%
	T28*Ig G2b	Count	2	4	6
		Expected Count	2.1	3.9	6.0
		% within Perlakuan Kombinasi	33.3%	66.7%	100.0%
	T28*Ig G3	Count	4	2	6
		Expected Count	2.1	3.9	6.0
		% within Perlakuan Kombinasi	66.7%	33.3%	100.0%
Total		Count	25	47	72
		Expected Count	25.0	47.0	72.0
		% within Perlakuan Kombinasi	34.7%	65.3%	100.0%



