

BAB 4

MATERI DAN METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu

Isolasi spesimen larva stadium kedua (L2) dan cacing dewasa *T. cati* serta pemupukan telur dilaksanakan di Laboratorium Helminthologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Pembuatan homogenat dilakukan di Laboratorium *Intestinal Parasite, Tropical Disease Center* Universitas Airlangga. Peneraan antibodi serum kelinci dilakukan di Laboratorium Virologi & Imunologi, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Penelitian dilakukan mulai bulan April hingga Desember 2004, meliputi isolasi spesimen hingga peneraan kadar antibodi.

4.2 Materi Penelitian

Beberapa peralatan yang digunakan pada tahap isolasi dan pembuatan homogenat L2 dan *T.cati* dewasa adalah mikroskop *inverted*, mikroskop cahaya, penyemprot, cawan petri, tabung reaksi, corong, mortir, *sputit disposable*, jarum trokar, saringan ukuran 1 mm, saringan nilon (sablun) T200 (setara $25 \pm m$), sentrifus, gelas objek, pipet plastik, sonikator, pinset, pisau scalpel, gunting bedah, nampan aluminium, inkubator. Adapun alat yang diperlukan untuk peneraan antibodi pada *indirect-ELISA*, adalah mikropipet *multichannel*, pipet tip, *mikroplate ELISA*, *washing dish*, *ELISA-reader* dan peralatan gelas lain.

Bahan yang digunakan pada isolasi dan pembuatan homogenat L2 dan *T. cati* dewasa adalah aquadest, larutan sukrosa dengan berbagai konsentrasi, *phosphate buffer saline* (PBS), formalin 1%. Bahan yang digunakan pada imunisasi adalah *complete Freund's adjuvan* (CFA), *incomplete Freund's adjuvan* (IFA), PBS, *carbonat buffer*, *washing buffer*, *blocking buffer*, *conjugate*, *substrat buffer*, substrat dan NaOH 3 N.

Adapun hewan coba yang digunakan adalah kelinci ras angora (*Lepus europaeus*) betina dengan berat ± 5 kg.

4.3 Metode Penelitian

Penelitian ini terdiri dari beberapa tahap, yaitu isolasi dan pemupukan telur cacing *Toxocara cati*, pembuatan homogenat *T. cati*, imunisasi homogenat *T. cati* pada kelinci, serta penentuan titer antibodi dan nilai *optical density* (OD) serum kelinci.

4.3.1 Isolasi dan pemupukan telur cacing *Toxocara cati*

Toxocara cati dewasa diisolasi dari anak kucing penderita toxocarosis. Beberapa ekor kucing umur ± 2 bulan yang diperoleh dari beberapa Pasar dan RS Dr. Soetomo Surabaya, dipelihara secara intensif. Feses ditampung kemudian diperiksa secara mikroskopis untuk mengetahui keberadaan infeksi cacing *T. cati*. Anak kucing yang dinyatakan penderita toxocarosis diberi pengobatan dengan piperasin sitrat, satu hari kemudian dilakukan koleksi feses dan isolasi spesimen *T. cati*. Cacing *T. cati* yang diperoleh dibersihkan dengan *phosphat buffer saline* (PBS) kemudian disimpan dalam *freezer* -20°C hingga digunakan untuk pembuatan homogenat cacing dewasa.

Telur cacing diisolasi dari feses anak kucing dengan teknik preparasi gradien (DenRich, 1994). Telur cacing yang diperoleh dipupuk dalam medium PBS dengan penambahan formalin 1% hingga didapatkan larva stadium pertama (L1) dan larva stadium kedua (L2) (Sri Subekti dkk., 1999). Perkembangan telur cacing diamati dengan mikroskop inverted dan didokumentasikan dalam bentuk foto, kemudian L2 yang diperoleh pada hari 21-28 masa pemupukan disiapkan untuk pembuatan homogenat.

4.3.2 Pembuatan homogenat dan imunogen *T. cati*

Spesimen L2 dan cacing dewasa *T. cati* yang diperoleh dipersiapkan untuk pembuatan homogenat. Cacing dewasa *T. cati* dicincang dengan gunting dan ditampung dalam cawan porselin kemudian digerus dengan mortir. Setelah hancur, larutan dimasukkan tabung konikal dan disonikasi dengan frekuensi 30-40 kHz selama 3 x 30 detik secara periodik dengan interval istirahat 1 menit. Larutan yang diperoleh disentrifugasi 5.000 rpm selama 5 menit, supernatan yang merupakan homogenat cacing dewasa dipisahkan dan ditampung dalam tabung konikal steril, kemudian konsentrasi protein ditera dengan bantuan spektrofometer pada panjang gelombang 570 nm, homogenat siap diproses untuk pembuatan imunogen.

Sebelum dilakukan pembuatan homogenat L2, dilakukan pencucian L2 dengan cara menyaring medium dengan saringan 25 μm (nilon sablon ukuran T200) dan disemprot dengan PBS hingga bersih, L2 yang menempel pada saringan dimasukkan ke dalam tabung konikal. Volume medium dikurangi dengan cara melakukan sentrifugasi 5.000 rpm hingga didapatkan kandungan L2 sebanyak 10^6 butir/ml. Lebih lanjut, L2 dalam tabung konikal disonikasi dengan frekuensi 30-40 kHz sebanyak 3 x 30 detik secara periodik dengan interval istirahat 1 menit. Cairan dalam tabung kemudian diperiksa dengan mikroskop 400x untuk mengamati tingkat kehancuran L2, apabila tingkat kehancuran kurang dari 80% dilakukan sonikasi ulang. Setelah L2 yang hancur lebih dari 80%, homogenat disentrifugasi 5.000 rpm selama 5 menit, supernatan dipisahkan dan ditampung dalam tabung konikal steril, kemudian konsentrasi protein ditera dengan bantuan spektrofometer pada panjang gelombang 570 nm, homogenat disiapkan untuk pembuatan imunogen L2 *T. cati*.

Imunogen L2 dan cacing dewasa dibuat dengan cara menambahkan ajuvan (*complete Freund's adjuvant* atau *incomplete Freund's adjuvant*) dengan perbandingan 1:1 dan penisilin-streptomisin 20 IU/ml ke dalam homogenat, kemudian diaduk secara manual dengan pipet steril hingga homogen (\pm 4 jam). Setelah homogen imunogen ini disimpan dalam refrigerator suhu 4°C hingga digunakan untuk imunisasi pada kelinci.

4.3.3 Imunisasi pada Kelinci

Imunisasi kelinci dengan homogenat L2 dan *T. cati* dewasa dilakukan dengan dosis 500-1000 µg per ekor. Ajuvan yang digunakan terdapat dua macam yaitu *complete Freund's adjuvant* (CFA) dan *incomplete Freund's adjuvant* (IFA). Penambahan ajuvan dimaksudkan untuk meningkatkan daya imunogenesitas homogenat (Harlow dan Lane, 1993).

Sebanyak 9 ekor kelinci ras Angora jantan dibagi secara acak menjadi tiga kelompok. Kelompok I, diinjeksi dengan ajuvan, sebagai kontrol. Kelompok II, diinjeksi dengan imunogen L2 *T. cati*. Kelompok III, diinjeksi dengan imunogen cacing dewasa. Injeksi dilakukan sebanyak dua tahap, yaitu tahap inisiasi dengan penambahan CFA pada homogenat. Tahap kedua adalah imunisasi ulang (*booster*) dilakukan dua minggu setelah inisiasi, dengan penambahan IFA pada homogenat. *Booster* dilakukan tiga kali dengan interval dua minggu. Aplikasi imunisasi dilakukan secara subkutan.

4.3.4 Penentuan titer antibodi dan nilai *optical density*

Dua minggu setelah injeksi terakhir dilakukan pengambilan darah kelinci percobaan melalui vena auricularis sebanyak 3 ml. Darah dimasukkan tabung sentrifus (steril) didiamkan hingga mengendap, kemudian disentrifugasi 3.000 rpm selama 5

menit. Serum diambil, dimasukkan ke dalam *microtube* steril dan disimpan hingga dilakukan peneraan kadar antibodi anti-*T. cati*.

Peneraan kadar antibodi anti-*T. cati* dilakukan dengan teknik *indirect-ELISA* menggunakan *konjugate goat anti-rabbit* yang dilabel dengan enzim alkalin fosfatase. Pembacaan dilakukan dengan bantuan *ELISA-reader* pada panjang gelombang 405 nm (Harlow dan Lane, 1993).

4.3.5 Rancangan Penelitian dan Analisis Data

Rancangan yang digunakan pada penelitian ini adalah *The Post-Test Only Control Group Design* (Zainuddin, 2001). Data yang diperoleh berupa nilai OD pada *ELISA-reader*, dianalisis dengan uji F yang dilanjutkan dengan *Duncan's multiple range test*, menggunakan *statistical program and service solution* (SPSS) rel 10.0 for windows (Santoso, 2000).