

BAB 3

MATERI DAN METODE

BAB 3 MATERI DAN METODE

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Parasitologi dan Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Hewan serta *Tropical Disease Center* (TDC) Universitas Airlangga Surabaya. Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan September sampai November 2014.

3.2 Materi Penelitian

3.2.1 Bahan penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *whole* protein dari larva caplak *Rhipicephalus sanguineus*. Hewan coba untuk penelitian ini adalah 2 ekor kelinci jantan. Bahan yang digunakan untuk imunisasi adalah PBS, *Complete Freund's Adjuvant* (CFA), *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA). Sedangkan untuk uji *Indirect* ELISA adalah PBS-*Tween*, *buffer coating*, *washing buffer*, *blocking buffer*, *conjugate*, antigen, antibodi, substrat buffer, substrat p-NPP dan NaOH 3N.

3.2.2 Alat penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah pipet *multi channel*, pipet *ependorf*, timbangan elektrik, aluminium foil, *washing dish*, beker glass, pipet hisap, pipet Pasteur, mikroplate datar, ELISA *reader*, spektrofotometer dan peralatan gelas lain.

3.3 Metode Penelitian

Penelitian dilakukan dengan tahapan-tahapan sebagai berikut:

3.3.1 Koleksi caplak *Rhipicephalus sanguineus*

Pengkoleksian caplak *R. sanguineus* di ambil dari anjing yang berasal dari klinik La Femur dan Rumah Sakit Hewan Universitas Airlangga. Seluruh caplak yang di koleksi akan dipilih yaitu caplak betina yang sudah kenyang menghisap darah. Caplak tersebut akan terlihat besar dari pada yang lainnya.

Identifikasi dilakukan untuk memastikan bahwa caplak yang diambil sebagai sampel adalah *R. sanguineus* dengan memperhatikan ciri-ciri spesifik pada masing-masing stadium caplak yang menurut Soulsby (1986) yakni:

Larva : Seperti biji coklat kecil, mempunyai 3 pasang kaki, capitulum larva menonjol melewati tepi tubuh; Nimfa : Memiliki 4 pasang kaki, capitulum dan mulut tidak terlihat jelas dari sebelah atas; Dewasa : Capitulum dan mulut tidak terlihat jelas dari sebelah atas, namun yang membedakannya dari stadium nimfa yaitu terlihat dengan jelas *anal groove*. Gambar pada stadium caplak dapat dilihat pada Lampiran 1.

3.3.2 Rearing caplak *Rhipicephalus sanguineus*

Caplak *R. sanguineus* betina yang sudah kenyang menghisap darah, diletakkan dalam petridish yang diberi kertas saring yang telah dibasahi air. Setiap ekor caplak betina mampu menghasilkan telur antara 2000-4000 butir, setelah bertelur tubuh caplak betina akan kempes, kering dan mati. Telur berbentuk kecil, bulat, berwarna kuning dan bergerombol, dalam waktu 17-30 hari telur akan menetas menjadi larva yang mempunyai 3 pasang kaki (Levine, 1994).

3.3.3 Pembuatan *whole protein* caplak *Rhipicephalus sanguineus*

Larva yang diperoleh dari proses *rearing* dikumpulkan dalam satu tabung kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit dilanjutkan dengan penambahan PBS secukupnya dan ditambah protease inhibitor (EDTA, PMSF dan TLCK). Ekstraksi protein dilakukan dengan teknik sonikasi sebanyak 10 kali selama 1 menit dengan interval istirahat 1 menit. Larutan hasil sonikasi disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu dingin. Supernatan diambil dan dipindah di tabung baru kemudian disimpan dalam suhu -20°C dan siap untuk dilakukan pengukuran konsentrasi protein. Konsentrasi protein diukur menggunakan spektrofotometer. Hasil pengukuran protein akan digunakan dalam penentuan dosis imunisasi.

3.3.4 Imunisasi pada kelinci dewasa

Dua ekor kelinci jantan dengan berat badan ± 2 kg/ekor diimunisasi dengan *whole protein R. sanguineus* secara *sub cutan* sebanyak 20,4 μL /ekor dalam *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) 0,5 mL dan PBS sebanyak 459,2 μg per imunisasi. Selang dua minggu setelah imunisasi yang pertama dilakukan imunisasi yang kedua dengan jumlah protein yang sama dalam *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA) dan PBS dengan jumlah yang sama seperti yang pertama. Imunisasi yang ketiga dilakukan setelah selang 1 minggu berikutnya dengan jumlah, cara dan bahan yang sama seperti sebelumnya, begitu juga dengan imunisasi yang keempat.

3.3.5 Pengambilan darah kelinci

Setiap sebelum imunisasi, dilakukan pengambilan darah pada *V. auricularis*. Sebelum pengambilan darah, pada telinga dibasahi dengan larutan *xylol* tujuannya agar pembuluh darah membesar dan memudahkan dalam menentukan daerah pengambilan darah. Darah yang diambil kemudian didiamkan selama 10 menit, disentrifugasi 10.000 rpm selama 10 menit kemudian diambil serumnya. Serum kelinci digunakan sebagai sampel tes untuk menentukan titer antibodi dengan teknik *Indirect* ELISA. Serum kontrol negatif pada uji *Indirect* ELISA diperoleh dari pengambilan darah sebelum dilakukan imunisasi pertama. Dalam uji *Indirect* ELISA digunakan sampel salah satu kelinci dari dua kelinci yang diberi perlakuan sama.

3.3.6 Uji *indirect* ELISA

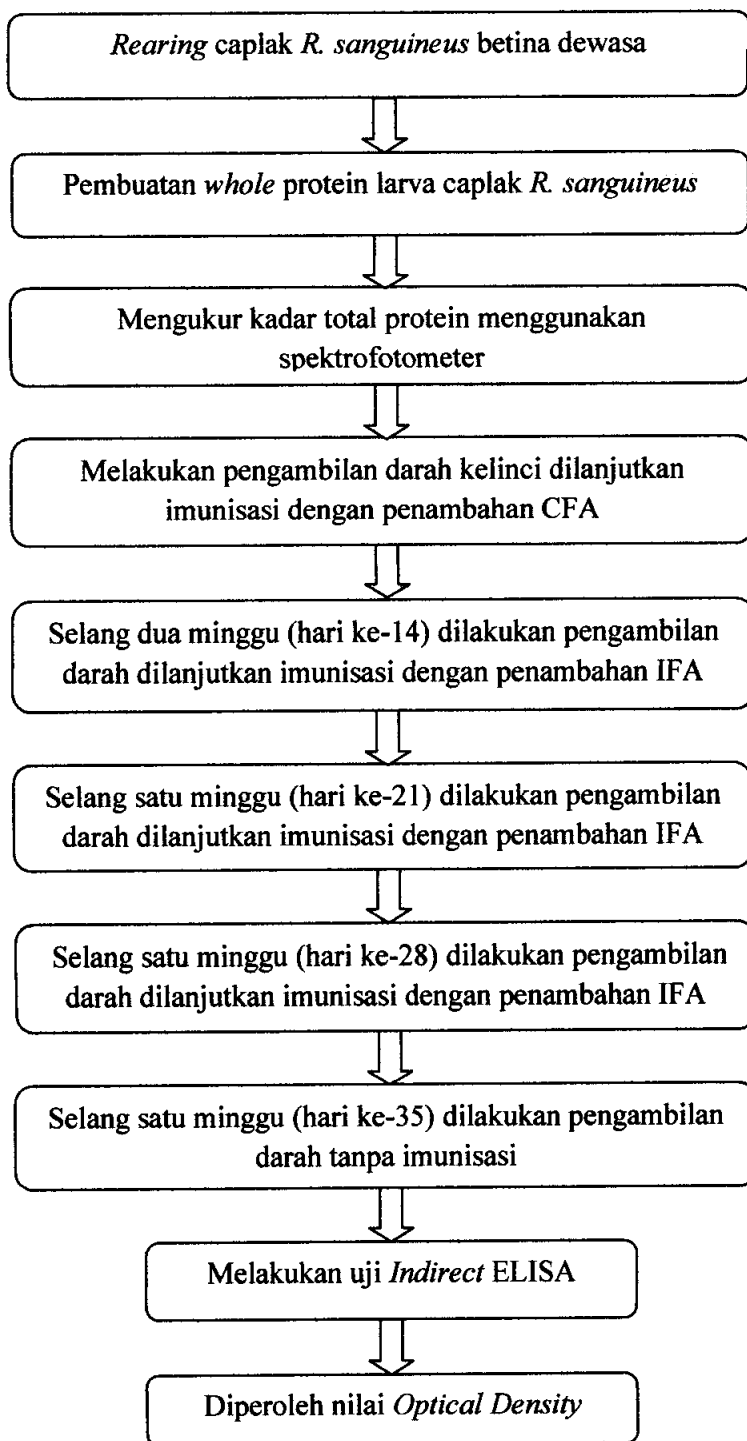
Cara kerja uji *Indirect* ELISA, adalah: 1) Coating Antigen: mengencerkan antigen dalam *carbonate buffer* dengan konsentrasi 5,102 µg /µl, memasukkan ke dalam sumuran sebanyak 100 µl. Menyimpan semalaman pada suhu 4°C. Kemudian dicuci dengan NaCl – *Tween* 20 sebanyak 3 kali. 2) Blocking: mengisi sumuran dengan 200 µl *blocking buffer*, menginkubasi selama 1 jam pada suhu kamar dan dicuci dengan NaCl – *Tween* 20 sebanyak 3 kali. 3) Inkubasi serum, meliputi: mengencerkan serum / supernatan yang akan diperiksa dengan *blocking buffer*, 1 : 10 – 1 : 100 dan memasukkan 4.995 µl serum pada tiap sumuran. Menginkubasi selama 1 jam pada suhu kamar (37°C), kemudian dicuci dengan NaCl – *Tween* 20 sebanyak 3 kali. 4) Inkubasi konjugat: mengencerkan konjugat dengan *blocking buffer* 1 : 1000 – 1 : 3000, kemudian memasukkan 100 µl

konjugat pada tiap sumuran. Menginkubasi selama 1 jam pada suhu kamar (37°C) dan dicuci dengan NaCl – *Tween* 20 sebanyak 3 kali. 5) Inkubasi substrat: memasukkan 100 μl substrat pada setiap sumuran, menginkubasi selama 30 menit pada suhu kamar di ruang gelap. Kemudian menambahkan 50 μl NaOH 3N tiap sumuran untuk stop reaksi. Langkah terakhir membaca pada 405 nm menggunakan ELISA *reader*.

3.4 Analisis Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini, akan dianalisis statistik menggunakan program *SPSS 17 for Windows* dan disajikan secara deskriptif.

3.5 Bagan Metode Penelitian



Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian