

**SKRIPSI**

**ISOLASI PROTEIN SPESIFIK CACING *Toxocara cati*  
SEBAGAI BAHAN DIAGNOSTIK TOXOCARIASIS  
PADA UJI ELISA  
( *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* )**



**OLEH :**

**SRI SUWAN DINI  
SURABAYA - JAWA TIMUR**

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2006**

**ISOLASI PROTEIN SPESIFIK CACING *Toxocara cati*  
SEBAGAI BAHAN DIAGNOSTIK TOXOCARIASIS  
PADA UJI ELISA  
( *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* )**

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

oleh

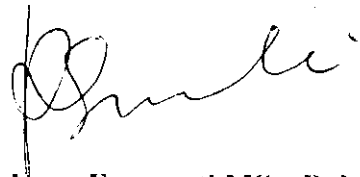
**SRI SUWAN DINI**  
**060212983**

Menyetujui  
Komisi Pembimbing,



**(M Anam Al Arief,MP.,Drh)**

Pembimbing Pertama



**(Dr. Rahayu Ernawati, MSc., Drh).**

Pembimbing Kedua

Setelah mempelajari dan menguji dengan sungguh – sungguh, kami berpendapat bahwa tulisan ini baik ruang lingkup maupun kualitasnya dapat diajukan sebagai skripsi untuk memperoleh gelar SARJANA KEDOKTERAN HEWAN.

Menyetujui

Panitia Penguji,



Hj. Sri Mumpuni Sosiawati, M.Kes., Drh

Ketua



Prof. Dr. H. Setiawan Koesdarto, M.Si., Drh

Sekretaris



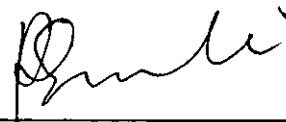
M. Anam Al Arief . MP., Drh

Anggota



Jola Rahmahani, M.Kes., Drh

Anggota



Dr. Rahayu Ernawati. MSc., Drh

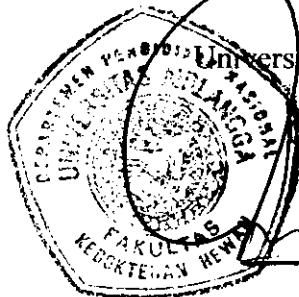
Anggota

Surabaya, Juli 2006

Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga

Dekan,



Prof. Dr. Ismudiono, MS., Drh

NIP 130687297

**ISOLASI PROTEIN SPESIFIK CACING *Toxocara cati*  
SEBAGAI BAHAN DIAGNOSIS TOXOCARIASIS  
PADA UJI ELISA  
( *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* )**

**SRI SUWAN DINI**

**ABSTRAK**

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh protein spesifik cacing *Toxocara cati*. Hasil penelitian ini dapat dijadikan acuan untuk diagnosis toxocariasis pada uji ELISA.

Pada penelitian ini protein spesifik cacing *T.cati* diperoleh dari E-S larva kedua jaringan (L2J) *T.cati*. Protein E-S L2J *T.cati* tersebut dianalisis dengan metode SDS-PAGE, setelah itu dilakukan isolasi protein dengan teknik Elektroelusi sehingga diperoleh protein spesifik. Protein spesifik inilah yang akan digunakan sebagai bahan uji (antigen) pada uji *indirect*-ELISA.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa diperoleh protein spesifik melalui teknik Elusi dengan berat molekul 9,1 kDa. Pada uji ELISA, data yang diperoleh dianalisis dengan uji Anofa Faktorial kemudian dilakukan uji lanjut dengan uji duncan 5%. Hasil tersebut menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna ( $P < 0,05$ ) antara P0 dengan perlakuan P1 dan P3, tetapi pada perlakuan P2 tidak menunjukkan perbedaan yang nyata pada P0 dan P3. Sedangkan pada perlakuan P1 menunjukkan berbeda yang nyata terhadap semua perlakuan yang lain. Dari ke empat perlakuan tersebut (P0, P1, P2, P3), perlakuan P1 memiliki spesifisitas yang paling tinggi dengan nilai OD(*optical density*) tertinggi, Sehingga dapat disimpulkan bahwa protein 9,1 kDa yang diperoleh dari E-S Larva Kedua Jaringan *T.cati* dapat mendeteksi antibodi anti E-S Larva Kedua Jaringan *T.cati*.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Syukur alhamdulillah senantiasa penulis panjatkan kepada ALLAH SWT atas kuasa dan karunia-NYA, maka penulis dapat menyelesaikan penelitian dengan judul "Isolasi Protein Spesifik Cacing *Toxocara cati* Sebagai Bahan Diagnostik *Toxocariasis* pada uji ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)".

Berpangkal dari uraian di atas maka penulis berupaya menuangkan dalam penulisan skripsi ini. Adalah manusiawi sekali apabila dalam penulisan ini masih memerlukan penyempurnaan, kekurangan tersebut semata-mata karena keterbatasan penulis baik menyangkut masalah waktu, tenaga, biaya, maupun pengetahuan dan pengalaman penulis.

Dalam penulisan ini, penulis banyak menerima masukan, dorongan, petunjuk dari segenap pihak, oleh karena itu pada kesempatan yang baik ini penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada yang terhormat:

Prof. Dr. Ismudiono, M.S., drh. sebagai Dekan Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga beserta staf pimpinan atas kesempatan yang telah diberikan.

Bapak M. Anam Al Arief, MP .,drh. sebagai pembimbing pertama, yang telah membimbing penulis hingga terselesainya penulisan skripsi ini.

Dr. Rahayu Ernawati, MSc., drh. sebagai pembimbing kedua, yang selalu meluangkan waktu dalam membimbing penulis.

Bapak Kusnoto, MSi., drh. sebagai dosen penelitian yang tak henti-hentinya membimbing penulis dalam penulisan skripsi ini.

Ibu Indah Norma Triana, drh, sebagai dosen wali yang membimbing penulis di masa kuliah.

Ibu Hj. Sri Mumpuni Sosiawati, M.Kes., drh, Prof. Dr. H. Setiawan Koesdarto, M.Si., drh, Ibu Jola Rahmahani, M.Kes., drh. Sebagai dosen penguji seminar dan skripsi penulis.

Seluruh keluargaku yang penulis cintai, ayahanda Soegeng Wijono, ibunda Sutartin, kakakku tersayang Sumantoro serta yang tercinta Rendi Prihatmanto. Terima kasih untuk semua doa, dukungan, cinta, semangat untuk penulis.

Teman-teman penelitian Septi, Hedi, Allin. Terima kasih kerjasamanya dan juga sahabatku Arta, Citra, terima kasih untuk persahabatannya.

Teman - temanku KH angkatan 2002 yang tak bisa penulis sebutkan satu persatu. Terima kasih atas semua dukungan kalian.

Semua pihak yang tidak bisa penulis sebutkan satu persatu yang telah memberikan bantuan secara langsung maupun tidak langsung demi terselesaikannya skripsi ini.

Penulisan skripsi ini masih jauh dari sempurna, untuk itu kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan dari para pembaca.

Surabaya, Juli 2006

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
LEMBAR PENGESAHAN.....	ii
ABSTRAK.....	iii
UCAPAN TERIMA KASIH.....	iv
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR TABEL.....	viii
DAFTAR GAMBAR.....	ix
DAFTAR LAMPIRAN.....	x
BAB I: PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Landasan Teori.....	4
1.5 Manfaat Penelitian.....	5
1.6 Hipotesis .....	5
BAB 2: TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 <i>Toxocara cati</i> .....	6
2.1.1 Klasifikasi.....	6
2.1.2 Habitat dan morfologi <i>Toxocara cati</i> .....	7
2.1.3 Siklus hidup dan cara penularan <i>Toxocara cati</i> .....	7
2.2 Aspek zoonosis <i>Toxocara cati</i> .....	9
2.3 Patogenesis.....	11
2.3.1 <i>Visceral Larva Migrans</i> (VLM).....	11
2.3.2 <i>Ocular Larva Migran</i> (OLM).....	11
2.4 Diagnosis Toxocariasis .....	12
2.5 Antigen Parasit .....	12
2.6 Isolasi dan Karakterisasi Protein <i>Toxocara cati</i> .....	14
2.7 <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA) .....	15
BAB 3: MATERI DAN METODE.....	17
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	17
3.2 Materi Penelitian.....	17
3.2.1 Hewan Percobaan .....	17
3.2.2 Bahan Penelitian.....	17
3.2.3 Alat- Alat Penelitian.....	19

3.3 Metode Penelitian.....	19
3.3.1 Isolasi telur infeksi (Larva kedua) <i>Toxocara cati</i> .....	19
3.3.2 Isolasi larva kedua(L <sub>2</sub> ) jaringan <i>Toxocara cati</i> ....	21
3.3.3 Pembuatan homogenat E-S larva kedua jaringan <i>Toxocara cati</i> .....	22
3.3.4 Identifikasi protein <i>Toxocara cati</i> dengan metode SDS-PAGE.....	23
3.3.5 Isolasi protein E-S larva kedua jaringan <i>T.cati</i> dengan teknik Elektroelusi.....	24
3.3.6 Pembuatan antibodi poliklonal pada mencit.....	24
3.3.7 Uji ELISA.....	26
3.4 Rancangan Penelitian.....	27
3.5 Analisis Data.....	27
3.6 Bagan Metode Penelitian.....	28
 BAB 4 HASIL PENELITIAN.....	 29
4.1 Hasil Isolasi Larva Kedua Jaringan <i>Toxocara cati</i> .....	29
4.2 Hasil Identifikasi Cacing <i>T.cati</i> dengan Metode SDS-PAGE.....	30
4.3 Isolasi Protein Spesifik <i>T.cati</i> dengan Teknik Elusi.....	32
4.4 Hasil Pengukuran Titer Antibodi pada Uji <i>Indirect-ELISA</i> .....	34
 BAB 5 PEMBAHASAN.....	 37
 BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN.....	 41
6.1 Kesimpulan.....	41
6.2 Saran.....	41
 RINGKASAN.....	 42
DAFTAR PUSTAKA.....	44
LAMPIRAN.....	47



## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Nilai OD ( <i>optical density</i> ) pada Pemeriksaan Antigen (Protein 9,1 kDa dan <i>crude</i> E-S L2 J <i>T.cati</i> ) pada Uji <i>Indirect-ELISA</i> .....	35
4.2 Rata-rata Nilai OD ( <i>optical density</i> ) pada Pemeriksaan Antibodi dengan Uji <i>Indirect-ELISA</i> .....	36

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Siklus hidup cacing <i>Toxocara cati</i> .....	9
3.1 Pelaksanaan Imunisasi.....	25
4.1 Larva kedua jaringan <i>Toxocara cati</i> .....	29
4.2 Hasil Identifikasi Protein E-S L2J <i>T.cati</i> dengan Metode SDS-PAGE.....	30
4.3 Isolasi Protein spesifik E-S L2J <i>T.cati</i> dengan Teknik Elusi, dianalisis kembali dengan Metode SDS_PAGE.....	32
4.4 Hasil Pengukuran Titer Antibodi pada Uji <i>Indirect-ELISA</i> .....	34

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Regresi Kubik untuk menentukan Hubungan antara Nilai Rf pada SDS-PAGE dengan Berat Molekul Protein E-S L2 J <i>T.cati</i> .....	48
2. Regresi Linier untuk menentukan Hubungan antara Nilai Rf pada SDS Hasil Elusi dengan Berat Molekul Protein E-S L2 J <i>T.cati</i> .....	51
3. Hasil Pengukuran / Peneraan Protein E-S L2 J <i>T.cati</i> .....	54
4. Hasil Penghitungan Nilai Absorbensi Pada Uji <i>Indirect</i> -ELISA dengan Panjang Gelombang 405 nm.....	55
5. Hasil Perhitungan Nilai OD ( <i>optical density</i> ) dengan Analisis Anova factorial dan Dilanjutkan Uji Jarak Duncan (5%).....	56
6. Bahan-Bahan Untuk <i>Indirect</i> -ELISA.....	59
7. Gambar Stadium Cacing <i>Toxocara cati</i> .....	62
8. Gambar Alat-Alat SDS-PAGE dan Elektroelusi .....	63
9. Gambar Alat-alat ELISA.....	64

# BAB 1 PENDAHULUAN

## BAB I

### PENDAHULUAN

#### I.I Latar Belakang

Penyakit toxocariasis merupakan suatu penyakit yang disebabkan oleh cacing kelas Nematoda dari genus *Toxocara*, yang terdiri dari tiga spesies yaitu *T.vitulum*, *T.canis* dan *T.cati*. *T.vitulum* menyerang anak sapi (pedet) serta anak dan induk jantan kerbau. *T.canis* menyerang anak anjing dan anjing jantan dewasa, sedangkan *T.cati* menyerang anak kucing dan kucing jantan dewasa. Semua hewan-hewan ini merupakan hospes definitif bagi ketiga spesies cacing tersebut.

Penyakit toxocariasis pada manusia dikenal dengan *Human Toxocariasis* yang merupakan penyakit parasitik yang sangat penting. Toxocariasis pada manusia terdiri dari dua bentuk yaitu *visceral larva migrans* (VLM) dan *ocular larva migrans* (OLM).

Penularan pada manusia terjadi secara per-oral, yaitu melalui makanan dan minuman yang terkontaminasi oleh telur infeksi yang mengandung larva kedua pada pemasakan yang kurang sempurna (Ito *et al.*, 1986). Sumber utama infeksi pada manusia adalah dari tanah yang terkontaminasi oleh telur infeksi (Radman *et al.*, 2000)

Siklus hidup *T.cati* di dalam tubuh manusia di mulai dari tertelannya telur berembrio yang mengandung larva kedua (L<sub>2</sub>) yang ikut bersama makanan dan minuman yang di konsumsi, kemudian telur infeksi tersebut akan menetas dan mengeluarkan larva di dalam usus bagian proksimal, kemudian terjadi penetrasi

larva pada mukosa dan akan terbawa sistem portal dan selanjutnya menuju hepar. Beberapa larva tetap tinggal dalam hepar sehingga menyebabkan terjadinya granuloma, sementara larva yang lain menuju ke paru melalui sirkulasi darah menuju ke berbagai organ tubuh sampai menuju ke pembuluh darah kecil hingga menembus pembuluh darah dan menuju jaringan yang ada di sekitarnya.

Pada kasus Toxocariasis terdapat satu hal yang sangat menarik, yakni larva stadium kedua ( $L_2$ ) tidak akan pernah berkembang menjadi larva stadium ketiga ( $L_3$ ) apabila infeksi terjadi pada selain hospes definitif. Cacing tanah, kecoa, ayam, anak kambing dan terutama mencit merupakan hewan yang bertindak sebagai hospes transport, karena larva menetap di dalam jaringan. Kondisi demikian disebut dengan *larva dorman*, yaitu larva mengalami perkembangan yang buntu sehingga larva hanya menetap di dalam jaringan baik visceral maupun jaringan somatik (Levine, 1978).

Diagnosis konvensional dengan pemeriksaan feses tidak selalu dapat ditemukan telur cacing, mengingat telur cacing dan cacing dewasa hanya dapat ditemukan pada hospes definitif, selain itu juga diagnosis berdasarkan pada gejala klinis sulit dilakukan karena gejala klinisnya sangat bervariasi. Oleh sebab itu dibutuhkan diagnosis secara serologik atau imunologik (Uga *et al.*, 1990). Diagnosis secara sero-imunologis membutuhkan bahan uji yang memiliki sensitifitas dan spesifisitas tinggi untuk menegakkan diagnosis. Penggunaan antigen *crude protein* untuk diagnosis toxocariasis tidak spesifik karena antigen ini terdiri beberapa macam protein di dalamnya, sehingga masih dapat dikenali oleh antibodi terhadap cacing lain (Kusnoto, 2003). Untuk memperoleh protein

yang sensitifitas dan spesifisitasnya tinggi perlu dilakukan analisis dan isolasi protein dengan menggunakan teknik *preparasi gel elektroforesis* (ELUSI), karena dengan teknik ini didapatkan protein murni (*pure protein*). Protein murni yang diperoleh dapat dipakai sebagai antigen pada uji ELISA, dalam hal ini protein murni yang dimaksud adalah Protein spesifik E-S Larva kedua jaringan *T.cati*.

Uji spesifisitas dan sensitifitas protein antigenik *Toxocara cati* untuk diagnosis secara imunologis masih belum banyak dilakukan, karena bahan uji yang ada masih rendah karena antigen yang digunakan adalah *crude protein* misalnya E-S antigen (*eksretori sekretori* Antigen) dan *whole worm extract* (ekstrak dari cacing dewasa) (Kusnoto, 2003), oleh karena itu diperlukan analisis dan isolasi protein untuk mendapatkan protein murni (*purified protein*). Teknik *preparasi gel elektroforesis* (ELUSI) merupakan teknik yang baik untuk mendapatkan protein murni sebagai acuan untuk dilakukan uji ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*).

Penelitian ini mencoba melakukan isolasi protein spesifik cacing *Toxocara cati*. Protein tersebut didapatkan dari E-S Larva kedua jaringan cacing *T.cati* dengan teknik *preparasi gel elektroforesis* (ELUSI) untuk mendapatkan protein murni. Protein murni tersebut selanjutnya digunakan untuk mengetahui imunogenitas anti E-S larva kedua jaringan *T.cati* sebagai pemicu pembentukan antibodi poliklonal pada mencit dengan melakukan uji *Indirect-ELISA*. Uji ini dilakukan untuk melihat adanya ikatan antigen-antibodi berdasarkan nilai *optical density* (OD) yang diperoleh, sehingga dapat dijadikan sebagai bahan diagnostik toxocariasis.

## I.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas maka masalah penelitian ini dapat dirumuskan sebagai berikut: Apakah protein spesifik cacing *T.cati* yang diperoleh dari E-S larva kedua Jaringan *T.cati* dapat digunakan dalam mendeteksi antibodi anti E-S larva kedua jaringan *T.cati* pada uji ELISA?

## I.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh protein spesifik cacing *T.cati* dari E-S larva kedua jaringan *T.cati* sebagai bahan uji (antigen) dalam mendeteksi antibodi anti E-S larva kedua jaringan *T.cati* pada uji ELISA.

## 1.4 Landasan Teori

Antigen *Ekskretori-Sekretori (antigen E-S)* merupakan bagian dari protein intestinum karena di dalamnya mengandung kelenjar intestinum. Semua cairan yang dikeluarkan oleh tubuh cacing baik pada saat cacing makan, membuang sisa metabolit dari intestinum (Kusnoto, 2003).

Keberadaan E-S larva kedua jaringan *T.cati* dalam jaringan tubuh akan menimbulkan respon imun, sehingga memicu timbulnya antibodi. anti E-S larva kedua jaringan *T.cati* yang terpapar dalam sistem imun tubuh bersifat spesifik.

Antibodi anti E-S larva kedua jaringan *T.cati* yang diperoleh dengan cara melakukan imunisasi pada mencit yang diinjeksi dengan E-S larva kedua jaringan *T.cati*. Mencit tersebut diambil serumnya, serum yang diperoleh kemudian dilakukan diagnosis secara imunologis dengan menggunakan metode *Indirect-*



ELISA untuk mendeteksi ikatan antigen –antibodi spesifik terhadap *T.cati*. Hasil yang diperoleh dinyatakan dalam bentuk nilai kerapatan atau *optical density* (OD).

### **I.5 Manfaat Penelitian**

Protein spesifik dari E-S larva kedua jaringan *T.cati* yang diperoleh dengan teknik *preparasi gel elektrophoresis* diharapkan dapat dimanfaatkan untuk bahan diagnostik toxocariasis yang memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi .

### **I.6 Hipotesis**

Protein spesifik cacing *T.cati* dari E-S larva kedua Jaringan *T.cati* dapat digunakan dalam mendeteksi antibodi anti E-S larva kedua jaringan *T.cati* pada uji ELISA.

## **BAB 2**

# **TINJAUAN PUSTAKA**

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 *Toxocara cati*

##### 2.1.1 Klasifikasi

*Toxocara cati* merupakan cacing dari kelas Nematoda. Cacing ini memiliki sinonim *T.mystax* (Levine, 1978). *T.cati* dapat menginfeksi seluruh bangsa kucing di dunia dan jarang terdapat pada anjing. Selain itu cacing ini juga dapat menginfeksi manusia, khususnya pada anak-anak yang senang bermain dengan hewan kesayangan (bersifat zoonosis) (Hubner *et al.*, 2001; Joel-Klein., 2005).

Menurut Kusumamiharja (1993) klasifikasi cacing *Toxocara cati* adalah sebagai berikut:

Filum	: Nematelminthes
Kelas	: Nematoda
Sub Kelas	: Plasmidia
Ordo	: Ascaridida
Sub Ordo	: Ascaridata
Super Famili	: Ascaridoidea
Famili	: Ascarididae
Genus	: <i>Toxocara</i>
Spesies	: <i>Toxocara cati</i>
Sinonim	: <i>Toxocara mystax</i>

### 2.1.2 Habitat dan Morfologi *Toxocara cati*

Cacing *T.cati* memiliki ukuran tubuh berbentuk silindris atau bulat panjang, tidak mempunyai segmen dan berwarna putih kekuning-kuningan. Cacing jantan dewasa panjang tubuhnya berukuran 3 –7 cm, sedangkan betina dewasa berukuran 4-10 cm dengan spikula yang sama panjang ukurannya sekitar 1,63 – 2,08 mm. Selain itu cacing ini memiliki *cervical alae* (sayap leher) yang sangat lebar dan bergaris-garis (Soulsby, 1986; Kusumamihardja., 1993). Menurut Warren (1986) yang dikutip oleh Ulum (2004) ukuran telur *T.cati* memiliki diameter 65 –75 mikron dengan dinding telur yang sangat tebal karena terbungkus oleh membran kitin sehingga tahan terhadap lingkungan yang tidak sesuai.

Habitat cacing *T.cati* dewasa terdapat di dalam usus kecil kucing (Kusumamihardja., 1993). Levine (1978) menyatakan bahwa, hewan yang bertindak sebagai hospes transpor pada kasus toxocariasis adalah cacing tanah, kecoa, ayam, anak kambing dan tikus.

### 2.1.3 Siklus hidup dan cara penularan *Toxocara cati*

Siklus hidup cacing *T.cati* di mulai dari dikeluarkannya telur berembrio oleh cacing betina dewasa bersamaan dengan dikeluarkannya feses baik pada anak kucing berumur kurang dari 6 bulan, maupun kucing jantan dewasa yang menderita toxocariasis. Telur yang berembrio akan berkembang menjadi larva pertama ( $L_1$ ) dalam tujuh hari, kemudian dari tahapan larva pertama akan berkembang lagi menjadi larva kedua ( $L_2$ ) yang merupakan telur infeksi dalam

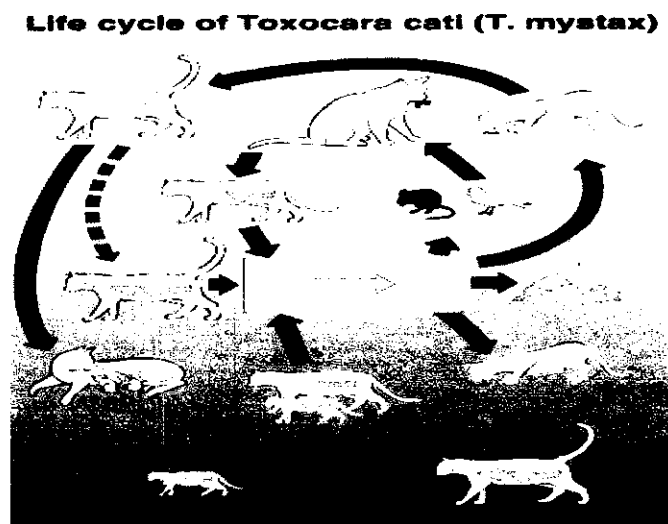
waktu 21-28 hari, perkembangan tahap larva harus didukung dengan lingkungan yang sesuai untuk pertumbuhannya. Infeksi toxocariasis terjadi pada saat termakannya telur yang mengandung larva kedua (L<sub>2</sub>) bersama makanan dan minuman yang selanjutnya telur infeksi tersebut akan menetas di dalam lambung. Dalam dua hari pertama larva akan berada dalam dinding lambung, pada hari ketiga dapat ditemukan di dalam organ hepar dan paru-paru, selanjutnya pada hari kelima larva ditemukan dalam organ paru-paru dan trakhea, sedangkan pada hari kesepuluh sudah ditemukan kembali di dalam lambung. Perubahan menjadi larva ketiga (L<sub>3</sub>) terjadi sesudah larva kembali ke lambung dan pada hari keduapuluh satu larva keempat (L<sub>4</sub>) terdapat di dalam lumen usus dengan jumlah banyak, selanjutnya berkembang menjadi cacing dewasa Kusumamihardja (1993).

Larva kedua (L<sub>2</sub>) dapat juga ditemukan dalam jaringan otot tikus, cacing tanah, kecoa, ayam, domba dan hewan lain yang memakan telur infeksi. Siklus hidup *T.cati* hampir sama dengan *T.canis*, tetapi tidak terjadi secara prenatal (Kusumamihardja., 1993).

Levin (1978) menyatakan bahwa, apabila infeksi terjadi pada selain hospes definitif maka telur akan menetas dalam lambung larva kedua (L<sub>2</sub>) dan akan terjadi *visceral larva migrans* (VLM) serta menetap di dalam jaringan organ dalam maupun organ somatik. Dapat pula terjadi *ocular larva migrans* (OLM), yaitu larva menuju ke mata dan otak.

Penularan cacing *T.cati* yang paling utama adalah melalui air susu induk kepada anaknya (*transmamary transmision*). Penularan ini dapat terjadi bila larva kedua (L<sub>2</sub>) *T.cati* menginfeksi induk betina kucing, larva tersebut tidak dapat

langsung berkembang menjadi karva ketiga ( $L_3$ ), melainkan harus menunggu induk betina tersebut bunting dan melahirkan. Adapun faktor-faktor yang dapat mempengaruhi siklus hidup dan cara penularan *T.cati* antara lain umur, jenis kelamin dan jenis hospes (Parsons, 1987).



Gambar 2.1 Siklus Hidup Cacing *Toxocara cati* (PHI, 2005)

Keterangan Gambar : Telur *T.cati* keluar bersama feses dari kucing yang menderita toxocariasis, setelah tahap pendewasaan (pematangan telur) pada lingkungan yang cocok, telur tersebut menjadi telur infeksius bagi binatang yang lain. Telur infeksius berkembang dalam host transport (cacing tanah, kecoa, burung, tikus, anjing dan juga manusia). Telur akan menetas menjadi larva dan berkembang menjadi cacing dewasa dalam usus kecil.

## 2.2 Aspek Zoonosis *Toxacara cati*

Toxocariasis merupakan penyakit yang disebabkan oleh cacing *T.cati* yang bersifat zoonosis karena selain dapat menginfeksi anak kucing dan kucing jantan dewasa (hospes definitif), dapat pula menginfeksi manusia, khususnya anak-anak. Infeksi terjadi dalam dua bentuk yaitu *visceral larva migrans* (VLM) yang dapat

menyebabkan *visceral toxocariasis* dan *ocular larva migrans* (OLM) yang dapat menyebabkan *ocular toxocariasis* (Uga *et al.*, 1990; Hubner *et al.*, 2001; Joel-Klein, 2005).

Penularan pada manusia dewasa terjadi karena tertelannya telur infeksi dari feses anak kucing dan kucing jantan dewasa yang menderita toxocariasis bersama makanan dan minuman. Pada anak-anak yang memiliki kegemaran bermain dengan hewan kesayangan, penularan terjadi karena tanah yang terkontaminasi telur infeksi dan kebiasaan anak yang senang memasukkan sesuatu ke dalam mulutnya (*geophagia*). Penularan juga dapat terjadi apabila manusia minum air susu mentah atau dengan pemasakan yang kurang sempurna dan memakan daging yang terinfeksi cacing *Toxocara sp* (Ito *et al.*, 1986; Alonso *et al.*, 2000; Radman *et al.*, 2000).

Penularan toxocariasis juga dapat terjadi melalui beberapa cara tergantung dari umur induk semang, yang meliputi *prenatal transmission* (transuterine), *lactogenic transmission* (colostral), *direct transmission* dan dapat pula pada *parathenic host transmission*. Direct transmision terjadi dengan cara peroral yaitu tertelanya telur berembrio yang berasal dari feses kucing penderita yang berumur muda (Kusumamihardja., 1993).

Pengendalian penyakit toxocariasis dapat dilakukan dengan cara mencuci tangan setelah bermain dengan hewan kesayangan, menjaga kebersihan halaman rumah sebagai tempat bermain kucing, memberikan makanan yang bergizi, vitamin dan pemberian antihelminik secara teratur pada hewan kesayangan kita.

## 2.3 Patogenesis

Cacing merupakan organisme yang kelangsungan hidupnya bergantung pada tercapainya penyesuaian terhadap induk semang (inang). Apabila *T.cati* menginfeksi akan memperlihatkan gejala subklinis dan bila parasit cacing menyerang suatu induk semang yang belum sepenuhnya sesuai, maka akan berkembang banyak dalam jumlah yang luar biasa sehingga mengakibatkan penyakit tersebut bersifat akut (Tizzard., 1982).

Manifestasi klinis toxocariasis pada manusia terjadi dalam dua bentuk yaitu *visceral larva migrans* (VLM) yang dapat menyebabkan *visceral toxocariasis* dan *ocular larva migrans* (OLM) yang dapat menyebabkan *ocular toxocariasis*.

### 2.3.1 *Visceral Larva Migrans (VLM)*

Visceral toxocariasis ditandai dengan adanya gejala yang simptomatis seperti demam, batuk, menggigil, pembesaran limpa, pembesaran hati dengan hiper eosinofilia, malas beraktifitas dan pembesaran limfonodule (“*swollen glands*”) (Joel-Klein., 2005).

### 2.3.2 *Ocular Larva Migrans (OLM)*

Menurut Viqar Zaman (1997) larva infeksi terkadang dapat menuju ke mata, susunan syaraf pusat dan organ lain dari tubuh. Pada stadium berat anak-anak dapat mengakibatkan penurunan daya penglihatan serta kerusakan pada retina mata sehingga dapat mengalami kebutaan. Goffete *et al.* (2000) melakukan



penelitian pada wanita yang berusia 40 tahun yang menderita toxocariasis, didapatkan nilai titer antibodi yang lebih tinggi dalam cairan *serebrospinal* dibandingkan titer antibodi serumnya. Berdasarkan pemeriksaan cairan *serebrospinal* menunjukkan adanya *eosinophilic peocytosis*, sehingga dapat disimpulkan bahwa toxocariasis dapat mengakibatkan *hipersensitivitas* sampai pada *spinal cord*.

#### 2.4 Diagnosis Toxocariasis

Diagnosis toxocariasis secara konvensional dengan melakukan pemeriksaan feses untuk menemukan telur cacing *T.cati* tidak selalu berhasil hal ini mengingat stadium telur dan stadium dewasa hanya ditemukan pada hospes definitif.

Diagnosis berdasarkan gejala klinis sulit dilakukan, karena gejala klinis penyakit toxocariasis sangat bervariasi (Uga *et al.*, 1990) sehingga diperlukan diagnosis secara serologis dan imunologis. Waren (1993) menyatakan bahwa ada beberapa macam metode untuk mendiagnosis penyakit pada nematoda yaitu: Uji aglutinasi cepat, Imunodifusi, Imunoelektroforesis, ELISA (*Enzime Linked Immunosorbent Assay*), Immunoblotting dan Imunohistokimia.

#### 2.5 Antigen Parasit

Antigen merupakan substansi yang dikenal oleh sistem imun tubuh sebagai benda asing yang dapat diukur berdasarkan keberhasilan mengikat antibodi, sedangkan imunitas merupakan semua mekanisme fisiologi yang

membantu mengenal benda asing, menetralkan, menyisipkan, mengurangi dan memetabolisme benda asing tersebut ( Bellanti, 1993).

Imunogen merupakan bagian dari antigen yang dapat memicu respon imun untuk menghasilkan antibodi (Abbas *et al.*, 2000) Imunogenitas suatu substansi ditentukan oleh beberapa faktor penting, di antaranya molekul substansi tersebut harus berukuran cukup besar, walaupun belum diketahui batas ukuran molekul yang menentukan imunogenitas. Substansi dapat dikatakan bersifat imunogen jika mempunyai berat molekul  $> 5.000$  Dalton (Smith, 1995) dan imunogen yang paling poten adalah makromolekul protein dengan berat molekul  $>10.000$  Dalton (Goodman, 1991 dan Abbas, Litchman and Pober., 2000). Hampir semua molekul biologik, termasuk karbohidrat, lipid, hormon, asam nukleat dan protein dapat bertindak sebagai antigen, tetapi hanya makromolekul yang bersifat imunogenik yang mampu merangsang aktifitas limfosit yang diperlukan untuk mangawali respon imun. Imunogen yang paling poten umumnya merupakan makromolekul polisakarida, polipeptida atau protein (Kresno, 1996).

Sifat-sifat umum imunogen adalah (1) Keasingan, yaitu : dalam lingkungan yang normal sistem imun membedakan antara *self* dan *non-self*; (2) Ukuran, antigen harus mempunyai ukuran yang minimum dan efektif dengan berat molekul kurang lebih 10.000 Dalton serta (3) Kompleksitas, faktor yang menentukan kompleksitas imunogen yaitu sifat fisik dan kimia molekuler (Wahab dan Noerjati, 1993).

Sistem imun merupakan sistem pertahanan tubuh yang berfungsi untuk melindungi bagian tubuh hewan terhadap masuknya organisme, produk beracun

maupun benda asing. Adanya benda asing yang masuk nantinya akan berikatan dengan reseptor yang diperantarai oleh limfosit dan dihasilkan oleh produk khusus berupa protein spesifik yang disebut antibodi (Baratawidjaya, 2000). Antibodi memiliki beberapa fungsi antara lain, mengikat imunogen serta berinteraksi dengan jaringan hospes dan sistem efektor untuk fasilitas penolakan imunogen.

Protein secara alami bersifat imunogenik, karena senyawa ini mempunyai berat molekul yang tinggi sehingga dapat merangsang sistem imun untuk memproduksi antibodi terhadap molekul tersebut. Pada telur cacing *T. cati*, protein antigenik dapat diperoleh dari kulit telur (*egg shell*), membran vitelin (*membrane viteline*) dan *granular layer* (Abdel-Rahman *et al.*, 2000). Protein antigenik juga dapat diperoleh dengan melakukan pengamatan pada tahap larva pertama, kedua, ketiga dan keempat serta dapat juga di dapat dari cacing dewasa. Sumber antigen yang lain adalah antigen somatik (el-Massry, 1999), antigen E-S dan *surface antigen* (Bowman, Grieve and Grieve., 1987).

## **2.6 Isolasi Dan Karakterisasi Protein *Toxocara cati*.**

Karakterisasi Protein *Toxocara cati* dapat dilakukan dengan cara beberapa metode elektroforesis, antara lain SDS-PAGE, *Western blot*, *dot blot*, dan elusi. Elusi merupakan metode elektroforesis yang menghasilkan protein murni. Dalam tahap elusi ini, sebelumnya perlu dilakukan metode SDS-PAGE untuk mengidentifikasi Berat Molekul (BM) protein *Toxocara cati*. Gel hasil SDS-PAGE selanjutnya dipotong menurut BM yang dikehendaki, kemudian gel yang terdapat pita BM *T. cati* dielusi dengan cara dipotong-potong menjadi dua bagian

dan dimasukkan ke dalam membran selofan menggunakan pelarut yang cocok yang bertujuan agar protein terlepas dari gel. Dalam teknik ini, gel yang digunakan adalah *gel polyacrilamid* untuk menghindari pita yang cembung (Wongsosupantio, 1990).

### **2.7 Enzim Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

ELISA (*Enzim Linked Immunosorbent Assay*) pertama kali diperkenalkan oleh Engvall dan Parlmann pada tahun 1971 dengan cara mengkonjugasikan enzim dalam immunoassay. ELISA merupakan salah satu metode yang sensitif untuk mendeteksi antigen, antibodi, hormon dan bahan-bahan toksik. Dua macam antibodi yang digunakan dalam ELISA, yaitu antibodi pertama (*primary antibody*) mengikat pada antigen dan antibodi kedua (*secondary antibody*) atau antibodi antiglobin mengikat pada antibodi pertama. Antiglobin ini dilabel dengan enzim seperti *horeradish peroxidase*, *alkaline phospatase* yang memudahkan untuk memonitor perubahan warna. Adanya reaksi enzim ini, menyebabkan antibodi pertama dapat dianalisis secara kuantitatif (Rantam, 2003).

Prinsip ELISA didasarkan pada dua pengamatan. Pertama, antibodi dan beberapa antigen yang dapat menempel pada piringan plastik polistirin dan kemampuan imunologis terjaga secara penuh. Kedua, antigen dan antibodi dapat diikatkan pada enzim dan kompleks yang terbentuk dan masih berfungsi penuh secara imunologis maupun enzimatis. Enzim yang digunakan dalam ELISA adalah  $\beta$ - *Galaktosidase*, *peroksidase*, *glukose oksidase* dan *alkaline phospatase* (Pelezar, Chan dan Pelezar., 1988).

Berdasarkan komponen yang dilabel, ELISA dibagi menjadi 3 jenis, yakni pelabelan pada antibodi, pelabelan pada antigen dan pelabelan pada anti imunoglobulin (Suwarno dkk, 2003).

Sistem ELISA terbagi menjadi dua macam, yaitu sistem *homogen* dan sistem *heterogen*. Pada sistem heterogen terbagi lagi menjadi dua bentuk yaitu, kompetitif dan *non kompetitif* ELISA. *Non kompetitif* ELISA merupakan suatu sistem yang paling banyak dikembangkan karena model ini lebih sensitif dibandingkan model lainnya, salah satunya yakni metode *Indirect-ELISA* (Rantam, 2003).

Menurut Suwarno dkk (2003) antibodi dapat ditentukan dengan melakukan pelabelan pada anti-Ig nya yaitu dengan teknik *Indirect-ELISA*. Serum dengan antibodi yang akan ditentukan direaksikan dengan antigen yang telah diikatkan pada fase padat kemudian ditambahkan konjugat, terakhir ditambahkan substrat. Hasil akhir dari penentuan antibodi yang menggunakan teknik *Indirect-ELISA* akan menghasilkan produk berwarna, sehingga dapat dilakukan pembacaan pada *ELISA reader* berdasarkan nilai kerapatan optik atau nilai absorbent (*Optical density*).

## **BAB 3**

# **MATERI DAN METODE**

## **BAB III**

### **MATERI DAN METODE**

#### **3.1 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dimulai bulan Juni 2005 sampai dengan Maret 2006. Tempat pelaksanaan penelitian di Laboratorium Helminthologi dan Laboratorium Virologi, Fakultas Kedokteran Hewan serta *Tropical Disease Center* (TDC) Universitas Airlangga Surabaya.

#### **3.2 Materi Penelitian :**

##### **3.2.1 Hewan Percobaan**

Pada penelitian ini hewan coba yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*) jantan dengan umur 8 minggu sebanyak 20 ekor dan beratnya rata-rata 37 gram.

##### **3.2.2 Bahan Penelitian**

Bahan-bahan utama yang digunakan pada penelitian ini yaitu telur infeksi (larva kedua), larva kedua jaringan cacing *T.cati*, yang diperoleh dengan 3 cara, yaitu pemurnian feses dengan teknik gradien preparasi, melakukan pembedahan pada saluran pencernaan dari lima ekor kucing yang menderita toxocariasis yang diambil dari beberapa tempat dan pasar di kota surabaya serta penggerusan cacing dewasa *T.cati*. Bahan kimia yang digunakan adalah ether, aquadest, media RPMI,

Formalin 10 %, larutan sukrosa dengan berbagai konsentrasi (20%, 25%, 30%, 35%, 40%), *Phosphat Buffer Saline* (PBS) dengan pH 7,2.

Bahan yang digunakan untuk SDS-PAGE adalah 30% *Acrylamid* sebanyak 2,5 ml, *Tris HCl* Ph 8,8 sebanyak 1,2 ml, 0,5 % SDS, Aquadest 1,1 ml, TEMED 5 µl, APS 10 % sebanyak 30 µl, Larutan Laemmli (gliserin 5 ml, *Brom phenol blue* 0,4 ml, SDS 10 % sebanyak 11,5 ml, M Tris HCL ph 6,8 sebanyak 6,25 ml, Merkpto etanol 5% sebanyak 50 µl,

Bahan yang digunakan untuk teknik *preparasi gel elektrophoresis* (ELUSI) adalah *Phosphat buffer saline* (PBS), butanol, Acrilamid, aquadest dan Laemmli buffer, 25 ml methanol 5 %, 3,75 ml asam asetat 7,5 %, aquades 21,25 ml, *Cromassi blue*, asam asetat 10 % dan gliserin 10 %

Bahan-bahan yang digunakan pada imunisasi mencit adalah *complete Freund's adjuvan* (CFA), *incomplete Freund's adjuvan* (IFA), Aqua bidestilata steril 500 ml, *Penicilin-Streptomycin* 8 : 1.

Bahan-bahan yang digunakan pada uji indirect ELISA adalah 0,05% PBS *Tween- 20*, *buffer coating* (Buffer Carbonat-Bicarbonat), washing buffer, *blocking buffer* (*Bovine Serum Albumin* 1%), *Conjugate* (*Anti-Mouse-Ig G AP Conjugate*), antigen (Protein 9 kDa E-S larva kedua jaringan *T.cati*), Antibodi (serum yang diperoleh dari mencit yang telah di imunisasikan dengan E-S larva kedua jaringan *T.cati*, *Ancylostoma sp*, *Diphylidium caninum*), substrat buffer (DEA 1 mol/L), substrat PNPP (*Para Nitro Phenyl Phosphat*) dan NaOH 3 N.



### 3.2.3 Alat –Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *styroform*, jarum pentul, kandang kucing, inkubator, *freezer*  $-30^{\circ}\text{C}$ , cawan petri, scalpel, pinset, gunting bedah, nampan plastik, mikroskop *inverted*, mikroskop *disecting*, tabung conical kecil dan besar, label, selotip, sentrifus, pipet plastik, pipet *ependrof* 1000 $\mu\text{l}$ , 100  $\mu\text{l}$ , *yellow tip*, *blue tip*, *sput disposable*, jarum trokar, filter T200 (25  $\mu\text{m}$ ), filter ukuran 1 mm, corong plastik, *object glass*, *cover glass*, sonikator, Sonde, gelas plastik, mikrotube, kapas, kandang mencit, *Comb*, Gelas plate, *shaker*, *Elektro elusi*, *selofan*, power supply, sedangkan alat-alat yang digunakan pada *Indirect ELISA* adalah Pipet *Multi Channel*, Pipet *ependrof* 20-200  $\mu\text{l}$  dan 1-10  $\mu\text{l}$ , gelas ukur 500 ml, beker gelas 100ml, mikroplate dasar "U", timbangan elektrik, aluminium foil, pipet hisap, pipet pasteur, *magnetic stirrer*, *magnetic bar*, *ELISA reader*.

### 3.3 Metode Penelitian

Penelitian dilakukan dengan tahapan-tahapan metode sebagai berikut :

#### 3.3.1 Isolasi Telur infektif (larva kedua) *Toxocara cati*

Isolasi telur infektif (larva kedua *T.cati*) diperoleh dengan 3 cara yaitu : Pembedahan saluran pencernaan kucing yang terinfeksi berat *T.cati*, penggerusan cacing dewasa *T.cati* dan pemurnian feses yang diambil dari kucing penderita toxocariasis dengan tehnik Gradien Preparasi (*preparation of gradien*) (DrenchRite, 1996). Pada Pembedahan saluran pencernaan kucing yang terinfeksi berat *T.cati* dilakukan dengan cara 5 ekor kucing jantan yang terinfeksi berat

*T.cati* di euthanasia dengan menggunakan ether secara terbuka (*Open drop*) sampai kucing tersebut mati. Selanjutnya dilakukan preparasi pada saluran pencernaan dan cacing yang didapatkan sebanyak 16 ekor cacing dewasa. Cacing yang ditemukan diambil kemudian dicuci dengan aquadest agar cacing tidak bercampur dengan kotoran, selanjutnya di cuci kembali dengan PBS hingga bersih. Cacing yang diperoleh diidentifikasi di bawah mikroskop *disecting*, kemudian dimasukkan ke cawan petri dan disimpan dalam inkubator dengan suhu 37°C. biasanya cacing *T.cati* hanya dapat bertahan hidup selama 3-4 hari, setelah hari ke 3 telur yang dikeluarkan oleh tubuh cacing dipindahkan ke cawan petri yang lain pada media PBS dan disimpan pada suhu ruangan. Telur tersebut di pupuk selama 21-28 hari untuk mendapatkan telur Infektif (Larva Kedua) *T.cati*. Untuk menghambat pertumbuhan mikroorganisme pengganggu ditambahkan beberapa tetes formalin 1 %.

Isolasi telur infektif yang diperoleh dari penggerusan cacing dewasa, yaitu dengan melakukan penggerusan cacing dewasa baik yang sudah mati maupun dari cacing *T.cati* yang hidup. Telur yang didapat dari hasil gerusan dimasukan ke dalam cawan petri dan disimpan pada suhu ruangan dan untuk mencegah adanya mikroorganisme pengganggu perlu ditambahkan beberapa tetes formalin 1 %. Telur cacing dipupuk pada media PBS selama 21-28 hari untuk mendapatkan telur infektif (Larva kedua) *T.cati*.

Isolasi telur infektif cacing *T.cati* yang didapat dari kucing penderita toxocariasis di pasar dan beberapa tempat di kota surabaya, dengan cara melakukan teknik pemurnian feses Gradien Preparasi (*preparation of gradien*)

(DrenchRite, 1996). Feses diencerkan dengan air dengan perbandingan 1:10, suspensi feses tersebut kemudian disaring dengan filter yang berukuran 1mm. Larutan sukrosa yang telah dibuat dengan berbagai konsentrasi (20%, 25%, 30%, 35%, 40%). larutan tersebut dimasukkan ke dalam tabung sentrifus dengan menggunakan spuit yang telah dipasang jarum trokar. Larutan dimasukkan mulai dari konsentrasi terendah hingga yang tertinggi, masing-masing 2 ml. selanjutnya dimasukkan suspensi feses sebanyak 2 ml pada tiap-tiap tabung, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit. Hasilnya telur *T.cati* akan berada pada konsentrasi 30%-35% berbentuk cincin berupa kabut yang berwarna putih. Telur tersebut diambil dengan menggunakan spuit yang terpasang jarum trokar lalu disaring dengan filter T 200 (25  $\mu$ m). Telur yang diperoleh dipindahkan kedalam cawan petri yang telah diberi PBS untuk mencegah mikroorganisme pengganggu ditambahkan beberapa tetes formalin 1% dan diinkubasikan pada suhu ruangan. Setiap hari telur diamati hingga menjadi Telur Infektif (larva kedua) selama 21-28 hari.

### **3.3.2 Isolasi Larva Kedua (L2) Jaringan *Toxocara cati***

Larva kedua (L2) jaringan *T.cati* diperoleh dengan cara melakukan infeksi buatan pada 20 ekor mencit jantan dengan berat rata-rata 37 gram. Dosis yang dipakai 10.000-30.000 butir/ekor mencit secara peroral dengan menggunakan sonde, setelah dilakukan infeksi mencit dibiarkan 3-4 hari tetapi harus diamati setiap harinya. Apabila terdapat mencit yang mati, segera dimasukkan ke dalam freezer pada suhu -30°C agar tidak busuk. Pada infeksi hari keempat, mencit di

ethanasia dengan menggunakan ether dan dibedah untuk diambil jaringan somatik, organ saluran pencernaan dan organ viscera (hepar, ginjal, jantung dan paru). Organ-organ yang telah dipisahkan dipotong kecil-kecil lalu dicuci dengan PBS dua kali, kemudian suspensi organ tersebut diinkubasi dengan suhu 37°C pada cawan petri yang berisi larutan Tripsin 1%. Setiap 30 menit suspensi organ dikeluarkan dari inkubator dan diperiksa di bawah mikroskop, untuk diambil larvanya yang telah keluar. Hal ini dilakukan seterusnya sampai larva kedua jaringan habis. Larva kedua jaringan yang didapat segera disimpan dalam *freezer* pada suhu -30°C.

### **3.3.3 Pembuatan Homogenat E-S Larva Kedua Jaringan *T.cati***

E-S Larva kedua jaringan diperoleh dari larva kedua jaringan yang telah diisolasi dan diinkubasikan pada suhu 37°C dengan menggunakan media RPMI (*Rose Park Memorial Institute*). Cairan E-S tersebut disimpan dalam tabung dan disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit untuk diambil supernatannya, lalu supernatan tersebut ditera untuk mengetahui kadar proteinnya, E-S larva kedua jaringan *T.cati* tersebut disimpan dalam dalam *freezer* pada suhu -30°C agar proteinnya tidak rusak. Homogenat E-S Larva kedua jaringan *T.cati* disiapkan untuk digunakan pada isolasi protein dengan menggunakan teknik SDS-PAGE untuk diidentifikasi proteinnya.

### 3.3.4 Identifikasi Protein *Toxocara cati* dengan Metode SDS-PAGE

Pada proses SDS-PAGE ini terdiri dari 3 tahapan 1) **Separating Gel**, bahan –bahan *separating gel* dimasukkan ke dalam gelas plate melalui ujung plate, kemudian ditambahkan butanol di atas permukaan *separating gel* hingga plate terisi penuh hal ini dilakukan agar permukaan gel tampak rata, setelah itu larutan tersebut didiamkan selama 20 menit agar larutan dapat membeku menjadi gel, setelah 20 menit butanol dibuang dan dibersihkan dengan menggunakan kertas *watchman* 2) **Stacking Gel**, bahan-bahan *stacking gel* di dicampur semua dan dimasukkan ke dalam plate yang telah terisi *separating gel* yang telah membeku, kemudian *comb* (berbentuk sisir) dipasangkan dibagian atas gel, didiamkan selama 20 menit. Penjepit gelas plate dilepas dan karet di sekeliling glass plate juga di ambil, kemudian plate dimasukkan ke dalam *chamber* yang telah diisi larutan *E buffer* sebanyak 250 ml. Sampel disiapkan sebanyak 15  $\mu$ l dicampur dengan larutan *laemmli* dengan perbandingan 1 : 4, kemudian sampel dipanaskan dalam *Waterbath* 100°C selama 5 menit, setelah itu sampel tersebut dimasukkan ke dalam sumuran, *power supply* dinyalakan dengan dengan tegangan 150 V, 40mA sampai warna biru turun ke dasar gel hingga terbentuk pita-pita protein selama 2 jam. 3) **pewarnaan**, tahap pewarnaan dalam proses ini menggunakan *cromassi blue*, setelah *power supply* dimatikan, plate dibuka dan gel hasil running diambil kemudian direndam dalam wadah yang berisi pewarna dan diletakkan diatas *shaker* hingga pita-pita protein muncul.

### **3.3.5 Isolasi Protein E-S Larva Kedua Jaringan *T.cati* dengan Teknik Elektroelusi**

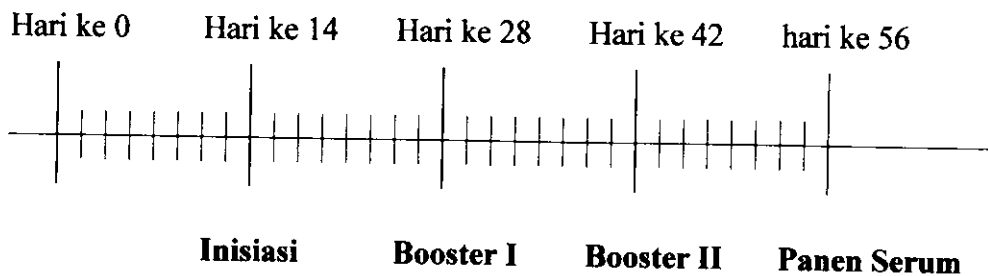
Isolasi Protein E-S Larva Kedua Jaringan *T.cati* dengan membuat pita-pita protein seperti pada proses SDS-PAGE, tetapi pada teknik elusi ini pita-pita yang telah terbentuk tidak diwarnai dan langsung dipotong berdasarkan berat molekul protein dari E-S larva kedua jaringan *T.cati*. Potongan-potongan gel tersebut dimasukkan ke dalam membran selofan yang berisi 0,05 M buffer fosfat dan elusi dilakukan pada dua gel. Ujung selofan pada bagian bawah diikat kemudian ditambahkan PBS 2 ml setelah itu ujung selofan diikat pada bagian atasnya. Selanjutnya dilakukan proses *running* dan elektroelusi yang telah ditambahkan *buffer* 500 µl dengan meletakkan selofan pada kutub negatif-positif yang ada pada elektroelusi dengan tegangan 125 volt, 40 mA selama 45 menit. Proses ini bertujuan untuk memisahkan protein dari gel sehingga nantinya didapatkan protein antigen yang murni (Rantam, 2003). Setelah didapatkan protein yang dikehendaki dihitung kadar proteinnya dengan spektrofotometer untuk menentukan pengenceran antigen pada uji ELISA.

### **3.3.6 Pembuatan Antibodi Poliklonal Pada Mencit**

Imunisasi pada mencit dilakukan dengan langkah-langkah sebagai berikut: menyiapkan mencit sebanyak 20 ekor. Dibagi secara acak menjadi empat perlakuan, yaitu pada perlakuan nol (P0) mencit yang diinjeksi dengan adjuvan CFA (*complete Freund's adjuvant*) (sebagai kontrol), (P1) adalah mencit yang diimunisasi dengan E-S larva kedua jaringan *T.cati*, (P2) adalah mencit yang diimunisasi dengan homogenat *Ancylostoma sp* dan (P3) adalah mencit yang

diimunisasi dengan homogenat *Dipylidium caninum*. Imunisasi diinjeksikan secara sub cutan dengan dosis imunisasi 200 µg per ekor mencit.

Tahap imunisasi yaitu pada dua minggu pertama dilakukan **inisiasi** dengan menambahkan adjuvant CFA (*complete Freund's adjuvant*), dua minggu berikutnya dilakukan **booster I** dengan menggunakan IFA (*incomplete Freund's adjuvant*) dan pada dua minggu berikutnya dilakukan **booster II** dengan menggunakan CFA (*complete Freund's adjuvant*). Setelah dilakukan dua kali booster dua minggu berikutnya dilakukan pemanenan darah mencit yang diambil dari ekornya, kemudian di sentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit, kemudian diambil serumnya yang selanjutnya digunakan sebagai antibodi pada uji *Indirect-ELISA*. Adapun pelaksanaan imunisasinya dapat dilihat selengkapnya pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Pelaksanaan Imunisasi

Keterangan :

Pada hari ke 14 (dua minggu pertama): Tahap inisiasi dengan CFA.

Pada hari ke 28 (dua minggu kedua): Tahap Booster I dengan IFA.

Pada hari ke 42 (dua minggu ketiga): Tahap Booster II dengan CFA.

Pada hari ke 56 (dua minggu keempat): Tahap Panen serum mencit.

### 3.3.7 Uji ELISA

Pada penelitian ini menggunakan uji *Indirect* ELISA. Tahapan kerja antara lain: Coating Antigen, Blocking buffer, Inkubasi serum, Inkubasi konjugat dan yang terakhir penambahan substrat.

langkah-langkahnya sebagai berikut, pertama-tama melakukan **Coating Antigen** dengan mengencerkan antigen dalam *carbonate buffer* dengan konsentrasi 1-10 µg/1 ml, kemudian antigen dimasukkan (protein 9,1 kDa E-S larva kedua jaringan *Toxocara cati*) ke dalam sumuran/well sebanyak 100µl, tutup mikroplate dengan palstik bening lalu simpan dalam kulkas dengan suhu 4 °C semalaman. **Blocking buffer**, setelah disimpan semalaman plate dikeluarkan dan antigen dibuang kemudian di cuci dengan NaCL-Triton sebanyak 3x1 menit kemudian ditambahkan blocking buffer sebanyak 200 µl ke tiap-tiap sumuran, inkubasi pada suhu kamar (37 °C) selama 1 jam, setelah 1 jam di cuci kembali dengan NaCL-Triton sebanyak 3x1 menit. **Inkubasi Serum**, mengencerkan serum dari mencit yang diimunisasi E-S larva kedua jaringan *T.cati*, *Ancylostoma sp*, *Dipylidium caninum* dengan *blocking buffer* dengan perbandingan (1:10-1:100), kemudian dimasukkan ke dalam tiap -tiap sumuran sebanyak 100 µl, dan inkubasikan pada suhu 37 °C selama 1jam, selanjutnya di cuci dengan NaCL-Triton sebanyak 3x1 menit. **Inkubasi Konjugat**, mengencerkan konjugat (Anti-Mouse Immunoglobulin G berlabel enzim *Alkaline Phosphatse*) dengan PBS *Tween-20* 0,6 ml hingga diperoleh pengenceran 1/2500, kemudian diisikan pada tiap-tiap sumuran sebanyak 100 µl dan di inkubasi pada suhu kamar selama 1 jam, di cuci kembali dengan NaCL-Triton sebanyak 3x1 menit. langkah terakhir pengerjaan



*Indirect-ELISA* ini dengan penambahan **Substrat**, memasukkan 100  $\mu$ l substrat pada tiap sumuran, kemudian didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar dan diletakan dalam ruangan gelap hingga tampak warna kekuningan, untuk stop reaksi (menghentikan reaksi ) tambahkan NaOH 3 N sebanyak 50  $\mu$ l. Pembacaan Nilai absorban dengan menggunakan *ELISA-reader* dengan panjang gelombang 405 nm.

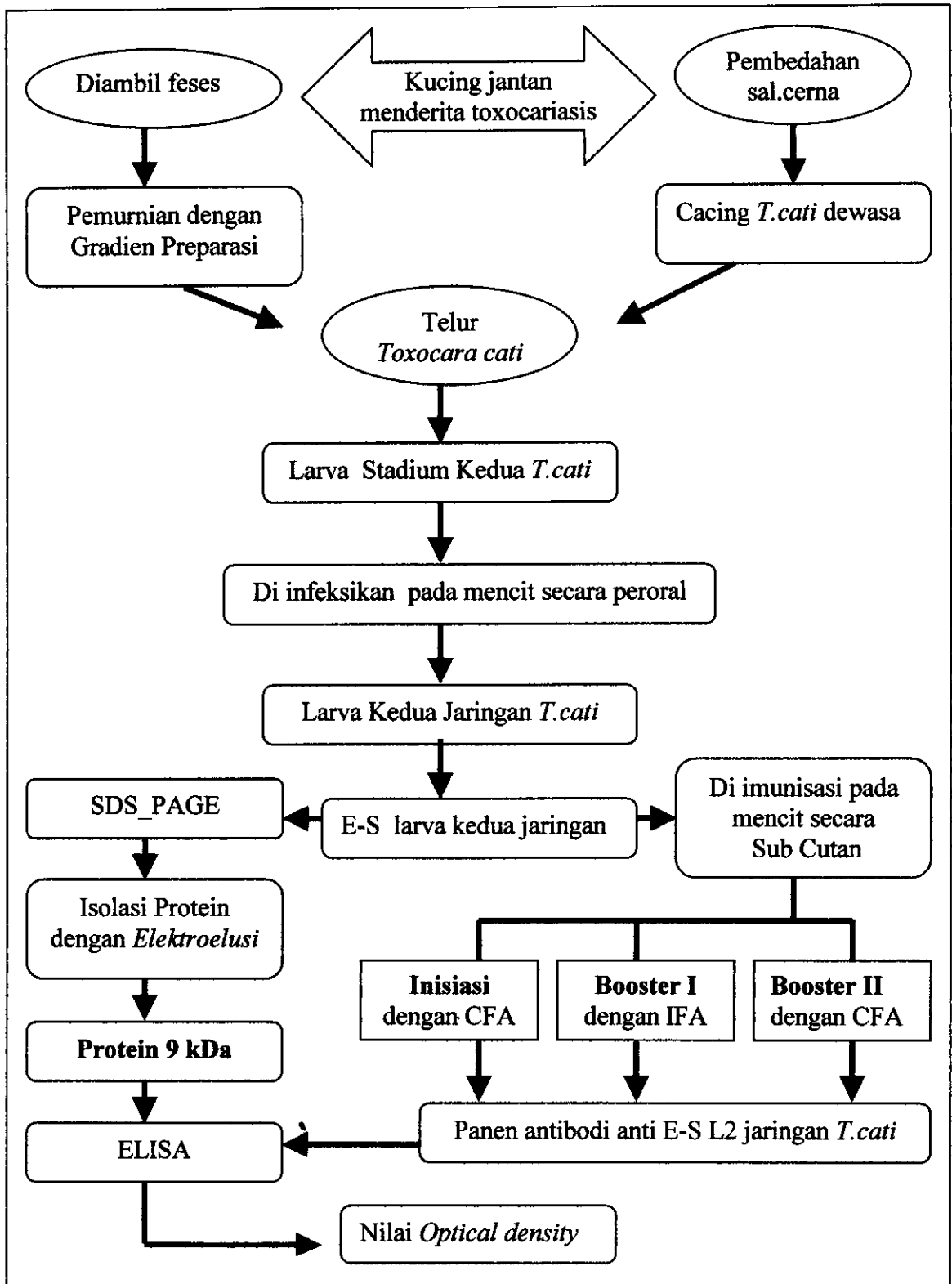
### 3.4 Rancangan Penelitian

Rancangan yang digunakan pada penelitian ini adalah *Factorial Post Test Only Control Group Design* (Zainuddin, 2001).

### 3.5 Analisis Data

Analisis data yang digunakan diperoleh dari data pada uji ELISA ditabulasikan kemudian dianalisis dengan *Anova (Analysis of Variant) Factorial*, menggunakan *statistical program and service solution* (SPSS) rel 13.0 for windows (Santoso, 2001). Apabila terdapat perbedaan yang bermakna, dilanjutkan dengan uji Duncan 5 %.

3.6 Bagan Metode Penelitian:



## BAB 4 HASIL PENELITIAN

## BAB IV

### HASIL PENELITIAN

#### 4.1 Hasil Isolasi Larva Kedua jaringan *Toxocara cati*

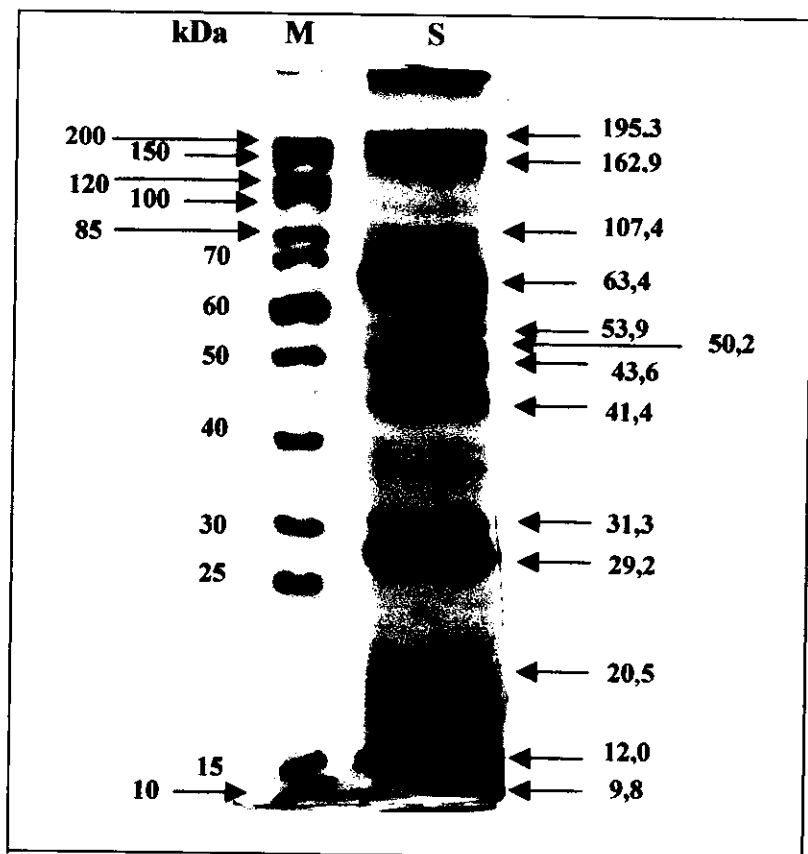
Pada penelitian Larva Kedua Jaringan *T.cati* diperoleh dengan melakukan infeksi buatan pada 20 ekor mencit jantan secara peroral, setelah 4 hari mencit dibedah dan dipisahkan bagian somatik, viscera dan organ pencernaannya kemudian dipotong kecil-kecil. Organ tersebut direndam dalam larutan tripsin 1 %, setelah itu larva kedua jaringan diambil sampai habis. Larva kedua jaringan yang telah diperoleh diambil E-S nya untuk dijadikan homogenat E-S larva kedua jaringan *T.cati*. Homogenat tersebut akan digunakan sebagai bahan identifikasi dan isolasi pada metode SDS-PAGE dan Elusi serta digunakan pada uji ELISA. Larva kedua jaringan *T.cati* yang diperoleh, ditampilkan pada gambar 4.1



Gambar 4.1 Larva Kedua Jaringan *Toxocara cati*  
(Pembesaran 100 X)

#### 4.2 Hasil Identifikasi Protein Cacing *T.cati* dengan Metode SDS-PAGE

Identifikasi protein *T.cati* yang diperoleh dari E-S larva kedua jaringan cacing *Toxocara cati* dianalisis menggunakan metode SDS-PAGE, diperoleh hasil berturut-turut dari atas ke bawah berupa 13 fraksi pita protein. Gambar selengkapnya dapat dilihat pada gambar 4.2



Gambar 4.2 . Hasil Identifikasi Protein E-S L2J *T.cati* dengan Metode SDS-PAGE

M = Marker, S = Protein hasil SDS

Keberadaan Protein Spesifik E-S L2J *T.cati* pada BM 20,5 kDa dan 9,8 kDa

Pada penelitian ini pita-pita protein pada marker mempunyai persamaan  $y = 5,639 - 4,411x + 6,43x^2 - 3,708x^3$ . Penghitungan menggunakan *Statistical Program for Social Society* (SPSS) for Windows. Perhitungan selengkapnya dapat di lihat pada lampiran 1.

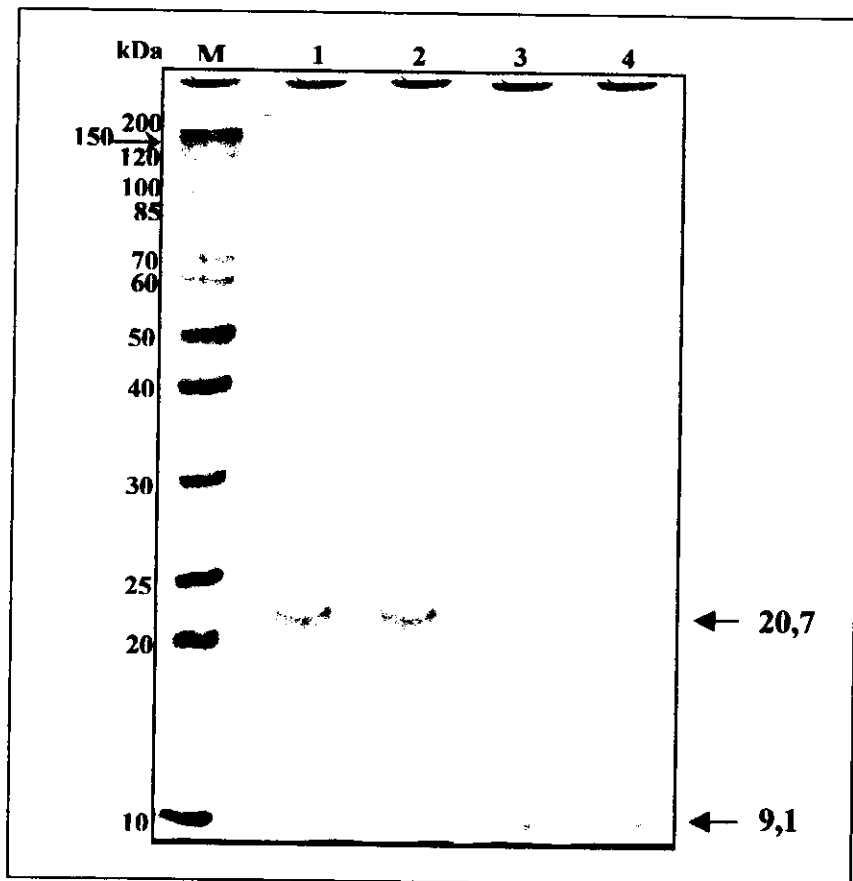
Hasil analisis protein yang diperoleh dari E-S larva kedua Jaringan *T.cati* didapatkan 13 fraksi pita protein dengan berat molekul 195,3 kDa, 162,9 kDa, 107,4 kDa, 63,4 kDa, 53,9 kDa, 50,2 kDa, 43,6 kDa, 41,4 kDa, 31,3 kDa, 29,2 kDa, 20,5 kDa, 12,0 kDa dan 9,8 kDa.

Diantara 13 fraksi pita protein tersebut, terdapat 5 pita protein yang terlihat lebih tebal warna pita protein yang terbentuk yaitu pada berat molekul: 195,3 kDa, 162,9 kDa, 63,4 kDa, 29,2 kDa, 12,0 kDa dan 9,8 kDa, sedangkan pada berat molekul 107,4 kDa, 53,9 kDa, 50,2 kDa, 43,6 kDa, 41,4 kDa, 31,3 kDa, 20,5 kDa tampak lebih tipis karena intensitas warnanya rendah.

Pada hasil analisis protein yang diperoleh dari E-S larva kedua Jaringan *T.cati* keberadaan protein spesifik yang akan nantinya digunakan sebagai bahan uji (antigen) pada uji *Indirect-ELISA*. Protein tersebut terletak pada pita protein dengan berat molekul 20,5 kDa dan 9,8 kDa.

### 4.3 Isolasi Protein Spesifik *T.cati* dengan Teknik ELUSI.

Setelah dilakukan teknik *preparasi gel elektroforesis*, hasil tersebut dianalisis kembali dengan metode SDS-PAGE. Hasil yang diperoleh berupa dua buah protein spesifik dari E-S larva kedua jaringan *T.cati* dengan berat molekul 9,1 kDa dan 20,7 kDa. Gambar selengkapnya dapat dilihat pada gambar 4.3



Gambar 4.3. Isolasi Protein Spesifik ES L2J *T.cati* dengan Teknik Elusi, dianalisis kembali dengan Metode SDS-PAGE  
M = Marker, Kolom 1-4 = Protein spesifik hasil elusi

Pada penelitian ini pita-pita protein pada marker mempunyai persamaan  $Y = 5,237 - 1,317x$ . Penghitungan menggunakan *Statistical Program for Social Society* (SPSS) rel 13.0 for Windows yang menunjukkan adanya korelasi negatif dengan nilai  $r = -0,985$ , a (*intercept*) = 5,237 dan b (*slope*) = -1,317. Perhitungan selengkapnya dapat di lihat pada lampiran 2.

Hasil analisis protein spesifik yang diperoleh dari E-S larva kedua jaringan *T.cati* didapatkan dua buah protein spesifik dengan berat molekul 9,1 kDa dan 20,7 kDa.

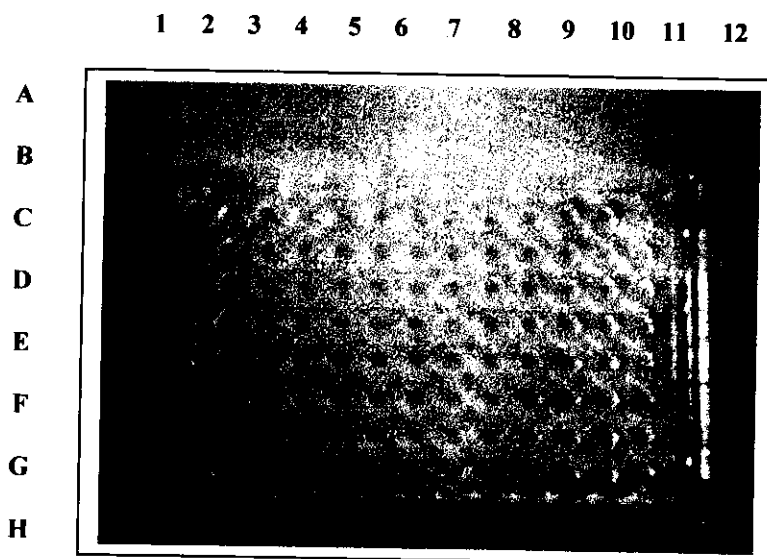
Hasil analisis tersebut difokuskan pada protein 9,1 kDa yang terletak di bawah marker 10 kDa dan protein dengan berat molekul 20,7 terletak diantara marker 20 kDa dengan marker 25 kDa. Protein spesifik tersebut yang akan digunakan sebagai antigen pada uji ELISA.

Pada penelitian ini protein spesifik yang digunakan adalah protein spesifik E-S larva kedua jaringan *T.cati* dengan berat molekul 9,1 kDa sebagai bahan uji (antigen) pada uji *Indirect-ELISA*.



#### 4.4 Hasil Pengukuran Titer Antibodi pada Uji *Indirect-ELISA*.

Setelah dilakukan pemanenan darah pada mencit, baik pada kontrol maupun perlakuan, darah tersebut disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit untuk dipisahkan dengan serumnya, serum yang diperoleh digunakan sebagai antibodi pada uji *Indirect-ELISA*, seperti tampak pada gambar 4.4



Gambar 4.4 Hasil Pengukuran Titer Antibodi Pada uji *Indirect-ELISA*

Keterangan:

Kolom 1 dan 7: PBS , Kolom 2-6: Antigen protein 9,1 kDa E-S L2J, Kolom 8-12: Antigen *crude* protein E-S L2J, A dan E : Kontrol, B dan F : antibodi anti E-S L2J, C dan G : antibodi anti *Ancylostoma sp.*, D dan H : antibodi anti *D. caninum*.

Hasil pengukuran diatas kemudian ditentukan nilai OD (*optical density*)nya dengan menggunakan *ELISA-reader*, hasil selengkapnya dapat dilihat pada lampiran 4.

**Tabel 4.1 Nilai OD (*optical density*) pada Pemeriksaan Antigen (Protein 9,1 kDa dan *crude* E-S L2 J *T.cati*) pada Uji *Indirect-ELISA*.**

Jenis Antigen	Perlakuan	X ±SD
Protein 9 kDa E-S Larva Kedua Jaringan <i>T.cati</i>	P0	0,13040±0,035331
	P1	0,24420±0,068827
	P2	0,14000±0,029791
	P3	0,18700±0,049290
	<b>Rata-rata</b>	<b>0,17540<sup>a</sup>±0,064048</b>
<i>crude</i> E-S Larva Kedua Jaringan <i>T.cati</i>	P0	0,09140±0,005413
	P1	0,13700±0,018166
	P2	0,09700±0,006964
	P3	0,10440±0,021209
	<b>Rata-rata</b>	<b>0,10745<sup>b</sup>±0,21209</b>

Keterangan : Superskrip pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan bermakna ( $P < 0,05$ )

Pada hasil tersebut di atas (Tabel 4.1) kemudian dianalisis statistik menunakan uji Anofa Faktorial dan dilanjutkan dengan uji Duncan 5%. Dari analisis tersebut dapat diketahui adanya perbedaan yang bermakna ( $P < 0,05$ ) antara antigen Protein 9,1 kDa E-S larva kedua jaringan *T.cati* dengan antigen *crude* E-S larva kedua jaringan *T.cati*. Hal ini ditunjukkan dengan adanya superskrip yang berbeda pada kolom yang sama.

**Tabel 4.2 Rata-rata Nilai OD (*optical density*) pada Pemeriksaan Antibodi dengan uji *Indirect-ELISA***

Perlakuan	$\bar{X} \pm SD$
Kontrol (P0)	0,11090 <sup>a</sup> $\pm$ 0,031469
<i>Ancylostoma sp</i> (P2)	0,11850 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,030490
<i>D. caninum</i> (P3)	0,14570 <sup>b</sup> $\pm$ 0,055221
E-S L2 J <i>T.cati</i> (P1)	0,19060 <sup>c</sup> $\pm$ 0,073785

Keterangan : Superskrip pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan bermakna ( $P < 0,05$ )

Hasil di atas (tabel 4.2) menunjukkan adanya perbedaan bermakna antara Kontrol (P0) dengan perlakuan E-S L2 J *T.cati* (P1) dan *D.caninum* (P3), akan tetapi P0 tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna dengan perlakuan *Ancylostoma sp* (P2). Pada perlakuan (P2) juga tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna dengan perlakuan (P3), sedangkan pada perlakuan (P1) berbeda nyata terhadap semua perlakuan (P0, P2 dan P3). Menurut data diatas dapat di ketahui bahwa pada perlakuan (P1) memiliki nilai OD (*optical density*) yang tertinggi dibandingkan pada semua perlakuan. Penghitungan selengkapnya dapat dilihat pada lampiran 5.

## BAB 5 PEMBAHASAN

## BAB V

### PEMBAHASAN

Pada penelitian ini protein spesifik cacing *T.cati* diambil dari Ekskretori-sekretori (E-S) larva kedua jaringan (L2 J) *T.cati*. E-S merupakan bagian dari intestinum karena di dalamnya mengandung kelenjar intestinum, semua cairan yang dikeluarkan oleh tubuh cacing, baik saat makan, buang kotoran dan mengeluarkan sisa metabolisme dari intestinum (Kusnoto, 2003). E-S larva kedua jaringan *T.cati* dipilih pada penelitian ini, karena pada stadium ini protein yang terkandung lebih spesifik dan diharapkan dapat mendeteksi adanya infeksi pada stadium larva maupun cacing dewasa .

Pada tahap pembuatan Homogenat E-S larva kedua jaringan *T.cati*, dilakukan pemeriksaan kadar protein dengan alat spektrofotometer. Dari pemeriksaan diperoleh kadar protein E-S larva kedua jaringan *T.cati* sebesar 3.440 µg/ml. Kadar protein tersebut digunakan sebagai dasar penentuan dosis imunisasi dan pengenceran antigen pada uji elisa, sedangkan untuk pembandingan pada uji ELISA juga dilakukan peneraan protein yaitu pada cacing *Ancylostoma sp* kadar protein 1.310 µg/ml dan *D.caninum* dengan kadar protein 15.224 µg/ml.

Aplikasi imunisasi dilakukan secara subcutan dengan harapan melalui cara tersebut depoprotein akan lepas secara bertahap (gradual), dengan dosis protein yang cukup tinggi 200 µg/ekor mencit, kemudian dilakukan booster dengan interval dua minggu sebanyak tiga kali, sehingga diharapkan respon imun pada tubuh mencit dalam membentuk antibodi terhadap E-S larva kedua jaringan *T.cati*

, *Ancylostoma sp*, *D.caninum* dapat maksimal dan kadarnya tetap terjaga dalam darah. Untuk memperoleh respon imun yang lebih tinggi dilakukan penambahan *adjuvant*. *Adjuvant* yang digunakan adalah *complete Freund's adjuvant* (CFA) dan *incomplete Freund's adjuvant* (IFA). CFA merupakan *adjuvant Freund's* yang terdiri atas campuran minyak mineral dan pengemulsi yang mempunyai efek kuat karena mengandung mikrobakteria yang dapat merangsang timbulnya respon antibodi yang kuat dalam waktu yang cukup lama (Dalsgaard, 1987). Pemberian CFA bertujuan untuk meningkatkan kekebalan seluler dan humoral, dengan mengaktifasi sel T untuk merangsang sel B dalam menghasilkan antibodi. *incomplete Freund's adjuvant* (IFA) merupakan *adjuvant Freund's* yang terdiri atas campuran minyak mineral dan pengemulsi tanpa mikrobakteria. Pemberian IFA ini bertujuan untuk menghindari reaksi hipersensitivitas yang hebat.

Penelitian ini berhasil melakukan identifikasi dan isolasi protein E-S larva kedua jaringan *T.cati* dengan menggunakan metode SDS-PAGE dan Elektroelusi sebagai acuan pada uji *Indirect-ELISA*. Pada metode SDS-PAGE berhasil mengidentifikasi 13 fraksi pita protein dari E-S L2 J *T.cati* dengan berat molekul 195,3 kDa, 162,9 kDa, 107,4 kDa, 63,4 kDa, 53,9 kDa, 50,2 kDa, 43,6 kDa, 41,4 kDa, 31,3 kDa, 29,2 kDa, 20,5 kDa, 12,0 kDa dan 9,8 kDa. Setelah itu dilakukan isolasi protein dengan teknik Elektroelusi, diperoleh dua fraksi pita protein spesifik dengan berat molekul 9,1 kDa dan 20,7 kDa.

Pada penelitian ini difokuskan pada protein dengan berat molekul 9,1 kDa yang nantinya akan digunakan sebagai antigen pada uji ELISA.

Hasil uji *Indirect-ELISA* diperoleh nilai OD (Tabel 4.2) yang menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antara Kontrol (P0) dengan perlakuan E-S L2 J *T.cati* (P1) dan *D.caninum* (P3), akan tetapi P0 tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna dengan perlakuan *Ancylostoma sp* (P2). Pada perlakuan (P2) juga tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna dengan perlakuan (P3), sedangkan pada perlakuan (P1) menunjukkan perbedaan yang nyata dan nilai OD yang tertinggi dari semua perlakuan (P0, P2 dan P3). Hal tersebut menunjukkan bahwa tingkat spesifisitas dan respon imun yang ditimbulkan dari imunisasi E-S larva kedua jaringan *T.cati* memberikan nilai yang paling tinggi. Sehingga protein 9,1 kDa yang diperoleh dari E-S larva kedua jaringan *T.cati* dapat digunakan untuk mendeteksi antibodi anti E-S Larva kedua Jaringan *T.cati* pada uji *Indirect-ELISA*.

Proses terbentuknya antibodi anti E-S larva kedua jaringan *T.cati* merupakan bagian dari respon imun dalam tubuh mencit dalam menanggapi antigen protein 9,1 kDa yang diperoleh dari E-S larva kedua Jaringan *T.cati* yang diimunisasikan. Proses tersebut diawali dengan penangkapan antigen oleh *Antigen Presenting Cell* (APC) yang merupakan bagian dari makrofag untuk dipresentasikan kepada sel limfosit dalam bentuk yang dikenalnya (Baratawidjaja, 2000). Pada uji *Indirect-ELISA* ini konjugat yang digunakan adalah konjugat *anti mouse* yang berlabel enzim *alkaline fosfatase*. Pemilihan enzim ini berdasarkan atas spesifik, homogen, stabil dan harganya murah (Rantam, 2003).

Pengukuran antibodi pada penelitian ini menggunakan uji *Indirect-ELISA*, karena uji ini memiliki spesifisitas yang lebih tinggi dibandingkan pada uji *Direct-ELISA*, selain itu juga bahan uji yang digunakan mudah diperoleh dipasaran walaupun memerlukan biaya relatif besar dan pada uji ini tidak memerlukan keahlian khusus untuk konjugasi (Rantam, 2003).

Pada penelitian ini antigen yang digunakan pada uji *Indirect-ELISA* adalah protein dari E-S larva kedua jaringan *T.cati* dan *crude* protein E-S larva kedua jaringan *T.cati*. Hal ini dimaksudkan untuk melihat perbedaan nilai OD (*optical density*) antara protein murni E-S larva kedua jaringan *T.cati* yang diperoleh dari teknik Elektroelusi dengan protein kasar (*crude* protein) E-S larva kedua jaringan *T.cati*. Terlihat pada lampiran 5 bahwa nilai OD tertinggi adalah menggunakan protein murni 9,1 kDa E-S larva kedua jaringan *T.cati* yang diperoleh dengan teknik Elektroelusi dibandingkan *crude* protein.



## **BAB 6** **KESIMPULAN DAN SARAN**

## BAB VI

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 6.1 Kesimpulan

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa protein 9,1 kDa E-S larva kedua jaringan *T.cati* dapat digunakan sebagai bahan uji (antigen) pada pemeriksaan antibodi anti E-S larva kedua jaringan *T.cati* pada kasus toxocariasis, khususnya dengan teknik *Indirect-ELISA*.

#### 6.2 Saran

Saran yang diajukan dari hasil penelitian ini adalah

1. Untuk melakukan pemeriksaan toxocariasis, terutama pada hospes Non-definitif dengan teknik *Indirect-ELISA* dapat digunakan protein 9,1 kDa sebagai bahan uji (antigen) alternatif.
2. Protein spesifik 9,1 kDa dapat digunakan sebagai immunogen pada antibodi monoklonal untuk pengembangan teknik ELISA pada pemeriksaan serologis terhadap kasus toxocariasis.

## RINGKASAN

Penyakit parasitik yang perlu mendapatkan perhatian khusus salah satunya penyakit toxocariasis yang disebabkan oleh cacing *Toxocara cati*, karena cacing ini dapat menginfeksi hospes definitifnya (anak kucing dan kucing jantan dewasa) selain itu juga dapat menginfeksi manusia, khususnya anak-anak (zoonosis). Manifestasi klinisnya toxocariasis pada manusia ada dua bentuk *ocular larva migrans* (OLM) dan *visceral larva migrans* (VLM).

Diagnosis penyakit toxocariasis berdasarkan pada gejala klinis yang bervariasi. sulit dilakukan, untuk itu dibutuhkan diagnosis secara serologik atau imunologik, karena diagnosis konvensional dengan pemeriksaan feses tidak selalu dapat ditemukan telur cacing, mengingat telur cacing dan cacing dewasa tidak dapat ditemukan pada hospes *non* definitif.

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh protein spesifik cacing *T.cati* yang diambil dari E-S Larva Kedua jaringan *T.cati* yang didapatkan dengan melakukan teknik *preparasi gel elektroforesis* sebagai bahan diagnostik toxocariasis pada uji ELISA.

Isolat E-S Larva kedua jaringan diperoleh dari larva kedua jaringan yang telah diisolasi, diinkubasikan pada suhu 37°C dengan menggunakan media RPMI, Cairan E-S tersebut disimpan dalam tabung dan disentrifus untuk diambil supernatannya, lalu supernatan tersebut ditera untuk mengetahui kadar proteinnya, E-S larva kedua jaringan *T.cati* tersebut disimpan dalam dalam *freezer* pada suhu -30°C agar proteinnya tidak rusak. Homogenat E-S Larva kedua

jaringan *T.cati* disiapkan untuk digunakan pada isolasi protein dengan menggunakan teknik *Elektroelusi* untuk diidentifikasi proteinnya.

Penelitian ini berhasil mengidentifikasi protein E-S Larva kedua jaringan *T.cati* dengan metode SDS-PAGE, dengan berat molekul 195,3 kDa, 162,9 kDa, 107,4 kDa, 63,4 kDa, 53,9 kDa, 50,2 kDa, 43,6 kDa, 41,4 kDa, 31,3 kDa, 29,2 kDa, 20,5 kDa, 12,0 kDa dan 9,8 kDa. Untuk mendapatkan protein yang murni dilanjutkan dengan teknik preparasi gel elektroforesis, dengan berat molekul 9,1 kDa. Protein murni yang diperoleh digunakan sebagai antigen pada uji ELISA.

Kesimpulan pada penelitian ini protein 9,1 kDa E-S larva kedua jaringan *T.cati* dapat digunakan sebagai bahan uji (antigen) pada pemeriksaan antibodi anti E-S larva kedua jaringan *T.cati* pada kasus toxocariasis, khususnya dengan teknik *Indirect-ELISA*.

Saran yang diajukan dari hasil penelitian ini adalah Untuk melakukan pemeriksaan toxocariasis, terutama pada hospes Non-definitif dengan teknik *Indirect-ELISA* dapat digunakan protein 9,1 kDa sebagai bahan uji (antigen) alternatif. Protein spesifik 9,1 kDa dapat digunakan sebagai immunogen pada antibodi monoklonal untuk pengembangan teknik ELISA pada pemeriksaan serologis terhadap kasus toxocariasis.

## DAFTAR PUSTAKA

## DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A. K., A. H. Lichtman, and J. S. Pober. 2000. Cellular and Molecular Immunology 4<sup>th</sup> ed. Saunders Company . Philadelphia.
- Abdel-Rahman, E. H., K. Abdel-Megeed and M. A. Hassanain. 2000. Structural characterization and immunocatalization of egg antigen cross-react with *Toxocara vitulorum*, *Fasciola gigantica* and *Moniezia expanza*. J. Egypt. Soc. Parasitol. 30(2): 581-91.
- Alonso, J. M., M. V. Bojanich, M. Chamarro, and J. O. Gorodner. 2000. *Toxocara* seroprevalence in children from a subtropical city in Argentina. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 42 (2): 235-7.
- Baratawidjaja, K. G. 2000. Immunologi Dasar. Edisi keempat. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Bellanti, C. 1993. Immunologi III. Terjemah: Samik Wahab. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Bowman, D., M. Grieve and R. B. Grieve. 1987. *Toxocara canis*. Monoklonal antibodies to larvae excretory-secretory antigen that bind with genus and species specivity to the cuticular surface of infection larvae. Exp. Parasitol. 64(3): 458-65.
- Dalsgaard, K. 1987. Adjuvants. Vet. Immund. Immunolpath. Teknologi Elisa dalam Diagnosis dan Penelitian. G. W. Burgess Ed. JamesCook. University of North Quensland.
- Drench Rite. 1996. Larvae Development Assay. A product of Rsiro Reseach. Horizon Technology pty Limited. Roseville, Australia.
- el-Massry, A. A. 1999. Characterization of antigenic property of *Toxocara leonine* adults and larvae through immunodiagnostic electrophoresis (*SDS-PAGE*) and *Western blot* Technique. J. Egypt. Soc. Parasitol; 29(2): 335-45.
- Goffette, S., A. P. Jeanjean, T. P. Duprez, G. Bigaignon, and C. J. Sindic. 2000. Eosinophilic pleocytosis and myelitis related to *Toxocara canis* infection. Eur J Neurol ; 7(6) : 703-6.
- Goodman, J. W. 1991. Immunogenecity and Antigen Specivicity. In: Stites DP and Terr Al (eds) Basic and Clinical Immunology 7<sup>th</sup> ed. Appleton and Lange. Norwalk Connecticut.

- Hubner, J., M. Uhlikova, and M. Leissova. 2001. Diagnosis of larva Toxocariasis using IgG avidity. *Epidemiol Microbiol Immunol.* Apr; 50(2): 67-70.
- Ito, K., K. Sakai, T. Okajima, K. Quchi, A. Funikoshi, J. Nishimura, H. Ibayashi, and M. Tsuji. 1986. Three cases of visceral larva migrans due to ingestion of raw chicken or cow liver. *Nihon Naikagako Zassi.* 75: 759-766.
- Joel-Klein, M. D. 2005. *Toxocariasis*. The Nemours Foundation All Right Reserved. <http://kidshealth.org/parent/infections/parasitic/toxocariasis.html>.
- Kresno, S. B. 1996. *Imunologi Diagnosis dan Prosedur Laboratorium*. Ed III. Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Kusumamihardja, S, 1993. *Parasit dan Parasitosis pada Hewan Ternak dan Hewan Piaraan di Indonesia*. PAU Biotechnologi, IPB, Bogor.
- Kusnoto, 2003. *Isolasi dan Karakterisasi Protein Imunologik Larva Stadium II Toxocara cati Isolat lokal*. Tesis. Program PascaSarjana Universitas Airlangga.
- Levine, N. D. 1978. *Textbook of Veterinary Parasitology*. Burgers Publishing Company. Terjemah: Ashadi G. 1990. Wardianto Ed. Gajah mada University Press. Yogyakarta.
- Parsons, J. C. 1987. Ascarid infection of cats and dogs. *Vet. Clin. Noth. Am. Pract.* 17(6):1307-39.
- Pelezar, M. J., E. C. S. Chan dan M. F. Pelezar. 1988. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Jilid 2. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta.
- PHI. 2005. [provethealthcareinformation.info@provet.co.uk](mailto:provethealthcareinformation.info@provet.co.uk)
- Radman, N. E., S. M. Archelli., R. D. Fonrouge., M. del V Guardis and O. R. Linzitto. 2000. Human Toxocariasis. Its seroprevalence in the city of La Plata. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* May-Jun; 95(3): 281-5.
- Rantam, F. A. 2003. *Metode Imunologi*. Cetakan I. Airlangga University Press. Surabaya.
- Santoso, S. 2001. *Mengolah Data Statistik Secara Profesional*. SPSS versi 10. Penerbit PT Elex Media Komputindo Kelompok Gramedia, Jakarta.
- Smith, J. R. 1995. *Produksi serum hiperimun. Teknologi ELISA dalam Diagnosis dan Penelitian*. G. W. Burgess Ed. James Cook of North Queensland.

- Soulsby, E. J. L. 1986. Helminth, Aarthropods, and Protozoa Of Domestic Animals. Bailliere Tindall and Cassel. London.
- Suwarno, Ernawati R., Rahardjo A. P, Sianita N., Rahmahani J., dan Rantam F. A. 2003. Prinsip Dasar, Optimalisasi dan Interpretasi Hasil Uji ELISA. Laboratorium Virologi dan Imunologi. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Tizard, I. R. 1982. An Introduction of Veterinary Immunology. WB Saunders Company. Terjemah: Masduki Partodiredjo dan Soehardjo Hardjosworo. 1987. Airlangga University Press.
- Uga, S., T. Matsumara, K. Fujisawa, K. Okubo, N. Kataoka and K. Kondo. 1990. Incidence of seropositivity to human toxocariasis in Hyogo Prefecture, japan, and its possible role in ophtalmic disease. J. Parasitol. 39(5): 500-502.
- Ulum, M. A. 2004. Gambaran Protein Larva Kedua (L<sub>2</sub>) Telur Infektif dan Cacing Dewasa *Toxocara cati*. **Skripsi** Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Viqar-Zaman, 1997. Atlas Parasitologi Kedokteran. Edisi II. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Wahab, A. S. dan Noerjati S. 1993. Imunologi III. Gajah Mada Press. Yogyakarta.
- Warren, K. S. 1993. Immunology and Molecular Biology of Parasit Infections. Black well Sc. Edinburgh.
- Wongsosupantio, S. 1990. Pedoman Kuliah Elektroforesis Gel Protein. Pusat Antar Universitas- Bioteknologi Universitas Gajah Mada. Yogyakarta.
- Zainuddin, M. 2001. Metodologi Penelitian. Program Pascasarjana, Universitas Airlangga. Surabaya.



# LAMPIRAN

**Lampiran 1. Regresi Kubik Untuk Menentukan Hubungan Antara Nilai Rf pada SDS-PAGE dengan Berat Molekul Protein E-S L2 j *T.cati*.**

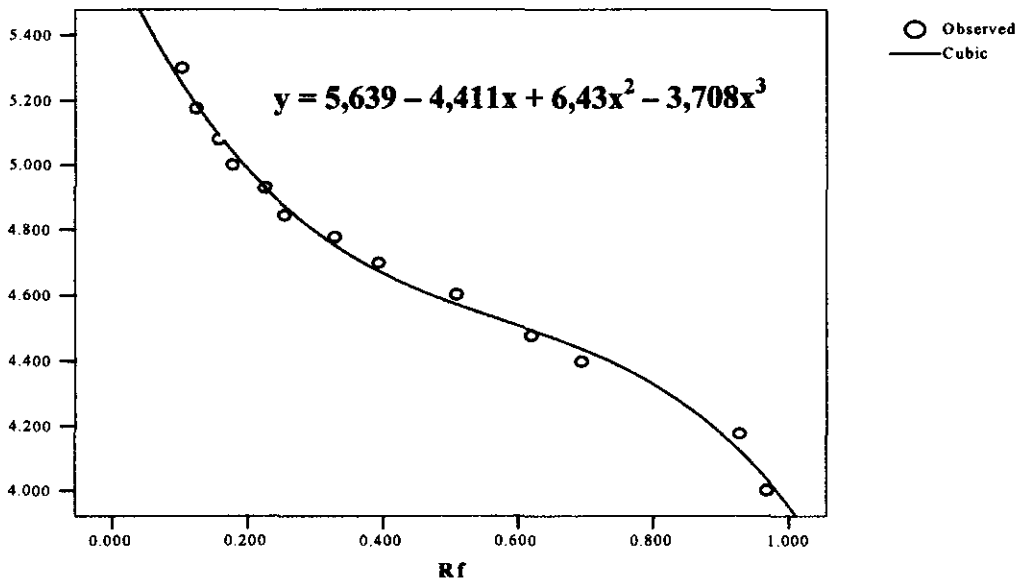
**Tabel Jarak Antara Gel Preparasi dan Pita yang Terbentuk pada SDS-PAGE**

jarak marker	Rf	BM (y KDa)	BM (y Da)	log y (Da)
12,5	0,102	200,0	200000	5,301
15,0	0,123	150,0	150000	5,176
19,0	0,156	120,0	120000	5,079
21,5	0,176	100,0	100000	5,000
27,5	0,225	85,0	85000	4,929
31,0	0,254	70,0	70000	4,845
40,0	0,328	60,0	60000	4,778
48,0	0,393	50,0	50000	4,699
62,0	0,508	40,0	40000	4,602
75,5	0,619	30,0	30000	4,477
84,5	0,693	25,0	25000	4,398
113,0	0,926	15,0	15000	4,176
118,0	0,967	10,0	10000	4,000

Panjang Gel  
122

**Curve Fit**

log y BM



**Cubic****Model Summary**

R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
,996	,993	,990	,038

The independent variable is Rf.

**ANOVA**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Regression	1,793	3	,598	415,015	,000
Residual	,013	9	,001		
Total	1,806	12			

The independent variable is Rf.

**Coefficients**

	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
Rf	-4,411	,554	-3,395	-7,963	,000
Rf ** 2	6,430	1,221	5,291	5,264	,001
Rf ** 3	-3,708	,763	-2,950	-4,856	,001
(Constant)	5,639	,066		85,282	,000

Berdasarkan Perhitungan regresi diketahui bahwa terdapat hubungan korelasi negatif sangat erat antara Rf dengan berat molekul protein pada marker, sehingga diperoleh persamaan  $y = 5,639 - 4,411x + 6,43x^2 - 3,708x^3$ .

Persamaan di atas digunakan untuk menghitung berat molekul sampel yaitu sebagai berikut :

**Tabel Berat Molekul (BM) Sampel**

Jarak sampel	Kubik	$\log y^* Da$	BM Da	BM kDa
11,0	0,090	5,2908	195343,9	195,3
14,0	0,115	5,2119	162892,1	162,9
22,0	0,180	5,0309	107374,2	107,4
36,0	0,295	4,8020	63386,9	63,4
42,0	0,344	4,7312	53851,8	53,9
45,0	0,369	4,7007	50199,6	50,2
52,0	0,426	4,6399	43641,5	43,6
55,0	0,451	4,6175	41447,6	41,4
75,0	0,615	4,4959	31325,6	31,3
80,0	0,656	4,4659	29234,8	29,2
99,0	0,811	4,3123	20525,8	20,5
115,5	0,947	4,0798	12017,1	12,0
120,0	0,984	3,9926	9831,1	9,8

**Lampiran 2. Regresi Linier Untuk Menentukan Hubungan Antara Nilai Rf pada SDS Hasil Elusi dengan Berat Molekul Protein E-S L2 j *T.cati***

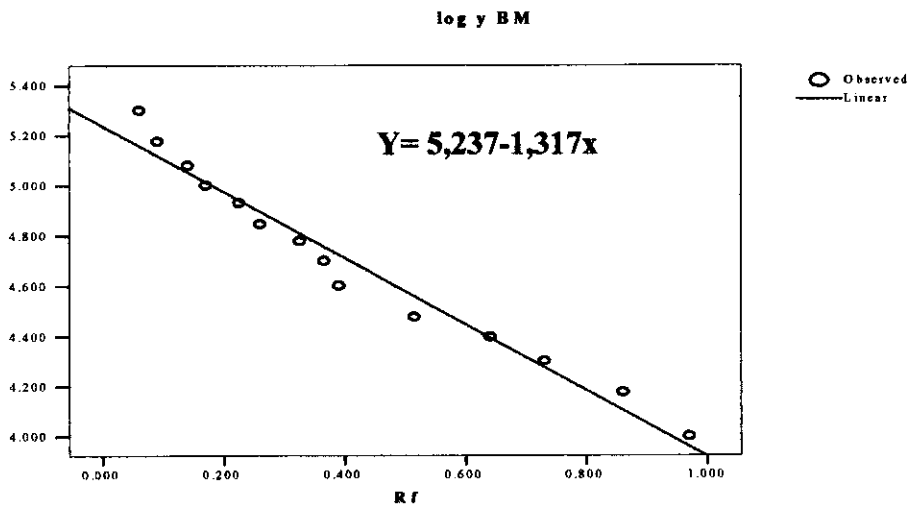
**Tabel Jarak Antara Gel Preparasi dan Pita yang Terbentuk pada SDS-PAGE**

**Penghitungan Berat Molekul Protein pada Marker**

jarak marker	Rf	BM (y KDa)	BM (y Da)	log y (Da)
6,0	0,060	200,0	200000	5,301
9,0	0,090	150,0	150000	5,176
14,0	0,140	120,0	120000	5,079
17,0	0,170	100,0	100000	5,000
22,5	0,225	85,0	85000	4,929
26,0	0,260	70,0	70000	4,845
32,5	0,325	60,0	60000	4,778
36,5	0,365	50,0	50000	4,699
39,0	0,390	40,0	40000	4,602
51,5	0,515	30,0	30000	4,477
64,0	0,640	25,0	25000	4,398
73,0	0,730	20,0	20000	4,301
86,0	0,860	15,0	15000	4,176
97,0	0,970	10,0	10000	4,000

Panjang Gel  
100

**Curve Fit**



## Regression

### Variables Entered/Removed<sup>a</sup>

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	Rf <sup>a</sup>	.	Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: log y BM

### Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	,985 <sup>a</sup>	,969	,967	,070894

a. Predictors: (Constant), Rf

### ANOVA<sup>b</sup>

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	1,915	1	1,915	380,999	,000 <sup>a</sup>
	Residual	,060	12	,005		
	Total	1,975	13			

a. Predictors: (Constant), Rf

b. Dependent Variable: log y BM

### Coefficients<sup>a</sup>

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	5,237	,034		156,202	,000
	Rf	-1,317	,067	-,985	-19,519	,000

a. Dependent Variable: log y BM

Berdasarkan Perhitungan regresi diketahui bahwa terdapat hubungan korelasi negatif sangat erat antara Rf dengan berat molekul protein pada marker, dengan nilai  $r = -0,985$ , a (*intercept*) = 5,237 dan b (*slope*) = -1,317, sehingga diperoleh persamaan  $y = 5,237 - 1,317x$ .

Persamaan di atas digunakan untuk menghitung berat molekul sampel yaitu sebagai berikut :

**Tabel Berat Molekul (BM) Sampel**  
**Penghitungan Berat Molekul Protein pada Sampel**

jarak sampel	Rf	Log y Da	Y (BM) kDa	BM kDa
97,0	0,970	3,9595	9109,6	9,1
70,0	0,700	4,3151	20658,6	20,7

Lampiran 3. Hasil Pengukuran/ Peneraan Kadar Protein E-S L2 j *T.cati*

Tabel Hasil Peneraan Protein

Pak kusnoto .

06/01/19 12:37:40

595.80ml	0,077A
----------	--------

SmpI No.	ABS	KxABS
19	0,021	118,26
20	0,022	122,78
21	0,110	604,38
22	0,094	526,37
23	0,088	494,24
24	0,087	489,46
25	0,079	434,08
26		

K - 5600,0

Perhitungan Kadar Protein : (Standart 400 ug/ml)

$$20-25 \text{ kDa} = \frac{0,094}{0,113} \times 400 = 332,74 \text{ ug/ml}$$

$$10-16 \text{ kDa} = \frac{0,088}{0,113} \times 400 = 311,5 \text{ ug/ml}$$

$$36-45 \text{ kDa} = \frac{0,087}{0,113} \times 400 = 307,96 \text{ ug/ml}$$

$$28-30 \text{ kDa} = \frac{0,078}{0,113} \times 400 = 276,11 \text{ ug/ml}$$



**Lampiran 4. Hasil Penghitungan Nilai Absorbensi pada Uji *Indirect-ELISA* dengan Panjang Gelombang 405 nm**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>P0.1</b>	0,009 *	0.133	0.11	0.118	0.19	0.101	0.004 *	0.097	0.095	0.092	0.09	0.083
<b>P1.1</b>	0.012 *	0.306	0.183	0.182	0.328	0.222	0.001 *	0.166	0.136	0.131	0.116	0.136
<b>P2.1</b>	0.004 *	0.191	0.142	0.123	0.12	0.124	0.003 *	0.105	0.096	0.102	0.087	0.095
<b>P3.1</b>	0.000 *	0.2	0.24	0.125	0.147	0.223	0.003 *	0.099	0.112	0.12	0.086	0.105
<b>P0.2</b>	0.002 *	0.118	0.119	0.126	0.154	0.129	0.005 *	0.08	0.082	0.084	0.082	0.082
<b>P1.2</b>	0.004 *	0.3	0.245	0.185	0.183	0.166	0.000 *	0.106	0.114	0.12	0.106	0.107
<b>P2.2</b>	0.001 *	0.191	0.271	0.173	0.186	0.24	0.001 *	0.09	0.086	0.087	0.094	0.088
<b>P3.2</b>	0.006 *	0.224	0.166	0.165	0.177	0.191	0.002 *	0.1	0.085	0.099	0.094	0.1

**KETERANGAN :**

Kolom 1 dan 7 (\*) = PBS

Kolom 2 – 6 = Antigen Protein 9 kDa E-S larva kedua jaringan *T. cati*

Kolom 8 –12 = Antigen *crude* E-S larva kedua jaringan *T. cati*

P0 = Kontrol

P1 = E-S Larva Kedua Jaringan *Toxocara cati*

P2 = *Ancylostoma sp*

P3 = *D. caninum*

**Lampiran 5. Hasil Perhitungan Nilai OD (*optical density*) dengan Analisis Anova faktorial dan dilanjutkan Uji Jarak Duncan 5%.**

**Summarize**

Case Summaries <sup>a</sup>

					optical density (OD)
Jenis Antigen	P9 L2JT.cati	Jenis Imunogen	Kontrol	1	,133
				2	,110
				3	,118
				4	,190
				5	,101
			Total	N	5
			T. cati	1	,306
				2	,183
				3	,182
				4	,328
			5	,222	
			Total	N	5
		Ancylostoma	1	,191	
			2	,142	
			3	,123	
			4	,120	
			5	,124	
			Total	N	5
			D. caninum	1	,200
				2	,240
			3	,125	
			4	,147	
			5	,223	
		Total	N	5	
		Total	N	20	
	ES L2JT.cati	Jenis Imunogen	Kontrol	1	,097
				2	,095
				3	,092
				4	,090
				5	,083
			Total	N	5
			T. cati	1	,166
				2	,136
				3	,131
				4	,116
			5	,136	
		Total	N	5	
		Ancylostoma	1	,105	
			2	,096	
			3	,102	
			4	,087	
			5	,095	
		Total	N	5	
		D. caninum	1	,099	
			2	,112	
			3	,120	
			4	,086	
			5	,105	
		Total	N	5	
		Total	N	20	
	Total			N	40

a. Limited to first 100 cases.

## Univariate Analysis of Variance

### Between-Subjects Factors

		Value Label	N
Jenis Antigen	1	P9 L2JT.cati	20
	2	ES L2JT.cati	20
Jenis Imunogen	1	Kontrol	10
	2	T. cati	10
	3	Ancylostoma	10
	4	D. caninum	10

### Descriptive Statistics

Dependent Variable: optical density (OD)

Jenis Antigen	Jenis Imunogen	Mean	Std. Deviation	N
P9 L2JT.cati	Kontrol	,13040	,035331	5
	T. cati	,24420	,068827	5
	Ancylostoma	,14000	,029791	5
	D. caninum	,18700	,049290	5
	Total	,17540	,064048	20
ES L2JT.cati	Kontrol	,09140	,005413	5
	T. cati	,13700	,018166	5
	Ancylostoma	,09700	,006964	5
	D. caninum	,10440	,012934	5
	Total	,10745	,021209	20
Total	Kontrol	,11090	,031469	10
	T. cati	,19060	,073785	10
	Ancylostoma	,11850	,030490	10
	D. caninum	,14570	,055221	10
	Total	,14143	,058323	40

### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: optical density (OD)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Model	,893 <sup>a</sup>	8	,112	90,426	,000
J_Antigen	,046	1	,046	37,395	,000
J_Imunogen	,039	3	,013	10,512	,000
J_Antigen * J_Imunogen	,008	3	,003	2,170	,111
Error	,040	32	,001		
Total	,933	40			

a. R Squared = ,958 (Adjusted R Squared = ,947)

**Post Hoc Tests****Jenis Imunogen****Homogeneous Subsets****optical density (OD)**Duncan<sup>a,b</sup>

Jenis Imunogen	N	Subset		
		1	2	3
Kontrol	10	,11090		
Ancylostoma	10	,11850	,11850	
D. caninum	10		,14570	
T. cati	10			,19060
Sig.		,632	,093	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = ,001.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10,000.

b. Alpha = ,05.

**Lampiran 6. Bahan – bahan untuk *Indirect-ELISA*****1. PBS (*phosphat buffer saline*)**

PH : 7,4

Konsentrasi : fosfat : 10 mmol/l

NaCL : 140 mmol/l

Timbang : NaCL : 8 g

KCL : 0,2 g

KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> : 0,2 gNa<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> 12H<sub>2</sub> O : 2,89 g

Aquadest ad : 1 liter

Simpan pada suhu 4 ° C

PBS-Triton x

Triton x : 0,5 ml

NaN<sub>3</sub> : 200 mg

PBS ad : 1 Liter

**2. Buffer untuk Coating Antigen (*Carbonate Buffer*)**

PH = 9,6

Konsentrasi 100 m mol / L

Timbang : Na<sub>2</sub> CO<sub>3</sub> 1,59 grNa<sub>2</sub> HCO<sub>3</sub> 2,93 gr

Aquadest 1 liter

Simpan pada suhu 4 ° C tidak lebih dari dua minggu

KATALOG :

Na<sub>2</sub> CO<sub>3</sub> (Natrium Carbonat wasserfrei) 500.323 A763692 art  
6392.

MERCK

Na<sub>2</sub> HCO<sub>3</sub> (Natrium Hidrogen Carbonat) Art 6329.

### 3. Buffer untuk Pengencer atau Blocking (*Blocking Buffer*)

a. PBS-Tween BSA dengan pH 7,4

Konsentrasi : Phospat    10 m mol / L  
                   NaCl        140 m mol / L  
                   Tween 20    1ml  
                   BSA         5 gram

Timbang : BSA 0,5 gram

PBS-Tween ad 100 ml

b. PBS-Triton X-BSA

PH :7,0

Timbang :

BSA : 0,5 g

PBS-Triton X ad 100ml

#### KATALOG:

- Bovine Albumin Fraction v. Albumin : 95% 25 ng cat. No. 11018017. Lot. No. 1018736 GIBCO BRL
- Tween-20. 500 ml cat. 20605 cas : 9005-64-5 Lot. 107989. USB
- NaCL (Sodium Chloride Analytical Reagent). 1 kg. 31434 Riedel-dehaen.
- Triton X-100. 1 liter. Lot 103 H 0421 SIGMA.

### 4. Buffer untuk Mencuci (*Washing Buffer*)

NaCl – Triton X

Konsentrasi :    Nacl 0,154 M / L  
                           Triton X - 100 0,05%  
                           NaN<sub>3</sub> 0,02 %

Timbang : Nacl 0,9 gr

Triton X - 100 0,05 ml

NaN<sub>3</sub> 20 mg

Aquadest ad 100 ml

## KATALOG :

- NaCl (Lihat Blocking Buffer)
- Triton X-100 (Lihat Blocking Buffer)
- $\text{NaN}_3$  (Lihat Blocking Buffer)

**5. Konjugat**

*Alkaline Phosphatase – Anti mouse Ig G Conjugate*

Encerkan dengan *blocking buffer* 1: 1000 sampai 1: 3000

**6. Substrat buffer**

Konsentrasi : Diethanolamine ( DEA ) 1 mol / L ; pH 9,8

Timbang :  $\text{MgCl}_2$  0,01 mg

Diethanolamine 0,097 ml

Aqua 80 ml

$\text{NaN}_3$  0,02 mg

HCl pekat sampai pH 9,8

Aquadest ad 100 ml

Disimpan dalam suhu kamar

## KATALOG :

- $\text{MgCl}_2$  : 1kg 405 A 852233. Art. 5833 Merck
- Diethanolamine : 500 g O-8885 Lot 45 H 0950 SIGMA.
- $\text{NaN}_3$  : 100 g 405 B 32014880 Art. 6688 Merck

**7. Substrat**

PH 9,8

Konsentrasi : DEA 1 mol / L

4 NPP 2,7 m mol / L

Timbang : 4 NPP 10 mg

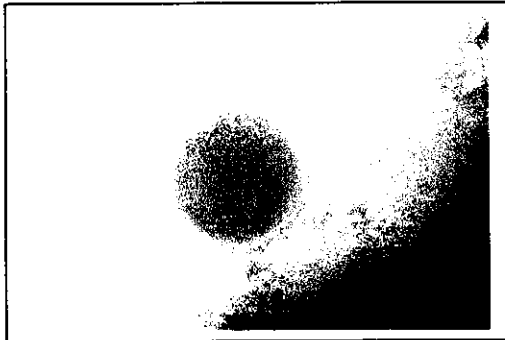
Substrat buffer 10 ml

Substrat harus dalam keadaan segar atau baru dibuat

**8. Stop reaction**

NaOH 3 N

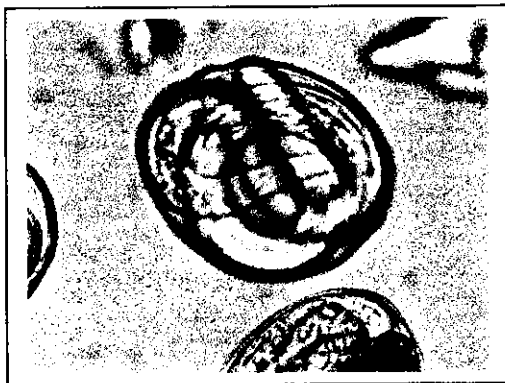
**Lampiran 7. Gambar Stadium Cacing *Toxocara cati***



Stadium Telur  
Pembesaran 400X



Stadium Larva Pertama  
Pembesaran 400X



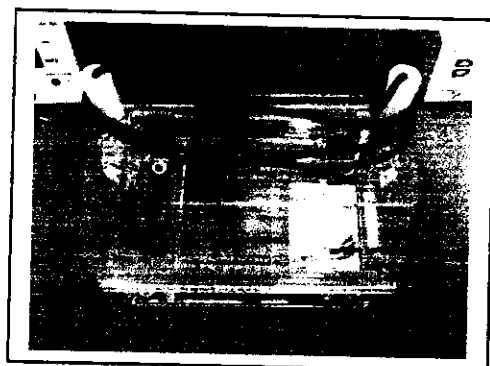
Stadium Larva Kedua  
Pembesaran 400X



Stadium Dewasa



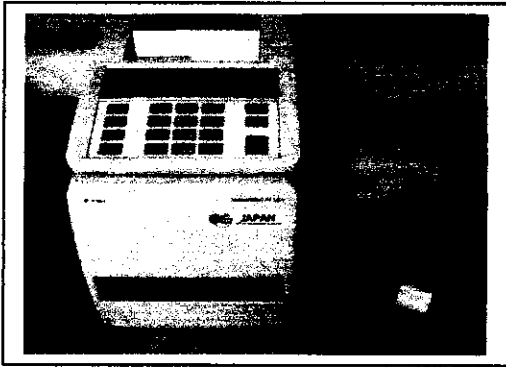
**Lampiran 8. Gambar alat-alat SDS-PAGE dan Elektroelusi**



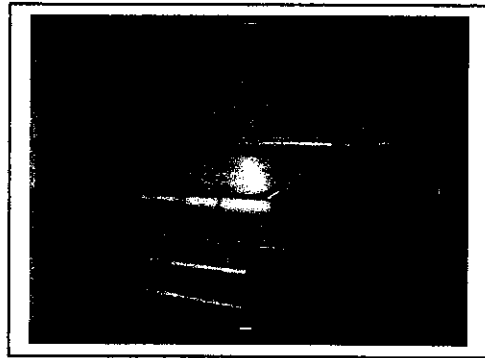
*Chamber Biorad*



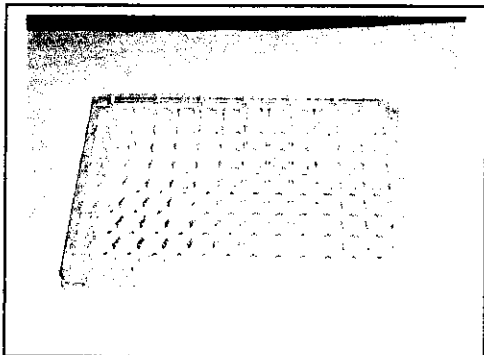
*Power supply Biorad*  
Model 1000 /500

**Lampiran 9. Gambar alat-alat ELISA**

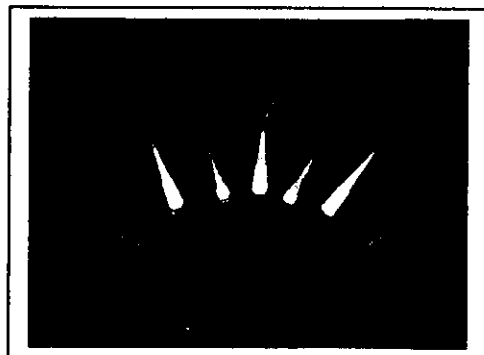
*ELISA reader*  
*Immuno Mini N J -2300 JAPAN*



*Pipet Eppendorf ukuran*  
*100  $\mu$ l, 1000  $\mu$ l*



*Mikroplate bentuk dasar U*



*Microtip*  
*Yellow tip 100  $\mu$ l, blue tip 1000  $\mu$ l,*