

SKRIPSI

**DETEKSI ANTIBODI PADA MENCIT YANG DIINFEKSI
Toxocara cati TERHADAP WAKTU YANG BERBEDA
MENGUNAKAN TEKNIK *INDIRECT ELISA***



Oleh :

AINUN JARIYAH NOFIANTI

NIM 060032847

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2008**

**DETEKSI ANTIBODI PADA MENCIT YANG DIINFEKSI
Toxocara cati TERHADAP WAKTU YANG BERBEDA
MENGUNAKAN TEKNIK *INDIRECT ELISA***

Skripsi
Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan
Pada
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

oleh
AINUN JARIYAH NOFIANTI
NIM 060032847

Menyetujui
Komisi Pembimbing,



(Retno Bijanti, M.S., drh)
Pembimbing Pertama



(Dr. M. Zainal Arifin, M.S., drh)
Pembimbing Kedua

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi berjudul :

Deteksi Antibodi pada Mencit yang Diinfeksi *Toxocara cati* Terhadap Waktu yang Berbeda Menggunakan Teknik *Indirect* ELISA

tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan sepanjang sepengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Surabaya, Agustus 2008



Ainun Jariyah Nofianti
NIM 060032847

Telah dinilai pada Seminar Hasil Penelitian

Tanggal : 28 Juli 2008

KOMISI PENILAI SEMINAR HASIL PENELITIAN

Ketua : Prof. Dr. Rochiman Sasmita, M.S., M.M., drh

Sekretaris : Nanik Sianita, S.U., drh

Anggota : Tutik Juniastuti, M. Kes., drh

Pembimbing 1 : Retno Bijanti, M.S., drh

Pembimbing 2 : Dr. M. Zainal Arifin, M.S., drh

Telah diuji pada

Tanggal : 7 Agustus 2008

KOMISI PENGUJI SKRIPSI

Ketua : Prof. Dr. Rochiman Sasmita, M.S., M.M., drh

Anggota : Nanik Sianita, S.U., drh

Tutik Juniastuti, M. Kes., drh

Retno Bijanti, M.S., drh

Dr. M. Zainal Arifin, M.S., drh

Surabaya, 18 Agustus 2008

Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga

Dekan,



Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph.D., drh

NIP. 130 687 305

**DETECTION of ANTIBODY in MICE WHICH INFECTION
by *Toxocara cati* WITH DIFFERENT TIME by USING
INDIRECT ELISA'S TECHNIQUE**

Ainun Jariyah Nofianti

ABSTRACT

The aim of this attempt is to know how the pattern of humoral immune responses toward infection of *Toxocara cati* at different times by using indirect ELISA's technique. The animal object that used as analisis object is five male mice (*Mus musculus*) which infection with second stage larvae of *Toxocara cati* worm, and than conducted by intake of serum at four different time to detect imunoglobulin formed from the whole animal of the attempt. T0 is serum intake before conducted by infection while T1, T2, and T3 are serum intake on seventh, fourteenth and twenty eight days after conducted by oral infection. Humoral immune responses toward second stage larva of *Toxocara cati* worm determined by pursuant value of optical density (OD) that obtained from assay of indirect ELISA, where value of the OD explaining the titers of antibody in serum. Afterwards, data obtained to be analysed whith Anova Test using SPSS 13.0 for windows and than to be tested by Duncan 5%. The result of research show highly significant difference ($p < 0,01$) among T0, T1, T2, and T3. After continued with test of Duncan, clearly there are significantly difference ($p < 0,05$) among T0 by T1, T2, and T3. While among T1, T2, and T3 there no significantly difference.

Key words: *Toxocara cati*, second stage larvae, ELISA, humoral immune responses, antibody.

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur Kehadirat Allah SWT atas karunia yang telah dilimpahkan sehingga penulis dapat melaksanakan penelitian dan menyelesaikan skripsi dengan judul **Deteksi Antibodi pada Mencit yang Diinfeksi *Toxocara cati* terhadap Waktu yang Berbeda Menggunakan Teknik *Indirect* ELISA.**

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada :

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph.D., drh atas kesempatan mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Ibu Retno Bijanti, M.S., drh selaku pembimbing pertama dan Dr. M. Zainal Arifin, M.S., drh selaku pembimbing kedua atas saran dan bimbingannya sampai dengan selesainya skripsi ini.

Prof. Dr. H. Rochiman Sasmita, M.S., M.M., drh., selaku ketua penguji, Ibu Nanik Sianita, S.U., drh., selaku sekretaris penguji dan Ibu Tutik Juniastuti, M.Kes., drh., selaku anggota penguji.

Bapak Kusnoto, M.Si., drh., selaku dosen pembimbing penelitian yang telah banyak membantu selama penelitian sampai dengan selesainya penyusunan skripsi ini.

Seluruh staf pengajar Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas wawasan keilmuan selama mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Seluruh staf pengajar Laboratorium Helminologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga yang telah mengizinkan penulis menggunakan

fasilitas laboratorium, serta kepada Bapak Suwarno atas bantuannya selama proses penelitian di laboratorium.

Ayahanda, Ibunda, Suami dan Anak-anakku yang tercinta yang telah memberikan segalanya, bantuan doa, dorongan dan semangat.

Akhirnya, penulis menyadari bahwa penulisan skripsi ini masih jauh dari sempurna karena keterbatasan yang ada pada penulis. Untuk itu dengan lapang dada penulis menerima semua kritik dan saran guna perbaikan isi skripsi agar lebih sempurna penulisan ini.

Surabaya, Agustus 2008

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRACT	iv
UCAPAN TERIMA KASIH	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG	xii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang Masalah	1
1.2. Rumusan Masalah	5
1.3. Landasan Teori	5
1.4. Tujuan Penelitian	8
1.5. Manfaat Penelitian	8
1.6. Hipotesis	8
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	9
2.1. <i>Toxocara cati</i>	9
2.1.1. Klasifikasi	9
2.1.2. Morfologi	9
2.1.3. Habitat dan induk semang	10
2.1.4. Siklus hidup	11
2.2. Aspek Zoonosis <i>Toxocara cati</i>	13
2.3. Patogenitas	14
2.3.1. <i>Visceral Larva Migrans</i>	15
2.3.2. <i>Ocular Larva Migrans</i>	15
2.3.3. <i>Covert toxocariasis</i>	16
2.4. Diagnosa Toxocariasis	16
2.5. Antigen Parasit	17
2.6. Respon Imun Terhadap Cacing	19
2.6.1. Antibodi	22
2.6.2. Immunoglobulin G	23
2.6.3. Immunoglobulin M	23
2.6.4. Immunoglobulin E	24
2.7. Enzyme Linked Immunosorbent Assay	24
BAB 3 MATERI DAN METODE.....	27
3.1. Tempat dan Waktu Penelitian	27
3.2. Peralatan Penelitian	27
3.3. Bahan Penelitian	27

3.4. Metode Penelitian	28
3.4.1. Isolasi Telur Infektif (mengandung L2) <i>Toxocara cati</i>	28
3.4.2. Penghitungan Telur	30
3.4.3. Infeksi buatan pada mencit	30
3.4.4. Isolasi larva kedua jaringan (L2 dorman) <i>Toxocara cati</i>	31
3.4.5. Pembuatan excretory-secretory (ES) L2 dorman <i>T. cati</i>	32
3.4.6. <i>Indirect</i> -ELISA	32
3.5. Rancangan Penelitian dan Analisis Data	33
3.6. Kerangka Operasional Penelitian	35
BAB 4 HASIL PENELITIAN	36
4.1. Isolasi Cacing <i>Toxocara cati</i> Dewasa	36
4.2. Isolasi Larva Kedua (L2) <i>Toxocara cati</i>	36
4.3. Penghitungan Telur	37
4.4. Isolasi Larva Kedua (L2) Dorman <i>Toxocara cati</i>	38
4.5. Pembuatan <i>excretory-secretory</i> (ES) L2 Dorman <i>Toxocara cati</i>	38
4.6. Hasil Pembacaan Nilai OD dengan Teknik <i>Indirect</i> ELISA	38
BAB 5 PEMBAHASAN	41
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN	48
6.1. Kesimpulan	48
6.2. Saran	48
RINGKASAN	49
DAFTAR PUSTAKA	51
LAMPIRAN	55

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1. Rata-rata nilai <i>Optical Density</i> (OD) pemeriksaan antibodi mencit pada hari ke0, ke7, ke14 dan ke28 setelah infeksi L2 <i>T. cati</i>	38

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1. Cacing <i>T. cati</i> dewasa, bagian anterior cacing <i>T. cati</i> dan telur <i>T. cati</i>	10
2.2. Siklus hidup <i>Toxocara cati</i>	13
4.1. Hasil isolasi cacing <i>Toxocara cati</i> dewasa	36
4.2. Telur <i>T. cati</i> dan Larva stadium kedua (L2) <i>T. cati</i>	37
4.3. Pengamatan L2 dorman menggunakan mikroskop <i>dissecting</i> dengan pembesaran 200x	37
4.4. Grafik rata-rata nilai OD untuk pemeriksaan antibodi mencit pada hari ke0, ke7, ke14 dan ke28 setelah infeksi L2 <i>T. cati</i>	40

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Analisis statistik Nilai OD	55
2. Bahan-bahan untuk uji <i>Indirect</i> ELISA	57
3. Gambar Penelitian	60

SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG

ELISA = *Enzyme-linked immunosorbent assay*

ES = *Excretory-secretory*

L1 = Larva stadium pertama

L2 = Larva stadium kedua

L3 = Larva stadium ketiga

L4 = Larva stadium keempat

Ig = *Imunoglobulin*

OD = *Optical Density*

SPSS = *Statistical Program and Service Solution*

BAB 1

PENDAHULUAN

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Toxocariasis adalah penyakit infeksi yang disebabkan oleh ascarid nematoda *Toxocara canis* dan *Toxocara cati*. Biasanya infeksi diperoleh secara *accidental ingestion* terhadap telur infeksi. Telur dikeluarkan melalui feses anjing terinfeksi *Toxocara canis* atau kucing yang terinfeksi *Toxocara cati* (Noordin *et al.*, 2004).

Toxocariasis merupakan penyakit zoonosis yang telah tersebar luas di seluruh dunia dengan seroprevalensi di negara maju biasanya lebih rendah dibandingkan di negara yang sedang berkembang (Noordin *et al.*, 2004). Di Prancis 2-5% orang dewasa dari daerah perkotaan yang nampak sehat ternyata menunjukkan seropositif terhadap *Toxocara* sedangkan di daerah pedalaman sebesar 14,2-37%. Seropositif sebesar 40% terjadi di Brazil, 12% di Ohio (Amerika Serikat), dan 2.5% di Jerman. Di daerah tropis, seropositif mencapai angka 63,2% di Bali (Indonesia), 92,8% terjadi di La reunion (Prancis), 86% di Saint Lucia (India) dan di Karibia sebesar 83% (Virginia *et. al.*, 1991 ; Overgaauw and Van Knapen, 2000 ; Huh and Lee, 2006).

Toxocariasis yang disebabkan oleh *Toxocara cati* perlu mendapat perhatian. Selain bersifat zoonosis, kucing merupakan hewan yang memiliki kedekatan dengan manusia sebagai hewan kesayangan. Di Indonesia populasi kucing sangat tinggi. Padahal *Toxocara cati* merupakan parasit cacing yang umum terdapat pada saluran pencernaan kucing dan cacing betina *Toxocara cati* mampu memproduksi 200.000 butir telur tiap harinya. Di Surabaya prevalensi toxocariasis pada kucing

mencapai 74% (Sudiana dkk, dikutip oleh Kusnoto, 2004) sedangkan kesadaran masyarakat Indonesia khususnya di Surabaya terhadap kesehatan hewan dan kebersihan ternyata masih rendah. Keadaan ini menyebabkan peningkatan resiko terjadinya toxocariasis pada manusia (Noble and Noble, 1989 ; Kusnoto, 2004 ; Nash, 2008).

Infeksi pada manusia yang disebabkan oleh larva *Toxocara* biasanya bersifat kronis dengan lokasi infeksi berada pada ekstraintestinal (*visceral larva migrans*). Larva dilepaskan dari telur yang tertelan dan bermigrasi dari usus halus menuju beberapa organ dan jaringan, kemudian larva akan menetap untuk waktu yang lama pada organ dan jaringan tersebut. Anak-anak terutama yang berumur 18 bulan hingga tiga tahun merupakan kelompok yang beresiko tinggi terhadap infeksi ini. Tetapi tidak menutup kemungkinan terjadi pada usia yang lebih dewasa (Ancha and Szyfres, 1995).

Pada induk semang non definitif termasuk manusia, cacing *Toxocara* tidak dapat melalui siklus hidup dengan lengkap dan terhenti pada larva stadium kedua (L2). Di dalam tubuh induk semang non definitif, L2 akan bermigrasi pada berbagai organ dan jaringan (Noordin *et al.*, 2004). Migrasi dari L2 pada jaringan dan organ manusia menimbulkan manifestasi klinis yang dapat dikelompokkan pada tiga bentuk yaitu *visceral larva migrans*, *ocular larva migrans* dan *covert toxocariasis* (Smith, 1993 ; Huh and Lee, 2006).

Sumber utama infeksi pada manusia berasal dari tanah yang terkontaminasi telur *Toxocara*. Telur *Toxocara* dapat terakumulasi pada tanah dimana kucing pernah melakukan buang kotoran dan mampu bertahan pada lingkungan yang sesuai hingga beberapa tahun. Telur *Toxocara* memiliki sifat yang lengket

karenanya dapat melekat dan terakumulasi di tangan termasuk di bawah kuku. Seseorang dengan *hygiene* yang kurang terutama anak-anak dengan kebiasaan geophagia dan memasukkan jari-jari tangan ke mulut dapat tertular melalui kontak mulut dengan tangan yang terkontaminasi (Huh and Lee, 2006 ; Nash, 2008). Selain itu penularan juga dapat melalui makanan atau minuman yang terkontaminasi telur infeksiif maupun larva jaringan (dorman) karena pemasakan yang kurang sempurna (Ito *et al.*, 1986 dikutip oleh Kusnoto dkk, 2005).

Selama ini diagnosa klinik terhadap infeksi toxocariasis secara pasti tidak mudah dilakukan karena pada infeksi toxocariasis tidak menunjukkan tanda-tanda yang patognomonik, selain itu larva yang bermigrasi tidak mudah ditemukan pada material biopsi (Overgaauw and Van Knapen, 2000 ; Noordin *et al.*, 2005). Diagnosa secara langsung tidak dapat dilakukan pada semua penderita toxocariasis karena induk semang non definitif tidak mengeluarkan material parasit seperti telur atau larva (Overgaauw and Van Knapen, 2000) sehingga diagnosa secara konvensional dengan menemukan telur *Toxocara* pada feses tidak dapat dilakukan dan hanya dapat dilakukan pada induk semang definitif (anak kucing dan kucing jantan dewasa) karena cacing *Toxocara cati* dewasa tidak pernah ditemukan di dalam usus induk semang non definitif. Oleh karena itu upaya yang dapat dilakukan untuk mengatasi kesulitan ini adalah dengan mengembangkan diagnosis secara imunologik (Kusnoto, 2004).

Penegakan diagnosis toxocariasis secara imunologik salah satunya dapat dilakukan dengan menggunakan teknik *indirect-ELISA*. Pada teknik ini antigen yang paling sering digunakan adalah *excretory-secretory* dari kultur invitro larva

stadium kedua (L2) (Yamasaki *et al.*, 2000 ; Noordin *et al.*, 2005), sedangkan antibodi dapat diperoleh dari serum penderita toxocariasis.

Penelitian sebelumnya telah banyak diketahui tentang antigen spesifik yang dapat digunakan sebagai bahan uji diagnosis toxocariasis, namun belum banyak diketahui tentang gambaran pola antibodi terhadap infeksi *Toxocara cati* pada beberapa waktu deteksi yang berbeda, yang dapat digunakan sebagai bahan acuan diagnosis toxocariasis menggunakan teknik *indirect*-ELISA.

Infeksi L2 *Toxocara cati* dapat memicu respon imun humoral pada tikus sebagai induk semang antara (Havasiova-Reiterova *et al.*, 1995) dengan dibentuknya antibodi spesifik yang muncul dalam serum sesudah beberapa waktu sebagai kontrol parasit ekstraseluler (Roitt *et al.*, 1989). Pada manusia, larva infeksiif juga mampu menimbulkan respon imun yang kuat dan persisten (Smith,1993).

Pada penelitian ini dicoba dilakukan deteksi antibodi pada beberapa waktu yang berbeda terhadap serum mencit setelah diinfeksi secara buatan dengan telur infeksiif cacing *Toxocara cati* menggunakan teknik *indirect*-ELISA. Teknik ini dilakukan untuk mengetahui gambaran titer antibodi pada beberapa waktu setelah infeksi melalui adanya ikatan antigen-antibodi, dan nilai *Optical Density* (OD) yang didapat pada uji ini akan mencerminkan titer antibodi dimana lebih lanjut dapat digunakan sebagai acuan dalam pengembangan diagnosis toxocariasis secara imunologik.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka permasalahan pada penelitian ini adalah: Apakah terdapat perbedaan nilai *Optical Density* (OD) pada serum mencit yang diinfeksi L2 *Toxocara cati* terhadap waktu deteksi yang berbeda.

1.3 Landasan Teori

Spesies cacing *Toxocara cati* memiliki siklus hidup yang rumit. Cacing ini telah diketahui memiliki cara yang sangat efektif untuk memastikan spesiesnya telah ditularkan dari generasi ke generasi melalui rute *trans mammary*. Infeksi *Toxocara cati* dapat melalui beberapa cara antara lain karena tertelannya telur infeksi secara langsung, tertelannya larva inektif (L2 dorman) yang berada pada jaringan dan organ induk semang non definitif yang terinfeksi, serta melalui air susu induk yang terinfeksi. (Bowman and Lynn, 1995 ; Nash, 2008).

Stadium yang dialami cacing *Toxocara cati* meliputi larva stadium pertama (L1), larva stadium kedua (L2), larva stadium ketiga (L3), larva stadium keempat (L4) dan dewasa. Stadium infeksi adalah larva stadium kedua (L2) (Levine, 1994). Larva stadium kedua jika berada di lingkungan yang sesuai mampu bertahan hingga beberapa tahun sedangkan jika berada dalam tubuh induk semang non definitif larva akan bermigrasi pada berbagai organ dan jaringan, namun tidak akan pernah berkembang menjadi L3, L4 hingga dewasa. Dengan kata lain perkembangan larva mengalami jalan buntu yang kemudian akan membentuk kista dan menetap sebagai L2 jaringan atau biasa disebut L2 dorman (Levine, 1994 ; Nash, 2008).

Diagnosa secara imunologik (uji serologis) pada toxocariasis kini sangat diperlukan karena diagnosis atas dasar tanda-tanda klinis dan dengan cara biopsi untuk menemukan larva infeksi ternyata sangat sulit dilakukan. Begitu juga diagnosis secara konvensional untuk menemukan telur *Toxocara cati* tidak selalu dapat dilakukan terutama pada induk semang non definitif termasuk manusia (Yamasaki *et al.*, 2000 ; Kusnoto, 2005).

Beberapa uji imunologik dapat dilakukan untuk mendiagnosa toxocariasis tetapi uji yang memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi adalah menggunakan teknik ELISA dengan mereaksikan antigen *Toxocara cati* dan antibodi spesifik *Toxocara cati*. Antigen yang sering digunakan pada uji ELISA adalah *excretory-secretory* (ES) yang di dapat dari larva *Toxocara cati* dalam media kultur, dengan estimasi akan memiliki sensitivitas sebesar 78% dan spesifisitas sebesar 92% (Acha and Szyfres, 1995).

Keberadaan telur infeksi *Toxocara cati* sebanyak 17 telur per gram berat badan setelah inokulasi oral pada *Mongolian gerbils* sebagai hewan coba menunjukkan adanya perubahan optalmik dan migrasi larva sampai ke mata (Akao *et al.*, 2000). Adanya larva dalam jaringan akan menimbulkan jejas, sehingga timbul respon imun yang ditandai dengan keberadaan imunoglobulin E (Ig E) dan terjadi peningkatan kadar eosinofil yang merupakan jenis dari *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* (ADCC). Respon tersebut dilengkapi dengan kecenderungan cacing untuk menstimulasi subset Th2CD4 dari sel Th untuk mensekresi interleukin-4 (IL-4) dan IL-5. IL-4 merupakan limfokin yang merangsang sel B untuk berdeferensiasi menjadi sel plasma dan

menghasilkan Ig E, sedangkan IL-5 merupakan pemicu pembentukan eosinofil (Abbas and Lichtman, 2003).

Menurut Smith (1993) larva infeksi pada tubuh manusia dapat menimbulkan respon imun yang kuat dan persisten. Hal ini digambarkan dengan adanya leukositosis, eosinofilia, hipergamaglobulinemia, dan khususnya produksi Ig M, Ig G dan Ig E yang merupakan *isotypes* antibodi terhadap *Toxocara excretory-secretory* (TES). Antibodi tersebut akan muncul dalam serum sesudah beberapa waktu telah berlangsung (Herscowitz, 1993).

Antibodi yang dihasilkan sistem imun tubuh bersifat spesifik terhadap *Toxocara cati* dan sebagian beredar dalam aliran darah perifer, sehingga respon imun terhadap *Toxocara cati* dapat di deteksi secara imunologik melalui ikatan antara antigen-antibodi yang spesifik terhadap *Toxocara cati* (Kusnoto, 2004). Dengan menggunakan teknik *indirect-ELISA* kita dapat mendeteksi ikatan antigen-antibodi melalui nilai *optical density* (OD), dimana nilai OD akan mencerminkan ikatan antigen-antibodi tersebut.

Respon imun spesifik (humoral dan seluler) terbagi atas beberapa fase yang berbeda. Fase-fase tersebut meliputi pengenalan antigen, dilanjutkan aktivasi limfosit, kemudian fase efektor yang merupakan proses eliminasi antigen, lalu diikuti fase penurunan respon untuk kembali berada pada keseimbangan homeostasis dan diakhiri dengan fase terbentuknya sel memori. Masing-masing fase dapat memiliki masa durasi yang bervariasi dalam respon imun yang berbeda (Abbas and Lichtman, 2003).

1.4 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui gambaran pola respon imun humoral terhadap infeksi *Toxocara cati* pada beberapa waktu yang berbeda melalui pembacaan nilai OD yang mencerminkan kadar antibodi dalam serum menggunakan teknik *indirect-ELISA*.

1.5 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang pola respon imun humoral pada infeksi *Toxocara cati* terhadap waktu deteksi yang berbeda sehingga dapat digunakan sebagai acuan dalam diagnosa toxocariasis.

1.6 Hipotesis

Pada penelitian ini hipotesis yang diajukan adalah: Terdapat perbedaan nilai OD yang mencerminkan kadar antibodi dalam serum pada infeksi L2 *Toxocara cati* terhadap waktu deteksi yang berbeda.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Toxocara cati*

2.1.1 Klasifikasi

Klasifikasi cacing *Toxocara cati* menurut Soulsby, 1982 adalah sebagai berikut :

Filum : Nematelminthes

Kelas : Nematoda

Sub Kelas : Secernentea

Ordo : Ascaridida

Super Famili : Ascaridoidea

Famili : Ascarididea

Genus : *Toxocara*

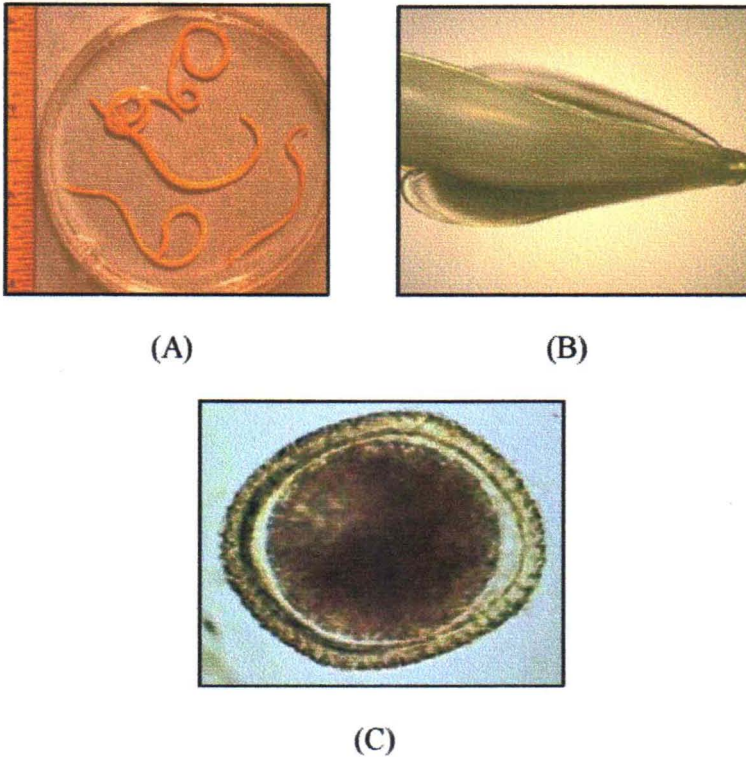
Spesies : *Toxocara cati*.

Sinonim *Toxocara mystax* (Levine, 1994).

2.1.2 Morfologi

Toxocara cati merupakan askarida yang umum terdapat pada kucing. Nama lain dari *Toxocara cati* adalah *Toxocara mystax*. Cacing ini mempunyai garis kutikuler yang saling berdekatan dengan *cervical alae* besar, menyempit di anterior kemudian melebar di posterior sehingga ujung anterior tubuh cacing mirip dengan kepala anak panah. (Levine, 1994). Panjang cacing jantan 3-6 cm dengan spikula berukuran 1,63-2,08 mm. Cacing betina panjangnya 4-10 cm dan diameter telurnya 65-75 mikron (Soulsby, 1982). Telur *Toxocara* berbentuk

agak bulat, berwarna coklat muda, mempunyai selubung yang tebal, kasar sedikit berbintik-bintik dan mengandung banyak protein dengan membran vitelin yang kurang jelas (Noble and Noble, 1989 ; Levine 1994).



Gambar 2.1 (A) Cacing *T. cati* dewasa (Baringvet, 2008)
 (B) Bagian anterior cacing *T. cati* (Wikimedia Commons, 2008).
 (C) Telur *T. cati* (Wikimedia Commons, 2008).

2.1.3 Habitat dan induk semang

Cacing *Toxocara cati* biasa ditemukan pada usus halus induk semang definitif, yaitu anak kucing dan kucing jantan dewasa juga pada usus halus felidae liar (Soulsby, 1982 ; Bowman and Lynn, 1995). *Toxocara cati* juga terdapat pada mustilidae, anjing dan manusia tetapi jarang terjadi. Sedangkan cacing tanah,

kecoa, ayam, anjing, anak kambing dan mencit berperan sebagai induk semang transpor (Levine, 1994).

2.1.4 Siklus hidup

Siklus hidup *Toxocara cati* berbeda dengan siklus hidup *Toxocara canis*. Perbedaan tersebut terletak pada tidak adanya infeksi prenatal pada *Toxocara cati* karena rute mayor infeksi *Toxocara cati* dari induk ke anak kucing adalah melalui *transmammary transmission*. Terdapat sedikit perkembangan pada saat cacing berada dalam saluran pencernaan dan relatif penting adanya induk semang transport (Levine, 1994).

Saat dilepas ke lingkungan bersama feses induk semang definitif, telur *Toxocara* belum bersifat infeksi. Ia membutuhkan waktu 3 sampai 6 minggu bahkan hingga beberapa bulan untuk berkembang menjadi stadium infeksi dan dapat bertahan hingga satu tahun dalam keadaan infeksi (Overgaauw and Van Knapen, 2000).

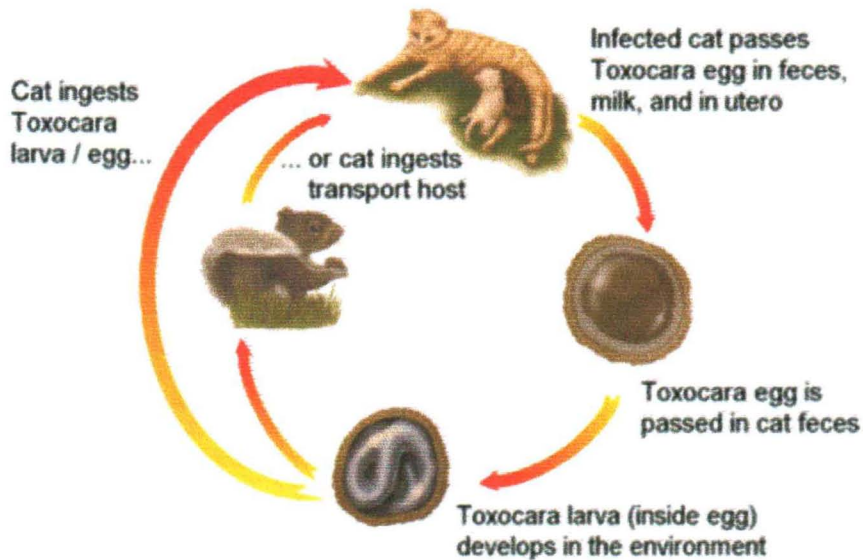
Stadium infeksi dari *Toxocara cati* adalah larva stadium kedua (L2) yang berada di dalam telur. Infeksi dapat terjadi apabila telur infeksi tertelan oleh kucing kemudian menetas didalam lambung. Untuk dua hari pertama larva ditemukan pada dinding lambung, kemudian sebagian besar berpindah melalui vena porta hepatica menuju hati dan paru-paru. Sampai hari ketiga beberapa larva telah berada di organ hati dan paru-paru. Hari kelima, selain di paru-paru larva juga ditemukan pada *tracheal washing*. Pada hari ke 10 larva ditemukan kembali didalam dinding lambung dan berkembang menjadi larva stadium ketiga (L3). Menginjak hari ke 21 larva telah berkembang menjadi dewasa. Larva stadium ke

tiga (L3) kebanyakan terdapat pada dinding lambung, sedangkan larva ke empat (L4) dapat ditemukan pada isi lambung, dinding usus dan lumen usus yang selanjutnya berkembang menjadi cacing dewasa (Soulsby, 1982 ; Levine, 1994).

Infeksi dari rodensia juga memegang peranan penting dalam siklus hidup *Toxocara cati* sebagai induk semang transpor. Di dalam tubuh rodensia yang terinfeksi *Toxocara cati* terdapat larva stadium ke dua (L2) di berbagai organ dan jaringan. Pada saat rodensia yang terinfeksi tersebut dimakan oleh kucing, larva stadium ke dua yang menetap dalam jaringan dan organ induk (disebut L2 dorman) akan terbebas dan berkembang didalam dinding lambung kucing hingga menjadi larva stadium ke 3 (L3). 21 hari kemudian pada dinding dan lumen usus ditemukan larva stadium ke 4 (L4) (Soulsby, 1982).

Pada induk semang non definitif, telur infeksi yang tertelan akan menetas didalam usus. Kemudian larva stadium ke 2 berpindah kedalam jaringan yang menyebabkan terjadinya visceral larva migran dan membentuk kista di jaringan organ dalam maupun somatik. Dapat juga terjadi ocular larva migran bila larva bermigrasi sampai kemata, bahkan migrasi larva tersebut dapat mencapai otak. Didalam tubuh induk semang non definitif, larva stadium ke 2 tidak dapat mengalami perkembangan selanjutnya dalam arti perkembangannya mengalami jalan buntu (Levine, 1994 ; Kusnoto, 2004). Begitu juga pada kucing betina dewasa yang terinfeksi. Cacing *Toxocara* tidak dapat berkembang menjadi dewasa hanya berhenti pada larva stadium ke 2 dan berada pada berbagai jaringan selama laktasi belum dimulai. Pada saat kucing betina yang terinfeksi bunting, sebagian larva bermigrasi ke kelenjar mammae dan kemudian ikut keluar melalui air susu selama masa laktasi menyebabkan anak kucing tertular karena larva yang

terminum bersama air susu dari induk akan berkembang secara langsung menjadi dewasa didalam usus halus, dalam waktu satu minggu setelah lahir (Soulsby, 1982 ; Levine, 1994).



Gambar 2.2 Siklus hidup *Toxocara cati* (Baringvet,2008)

2.2 Aspek Zoonosis *Toxocara cati*

Toxocariasis merupakan penyakit infeksi zoonosis pada manusia yang disebabkan oleh larva *Toxocara canis* yang berasal dari anjing dan *Toxocara cati* yang berasal dari kucing (Glickman and Schantz, 1981 ; Page and Maizels, 1992 dikutip oleh Yamasaki *et al.*, 2000).

Toxocariasis pada manusia merupakan penyakit parasitik zoonosis yang telah tersebar luas diseluruh dunia. Bahkan kasus infeksi pada manusia yang tidak terdeteksi mungkin tersebar lebih luas dari pada yang telah dilaporkan. (Brown, 1979 ; Noordin *et al.*, 2005).

Infeksi pada manusia dapat diperoleh melalui oral dengan tertelannya telur *Toxocara* infeksius dari tanah yang terkontaminasi (sapro zoonosis), makanan atau minuman yang terkontaminasi oleh telur infeksius atau karena tertelannya larva jaringan karena pemasakan yang kurang sempurna. Namun tanah yang terkontaminasi oleh telur infeksius merupakan sumber infeksi utama pada manusia (Overgaauw and Van Knapen, 2000 ; Ito *et al.*,1986 dikutip oleh Kusnoto dkk, 2005).

Beberapa studi dari penjuru dunia menunjukkan rata-rata yang tinggi pada kontaminasi tanah di taman, arena bermain, kotak pasir dan daerah publik lainnya terhadap telur *Toxocara* sebesar 10% sampai 30% (Overgaauw and Van Knapen, 2000).

Menurut Noble and Noble, 1989, larva *Toxocara* mampu hidup pada berbagai induk semang abnormal termasuk manusia terutama anak-anak. Karena anak-anak seringkali bermain debu dan tanah serta kebiasaan geophagia (Smith, 1993).

2.3. Patogenitas

Toxocara tidak dapat berkembang secara sempurna pada induk semang non definitif termasuk pada manusia. Perkembangan parasit akan terhenti pada stadium larva ke 2. migrasi dari larva stadium ke 2 ini menyebabkan manifestasi klinik berupa *visceral larva migrant*, *ocular larva migrant* dan *covert toxocariosis* (Noordin *et al.*, 2005).

2.3.1 *Visceral larva migrans*

Visceral larva migrans (VLM) disebabkan oleh migrasi larva yang melewati organ internal manusia yang berakibat terjadinya reaksi inflamasi (Huh and Lee, 2006). *Visceral larva migrans* sering berlangsung tanpa gejala walaupun larva *Toxocara* mengadakan invasi pada berbagai organ seperti hati, otak, mata, sumsum tulang, paru-paru, otot, jantung, ginjal dan kelenjar limfe. Pernah dilaporkan pada seorang penderita dengan infeksi berat ditemukan 60 ekor larva dalam tiap gram jaringan hati, 5 ekor didalam tiap gram jaringan otot, dan 3-5 ekor dalam tiap gram jaringan otak (Brown, 1979).

Gejala umum yang tampak pada kasus *visceral larva migrans* antara lain demam, nyeri pada daerah perut, malaise, penurunan berat badan, skin rash, hepatomegali, hypergammaglobulinemia, gangguan pernapasan yang diikuti eosinophilia (Magnaval *et al.*, 2001 dikutip oleh Noordin *et al.*, 2005). Bahkan miokarditis dan gangguan pada *central nervous system* dapat timbul sebagai gejala VLM (Smith, 1993).

2.3.2 *Ocular larva migrans*

Masuknya larva kedalam mata seringkali terjadi dan dapat menimbulkan kerusakan yang serius (Noble and Noble, 1989). Hal ini terjadi karena masuknya larva dapat menimbulkan inflamasi dan terbentuknya scar pada retina. Gejala yang timbul pada *ocular larva migrans* (OLM) dapat berupa strabismus, pars planitis, endophtalmitis, uveitis, retinal granuloma dan retinal fibrosis yang menyebabkan penurunan daya pandang hingga kebutaan (Gilespeie *et al.*, 1993 dikutip oleh Noordin *et al.*, 2005 ; Huh and Lee, 2006).

2.3.3 *Covert toxocariasis*

Covert toxocariasis (CT) adalah gejala pada penderita toxocariasis yang tidak termasuk pada kategori VLM atau OLM dengan gejala yang tidak spesifik (Smith, 1993) antara lain batuk, nyeri abdominal, sakit kepala, gangguan pola tidur dan kebiasaan (Taylor *et al.*, 1981 dikutip oleh Noordin *et al.*, 2005).

2.4. Diagnosa Toxocariasis

Diagnosis toxocariasis secara konvensional dengan pemeriksaan feses untuk menemukan telur *Toxocara* tidak selalu dapat dilakukan karena cacing dewasa *Toxocara cati* hanya terdapat pada induk semang definitif yaitu anak kucing dan kucing jantan dewasa. Sedangkan pada induk semang non definitif termasuk manusia perkembangan *Toxocara cati* terhenti pada larva stadium ke 2 (Kusnoto dkk, 2005) selain itu diagnosa berdasarkan gejala klinis dan biopsi untuk menemukan larva infeksiif juga sulit dilakukan karena gejala klinis pada penderita toxocariosis tidak menunjukkan tanda yang pathognomonik dan biopsi pada organ sulit dilakukan karena larva stadium kedua bisa terdapat pada berbagai organ induk semang non definitif (Noordin *et al.*, 2005 ; Huh and Lee, 2006). Sehingga satu-satunya sarana diagnostik yang penting pada infeksi ini adalah uji serologik. Pada imunodiagnosis secara garis besar yang dideteksi adalah reaksi kekebalan induk semang dan antigen dari parasit (Gandahusada, 2006).

Reaksi humoral terhadap parasit dari induk semang merupakan salah satu reaksi kekebalan yang spesifik. Diagnosis berdasarkan reaksi humoral pada dasarnya adalah untuk mendeteksi imunoglobulin yang ada dalam serum atau plasma. Diagnosis untuk parasit secara imunologi terutama ditujukan pada Ig G,

Ig M dan Ig E. 80% dari seluruh imunoglobulin adalah Ig G, sebaliknya Ig E hanya 0,002% dan Ig M sekitar 13% dari seluruh imunoglobulin. Karena itu kebanyakan tes serologi untuk reaksi humoral adalah dengan mendeteksi Ig G (Gandahusada, 2006).

Beberapa uji imunologik dapat dilakukan pada diagnosa toxocariasis. Salah satunya adalah uji serologik menggunakan teknik ELISA yang memiliki sensitivitas dan spesifisitas tinggi dibandingkan beberapa uji imunologik yang lain. Antigen yang banyak digunakan pada teknik ELISA saat ini adalah *excretory-secretory* yang didapat dari media kultur larva *Toxocara cati* atau TES antigen. (Skeuer, 1987 dikutip oleh Overgaaauw and Van Knapen, 2000 ; Acha and Szyfres, 1995).

2.5. Antigen Parasit

Secara umum antigen didefinisikan sebagai sesuatu yang asing oleh sistem imun tubuh (Gershwin, 1997). Menurut Baratawidjaya, 2006 saat ini pengertian antigen mengandung dua arti yaitu antigen dan imunogen. Antigen adalah substansi yang dapat terikat secara spesifik dengan molekul antibodi atau reseptor sel T. Sedangkan molekul yang dapat menstimulasi respon imun disebut imunogen (Abbas and Lichtman, 2003).

Molekul dapat bersifat imunogen apabila memiliki beberapa karakteristik. Diantaranya keasingan terhadap tubuh hospes, ukuran minimum tertentu dengan berat molekul lebih besar dari 10.000 Da, struktur kimiawi yang kompleks, serta memiliki kekakuan molekuler (Gershwin, 1997; Jackson, 1993). Bahan kimia dengan ukuran molekul yang kecil (hapten) dapat terikat pada antibodi, tetapi

bahan tersebut tidak dapat menimbulkan respon imun. Untuk memacu respon imun hapten harus terikat pada molekul besar sebagai pembawa. Sehingga hapten dapat berperan sebagai imunogen (Baratawidjaya, 2006).

Tizard, 1982 menyebutkan bahwa protein merupakan antigen yang terbaik karena ukuran dan karumitannya. Hampir semua protein yang berat molekulnya lebih besar dari 1000 Da adalah antigenik.

Antigen yang berasal dari parasit terdiri dari berbagai macam jenis yang dirinci berdasarkan sumber, lokasi parasit dan siklus hidup parasit. Berdasarkan sumber dan lokasi parasit, antigen terdiri atas: 1) exoantigen terlarut yang berasal dari parasit hidup atau parasit dalam media buatan merupakan produk ekskresi berupa metabolit; 2) Antigen somatic terlarut yang berasal dari cacing dewasa, larva yang hancur atau dari sel permukaan tubuh parasit; 3) parasit yang mati atau fragmen tubuhnya; 4) parasit hidup yang utuh; 5) cairan tubuh nematode; 6) cairan kista larva cacing pita. Sedangkan berdasarkan siklus hidup parasit, antigen terdiri atas: 1) spesifikasi genus, spesies, strain dan stadium hidup; 2) parasit yang mengalami perubahan bentuk (Tizard, 1982; el-Massry, 1999 dikutip oleh Yasmin, 2003).

Parasit mengandung berbagai macam antigen somatik dan antigen metabolik. Beberapa antigen diantaranya bersifat spesifik stadium sehingga bersifat sementara, sedangkan antigen yang lain tetap ada pada seluruh siklus hidup parasit dan merangsang terus menerus respon imunologik (Cypess, 1993).

Cacing mempunyai beberapa stadium yang berbeda dalam daur hidupnya sehingga akan menimbulkan respon imun terhadap antigen yang bervariasi pada induk semang (Patterson, 1995). Perbedaan antar stadium dalam siklus hidup

Toxocara cati ditentukan berdasarkan perbedaan morfologi. Perangkat antigen yang berbeda-beda pada tiap stadium siklus hidup *Toxocara cati*, selain menyebabkan perbedaan imunogenitas dalam memicu terbentuknya antibodi, juga dimanfaatkan oleh cacing untuk menghindari sistem imun induk semang (Warren, 1993 dikutip oleh Setyowati, 2006).

Secara umum struktur antigen yang dimiliki parasit cacing antara lain antigen permukaan, antigen internal yang dilepas pada saat pemangsaan, ekskresi ganti kulit dan berbiak (yaitu fraksi *excretory-secretory* atau ES) serta residu antigen somatik (More, 1995).

Berdasarkan siklus hidup *toxocara cati* yang kompleks, pengamatan terhadap protein antigen dapat dilakukan terhadap telur, larva (L1, L2, L3 dan L4) maupun cacing dewasa. Pada telur cacing protein antigenik dapat diperoleh dari kulit telur, *membrane vitelin* dan *granular layer*. Sedangkan pada stadium larva dan dewasa yang paling sering digunakan adalah antigen *excretory-secretory* (ES antigen), *surface* antigen dan antigen somatik (*whole extract*) (Kusnoto dkk, 2005).

2.6. Respon Imun Terhadap Cacing

Pemaparan terhadap imunogen akan menghasilkan antibodi spesifik yang akan muncul dalam serum sesudah beberapa waktu kemudian. Pemaparan pertama pada imunogen membangkitkan respon primer. Segera sesudah pengenalan pada imunogen akan memasuki periode induktif dimana selama periode ini imunogen dikenali dan diproses kemudian terjadi pengiriman sinyal pada sel-sel yang sesuai dan ditugaskan untuk memproduksi antibodi. Periode ini

dikarakterisasi dengan proliferasi dan deferensiasi seluler. Lamanya periode ini bervariasi dan tergantung pada beberapa faktor (Herscowitz, 1993).

Setelah timbulnya antibodi pertama pada akhir periode induksi, dimulailah waktu biosintesis aktif antibodi. Konsentrasi antibodi bertambah secara logaritmik selama empat sampai sepuluh hari sampai konsentrasi ini mencapai puncaknya. Setelah itu kadar antibodi dalam sirkulasi berada dalam keadaan konstan. Tetapi keadaan yang konstan ini tidak berlangsung lama bahkan pada beberapa kasus keadaan yang konstan ini hampir tidak pernah terjadi yang akhirnya terjadi penurunan kadar antibodi (Hercowitz, 1993).

Menurut Tizard (1982) imunoglobulin terpenting yang terlibat dalam resistensi terhadap cacing adalah imunoglobulin E. Imunoglobulin ini memiliki peranan dalam mengurangi jumlah cacing. Walau demikian antibodi dari kelas yang lain meliputi Ig M, Ig G dan Ig A tetap diproduksi sebagai fungsi proteksi pada tanggap kebal terhadap antigen cacing. Mekanisme yang terlibat pada infeksi cacing meliputi netralisasi yang diperantarai antibodi terhadap enzim proteolitik yang dipakai oleh larva untuk menembus jaringan, penyumbatan lubang anus dan mulut larva oleh kompleks kebal karena kemampuan antibodi untuk berikatan dengan produk ekskresi dan sekresi dari larva, serta pencegahan terhadap eksidisi dan perkembangan larva. Sedangkan pada cacing dewasa antibodi mampu menghalangi jalur enzim yang menyebabkan terhentinya produksi telur bahkan mengganggu perkembangan struktur anatomi cacing dewasa.

Respon imun untuk menghancurkan cacing melibatkan mekanisme interaksi antara sel mast, Ig E, Ig G dan eosinofil. Dengan melibatkan sel mast, Ig E merangsang pelepasan faktor anafilaksis kemotaktik eosinofil yang akan

memobilisasi cadangan eosinofil kedalam sirkulasi dalam jumlah besar. Pada infeksi cacing, eosinofil bersama antibodi dan komplemen dapat membunuh beberapa larva serta mampu menetralkan bahan vasoaktif yang dikeluarkan dari sel mast. Parasit cacing dapat dihancurkan oleh eosinofil apabila parasit tersebut telah dilapisi imunoglobulin G atau Ig E karena eosinofil dapat mendekat dan melekat pada permukaan parasit cacing melalui Ig G. (Tizard, 1982 ; Kresno, 2001)

Respon imun humoral dilaksanakan oleh sekelompok limfosit yang berdiferensiasi di sumsum tulang yang biasa disebut limfosit B (sel B) beserta produknya yaitu antibodi (Bellanti dan Kadlec, 1993 ; Kresno, 2001). Secara umum respon imun humoral ini biasanya dimulai dengan aktivitas makrofag atau *antigen presenting cell* (APC) yang memproses antigen, kemudian mempresentasikan fragmen-fragmen antigen pada permukaan sel bersama dengan *major histocompatibility complex* (MHC). Antigen yang telah diproses oleh APC dan dipresentasikan bersama MHC kelas II tersebut akan dikenali dan bereaksi dengan sel T. Interaksi ini merupakan sinyal bagi sel T untuk berproliferasi dan melepaskan sejumlah limfokin atau sitokin yang selanjutnya merangsang sel B untuk berproliferasi dan berdiferensiasi sehingga mampu memproduksi antibodi (Kresno, 2001).

Pertahanan terhadap infeksi cacing banyak diperankan oleh aktivasi sel Th 2 yang melepas IL-4, IL-5 dan IL-13. IL-4 dan IL-13 merangsang produksi Ig E sedangkan IL-5 merangsang perkembangan dan aktivasi eosinofil (Abbas and Lichtman, 2003 ; Baratawidjaya, 2006).

2.6.1 Antibodi

Antibodi adalah protein serum terlarut yang dihasilkan akibat adanya imunogen, yang beredar diseluruh jaringan dan sirkulasi darah. Antibodi merupakan imunoglobulin yang disekresi oleh sel B yang telah teraktivasi oleh antigen. Antibodi yang telah terbentuk secara spesifik ini akan mengikat antigen baru yang sejenis (Rantam, 2003). Karena molekul antibodi adalah globulin, maka secara umum antibodi dikenal sebagai imunoglobulin (yang disingkat Ig). Istilah imunoglobulin dipakai untuk menggambarkan semua protein yang mempunyai aktivitas antibodi maupun beberapa protein yang mempunyai struktur imunoglobulin tetapi tidak memiliki aktivitas antibodi (Tizard, 1982). Jika pemisahan secara elektroforesis dilakukan pada protein serum maka akan didapatkan beberapa fraksi meliputi albumin, alfa (α) globulin, beta (β) globulin, dan gama (γ) globulin (Gershwin, 1997). Menurut Baratawidjaya (2006) imunoglobulin paling banyak terdapat pada fraksi gama globulin meskipun ada beberapa imunoglobulin juga ditemukan dalam fraksi globulin alfa dan beta.

Terdapat lima kelas antibodi yaitu Ig A, Ig D, Ig E, Ig G dan Ig M (Abbas and Lichtman, 2003). Menurut Smith 1993, infeksi toxocara dapat menstimulasi produksi Ig M, IgG, dan Ig E. Semua molekul imunoglobulin memiliki struktur dasar yang sama, terdiri atas 4 rantai polipeptida yang terikat pada ikatan disulfida dengan 2 rantai yaitu rantai ringan (berat molekul 22.000 Da) dan rantai berat (berat molekul 55.000 Da) yang identik (Gershwin, 1997 ; Baratawidjaya, 2006).

2.6.2 Imunoglobulin G

Imunoglobulin G adalah kelas imunoglobulin yang memiliki konsentrasi tertinggi dalam serum darah. Karena itu Ig G memainkan peran utama dalam mekanisme pertahanan yang diperantarai oleh antibodi (Tizard, 1982). Kadarnya dalam serum sekitar 13 mg/ml, merupakan 75% dari semua imunoglobulin dengan berat molekul 160.000 Da (Baratwidjaya, 2006). Imunoglobulin G termasuk imunoglobulin yang penting terhadap pertahanan induk semang karena mampu menembus dan keluar sistem vaskular dan didistribusikan secara menyeluruh pada cairan ekstrasvaskular untuk menjalankan berbagai fungsi protektif di jaringan (Gershwin, 1997 ; Kresno, 2001).

Kelas imunoglobulin ini membantu imunitas melawan beberapa agen infeksi yang disebarkan melalui darah seperti bakteri, virus, parasit dan beberapa jamur (Bernier, 1993). Imunoglobulin G berperan dalam opsonisasi, aktivasi komplemen, sebagai imunitas neonatal, feedback inhibisi dari sel B, serta sebagai *antibodi dependent cell mediated cytotoxicity* (ADCC) (Abbas and Lichtman, 2003).

2.6.3 Imunoglobulin M

Imunoglobulin M memiliki konsentrasi nomor dua tertinggi dalam serum dengan berat molekul 900.000 dalton (Tizard, 1982). Imunoglobulin M merupakan imunoglobulin yang berukuran paling besar sehingga terutama terdapat intravaskular dengan volume sebesar 10% dari imunoglobulin total dalam serum. Imunoglobulin M adalah kelas imunoglobulin yang dibentuk pertama kali

atas rangsangan antigen, tetapi responnya pendek hanya beberapa hari kemudian menurun. (Kresno, 2001).

Kelas imunoglobulin ini sangat efisien pada aktivasi komplemen, sebagai reseptor antigen pada sel B, opsonisasi, netralisasi virus serta aglutinasi (Tizard, 1982 ; Abbas and Lichtman, 2003).

2.6.4 Imunoglobulin E

Imunoglobulin E dapat dijumpai dalam serum dengan kadar amat rendah, hanya merupakan 0,0004% dari kadar imunoglobulin total dengan berat molekul 196.000 dalton. Salah satu sifat dari Ig E adalah kemampuannya melekat erat pada permukaan sel mast dan basofil melalui reseptor Fc (fragmen *crystallizable*) dan bersama-sama dengan antigen menyebabkan keluarnya zat vasoaktif dari sel-sel ini. Imunoglobulin E memiliki peranan penting dalam memperantarai reaksi hipersensitivitas tipe segera dan diduga berperan melindungi tubuh dari infeksi parasit cacing karena imunoglobulin ini banyak dijumpai pada penderita dengan infestasi cacing. Akhir-akhir ini terungkap bahwa parasit yang dilapisi immunoglobulin E lebih mudah dibunuh oleh eosinofil (Tizard, 1982 ; Kresno, 2001).

2.7. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*

Enzyme linked immunosorbent assay biasa disingkat ELISA adalah salah satu uji dengan sensitivitas tinggi yang dapat digunakan untuk mendeteksi baik antigen maupun antibodi. Aplikasi ELISA meliputi diagnostik penyakit noninfeksius maupun penyakit infeksius (Gershwin, 1997). Ciri utama teknik

ELISA adalah penggunaan indikator enzim untuk reaksi imunologi (Burgess, 1995). Metode ELISA pertama kali diperkenalkan oleh Engvall dan Perlman pada tahun 1971 dengan cara mengkonjugasikan enzim dan *immunoassay* (Rantam, 2003).

Sejak pertama kali dipublikasikan teknik ini telah mengalami banyak perubahan. Dapat dikatakan bahwa ELISA telah berkembang sampai pada tingkatan yang sulit untuk membuat generalisasi tentang kemampuan kinerja berbagai konfigurasi (Burgess, 1995). Meskipun demikian, ELISA tetap memiliki prinsip dasar yaitu: pelapisan antigen kelubang mikropate kemudian direaksikan dengan antibodi pertama lalu direaksikan lagi dengan antibodi kedua (*conjugate fragment immunoglobuline G* atau M) selanjutnya divisualisasikan dengan substrat peroksidase atau alkalin fosfatase (Rantam, 2003).

Salah satu konfigurasi ELISA paling sederhana yang dapat digunakan untuk mengukur titer antibodi adalah *indirect* ELISA (Burgess, 1995). *Indirect* ELISA merupakan model ELISA yang banyak digunakan pada berbagai tingkatan laboratorium dan sering digunakan secara rutin untuk diagnosa antigen maupun antibodi (Rantam, 2003). Prinsip dasar *indirect* ELISA adalah antigen teradsorpsi pada substrat padat, antibodi primer tidak berlabel diperoleh dari serum atau cairan tubuh yang lain, serta antibodi sekunder yang terikat pada enzim yang sesuai (antibodi ini biasanya disebut sebagai konjugat), kemudian hasil akan tampak bila ditambahkan substrat. Pada *indirect* ELISA antigen dan antibodi sekunder biasanya dibuat konstan dan yang berubah adalah antibodi primernya (Burgess, 1995).

Pembacaan hasil ELISA dapat dilakukan dengan melihat perubahan warna secara visual untuk menentukan penilaian positif atau negatif. Selain itu penilaian menggunakan perangkat spektrofotometer dapat dilakukan untuk mendapatkan hasil secara kuantitatif dari nilai absorben (*clinical biochemistry*). Dalam hal ini penilaian atas dasar kerapatan optik yang berhubungan dengan konsentrasi antibodi primer (Burgess, 1995).

BAB 3

MATERI DAN METODE

BAB 3 MATERI DAN METODE

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Helmintologi bagian Parasitologi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya dan Laboratorium *Tissue Culture Tropical Disease Center* (TDC) Surabaya, selama 8 bulan dimulai bulan Oktober 2007 sampai dengan bulan Juni 2008.

3.2. Peralatan Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain mikroskop *inverted*, mikroskop cahaya, mikroskop *dissecting*, gunting bedah, scalpel, pinset, nampan plastik, penyemprot, cawan petri, tabung reaksi, corong, mortir, *sput disposable*, sonde, filter kuran 1 mm, filter ukuran 25 μm , sentrifus, *object glass*, *cover glass*, *beacker glass*, *microtube*, tabung konikal, pipet plastik, pipet *ependorf*, inkubator, freezer, microplate untuk ELISA, gelas ukur, mikropipet multichannel, *yellow tips*, *blue tips*, timbangan elektrik, magnetik stirrer, magnetik bar, *vortex*, spektrofotometer, ELISA *reader*.

3.3. Bahan Penelitian

Bahan utama pada penelitian ini adalah telur infeksi, serum mencit yang telah diinfeksi dengan telur *Toxocara cati* serta ES (*excretory-secretory*) dari L2 dorman *Toxocara cati*. Bahan-bahan lain yang digunakan untuk isolasi cacing *Toxocara cati*, isolasi L2 *Toxocara cati*, dan isolasi L2 dorman *Toxocara cati*

adalah aquadest, *Phosphate Buffer Saline* (PBS) 10%, ether, larutan sukrosa dengan beberapa konsentrasi dan warna, formalin 1%, larutan tripsin 1%.

Bahan yang digunakan untuk deteksi antibodi menggunakan teknik *indirect* ELISA adalah antigen (ES L2 dorman *Toxocara cati*), *carbonate buffer*, *washing buffer* (PBS-T), *blocking buffer*, antibodi (serum mencit yang diinfeksi buatan dengan telur infeksi *Toxocara cati*), HRP-*conjugated* Ig G anti mouse, TMB *substrate*, dan H₂SO₄ 1N.

3.4. Metode Penelitian

3.4.1 Isolasi telur infeksi (mengandung L2) *Toxocara cati*

Isolasi L2 *Toxocara cati* pada penelitian ini dilakukan dengan dua cara yaitu: 1). Menginkubasi cacing *Toxocara cati* dewasa. 2). Pemurnian telur *Toxocara cati* dari feses kucing penderita toxocariasis.

Inkubasi cacing *Toxocara cati* dewasa dimulai dengan *euthanasia* menggunakan ether secara open drop pada kucing penderita Toxocariasis. Setelah kucing mati, dilakukan pembedahan saluran cerna untuk memperoleh cacing dewasa. Kemudian cacing yang diperoleh dicuci dengan PBS sampai bersih. Selanjutnya dilakukan identifikasi dibawah mikroskop *dissecting*. Bila cacing yang diperiksa teridentifikasi sebagai cacing *Toxocara cati*, maka cacing tersebut dimasukkan ke dalam cawan petri yang berisi PBS kemudian diinkubasi di dalam inkubator pada suhu 37°C. Setiap hari dilakukan pengamatan bila ada cacing yang mati harus dipisahkan dan volume PBS harus selalu dijaga. Setelah hari ketiga media PBS yang mengandung telur *Toxocara cati* dikeluarkan dari inkubator kemudian dilakukan pemeliharaan dan bila perlu dilakukan penambahan beberapa

tetes formalin 1%. Pemeliharaan dilakukan selama 21-28 hari pada suhu ruang hingga telur berkembang menjadi L2.

Isolasi telur *Toxocara cati* dari feses kucing penderita toxocariasis dilakukan dengan teknik gradien preparasi. Langkah-langkah pelaksanaan gradien preparasi adalah diawali dengan koleksi feses kucing penderita toxocariasis. Kemudian feses digerus dan diencerkan menggunakan PBS dengan perbandingan 1:10 lalu disaring dengan filter 1mm. Hasil penyaringan disentrifus 1500 rpm selama 5 menit untuk mendapatkan endapan. Selanjutnya disiapkan larutan sukrosa berbagai konsentrasi mulai konsentrasi 20%, 25%, 30%, 35% dan 40% dengan perbedaan warna pada masing-masing konsentrasi. Kemudian larutan sukrosa tersebut dimasukkan ke dalam tabung sentrifus masing-masing konsentrasi sebanyak 2 ml dengan jarum spuit berjarum trokar hingga ke dasar tabung dimulai dari konsentrasi terendah sampai konsentrasi tertinggi dan bagian teratas dimasukkan feses hasil endapan sebanyak 2 ml, lalu disentrifus 1500 rpm selama 5 menit. Setelah disentrifus akan terbentuk kabut berwarna putih yang menyerupai cincin diantara sukrosa berkonsentrasi 30% -35% disinilah telur *Toxocara* berada. Bentuk kabut berwarna putih tersebut kemudian diambil menggunakan spuit berjarum trokar lalu disaring dengan filter berukuran 25 μ m, dan disemprot dengan aquadest agar larutan sukrosa terjatuh dan meninggalkan telur *Toxocara cati* yang menempel pada filter. Telur tersebut kemudian dipindahkan pada cawan petri yang berisi PBS sebagai media pemupukan dan ditambahkan formalin 1% beberapa tetes bila perlu untuk mencegah perkembangan mikroorganisme pengganggu sampai terbentuk telur infeksi (mengandung L2) selama 21-28 hari.

3.4.2 Penghitungan telur

Penghitungan telur pada penelitian ini dilakukan dengan modifikasi dari penghitungan TCPGT (telur cacing pergram tinja) metode *Lucient Brumpt* (Sosiawati dkk, 2007). Modifikasi dilakukan untuk menyesuaikan dengan media dari telur yang akan dihitung karena dalam penelitian ini telur yang akan dihitung berada dalam media kultur sedangkan penghitungan TCPGT metode *Lucient Brumpt* penghitungan didasarkan pada berat sampel tinja.

Langkah operasional penghitungan telur dilakukan dengan cara sebagai berikut : 1).Diambil 1 ml suspensi telur *T. cati* dari media kultur. 2). Suspensi tersebut kemudian diencerkan 10 kali menjadi 10 ml suspensi. 3). Selanjutnya diambil satu mili untuk dihitung jumlah tetes pada setiap satu mili suspensi dengan menggunakan pipet pasteur. 4). Satu tetes suspensi diletakkan pada gelas obyek, ditutup dengan gelas penutup dan diperiksa dibawah mikroskop dengan pembesaran 100 kali. 5). Telur yang tampak pada mikroskop dihitung jumlahnya.

Berdasarkan penghitungan TCPGT, untuk mengetahui jumlah telur *T. cati* dalam tiap ml suspensi media kultur, digunakan rumus : jumlah tetes setiap ml (N) x jumlah telur cacing tiap tetes (n) x jumlah pengenceran.

3.4.3 Infeksi buatan pada mencit

Tujuan infeksi buatan ini dilakukan untuk mendapatkan serum yang mengandung antibodi terhadap *Toxocara cati*. Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah 5 ekor mencit jantan (*Mus musculus*) berumur delapan minggu dengan berat badan rata-rata 40 gram. Kelima mencit tersebut diinfeksi

dengan telur infeksi *Toxocara cati* sebanyak 17 butir/gram berat badan dan diambil darahnya melalui ekor.

Sebelum diinfeksi, kelima ekor hewan coba telah diambil darahnya sebagai perlakuan nol (T0). Pengambilan darah selanjutnya dilakukan pada hari ketujuh sebagai perlakuan ke 1 (T1), kemudian perlakuan (T2) dilakukan pengambilan darah pada hari ke 14 dan perlakuan (T3) pengambilan darah dilakukan pada hari ke 28. Dari pengambilan darah ini hanya diperoleh 19 sampel yang seharusnya 20 sampel darah karena pada hari ketujuh hanya 4 ekor mencit yang dapat diambil darahnya.

Semua sampel darah yang diperoleh masing-masing dimasukkan ke dalam microtube dan disentrifus 3000 rpm selama 5 menit untuk mendapatkan serum yang mengandung antibodi anti L2 *Toxocara cati*. Serum yang didapat kemudian diuji menggunakan teknik *indirect* ELISA untuk mengetahui nilai OD yang ada pada tiap-tiap sampel.

3.4.4 Isolasi larva kedua jaringan (L2 dorman) *Toxocara cati*

Larva kedua jaringan (L2 dorman) *Toxocara cati* diperoleh dari mencit yang telah diinfeksi telur infeksi (mengandung L2) dengan dosis 17 butir/gr berat badan. Empat hari setelah infeksi mencit dieuthanasi menggunakan ether dan dibedah untuk mendapatkan jaringan somatik, organ saluran pencernaan dan organ visceral (hati, jantung, ginjal dan paru-paru). Bagian dari organ tersebut kemudian dipotong kecil-kecil dan dicuci 2 kali menggunakan PBS. Selanjutnya potongan-potongan dari organ tersebut dimasukkan ke dalam cawan petri yang telah diisi tripsin 1% dan diinkubasikan selama 30 menit di dalam inkubator

dengan suhu 37°C. Setiap 30 menit dilakukan pengambilan L2 yang telah terlepas dari organ sampai habis. Pengambilan dilakukan di bawah mikroskop menggunakan pipet.

3.4.5 Pembuatan *excretory-secretory* (ES) L2 dorman *Toxocara cati*

Excretory-secretory (ES) L2 dorman *Toxocara cati* diperoleh dengan cara menginkubasikan L2 dorman dalam media PBS pada suhu 37°C selama 4 jam. Selanjutnya cairan hasil inkubasi diambil sebagai ES L2 dorman *Toxocara cati*. Cairan kemudian ditampung dalam tabung dan disentrifus 35.000 rpm pada suhu 4°C selama 20 menit untuk pepadatan. Setelah sentrifugasi, diambil peletnya dan dilakukan peneraan kadar protein menggunakan spektrofotometer. Kadar protein yang telah diketahui akan digunakan sebagai dasar pengenceran. ES L2 dorman ini selanjutnya dipakai sebagai antigen pada uji *Indirect-ELISA*.

3.4.6 *Indirect-ELISA*

Indirect-ELISA pada penelitian ini dilakukan dengan langkah-langkah sebagai berikut : 1). **Coating** antigen dilakukan dengan mengencerkan antigen ke dalam *carbonat buffer* dengan konsentrasi 50 µg/well. Setelah diencerkan antigen dimasukkan ke dalam sumuran *microplate* (*well*) masing-masing sebanyak 50 µl. Kemudian *microplate* ditutup dengan plastik bening lalu diinkubasi pada suhu 4°C selama 18 jam. Setelah diinkubasi antigen dibuang dan dilanjutkan dengan pencucian *microplate* sebanyak 3 kali menggunakan PBS-*Tween*. 2). **Blocking**. 200 µl *blocking buffer* dimasukkan kedalam tiap sumuran *microplate* dan diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 1 jam. Kemudian *microplate*

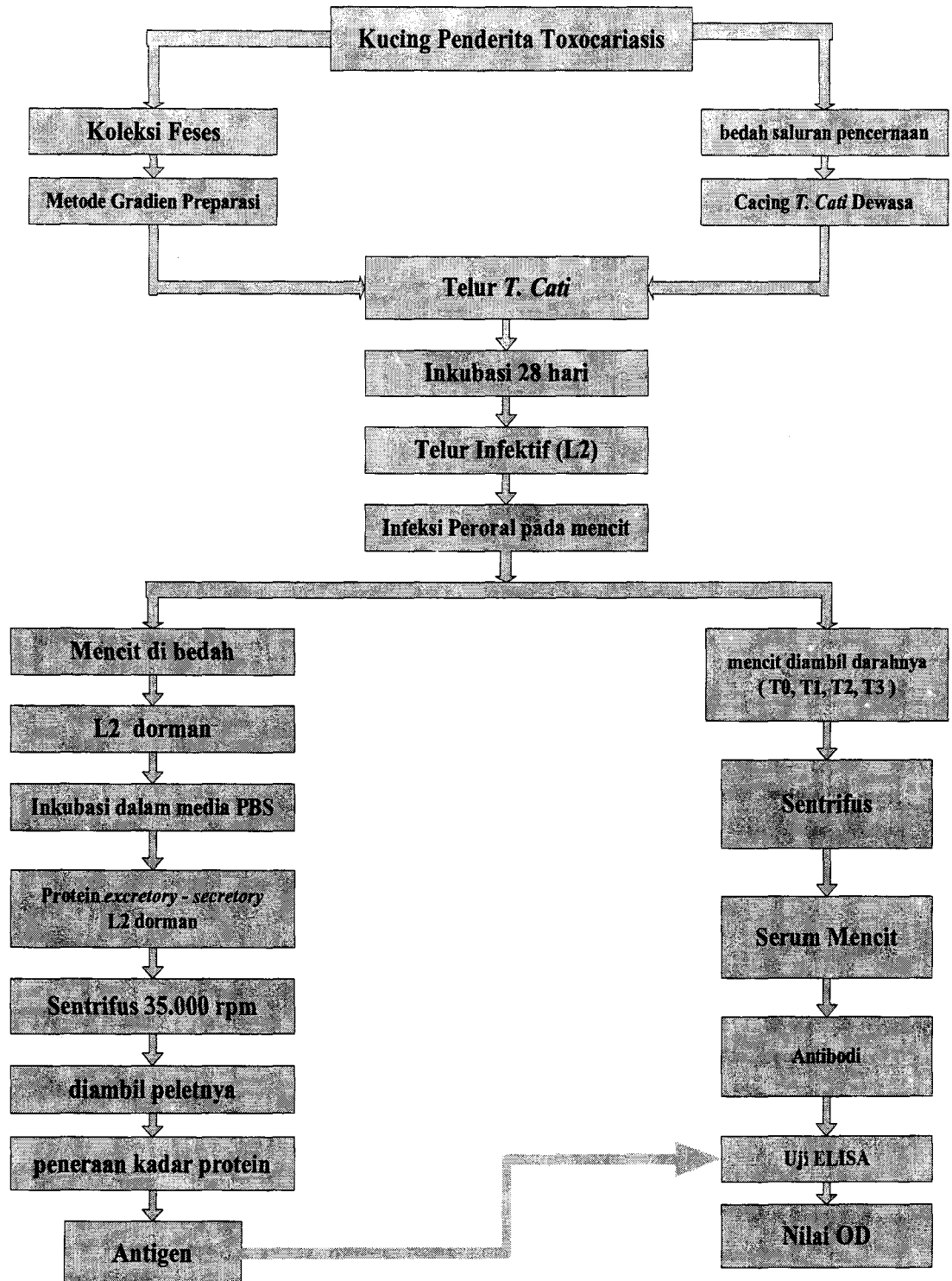
dicuci sebanyak 4 kali menggunakan PBS-*Tween*. 3). **Inkubasi serum.** Serum yang akan diperiksa (dari mencit yang diinfeksi dengan telur infeksi *Toxocara cati*) diencerkan menggunakan *blocking buffer* dengan perbandingan 1:25 kemudian dimasukkan ke dalam tiap sumuran *microplate* sebanyak 50 μ l dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Selanjutnya dilakukan pencucian sebanyak 4 kali menggunakan PBS-*Tween*. 4). **Inkubasi konjugat.** Konjugat (HRP-*conjugate* Ig G anti-mouse) diencerkan dengan perbandingan 1:100 menggunakan *blocking buffer*, kemudian dimasukkan ke dalam tiap sumuran *microplate* sebanyak 50 μ l. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam dan dilakukan pencucian setelah inkubasi sebanyak 4 kali menggunakan PBS-*Tween*. 5). **Inkubasi substrat.** Substrat (TMB *Substrate*) sebanyak 50 μ l dimasukkan ke dalam tiap sumuran *microplate* kemudian diinkubasi selama 30 menit di ruang gelap hingga tampak warna kekuningan. Tambahkan 50 μ l H₂SO₄ 1N pada tiap sumuran sebagai *stop* reaksi. Langkah terakhir pada *indirect-ELISA* ini adalah pembacaan nilai *Optical Density* (OD) menggunakan *ELISA reader* dengan panjang gelombang 450 nm.

3.5 Rancangan Penelitian dan Analisis Data

Rancangan yang digunakan pada penelitian ini adalah *Time-Series Experiment*. Prinsip dasar dari rancangan ini merupakan presensi dari proses pengukuran secara periodik pada suatu kelompok atau individu (Campbell and Stanley, 1963). Data yang diperoleh dari hasil uji *indirect ELISA* kemudian dianalisis menggunakan *statistical program and service solution* (SPSS) rel 13,0

for windows. Apabila terdapat perbedaan bermakna, penghitungan dilanjutkan dengan uji Duncan 5%.

3.6 Kerangka Operasional Penelitian



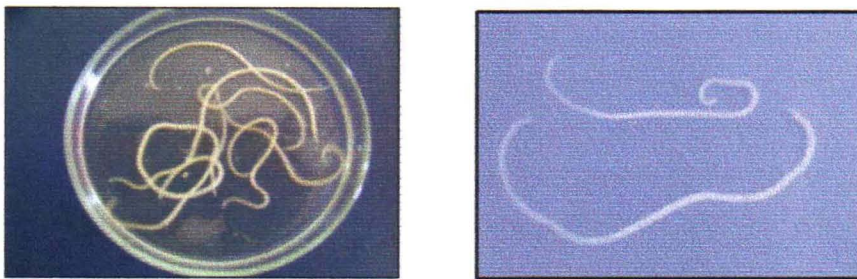
BAB 4

HASIL PENELITIAN

BAB 4 HASIL PENELITIAN

4.1. Isolasi cacing *Toxocara cati* dewasa

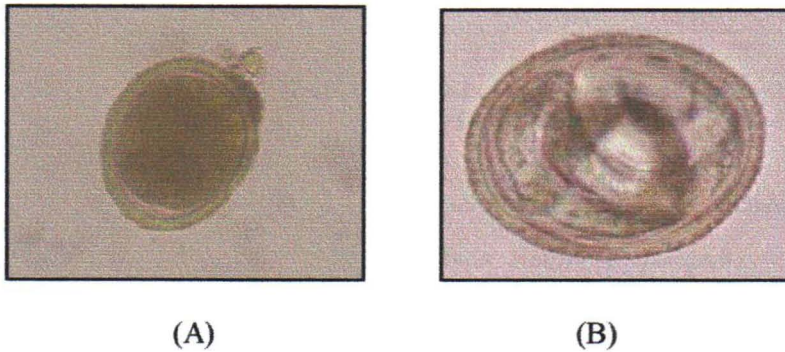
Isolasi cacing *Toxocara cati* dewasa pada penelitian ini diperoleh melalui pembedahan saluran pencernaan kucing penderita toxocariasis. Hasil isolasi dapat dilihat pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Hasil isolasi cacing *Toxocara cati* dewasa.

4.2. Isolasi Larva Kedua (L2) *Toxocara cati*

Telur yang diperoleh dari inkubasi cacing *Toxocara cati* dewasa dan pemurnian feses penderita harus dilakukan identifikasi sebelum dilakukan pemupukan dalam media PBS pada suhu kamar. Selama proses pemupukan perkembangan telur diamati secara rutin menggunakan mikroskop *inverted* dengan pembesaran 100 kali hingga 400 kali. Dua puluh delapan hari pasca pemupukan dilakukan pemanenan larva kedua (L2) seperti tampak pada Gambar 4.2 berikut.



Gambar 4.2 (A) Telur *T. cati*. (B) Larva stadium kedua (L2) *T. cati*.

4.3. Penghitungan Telur

Penghitungan telur dilakukan dengan metode modifikasi penghitungan TCPGT. Langkah awal yang dilakukan untuk penghitungan ini adalah penghitungan tetes menggunakan pipet Pasteur dan diketahui dalam satu ml suspensi terdiri atas 20 tetes. Pada penghitungan awal menggunakan mikroskop diketahui dalam satu tetes suspensi jumlah telur sangat banyak dan tidak bisa dihitung. Oleh karena itu dilakukan pengenceran 10 kali dengan harapan telur yang ada dapat terhitung. Ternyata pada pengenceran ini terdapat 15 butir telur pada tiap tetesnya. Berdasarkan prinsip penghitungan TCPGT dapat diketahui jumlah telur dalam satu ml berdasarkan rumus : jumlah tetes setiap satu ml suspensi (N) x jumlah telur cacing tiap tetes (n) x pengenceran. Dalam penelitian ini didapatkan $N = 20$, $n = 15$, dan pengencerannya 10 kali, maka jumlah telur *T. cati* tiap ml suspensi media kultur adalah $20 \times 15 \times 10 = 3.000$ butir telur.

4.4. Isolasi Larva kedua (L2) Dorman *Toxocara cati*

Larva kedua (L2) dorman diperoleh melalui preparasi organ visceral (hati, jantung, ginjal dan paru) serta jaringan somatik dari mencit yang telah diinfeksi peroral dengan telur infeksius. Hasil isolasi tampak pada Gambar 4.3.



Gambar 4.3 Pengamatan L2 dorman menggunakan mikroskop *dissecting* dengan pembesaran 200x

4.5. Pembuatan *excretory-secretory* (ES) L2 dorman *Toxocara cati*

Medium inkubasi dari L2 dorman *T. cati* mengandung *excretory-secretory* L2 dorman *T. cati*. Sebelum digunakan sebagai antigen pada uji ELISA, medium inkubasi ini disentrifus 35.000 rpm pada suhu 4°C selama 20 menit kemudian diambil peletnya dan ditera kadar proteinnya menggunakan spektrofotometer untuk menentukan pengenceran antigen pada uji *indirect* ELISA. Hasil pengukuran kadar protein antigen ES L2 dorman *T. cati* adalah sebesar 0,343 gr/dl.

4.6. Hasil pembacaan nilai OD dengan teknik *Indirect-ELISA*

Setelah dilakukan pengambilan serum darah mencit pada hari ke0, ke7, ke14 dan ke28 selanjutnya serum tersebut diukur kadar antibodinya melalui nilai OD yang didapat pada uji *indirect-ELISA* menggunakan Ig G anti-mouse sebagai

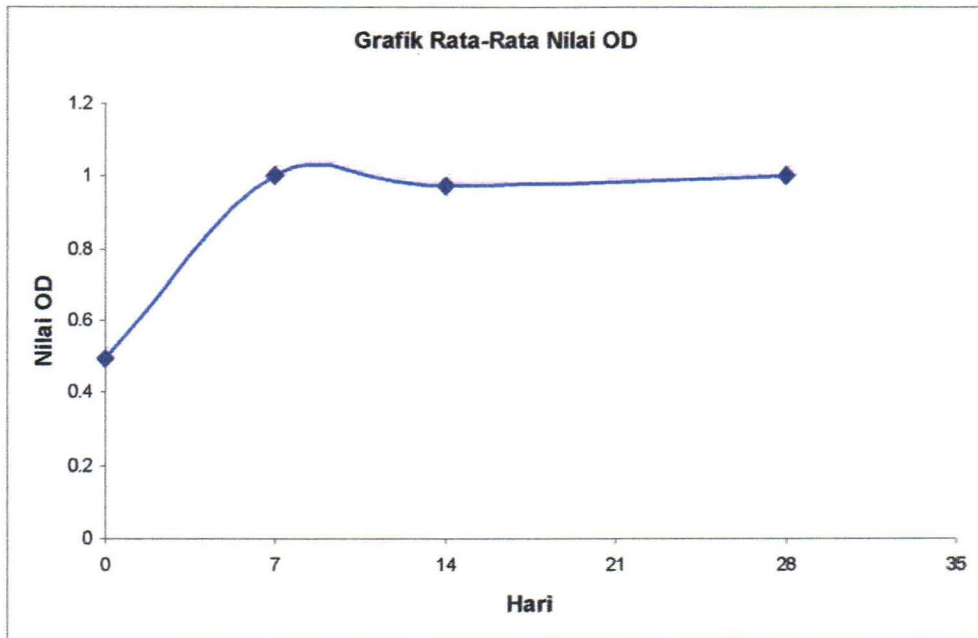
OD yang didapat pada uji *indirect-ELISA* menggunakan Ig G anti-mouse sebagai konjugat. Pembacaan nilai OD tersebut dilakukan pada panjang gelombang 450 nm menggunakan *ELISA reader*. Rata-rata nilai OD yang diperoleh terdapat pada Tabel 4.1 berikut.

Tabel 4.1 Rata-rata nilai *Optical Density* (OD) pemeriksaan antibodi mencit pada hari ke0, ke7, ke14 dan ke 28 setelah infeksi L2 *T.cati*.

Pemeriksaan serum	Nilai OD serum (X±SD)
T0 (Hari ke 0)	0,495 ^a ± 0,0367
T1 (Hari ke7)	1,004 ^b ± 0,1280
T2 (Hari ke14)	0,974 ^b ± 0,0176
T3 (Hari ke28)	1,000 ^b ± 0,0790

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan bermakna ($p < 0,05$)

Berdasarkan hasil analisis statistik dengan uji F menggunakan SPSS rel 13,00 *for windows* diketahui terdapat perbedaan yang sangat bermakna ($p < 0,01$) antar waktu deteksi yaitu T0, T1, T2 dan T3. Setelah diketahui terdapat perbedaan yang sangat bermakna maka dilakukan analisis lanjutan dengan uji Duncan dan dapat diketahui bahwa terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) antara nilai OD T0 dengan T1, T2 dan T3, sedangkan T1, T2, dan T3 memiliki nilai OD yang tidak berbeda nyata dan dapat digambarkan pada grafik berikut.



Gambar 4.4 Grafik rata-rata nilai OD untuk pemeriksaan antibodi mencit pada hari ke0, ke7, ke14 dan ke28 setelah infeksi L2 *T. cati*.

BAB 5
PEMBAHASAN

BAB 5 PEMBAHASAN

Toxocariasis adalah penyakit infeksi zoonotik yang telah tersebar luas di dunia dengan ascarid nematoda *Toxocara canis* dan *Toxocara cati* sebagai penyebabnya. Biasanya infeksi ini diperoleh karena tertelannya telur infeksiif atau larva jaringan (L2 dorman) melalui makanan atau minuman yang terkontaminasi (Noordin *et al.*, 2005 ; Kusnoto dkk., 2005).

Dalam tubuh manusia dan induk semang non definitif yang lain siklus hidup *Toxocara* tidak dapat berlangsung secara lengkap dan perkembangan parasit akan terhenti pada larva stadium kedua (L2) (Noordin *et al.*, 2005). L2 tersebut akan mengalami dormansi pertumbuhan dan tetap tinggal pada jaringan dengan dikelilingi sel-sel imun tubuh membentuk granuloma (Warren,1993 dikutip oleh Kusnoto, 2005).

Diagnosis toxocariasis pada induk semang non definitif termasuk manusia sampai saat ini masih sulit dilakukan bila didasarkan pada gejala yang timbul atau dengan mendeteksi larva infeksiif yang ada dalam material biopsi. Oleh karena itu diperlukan diagnosis atas dasar uji imunologik (Acha and Szyfres, 1995 ; Yamasaki *et al.*, 2000).

Enzyme-linked Immunosorbent assay (ELISA) merupakan salah satu uji imunologik yang dapat digunakan untuk pengukuran secara kuantitatif interaksi antara antigen dan antibodi primer. Metode ini menggunakan antibodi terikat enzim, dan titik akhir pengukuran adalah pembentukan produk enzimatik dari substrat yang dapat diukur menggunakan kolorimetri atau dengan mata biasa.

Metode ini mempunyai penerapan klinik yang luas untuk serodiagnosis pada banyak penyakit termasuk infeksi toxocariasis (Zmijewski dan Bellanti, 1993).

Antibodi yang digunakan pada uji ELISA berasal dari sampel serum darah mencit yang diinfeksi tunggal secara peroral dengan telur infeksi (L2) *Toxocara cati* dimana waktu pengambilan sampel tersebut berbeda. Infeksi tunggal secara peroral dilakukan untuk mengetahui bagaimana sebenarnya tingkat respon imun humoral yang terbentuk pada beberapa waktu yang berbeda setelah induk semang terinfeksi melalui kontaminasi makanan atau minuman. Hal ini disesuaikan dengan pola penularan toxocariasis yang banyak terjadi melalui peroral.

Pembentukan antibodi pada mencit merupakan respon imun humoral terhadap L2 *Toxocara cati* sebagai antigennya. Imunitas humoral ini diperantarai oleh sekelompok limfosit yang berdeferensiasi di sumsum tulang dan diberi nama limfosit asal sumsum tulang (*bone marrow derived*) atau biasa disebut limfosit B. Antibodi adalah produk dari elemen sel B dan mempunyai kemampuan untuk bereaksi dengan imunogen atau antigen yang merangsang pembentukannya (Bellanti dan Kadlec, 1993).

Pertahanan terhadap banyak infeksi cacing terjadi melalui respon antibodi Ig E dan eosinofil. Diduga Ig E berfungsi merangsang mastosit untuk melepaskan granulanya dan melepaskan *eosinophil chemotactic factor* sehingga eosinofil mendekat dan melekat pada permukaan parasit cacing melalui reseptor Fc. Parasit termasuk larva yang dilapisi Ig G atau Ig E dapat dihancurkan oleh eosinofil karena granula eosinofil dapat melepaskan enzim yang merusak parasit. Mekanisme ini merupakan respon ADCC (*Antibody Dependent Cell mediated Cytotoxicity*) (Kresno, 2001).

Parasit mengandung berbagai macam antigen somatik dan antigen metabolik, beberapa diantaranya spesifik stadium dan bersifat sementara sedangkan yang lain akan tetap ada pada seluruh siklus hidup parasit tersebut dan dapat merangsang terus menerus respon imunologik yang berbeda-beda. Untuk agen yang menetap di jaringan dalam waktu yang lama seperti pada keadaan L2 dorman akan menimbulkan infeksi kronis dan sebagai rangsangan antigenik yang menetap. Dalam keadaan ini respon imun humoral maupun selular dapat dideteksi dengan berbagai macam *assay*, sehingga uji serologik merupakan sarana penting dalam penegakan diagnostik penyakit parasit (Cypess, 1993).

ELISA dalam penelitian ini dilaksanakan dengan menggunakan antigen larva kedua dari *Toxocara cati excretory-secretory* (TES) yang merupakan antigen metabolik. Antigen ini umum digunakan pada imunodiagnosis untuk toxocariasis hal ini disebabkan karena pada keadaan *visceral larva migrans* (VLM) larva yang ada dalam jaringan atau organ akan terus menerus memproduksi *excretory-secretory* (ES) yang dapat dikenali sebagai benda asing oleh sistem imun tubuh dan menstimulasi pembentukan antibodi yang spesifik terhadap TES.

Nilai *optical density* (OD) dari reaksi antara antigen dan antibodi yang digunakan diperoleh dari pembacaan menggunakan ELISA *reader* pada panjang gelombang 450 nm. Nilai OD ditentukan berdasarkan perubahan warna yang terjadi setelah ditambahkan substrat kromogenik. Substrat tersebut dapat menimbulkan warna bila bereaksi dengan enzim yang telah terikat pada antibodi sekunder. Perubahan warna yang terjadi sesuai dengan jumlah enzim yang diikat dan sesuai pula dengan kadar antibodi yang sedang dicari (Baratawidjaya, 2006),

yaitu antibodi terhadap L2 *T. cati*. Nilai OD yang telah didapat kemudian dianalisis secara statistik menggunakan uji F dan dilanjutkan dengan uji Duncan.

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa nilai OD serum mencit yang diinfeksi dengan L2 *T. cati* lebih tinggi bila dibandingkan dengan serum mencit yang belum diinfeksi dengan L2 *T. cati*. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat reaksi imunologik dari mencit terhadap L2 *T. cati* yang telah diinfeksi. Berdasarkan analisis lanjutan dengan uji Duncan dapat diketahui adanya perbedaan yang bermakna antara nilai OD T0 dengan T1, T2, dan T3, sedangkan antara nilai OD T1, T2, dan T3 tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna. Dari hasil analisis diatas, dapat dilihat adanya pola respon imun humoral mencit terhadap infeksi L2 *T. cati* seperti tampak pada Gambar 4.4 dimana kadar antibodi meningkat hingga mencapai puncaknya setelah hari ketujuh pasca infeksi (T1) dan ditunjang oleh pernyataan Barriga and Omar, 1991 yang dikutip Kusnoto (2003) bahwa pada peruntan respon imun terhadap patogenitas larva, ditemukan puncak kadar antibodi sapi dewasa pada 7 hari setelah infeksi. Puncak kedua dapat terjadi pada saat terjadi migrasi larva ke organ viseral yang lain. Pengamatan pada hari ke 14 (T2) tampak sedikit penurunan walaupun tidak signifikan dan diikuti kadar antibodi yang stabil hingga hari ke-28 (T3) setelah infeksi. Keadaan yang stabil ini dapat dikarenakan adanya L2 dorman dalam jaringan dan organ induk semang yang secara terus menerus mengeluarkan ES yang dapat dikenali sebagai benda asing dan marangsang pembentukan antibodi yang konstan (Smith, 1993).

Respon imun spesifik terdiri dari beberapa fase. Fase yang pertama adalah fase pengenalan antigen, fase aktivasi limfosit, dan fase efektor yang melibatkan

imunitas humoral untuk mengeliminasi antigen. Setelah ketiga fase tersebut akan terjadi penurunan respon imun dan terbentuk sel memori. Durasi masing-masing fase dapat bervariasi pada respon imun yang berbeda (Abbas and Lichtman, 2003).

Pemaparan pertama terhadap imunogen, dalam hal ini adalah ES L2 *T. cati* akan membangkitkan respon primer. Segera sesudah pengenalan dengan imunogen oleh reseptor spesifik pada sel T, akan terjadi proliferasi dan diferensiasi seluler untuk pembentukan antibodi terhadap imunogen tersebut. Periode ini disebut periode induktif (Hercowitz, 1993 ; Baratawidjaya, 2006).

Interaksi antara antigen yang dipresentasikan oleh APC (*antigen presenting cell*) dengan limfosit T *helper* (Th) merupakan tahap awal terjadinya respon imun seluler maupun humoral yang terjadi antara satu atau dua hari setelah pemberian antigen (Abbas and Lichtman, 2003). Respon sel T terhadap antigen di samping karena adanya sinyal melalui TCR (*T cell receptor*) juga diperlukan adanya ko-stimulasi. Salah satu molekul ko-stimulasi adalah CD28 yang dapat berinteraksi dengan ligandnya yaitu CD80 dan CD86. Interaksi molekul ko-stimulasi dengan ligand tersebut menyebabkan sel T memproduksi IL2 untuk proliferasi. Sel T yang telah berproliferasi akan memproduksi IL4 dan IL6, dimana IL4 dan IL6 tersebut akan meningkatkan proliferasi dan diferensiasi sel B untuk menjadi sel plasma dan memproduksi antibodi (Kresno, 2001).

Menurut Abbas dan Lichtman (2003), tiga hingga tujuh hari setelah pemberian antigen sel B akan memproduksi antibodi. Demikian juga yang tampak pada Tabel 4.4 dimana terjadi peningkatan nilai OD yang menggambarkan titer antibodi hingga hari ketujuh setelah dilakukan infeksi.

Setelah timbulnya antibodi pertama pada akhir periode induktif, mulailah waktu biosintesis aktif antibodi yang dapat dibagi menjadi tiga fase. Pada fase pertama adalah fase logaritmik, yaitu konsentrasi antibodi bertambah secara logaritmik sampai konsentrasi mencapai puncaknya. Titer antibodi tertinggi terhadap eritrosit heterolog biasanya dicapai dalam empat sampai lima hari, terhadap protein yang larut dicapai dalam delapan sampai 12 hari dan terhadap toksid yang dibuat dari *Corynebacterium diphtheriae* adalah selama dua sampai tiga bulan (Hercowitz, 1993), sedangkan pada penelitian ini tampak bahwa titer antibodi tertinggi terhadap telur infeksi *T. cati* dicapai setelah hari ketujuh pasca infeksi.

Fase kedua biosintesis aktif antibodi adalah fase mantap yang dicapai sesudah pemaparan pertama dengan antigen. Biasanya berlangsung sangat cepat bahkan hampir tidak terdapat pada beberapa kasus (Hercowitz, 1993). Hasil penelitian ini fase mantap yang ditandai sebagai satu *plateu*, nampak dalam Gambar 4.4 berada setelah hari ketujuh dan kemudian menurun walaupun tidak signifikan hingga hari ke14.

Fase penurunan akan terjadi setelah proses katabolisme antibodi lebih besar daripada sintesis antibodi (Hercowitz, 1993), dimana sistem imun akan kembali pada keadaan keseimbangan homeostasis (Abbas and Licthman, 2003). Pada penelitian ini fase penurunan terjadi antara hari ketujuh dan hari ke14 pasca infeksi walaupun penurunannya tidak signifikan. Penurunan ini terjadi karena adanya pengaturan tanggap kebal. Terdapat beberapa macam mekanisme pengendalian tanggap kebal ini, diantaranya: 1). Pengaturan tanggap kebal oleh antigen. Pada umumnya tanggap kebal dipacu oleh antigen. Segera sesudah

antigen dilenyapkan maka rangsangan untuk proliferasi sel hilang dan tanggap kebal khusus berhenti. Bila antigen tetap ada maka tanggap kebal cenderung diperlama. 2). Pengaturan tanggap kebal oleh antibodi. Antibodi pada dasarnya mampu memberikan umpan balik yang menghambat aktivasi sel B dan produksi antibodi bila konsentrasi imunoglobulin telah mencukupi kebutuhan. 3). Pengaturan tanggap kebal oleh sel T. Disamping fungsi *helper* yang diberikan, sel T juga dapat memberikan fungsi *supresor* dengan pengurangan jumlah respon imun atau penurunan kadar sintesis imunoglobulin (Tizard, 1988 ; Herscowitz, 1993 ; Kresno, 2001). Namun fase penurunan pada penelitian ini tidak signifikan karena adanya antigen yang terus menetap dalam tubuh induk semang, sehingga tampak terus stabil hingga hari ke28 pasca infeksi.

Adanya fase-fase dalam respon imun ini ternyata menyebabkan perbedaan nilai OD pada deteksi antibodi dengan waktu yang berbeda, sehingga bentuk pola respon imun terhadap ES L2 *T. cati*, tampak seperti pada Gambar 4.4. Selain dipengaruhi oleh fase-fase respon imun yang berlangsung ternyata keberadaan larva dorman dalam tubuh induk semang dapat menyebabkan keberadaan antibodi yang persisten sehingga bentuk pola respon imun digambarkan dengan keadaan yang konstan.

BAB 6

KESIMPULAN DAN SARAN

BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Dari pembahasan tersebut diatas dapat disimpulkan bahwa:

1. Terdapat perbedaan nilai *optical density* (OD) yang mencerminkan kadar antibodi sebagai respon imun humoral pada infeksi L2 *Toxocara cati* terhadap waktu deteksi yang berbeda.
2. Nilai OD tertinggi dicapai setelah hari ketujuh dan terjadi sedikit penurunan walaupun tidak signifikan hingga hari ke14, kemudian diikuti keadaan yang konstan hingga hari ke 28 pasca infeksi.

6.2. Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang respon imun terhadap pemaparan kedua sebagai respon imun sekunder pada infeksi *Toxocara cati* sehingga dapat diketahui gambaran pola respon imun yang terjadi pada infeksi sekunder tersebut.

RINGKASAN

RINGKASAN

Toxocariasis adalah penyakit infeksi yang disebabkan oleh ascarid nematoda *Toxocara canis* dan *Toxocara cati*. Biasanya infeksi diperoleh secara *accidental ingestion* terhadap telur infeksi. Telur dikeluarkan melalui feses anjing terinfeksi *Toxocara canis* atau kucing yang terinfeksi *Toxocara cati* (Noordin *et al.*, 2004). Toxocariasis merupakan salah satu penyakit zoonosis yang telah tersebar luas diseluruh dunia.

Selama ini diagnosa toxocariasis berdasarkan gejala klinis khususnya pada induk semang non definitif sulit dilakukan karena gejala klinis yang timbul sangat bervariasi. Sedangkan diagnosa toxocariasis secara konvensional dengan cara pemeriksaan feses tidak mutlak dapat dilakukan. Oleh karena itu diperlukan diagnosis secara imunologis, salah satunya dengan menggunakan teknik *Indirect ELISA*.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui gambaran pola respon imun humoral terhadap infeksi L2 *Toxocara cati* pada beberapa waktu deteksi yang berbeda, sehingga dapat digunakan sebagai acuan dalam diagnosa toxocariasis. Serum mencit yang telah diinfeksi dengan L2 *T. cati* digunakan sebagai antibodi dan direaksikan dengan antigen yang berasal dari *excretory-secretory* L2 dorman *T. cati* menggunakan teknik *Indirect ELISA*. Hasil dari *Indirect ELISA* merupakan nilai optical density (OD) yang diperoleh dari pembacaan ELISA menggunakan ELISA reader pada panjang gelombang 450 nm. Nilai OD yang diperoleh kemudian dianalisis statistik menggunakan uji F dan dilanjutkan dengan uji Duncan.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang sangat signifikan ($p < 0,01$) antara T0, dengan T1, T2 dan T3. Pengambilan serum sebelum dilakukan infeksi ternyata memiliki nilai OD lebih rendah bila dibandingkan dengan nilai OD pada serum yang diambil setelah infeksi dimana menunjukkan adanya respon imun mencit terhadap infeksi L2 *T. cati*. Setelah dilanjutkan dengan uji Duncan, serum mencit yang diambil pada hari ketujuh setelah infeksi ternyata menunjukkan nilai OD yang tertinggi bila dibandingkan dengan serum mencit yang diambil pada hari ke 14 dan ke28 pasca infeksi.

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan nilai *optical density* (OD) yang mencerminkan kadar antibodi sebagai respon imun humoral pada infeksi L2 *Toxocara cati* terhadap waktu deteksi yang berbeda. Selain itu dapat diketahui pula, nilai OD mencapai puncaknya setelah hari ketujuh, kemudian nilai OD sedikit menurun walaupun tidak signifikan dan diikuti dengan keadaan yang stabil hingga hari ke 28 setelah infeksi. Saran yang dapat diajukan adalah perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang respon imun terhadap pemaparan kedua sebagai respon imun sekunder pada infeksi *Toxocara cati* sehingga dapat diketahui gambaran pola respon imun yang terjadi pada infeksi sekunder tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K., A.H. Lichtman. 2003. Cellular and Molecular Immunology 5th ed. Saunders, Elsevier Science (USA).
- Acha, P.N and B. Szyfres. 1995. Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals. 2nd ed. Pan American Health Organization. USA. pp. 842-847.
- Akao, N., T.H. Takayanagi, R. Suzuki, S. Tsukidate and K. Fujita. 2000. Ocular larva migrans caused by *Toxocara cati* in Mongolian gerbils and a comparison of ophthalmologic findings with those produced by *T. canis*. *J. Parasitol (Abstr.)* 86(5):1133-5
- Baratawidjaya, K.G. 2006. *Imunologi Dasar*. Edisi ketujuh. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran U.I. Jakarta.
- Baringvet, 2008. Roundworms in Cats and Kittens. Baring Boulevard Veterinary Hospital. <http://www.baringvet.net/roundwormscats.htm>. [27 Maret 2008]
- Bellanti, J.A. and J.V. Kadlec. 1993. *Imunobiologi Umum*. In: J.A. Bellanti (Ed). *Immunology III*. W.B. Saunders Company, Philadelphia. Diterjemahkan oleh S. Wahab dan N. Soeripto (Ed). Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Bernier, G.M. 1993. *Antibodi dan Immunoglobulin: Struktur dan Fungsi*. In: J.A. Bellanti (Ed). *Immunology III*. W.B. Saunders Company, Philadelphia. Diterjemahkan oleh S. Wahab dan N. Soeripto (Ed). Gadjah Mada University Press. Yogyakarta
- Bowman, D.D, R.C. Lynn. 1995. *Georgis' Parasitology for Veterinarians*. 6th ed. W.B. Saunders Company. Pp. 206-209.
- Brown, H.W. 1969. *Basic Clinical Parasitology*. 3rd ed. Diterjemahkan oleh Rukmono, B., Hoedjo, N.S. Djakaria, S.D. Soeprihatin, S.S. Margono, S. Oemijati, S. Gandahusada, W. Pribadi. 1979. PT Gramedia. Jakarta.
- Brown, T.T., M.M. Suter and D.O. Slauson. 2002. *Immunopathology*. In: D.O. Slauson and B.J. Cooper (Ed). *Mechanisms of Deseases: A Textbook of Comparative General Pathology*. 3rd ed. Mosby Inc.
- Burgess, G.W. 1995. *Teknologi ELISA dalam Diagnosis dan Penelitian*. Gadjah Mada University Press. Yokyakarta.

- Campbell, D.T., and J.C. Stanley. 1963. *Experimental and Quasi-Experimental Designs For Research*. Houghton Mifflin Company. Boston. Pp.37-39.
- Cypess, R.H. 1993. Mekanisme Imunitas Terhadap Penyakit-Parasit. In: J.A. Bellanti (Ed). *Immunology III*. W.B. Saunders Company, Philadelphia. Diterjemahkan oleh S. Wahab dan N. Soeripto (Ed). Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Gandahusada, S., H.D. Ilahude, W. Pribadi. 2006. *Parasitologi Kedokteran*. Cetakan ke-6. Gaya Baru. Jakarta.
- Gershwin, L.J. 1997. *Clinical Immunology*. In: J.J Kaneko, J.W Harvey, M.L Bruss (Ed). *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 5th ed. Academic Press. USA.
- Havasiova-Reiterova, K., O. Tomasovicova and P. Dubinsky. 1995. Effect of various doses of infective *Toxocara canis* and *Toxocara cati* eggs on the humoral response and distribution of larvae in mice. *Parasitol. Res (Abstr.)* 81(1):13-7
- Hercowitz, H.B. 1993. *Imunofisiologi: Fungsi Sel dan Interaksi Seluler dalam Pembentukan Antibodi*. In: J.A. Bellanti (Ed). *Immunology III*. W.B. Saunders Company, Philadelphia. Diterjemahkan oleh S. Wahab dan N. Soeripto (Ed). Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Holton, K. and D. Pepper. 200 . *Guidelines for Veterinarians. Prevention of Zoonotic Transmission of Ascarids and Hookworm*. <http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/roundworm/roundworm.htm>. [4 Januari 2008]
- Huh, S. and S. Lee. 2006. *Toxocariasis*. <http://www.emedicine.com/linkus.htm>. [12 Desember 2007]
- Jackson, A.L.1993. *Antigen dan Imunogenisitas*. In: J.A. Bellanti (Ed). *Immunology III*. W.B. Saunders Company, Philadelphia. Diterjemahkan oleh S. Wahab dan N. Soeripto (Ed). Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Kahrs, R.F. 2001. *Viral Diseases of cattle*. 2nd ed. Iowa State university Press.
- Kresno, S.B. 2001. *Imunologi: Diagnosis dan prosedur laboratorium*. Edisi keempat. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran U.I. Jakarta.
- Kusnoto. 2003. *Isolasi dan Karakterisasi Protein Imunogenik Larva Stadium II Toxocara cati Isolat Lokal*. [Tesis]. Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga.

- Kusnoto. 2004. Produksi Antibodi Monoklonal Menggunakan Antigen Spesifik *Toxocara cati* Untuk Diagnosis Dini Dengan IDAS-ELISA. [Laporan Penelitian]. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga. Surabaya.
- Kusnoto, S. Subekti dan Suwarno. 2005. Respon Imun Humoral Kelinci dalam Membentuk Antibodi Anti-*Toxocara cati*. *Media Kedokteran Hewan*. 21(3):137-142
- Kusnoto. 2005. Prevalensi *Toxocariasis* Pada Kucing Liar di Surabaya Melalui Bedah Saluran Pencernaan. *Media Kedokteran Hewan*. 21(1):7-10
- Levine, N.D. 1994. Buku Pelajaran Parasitologi Veteriner. Diterjemahkan oleh Ashadi G, Wardiarto (Ed). Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- More, S. 1995. Struktur Antigen Parasit. In: Teknologi ELISA dalam Diagnosis dan Penelitian. G.W. Burgess (Ed). Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Nash, H. 2008. Roundworms (*Toxascaris leonina*, *Toxocara cati*). [//http://www.peteducation.com/article.cfm](http://www.peteducation.com/article.cfm). [2 Mei 2008]
- Noble, E.R., G.A. Noble. 1989. Parasitologi. Biologi parasit Hewan. Diterjemahkan oleh Wardiarto. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Noordin, R., H.V. Smith. S. Mohamad, R.M. Maizels, and M.Y. Fong. 2004. Comparison of Ig G-ELISA and Ig G4-ELISA for *Toxocara* Serodiagnosis. *J. Acta Tropica*. 93(2005):57-62
- Overgaauw, P.A and F. Van Knapen. 2000. Dogs and Nematode Zoonoses. In: C.N.L. Macpherson, F.X. Meslin, A.I. Wandeler (Ed). *Dogs Zoonoses and Public Health*. CABI Publishing.
- Patterson, R.M. 1995. Respon Imun Terhadap Parasit Cacing. In: Teknologi ELISA dalam Diagnosis dan Penelitian. G.W. Burgess (Ed). Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Rantam, F.A. 2003. Metode Immunologi. Airlangga University Press. Surabaya.
- Roitt, I.M., J. Brostoff, and D.K. Male, 1989. Immunology. 2nd Ed. The C.V Mosby Company, St. Louis. Washington D.C, Toronto. Gower Medical Publishing. London. New York.
- Setyowati, S.D. 2006. Potensi Protein Spesifik Excretory Secretory Larva Kedua Jaringan *Toxocara cati* Sebagai Bahan Uji Diagnosis *Toxocariasis* Pada Mencit Dengan Teknik ELISA.[Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

- Smith, H.V. 1993. Antibody Reactivity in Human Toxocariasis. In: Toxocariasis Clinical, Epidemiological and Molekular Perspectives. J.W. Lewis and R.M. Maizels (Ed). The Institute of Biology. London.
- Soulsby, E.J.L. 1982. Helminth, Arthropods and Protozoa of Domestic Animals. Bailliere Tindal and cassel. London.
- Tizard, I. 1982. An Introduction to Veterinary Immunology. W.B. Saunders Company. Diterjemahkan oleh Partodiredjo, M dan S. Hardjosworo. 1987. Airlangga University Press. Surabaya.
- Virginia, P., K. Nagakura, O. Ferreira and S. Tateno. 1991. Serologic evidence of toxocariasis in northeast Brazil. Jpn. J. Med. Sci. Biol (Abstr.) 44(1):1-6
- Wikimedia Commons, 2008. Category Toxocara cati. <http://commons.wikimedia.org/wiki/category.toxocaracati.htm>. [27 Maret 2008]
- Yamasaki, H., K. Araki, P. K. C. Lim, N. Zasmy, J.W. Mak, R. Taib, and T. Aoki. 2000. Development of a Highly Specific Recombinant Toxocara canis Second-Stage Larva Excretory-Secretory Antigen for Immunodiagnosis of Human Toxocariasis. J. Clin. Microbiol. 38(4):1409-1413
- Yasmin, N. 2003. Respon Imun Humoral Pada Kelinci Yang Diinfeksi Buatan dan Diimunisasi Larva Stadium Kedua Toxocara vitulorum [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Zmijewski, C. M. and J.A. Bellanti. 1993. Interaksi Antigen-Antibodi. In: J.A. Bellanti (Ed). Immunology III. W.B. Saunders Company, Philadelphia. Diterjemahkan oleh S. Wahab dan N. Soeripto (Ed). Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Analisis Statistik Nilai OD

Case Summaries ^a

				OD Serum Mencit	
Waktu Pengamatan	Hari Ke-0	1		.434	
		2		.486	
		3		.516	
		4		.519	
		5		.519	
		Total	N	5	
			Sum	2.474	
			Mean	.49480	
			Std. Deviation	.036725	
		Hari Ke-7	1		.821
			2		1.089
			3		1.011
			4		1.094
			Total	N	4
			Sum	4.015	
		Mean	1.00375		
		Std. Deviation	.127623		
	Hari Ke-14	1		.992	
		2		.966	
		3		.959	
		4		.994	
		5		.959	
	Total	N	5		
		Sum	4.870		
		Mean	.97400		
		Std. Deviation	.017593		
	Hari Ke-28	1		1.126	
		2		.995	
		3		1.011	
		4		.945	
		5		.923	
	Total	N	5		
		Sum	5.000		
		Mean	1.00000		
		Std. Deviation	.079019		
	Total	N		19	
		Sum		16.359	
		Mean		.86100	
		Std. Deviation		.234869	

a. Limited to first 100 cases.

Oneway**Descriptives**

OD Serum Mencit

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Minimum	Maximum
Hari Ke-0	5	.49480	.036725	.016424	.434	.519
Hari Ke-7	4	1.00375	.127623	.063811	.821	1.094
Hari Ke-14	5	.97400	.017593	.007868	.959	.994
Hari Ke-28	5	1.00000	.079019	.035338	.923	1.126
Total	19	.86100	.234869	.053883	.434	1.126

Test of Homogeneity of Variances

OD Serum Mencit

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.774	3	15	.078

ANOVA

OD Serum Mencit

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.912	3	.304	56.695	.000
Within Groups	.080	15	.005		
Total	.993	18			

Post Hoc Tests

OD Serum Mencit

Duncan ^{a,b}

Waktu Pengamatan	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
Hari Ke-0	5	.49480	
Hari Ke-14	5		.97400
Hari Ke-28	5		1.00000
Hari Ke-7	4		1.00375
Sig.		1.000	.564

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.706.
- The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

Lampiran 2. Bahan-Bahan untuk Uji *Indirect* ELISA

1. PBS (Phosphat Buffer Saline)

pH : 7,4

Konsentrasi : Fosfat 10 mmol/l

NaCl 140 mmol/l

Timbang : NaCl 8g

KCl 0,2 g

KH₂PO₄ 0,2 gNa₂HPO₄ 12H₂O 2,89 g

Aquadest ad 1 liter

Simpan pada suhu 4° C

Katalog :

-NaCl (lihat Blocking buffer)

-KCl. Kalium Chloride (31248) Ident. Nr. 10-100-94

Vertrags Nr. 1082

-KH₂PO₄. Kalium Dihydrogen Phosphat (30407) Ident. Nr 10-100-94

EG. Nr. 231-913-4

- Na₂HPO₄ 12H₂O. Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat. Ident. Nr.

10-100-94 Vertrags Nr.1082 Elnecs/Elines Nr. 231-448-7

2. Buffer untuk coating Ag (Carbonate Buffer)

pH 9,6

Konsentrasi : 50 mmol/l

Timbang : Na₂CO₃ 1,59 g

NaHCO_3 2,93 g

Aquadest ad 1 liter

Simpan pada suhu 4°C tidak lebih dari 2 minggu

Katalog :

- Na_2CO_3 (Natrium Carbonat Wasserfrei) 500.323 A763692 Art 6392.

MERCK.

- NaHCO_3 (Natrium Hidrogen Carbonat) Art 6329

3. Buffer untuk pencuci (Washing Buffer)

PBS-Tween

Timbang : Tween-20 1ml

PBS ad 1 liter

Katalog : Tween-20. 500 ml cat. 20605 cas: 9005-64-5 Lot. 107989. USB

4. Buffer untuk pengencer dan blocking (Blocking Buffer)

PBS-Tween-Creamer

Konsentrasi : Fosfat 10mmol/l

NaCl 140 mmol/l

Tween-20 1 ml

Creamer 4% untuk blocking

1% untuk pengenceran sampel dan konjugat

Timbang : Creamer 4 g (untuk blocking) dan 1 g (untuk pengencer)

Masing-masing ditambahkan PBS-Tween ad 100ml

Katalog :

- NaCl (Natrium Chlorid) 1.06404.1000. Merck. kGa A

-Creamer Nestle

-Tween (lihat Washing Buffer)

5. Substrat Buffer

TMB Substrate cat. No. 80-1302 Assay Designs

6. Konjugat

Ig G Conjugate HRP (Horseradish Peroxydase)

encerkan dengan Blocking Buffer 1:100

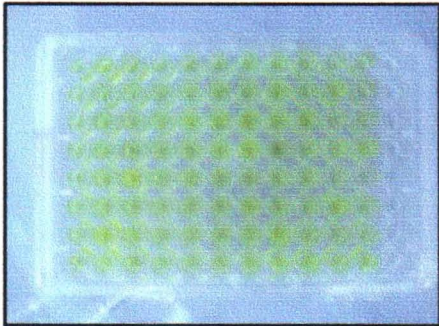
7. Stop Reaction

H₂SO₄ 1 N

Katalog: Sulfuric acid (K 241 879 31 734) Merck kGa A 64271

EG. Nr 231-639-5

Lampiran 3. Gambar Penelitian



(A)



(B)



(C)



(D)

Keterangan : (A) Hasil *Indirect* ELISA. (B) Hasil teknik gradien preparasi.

(C) ELISA reader.

(D) Pipet Ependorf.