

TESIS

ISOLASI DAN KARAKTERISASI PROTEIN IMUNOGENIK LARVA STADIUM II *Toxocara cati* ISOLAT LOKAL

PENELITIAN DISKRIPITIF LABORATORIK



KUSNOTO

Program Studi Magister Imunologi

PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2003

TESIS

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI PROTEIN IMUNOGENIK
LARVA STADIUM II *Toxocara cati* ISOLAT LOKAL**

PENELITIAN DISKRIPITIF LABORATORIK

KUSNOTO

Program Studi Magister Imunologi

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2003**

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI PROTEIN IMUNOGENIK
LARVA STADIUM II *Toxocara cati* ISOLAT LOKAL**

PENELITIAN DISKRIPITIF LABORATORIK

THESIS

Untuk memperoleh gelas Magister
dalam Program Studi Immunologi
pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga



Oleh:

Kusnoto

NIM. 090013847 / M

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

Tanggal 27 Februari 2003

Lembar Pengesahan

TESIS INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL, 27 Februari 2003

Oleh

Pembimbing Ketua,



Dr. I Ketut Suidiana, MS., drs.

NIP.130 877 636

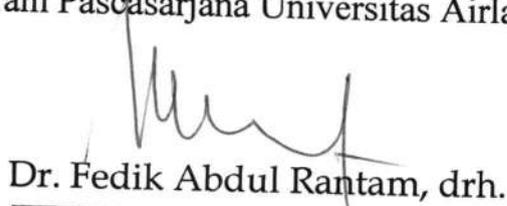
Pembimbing,



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

NIP. 130 687 296

Mengetahui
Ketua Program Studi Magister Imunologi
Program Pascasarjana Universitas Airlangga,



Dr. Fedik Abdul Rantam, drh.

NIP. 131 653 343

Telah diuji pada
Tanggal 27 Februari 2003
PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Dr. Fedik Abdul Rantam, drh.

Anggota : 1. Machfudz, MS., DTM&H, dr.

2. Dr. H. Setiawan Koesdarto, MSc., drh.

3. Dr. I Ketut Suidiana, MS., drs.

4. Prof. Dr. Hj. Sri Subekti Bendryman, DEA., drh.

UCAPAN TERIMA KASIH

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

Terima kasih tak terhingga dan penghargaan setinggi-tingginya penulis sampaikan kepada Dr. I Ketut Suidiana, MS., drs., Pembimbing Ketua yang dengan penuh kesabaran dan perhatian telah memberikan dorongan, bimbingan dan saran sehingga tesis ini dapat terselesaikan.

Terima kasih tak terhingga dan penghargaan setinggi-tingginya juga penulis sampaikan kepada Prof. Dr. Hj. Sri Subekti Bendryman, DEA, drh., Pembimbing yang dengan penuh kesabaran dan perhatian telah memberikan dorongan, bimbingan dan saran sehingga tesis ini dapat terselesaikan.

Saya ucapkan banyak terima kasih kepada Pemerintah Indonesia cq Menteri Pendidikan Nasional melalui Beasiswa Program Pascasarjana (BPPS) yang telah memberikan bantuan finansial, sehingga dapat meringankan beban saya dalam menyelesaikan tesis ini.

Dengan selesainya tesis ini, perkenankanlah saya juga mengucapkan banyak terima kasih kepada:

- ✧ Rektor Universitas Airlangga Prof. Dr. Med. Puruhito, dr. atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya, untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan program Magister.
- ✧ Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga Prof. Dr. Mochamad Amin, dr. atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya, untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan program Magister Ilmu Immunologi.
- ✧ Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Prof. Dr. Ismudiono, MS., drh. atas kesempatan dan rekomendasi yang diberikan kepada saya untuk mengikuti pendidikan program Magister.
- ✧ Ketua Program Studi Ilmu Immunologi Dr. Fedik Abdul Rantam, drh. atas kesempatan dan rekomendasi yang diberikan kepada saya untuk mengikuti pendidikan program Magister.

- ✧ Ketua Tropical Disease Center Prof. Dr. H. Yoes Prijatna Dachlan, MSc., dr. yang memberikan ijin penggunaan fasilitas penelitian kepada saya hingga tesis ini dapat terselesaikan.
- ✧ Prof. Dr. H. Soehartojo Hardjopranjoto, MSc., drh. yang memberikan dorongan dan rekomendasi kepada saya untuk mengikuti program pendidikan Magister.
- ✧ Dr. H. Setiawan Koesdarto, MSc., drh.; Machfudz, MS., DTM&H., dr.; Sri Mumpuni, MKes., drh.; Halimah Puspitawati, MKes., drh.. senior saya di Laboratorium Helminthologi Fakultas Kedokteran Hewan dan di Kelompok Studi Intestinal Parasit Tropical Disease Center Universitas Airlangga atas perhatian dan dorongan yang diberikan pada saya selama menempuh pendidikan Magister hingga terselesaikannya tesis ini.
- ✧ Suwarno, MSi. drh. yang dengan tulus memberikan dorongan dan perhatian selama saya menempuh pendidikan Magister hingga terselesaikannya tesis ini.
- ✧ Pak Suwarno, Pak Dinir, Kris Cahyo, Helen S. dan Heri Sukamto yang dengan banyak membantu pelaksanaan penelitian hingga tesis ini dapat terselesaikan dengan baik.

Tak lupa saya ucapkan terima kasih kepada Ayahnda Kaslan Karsosentono (alm) dan Ibunda Sariani yang dengan penuh kesabaran mendidik saya dan restunya hingga saya dapat menyelesaikan pendidikan program Magister. Demikian pula kepada istriku yang selalu kusayangi Tutik Juniastuti, MKes. drh., ananda Suhita Aryaloka dan Suharti Aryanata yang dengan penuh kasih sayang memberikan semangat kepada saya untuk menyelesaikan pendidikan program Magister.

Semua fihak yang membantu selama saya mengikuti pendidikan program Magister Ilmu Immunologi, semoga Allah SWT membalas dengan kebaikan yang berlipat. Amin.

Surabaya, Februari 2003

Kusnoto

RINGKASAN

Spesifisitas protein imunogenik *Toxocara cati* untuk diagnosis secara imunologis pada infeksi toxocariasis hingga saat ini belum diketahui. Hal ini karena protein antigen diagnostik yang banyak diteliti di negara Barat adalah protein antigen *Toxocara canis*, sedangkan di negara sub-tropis hingga tropis yang banyak diteliti adalah protein antigen *Toxocara vitulorum*, namun spesifisitas bahan uji yang ada masih rendah karena kebanyakan protein antigen diagnostik yang digunakan adalah antigen yang tidak spesifik.

Penyakit yang disebabkan oleh infeksi *Toxocara sp* bersifat zoonosis, khususnya pada anak-anak, namun demikian pernah dilaporkan terjadi juga pada orang dewasa. Toxocariasis yang disebabkan oleh *T. cati* perlu mendapat perhatian khusus karena populasi kucing di Indonesia cukup tinggi dan kedekatan hewan kesayangan ini dengan manusia. Kebiasaan kucing menimbun fecesnya dengan tanah setelah defekasi dapat memperlama daya tahan telur cacing di dalam tanah, hal ini perlu diwaspadai mengingat anak-anak punya kecenderungan senang bermain-main di tanah gembur. Di samping itu prevalensi toxocariasis pada kucing di Surabaya cukup tinggi, yaitu sebesar 74%, keadaan ini dapat meningkatkan resiko terjadinya toxocariasis pada manusia.

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh protein imunogenik yang spesifik pada larva stadium kedua (L2) *T. cati*. Melalui tahapan: 1) Persiapan, pada tahap ini dilakukan isolasi telur, larva dan cacing dewasa (*T. cati*, *T. vitulorum* dan *Fasciola gigantica*), pembuatan ekstrak larva dan cacing dewasa, dan pembuatan antibodi poliklonal; 2) Analisis protein, pada tahap ini dilakukan preparasi protein antigen dari larva dan cacing dewasa dengan teknik *sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE), *semi-dry blotting*, dan *blotting*; dan 3) Isolasi protein dengan preparasi gel elektroforesis.

Hasil analisis protein untuk mengetahui berat molekul (BM) protein antigen larva kedua (L2) *T. cati* yang dilakukan dengan teknik SDS-PAGE menunjukkan adanya tujuh macam pita protein masing-masing diperkirakan pada BM 133,7 kDa, 96,6 kDa, 86,1 kDa, 60,7 kDa, 40,0 kDa, 30,3 kDa dan 24,0 kDa. Dari ketujuh jenis protein tersebut protein dengan BM 96,6 kDa dan 86,1 kDa terlihat lebih dominan di antara protein lainnya, sementara protein lainnya terlihat diekspresikan dengan bentuk yang lebih tipis dan intensitas warna yang berkurang.

Hasil identifikasi protein dengan teknik *Western blot* menggunakan antibodi poliklonal anti larva kedua (L2) *T. cati* dapat dikarakterisasi tiga macam protein. Ketiga protein tersebut antara lain pada BM 133,7 kDa, 30,3 kDa, dan 24,0 kDa. Protein pada

BM 133,7 kDa menunjukkan pita reaksi silang antara serum anti L2 *T. cati* dan protein antigen cacing dewasa *Fasciola gigantica*. Protein dengan BM 30,3 kDa menunjukkan pita reaksi antara serum anti L2 *T. cati* dengan protein antigen *T. cati* dan *T. vitulorum* baik dari L2 maupun cacing dewasanya. Hal ini menunjukkan bahwa kemungkinan protein antigen dengan BM 30,3 kDa mempunyai sifat imunogenesitas yang tinggi sehingga mampu memicu respon imun humoral pada kelinci dalam membentuk antibodi. Protein dengan BM 24,0 kDa menunjukkan adanya pita reaksi antara serum anti L2 *T. cati* dengan protein antigen L2 *T. cati* dan L2 *T. vitulorum*, tetapi tidak terjadi reaksi dengan cacing dewasa *Toxocara sp* maupun cacing lain. Berdasarkan hasil tersebut dapat dinyatakan bahwa protein dengan BM 24,0 kDa merupakan protein spesifik terhadap protein antigen stadium larva khususnya L2 *T. cati* dan *T. vitulorum*.

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa: 1) Larva stadium kedua (L2) *Toxocara cati* mengandung protein imunogenik yang mempunyai spesifisitas tinggi, yaitu pada BM 24,0 kDa dan BM 30,3 kDa dan 2) Protein antigen dengan BM 30,3 kDa merupakan antigen dominan dari berbagai stadium *T. cati* untuk mengenali antibodi yang dihasilkan terhadap L2 *T. cati*.

Saran yang diajukan berdasarkan hasil penelitian ini adalah: 1) Untuk bahan diagnosis toxocariasis pada hospes aberan yang hanya ditemukan parasit cacing dalam stadium larva dapat digunakan protein antigen L 2 *T. cati* pada BM 24,0 kDa, sedangkan pada hospes definitif dapat digunakan protein dengan BM 30,3 kDa; 2) Perlu dilakukan uji lanjutan mengenai imunogenisitas dan antigenisitas terhadap masing-masing protein murni yang telah berhasil diisolasi baik secara laboratorik maupun uji lapang.

ABSTRACT

The aim of this study was to get the purified protein with the high specificity, immunogenicity and antigenicity. It can be used to produce the monoclonal antibody and also as a kit of toxocariasis diagnostic. This study was divided in some steps as follows: isolation of second larvae and adult worm; production of whole extract and polyclonal antibody; analysis of protein antigen; characterization of protein antigen by Western blot; and purification of protein antigen by preparation of gel electrophoresis. Structural characterization of the second larvae of *Toxocara cati* by sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), showed that the crude extract consisted of seven polypeptides of 133.7 kDa, 96.6 kDa, 86.1 kDa, 60.7 kDa, 40.0 kDa, 30.3 kDa and 24.0 kDa. By immunoblotting, the cross-reaction antigens of *F. gigantica* were recognized by anti-second larvae of *T. cati* antisera was 133.7 kDa. Anti-second larvae of *T. cati* antisera was detected by *T. cati* and *T. vitulorum* larvae and both adult stage was 30.3 kDa. Eventhough, the anti-second larvae of *T. cati* antisera was detected by only of both *T. cati* and *T. vitulorum* second larvae, was 24.0 kDa.

Key words: immunogenicity, antigenicity, toxocariasis, polyclonal antibody, second larvae

DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul Depan	i
Sampul Dalam	ii
Prasyarat Gelar	iii
Lembar Pengesahan	iv
Penetapan Panitia	v
Ucapan Terima Kasih	vi
Ringkasan	viii
Abstract	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Penelitian	1
1.2 Rumusan Masalah	6
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.3.1 Tujuan umum	6
1.3.2 Tujuan khusus	6
1.4 Manfaat Penelitian	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1 Toxocariasis	8
2.1.1 Hospes dan penyebab toxocariasis	8
2.1.2 Transmisi toxocariasis dan siklus hidup <i>Toxocara cati</i>	8
2.1.3 Aspek zoonosis toxocariasis	10
2.2 Diagnosis Toxocariasis	11
2.3 Antigen Parasit	12
2.3.1 Aspek biologi antigen parasit	12
2.3.2 Antigen cacing <i>Toxocara sp</i>	13

2.4	Antibodi	17
2.4.1	Struktur dan fungsi molekul antibodi	17
2.4.2	Pembagian klas fungsional imunoglobulin	19
2.5	Respon Imun terhadap Parasit	20
2.5.1	Respons imun non-spesifik terhadap parasit	20
2.5.2	Respons imun spesifik terhadap parasit	20
2.6	Patogenesis Toxocariasis	21
2.6.1	<i>Visceral larvae migrans</i> (VLM)	21
2.6.2	<i>Ocular larvae migrans</i> (OLM)	22
2.6.3	Pembentukan jaringan granuloma dan larva dorman	23
2.7	Imunopatogenesis Toxocariasis	24
2.8	Pengelakan Respons Imun oleh Cacing	26
BAB 3	KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS	29
3.1	Kerangka Konseptual Penelitian	29
3.2	Hipotesis Penelitian	31
BAB 4	METODE PENELITIAN	32
4.1	Waktu dan Tempat Penelitian	32
4.2	Jenis Penelitian	32
4.3	Definisi Operasional	32
4.4	Bahan Penelitian	33
4.4.1	Unit analisis	33
4.4.2	Hewan percobaan	33
4.4.3	Bahan uji laboratorium	33
4.5	Instrumen Penelitian	33
4.6	Prosedur Penelitian	34
4.6.1	Isolasi cacing <i>T. cati</i> , <i>T. vitulorum</i> dan <i>F. gigantica</i>	34
4.6.2	Pembuatan <i>whole extract</i>	35
4.6.3	Pembuatan antibodi poliklonal	35
4.6.4	Analisis protein	36
4.6.5	Isolasi protein dengan preparasi gel elektroforesis	38
4.7	Skema Prosedur Penelitian	39

BAB 5	HASIL DAN ANALISIS PENELITIAN	40
5.1	Isolasi Larva Stadium Kedua (L2) <i>Toxocara cati</i>	40
5.2	Pembuatan Ekstrak (<i>Whole Extract</i>) L2	41
5.3	Produksi Antibodi Poliklonal Anti-L2 <i>T. cati</i> pada Kelinci	41
5.4	Analisis Protein L2 <i>T. cati</i>	42
5.5	Karakterisasi Protein	44
5.6	Analisis Protein Hasil Elusi	45
BAB 6	PEMBAHASAN	47
6.1	Isolasi Larva Stadium Kedua (L2) <i>Toxocara cati</i>	47
6.2	Kadar Protein <i>Whole Extract</i> L2 <i>T. cati</i>	47
6.3	Produksi Antibodi Poliklonal Anti-L2 <i>T. cati</i> pada Kelinci	49
6.4	Analisis Protein L2 <i>T. cati</i>	50
6.5	Karakterisasi Protein	51
6.6	Analisis Protein Hasil Elusi	53
BAB 7	KESIMPULAN DAN SARAN	56
7.1	Kesimpulan	56
7.2	Saran	56
DAFTAR PUSTAKA	57
LAMPIRAN	63

DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
5.1	Nilai <i>Optical Density</i> (OD) Serum Kelinci Sebelum dan Sesudah Dipapar dengan Protein Antigen L2 <i>T. cati</i>	41
5.2	Hasil Perhitungan Berat Molekul Protein Antigen L2 <i>T. cati</i> dengan teknik SDS-PAGE	43

DAFTAR GAMBAR

Gambar		Halaman
3.1	Skema konseptual penelitian	30
4.1	Skema prosedur penelitian	39
5.1	Hasil identifikasi telur cacing <i>T. cati</i> dan perkembangannya hingga mencapai L2	40
5.2	Hasil analisis protein L2 <i>T. cati</i> dengan SDS-PAGE <i>running</i> I	42
5.3	Hasil analisis protein L2 <i>T. cati</i> dengan SDS-PAGE <i>running</i> II	42
5.4	Hasil analisis protein terhadap antibodi poliklonal anti-L2 <i>T. cati</i> dengan teknik <i>Western Blot</i>	44
5.5	Hasil isolasi protein antigen L2 <i>T. cati</i> yang diuji kembali dengan dengan teknik SDS-PAGE	45

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Uji Linier Regresi antara nilai Rf (x) dan Berat Molekul (log y Da) untuk Menentukan Berat Molekul Protein Antigen L2 <i>Toxocara cati</i>	63



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Spesifisitas protein *Toxocara cati* untuk diagnosis secara imunologis pada toxocariasis hingga saat ini belum diketahui. Hal ini karena antigen diagnostik yang banyak diteliti di negara Barat adalah protein *Toxocara canis*, sedangkan di negara Sub-tropis hingga Tropis yang banyak diteliti adalah protein *Toxocara vitulorum*, namun apabila bahan uji yang digunakan spesifisitasnya masih rendah, maka akan didapatkan spesifitas uji yang rendah pula.

Penyakit yang disebabkan oleh infeksi *Toxocara sp* bersifat zoonosis, khususnya pada anak-anak, namun demikian pernah dilaporkan terjadi juga pada orang dewasa. *Toxocariasis* yang disebabkan oleh *T. cati* perlu mendapat perhatian khusus karena populasi kucing di Indonesia cukup tinggi dan kedekatan hewan kesayangan ini dengan manusia. Kebiasaan kucing menimbun fesesnya dengan tanah setelah berak dapat memperlama daya tahan telur cacing di dalam tanah, hal ini perlu diwaspadai mengingat anak-anak punya kecenderungan senang bermain-main di tanah gembur. Di samping itu prevalensi *toxocariasis* pada kucing di Surabaya cukup tinggi, yaitu sebesar 74% (Sudiana dkk., 1994). Keadaan ini dapat meningkatkan resiko terjadinya toxocariasis pada manusia (Beer *et al.*, 1999). Hal ini sesuai dengan pendapat Kilpatrick (1992) yang menyatakan, bahwa toxocariasis pada manusia merupakan hasil infeksi dengan telur infeksi (mengandung L2) *T. canis* yaitu ascaris dari anjing dan *T. cati* dari kucing, atau mungkin spesies *Toxocara* lain. Penyakit tersebut pada manusia dikenal dengan sebutan *human toxocariasis*, yang merupakan salah satu penyakit cacing zoonosis yang sangat umum (Humbert *et al.*, 2000). Toxocariasis pada manusia adalah penyakit paling penting di antara infeksi oleh nematoda, karena menyebabkan penyakit yang luas pada anak-anak, dan kerusakan mata pada orang dewasa (Playfair, 1992). Toxocariasis pada manusia terdapat dua bentuk yaitu *visceral toxocariasis* dan *ocular toxocariasis*, kedua

bentuk ini masing-masing diakibatkan adanya *visceral larvae migrans* dan *ocular larvae migrans* (Uga *et al.*, 1990; Hubner *et al.*, 2001).

Manusia dapat tertular karena makanan atau minuman terkontaminasi oleh telur infeksius atau larva jaringan terutama apabila pemasakan produk daging atau organ dari ternak yang kurang sempurna (Ito *et al.*, 1986). Namun demikian dinyatakan, bahwa sumber utama infeksi pada manusia adalah tanah terkontaminasi dengan telur infeksius yang mengandung L2 (Radman *et al.*, 2000), terutama pada anak yang masih mempunyai sifat *geophagia* dan kontak dengan hewan penderita (Alonso *et al.*, 2000), maupun yang memasukkan jarinya ke mulut (Marx, 1991). Apabila telur infeksius, yang mengandung larva kedua (L2) dari tanah dan tangan terkontaminasi, tertelan manusia maka telur akan menetas dan mengeluarkan larva dalam usus halus bagian proksimal, kemudian terjadi penetrasi larva pada mukosa dan terbawa sirkulasi sampai hati melalui sistem portal. Beberapa larva tinggal di dalam hati menyebabkan pembentukan granuloma, yang lain terbawa ke paru dan kemudian beberapa masuk sistem sirkulasi dan terbawa ke berbagai organ tubuh hingga mencapai pembuluh darah kecil. Larva menembus pembuluh darah dan migrasi menuju jaringan di sekitarnya (Kilpatrick, 1992). Larva tidak kembali ke usus halus untuk berkembang lebih lanjut tetapi mengalami jalan buntu, sehingga tetap tinggal di jaringan dan statis yang lazim disebut larva dorman (Levine, 1978). Larva dorman (L2) dapat ditemukan dalam jaringan somatik, organ paru, hati, ginjal dan mata bahkan dapat mencapai otak (Havasiova-Reiterova *et al.*, 1995; Uga *et al.*, 1990).

Suatu hal yang menarik pada kasus toxocariasis adalah L2 tidak pernah berkembang menjadi L3 kecuali apabila infeksi terjadi pada anak kucing dan kucing jantan dewasa atau kucing betina dewasa yang bunting dan menjelang melahirkan. Cacing tanah, kecoa, ayam, anjing, anak kambing dan khususnya mencit dapat berfungsi sebagai hospes karier (Levine, 1978). Mengingat telur dan cacing dewasa *T. cati* tidak dapat ditemukan pada hospes transport, termasuk manusia, maka diagnosis

secara konvensional berdasarkan pemeriksaan telur cacing dalam feses tidak dapat dilakukan, begitu juga diagnosis berdasarkan gejala klinis sulit dilakukan, karena gejala klinisnya sangat bervariasi. Oleh karena itu, diperlukan diagnosis secara imunologik.

Di Indonesia belum pernah dilakukan survei seroepidemiologi toxocariasis pada manusia, sehingga angka kejadiannya belum diketahui. Hal ini sangat berbeda dengan beberapa negara lain misalnya di Argentina telah diketahui angka prevalensi toxocariasis pada anak-anak di kota Resistencia sebesar 37,9% dari 206 sampel yang diamati (Alonso *et al.*, 2000), sedangkan di Chaco Salteno 20,4% dari 98 sampel (Taranto *et al.*, 2000), di Shiraz 25,6% dari 519 sampel (Sajjadi *et al.*, 2000), dan di Jos, Plateau State, Nigeria 29,6%, sedangkan pada orang dewasa 30,4% dari 104 sampel (Ajayi *et al.*, 2000). Park *et al.* (2000) juga melaporkan, adanya lima kasus toxocariasis terjadi pada orang dewasa di Korea.

Telah diketahui di seluruh dunia, bahwa *T. canis* dan *T. cati* memungkinkan sebagai penyebab infeksi pada manusia, termasuk manifestasi klinisnya, yaitu *visceral* dan *ocular larvae migrans* (Hubner *et al.*, 2001). Mengingat dampak yang ditimbulkan sangat berat terutama bila terjadi *ocular larva migrans* maupun bila larva sampai ke otak (Havasiova-Reiterova *et al.*, 1995), maka perlu dipikirkan penggunaan imunodiagnosis pada manusia. Keberadaan larva dalam jaringan akan menimbulkan jejas, sehingga timbul respons imun yang ditandai dengan keberadaan imunoglobulin E (IgE) dan peningkatan kadar eosinofil yang merupakan jenis khusus dari *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* (ADCC). Respons tersebut dilengkapi dengan kecenderungan dari cacing untuk menstimulasi subset $Th_2CD_4^+$ dari sel Th mensekresi interleukin-4 (IL-4) dan IL-5. Interleukin-4 merupakan limfokin yang merangsang sel B untuk berdeferensiasi menjadi sel plasma dan menghasilkan Ig E, sedangkan IL-5 merupakan pemicu potensial terhadap pembentukan eosinofil (Abbas *et al.*, 2000). Jadi IL-4 dan IL-5 berperan dalam kontrol produksi Ig E dan Ig G₁, sedangkan $Th_1CD_8^+$ menghasilkan interferon gamma (IFN γ) yang menghambat reaksi hipersensitivitas dan memicu

produksi Ig G₂. Antibodi yang dihasilkan oleh sel-sel sistem imun tubuh tersebut bersifat spesifik terhadap *T. cati* dan sebagian beredar dalam darah perifer, sehingga dapat dideteksi dengan teknik imunodiagnostik, yang pada prinsipnya adalah mendeteksi ikatan antigen-antibodi spesifik terhadap *T. cati* dalam serum penderita. Karena dalam pemeriksaan tersebut diperlukan antibodi dan antigen spesifik terhadap *T. cati*, maka perlu dikaji lebih lanjut tentang imunogenisitas dan antigenisitas penyebab penyakit tersebut dengan mempersiapkan perangkat diagnostik yang mempunyai nilai 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.

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

Pengamatan terhadap telur *T. vitulorum* didapatkan protein dengan BM 240 kDa dan 206 kDa yang dapat dikenali oleh antibodi terhadap cacing dewasa, namun dapat dikenali pula oleh antibodi terhadap cacing lain (Abdel-Rahman *et al.*, 2000). Adapun pengamatan terhadap *surface antigen* dan E-S antigen dari larva infeksi *T. canis* didapatkan reaksi silang dengan antibodi terhadap *T. canis* dan *T. cati* pada BM 200 kDa, sedangkan yang lebih spesifik kira-kira pada BM 80 kDa (Bowman *et al.*, 1987). Pada *T. vitulorum* dewasa dapat ditemukan protein dengan BM 97 kDa dan 66 kDa

(Trisunuwati, 1997), 133 kDa dan 143 kDa (Abdel Rahman and Megeed, 2000), BM 92 kDa dan 87 kDa (Abdel-Rahman, 2000), namun protein tersebut memberikan reaksi silang dengan antibodi terhadap cacing lain.

Karena L2 merupakan larva migran yang berasal dari saluran usus dan kemudian masuk ke dalam sistem *portal hepatic*, ke dalam hati, paru, dan organ visceral lain, sangat memungkinkan L2 lebih dikenali oleh perangkat imun tubuh hospes, sehingga dapat memicu terbentuknya antibodi lebih kuat. Hal ini dapat dibuktikan dengan pemeriksaan antibodi terhadap *T. vitulorum* dengan uji ELISA, bahwa penggunaan antigen L2 pada mencit memberikan nilai *optical density* (OD) yang lebih tinggi dibanding jika digunakan antigen L1 maupun dewasa (Kusnoto dkk., 2001). Berdasarkan pemeriksaan antibodi dengan teknik *Western blot*, terjadi reaksi antara antibodi terhadap L3 *T. vitulorum* dengan protein 34 kDa dan 32 kDa dari L2 maupun L3, tetapi memberikan hasil negatif dengan protein pada L1 (Trisunuwati, 1997). Berdasarkan hasil uji *skin tests*, respons imun humoral berupa reaksi hipersensitifitas yang ditunjukkan pada anak kerbau terhadap ekstrak larva infeksi *T. vitulorum* lebih tinggi dibandingkan dengan antigen E-S (Starke *et al.*, 1996). Kenyataan tersebut memberikan indikasi bahwa ekstrak larva infeksi dapat digunakan sebagai sumber protein dengan imunogenisitas dan antigenisitas yang tinggi, namun masih perlu dianalisis lebih lanjut agar nantinya dapat ditemukan antigen yang sangat spesifik untuk digunakan sebagai bahan uji imunodiagnostik terhadap toxocariasis dengan sensitifitas dan spesifisitas yang tinggi.

Adanya reaksi silang pada penggunaan antigen ekstrak *crude protein* memberikan isyarat bahwa pada uji imunodiagnostik membutuhkan bahan uji yang lebih spesifik. Purifikasi protein cacing dewasa *T. vitulorum* ternyata menghasilkan fraksi protein yang dapat meningkatkan spesifisitas (*specific activity*) dibanding dengan *crude extract* (Abdel-Rahman (2000). Hal ini juga tampak pada penggunaan *crude extract* dari cacing *T. canis* yang menunjukkan reaksi silang dengan antibodi terhadap *A.*

vitulorum dan *A. lumbricoides*, tetapi reaksi silang tidak terjadi bila menggunakan *partially purified antigen* (Safar *et al.*, 1992).

Bertitik tolak dari permasalahan di atas maka perlu kiranya dikaji lebih mendalam mengenai protein imunogenik *T. cati* yang bersifat spesifik, khususnya sensitifitas dan spesifisitas protein imunogenik L2 dalam upaya mendapatkan perangkat diagnostik dini, cepat dan akurat.

1.2 Rumusan Masalah

- 1) Apakah larva kedua (L2) *T. cati* mengandung protein antigenik?
- 2) Apakah terdapat antigen dominan dari berbagai stadium *T. cati* untuk mengenali antibodi anti-L2 *T. cati*?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh protein imunogenik yang spesifik pada larva stadium kedua (L2) *T. cati*.

1.3.2 Tujuan khusus

- 1) Menentukan berat molekul protein imunogenik pada L2 cacing *T. cati*.
- 2) Untuk mendapatkan protein dari L2 *T. cati* pada BM tertentu dengan antigenisitas tinggi.

1.4 Manfaat Penelitian

Dengan diketahuinya protein imunogenik dari *T. cati*, akan dapat diketahui karakter epitop *T. cati*, sehingga dapat dimanfaatkan pada diagnosis toxocariasis dengan pemeriksaan antibodi. Hasil penelitian ini diharapkan dapat dijadikan tolok ukur dalam studi awal pembuatan kit diagnostik melalui pemeriksaan antibodi dengan uji immuno-

logik yang mempunyai sensitifitas dan spesifisitas tinggi untuk keperluan diagnosis *toxocariasis*. Dengan demikian, penelitian ini diharapkan dapat memberikan sumbangan bagi perkembangan ilmu Kedokteran dan Bioteknologi.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Toxocariasis

2.1.1 Hospes dan penyebab toxocariasis

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

Nama lain dari *T. cati* adalah *T. mystax*. Cacing ini mempunyai cervical alae sangat lebar dan bergaris. Panjang cacing jantan 3-6 cm, spikula *unequal* dengan panjang 1,63-2,08 mm. Panjang cacing betina 4-10 cm. Adapun ukuran telurnya adalah 65-75 mikron (Soulsby, 1986; Kusumamihardja, 1993).

Hospes definitif *T. cati* adalah anak kucing dan kucing jantan dewasa, selain itu juga dapat menyerang felidae lain dan mustelidae. Adapun cacing tanah, kecoa, ayam, anak kambing dan tikus dapat berperan sebagai hospes transpor (Levine, 1978). Angka prevalensi tertinggi didapatkan pada anak kucing umur 12-24 minggu, dan tidak ditemukan pada anak kucing umur 0-4 minggu (O'Lorcain, 1994).

2.1.2 Transmisi toxocariasis dan siklus hidup *Toxocara cati*

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

Potensi tanah sebagai sumber infeksi *Toxocara sp* telah dibuktikan dengan hasil beberapa penelitian, diantaranya penelitian yang di lakukan di Santiago didapatkan sampel positif 33,3% dari sampel tanah lapangan (*squares*) dan 66,7% dari sampel tanah taman (*parks*). Angka prevalensi keseluruhan di kota tersebut adalah 13,5% dari

288 total sampel tanah (Castillo *et al.*, 2000). Hasil penelitian serupa yang dilakukan di La Plata, Argentina oleh Fonrouge *et al.* (2000), didapatkan sampel positif 13,2% dari 242 sampel tanah dari *squares* dan *parks*. Adapun di Indonesia juga telah dilakukan penelitian terhadap tanah di sekitar *playgrounds*, Rumah Potong Hewan dan peternakan sapi perah di Surabaya, didapatkan hasil 28,2% sampel positif mengandung telur *Toxocara sp* dari 188 sampel yang diamati (Kusnoto dkk., 2000).

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

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

otot tikus, cacing tanah, kecoak, ayam, domba dan hewan lain yang terinfeksi oleh telur infeksi (Kusumamihardja, 1993).

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

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

2.1.3 Aspek zoonosis toxocariasis

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

Manusia dapat tertular toxocariasis karena termakannya telur infeksi yang terdapat dalam feses anak anjing, anak kucing, kucing jantan dewasa, anak sapi dan tanah terkontaminasi atau larva yang berada pada jaringan maupun air susu (Ito *et al.*, 1986; Alonso *et al.*, 2000; Radman *et al.*, 2000). Berdasarkan gejala klinik, toxocariasis

pada manusia diklasifikasikan menjadi *visceral toxocariasis* dan *ocular toxocariasis*. Kedua penyakit tersebut didefinisikan sebagai *visceral larva migrans* (VLM) dan *ocular larva migrans* (OLM) yang membutuhkan diagnosis secara imunologik (Uga *et al.*, 1990). Toxocariasis pada manusia dilaporkan telah terjadi di Jepang sebanyak 42 kasus (Kondo, 1989). *Toxocara* ternyata dapat menyerang manusia dewasa maupun anak-anak. Gejala toxocariasis bervariasi sehingga sulit untuk didiagnosis berdasarkan gejala klinik (Uga *et al.*, 1990). Lebih lanjut dinyatakan bahwa dengan uji ELISA terhadap orang-orang yang tinggal di kota Kobe dan sekitarnya didapatkan hasil 4,6 % positif dari 196 kelompok orang dewasa (100 orang pria dan 96 wanita), 6,3 % positif dari 80 kelompok anak-anak (45 pria dan 35 wanita), dan 29,3 % positif dari 75 kelompok orang yang menunjukkan gejala/tersangka penderita (pasien 41 pria dan 34 wanita, umur 9-69 tahun).

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

2.2 Diagnosis Toxocariasis

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

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

2.3 Antigen Parasit

2.3.1 Aspek biologi antigen parasit

Secara umum, pengertian antigen adalah substansi yang dapat dikenali sebagai benda asing (*non self*) oleh sistem imun tubuh. Antigen ialah benda asing yang diukur berdasarkan keberhasilan dalam mengikat antibodi. Adapun imunogen, merupakan bagian dari antigen, diukur berdasarkan kemampuan dalam memicu sistem imun adaptif untuk menghasilkan antibodi (Abbas *et al.*, 2000). Pada umumnya, molekul yang bersifat imunogen ialah apabila terjamin keasingannya dan mempunyai berat molekul (BM) lebih dari 5 kDa. Pada molekul yang lebih kecil, dapat menjadi imunogenik apabila terikat pada makromolekul sebagai karier (Tizard, 1982; Manus 1986). Respon imun juga dipengaruhi oleh tingkat solubilitas protein antigen. Antibodi hanya akan mengikat pada bagian khusus makromolekul, yang kemudian disebut sebagai penentu



antigenik (*epitope*). Pada satu makromolekul mungkin terdapat sejumlah epitop yang masing-masing akan berikatan dengan antibodi yang sesuai (Abbas *et al.*, 2000).

Berbagai jenis antigen yang berasal dari parasit dapat diperinci berdasarkan sumber dan lokasi parasit, maupun populasi dan siklus hidup parasit. Berdasarkan sumber dan lokasi parasit antara lain terdiri dari: 1) exoantigen terlarut, berasal dari parasit hidup atau parasit dalam media buatan merupakan produk ekskresi berupa metabolit; 2) somatik antigen terlarut, berasal dari cacing stadium dewasa atau larva yang hancur atau dari sel permukaan tubuh parasit; 3) parasit yang mati atau fragmen-fragmen tubuhnya; 4) parasit yang hidup secara utuh; 5) cairan tubuh nematoda; dan 6) cairan kista larva cacing pita. Adapun berdasarkan stadium dan siklus hidup parasit antara lain terdiri dari: 1) spesifikasi genus, spesies, strain dan stadium hidup; dan 2) parasit yang mengalami perubahan bentuk (Tizard, 1982; Page *et al.*, 1991; Warren, 1993; el-Massry, 1999).

Antigen yang berasal dari parasit akan menjadi imunogenik apabila dikenali sebagai *non self* dengan berat molekul tertentu. Secara kimiawi, zat imunogen parasit dapat berupa protein, lipida, karbohidrat, glikoprotein, dan glikolipida. Masing-masing komponen kimiawi tersebut mempunyai karakteristik ukuran, susunan rantai dan jumlah determinan yang mungkin berbeda (Anders, 1982). Keistimewaan antigen yang berasal dari parasit adalah arti antigen terhadap hospes maupun parasit itu sendiri. Sebagian antigen dihasilkan parasit dapat memicu respon imun hospes (*antigen host protective*), tetapi sebagian lagi justru untuk pertahanan parasit tersebut terhadap pengenalan oleh hospes (*antigen parasite protective*).

2.3.2 Antigen cacing *Toxocara sp*

Cacing *T. cati* yang selama hidupnya mengalami beberapa generasi memiliki perangkat antigen yang berbeda-beda, hal ini dimanfaatkan agar terhindar dari sistem imun hospes. Adanya perbedaan struktur morfologi pada berbagai generasi tersebut

menyebabkan perbedaan imunogenisitas dalam memicu terbentuknya antibodi (Warren, 1993). Cacing *T. cati* dewasa yang panjangnya mencapai 12 cm, memiliki induk semang dengan tingkatan umur yang berbeda dengan manifestasi klinik yang berbeda pula. Bentuk larva (L2) dapat ditemukan pada kucing betina dewasa, kambing dan manusia sebagai hospes aberan, selain itu juga dapat ditemukan pada *paraternal host* misalnya tikus, kecoa, ayam serta hewan lain, sedangkan bentuk dewasa mudah didapatkan pada usus halus anak kucing dan kucing jantan dewasa sebagai hospes definitif (Levine, 1978; Kusumamihardja, 1990).

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

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

Trisunuwati (1997) melakukan analisis protein pada berbagai stadium larva *T. vitulorum* memperoleh gambaran, bahwa setiap stadium menunjukkan pita protein dengan berat molekul yang berbeda. Pada L1 diperoleh protein dengan BM 56 kDa dan

42 kDa. Larva stadium kedua (L2) selain menunjukkan protein dengan BM seperti pada L1, juga ditemukan protein 97 kDa, 34 kDa, dan 32 kDa. Protein L3 hampir sama dengan L2 tetapi juga didapatkan protein dengan BM 66 kDa.

Pada *T. vitulorum* dewasa dapat ditemukan protein dengan BM 97 kDa dan 66 kDa, yang sama dengan protein pada *A. lumbricoides* dewasa (Trisunuwati, 1997). Abdel-Rahman and Megeed (2000) juga mendapatkan reaksi silang dari ekstrak cacing utuh (*whole worm extract*) dengan uji ELISA, yaitu antara antigen *T. vitulorum*, *F. gigantica* dan *M. expansa* dewasa. Berdasarkan teknik *immunoblotting* dapat diketahui, bahwa antigen *F. gigantica* dikenali oleh antibodi *T. vitulorum* pada BM 109 kDa, bila komponen ini ditambahkan satu dengan yang lain pada 52 kDa akan dideteksi oleh antibodi *M. expansa* dengan ekstrak yang sama. Lebih jauh diketahui, bahwa terjadi reaksi silang antara antigen *T. vitulorum* dengan *F. gigantica* pada 133 kDa dan dengan *M. expansa* pada 143 kDa. Lebih lanjut dinyatakan oleh Abdel-Rahman (2000), bahwa antigen spesifik spesies *T. vitulorum* dewasa hanya dua polipeptida, yaitu pada BM 92 kDa dan 87 kDa.

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

band (90,00 kDa, 91,95 kDa dan 69,25-70,56 kDa). Adapun pita yang menunjukkan reaksi spesifik untuk *T. canis* dewasa adalah polipeptida pada 125,37 kDa dan 117,73 kDa, sedangkan untuk *T. leonina* dewasa pada 119.04 kDa.

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

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

2.4 Antibodi

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

2.4.1 Struktur dan fungsi molekul antibodi

Semua molekul imunoglobulin (Ig) mempunyai 4 rantai polipeptida dasar yang terdiri atas 2 rantai berat (*heavy chain*) yang identik dan 2 rantai ringan (*light chain*) yang juga identik. Setiap rantai ringan terikat pada rantai berat melalui ikatan disulfida (S-S). Ada 2 jenis rantai ringan, yaitu *kappa* (κ) dan *lambda* (λ) yang terdiri atas 230 asam amino serta 5 jenis rantai berat yang tergantung pada jenis Ig (Baratawidjaja, 2000). Molekul antibodi ini berbentuk seperti huruf “Y” yang terdiri dari tiga segmen dengan ukuran seimbang (*equal-size*) (Janeway, *et al.*, 1999).

Roitt *et al.*, 1998) menyatakan, bahwa pengetahuan tentang struktur dan fungsi imunoglobulin diperoleh dengan memisahkan struktur antibodi menjadi fragmen-fragmen antibodi dengan enzim protease. Enzim protease papain dari tanaman memisahkan molekul IgG pada *hinge region* menjadi 3 fragmen, yaitu 2 fragmen yang mempunyai susunan yang sama, terdiri atas rantai berat (H) dan rantai ringan (L) disebut fragmen Fab yang dibentuk oleh domain terminal-N, dan 1 fragmen yang hanya terdiri atas rantai berat saja disebut fragmen Fc yang dibentuk oleh domain terminal-C.

Fragmen Fab dengan *antigen binding site* berfungsi mengikat antigen, karena itu susunan asam amino pada bagian ini berbeda antara Ig satu dengan yang lain dan sangat

variabel sesuai dengan variabilitas antigen yang memicu pembentukannya. Fragmen Fc (*crystallizable*) dapat dikristalkan dari larutan dan merupakan fragmen yang konstan. Fragmen ini tidak mempunyai kemampuan mengikat antigen tetapi dapat bersifat sebagai antigen (determinan antigen). Fragmen Fc mempunyai fungsi efektor sekunder dan menentukan sifat biologik Ig, misalnya kemampuan Ig melekat pada sel, fiksasi komplemen, kemampuan Ig menembus plasenta, distribusi Ig dalam tubuh dan lain-lain. Papain memecah Ig pada terminal asam amino di tempat ikatan S-S yang mengikat kedua rantai H dengan yang lain. Adapun enzim pepsin dapat memecah molekul Ig di belakang ikatan S-S, pemecahan ini mengakibatkan terbentuknya satu fragmen besar yaitu F(ab')₂ yang mampu mengikat dan menggumpalkan antigen karena bersifat bivalen dan dapat membentuk *lattice*. Selanjutnya pepsin dapat memecah Fc menjadi beberapa bagian kecil. Bagian molekul Ig yang peka terhadap pemecahan kedua enzim di atas disebut bagian engsel (*hinge region*) (Stites *et al.*, 1997; Roitt *et al.*, 1998).

Pada beberapa keadaan, antibodi melaksanakan fungsi proteksi dengan menetralkan antigen secara langsung. Tetapi dalam melaksanakan fungsinya, lebih sering dibantu oleh sistem efektor lain, misalnya komplemen, fagosit dan sel sitotoksik. Reseptor Fc (FcRI, FcRII, FcRIII) bersama dengan reseptor komplemen CR1 dan CR3 mempunyai peran penting dalam menangkap dan menyingkirkan kompleks imun. Bentuk transmembran reseptor FcRIII pada makrofag dan sel NK diduga terlibat dalam merangsang sitotoksitas seluler. Di samping itu reseptor Fc yang terdapat pada beberapa subpopulasi sel T dan sel B diduga terlibat dalam pengaturan produksi berbagai isotip antibodi walaupun mekanismenya yang pasti belum diketahui. Reseptor IgG yang lain terdapat pada permukaan *syncytiotrofoblast*. Reseptor ini dapat mengikat berbagai isotip IgG dan sangat penting untuk transfer IgG ibu ke dalam sirkulasi darah janin, sehingga janin mendapat proteksi yang diperlukan (Kresno, 1996).

2.4.2 Pembagian klas fungsional imunoglobulin

Imunoglobulin (Ig) disekresikan oleh sel plasma yang merupakan fase terminal dalam diferensiasi sel B. Menurut teori seleksi klon, satu sel plasma hanya memproduksi satu jenis antibodi spesifik. Hingga sekarang dikenal 5 klas utama Ig dalam serum manusia, yaitu IgG, IgA, IgM, IgD, IgE. Klasifikasi ini didasarkan atas perbedaan dalam struktur kimia yang mengakibatkan perbedaan dalam sifat biologik maupun sifat fisika Ig. Di laboratorium, kelas Ig ini ditentukan berdasarkan sifat migrasi masing-masing pada elektroforesis dan sifat-sifat serologik (Roitt *et al.*, 1998).

Setiap klas Ig mempunyai rantai berat (*heavy chains*) yang spesifik, IgG mempunyai rantai *gamma* (γ), sedangkan rantai berat pada IgM adalah rantai *mu* (μ), pada IgA rantai beratnya adalah *alfa* (α), pada IgD rantai *delta* (δ), dan pada IgE rantai *epsilon* (ϵ). Jadi kelima klas Ig diberi nama sesuai rantai berat yang menyusunnya. Selain itu terdapat 2 tipe rantai ringan (*light chains*) yaitu *kappa* (κ) dan *lambda* (λ). Pada tiap rantai pada Ig tersebut terdiri dari polipeptida, dengan demikian dapat dikatakan bahwa, Ig tersusun dari 4 rantai polipeptida, yaitu 2 polipeptida pada rantai berat dan 2 polipeptida pada rantai ringan (Roitt *et al.*, 1998; Janeway *et al.*, 1999).

Tiap molekul IgG tersusun atas satu unit dasar (karena itu disebut monomer) terdiri atas 2 rantai γ dirangkaikan dengan 2 rantai κ atau λ , IgE juga merupakan monomer, tersusun atas 2 rantai ϵ dan 2 rantai κ atau λ , demikian pula IgD yang terdiri atas 2 rantai δ dan 2 rantai κ atau λ . Di lain pihak, molekul sekresi IgM merupakan molekul pentamer terdiri atas 5 unit dasar. Tiap unit dasar terdiri atas 2 rantai μ dirangkaikan dengan 2 rantai κ atau λ . Kelima unit dasar itu dirangkaikan satu dengan yang lain oleh rantai J (*joining chain*), yaitu bagian non-Ig yang mengandung banyak sulfhidril. IgM pada permukaan limfosit (sIgM) dijumpai sebagai monomer. IgA juga dapat dijumpai dalam dua bentuk, yaitu monomer dan dimer. Sebagian besar (89-90%) IgA terdapat dalam bentuk dimer, terdiri atas 2 unit, masing-masing unit mempunyai 2 rantai α dan 2

rantai κ atau λ . Kedua unit dasar IgA dirangkaikan satu dengan yang lain oleh rantai J (Roitt *et al.*, 1998; Abbas *et al.*, 2000).

2.5 Respon Imun Terhadap Parasit

2.5.1 Respon imun non-spesifik terhadap parasit

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

2.5.2 Respon imun spesifik terhadap parasit

Respon imun spesifik terhadap infeksi beberapa cacing diperantarai oleh Ig E dan eosinofil, yang merupakan tipe khusus dari *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* (ADCC). Antibodi (IgE) mengikat bagian permukaan dari cacing, kemudian eosinofil menyerang melalui Fc reseptor, dan eosinofil teraktivasi mensekresi granula enzim yang menghancurkan parasit. Respon tersebut dilengkapi dengan kecenderungan dari cacing untuk menstimulasi subset $Th_2CD_4^+$ dari sel Th, yang mensekresi IL-4 dan IL-5. Interleukin-4 (IL-4) menstimulasi produksi Ig E, dan IL-5 menstimulasi perkembangan dan aktivasi eosinofil. Eosinofil kemungkinan lebih efektif untuk mematikan cacing daripada leukosit lain, karena protein granula eosinofil mungkin lebih toksik dibanding enzim proteolitik dan oksigen reaktif dari netrofil maupun makrofag. Respon imun spesifik terhadap parasit juga menambah jejas jaringan. Beberapa parasit dan produknya menginduksi respon granulomatous yang diikuti dengan fibrosis (*fibrosis concomitant*) (Roitt *et al.*, 1998; Abbas *et al.*, 2000).

2.6 Patogenesis Toxocariasis

2.6.1 Visceral larva migrans (VLM)

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

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

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

billiary extra hepatic ternyata ditemukan *T. canis* yang menginvasi sistem *billiary* via anastomosis antara *gall bladder* dan duodenum. Hal ini menyebabkan *billiary* dan *hepatic toxocariasis*.

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

2.6.2 Ocular larva migrans (OLM)

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

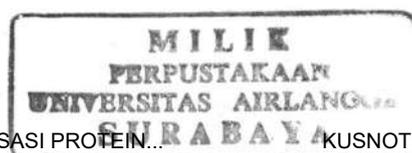
Park *et al.* (2000) melaporkan adanya 5 kasus *ocular toxocariasis* pada orang-orang dewasa di Korea. Pada pemeriksaan funduskopik, 4 kasus dinyatakan mengalami *retinal detachment* bersama dengan eksudat. Atopi ini memberi kesan ada hubungannya dengan level tinggi dari antibodi Ig E. Bilamana lesi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

posterior fundus, perifer fundus, dan keduanya, juga dapat terjadi *papillary oedema (redness)*, lesi chorioretinal dan *traction retinal detachment*.

2.6.3 Pembentukan jaringan granuloma dan larva dorman

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

Infeksi larva *Toxocara sp* pada sapi betina dewasa juga memberikan gambaran respon imun seluler kronis, misalnya pembentukan jaringan granuloma di sekitar lokasi larva (Roberts, 1992). Hipersensitivitas tipe lambat kemungkinan juga terjadi pada infeksi bentuk larva, yaitu pada 2-3 minggu sebelum hospes melahirkan. Fenomena ini besar kemungkinan berkaitan dengan keberadaan hormon laktogenik yang akan menurunkan respon imun secara tidak langsung dengan kompetisi penggunaan kalsium (Ca) sebagai bahan penyusun air susu, hal ini memungkinkan L2 aktif kembali menjadi L3. Tidak semua L2 yang berada di jaringan paru, ginjal, dan hati akan terbebas keluar pada saat kelahiran yang sama, sebagian dapat bertahan hingga kelahiran berikutnya (Roberts, 1993). Terbentuknya sel fibroblas dari sel limfosit ikut berperan dalam pembentukan kapsul dan jaringan granuloma yang mengelilingi larva. Apabila



kapsulasi tersebut terjadi pada waktu yang lama dapat terjadi pengapuran (Soulsby, 1989).

2.7 Imunopatogenesis Toxocariasis

Pada umumnya infeksi oleh parasit, khususnya cacing, ditandai dengan keberadaan imunoglobulin (Ig) E dan peningkatan kadar eosinofil. Peningkatan kedua sel-sel sistem imun tersebut di bawah kontrol sel T (Pearse and Sher, 1990). Interleukin (IL) 4, merupakan limfokin yang merangsang sel B yang teraktivasi oleh lipopolisakarida untuk menghasilkan Ig E dalam tubuh hospes. Sedangkan IL-5 merupakan stimulus potensial terhadap pembentukan eosinofil pada medium buatan (Abbas *et al.*, 2000). Penyuntikan IL-5 pada tikus yang dilakukan oleh Amerasinghe *et al.* (1992), berakibat terjadi peningkatan jumlah sel eosinofil dalam darah dan jaringan. Jika IL-5 rendah akan menyebabkan terjadinya granuloma dan fibrosis hati. Interleukin (IL)-4 dan IL-5, yang dihasilkan oleh $Th_2CD_4^+$, berperan dalam kontrol produksi Ig E dan Ig G₁. Sedangkan $Th_1CD_8^+$ menghasilkan interferon gamma (IFN γ) yang menghambat reaksi hipersensitivitas dan memacu produksi Ig G₂. Menurut Rajapakse (1992), Ig G₂ lebih berperan dalam infeksi *T. vitulorum* dari pada imunoglobulin yang lain.

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

Bentuk imunitas protektif yang lain terhadap cacing dewasa masih bersifat spekulatif. Salah satu teori ialah *self cure* yang menyebabkan pengeluaran cacing

dewasa dari tubuh hospes (Lloyd and Soulsby, 1987). Pada saat itu kadar Ig E meningkat, hal ini dibuktikan oleh Matsumura *et al.* (1983). Pengeluaran cacing dari lumen usus merupakan kerja sama antara antibodi, sel limfosit dan sel myeloid. Namun sepenuhnya fenomena tersebut belum dapat dijelaskan secara tepat. Sedangkan pada bentuk muda seringkali terjadi migrasi dari satu organ ke organ lain, kemudian akan membentuk jaringan ikat di sekitarnya. Keadaan ini akan merangsang kenaikan jumlah sel eosinofil yang berlangsung kronis, dan akan berkaitan dengan produksi Ig M dan Ig G di sekitar fibrosis dan di dalam granuloma tersebut. Sedangkan kadar eosinofil darah perifer terlihat mulai dari normal hingga terjadi peningkatan (Trisunuwati, 1997). Jumlah sel eosinofil dan makrofag sangat bergantung kepada keberadaan dan aktivitas sel limfosit T. titer Ig G spesifik yang tinggi ada hubungannya dengan manifestasi klinis dari toxocariasis. Infeksi larva juga dapat menstimulasi eosinofil (Kincekova, 1999).

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

Infeksi pada anak sapi dapat terjadi terutama disebabkan karena belum memiliki aktivitas sistem imun sendiri. Imunoglobulin yang dipunyai oleh anak sapi neonatal ini ialah antibodi maternal (Brandon and Lascelles, 1971), sampai pada saat terjadinya perkembangan organ imunokompeten sebagai bentuk protektif. Hal ini karena pada sapi tidak terjadi transfer imunoglobulin melalui plasenta, tetapi hanya melalui kolostrum. Dalam darah fetal sebenarnya sudah didapatkan sel limfosit pada 45 hari setelah konsepsi, sedangkan Ig M pada hari ke-359 kebuntingan dan Ig G1 pada hari ke-

135. penelitian ini dilakukan dengan teknik gel difusi (Husband *et al.*, 1972). Demikian pula respon yang terjadi pada infeksi buatan dengan beberapa penyebab penyakit. Namun belum diketahui secara pasti apakah imunoglobulin tersebut berasal dari induk atau respon fetus, karena timus dan limfo noduli sudah ditemukan pada fetus sapi 45 hari setelah konsepsi.

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

2.8 Pengelakan Respon Imun oleh Cacing

Tizard (1982) menyatakan bahwa, respon imun protektif terhadap infeksi cacing tidak sepenuhnya efektif. Keberhasilan adaptasi ini terlihat paling jelas pada infeksi cestoda, terutama *cysticercus* yang tampak mampu untuk bertahan hidup tanpa batas dengan adanya tanggap induk semang. Beberapa mekanisme dapat dipertimbangkan berperan dalam adaptasi ini. Di antaranya mimikri antigen induk semang, penyerapan antigen induk semang, variasi antigenik, penghalangan antibodi dan toleransi.

Mekanisme yang pertama mengenalkan konsep bahwa cacing dapat membuat antigen histokompatibilitas atau antigen golongan darah yang cocok dengan yang dimiliki

induk semangnya. Jelas bahwa cacing tidak dapat membuat semua antigen yang mungkin diperlukan, karena untuk itu dibutuhkan adanya sistem genetik yang sama rumitnya dengan sistem penghasil-antibodi. Namun demikian tentunya mungkin juga untuk meniru sebagian dari antigen induk semang, misalnya, respon domba terhadap antigen *H. contortus* lebih sedikit dibandingkan kelinci. Hal ini menunjukkan bahwa *H. contortus* memiliki kemiripan antigenik lebih dekat dengan domba, induk semang alamiahnya, daripada kelinci induk semang yang biasanya diinfeksi.

Kedua, terdapat banyak bukti yang menunjukkan bahwa jaringan cacing dapat terlindungi dari konsekuensi tanggap kebal induk semangnya, dengan penyerapan antigen induk semang pada permukaannya. Contohnya, *Schistosoma mansoni* dewasa, trematoda yang hidup dalam pembuluh darah mesenterium manusia dan yang mampu menyerap eritrosit induk semang dan antigen histokompatibilitas pada permukaannya. *Cysticercus* juga dapat menyerap antigen histokompatibilitas dengan cara ini.

Mekanisme ketiga, pengelakan respon imun melibatkan variasi antigenik. Walaupun cacing tidak mengembangkan suatu sistem seefisien seperti yang terlihat pada tripanosomiasis, tetapi dikenal adanya variasi antigenik secara berangsur-angsur. Jadi, antigen kutikula dari *T. spiralis* memperlihatkan perubahan yang luas setelah tiap pergantian kulit. Bahkan selama fase pertumbuhannya memperlihatkan perubahan kuantitatif pada pengungkapan dari protein antigen permukaan.

Suatu respon lain, yang dapat berperan dalam kelangsungan hidup parasit cacing adalah immunosupresi. Misalnya, domba yang ditulari *H. contortus* mengalami supresi secara spesifik sehingga tidak bereaksi terhadap *H. contortus* walaupun tetap tanggap terhadap antigen lain. Mekanisme yang terlibat dalam tanggap ini belum diketahui. Mekanisme dapat melibatkan induksi pada sel supresor khusus, seperti apa yang ditunjukkan pada filariasis atau yang lainnya, hal itu dapat terjadi sebagai akibat dari produksi antibodi penghalang dengan cara analog dengan apa yang terlihat pada kebuntingan dan beberapa kondisi neoplastik. Pada infeksi cacing yang lain seperti

misalnya trichinosis, induk semang yang tertulari mengalami immunosupresi nonspesifik. Immunosupresi ini dicerminkan pada ketahanan yang menurun terhadap infeksi yang lain, tanggap yang tidak baik terhadap vaksinasi dan bertambah lamanya waktu kelangsungan cangkok kulit. Secara teori mungkin bahwa toleransi dapat terjadi pada hewan muda yang menerima antigen parasit dalam jumlah yang banyak baik *in utero* atau segera setelah lahir, seperti halnya pada toxocariasis (Tizard, 1982).

Free antigens dapat menyebabkan: 1) Bergabung dengan antibodi dan mengalihkan (membelokkan) dari parasit; 2) Memblokade sel efektor, secara langsung atau sebagai kompleks imun maupun keduanya; 3) Menginduksi sel-T atau sel-B toleran, mungkin melalui blokade pada *antibody-forming cells* (AFC) atau penipisan (*depletion*) dari limfosit antigen-spesifik *mature* melalui *clonal exhaustion*; 4) Menyebabkan aktivasi poliklonal. Beberapa produk parasit mitogenik terhadap sel-B atau sel-T dan meningkatkan konsentrasi Ig M (dan Ig G) non-spesifik umumnya ditemukan pada infeksi parasitik mungkin hasil dari stimulasi poliklonal tersebut. Apabila hal ini berlanjut, dipercaya dapat berperanan dalam pelemahan fungsi sel-B, deplesi progresif dari limfosit B antigen-reaktif dan immunosupresinya; dan 5) Aktivasi sel-T, khususnya sel Th₂, atau makrofag, atau keduanya, untuk menghasilkan molekul immunosupresif (Roitt *et al.*, 1998).

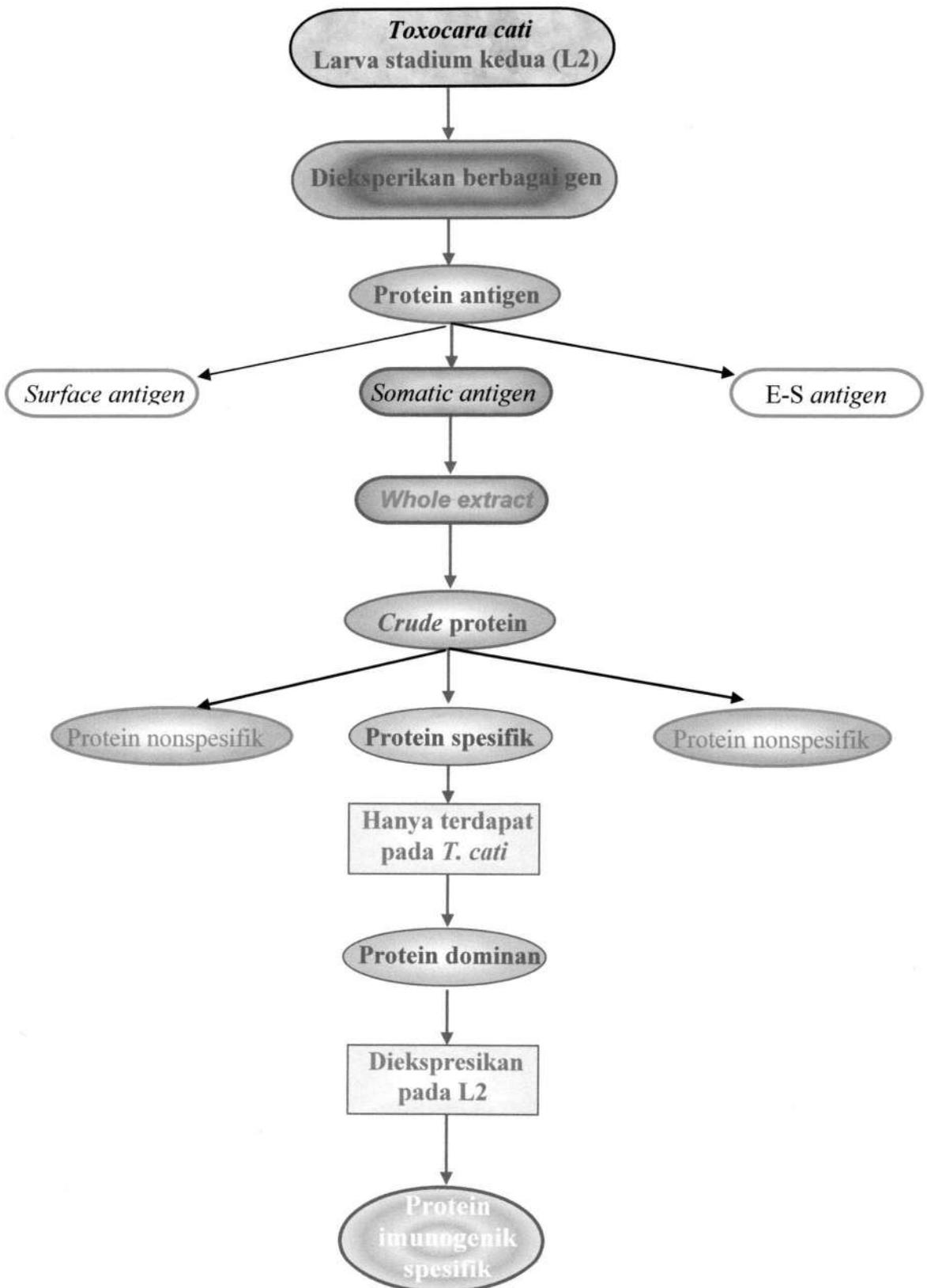
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Koseptual Penelitian

Cacing *T. cati* dalam siklus hidupnya mengalami beberapa generasi, yakni stadium telur, larva (terdiri dari L1, L2, L3 dan L4), dan cacing dewasa. Pada berbagai stadium tersebut diekspresikan berbagai gen yang mengkode sintesis berbagai protein. Adanya perbedaan gen penyandi menyebabkan perbedaan protein antigen yang terkandung dalam berbagai stadium *T. cati*. Oleh karena itu pengamatan terhadap protein antigenik cacing tersebut dapat dilakukan terhadap telur, larva (L1, L2, L3 dan L4), maupun cacing dewasa.

Dari berbagai stadium *T. cati*, L2 merupakan stadium infeksi yang dapat bermigrasi (larva migran) ke berbagai organ tubuh hospes. Oleh karena itu sangat memungkinkan L2 lebih dikenali perangkat imun tubuh hospes, sehingga dapat memicu terbentuknya antibodi lebih kuat. Hal ini telah dibuktikan oleh Kusnoto dkk. (2001), yang melakukan pemeriksaan antibodi terhadap *T. vitulorum* dengan uji ELISA, bahwa penggunaan homogenat L2 pada mencit memberikan nilai titer antibodi yang lebih tinggi dibanding jika digunakan antigen L1 maupun dewasa.

Protein antigen pada stadium larva dan dewasa dapat diperoleh dari: 1) antigen permukaan (*surface antigen*); 2) antigen internal yang dilepas pada saat pemangsaan, ekskresi ganti kulit dan berbiak (yaitu fraksi *excretory-secretory* atau *E-S antigen*); dan 3) residu antigen somatik (More, 1988). Penggunaan ekstrak larva infeksi (*whole extract*) sebagai sumber antigen, dengan *skin test* pada kerbau, menimbulkan respon imun humoral yang lebih tinggi dibanding antigen E-S (Starke *et al.*, 1996), namun penggunaan *crude extract* dari cacing *T. canis* menunjukkan reaksi silang dengan antibodi terhadap ascaris lain (Safar *et al.*, 1992). Oleh karena itu perlu dilakukan karakterisasi lebih lanjut terhadap ekstrak L2, untuk selanjutnya dapat diperoleh *purified protein*, sehingga spesifisitasnya (*spesific activity*) dapat ditingkatkan (Safar *et al.*, 1992; Abdel-Rahman, 2000).



Gambar 3.1 Skema konseptual penelitian.

3.2 Hipotesis Penelitian

Hipotesis yang diajukan pada penelitian ini adalah:

- 1) Larva kedua (L2) *Toxocara cati* mengandung protein antigenik.
- 2) Terdapat antigen dominan dari berbagai stadium *T. cati* untuk mengenali antibodi anti-L2 *Toxocara cati*.

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini berlangsung selama 6 bulan, sejak bulan Agustus 2002 hingga bulan Januari 2003. Isolasi cacing *T. cati* dari kucing penderita dan pemupukan telur untuk memperoleh larva stadium kedua dilaksanakan di Laboratorium Helminthologi Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga. Sonikasi spesimen cacing dewasa *T. cati*, *Fasciola sp*, *Diphylidium caninum*, dan L2 *T. cati* dilaksanakan di Laboratorium *Intestinal Parasite, Tropical Disease Center*, Universitas Airlangga. Adapun analisis protein dengan teknik SDS-PAGE, karakterisasi protein dengan teknik *Western blot* dan isolasi protein dengan teknik elektroforesis dilaksanakan di Laboratorium *Tissue Culture, Tropical Disease Center*, Universitas Airlangga dan Laboratorium Biologi Molekuler, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga.

4.2 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksploratif laboratorik, yaitu untuk mendiskripsikan tentang protein imunogenik larva stadium kedua *T. cati* isolat lokal. Penelitian ini dimaksudkan untuk menjawab pertanyaan: apakah L2 *T. cati* mengandung protein imunogenik yang mempunyai spesifisitas tinggi? Oleh karena itu penelitian ini termasuk penelitian diskriptif (Zainuddin, 2000).

4.3 Definisi Operasional

Isolat lokal adalah adalah cacing *Toxocara cati* yang diperoleh dengan cara mengisolasi *T. cati* dewasa dari kucing penderita di Surabaya. Adapun yang dimaksud dengan L2 adalah larva cacing *Toxocara cati* yang diperoleh dengan cara melakukan pemupukan telur cacing *T. cati* pada media PBS. Telur cacing diperoleh dari *T. cati* dewasa yang diinkubasi pada suhu 37°C dan diisolasi dari feses kucing penderita toxocariasis dengan teknik *preparation of gradients* (DrenchRite, 1996).

4.4 Bahan Penelitian

4.4.1 Unit analisis

Unit analisis dalam penelitian ini adalah larva stadium kedua *T. cati* hasil pemupukan telur cacing *T. cati* pada media *phosphate buffer saline* (PBS). Telur cacing diperoleh dari feses kucing penderita dan cacing dewasa yang diisolasi dari kucing penderita toxocariasis di Surabaya.

4.4.2 Hewan percobaan

Hewan percobaan yang digunakan pada penelitian ini adalah kucing liar dan kelinci ras Australia jantan umur kurang lebih 3 bulan sebanyak dua ekor. Kucing liar diperoleh dari wilayah Surabaya untuk diambil fesesnya dan dilakukan pembedahan untuk memperoleh cacing dewasa. Kelinci ras Australia diperoleh dari Batu Malang digunakan untuk pembuatan antibodi poliklonal.

4.4.3 Bahan uji laboratorium

Bahan kimia yang digunakan adalah: amonium persulfat, AgNO_3 , *citroen acid*, *fast red*, polyacrylamid, Natrium N-lauroilsarkosin, sodium dedoxil sulfat (SDS), TEMED, NP40, K-proteinase, Tris-HCl, *bovine serum albumin* (BSA), sukrosa, alkohol 70%, PBS, akuades, air destilasi, formalin 10% dan 1%, dan chloroform.

Bahan lain yang digunakan adalah *conjugate* Ig G *anti-rabbit*, kertas *nitrocellulose*, adjuvan vaksin yaitu *complete Freund's adjuvant* dan *incomplete Freund's adjuvant*.

4.5 Instrumen Penelitian

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini adalah sebagai berikut: *elektroforesis equipment* (SDS-PAGE), inkubator, *rapid trans-blot*, two dimension, dan ultrasentrifus berpendingin 4°C, sentrifus 5000 rpm, *sput disposable* berbagai ukuran,

gunting, skalpel, pinset, petridish, gelas beker berbagai ukuran, tabung sentrifus, filter 25 μm , 120 μm dan 150 μm , water bath, pipet eppendorf berbagai ukuran, pipet pasteur, mikroskop cahaya, mikroskop inverted dan *autoclave*.

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1 Isolasi cacing *Toxocara cati*, *T. vitulorum* dan *F. gigantica*

a. Isolasi cacing dewasa dan telur cacing *T. cati*

Cacing *T. cati* dewasa diisolasi dari anak kucing penderita toxocariasis, yang diperoleh dari Surabaya dengan teknik bedah saluran pencernaan. Setelah cacing diidentifikasi, kemudian diinkubasikan di dalam inkubator pada 37°C untuk memperoleh telur cacing. Untuk memenuhi kebutuhan L2 *T. cati*, juga dilakukan isolasi telur cacing dari feses kucing penderita.

b. Isolasi cacing dewasa dan telur *T. vitulorum*

Cacing *T. vitulorum* dewasa diisolasi dari feses anak sapi (pedet) penderita toxocariasis yang sebelumnya diberi obat piperasin sitrat. Setelah cacing diidentifikasi kemudian dibersihkan dengan PBS, selanjutnya disiapkan untuk proses pembuatan *whole extract*. Sebagian cacing *T. vitulorum* dewasa yang diperoleh dibedah dan diambil uterusnya untuk mendapatkan telur cacing. Untuk memenuhi kebutuhan L2 *T. vitulorum*, juga dilakukan isolasi telur cacing dari feses pedet penderita.

c. Isolasi cacing dewasa *F. gigantica*

Cacing *F. gigantica* diperoleh dari Rumah Potong Hewan Surabaya. Setelah cacing dewasa tersebut diidentifikasi kemudian dibersihkan dengan PBS, selanjutnya disiapkan untuk proses pembuatan *whole extract*.

d. Isolasi larva stadium kedua (L2) *T. cati* dan *T. vitulorum*

Telur cacing yang diperoleh dari cacing *T. cati* dewasa dan feses penderita tersebut kemudian dimurnikan dengan teknik *preparation of gradients* (DrenchRite, 1996). Selanjutnya telur cacing diidentifikasi, kemudian dipupuk dalam media PBS pada suhu kamar selama 28 hari untuk memperoleh L2.

4.6.2 Pembuatan *whole extract*

a. Pembuatan ekstrak L2 *T. cati* dan *T. vitulorum*

Hasil isolasi berupa L2 *T. cati* dan *T. vitulorum* kemudian dihancurkan dengan sonikasi 3x30 detik serta dipusingkan pada 5.000 rpm selama 5 menit. Supernatan diambil, ditambahkan etanol sama banyak dan dipusingkan kembali pada 35.000 rpm selama 30 menit. Pelet selanjutnya disimpan untuk bahan analisis protein maupun untuk karakterisasi protein.

b. Pembuatan ekstrak cacing dewasa *T. cati*, *T. vitulorum* dan *F. gigantica*

Hasil isolasi berupa cacing *T. cati*, *T. vitulorum* dan *F. gigantica* dihancurkan dengan mortir secara manual, kemudian dilakukan sonikasi 3x30 detik serta dipusingkan pada 5.000 rpm selama 5 menit. Supernatan diambil, ditambahkan etanol sama banyak dan dipusingkan kembali pada 35.000 rpm selama 30 menit. Pelet selanjutnya disimpan untuk uji reaksi silang pada karakterisasi protein dengan teknik *Western blot*.

4.6.3 Pembuatan antibodi poliklonal

Antibodi poliklonal dibuat dengan jalan menginjeksikan ekstrak L2 (hasil isolasi) pada kelinci ras Australia jantan sebanyak dua ekor. Imunisasi awal diberikan sebanyak 200 µg/ml protein L2 *T. cati* dengan penambahan *complete Freund's adjuvant* sama banyak. *Booster* dilakukan tiga kali, selang waktu 2 minggu dengan dosis 200 µg/ml

protein L2 *T. cati* dengan penambahan *incomplete Freund's adjuvant* sama banyak. Dua minggu setelah *booster* terakhir darah kelinci diambil masing-masing sebanyak 5-10 ml, kemudian disentrifugasi pada 2000 rpm selama 5 menit untuk mendapatkan serumnya. Pembuatan antibodi poliklonal digunakan untuk proses *blotting*, direaksikan dengan protein dari L2 *T. cati* dan *T. vitulorum*, cacing dewasa *T. cati*, *T. vitulorum* dan *F.gigantica* sehingga dapat dikarakterisasi derajat antigenesitas dan imunogenesitasnya maupun reaksi silang dengan cacing dewasa dan cacing lain.

4.6.4 Analisis protein

Pelet hasil penghancuran L2 kemudian dilisiskan dengan *buffer lisis* dan dilakukan SDS-PAGE. Protein kemudian ditransfer pada kertas nitroselulose dan selanjutnya dilakukan *blotting* (Rantam, 1997).

a. SDS-PAGE (*Polyacrylamid gel electrophoresis*)

Analisis protein terhadap L2 *T. cati* dilakukan dengan teknik *sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) dengan komposisi *separating gel* 12% (2,5 ml acrylamide; 1,2 ml Tris-HCl pH 8,8; 1,2 ml SDS 0,5%; 1,1 ml aquadest, 50 µl Temed dan 30 µl APS 10%) dan *stacking gel* 12% (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 dimasukan *comb* dan ditunggu sampai betul-betul *set*. *Plate* berisi gel kemudian dipasang pada Minigel Twin G-42 slab dan dituangkan *electrophoresis buffer* (30,29 g Tris aminomethan; 144,13 g glisin; 10 g SDS dalam 1000 ml aquadest).

Sebanyak 15 μ l sampel berupa ekstrak L2 *T.cati* maupun *T.cati* dewasa ditambah *Lamml buffer* sama banyak. Kemudian sampel didenaturasi dengan *Lamml buffer* (Tris-HCl pH 6,8 1,0 ml, gliserin 0,8 ml, SDS 10% 1,6 ml, bromfenolblue 0,5% 0,4 ml, merkaptoetanol 5% 50 μ l, 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 3 tahap, yaitu: 1) Pencucian pertama, menggunakan 25 ml metanol 50%, 3,75 ml asam asetat 7,5% dan 71,25 ml aquadest selama 30 menit; 2) Pencucian kedua, menggunakan 2,5 ml metanol 5%, 3,75 ml asam asetat 7,5% dan 93,75 ml aquadest selama 20 menit; dan 3) Pencucian ketiga, menggunakan glutaraldehida 10% selama 25 menit. Gel kemudian diwarnai dengan teknik pewarnaan silver (1,6 g AgNO₃ dalam 8 ml aquadest; 42 ml NaOH 0,36%; 2,8 ml NH₃ 25% dalam 147 ml aquadest) selama 15 menit, dilanjutkan pencucian 2 kali 2 menit dengan 100 ml aquadest dan kemudian ditambahkan larutan pengembang warna (200 μ l asam sitrat 5%; 100 μ l formaldehid 37% dalam aquadest 200ml) dan dilakukan pencucian kembali selama 2 kali 2 menit dengan 100 ml aquadest. Setelah gel terwarnai kemudian dimasukkan dalam larutan asam asetat 10% untuk menghentikan proses pengecatan. Selanjutnya gel dapat disimpan pada larutan gliserin 10% (Harlow dan Lane, 1988).

b. Semi-dry blotting

Protein dari gel kemudian ditransfer ke membran nitroselulosa (PVDF) dengan cara memotong kertas Whatman dan PVDF sesuai dengan besarnya gel. Enam

sheets kertas absorben pada anoda bufer I dan 3 *sheets* pada anoda bufer II dan 6 *sheets* pada katoda bufer.

Membran PVDF di inkubasikan pada anoda bufer II selama 5 menit kemudian disusun 6 *sheets* kertas absorben dari bufer I, 3 *sheets* dari bufer II, PVDF, poliakrilamid dan 6 *sheets* kertas absorben dari katoda bufer. Selanjutnya diberi aliran listrik dengan $0,8 \text{ mA/cm}^2$ dari gel. Setelah protein ditransfer, PVDF dicuci dengan aquadest selama 10 menit dan larutan TBS selama 10 menit yang selanjutnya dilakukan *blotting*.

c. *Blotting*

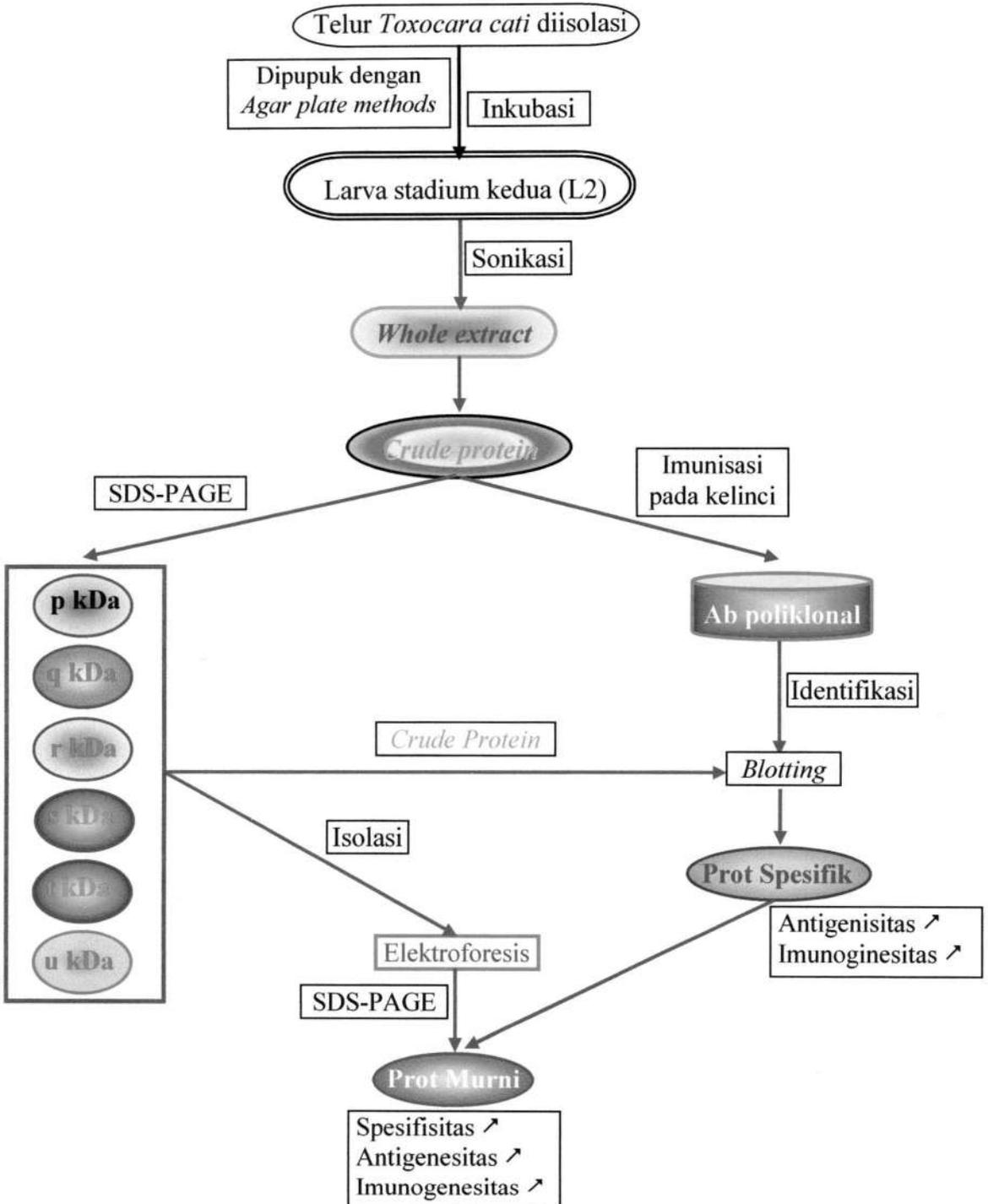
PVDF *blot* diblok dengan 10 % BSA kemudian dicuci dengan larutan TBS dua kali. Direaksikan dengan antibodi poliklonal. PVDF diinkubasi pada suhu ruang, dicuci dengan larutan TBS tiga kali, kemudian ditambahkan konjugat *anti-rabbit* yang dilabel alkalin fosfatase dan substrat 4-NPP dan diwarnai dengan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

4.6.5 Isolasi protein dengan preparasi gel elektroforesis

Gel silinder dimasukkan melalui sistem selang dan protein eluinsi di-*transport* sampai bawah membran dialisa. Selanjutnya sampel dicampur dengan *Laemmli bufer*. Untuk gel pemisah protein digunakan konsentrasi 17% acrylamid kemudian dibiarkan polimerisasi pada suhu ruang. Setelah itu ditambahkan acrylamid 4 %, kemudian 200 μl sampel dimasukkan. Arus listrik yang dipakai 99,9 Volt, 50 mA dan 12 W dan selanjutnya protein ditampung pada 125 tabung 4 ml dan jika sudah bereaksi sampai bawah, maka koleksi protein dihentikan. Selanjutnya protein ditaruh pada suhu 4°C dan dilakukan analisis protein lagi secara biokimiawi (Rantam, 1997).

4.7 Skema Prosedur Penelitian

Untuk memperjelas gambaran penelitian secara keseluruhan dapat dilihat pada Gambar 4.1.

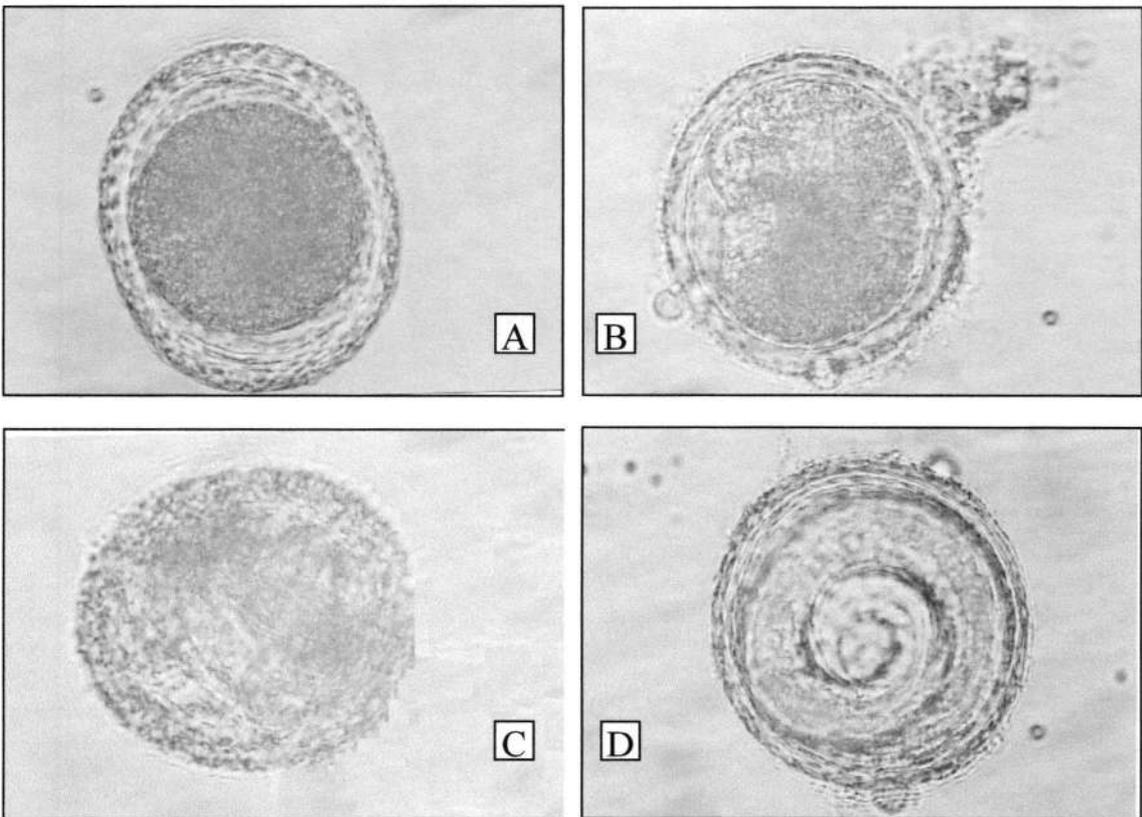


Gambar 4.1 Skema prosedur penelitian.

BAB 5 HASIL DAN ANALISIS PENELITIAN

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

Untuk memperoleh L2 *T. cati* pada penelitian ini dilakukan isolasi telur cacing baik dari inkubasi cacing dewasa maupun dari feses kucing penderita toxocariasis. Telur kemudian dimurnikan dari jaringan dan feses dengan metode preparasi gradien, selanjutnya dipupuk dalam petridish berisi media PBS pada suhu kamar. Perkembangan telur hingga mencapai L2 diikuti dengan memeriksa dengan mikroskop inverted (M=100x dan 400x). Dua puluh delapan hari pasca pemupukan dilakukan pemanenan L2, seperti tampak pada Gambar 5.1.



Gambar 5.1 Hasil identifikasi telur cacing *T. cati* dan perkembangannya hingga mencapai L2. M=400x, A=1 sel, B= gastrula, C=L1, dan D=L2.

5.2 Pembuatan Ekstrak (*Whole Extract*) L2

Pembuatan ekstrak L2 dilakukan dengan sonikasi dengan waktu 3 kali 30 detik. Setelah dilakukan sonikasi, ekstrak L2 kemudian disentrifugasi pada kecepatan 2000 rpm selama 5 menit, kemudian supernatan dan pelet dipisahkan. Pelet kemudian dikumpulkan dan dilakukan sonikasi ulang, ternyata setelah diperiksa secara mikroskopis hasilnya jauh lebih baik, dalam arti L2 yang hancur lebih banyak yaitu lebih dari 95%.

Setelah ekstrak diperoleh dilakukan pengukuran kadar protein dengan teknik elektrochromatografi. Hal ini terutama dilakukan terhadap ekstrak yang menunjukkan hasil baik pada analisis protein dengan *sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE). Hasil yang diperoleh adalah sebesar 206,5 µg/ml, hasil pengukuran kadar protein ini digunakan sebagai dasar penentuan dosis imunisasi pada pembuatan antibodi poliklonal dan pengenceran antigen pada uji ELISA.

5.3 Produksi Antibodi Poliklonal Anti-L2 *T. cati* pada Kelinci

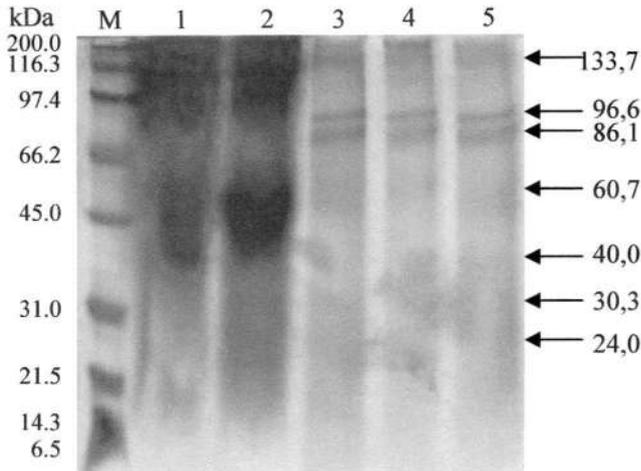
Untuk mengetahui imunogenisitas protein antigen L2 *T. cati* dan memenuhi kebutuhan antibodi anti-L2 *T. cati* yang akan digunakan pada proses karakterisasi protein dengan teknik *Western blot*, maka dilakukan imunisasi pada kelinci sebanyak empat kali. Setelah delapan minggu pasca-imunisasi pertama dilakukan pengambilan darah kelinci dan dilakukan pemisahan serum dengan sentrifugasi pada 2000 rpm selama 5 menit. Serum yang didapat ditera terhadap kadar antibodinya dengan teknik *indirect-ELISA* menggunakan konjugat Ig G anti-*rabbit* yang dinyatakan dengan nilai *optical density* (OD) seperti terlihat pada Tabel 5.1.

Tabel 5.1 Nilai *Optical Density* Serum Kelinci Sebelum dan Sesudah Dipapar dengan Protein Antigen L2 *T. cati*

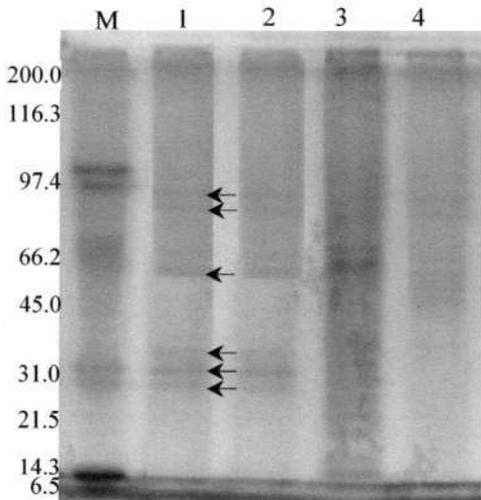
No. Kelinci	Nilai OD	
	Sebelum	Sesudah
1	0,124	1,596
2	0,216	1,600

5.4 Analisis Protein L2 *T. cati*

Untuk mengetahui berat molekul (BM) protein antigen L2 *T. cati*, dilakukan preparasi protein dengan teknik SDS-PAGE. Hasil analisis protein selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 5.2 pada *running* pertama dan Gambar 5.3 pada *running* kedua.



Gambar 5.2 Hasil analisis protein L2 *T. cati* dengan SDS-PAGE. M, marker; kolom 1-2, ekstrak cacing dewasa; kolom 3-5, ekstrak L2 *T. cati*.



Gambar 5.3 Hasil analisis protein L2 *T. cati* dengan SDS-PAGE. M, marker; kolom 1-2= ekstrak L2 *T. cati*; kolom 3, ekstrak cacing dewasa *T. cati*; kolom 4, protein antigen E-S cacing dewasa *T. cati*.

Gambar 5.2 dan 5.3 menunjukkan hasil preparasi protein L2 *T. cati*, yaitu didapatkan tujuh pita protein. Untuk menentukan BM ketujuh protein tersebut dilakukan perhitungan menggunakan linier regresi antara nilai Rf dan log BM (Da) (Lampiran 1). Pita protein pertama terletak antara marker dengan BM 116,3-200 kDa, yaitu pada BM 133,7 kDa. Dua pita protein berikutnya terletak antara marker dengan BM 66,2-97,4 kDa, masing-masing pada BM 96,6 kDa dan 86,1 kDa. Pita protein keempat berada di antara marker dengan BM 45,0-66,2 kDa, yaitu pada BM 60,7 kDa. Pita protein kelima berada di antara marker dengan BM 31,0-45,0 kDa, yaitu pada BM 40,0 kDa. Pita protein keenam hampir berimpit dengan marker pada BM 31,0 kDa, yaitu pada BM 30,3 kDa. Paling bawah terdapat pita protein ketujuh yang terletak di antara marker dengan BM 21,5-31,0 kDa, yaitu pada BM 24,0 kDa. Dari ketujuh jenis protein tersebut protein dengan BM 96,6 dan 86,1 kDa terlihat lebih dominan di antara protein lainnya, sementara protein lainnya terlihat diekspresikan dengan bentuk yang lebih tipis dan intensitas warna yang berkurang. Untuk memperjelas hasil preparasi protein ini dapat dilihat Tabel 5.2.

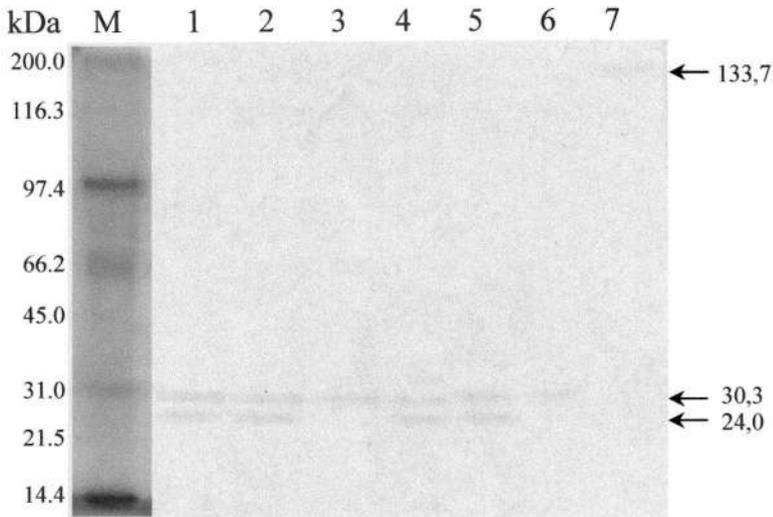
Tabel 5.2 Hasil Perhitungan Berat Molekul Protein Antigen L2 *T. cati* dengan teknik SDS-PAGE

PP* ke	Jarak pada gel	Nilai Rf	y** Da (dari regresi linier)	Antilog y	BM (kDa)
1	0,30 cm	0,050	5,126	133659,55	133,7
2	1,00 cm	0,167	4,985	96605,09	96,6
3	1,25 cm	0,208	4,935	86099,38	86,1
4	2,00 cm	0,333	4,783	60673,63	60,7
5	2,90 cm	0,483	4,602	39994,48	40,0
6	3,50 cm	0,583	4,481	30269,13	30,3
7	4,00 cm	0,667	4,380	23988,33	24,0

*PP = Pita protein; **Persamaan regresi: $y = 5,187 - 1,211 x$, di mana x = nilai Rf

5.5 Karakterisasi Protein

Hasil identifikasi protein dengan teknik *Western blot* menggunakan antibodi poliklonal anti-L2 *T. cati* dapat dikarakterisasi masing-masing protein yang telah berhasil dipreparasi seperti tampak pada Gambar 5.4.



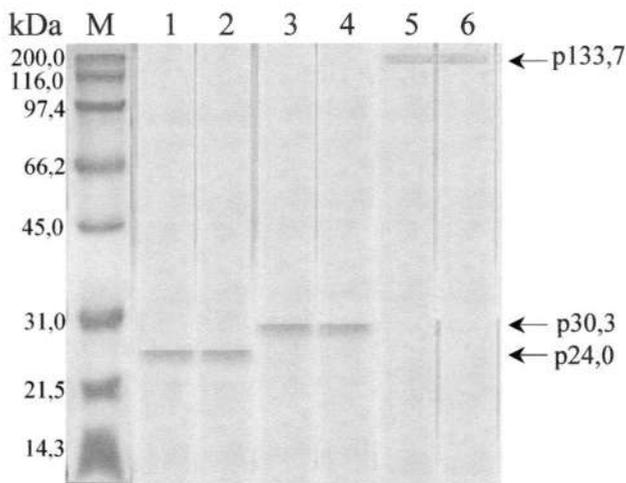
Gambar 5.4 Hasil analisis protein terhadap antibodi poliklonal anti-L2 *T. cati* dengan teknik *Western blot*. M, marker; kolom 1-2, ekstrak L2 *T. cati*; kolom 3, ekstrak cacing dewasa *T. cati*; kolom 4-5, ekstrak L2 *T. vitulorum*; kolom 6, ekstrak cacing dewasa *T. vitulorum*; dan kolom 7, ekstrak cacing dewasa *F. gigantica*.

Pada Gambar 5.4 terlihat bahwa pita reaksi antibodi poliklonal anti L2 *T. cati* terhadap berbagai antigen cacing yang digunakan, didapatkan tiga pita reaksi. Pita reaksi pertama terjadi pada protein dengan BM 133,7 kDa, menggambarkan pita reaksi silang antara protein serum anti L2 *T. cati* dengan antigen cacing dewasa *F. gigantica*. pita reaksi kedua terjadi pada protein dengan BM 30,3 kDa, menggambarkan pita reaksi antara protein serum anti L2 *T. cati* dengan antigen L2 *T. cati* dan L2 *T. vitulorum* maupun antigen cacing dewasa *T. cati* dan *T. vitulorum*. Pita reaksi terakhir terjadi pada protein dengan BM 24,0 kDa yang menggambarkan pita reaksi antara protein serum anti L2 *T. cati* dengan protein antigen L2 *T. cati* maupun L2 *T. vitulorum*.

Berdasarkan hasil tersebut dapat dinyatakan bahwa protein dengan BM 24 kDa merupakan protein spesifik terhadap protein antigen stadium larva *T. cati* maupun *T. vitulorum* khususnya adalah L2. Adapun protein dengan BM 30,3 kDa kemungkinan merupakan antigen dominan yang dapat mengenali antibodi anti *T. cati* dan *T. vitulorum* pada berbagai stadium. Oleh karena itu dapat dinyatakan bahwa protein antigen L2 dengan BM 24,0-30,3 kDa merupakan protein spesifik yang dapat dimanfaatkan sebagai antigen diagnostik sesuai kebutuhan.

5.6 Analisis Protein dari Hasil Elusi

Berdasarkan hasil preparasi protein dengan teknik SDS-PAGE telah dilakukan isolasi protein, kemudian masing-masing hasil isolasi dilakukan SDS-PAGE kembali. Hasil analisis protein antigen L2 *T.cati* yang difokuskan pada protein dengan BM 133,7 kDa, 30,3 kDa dan 24,0 kDa ditampilkan pada Gambar 5.5.



Gambar 5.5 Analisis SDS-PAGE hasil isolasi protein antigenik L2 *Toxocara cati*. M, marker; Kolom 1 dan 2, p133,7; kolom 3-4, p30,0; dan kolom 5-6, p24,0.

Pada Gambar 5.4 protein dengan BM 30,3 kDa tampak lebih dominan dibanding protein yang lain, kemudian diikuti protein dengan BM 24,0 kDa, sedangkan protein

dengan BM 133,7 kDa tampak diekspresikan paling tipis. Perbedaan ini menunjukkan perbedaan secara genetik di antara ketiga protein tersebut, karena meskipun berat molekul sama tetapi bila ekspresinya terdapat perbedaan, maka secara genetik terdapat perbedaan pula.

BAB 6 PEMBAHASAN

6.1 Isolasi Larva Kedua (L2) *Toxocara cati*

Larva kedua *T. cati* pada penelitian diperoleh dengan melakukan pemupukan telur cacing *T. cati*. Telur cacing diperoleh dengan jalan melakukan isolasi baik dari inkubasi cacing dewasa maupun dari feses kucing penderita toxocariasis, kemudian dimurnikan dengan metode preparasi gradien (DrenchRite, 1996).

Pengamatan telur dilaksanakan hingga mencapai L2 yang diperjelas dengan pemeriksaan mikroskopik menggunakan mikroskop inverted pada perbesaran 100 x dan 400 x. Dua puluh delapan hari pasca-pemupukan dilakukan pemanenan L2. Perkembangan telur hingga mencapai L1 membutuhkan waktu 7-8 hari, sedangkan L2 terbentuk pada hari ke-21 hingga hari ke-28. Telur cacing dinyatakan infeksiif apabila telur tersebut sudah berisi L2 hidup, yang perkembangannya dipengaruhi oleh keadaan lingkungan misalnya suhu dan kelembaban (Levine, 1978; Kusumamihardja, 1986).

6.2 Kadar Protein *Whole Extract* L2 *T. cati*

Hasil pembuatan ekstrak L2 yang dilakukan dengan sonikasi selama 3 kali 30 detik menunjukkan tingkat penghancuran L2 yang masih rendah yaitu sekitar 75%. Hal ini tampak setelah dilakukan pemeriksaan dengan mikroskop pada pembesaran 400x. Oleh karena itu setelah dilakukan sonikasi, ekstrak L2 kemudian disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 5 menit, kemudian supernatan dan pelet dipisahkan. Pelet kemudian diresuspensi dengan PBS dan dilakukan sonikasi ulang, ternyata setelah diperiksa secara mikroskopis hasilnya jauh lebih baik, dalam arti L2 yang hancur lebih banyak yaitu lebih dari 95%.

Setelah ekstrak diperoleh dilakukan pengukuran kadar protein dengan teknik elektrokratografi. Kadar protein yang diperoleh dari pemeriksaan ekstrak tersebut adalah sebesar 206,5 µg/ml. Hasil ini digunakan sebagai dasar penentuan dosis

imunisasi pada pembuatan antibodi poliklonal dan pengenceran antigen pada uji ELISA. Namun karena kadar protein ini belum menunjukkan pita protein yang jelas maka dilakukan pemadatan dengan cara melakukan sentrifugasi dengan kecepatan 35.000 rpm pada 4°C selama 20 menit yang sebelumnya ditambahkan etanol dengan volume yang sama dan didiamkan. Pelet kemudian diambil dan diresuspensi dengan PBS sebanyak 1/10 volume semula atau menyesuaikan ketebalan pita protein yang terbentuk pada *running* pendahuluan.

Berdasarkan hasil pengamatan terhadap hasil *running* SDS-PAGE menunjukkan bahwa keberhasilan *running* tersebut dipengaruhi beberapa hal misalnya tingkat kemurnian isolat, kebersihan isolat, dan kadar protein dalam ekstrak. Isolat yang murni akan menghasilkan pita protein yang baik dan jelas sehingga dapat mempermudah analisis berat molekul (BM) pada pita yang terbentuk. Kebersihan isolat mempengaruhi kualitas pita protein yang terbentuk pada gel, pita terlihat tajam dengan gel yang terang, sehingga mempermudah analisis protein dan dokumentasi. Kadar protein ekstrak selain mempengaruhi kualitas pita yang terbentuk pada proses analisis maupun karakterisasi protein juga kecepatan pembentukan pita. Berdasarkan pengamatan yang dilakukan dari beberapa kali *running* analisis protein cacing, kadar protein yang cukup akan menghasilkan pita protein yang jelas dalam waktu yang cepat.

Kadar protein optimal untuk ekstrak cacing baik dalam bentuk telur, larva dan dewasa yang dapat menghasilkan pita yang baik adalah lebih dari 1000 µg/ml. Kadar protein yang cukup di samping memberikan hasil yang baik pada preparasi protein, juga lebih efisien saat melakukan imunisasi pada pembuatan antibodi poliklonal, karena pada imunisasi memerlukan tambahan konjugat komplet (inisiasi) dan inkomplet (*booster*) dengan perbandingan yang sama dengan volume ekstrak yang digunakan.

6.3 Produksi Antibodi Poliklonal Anti-L2 *T. cati* pada Kelinci

Penggunaan hewan coba kelinci untuk produksi antibodi poliklonal ini karena pemeliharaan dan *handling*-nya tergolong mudah, demikian pula saat pengambilan darah dapat diperoleh serum yang cukup. Kelinci ras Australia dipilih dengan pertimbangan daya tahannya lebih baik dibanding kelinci lokal dan pengambilan darah dapat dilakukan sebanyak 10 ml/ekor, sehingga diperoleh serum yang cukup untuk *blotting*. Berdasarkan penelitian pendahuluan penggunaan kelinci lokal sangat peka terhadap serangan scabies dan diare, sehingga kelinci tersebut mudah mati. Hal ini sangat merugikan terutama dari segi waktu karena harus mengulang imunisasi lagi.

Kualitas antibodi yang diperoleh sangat dipengaruhi oleh kualitas antigen yang digunakan, rute aplikasi, dosis protein, jumlah dan interval imunisasi. Protein yang lebih murni dengan kadar yang cukup akan memberikan hasil antibodi yang lebih baik. Walaupun kadar antibodi total cukup tinggi tetapi bila protein antigen yang digunakan kurang murni, biasanya pada proses *blotting* akan menghasilkan pita reaksi yang kurang jelas karena mengandung protein serum dan protein antigen yang tidak spesifik. Karena kadar protein spesifik tidak memenuhi ambang respon imun optimal, maka imunogenisitas protein tersebut tidak maksimal (Abbas *et al.*, 2000).

Pada penelitian ini aplikasi imunisasi dilakukan secara *subcutan* dengan harapan terbentuk depo protein yang dilepas secara bertahap (*gradual*), kemudian dilakukan *booster* dengan interval dua minggu sebanyak tiga kali sehingga respon imun terhadap pembentukan antibodi anti L2 *T. cati* dapat maksimal dan kadarnya terjaga dalam darah. Subowo (1993) menyatakan bahwa, respon imun suatu antigen bergantung pada dosis dan cara pemasukannya ke dalam tubuh. Biasanya apabila dosis minimal suatu antigen telah dilampaui, maka makin tinggi dosisnya akan meningkatkan respon imun secara sebanding, tetapi pada dosis tertentu akan terjadi sebaliknya yaitu respon imun menurun atau bahkan dapat hilang sama sekali, keadaan ini disebut toleransi imunologik.

6.4 Analisis Protein L2 *T. cati*

Hasil analisis protein untuk mengetahui berat molekul (BM) protein antigen larva kedua (L2) *T. cati* yang dilakukan dengan tehnik SDS-PAGE menunjukkan adanya tujuh macam pita protein masing-masing dengan BM 133,7 kDa, 96,6 kDa, 86,1 kDa, 60,7 kDa, 40,0 kDa, 30,3 kDa dan 24,0 kDa. Mengingat perhitungan menggunakan regresi linier dan kemungkinan perbedaan relatif dalam menentukan jarak pita protein maupun panjang dan awal pengukuran gel, maka kemungkinan ada beberapa pita portein yang memiliki sedikit perbedaan dengan peneliti lain, tetapi sebenarnya yang dimaksud adalah pita protein yang sama. Dari ketujuh jenis protein tersebut protein dengan BM 96,6 kDa dan 86,1 kDa terlihat lebih dominan di antara protein lainnya, sementara protein lainnya terlihat diekspresikan dengan bentuk yang lebih tipis dan intensitas warna yang berkurang. Hal ini menunjukkan perbedaan secara genetik di antara protein-protein tersebut. Tung *et al.* (1995) menyatakan bahwa, meskipun berat molekul sama tetapi bila ekspresinya terdapat perbedaan, maka secara genetik terdapat perbedaan pula. Namun demikian untuk mengetahui spesifisitas protein antigen tersebut masih memerlukan karakterisasi protein lebih lanjut.

Hasil analisis protein dengan teknik *Western blot* menunjukkan adanya beberapa pita protein yang sejajar baik pada L2 *T. cati*, L2 *T. vitulorum* maupun cacing dewasa *T. cati*, *T. vitulorum*, *F. gigantica* dan *D. caninum*. Beberapa pita protein yang sejajar pada beberapa cacing tersebut lebih banyak terjadi pada protein dengan BM yang tinggi (lebih dari 50 kDa), sedangkan pada L2 *T. cati* dan L2 *T. vitulorum* lebih banyak terjadi pada protein dengan BM rendah. Apabila dibandingkan dengan hasil penelitian Sri Subekti dkk. (2003) yang melakukan preparasi protein antigen L2 *T. vitulorum* dengan tehnik yang sama, tampak terdapat beberapa kemiripan protein antigen antara L2 *T. cati* dan L2 *T. vitulorum* serta cacing dewasa *T. cati* dan *T. vitulorum*. Kemiripan ini terjadi kemungkinan memang pada semua stadium selalu terdapat protein yang tetap di

samping beberapa protein lain yang berbeda. Hal ini sesuai dengan pendapat Patterson (1989) yang menyatakan bahwa, profil protein antigen pada setiap stadium kehidupan parasit pada umumnya mempunyai kesamaan ataupun perbedaan bergantung kepada tingkatan stadium hidupnya. Trisunuwati (1997) yang melakukan preparasi protein antigen berbagai stadium *T. vitulorum* menyatakan bahwa, protein antigen dengan BM 97 kDa pada L2, L3 dan dewasa mungkin berasal dari kutikula, hal ini diperkuat dengan kenyataan bahwa *Ascaris sp* dewasa juga mempunyai protein antigen dengan BM 97 kDa.

6.5 Karakterisasi Protein

Identifikasi protein pada penelitian ini dilakukan dengan teknik *Western blot*. Teknik tersebut digunakan untuk menentukan reaksi antara beberapa antigen dengan antibodi poliklonal dari serum darah kelinci yang sebelumnya diimunisasi dengan protein L2 *T. cati*, di samping itu juga dapat memberikan gambaran tentang imunogenisitas dan antigenesitas masing-masing protein yang telah berhasil dipreparasi dalam bentuk garis reaksi antigen-antibodi pada kertas nitroselulosa.

Hasil identifikasi protein dengan teknik *Western blot* menggunakan antibodi poliklonal anti L2 *T. cati* dapat ditentukan tiga macam protein. Ketiga protein tersebut antara lain dengan BM 133,7 kDa, 30,3 kDa, dan 24,0 kDa. Protein dengan BM 133,7 kDa menunjukkan pita reaksi silang antara serum anti L2 *T. cati* dan protein antigen cacing dewasa *Fasciola gigantica*. Hasil ini tampaknya memberi gambaran kemiripan protein antigen L2 *T. cati* dan L2 *T. vitulorum*, hal ini sesuai dengan hasil penelitian Abdel-Rahman and Megeed (2000) yang melakukan imunoblotting terhadap protein antigen *T. vitulorum* dinyatakan bahwa, antiserum *T. vitulorum* dikenali oleh antigen *F. gigantica* pada 109 kDa dan 133 kDa. Reaksi silang antara antibodi anti L2 *T. cati* dengan antigen cacing lain dapat terjadi karena sebagian besar jenis parasit sering kali mempunyai profil protein yang hampir sama, sehingga sering kali mengakibatkan reaksi

silang (Troncy, 1989). Namun pita reaksi silang yang terjadi tidak sebanyak kesamaan pita protein yang terdapat pada hasil analisis protein antara beberapa cacing yang berhasil dipreparasi. Hal ini sesuai dengan pendapat Harlow and Lane (1988) yang menyatakan bahwa, protein dengan BM yang sama tetapi apabila mempunyai epitop berbeda maka tidak terjadi ikatan dengan antibodi sehingga reaksi silang tidak terjadi.

Protein dengan BM 30,3 kDa menunjukkan pita reaksi antara serum anti L2 *T. cati* dengan protein antigen *T. cati* dan *T. vitulorum* baik dari L2 maupun cacing dewasanya. Hal ini menunjukkan bahwa kemungkinan protein antigen dengan BM 30,3 kDa mempunyai sifat imunogenisitas yang tinggi sehingga mampu memicu respon imun kelinci dalam membentuk antibodi. Teknik *Western blot* sangat membantu penentuan berat molekul antibodi dalam serum yang dapat berikatan dengan protein antigen. Ikatan yang terjadi memberi arti bahwa antibodi yang terbentuk sesuai dengan antigen yang digunakan dengan kata lain adanya garis ikatan antigen-antibodi pada protein tertentu dapat membuktikan bahwa protein tersebut bersifat antigenik dan imunogenik serta dapat terjadinya reaksi silang antar stadium maupun cacing lain. Sifat imunogenisitas protein ini menurut Abbas *et al.* (2000) sangat berkaitan dengan tingkat keasingan protein terhadap hospes, kelarutan, berat molekul dan konsentrasi protein. Adanya pita reaksi antar stadium yaitu antara anti serum anti L2 *T. cati* dengan cacing dewasa menunjukkan bahwa protein dengan 30,3 kDa merupakan protein antigen dominan yang mungkin dapat mengenal seluruh stadium *Toxocara sp.*

Protein dengan BM 24,0 kDa menunjukkan adanya pita reaksi antara serum anti L2 *T. cati* dengan protein antigen L2 *T. cati* dan L2 *T. vitulorum*, tetapi tidak terjadi reaksi dengan cacing dewasa *Toxocara sp* maupun cacing lain. Berdasarkan hasil tersebut dapat dinyatakan bahwa protein dengan BM 24,0 kDa merupakan protein spesifik terhadap protein antigen stadium larva *T. cati* maupun *T. vitulorum* khususnya adalah L2. Adapun protein dengan BM 30,3 kDa kemungkinan merupakan protein

antigen dominan yang dapat mengenali antibodi anti *T. cati* dan *T. vitulorum* pada berbagai stadium. Oleh karena itu dapat dinyatakan bahwa protein antigen L2 dengan BM 24,0-30,3 kDa merupakan protein spesifik yang dapat dimanfaatkan sebagai antigen diagnostik sesuai kebutuhan. Hal ini membuktikan bahwa dengan purifikasi protein antigen akan dihasilkan protein murni dengan aktivitas spesifik yang meningkat dibanding *crude extract* (Abdel-Rahman, 2000).

Adanya reaksi silang antara antibodi dari satu cacing dengan antigen cacing lain merupakan indikasi bahwa protein antigen tersebut kurang tepat digunakan sebagai bahan diagnostik karena protein tersebut mungkin memberikan hasil uji dengan sensitivitas tinggi tetapi akan memberikan hasil dengan spesifisitas yang rendah. Kondisi ini menyebabkan parasit tidak dapat terdeteksi dengan jelas (Cohen and Warren, 1993). Berdasarkan hasil analisis protein dengan teknik *Western blot* pada penelitian ini dapat dinyatakan bahwa, protein antigen L2 *T. cati* dengan BM sekitar 133,7 kDa, 30,3 kDa dan 24,0 kDa kemungkinan merupakan protein imunogenik dengan spesifisitas berbeda, yang dapat dimanfaatkan sesuai kebutuhan. Protein dengan BM 24,0 kDa merupakan protein spesifik yang dapat dimanfaatkan sebagai bahan diagnostik toxocariasis untuk protein dengan spesifisitas tinggi dan bahan imunogen pada pembuatan antibodi monoklonal baik untuk tujuan diagnostik yang sangat spesifik maupun kandidat vaksin. Adapun protein imunogenik yang mempunyai reaksi silang dengan cacing lain stadium dan lain spesies misalnya protein dengan BM 133,7 kDa dan 30,3 kDa dapat dikembangkan menjadi protein imunogen pada proses pembuatan vaksin.

6.6 Analisis Protein dari Hasil Elusi

Untuk mendapatkan protein murni dengan spesifisitas, imunogenisitas dan antigenisitas tinggi telah dilakukan isolasi protein berdasarkan hasil preparasi protein dengan teknik SDS-PAGE dan karakterisasi protein dengan teknik *Western blot*. Untuk memastikan keberadaan protein murni tersebut dilakukan SDS-PAGE kembali terhadap

masing-masing protein hasil isolasi dari L2 *T. cati*. Analisis protein antigen L2 *T. cati* pada tahap ini difokuskan pada protein dengan BM 133,7 kDa, 30,3 kDa dan 24,0 kDa sesuai dengan hasil karakterisasi berbagai protein antigen (L2 *T. cati* dan *T. vitulorum* maupun cacing dewasanya serta cacing dewasa *F. gigantica* dan *D. caninum*) terhadap antibodi anti L2 *T. cati*. Hasil analisis protein hasil elusi pada penelitian ini menunjukkan bahwa protein dengan BM 30,3 kDa tampak lebih dominan dibanding protein dengan BM 133,7 kDa maupun 24,0 kDa. Perbedaan ini menunjukkan perbedaan secara genetik di antara protein-protein tersebut, karena meskipun berat molekul sama tetapi bila ekspresinya terdapat perbedaan, maka secara genetik terdapat perbedaan pula (Tung *et al.*, 1995).

Berdasarkan hasil penelitian ini fraksi protein antigen dengan BM 30,5 kDa berpeluang untuk digunakan sebagai bahan diagnostik toxocariasis baik pada hospes definitif maupun hospes aberan. Adapun protein antigen dengan BM 24,0 kDa hanya berpeluang untuk digunakan sebagai bahan diagnostik spesifik terhadap toxocariasis yang terdapat pada hospes aberan, karena pada hospes ini tidak dapat dijumpai cacing dewasa. Spesifisitas tertinggi terdapat pada protein serum anti L2 *T. cati* dengan BM 24,0 kDa yang spesifik terhadap protein antigen L2 *T. cati* dan L2 *T. vitulorum*. Hasil ini sesuai dengan hasil penelitian Safar *et al.* (1992) yang menyatakan bahwa, penggunaan *crude extract* dari cacing *T. canis* yang menunjukkan reaksi silang dengan antibodi terhadap *A. vitulorum* dan *A. lumbricoides*, tetapi reaksi silang tidak terjadi bila menggunakan *partially purified antigen*. Abdel-Rahman (2000) menyatakan bahwa, purifikasi protein antigen akan meningkatkan spesifisitas dibanding dengan *crude extract*. Dinyatakan pula bahwa, isolat fraksi protein yang didapatkan mempunyai potensi untuk digunakan sebagai bahan diagnostik dengan angka sensitivitas sebesar 100%. Bahkan Bowman *et al.* (1987) menyatakan, bahwa untuk mendapatkan uji yang lebih spesifik pada diagnosis *visceral* dan *ocular larvae migrans* akibat toxocariasis dapat dicapai dengan penggunaan antibodi monoklonal anti *T. canis* dan *T. cati* sebagai

bahan uji. Lebih lanjut dinyatakan oleh Barriga and Omar (1992) bahwa, kemungkinan empat protein antigen dari telur berembrio (mengandung L2 *T. vitulorum*) dengan BM antara 32,5-41,0 kDa mempunyai hubungan dengan proteksi pada hospes. Berarti protein tersebut berpotensi sebagai bahan imunogen pada pembuatan vaksin.

BAB 7 **KESIMPULAN DAN SARAN**

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan beberapa sebagai berikut:

- 1) Larva stadium kedua (L2) *Toxocara cati* mengandung protein antigenik, yaitu pada BM 24,0 kDa dan BM 30,3 kDa.
- 2) Didapatkan antigen dominan, yaitu protein dengan BM 30,3 kDa, merupakan antigen dari berbagai stadium *T. cati* yang dapat mengenali antibodi anti-L2 *T. cati*.

7.2 Saran

Saran yang diajukan berdasarkan hasil penelitian ini adalah:

- 1) Untuk bahan diagnostik toxocariasis pada hospes aberan yang hanya ditemukan parasit cacing dalam stadium larva dapat digunakan protein antigen L 2 *T. cati* dengan BM 24,0 kDa, sedangkan protein dengan BM 30,3 kDa dapat digunakan pada hospes definitif maupun hospes aberan.
- 2) Perlu dilakukan uji lanjutan mengenai imunogenesitas dan antigenesitas terhadap masing-masing protein murni yang telah berhasil diisolasi baik secara laboratorik maupun uji lapang.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. 2000. Cellular and Molecular Immunology. 4th ed. Philadelphia Saunders Company.
- Abdel-Rahman EH. 2000. Isolation and structural characterization of *Toxocara vitulorum* specific antigen and its potency in diagnosis of toxocariasis among buffalo calves. J. Egypt. Soc. Parasitol. 30(2):387-400
- Abdel-Rahman EH and Abdel-Megeed KN. 2000. Molecular identity of major cross-reactive adult antigens in *Fasciola gigantica*, *Toxocara vitulorum* and *Moniezia expanza*. Abstract. J. Egypt. Soc. Parasitol. 30(2): 561-71
- Abdel-Rahman EH, Abdel-Megeed KN, and Hassanain MA. 2000. Structural characterization dan immunocatalization of egg antigens cross-react with *Toxocara vitulorum*, *Fasciola gigantica* and *Moniezia expanza*. Abstract. J. Egypt. Soc. Parasitol. 30(2): 581-91
- Ajayi OO, Duhlińska DD, Agwale SM, Njoku M. 2000. Frequency of human toxocariasis in Jos, Plateau State, Nigeria. Mem. Inst. Oswaldo Cruz; 95(2): 147-9
- Alonso JM, Bojanich MV, Chamarro M, Gorodner JO. 2000. Toxocara seroprevalence in children from a subtropical city in Argentina. Abstract. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 42(4): 235-7
- Amerasinghe PH, Rajapakse RP, Lloyd S, Fernando ST. 1992. Antigen-induced protection against infection with *Toxocara vitulorum* larvae in mice. Parasitol. Res. 78(8):643-7
- Amin HI, McDonald HR, Han DP, Jaffe GJ, Johnson MW, Lewis H, Lopez PF, Mieler F, Neuwirth J, Sternberg P Jr, Werner JC, Ai E, Johnson RN. 2000. Vitrectomy update for macular traction in ocular toxocariasis. Retina. 20(1):80-5
- Anders RF., Howard RJ, and Mitchell GF. 1982. Parasitic and methods of analysis. In: Immunology of Parasit Infections. Oxford, Blackwell Scientific Publication. pp: 529-539
- Bambell FWR. 1970. Transmission of passive immunity from mother to young. Amsterdam: North Holland Publishing & Co. pp: 158-159.
- Baratawidjaja KG. 2000. Imunologi Dasar. Jakarta, Balai Penerbit FKUI.
- Barriga OO, and Omar HM. 1992. Immunity to *Toxocara vitulorum* repeated infections in a rabbit model. Vet. Immunol. Immunopathol. 33(3):249-60
- 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.
- Bowman DD, Mika-Grieve M, and Grieve RB. 1987. Toxocara canis: monoclonal antibodies to larval excretory-secretory antigens that bind with genus and species specificity to the cuticular surface of infective larvae. Exp. Parasitol. 64(3): 458-65

- Castillo D, Paredes C, Zanartu C, Castillo G, Mercado R, Munoz V, Schenone H, 2000. Environment contamination with *Toxocara* sp eggs in public squares and parks from Santiago, Chile, 1999. *Bol. Chil. Parasitol.* 55(3-4): 86-91
- Chappell H, Haeney M. 1992. *Essential of Clinical Immunology*. Mellbouerne. pp. 65
- Cohen S, Warren KS, 1982. *Immunology of parasitic infections*. 2nd Ed. Melbourne, Blackwell Sci. Publ. pp. 284-285
- David ED, Lindquist WD, 1982. Determination of the specific gravity of certain helminth eggs using sucrose density gradient centrifugation. *J. Parasitol.* 68(5): 916-919
- de Savigny, D. 1980. The cummunication of ELISA data from laboratory to clinician. *J. of Immunoassay.* 1(1): 105-128.
- DrenchRite. 1996. *Larval Development Assay*. A product of Csiro reseach. Horizon Technology Pty Limited. Roseville, Australia.
- el-Massry AA. 1999. Characterization of antigenic property of *Toxocara canis* and *Toxascaris leonine* adults and larvae through immunodiagnostic electrophoresis (SDS-PAGE) and western blot technique. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 29(2): 335-45
- Fonrouge R, Guardis MV, Radman NE, and Archelli SM. 2000. Soil contamination with *Toxocara* sp. eggs in squares and public places from the city of La Plata, Buenos Aires Argentina. *Bol. Chil. Parasitol.* 55(3-4): 83-5
- Glickman LT, Dubey JP, Winslow LJ. 1981. Serological responses of *Ascarids* free dog to *Toxocara canis* infection. *J. Parasitol.* 82: 382-387
- Goffette S, Jeanjean AP, Duprez TP, Bigaignon G, Sindic CJ. 2000. Eosinophilic pleocytosis and myelitis related to *Toxocara canis* infection. *Eur. J. Neurol.* 7(6): 703-6
- Gonzalez MT, Ibanez O, Balcarce N, Nanfito G, Kozubsky L, Radman N, Donatone J, Fynn A, Drut R, Cueto Rua E. 2000. Toxocariasis with liver involvement. *Acta Gastroenterol Latinoam.* 30(3):187-90
- Harlow, E. and D. Lane. 1988. *Antibodies. A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Havasiova-Reiterova K, Tomasovicova O, and Dubinsky P. 1995. Effect of various doses of infective *Toxocara canis* and *Toxocara cati* eggs on humoral response and distribution of larvae in mice. *Parasitol. Res.* 81(1): 13-7.
- Hubner J, Uhlikova M, Leissova M. 2001. Diagnosis of the early phase of larval toxocariasis using IgG avidity. *Epidemiol. Microbiol. Immunol.* 50(2):67-70
- Humbert P, Niezborala M, Salembier R, Aubin F, Piarroux R, Buchet S, and Barale T. 2000. Skin manifestations associated with toxocariasis: a case-control study. *Dermatol.* 201(3):230-4

- Husband AJ, Brandon MR, and Lascelles AK. 1972. Absorbtion and endogenous production of immunoglobulin in calves. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci*; 50: 490-498.
- Ito, K., K. Sakai, T. Okajima, K. Quchi, A. Funakoshi, J. Nishimura, H. Ibayashi, and M. Tsuji. 1986. Three cases of visceral larva migrans due to ingestion of raw chickens or cow liver. *Nihon Naikagaku Zassi*. 75: 759-766
- Janeway, C.A. Jr., P. Travers, M. Walport, and J.D. Capra. 1999. *Immunobiology. The immune system in health and disease*. 4th ed. New York, US: Elsevier Science Ltd/Garland Publishing.
- Kennedy MW, Maizels RM. Meghji M, Young L, Qureshi F, and Smith HV. 1987. Species-specific and common epitopes on the secreted and surface antigens of *Toxocara cati* and *Toxocara canis* infective larvae. *Parasite Immunol*. 9(4): 407-20
- Kilpatrick ME. 1992. Toxocariasis. In: *Tropical Medicine*. 7th ed. London: W.B. Saunders Company. pp. 761-4
- Kincekova J, Reiterova K, Dubinsky P. 1999. Larval toxocariasis and its clinical manifestation in childhood in the Slovak Republic. *J. Helminthol*. 73(4): 323-8
- Koga, K., S. Kasuya, Y. Handa, R. Keawvichit, K. Wongworapat, C. Khamboonruang, and H. Ohtomo. 1992. Agar plate method, a new stool examination method for the diagnosis of strongyloidiasis: Field applicability and sensitivity. *J. Parasitol*. 78(1): 155-156
- Kondo K. 1989. Toxocariasis. *Saisin-Igaku*. 44: 774-779.
- Kresno, S.B. 1996. *Imunologi: Diagnosis dan prosedur laboratorium*. Edisi ketiga. Jakarta: Penerbit Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia.
- 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, Uga S, Machfudz, Koesdarto S, dan Sri Mumpuni S. 2000. *Deteksi telur Toxocara sp. dalam tanah di sekitar playground, peternakan sapi perah dan rumah potong hewan di Surabaya*. Seminar Kajian Epidemiologi Zoonosis Penyakit Cacingan di Wilayah Jatim, Tropical Disease Center, Surabaya.
- Kusumamihardja S. 1993. *Parasit dan Parasitosis pada Hewan Ternak dan Hewan Piaraan di Indonesia*. Bogor: PAU Bioteknologi, IPB.
- Levine ND. 1978. *Texkbook of Veterinary Parasitology*. Burgers Publishing Company. Diterjemahkan oleh: Ashadi G. 1990. Wardiaro Ed. Yogyakarta: Gajah Mada University Press.
- Lloyd S, and Soulsby E.J.L. 1987. *Immunology of G.I. nematode of ruminants*. In: *Immune Responses in Parasitic Infections, Immunology, Immunopathology and Immunoprophylaxis*. Vol I. Soulsby E.J.L. Ed. New York Academic Press. pp: 231-240

- Manus DPM. 1986. Intermediary metabolism in parasitic helminth. In: Howell. Proc. Of the Sixth International Congress of Parasites. pp. 79-89.
- Marx MB. 1991. Parasites, pets, and people. Abstract. Prim. Care. 18(1): 153-65
- Matsumura K, Kazuta Y, Endo R, and Tanaka K. 1983. The Ig M antibody in relation to the parasite statues of *Toxocrz canis* in dogs. Zentralblat Bacteriol. Microbiol. Hyg. A. 255: 402-405
- Moreira-Silva SF, Pereira FE. 2000. Intestinal nematodes, *Toxocara* infection, and pyogenic liver abscess in children: a possible association.. J. Trop. Pediatr. 46(3):167-72
- O'Lorcain P. 1994. Epidemiology of *Toxocara spp.* in stray dogs and cats in Dublin, Ireland. J. Helminthol. 68(4): 331-6
- Overgaaauw PA. 1997^a. Aspects of *Toxocara* epidemiology: toxocariasis in dogs and cats. Crit. Rev. Microbiol. 23(3): 233-51
- Overgaaauw PA. 1997^b. Aspects of *Toxocara* epidemiology: human toxocariasis. Crit. Rev. Microbiol. 23(3): 215-31
- Ozeretskovskaia NN. 2000. The organ pathology in the acute stage of tissue helminthiases: the role of eosinophilia of the blood and tissues, blood immunoglobulins E and G4 and immune response-inducing factors. Med Parazitol (Mosk). 3: 3-8
- Park SP, Huh S, Magnaval JF, and Park I. 1999. A case of presumed ocular toxocariasis in a 28-year old woman. Korean J Ophthalmol. Dec;13(2):115-9
- Park SP, Park I, Park HY, Lee SU, Huh S, and Magnaval JF. 2000. Five cases of ocular toxocariasis confirmed by serology. Korean J. Parasitol. 38(4):267-73
- Patterson RM. 1989. The Immune respon to helminth parasites. In: ELISA Technology in Diagnosis and Research. Graham and Burgers Eds. Australia: James Cook University of North Queensland. pp: 279-297
- Parsons JC. 1987. Ascarid infections of cats and dogs. Vet. Clin. Noth. Am. Pract. 17(6): 1307-39
- Pearse EJ and Sher A. 1990. immunity to helminth. In: Current Opinion Immunology. USA National Institute for Allergy and Infectious Diseases. 2: 235-379
- Petithory JC, Beddok A, and Quedoc M. 1994. Ascariasis zoonosis: visceral larva migrans syndromes. Bull. Acad. Natl. Med. 178(4): 635-47
- Playfair JHL. 1992. Immunology at a Glance. 5th Ed. Blackwell Scientific Publications. University Press, Cambridge.
- Prokopowicz D and Sosnowska D. 1990. Toxocariasis. Abstrac. Przegl. Epidemiol. 44(3): 193-8
- Prunier F, Delepine S, Victor J, de Gentile L, Moreau C, Laporte J, Dupuis JM, Geslin P. 2001. Loffler's fibroblastic endocarditis. A report of a case complicating toxocarosis. Arch. Mal. Coeur. Vaiss. 94(3): 226-30

- Radman NE, Archelli SM, Fonrouge RD, del V Guardis M, Linzitto OR. 2000. Human toxocarosis. Its seroprevalence in the city of La Plata. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 95(3): 281-5
- Rajapakse RPVJ. 1992. Immunological response of buffalo cows and calves to *Toxocara vitulorum* infection. Dissertation. Submitted for the Degree of Doctor of Philosophy. University of Paradeniya. Sri Lanka.
- Rantam, FA. 1997. Bornavirus and cells culture. Isolation infections *Bornavirus* from human and animal and their characterization. Dissertation. Vet. Med. FV-Berlin.
- Rayes AA, Teixeira D, Serufo JC, Nobre V, Antunes CM, and Lambertucci JR. 2001. Human toxocariasis and pyogenic liver abscess: a possible association. Am J Gastroenterol; 96(2): 563-6
- Robert JA. 1993. *Toxocara vitulorum* in ruminant. Vet. Bull. 63(6): 545-568.
- Roitt I, Brostoff J, and Male D. 1998. Immunology. 4th Ed. Barcelona, Spain: Mosby, Times Mirror International Publishers Limited.
- Sadjjadi SM, Khosravi M, Mehrabani D, and Orya A. 2000. Seroprevalence of *Toxocara* infection in school children in Shiraz, Southern Iran. Abstract. J. Trop. Pediatr. 46(6): 327-30
- Safar EH, el-Rifaei F, and Maklad KM. 1992. Protein chromatographic study on adult *Ascaris lumbricoides*, *Ascaris vitulorum* and *Toxocara canis*. J. Egypt. Soc. Parasitol. 22(1): 171-6
- Santoso S. 2001. SPSS versi 10, Mengolah Data Statistik Secara Profesional. Jakarta: PT Elex Media Komputindo.
- Schulze C, Rothuizen J, van Sluijs FJ, Hazewinkel HA, van den Ingh TS. 2000. Extrahepatic biliary atresia in a border collie. J. Small. Anim. Pract. 41(1): 27-30
- Soulsby E.J.L. 1986. Helminth, Arthropods and Protozoa of Domestic Animals. London: Bailliere Tindall and Cassell.
- Soulsby E.J.L. 1989. Toxocariasis. Brit.Vet. J. 139: 471-475.
- Sri Subekti, Koesdarto S, Sri Mumpuni S, Halimah P, Kusnoto, 2003. Isolasi dan Karakterisasi protein imunogenik larva stadium II *Toxocara vitulorum* sebagai perangkat kit diagnostik pada uji ELISA. Proyek Due Like Batch III, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya.
- Starke WA, Machado RZ, Bechara GH, and Zocoller MC. 1996. Skin hypersensitivity test in buffaloes parasitized with *Toxocara vitulorum*. Vet Parasitol; 63(3-4): 283-90
- Stites DP, Terr AI, Parlow TG. 1997. Medical Immunology. 9th Ed. USA: A Simon & Schuster Company, Prentice-Hall International Inc.
- Subowo, 1993. Immunobiologi. Bandung: Penerbit Angkasa.

- Sudiana IK, Putra ST, dan Dachlan YP. 1994. Studi perubahan prosentase leukosit dan kadar hemoglobin darah kucing yang mengidap toxocariasis. Perkumpulan Pemberantasan Penyakit Parasit Indonesia, Surabaya.
- Taranto NJ, Passamonte L, Marinconz R, de Marzi MC, Cajal SP, and Malchiodi EL. 2000. Zoonotic parasitosis transmitted by dogs in Chaco Salteno, Argentina. *Medicina (B Aires)*. 60(2): 217-20
- Tizard Ian R. 1982. *An Introduction to Veterinary Immunology*. WB Saunders Company. Diterjemahkan oleh Masduki Partodiredjo dan Soehardjo Hardjosworo. 1987. Airlangga University Press. hal. 303-324
- Trisunuwati P. 1997. Penentuan protein imunogen larva *Toxocara vitulorum*, sebagai usaha menemukan metode imunodiagnosis dini *Toxocariasis* pada induk sapi. Disertasi. Program Pascasarjana Universitas Airlangga.
- Tung YC, Chang SF, Ko YC, Chen HY, and Lin KH. 1995. Comparison of the genetic variation in type I Dengue Virus isolates in Taiwan 1987-1992. *Kaohsiung J. Med. Sci.* 11: 243-249.
- Uga S, Matsumura T, Fujisawa K, Okubo K, Kataoka N, and Kondo K. 1990. Incidence of seropositivity to Human Toxocariasis in Hyogo Prefecture, Japan, and its possible role in ophthalmic disease. *Jpn. J. Parasitol.* 39(5): 500-502.
- Warren KS. 1993. *Immunology and molecular biology of parasit infections*. Eidinburg, Blackwell Sc. Pp. 55.
- Yoshida M, Shirao Y, Asai H, Nagase H, Nakamura H, Okazawa T, Kondo K, Takayanagi TH, Fujita K, Akao N. 1999. A retrospective study of ocular toxocariasis in Japan: correlation with antibody prevalence and ophthalmological findings of patients with uveitis. *J. Helminthol.* 73(4): 357-61
- Zainuddin, M. 1993. *Metodologi Penelitian*. Program Pascasarjana, Universitas Airlangga.

Lampiran 1. Uji Linier Regresi antara nilai Rf (x) dan Berat Molekul (log y Da) untuk Menentukan Berat Molekul Protein Antigen L2 *T. cati*

Summarize

Case Summaries^a

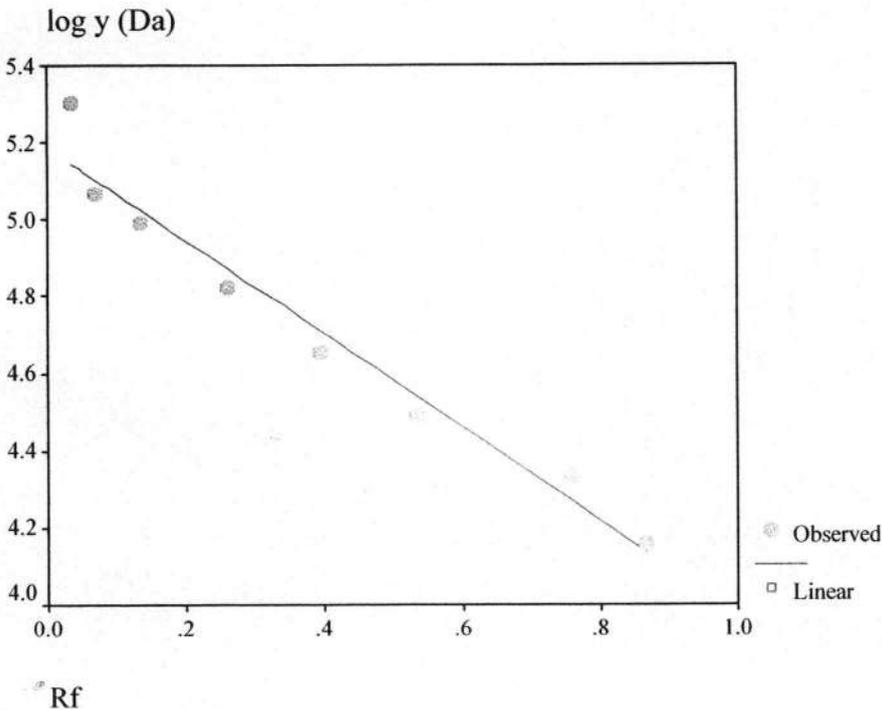
	JARAK	Rf	BM (y KDa)	BM (y Da)	log y (Da)
1	.20	.033	200	200000	5.301
2	.40	.067	116	116300	5.066
3	.80	.133	97	97400	4.989
4	1.55	.258	66	66200	4.821
5	2.35	.392	45	45000	4.653
6	3.20	.533	31	31000	4.491
7	4.55	.758	22	21500	4.332
8	5.20	.867	14	14400	4.158
Total N	8	8	8	8	8

a. Limited to first 100 cases.

Curve Fit

MODEL: MOD_1.
Independent: RF

Dependent	Mth	Rsqr	d.f.	F	Sigf	b0	b1
LOGY	LIN	.962	6	153.45	.000	5.1866	-1.2106



Regression

Variables Entered/Removed^b

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	Rf ^a	.	Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: log y (Da)

Model Summary^b

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.981 ^a	.962	.956	.081644

a. Predictors: (Constant), Rf

b. Dependent Variable: log y (Da)

ANOVA^b

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	1.023	1	1.023	153.446	.000 ^a
	Residual	.040	6	.007		
	Total	1.063	7			

a. Predictors: (Constant), Rf

b. Dependent Variable: log y (Da)

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	5.187	.047		110.244	.000
	Rf	-1.211	.098	-.981	-12.387	.000

a. Dependent Variable: log y (Da)

Residuals Statistics^a

	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	N
Predicted Value	4.13695	5.14662	4.72638	.382256	8
Residual	-.05900	.15438	.00000	.075588	8
Std. Predicted Value	-1.542	1.099	.000	1.000	8
Std. Residual	-.723	1.891	.000	.926	8

a. Dependent Variable: log y (Da)

Charts

Scatterplot

Dependent Variable: log y (Da)

