

SKRIPSI

**RESPONS IMUN HUMORAL MENCIT TERHADAP
INFEKSI BUATAN CACING *Toxocara cati*
DENGAN DOSIS YANG BERBEDA**



Oleh :

FIRA YANI INDAH PUSPITA

NIM. 060413339

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2008**

**RESPONS IMUN HUMORAL MENCIT TERHADAP
INFEKSI BUATAN CACING *Toxocara cati*
DENGAN DOSIS YANG BERBEDA**

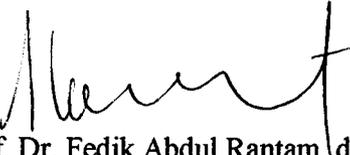
Skripsi
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan
pada
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

oleh

FIRA YANI INDAH PUSPITA
NIM 060413339

Menyetujui

Komisi Pembimbing,


(Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh.)
Pembimbing Pertama


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

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi berjudul :

**RESPONS IMUN HUMORAL MENCIT TERHADAP
INFEKSI BUATAN CACING *Toxocara cati*
DENGAN DOSIS YANG BERBEDA**

Tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan disuatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan 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, Juli 2008



FIRA YANI INDAH PUSPITA
NIM. 060413339

Telah dinilai pada Seminar Hasil Penelitian

Tanggal : 17 Juli 2008

KOMISI PENILAI SEMINAR HASIL PENELITIAN

Ketua : Dr. Suwarno, drh., M.Si.
Sekretaris : Prof. Dr. Sri Subekti, drh., DEA.
Anggota : Retno Bijanti, drh., M.S.
Pembimbing I : Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh.
Pembimbing II : Dr. M. Zainal Arifin, drh., M.S.

Telah diuji pada Sidang Skripsi

Tanggal : 28 Juli 2008

KOMISI PENGUJI SKRIPSI

Ketua : Dr. Suwarno, drh., M.Si.
Anggota : Prof. Dr. Sri Subekti, drh., DEA
Retno Bijanti, drh., M.S.
Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh.
Dr. M. Zainal Arifin, drh., M.S.

Surabaya, 28 Juli 2008

Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga
Dekan,



Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph.D., Drh
NIP. 130 687 305

**HUMORAL IMMUNE RESPONSES OF MICE TOWARD
ARTIFICIAL INFECTION *Toxocara cati*
WITH THE VARIOUS DOSES**

Fira Yani Indah Puspita

ABSTRACT

The aim of this research was investigated effect of various doses second stage larva of *Toxocara cati* toward *Optical Density* (OD) value using *indirect* ELISA technique. Twenty male mices (*Mus musculus*) were used in this research and divided into four groups. They were infected by second stage larva of *Toxocara cati*. The first group (P0) as control was not inoculated, the second (P1) was inoculated with dose 10 eggs/g body weight, the third (P2) was inoculated with dose 17 eggs/g body weight, and fourth (P3) was inoculated with dose 170 eggs/g body weight. Two weeks post infection, antibody from serum was reacted by *excretory secretory* of second stage larva *Toxocara cati* in male mice tissues in *indirect* ELISA technique. The result of *indirect* ELISA was analyzed using ANAVA test based on *Optical Density* (OD) and continued using Duncan test. The result of research statistically indicated that there was significant differences ($p < 0,05$) between the groups. It can be concluded second stage larvae of *Toxocara cati* were infected on mice had an antigenic character and different effect towards various doses.

Key words : *Toxocara cati*, second stage larva, various doses, antigenic, *indirect* ELISA.

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Tuhan Yang Maha Esa yang telah melimpahkan berkah, rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul **Respons Imun Humoral Mencit terhadap Infeksi Buatan Cacing *Toxocara cati* dengan Dosis yang Berbeda.**

Pada kesempatan ini, penulis mengucapkan terima kasih kepada :

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Prof. Romziah Sidiq, Phd., drh. Atas kesempatan mengikuti pendidikan di Universitas Airlangga, dosen pembimbing pertama Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh.. dan dosen pembimbing kedua Dr. M. Zainal Arifin, M.S., drh., para dosen penguji, Dr. Suwarno, M.Si., drh., Prof. Dr. Sri Subekti, DEA., drh., dan Retno Bijanti, M.S., drh. atas bimbingan, saran serta dorongan baik moril maupun materiil yang tak ternilai harganya kepada penulis.

Kepada Bapak Kusnoto, M.Si., drh. atas bimbingan penelitiannya selama ini dan bantuan cara pengolahan statistik, Bapak Suwarno (staf laboratorium Helminthologi) atas bantuan serta kerjasama yang baik selama penelitian di Laboratorium Helminthologi, Mbak Helen (staf Laboratorium *Tissue Culture*) atas bantuan dalam pelaksanaan uji ELISA di Laboratorium *Tissue Culture Institute of Tropical Disease (ITD)* Universitas Airlangga.

Almarhum Ayahanda tercinta atas semangat dan doa yang pernah diberikan dan Ibunda tercinta atas segalanya baik itu semangat maupun doa yang senantiasa tercurah, serta kakak-kakakku tersayang Mbak Naning, Mas Djoko,

dan Mas Bambang yang juga telah memberikan doa dan dorongan sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik. Selanjutnya terima kasih penulis ucapkan kepada rekan-rekan satu penelitian Intan, Erik, Mbak Ainun dan Mbak Ninis, teman-teman angkatan 2004, sahabat-sahabat penulis Intan, Ratna, Desty, dan Ami, serta teman-teman kost biru 45 atas segala perhatian, bantuan dan dorongan yang telah diberikan kepada penulis.

Akhirnya kepada semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian skripsi ini, penulis mengucapkan terima kasih yang tak terhingga. Penulis menyadari bahwa tulisan ini masih jauh dari kesempurnaan, untuk itu saran dan kritik yang membangun dari berbagai pihak sangat diharapkan. Walaupun demikian semoga hasil-hasil yang telah dituangkan dalam skripsi ini dapat bermanfaat bagi pengembangan dunia kedokteran hewan di Indonesia.

Surabaya, Juli 2008

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
HALAMAN IDENTITAS.....	iv
ABSTRACT.....	vi
UCAPAN TERIMA KASIH	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG.....	xiv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang Penelitian.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Landasan Teori	4
1.5 Manfaat Penelitian	6
1.6 Hipotesis.....	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 <i>Toxocara cati</i>	7
2.1.1 Klasifikasi	7
2.1.2 Morfologi <i>Toxocara cati</i>	8
2.1.3 Siklus Hidup dan Patogenesis <i>T. cati</i>	9
2.2 Aspek Zoonosis <i>Toxocara cati</i>	11
2.2.1 <i>Visceral Larva Migrants</i> (VLM)	12
2.2.2 <i>Ocular Larva Migrants</i> (OLM)	12
2.3 Diagnosis Toxocariasis.....	13
2.4 Imunitas	13
2.4.1 Antibodi	14
2.4.2 Respon Imun Humoral Terhadap Toxocariasis.....	15
2.4.3 Antigen Parasit.....	16
2.5 <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA)	18
BAB III METODE PENELITIAN	20
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	20
3.2 Materi Penelitian.....	20
3.2.1 Hewan percobaan.....	20
3.2.2 Bahan penelitian	20
3.2.3 Alat-alat penelitian.....	21
3.3 Metode Penelitian	22

3.3.1 Isolasi Telur Infektif (Larva Kedua) <i>Toxocara cati</i>	22
3.3.2 Pembuatan ES Larva Kedua Jaringan <i>T. cati</i>	24
3.3.3 Penghitungan Dosis Infeksi Telur L ₂ <i>T. cati</i>	24
3.3.4 Pembuatan Antibodi pada Mencit.....	25
3.3.5 Uji ELISA.....	26
3.4 Rancangan Penelitian dan Analisis Data	27
3.5 Kerangka Operasional Penelitian.....	28
3.6 Variabel Penelitian.....	29
BAB IV HASIL PENELITIAN.....	30
4.1 Isolasi Larva Kedua (L ₂) <i>Toxocara cati</i>	30
4.2 Isolasi Larva Kedua Jaringan (L ₂ J) <i>Toxocara cati</i> dan Pembuatan <i>Excretory Secretory</i> (ES) Antigen.....	31
4.3 Pembuatan Antibodi anti <i>Toxocara cati</i>	31
4.4 Hasil Uji <i>indirect</i> ELISA.....	32
BAB V PEMBAHASAN.....	34
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN.....	39
6.1 Kesimpulan	39
6.2 Saran	39
RINGKASAN.....	40
DAFTAR PUSTAKA.....	42
LAMPIRAN.....	45

DAFTAR TABEL

TABEL		Halaman
4.1	Rata-rata Nilai <i>Optical Density</i> (OD) dan Kisaran Nilai OD pada Uji ELISA.....	33

DAFTAR GAMBAR

GAMBAR		Halaman
Gambar 2.1	Cacing <i>Toxocara cati</i> Dewasa	8
Gambar 2.2	Siklus Hidup Cacing <i>Toxocara cati</i>	11
Gambar 4.1	Telur <i>T. cati</i>	30
Gambar 4.2	Hasil Isolasi Larva Kedua Jaringan (L ₂ J) <i>T. cati</i> perbesaran 100x.....	31
Gambar 4.3	Pengaruh Berbagai Dosis Infeksi L ₂ <i>T. cati</i> terhadap nilai <i>Optical Density</i> (OD)	33

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Analisis Statistik Nilai <i>Optical Density</i> dengan Uji ANAVA.....	45
2. Nilai optical density (OD) Setiap Serum Mencit Pada Setiap Perlakuan.....	47
3. Bahan-bahan yang Digunakan Untuk Uji <i>indirect</i> ELISA.....	48
4. Gambar Peralatan Penelitian.....	51

SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG

CD	=	<i>Cluster Designation</i>
ELISA	=	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ES	=	<i>Excretory Secretary</i>
IL	=	Interleukin
L ₁	=	Larva stadium pertama
L ₂	=	Larva stadium kedua
L ₃	=	Larva stadium ketiga
L ₄	=	Larva stadium keempat
L ₂ J	=	Larva kedua jaringan
OD	=	<i>Optical Density</i>
g BB	=	gram berat badan
TCPGT	=	Telur Cacing Per Gram Tinja
Th	=	<i>T helper</i>

BAB 1

PENDAHULUAN

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Penelitian

Toxocariasis adalah penyakit yang disebabkan oleh cacing dari genus *Toxocara* (Uga *et al.*, 1990). Terdapat tiga esies cacing dari genus *Toxocara*, yaitu *Toxocara vitulorum* yang menyerang anak sapi, anak kerbau dan induk jantan, *Toxocara canis* yang menyerang anak anjing dan anjing jantan dewasa, dan *Toxocara cati* yang menyerang anak kucing dan kucing jantan dewasa (Kusumamihardja, 1993; Kusnoto, 2005).

Toxocariasis pada kucing yang disebabkan oleh cacing *Toxocara cati* merupakan salah satu penyakit parasit yang penting, karena selain menginfeksi kucing, toxocariasis juga sangat berbahaya bagi manusia karena bersifat zoonosis dan dapat menyebabkan penyakit pada manusia (Provet, 2002).

Toxocariasis pada manusia dikenal sebagai *human toxocariasis* (Humbert *et al.*, 2000). Berdasarkan gejala klinisnya terdapat dua bentuk toxocariasis pada manusia yaitu *visceral toxocariasis* yang disebabkan oleh *visceral larva migrans* dan *ocular toxocariasis* yang disebabkan oleh *ocular larva migrans* (Hubner *et al.*, 2001). Penularan toxocariasis pada manusia terjadi secara per-oral, yaitu melalui makanan atau minuman yang terkontaminasi oleh telur infeksi yang mengandung larva kedua atau larva jaringan 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).

Populasi kucing di Surabaya yang tinggi, serta kedekatan hewan kesayangan dengan manusia terutama anak-anak, sangat berpotensi meningkatkan angka kejadian toxocariasis pada manusia. Populasi serta angka kejadian toxocariasis pada kucing yang meningkat secara tidak langsung juga akan meningkatkan kontaminasi tanah sekitar dengan feses penderita (hospes definitif) (Kusnoto, 2005), sehingga hal tersebut akan memperbesar resiko penularan pada manusia. Anak balita (usia di bawah lima tahun) yang bermain di tanah dan mempunyai kebiasaan memasukkan jari ke dalam mulut dan tidak sering mencuci tangan beresiko besar terinfeksi oleh toxocariasis (Soeharsono, 2002; Klein, 2005). Penanganan toxocariasis yang disebabkan oleh cacing *T. cati* perlu mendapat perhatian yang khusus, agar dapat mengurangi populasi kucing yang menderita toxocariasis dan resiko penyebarannya pada manusia (Provet, 2002).

Diagnosis konvensional dengan pemeriksaan feses tidak selalu dapat ditemukan telur cacing, mengingat telur cacing dan cacing dewasa hanya dapat ditemukan pada hospes definitif (anak kucing dan kucing jantan dewasa saja), 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). Upaya yang dapat dilakukan untuk mengatasi kesulitan diagnosis toxocariasis adalah dengan mengembangkan teknik diagnosis toxocariasis yang lebih sensitif terhadap infeksi *T. cati*, yaitu dengan melakukan diagnosis toxocariasis melalui pemeriksaan imunologis. Salah satu diagnosis secara imunologis yang dapat dilakukan adalah dengan menggunakan teknik ELISA (*Indirect-ELISA*).

Penegakan diagnosis toxocariasis secara imunologis dengan menggunakan teknik ELISA (*Indirect-ELISA*) memerlukan bahan uji dengan spesifisitas yang tinggi. Menurut Cohen and Warren (1982), spesifisitas bahan uji diperlukan mengingat banyak protein yang tidak spesifik yang dijumpai pada infeksi parasit.

Salah satu antigen yang sering digunakan adalah E-S antigen larva stadium kedua jaringan *T. cati*. *Excretory secretory* (E-S) antigen merupakan sekresi kelenjar inetestin dan semua cairan yang dikeluarkan cacing pada saat makan, buang kotoran dan reproduksi (Warren, 1993). Pada penelitian sebelumnya sudah banyak didapatkan antigen spesifik yang dapat digunakan sebagai bahan uji diagnosis toxocariasis, namun belum banyak yang melakukan deteksi antibodi spesifik yang juga dapat digunakan sebagai bahan uji diagnosis toxocariasis semisal uji *Indirect-ELISA*.

Berdasarkan respons imun yang ditimbulkan dari infeksi toxocariasis tersebut, maka antibodi yang dihasilkan oleh sel-sel imun tubuh bersifat spesifik terhadap *T. cati* dan sebagian beredar dalam darah perifer, sehingga dapat dideteksi secara imunologis yaitu dengan melihat ikatan antara antigen antibodi yang spesifik terhadap *T. cati* dalam serum penderita.

Penelitian ini mencoba melakukan pengamatan terhadap nilai *optical density* (OD) pada serum mencit yang telah diinfeksi buatan cacing *Toxocara cati* dengan dosis yang berbeda yang lebih lanjut dapat digunakan untuk pengembangan bahan uji spesifik diagnosis toxocariasis secara serologis dengan melakukan uji *Indirect ELISA*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas maka masalah penelitian ini dapat dirumuskan sebagai berikut:

1. Apakah L₂ *T. cati* yang diinfeksi ke mencit memiliki sifat antigenik?
2. Apakah terdapat perbedaan nilai *optical density* (OD) pada reaksi antigen antibodi mencit yang diinfeksi L₂ *Toxocara cati* dengan dosis yang berbeda?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan apakah L₂ *Toxocara cati* memiliki sifat antigenik dan mengetahui apakah terdapat perbedaan nilai *optical density* (OD) pada reaksi antigen antibodi mencit yang diinfeksi L₂ *Toxocara cati* dengan dosis yang berbeda?

1.4 Landasan Teori

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

Respons imun spesifik terhadap infeksi yang disebabkan beberapa cacing diperantarai oleh imunoglobulin E (Ig E) dan eosinofil. Keberadaan larva cacing dalam jaringan akan menimbulkan jejas, sehingga timbul respon imun yang ditandai dengan keberadaan Ig E dan peningkatan kadar eosinofil yang merupakan

jenis khusus dari Antibody-dependent Cell Mediated Cytotoxicity (ADCC). Respons tersebut dilengkapi dengan kecenderungan dari infeksi cacing untuk menstimulus subset $Th_2CD_4^+$ dari sel Th, yang mensekresi interleukin-4 (IL-4) dan IL-5. Interleukin-4 merupakan limfokin yang merangsang sel B untuk berdiferensiasi menjadi sel plasma dan menghasilkan Ig E, sedangkan IL-5 merupakan pemicu potensial terhadap pembentukan eosinofil (Abbas *et. al.*, 2000). Jadi IL-4 dan IL-5 berperan dalam kontrol produksi Ig E dan Ig G₁, sedangkan $Th_1CD_8^+$ menghasilkan interferon gamma (IFN γ) yang menghambat reaksi hipersensitifitas dan memicu produksi Ig G₂.

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

Larva *Toxocara sp.*, juga dapat bermigrasi ke mata (*Ocular Larva Membran*). Pada *Mongolian gerbils* sebagai model hewan coba, setelah diinokulasi secara oral dengan 17 telur berembrio *T. cati* per gram berat badan, menunjukkan adanya migrasi larva ke mata yang menyebabkan perubahan optalmik (Akao *et al.*, 2000). Antibodi anti L₂ *T. cati* diperoleh dengan cara melakukan infeksi buatan per oral pada mencit. Mencit tersebut diambil serumnya, serum yang diperoleh kemudian didiagnosis 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) yang mencerminkan kadar antibodi.

1.5 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang sifat antigenik *L₂ Toxocara cati* yang diinfeksi pada mencit dan pengaruh berbagai dosis infeksi *L₂ Toxocara cati* terhadap nilai *optical density* (OD) pada reaksi antigen antibodi mencit.

1.6 Hipotesis

Pada penelitian ini hipotesis yang diajukan adalah sebagai berikut :

1. *L₂ Toxocara cati* yang diinfeksi pada mencit memiliki sifat antigenik.
2. Terdapat perbedaan nilai *optical density* (OD) pada reaksi antigen antibodi mencit yang diinfeksi *L₂ Toxocara cati* dengan dosis yang berbeda.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Toxocara cati*

2.1.1 Klasifikasi

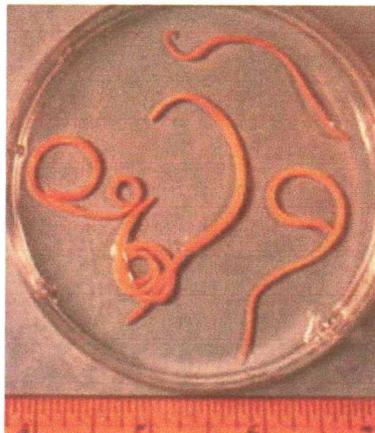
Toxocara cati merupakan cacing dari kelas Nematoda. Cacing ini memiliki sinonim *Toxocara mystax* (Levine, 1994). *T.cati* dapat menginfeksi seluruh bangsa kucing di dunia dan jarang terdapat pada anjing. Selain itu cacing ini juga dapat menginfeksi manusia, khususnya anak-anak yang senang bermain dengan 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	: Ascaridia
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 Morfologi *Toxocara cati*

Cacing dari genus *Toxocara* memiliki bibir pulpa yang membentuk dua lobus lateral yang jelas terpisah oleh sinus yang dalam dan satu lobus intermedier. Lobus lateral mengerut di anterior, berakhir pada penonjolan digitiform yang ujungnya membengkok. Kadang-kadang terdapat daerah peninggian yang bergerigi halus. Tidak terdapat interlabia, tetapi terdapat sayap servikal. Esofagus mempunyai bulbus posterior berotot. Ekor cacing jantan mempunyai alat tambahan digitiform di ujung tanpa sayap kaudal. Spikulum agak sama besar dan bersayap; tidak terdapat gubernakulum. Vulva terletak di anterior seperempat panjang tubuh. Telur mempunyai kulit yang berkerut (Levine, 1994).



Gambar 2.1 Cacing *Toxocara cati* dewasa (Baringvet, 2008)

Cacing *T. cati* memiliki ukuran tubuh berbentuk silindris atau bulat panjang, tidak mempunyai segmen dan berwarna putih kekuning-kuningan. *T. cati* mirip dengan *T. Canis* tetapi garis-garis kutikulemya saling berdekatan. 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, bergaris-garis, sempit di anterior, dan melebar di posterior. Dengan demikian ujung anterior tubuh cacing mirip dengan kepala anak panah (Levine, 1994; Soulsby, 1982; Kusumamihardja, 1993).

Telur *T. cati* agak bulat memiliki diameter 65 – 75 mikron dengan dinding telur yang sangat tebal kulit karena terbungkus oleh membran kitin sehingga tahan terhadap lingkungan yang tidak sesuai. Saelain itu telur *T. cati* sedikit berbintik-bintik (Levine, 1994; Warren, 1993).

2.1.3 Siklus Hidup dan Patogenesis *T. cati*

Siklus hidup *T. cati* berbeda dengan siklus *T. canis* dalam hal tidak adanya infeksi prenatal, terdapatnya sedikit perkembangan pada saat cacing berada di dalam saluran pencernaan, dan relatif penting adanya induk semang transpor (Levine, 1994).

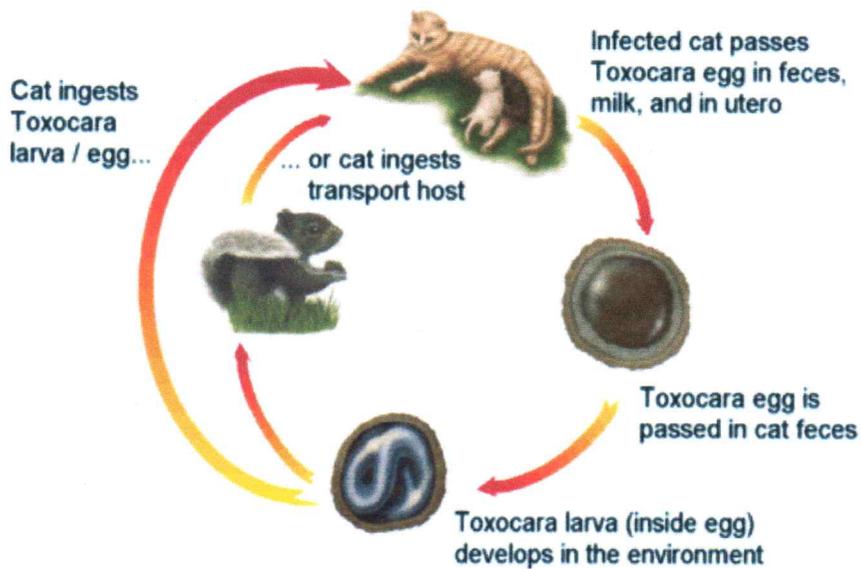
Siklus hidup cacing *T. cati* dimulai dari dikeluarkannya telur berembrio oleh cacing betina dewasa bersamaan dengan dikeluarkannya feses baik pada anak kucing berumur kurang dari 6 bulan, maupun kucing jantan dewasa yang menderita toxocariasis. Telur yang berembrio akan berkembang menjadi larva pertama (L_1) dalam tujuh hari, kemudian dari tahapan larva pertama akan berkembang lagi menjadi larva (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_2) 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_3) terjadi sesudah larva kembali ke lambung dan pada hari ke-21 larva keempat (L_4) terdapat di dalam lumen usus dengan jumlah banyak, selanjutnya berkembang menjadi cacing dewasa (Kusumamihardja, 1993).

Levine (1994) menyatakan bahwa cacing tanah, kecoa, anjing, anak kambing, dan khususnya mencit dapat berfungsi sebagai induk semang transpor. Di dalam induk semang transpor tadi, telur menetas di dalam usus dan larva stadium kedua berpindah ke dalam jaringan untuk membentuk kista. Apabila infeksi terjadi pada selain hospes definitif maka telur akan menetas dalam lambung larva kedua (L_2) dan akan terjadi *visceral larva membran* (VLM) serta menetap di dalam jaringan organ dalam maupun organ somatik. Dapat pula terjadi *ocular larva migran* (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_2) *T. cati* menginfeksi induk betina kucing, larva tersebut tidak dapat langsung berkembang menjadi larva 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 hospes (Parsons, 1987). Penularan toxocariasis juga dapat terjadi melalui beberapa cara tergantung dari umur induk semang, yang meliputi *prenatal transmissions (colostral)*, *direct transmission* dan dapat pula pada *parathenic host transmission*. Direct transmission terjadi dengan cara peroral yaitu tertelannya telur berembrio yang berasal dari feses kucing penderita yang berumur muda (Kusumamihardja, 1993).



Gambar 2.2 Siklus hidup cacing *T. cati* (Baringvet, 2008)

2.2 Aspek Zoonosis *Toxocara 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 membran* (VLM) yang dapat menyebabkan *visceral toxocariasis* dan *ocular larva migran* (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).

2.2.1 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 limphonodule ("*swollen glands*") (Joel-Klein, 2005).

2.2.2 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) yang

dikutip Dini (2006) melakukan penelitian pada wanita yang berusia 40 tahun yang menderita toxocariasis, didapatkan nilai titer antibodi yang lebih tinggi dalam cairan *serebrospinal* menunjukkan adanya *eosinophilic peocytosis*, sehingga dapat disimpulkan bahwa toxocariasis dapat mengakibatkan *hipersensitivitas* sampai pada *spinal cord*.

2.3 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. Warren (1993) menyatakan bahwa ada beberapa macam metode untuk mendiagnosis penyakit pada nematoda yaitu: Uji aglutinasi cepat, Imunodifusi, Imunoelektroforesis, ELISA (*Enzime Linked Immunosorbent Assay*), Immunobloting dan Imunohistokimia.

2.4 Imunitas

Rantam (2003) menjelaskan bahwa imunitas adalah merupakan jawaban reaksi tubuh terhadap bahan asing secara molekuler maupun seluler. Secara histories imunitas merupakan perlindungan terhadap penyakit, yang lebih spesifik dikenal dengan *infectious disease*. Secara umum, imunitas merupakan respon

molekul atau seluler yang mekanismenya terbagi menjadi dua yaitu *innate immunity* dan *adaptive immunity*.

Sistem imun non spesifik atau *innate immunity system* adalah pertahanan tubuh yang mempunyai sifat tidak spesifik dan merupakan bagian sistem imun yang berfungsi sebagai barier terdepan pada awal terjadinya infeksi penyakit, oleh karena itu sering disebut *natural* atau *native immunity*. Sedangkan sistem imun spesifik atau *adaptive immunity system* adalah merupakan sistem pertahanan tubuh lapis kedua, jika *innate immunity* tidak mampu mengeliminasi agen penyakit. Hal ini terjadi jika fagosit tidak mengenali agen infeksius, sebab hanya sedikit reseptor yang cocok untuk agen infeksius atau agen bertindak sebagai faktor antigen terlarut (*soluble antigen*) yang aktif. Jika hal ini terus menerus, maka akan diperlukan molekul spesifik yang akan berikatan langsung dengan agen infeksius yang dikenal dengan antibodi dan selanjutnya akan terjadi proses fagositosis (Rantam, 2003).

2.4.1 Antibodi

Antibodi adalah molekul protein yang dihasilkan oleh sel plasma sebagai akibat interaksi antara Limfosit B peka antigen dan antigen khusus (Tizard, 1982). Sedangkan Rantam (2003) menyatakan bahwa antibodi adalah protein imunoglobulin yang disekresi oleh sel B yang teraktifasi oleh antigen. Berat molekul antibodi berkisar 150.000 Da sampai 950.000 Da yang tergantung pada kelasnya.

Secara umum antibodi adalah protein serum terlarut yang dihasilkan sebagai keberadaan imunogen, yang beredar diseluruh jaringan dan sirkulasi darah. Bila darah dibiarkan membeku, akan meninggalkan serum yang mengandung berbagai bahan larut tanpa sel. Bahan tersebut adalah molekul antibodi yang digolongkan protein yang disebut globulin, dimana sekarang dikenal dengan imunoglobulin. Antibodi berupa Ig yang mempunyai struktur *gamma globulin* (γ *globulin*) dalam serum, karena berbentuk globulin. Antibodi dihasilkan oleh sel limfosit B yang diaktifasi oleh sel Th_2CD_4 dalam mekanisme imun, dan selanjutnya akan diproduksi oleh sel plasma (Roitt *et al.*, 1998).

Tipe imunoglobulin yang umum diketahui ada 5 tipe yaitu M (makroglobuli), G, A, D, dan E (Roitt *et al.*, 1998) yang bertanggung jawab atas keberadaan antigen. Imunoglobulin yang berperan aktif pada saat kejadian infeksi cacing adalah IgE dan IgG 1 dan 2. molekul antibodi berbentuk seperti huruf “Y” yang terdiri dari tiga segmen dengan ukuran yang seimbang (*equal-size*) (Janeway *et al.*, 1999).

2.4.2 Respons Imun Humoral Terhadap Toxocariasis

Imunitas humoral (*humoral immunity*) merupakan respons yang terjadi ketika antibodi terlarut (*soluble antibody*), yang disekresi oleh sel B limfosit karena adanya stimulasi oleh antigen, berikatan dengan antigen spesifik (Rantam, 2003).

Respons imun spesifik terhadap infeksi beberapa cacing diperantarai oleh IgE dan eosinofil yang merupakan tipe khusus dari *Antibody-Dependent Cell*

Mediated Cytotoxicity (ADCC). Antigen yang telah masuk ke dalam tubuh hewan, akan ditangkap oleh makrofag yang secara langsung akan menampilkan antigen dan disebut *Antigen Presenting Cell* (APC). Kejadian ini akan memicu produksi IL-1 yang berfungsi sebagai *fibroblast growing factor* yang mengakibatkan larva akan diselubungi oleh jaringan fibrosa. Selain itu, APC tersebut akan dikenali oleh sel T yang kemudian membantu menjadi Th_2CD_4 dan Th_1CD_8 . Subset inilah yang mensekresikan IL-5 dan IL-4 dan mempunyai fungsi tersendiri, yaitu IL-5 akan mengakibatkan eosinofil meningkat. Keadaan ini mempunyai kemungkinan yang lebih efektif untuk mematikan cacing daripada leukosit lain karena sifat toksik yang lebih dibanding neutrofil maupun makrofag. Pada kondisi IL-5 menurun, akan memacu terbentuknya jaringan granuloma pada organ yang terdapat larva dorman, sedangkan IL-4 akan mengakibatkan sel B menjadi sel plasma dan menghasilkan Ig E dan Ig G pada tubuh hospes dan disebut antibodi (Roitt *et al.*, 1998; Abbas *et al.*, 2000).

2.4.3 Antigen Parasit

Antigen adalah bahan yang dapat merangsang respons imun atau bahan yang dapat bereaksi dengan antibodi yang sudah ada (Baratawidjaja, 2000). Sedangkan Abbas *et al.* (2000) menyatakan bahwa pengertian antigen secara umum adalah substansi yang dapat dikenali sebagai benda asing (non self) oleh sistem imun tubuh, atau dengan kata lain antigen merupakan benda asing yang diukur berdasarkan kemampuan dalam mengikat antibodi.

Secara umum struktur antigen yang dimiliki oleh parasit, khususnya pada cacing antara lain antigen permukaan; antigen internal yang dilepas pada saat pemangsaan, ekskresi, ganti kulit, dan berbiak (yaitu fraksi *excretory secretory* atau ES) dan residu antigen somatik (More, 1995; Rantam, 2003)

Berdasarkan siklus hidup *T. cati* yang kompleks, pengamatan terhadap antigen cacing tersebut dapat dilakukan terhadap telur, larva (L1, L2, L3, dan L4) maupun cacing dewasa. Pada telur cacing, protein antigenik dapat diperoleh dari kulit, membran vitelin, dan *granular layer*. Sedangkan pada stadium larva dan dewasa yang paling sering digunakan adalah *excretory secretory* (ES) antigen, *surface antigen*, dan antigen somatic (*whole extract*) (Kusnoto, 2003).

Imunogenitas suatu substansi ditentukan oleh beberapa faktor penting, diantaranya molekul substansi tersebut harus berukuran cukup besar, walaupun belum diketahui batas ukuran molekul yang menentukan imunogenitas. Substansi dapat dikatakan 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 *et al.*, 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 mengawali respons imun. Imunogen yang paling poten umumnya merupakan makromolekul polisakarida, polipeptida atau protein (Kresno, 1996).

2.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ELISA (*Enzyme-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, antibody, 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 *horseradish peroxidase*, *alkaline phosphatase* yang memudahkan untuk memonitor perubahan warna. Adanya reaksi enzim ini, menyebabkan antibodi pertama dapat dianalisis secara kualitatif (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 β -Galaktosidase, peroksidase, glukose oksidase, dan *alkaline phosphatase* (Pelezar *et al.*, 1988).

Berdasarkan komponen yang dilabel enzim ELISA dapat dibagi menjadi tiga jenis, yakni pelabelan pada antibodi (Ab), pelabelan pada antigen (Ag) atau anti-immunoglobulin (anti-Ig) (Suwarno dkk, 2003).

Salah satu konfigurasi ELISA berdasarkan pelabelan pada anti-immunoglobulin yaitu ELISA tak langsung (*indirect-ELISA*). *Indirect-ELISA*

merupakan model ELISA yang banyak digunakan di berbagai tingkatan laboratorium, hasil uji ini juga lebih spesifik jika dibandingkan dengan uji *direct-ELISA*. Model ini sering digunakan secara rutin untuk diagnosis antigen maupun antibodi (Rantam, 2003). Prinsip dasar *indirect-ELISA* adalah antigen teradsorbsi pada substrat padat. Antibodi primer tidak berlabel dan dapat diperoleh dari serum atau bermacam cairan tubuh lain. Antibodi sekunder terikat pada enzim yang sesuai, antibodi ini biasanya disebut dengan konjugat. Antigen dan antibodi sekunder biasanya dibuat konstan dan yang berubah adalah antibodi primer. Hasil ELISA akan tampak bila ditambahkan substrat (Burgess, 1995).

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 METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dimulai bulan September 2007 sampai bulan Juni 2008. Tempat penelitian di Laboratorium Helmintologi, Laboratorium Virologi-Imunologi, Laboratorium Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dan Laboratorium *Tissue Culture, Institute of Tropical Disease (ITD)* Universitas Airlangga.

3.2 Materi Penelitian :

3.2.1 Hewan Percoban

Pada penelitian ini hewan coba yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*) jantan umur 8 minggu sebanyak 20 ekor dengan berat badan rata-rata 40 gram.

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan utama yang digunakan pada penelitian ini yaitu telur infeksi (larva kedua) dan E-S cacing *Toxocara cati* yang diperoleh dari pembedahan pada saluran pencernaan beberapa ekor kucing yang menderita toxocariasis yang diambil dari beberapa tempat di kota Surabaya. Bahan yang digunakan pada isolasi L₂ *T. cati* adalah : air destilasi, *phosphate buffer saline* (PBS) dengan pH 7,2, Formalin 10 %.

Bahan yang digunakan pada uji indirect ELISA adalah 0,05% PBS *Tween-20*, *buffer coating* (Buffer Carbonat-Bicarbonat), *washing buffer*, *blocking buffer* (creamer), *Conjugate (Anti-Mouse-Ig G HRP Conjugate)*, antigen (Protein 9 kDa E-S larva kedua jaringan *T. cati*), Antibodi (serum yang diperoleh dari mencit yang telah diinfeksi dengan telur L₂ *T. cati*), substrat buffer (DEA TMB), dan H₂SO₄.

3.2.3 Alat-Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *styroform*, jarum pentul, kandang kucing, inkubator, *freezer -30°C*, cawan petri, scalpel, pinset, gunting bedah, nampan plastik, mikroskop *inverted*, mikroskop *disecting*, tabung conical kecil dan besar, label, selotip, sentifus, pipet plastik, pipet *ependorf* 1000 µl, 100 µl, *yellow tip*, *blue tip*, *sput disposable*, jarum trokar, filter T200 (25 µm), filter ukuran 1 mm, corong plastik, *object glass*, *cover glass*, sonikator, sonde, gelas plastik, mikrotube, kapas, kandang mencit, gelas plate, alat spektrofotometer sedangkan alat yang digunakan pada *Indirect-ELISA* adalah Pipet *Multi Channel*, Pipet *ependorf* 20-200 µl dan 1-10 µl, gelas ukur 500 ml, beker glass 100 ml, 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 cara pembedahan saluran pencernaan kucing yang terinfeksi berat *T. cati*. Pada pembedahan saluran pencernaan kucing yang terinfeksi berat *T. cati* dilakukan dengan *euthanasia* menggunakan *ether* secara terbuka (*Open drop*) sampai kucing tersebut mati. Selanjutnya dilakukan preparasi pada saluran pencernaan dan didapatkan banyak cacing dewasa *T. cati*. Cacing yang ditemukan diambil kemudian dicuci dengan aquadest agar cacing tidak bercampur dengan kotoran, selanjutnya dicuci kembali dengan PBS hingga bersih. Cacing yang diperoleh diidentifikasi di bawah mikroskop *disecting*, kemudian dimasukkan ke cawan petri yang berisi PBS dan disimpan dalam inkubator dengan suhu 37°C. Setiap hari cacing dikeluarkan dan diperiksa, jika PBS tersisa sedikit maka ditambahkan dengan yang baru. Jika ada cacing yang mati dikeluarkan dari inkubator dan digerus untuk mendapatkan telur cacing dari hasil gerusan. Biasanya cacing hanya dapat bertahan hidup selama 3-4 hari, setelah hari ketiga telur yang dikeluarkan oleh tubuh cacing dipindahkan ke cawan petri yang lain pada media PBS dan disimpan pada suhu ruangan.

Isolasi telur cacing *T. cati* yang berasal dari feses kucing penderita toxocariasis dilakukan dengan menggunakan teknik gradien preparasi (*preparation of gradient*) (Drenchrite, 1996). Langkah pelaksanaan gradien preparasi adalah sebagai berikut : feses diencerkan dengan air dengan perbandingan 1 : 10, suspensi feses kemudian disaring dengan filter 1 mm. Hasil penyaringan disentrifus 1500 rpm selama 5 menit untuk mendapatkan

sedimentasi. Selanjutnya disiapkan larutan sukrosa dibuat dengan berbagai konsentrasi (20%, 25%, 30%, 35% dan 40%) dan masing-masing konsentrasi mempunyai warna yang berbeda. Masing-masing larutan sukrosa diambil sebanyak 2 ml dan dimasukkan ke dalam beberapa tabung sentrifus dengan menggunakan spuit yang telah dipasang jarum trokar hingga ke dasar tabung. Larutan sukrosa dimasukkan ke dalam tabung sentrifus secara bertahap, dimulai dari konsentrasi terendah ke konsentrasi tertinggi. Suspensi feses sebanyak 2 ml dimasukkan pada beberapa tabung sentrifus yang telah diisi dengan larutan sukrosa, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit. Telur *T. cati* akan berada diantara larutan sukrosa konsentrasi 30%-35% dan akan tampak menyerupai cincin kabut berwarna putih. Telur *T. cati* diambil dengan menggunakan spuit berjarum trokar lalu disaring dengan filter berukuran T 200 (25 μ m), setelah itu disemprot dengan aquadest supaya larutan sukrosa terjatuh tapi telur tetap menempel pada filter/saringan. Telur *T. cati* dipindahkan pada cawan petri yang berisi PBS sebagai media pertumbuhan dan ditambahkan formalin 1% untuk mencegah pertumbuhan mikroorganisme pengganggu. Telur-telur hasil isolasi tersebut di atas dipupuk selama 21-28 hari untuk mendapatkan telur infeksi (Larva Kedua) *T. cati*. Selain itu cawan petri harus selalu ditambah dengan PBS 10 % agar telur mendapatkan zat makanan yang cukup.

3.3.2 Pembuatan E-S Larva Kedua Jaringan *T. cati*

E-S Larva Kedua jaringan diperoleh dari larva kedua jaringan *T. cati* yang telah diisolasi dan diinkubasikan pada suhu 37°C dengan menggunakan media

Phosphate Buffer Saline (PBS). Cairan E-S tersebut disimpan dalam tabung dan disentrifus dengan kecepatan 35000 rpm selama 5 menit pada suhu 4° C untuk diambil supernatannya, lalu supernatan tersebut ditera untuk mengetahui kadar proteinnya, kadar protein tersebut diperlukan untuk mengetahui tingkat pengenceran antigen pada saat melakukan *indirect* ELISA. E-S larva kedua jaringan *T. cati* tersebut disimpan dalam *freezer* pada suhu -30°C agar proteinnya tidak rusak sampai menunggu ELISA dilakukan.

3.3.3 Penghitungan Dosis Infeksi Telur L₂ *T. cati*

Penghitungan telur L₂ *T. cati* dilakukan dengan menggunakan teknik penghitungan TCPGT (Telur Cacing Per Gram Tinja) yang telah dimodifikasi. Apabila penghitungan TCPGT pada umumnya menggunakan tinja atau feses yang disuspensikan maka pada teknik TCPGT yang dimodifikasi digunakan suspensi telur. Sesuai dengan penghitungan TCPGT menurut Sosiawati dkk. (2007) maka penghitungan dilakukan dengan metode Lucient Brumpt hanya saja dimodifikasi tidak dengan menimbang 1 g tinja tapi dengan telur infeksi (L₂) *T. cati* hasil pemupukan menggunakan PBS selama 28 hari.

Suspensi telur dalam PBS diambil sebanyak 1 ml kemudian diencerkan dengan PBS dengan pengenceran 10x menjadi 10 ml. Setelah itu dihitung jumlah tetes pada setiap 1 ml suspensi dengan menggunakan pipet pasteur. Kemudian diambil satu tetes lalu diletakkan pada obyek glass dan diperiksa di bawah mikroskop dengan perbesaran 100x. Apabila pada lapangan pandang mikroskop masih didapati telur infeksi masih terlalu pekat dan masih belum dapat dihitung

pada satu tetes maka pengenceran suspensi telur ditingkatkan sampai tiap tetesnya dapat dihitung. Setelah telur infeksi dapat dihitung maka jumlah telur yang akan diinfeksi pada tiap mencit digunakan rumus:

$$N \times n \times p$$

- Jumlah tetes setiap ml = N
- Jumlah telur cacing tiap tetes = n
- Jumlah pengenceran = p

3.3.4 Pembuatan Antibodi pada Mencit

Infeksi buatan pada mencit dilakukan dengan langkah sebagai berikut: menyiapkan mencit sebanyak 20 ekor. Dari 20 ekor mencit tersebut dibagi secara acak dalam 4 kelompok perlakuan, masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor mencit. Selanjutnya 4 kelompok perlakuan tersebut diinfeksi telur infeksi (L_2) *Toxocara cati* dengan dosis sebagai berikut : P0 adalah mencit yang diinfeksi buatan per oral dengan dosis 0 butir/gram berat badan, P1 adalah mencit yang diinfeksi buatan per oral dengan dosis L_2 *T. cati* 10 butir/gram berat badan, P2 adalah mencit yang diinfeksi buatan per oral dengan dosis L_2 *T. cati* 17 butir/g berat badan, dan P3 adalah mencit yang diinfeksi buatan per oral dengan dosis L_2 *T. cati* 170 butir/gram berat badan.

Tahap pengambilan darah dilakukan pada ekor mencit pada hari ke-14. Darah yang telah diambil disentrifus dengan kecepatan 3000rpm selama 5 menit, kemudian diambil serumnya yang selanjutnya digunakan sebagai antibodi pada uji *Indirect-ELISA*.

3.3.5 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.

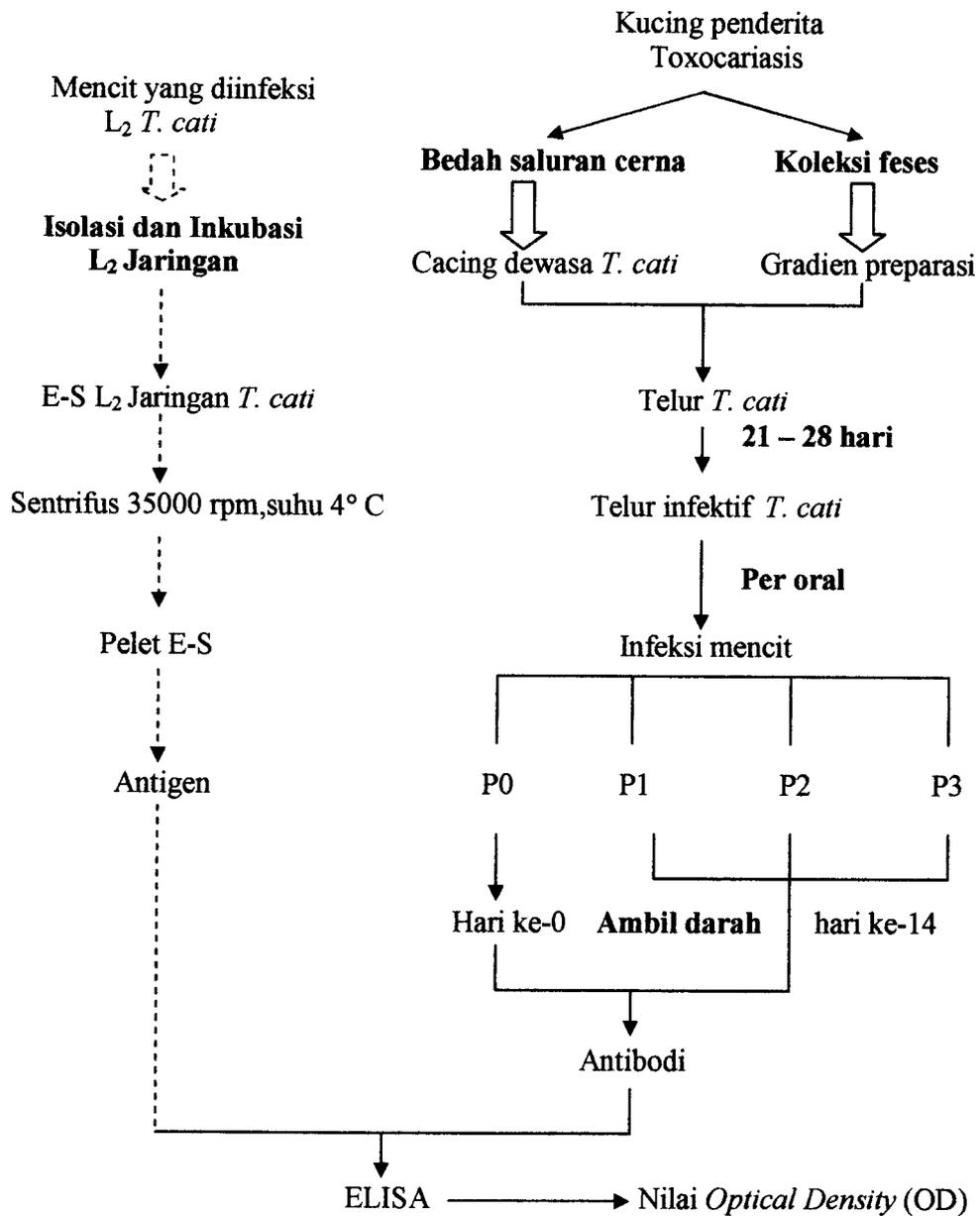
Langkah-langkahnya sebagai berikut, pertama dilakukan **Coating Antigen** dengan mengencerkan antigen dalam *carbonate buffer* dengan konsentrasi 50 µg/well, kemudian antigen dimasukkan ke dalam sumuran/well sebanyak 50 µl, mikroplate ditutup dengan plastik bening lalu disimpan dalam kulkas dengan suhu 4°C selama 24 jam. **Blocking buffer**, setelah disimpan 24 jam plate dikeluarkan dan antigen dibuang kemudian dicuci dengan PBS-Tween sebanyak empat kali kemudian ditambahkan blocking buffer sebanyak 250 µl ke tiap-tiap sumuran, lalu diinkubasi pada suhu kamar (37°C) selama 1 jam, setelah 1 jam dicuci kembali dengan PBS-Tween sebanyak empat kali. **Inkubasi serum**, mengencerkan serum dari mencit yang diinfeksi telur infeksi *T. cati* dengan *blocking buffer* dengan perbandingan (1:25), kemudian dimasukkan ke dalam tiap-tiap sumuran sebanyak 50 µl, dan inkubasikan pada suhu 37°C selama 1 jam, selanjutnya dicuci dengan PBS-Tween sebanyak empat kali. **Inkubasi konjugat**, mengencerkan konjugat (Anti-Mouse Immunoglobulin G berlabel enzim *Horseradish Peroxidase*) dengan PBS *Tween-20* 1 ml untuk 1 liter hingga diperoleh pengenceran 1/100, kemudian diisikan pada tiap-tiap sumuran sebanyak 50 µl dan diinkubasikan pada suhu kamar selama 1 jam, dicuci kembali dengan PBS-Tween sebanyak empat kali. Langkah terakhir pengerjaan *Indirect-ELISA* ini dengan penambahan substrat, memasukkan 50 µl substrat TMB pada tiap

sumuran, kemudian didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar dan diletakkan dalam ruangan gelap hingga tampak warna kekuningan, untuk stop reaksi (menghentikan reaksi) tambahkan H_2SO_4 1 N sebanyak 50 μ l. Pembacaan nilai absorban dengan menggunakan *ELISA-reader* dengan panjang gelombang 450 nm.

3.4 Variabel Penelitian

Variabel yang terdapat pada penelitian ini terdiri dari dua variabel, yaitu variabel bebas dan variabel tergantung. Variabel bebas pada penelitian ini berupa dosis infeksi *L₂ T. cati* yang diinokulasikan per oral pada mencit. Sedangkan variabel tergantung pada penelitian ini adalah nilai *Optical Density (OD)* yang dihasilkan dari pembacaan *ELISA reader*.

3.5 Kerangka Operasional Penelitian



Keterangan :

- = penelitian dilakukan sendiri
- - - - - = penelitian tidak dilakukan sendiri

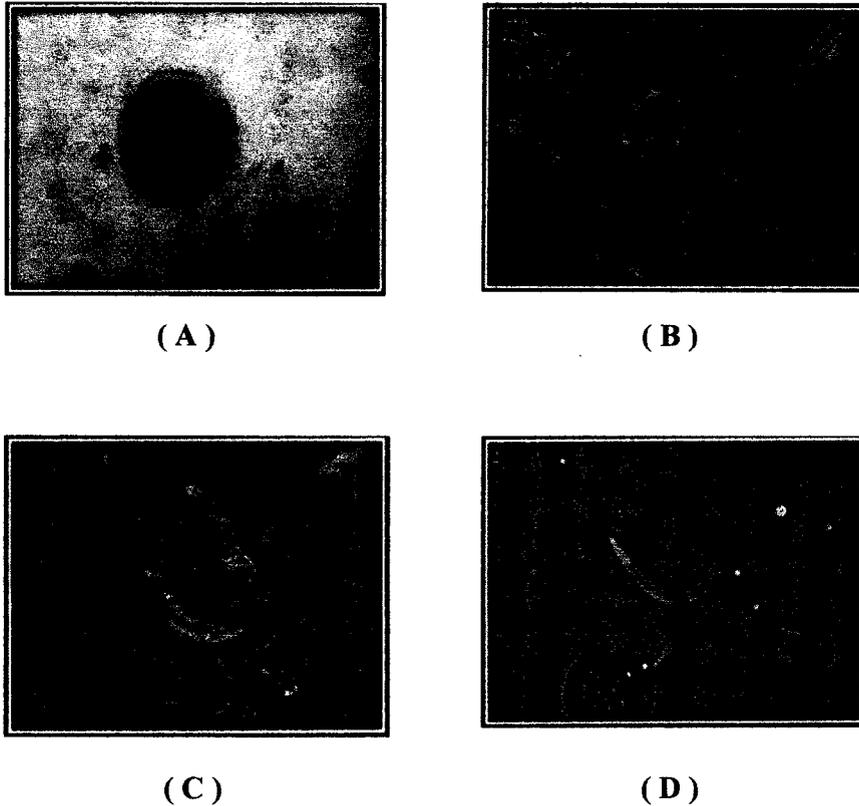
3.6 Rancangan Penelitian dan Analisis Data

Rancangan yang digunakan pada penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Data yang diperoleh dari hasil uji *Indirect-ELISA* ditabulasikan, kemudian dianalisis dengan uji Anava yang dilanjutkan dengan uji Duncan menggunakan *Statistical Program and Service Solution (SPSS) rel 13.00 for Windows* (Santoso, 2001).

BAB 4 HASIL PENELITIAN

4.1 Isolasi Larva Kedua (L₂) *Toxocara cati*

Hasil isolasi larva kedua (L₂) *T. cati* dan perkembangannya mulai telur, larva stadium pertama (L₁) sampai menjadi larva stadium kedua (L₂) *T. cati*, dapat dilihat pada gambar 4.1



Gambar 4.1 Telur *T. cati*. (A) Telur *T. cati*. Pembesaran 400x. (B) Larva stadium pertama (L₁) *T. cati*. Pembesaran 400x. (C) Larva stadium kedua (L₂) *T. cati*. Pembesaran 400x. (D) L₂ *T. cati* yang terlepas dari telur. Pembesaran 400x.

4.2 Isolasi Larva Kedua Jaringan (L₂J) *Toxocara cati* dan Pembuatan *Excretory Secretary* (ES) Antigen

Hasil isolasi larva kedua jaringan (L₂J) *T. cati* yang diperoleh dapat dilihat pada gambar 4.2. Antigen ES L₂J *T. cati* yang diperoleh kemudian dihitung kadar proteinnya dengan menggunakan spektrofotometer untuk menentukan pengenceran antigen pada *indirect*-ELISA. Hasil pengukuran kadar protein antigen ES L₂J *T. cati* yang diperoleh adalah sebesar 0,343 g/dl.



Gambar 4.2 Hasil isolasi larva kedua jaringan (L₂J) *T. cati*. Pembesaran 100x.

4.3 Pembuatan Antibodi anti-*T. cati*

Setelah proses infeksi pada mencit kemudian dilakukan pengambilan darah pada hari ke-14 untuk mendapat sampel serum darah mencit. Sampel darah yang didapatkan pada setiap mencit kemudian didiamkan selama 10 menit sebelum dilakukan sentrifugasi pada 1500 rpm selama 5 menit. Serum yang berupa cairan berwarna bening di atas darah yang membeku diambil dengan menggunakan pipet *ependorf* dimasukkan ke dalam mikrotube lalu dilabel sesuai dengan mencit yang berbeda pada setiap perlakuan. Khusus untuk sampel serum

mencit kontrol, darah diambil tanpa infeksi *L2J T. cati*. Sebelum dilakukan uji ELISA sampel serum disimpan dalam freezer supaya sampel tidak rusak

4.4 Hasil Uji *indirect*-ELISA

Seluruh nilai OD yang diperoleh pada uji *indirect*-ELISA kemudian dianalisis dengan menggunakan uji Anava yang dilanjutkan dengan uji Duncan yang secara lengkap dapat dilihat pada Lampiran 1. Adapun rata-rata nilai OD dari masing-masing perlakuan dapat dilihat pada Tabel 4.1

Tabel 4.1 Rata-rata Nilai *Optical Density* (OD) dan Kisaran Nilai OD Pada Uji *indirect*-ELISA

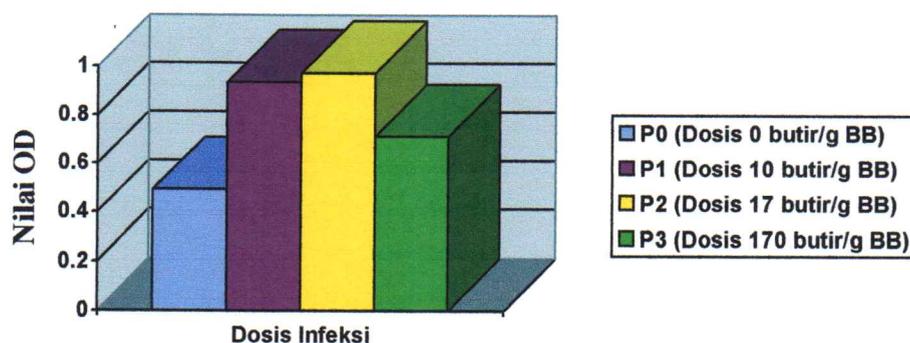
Perlakuan	X ± SD	Kisaran Nilai OD
P0 (Kontrol)	0,494 ± 0,036 ^a	0,434 – 0,519
P1 (Infeksi dengan dosis 10 butir/gr BB)	0,936 ± 0,186 ^c	0,667 – 1,094
P2 (Infeksi dengan dosis 17 butir/gr BB)	0,974 ± 0,017 ^c	0,959 – 0,994
P3 (Infeksi dengan dosis 170 butir/gr BB)	0,713 ± 0,246 ^b	0,461 – 1,044

^{a, b, c} superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$).

Pada tabel 4.1 terlihat bahwa hasil pembacaan nilai OD pada serum mencit tidak diinfeksi sebagai kontrol (P0) adalah sebesar 0,494. Sedangkan pada serum mencit yang diinfeksi dengan dosis 17 butir/g BB (P2) memperoleh nilai OD tertinggi, sebesar 0,974. Mencit yang diinfeksi dengan dosis 10 butir/g BB (P1)

memiliki OD sebesar 0,936 dan pada P3 yaitu pada serum mencit yang diinfeksi dengan dosis 170 butir/g BB memperoleh nilai OD sebesar 0,713.

Hasil analisis statistik Uji Anava terhadap nilai OD dari masing-masing perlakuan menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) diantara perlakuan. Nilai OD dari serum mencit yang mendapat perlakuan infeksi dengan dosis 17 butir/g BB memiliki nilai OD yang tertinggi bila dibandingkan dengan serum mencit yang mendapat perlakuan infeksi dengan dosis 10 butir/g BB, dosis 170 butir/g BB maupun kontrol. Hal ini dapat menunjukkan bahwa aktivitas ikatan antara antigen dan antibodi yang tertinggi terdapat pada P2, yaitu pada perlakuan yang mendapat infeksi dengan dosis 17 butir/g BB. Sehingga dapat dinyatakan bahwa dosis infeksi 17 butir/g BB merupakan dosis infeksi $L_2 T. cati$ yang mampu menampilkan nilai OD tertinggi. Selain itu dapat dinyatakan pula bahwa besarnya dosis merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi respons imun humoral yang dapat dilihat dari nilai OD yang diperoleh. Berikut merupakan gambar diagram batang yang menggambarkan pengaruh berbagai dosis infeksi $L_2 T. cati$ terhadap nilai *Optical Density* (OD).



Gambar 4.3 Pengaruh Berbagai Dosis Infeksi $L_2 T. cati$ terhadap nilai *Optical Density* (OD)

BAB 5 PEMBAHASAN

Toxocariasis adalah penyakit yang disebabkan oleh cacing dari genus *Toxocara* (Uga *et al.*, 1990). Toxocariasis pada kucing yang disebabkan oleh cacing *Toxocara cati* merupakan salah satu penyakit parasit yang penting, karena selain menginfeksi kucing, toxocariasis juga sangat berbahaya bagi manusia karena bersifat zoonosis dan dapat menyebabkan penyakit pada manusia (Provet, 2002).

Selama ini diagnosis toxocariasis secara konvensional dengan cara pemeriksaan feses untuk menemukan telur cacing tidak mutlak dapat dilakukan, karena cacing dewasa hanya dapat ditemukan pada hospes definitif saja, sehingga telur cacing dalam feses juga tidak mungkin dapat ditemukan pada selain hospes definitif. Diagnosis terhadap toxocariasis berdasarkan gejala klinis juga sulit dilakukan karena gejala klinis yang timbul sangat bervariasi (Uga *et al.*, 1990). Berdasarkan permasalahan tersebut maka diperlukan teknik diagnosis yang memiliki sensitifitas yang tinggi, salah satunya adalah melakukan diagnosis secara imunologis.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) merupakan salah satu teknik diagnosis dengan sensitifitas tinggi, yang dapat dikembangkan untuk diagnosis *Toxocariasis* secara imunologis. Penegakan diagnosis terhadap infeksi toxocariasis secara imunologis juga perlu ditunjang oleh adanya bahan uji yang memiliki spesifisitas yang tinggi, mengingat pada infeksi parasit banyak dijumpai adanya protein yang tidak spesifik (Cohen and Warren, 1982).

Antibodi yang digunakan pada uji ELISA berasal dari sampel serum darah mencit yang diberi perlakuan infeksi tunggal secara oral dengan dosis yang berbeda pada tiap perlakuan. Infeksi tunggal secara oral dilakukan untuk melihat bagaimana sebenarnya tingkat respons imun humoral yang terbentuk ketika hospes terinfeksi pertama kali melalui kontaminasi makanan atau minuman. Hal ini dikarenakan banyaknya penularan toxocariasis terjadi secara oral, yaitu melalui makanan atau minuman yang terkontaminasi oleh telur infeksius yang mengandung larva kedua atau larva jaringan (Ito *et al.*, 1986).

Tiap-tiap perlakuan diinfeksi dengan *L₂ T. cati* dosis 10 butir/g berat badan (P1), dosis 17 butir/g berat badan (P2), dosis 170 butir/g berat badan (P3), dan tanpa infeksi *L₂ T. cati* sebagai perlakuan kontrol (P0). Infeksi *T. cati* dengan menggunakan *L₂* dilakukan dengan harapan dapat segera memicu respons imun humoral karena *L₂* merupakan telur infeksius dari penyakit toxocariasis. Hal ini diperkuat oleh pernyataan Ogilvie dan de Savigny (1982) yang disitasi oleh Burges (1993) bahwa pada anjing yang diinfeksi *Toxocara canis* terdapat bukti yang menggambarkan imunitas spesifik stadium terhadap stadium larva yang tidak mempengaruhi stadium dewasa dalam usus.

Pengambilan darah dilakukan pada hari ke-14 atau minggu kedua dengan harapan pada hari ke-14 nilai OD menunjukkan nilai yang tinggi. Hal ini dikarenakan kadar Ig G mencapai puncaknya 10 – 14 hari setelah pemaparan antigen (Kresno, 2001), selain itu Ig G merupakan 75% dari imunoglobulin total dan imunoglobulin utama yang dibentuk atas rangsangan antigen sehingga dimungkinkan pada hari ke-14 imunoglobulin yang banyak terikat pada saat

ELISA adalah Ig G. Selain Ig G, imunoglobulin yang dapat terikat pada hari ke-14 adalah Ig M, namun kadarnya mulai berkurang sebelum Ig G mencapai puncaknya. Antibodi yang digunakan dalam penelitian ini adalah antibodi poliklonal yang terbentuk dihasilkan oleh limfosit B. Antibodi ini akan lebih banyak mengenal epitop yang merupakan bagian dari antigen (Baratawijaya, 2000). Bila antigen dimasukkan ke dalam sistem imun hewan percobaan, semua sel B yang mengenal epitop pada antigen akan dirangsang dan memproduksi antibodi. Darah yang diambil dari hewan tersebut akan mengandung antibodi yang multipel yang akan bereaksi dengan setiap epitop. Serum tersebut disebut poliklonal oleh karena mengandung produk dari banyak sel B. Keuntungan antibodi poliklonal dibandingkan dengan antibodi monoklonal adalah lebih sensitif dalam mengenal antigen walaupun spesifitasnya rendah (Tizard, 1982).

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) dilaksanakan dengan menggunakan antigen ES L₂J *T. cati*. Nilai OD yang dihasilkan dari reaksi antara antigen terhadap antibodi yang digunakan kemudian dianalisis dengan menggunakan Uji Anava. Hasil dari ELISA (*indirect-ELISA*) merupakan nilai *optical density* (OD) yang diperoleh dari pembacaan ELISA dengan menggunakan ELISA *reader* pada panjang gelombang 450 nm. Nilai OD yang diperoleh kemudian dianalisis dengan menggunakan uji Anava dan dilanjutkan dengan uji Duncan.

Hasil analisis nilai OD₄₅₀ dari masing-masing perlakuan menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) diantara perlakuan. Nilai rata-rata OD yang ditunjukkan oleh P1, P2, dan P3 mengalami peningkatan dibandingkan

dengan nilai OD dari P0. Hasil ini menunjukkan bahwa memang terjadi peningkatan respons imun oleh karena adanya infeksi cacing *Toxocara cati*. Menurut Bellanti (1993), injeksi satu dosis suatu substansi asing ke dalam binatang yang mampu membuat respons imun akan menghasilkan antibodi spesifik yang muncul dalam serum sesudah beberapa waktu berlangsung. Pemaparan pertama pada imunogen membangkitkan respons primer. Namun hasil statistik tersebut belum dapat dikatakan positif terinfeksi secara biologis apabila nilai perlakuan belum memenuhi dua kali kontrol negatif. Hal ini dapat dilihat pada nilai rata-rata P1, P2, dan P3 yaitu berturut-turut 0.936, 0.974, dan 0.713 masih belum memenuhi hasil dua kali kontrol negatif (P0) yaitu 0.988.

Nilai OD dari serum mencit yang mendapat perlakuan infeksi L_2 *T. cati* dengan dosis 17 butir/g berat badan menunjukkan hasil yang tertinggi bila dibandingkan dosis yang lain. Hasil tersebut menunjukkan bahwa dosis L_2 *T. cati* 17 butir/g berat badan merupakan dosis infeksi dan dosis optimal untuk meningkatkan respons imun humoral. Sedangkan dosis tertinggi L_2 *T. cati* (P3) yaitu 170 butir/g berat badan menunjukkan nilai OD paling rendah apabila dibandingkan dosis infeksi P1 dan P2. Hasil tersebut menunjukkan bahwa dosis tertinggi tidak selalu dapat merangsang respons imun yang tinggi. Besarnya dosis merupakan salah satu faktor penting yang menentukan imunogenitas suatu substansi dan juga menentukan respons imun yang ditimbulkan. Dosis yang diberikan juga harus tepat, karena bukan tidak mungkin dosis yang berlebihan bahkan tidak mampu merangsang respons imun (Kresno, 2001). Hal ini didukung oleh pernyataan Bellanti (1993) bahwa jumlah imunogen yang disuntikkan juga

mempengaruhi respons imun. Penelitian tentang toleransi imunogenik menggambarkan bahwa dosis benda asing yang sangat rendah atau sangat tinggi dapat menghambat respons yang akan datang pada suntikan berikutnya dengan dosis imunogenik yang lain.

Hasil yang ditunjukkan oleh P1 yaitu dosis *L₂ T. cati* 10 butir/g berat badan menunjukkan nilai OD yang tidak berbeda nyata dengan P2, namun rata-rata nilai OD P1 sedikit lebih rendah dari P2. Hasil tersebut menunjukkan bahwa dosis *L₂ T. cati* (P1) 10 butir/g berat badan masih mampu memberikan respons imun yang optimal. Menurut Burgess (1995), masuknya antigen parasit ke dalam usus terjadi melalui peningkatan permeabilitas persambungan antara sel-sel epitel yang disebabkan oleh peradangan yang terjadi karena produk sel mast, basofil dan eosinofil, yaitu sel-sel yang telah lama dikaitkan dengan nematodiasis gastrointestinal, atau karena kerusakan pada lapisan epitel yang disebabkan oleh cacing kait. Pengambilan antigen dapat juga dilakukan oleh sel khusus pada epitelium yang menutupi *Peyer patch*. Nematoda gastrointestinal menimbulkan respons yang menghasilkan antibodi Ig E, Ig M, Ig G dan Ig A.

BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini, dapat ditarik kesimpulan bahwa :

1. Larva kedua (L_2) *T. cati* yang diinfeksi ke mencit memiliki sifat antigenik.
2. Terdapat perbedaan nilai *Optical Density* (OD) pada serum mencit yang diinfeksi L_2 *T. cati* dengan dosis yang berbeda, dengan dosis 10 butir/g berat badan dan dosis 17 butir/g berat badan merupakan dosis yang mampu menginduksi kadar antibodi tertinggi dibanding dengan dosis 170 butir/g berat badan.

6.2 Saran

Berdasarkan kesimpulan di atas, penulis menyarankan :

Antibodi anti *T. cati* mencit dari hasil infeksi berupa telur infeksi (L_2) *T. cati* dengan dosis 10 butir/g BB dan dosis 17 butir/g BB dapat diteliti lebih lanjut untuk pengembangan kit diagnostik penyakit toxocariasis.

RINGKASAN

Fira Yani Indah Puspita. Respons Imun Humoral Mencit Terhadap Infeksi Buatan Cacing *Toxocara cati* dengan Dosis Yang Berbeda. (Di bawah bimbingan Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam drh. selaku pembimbing pertama dan Dr. M. Zainal Arifin M.S., drh. selaku pembimbing kedua).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui respons imun humoral mencit terhadap berbagai dosis infeksi L_2 *T. cati* yang ditunjukkan melalui nilai *Optical Density* (OD) dari hasil pembacaan *ELISA reader* dan menentukan dosis infeksi L_2 *T. cati* yang mampu menampilkan nilai *Optical Density* (OD) tertinggi pada serum mencit. Tujuan tersebut diharapkan nantinya dapat digunakan sebagai kit diagnostik penyakit infeksi cacing *Toxocara cati*.

Hewan coba yang digunakan adalah mencit jantan (*Mus musculus*) berumur 8 minggu sebanyak 24 ekor yang dibagi dalam 4 perlakuan, yaitu P0 (perlakuan kontrol) dosis infeksi L_2 *T. cati* 0 butir/gr BB, P1 dosis infeksi L_2 *T. cati* 10 butir/gr BB, P2 dosis infeksi L_2 *T. cati* 17 butir/gr BB, dan P3 dosis infeksi L_2 *T. cati* 170 butir/gr BB. Cacing *T. cati* yang diinfeksi berupa telur L_2 *T. cati* yang diperoleh dari inkubasi telur cacing *T. cati* yang berasal dari cacing dewasa dan feses kucing penderita toxocariasis.

Telur L_2 *T. cati* diinfeksi per oral pada mencit sesuai dosis pada masing-masing perlakuan. Setelah hari ke-14 post infeksi, diambil sampel serum darah tiap-tiap mencit pada masing-masing perlakuan yang nantinya digunakan sebagai antibodi pada uji *indirect* ELISA. Antigen yang digunakan pada uji

indirect ELISA berasal dari *excretory-secretory* (ES) L_2 *T. cati* hasil inkubasi L_2 *T. cati*.

Hasil dari uji *indirect* ELISA dibaca pada ELISA *reader* dengan panjang gelombang 450 nm. Kemudian data hasil pembacaan ELISA *reader* ditabulasikan dan dianalisis statistik dengan metode ANAVA SPSS yang diperoleh hasil bahwa terdapat perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) diantara perlakuan. Karena terdapat perbedaan yang nyata diantara perlakuan maka dilanjutkan dengan uji Duncan sehingga diperoleh tiga signifikansi, signifikansi pertama bahwa P0 sebagai kontrol perlakuan memiliki nilai OD terendah sebesar 0,494, kemudian signifikansi kedua terdapat pada P3 yang memiliki nilai OD sebesar 0,713, dan signifikansi ketiga terdapat pada P1 dan P2 dengan nilai OD masing-masing sebesar 0,936 dan 0,974. Sehingga dapat dinyatakan bahwa besarnya dosis infeksi mempengaruhi nilai *Optical Density* (OD).

Dari hasil penelitian ini, dapat ditarik kesimpulan bahwa L_2 *T. cati* yang diinfeksi ke mencit memiliki sifat antigenik dan pemberian dosis infeksi L_2 *T. cati* yang berbeda mempengaruhi nilai *Optical Density* (OD) dengan dosis 10 butir/g BB dan dosis 17 butir/g BB mampu menginduksi kadar antibodi tertinggi dibandingkan dengan dosis 170 butir/g BB. Untuk itu, disarankan untuk melakukan penelitian lebih lanjut terhadap antibodi anti *T. cati* mencit dari hasil infeksi L_2 *T. cati* dengan dosis 10 butir/g BB dan dosis 17 butir/g BB.

PERPUSTAKAAN

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A. K., A. H. Lichtman, and J.S. Pober. 2000. Cellular and Molecular Immunology 4th ed. Saunders Company. Philadelphia
- Akao N, T. H. Takayanagi, R. Suzuki, S.Tsukidate And K. Fujita. 2000. Ocular Larva Migrans Caused by *Toxocara cati* in Mongolian gerbils and Comparison of Ophthalmologic Findings with Those Produce by *T. canis*. J.Parasitol. 86(5): 1135-5.
- 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.
- Baringvet, 2008. Roundworms in Cats and Kittens. Baring Boulevard Veterinary Hospital. <http://www.baringvet.net/roundwormscats.htm>. [27 Maret 2008]
- Bellanti, J. A. 1993. Immunologi III. Cetakan Pertama. Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada. Gadjah Mada University Press.
- Burgess, G. W. 1995. Teknologi ELISA dalam Diagnosis dan Penelitian. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. Hubner, J., M. Uhlikova, and M. Leissova. 2001. Diagnosis of Larva Toxocariasis using IgG avidity. Epidemiol. Microbiol. Immunol. Apr. 50(2): 67 – 70.
- Cohen S, Warren K.S., 1982. Immunology of Parasitic Infections. 2nd Ed. Melbourne, Blackwell Sci. Publ. Pp. 284-285
- DrenchRite. 1996. Larval Development Assay. A product of Csiro research. Horizon Technology Pty Limited. Roseville, Australia.
- Goffete, 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 AI (eds) Basic and Clinical Immunology 7th 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.

- Humbert P, M. Nierborala, R. Salembier, F. Aubin, R. Piarroux, S. Buchet, and T. Barale. 2000. Skin Manifestations Associated with Toxocariasis : A Case Control Study. *Dermatol.* 201 (3): 230-4.
- Ito, K., K. Sakai, T. Okajima, K. Quichi, A. Funikoshi, J. Nishimura, H. Ibayashi, and M. Tsuji. 1986. Three cases of Visceral larva migrans due to ingestions of raw chicken or cow liver. *Nihon Naikagako Zassi.* 75:759-766.
- Janeway, C.A. Jr., P. Travers, M. Walport, and J.D. Capra. 1999. *Immunobiology. The Immune System in Health and Disease.* 4th ed. New York, US: Elsevier Science Ltd/Garland Publishing.
- 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.
- Kresno, S. B. 2001. *Imunologi Diagnosis dan Prosedur Laboratorium.* Ed IV. Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Kusnoto, 2005. Prevalensi Toxocariasis pada Kucing Liar di Surabaya Melalui Bedah Saluran Pencernaan. **Media Kedokteran Hewan.** Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. 21(1): 7-11.
- Kusumamihardja, S. 1993. *Parasit dan Parasitosis pada Hewan Ternak dan Hewan Piaraan di Indonesia.* PAU Biotechnology, IPB, Bogor.
- Levine, N. D. 1994. *Buku Pelajaran Parasitology Veteriner.* Burgers Publishing Company. Diterjemahkan oleh Ashadi G, Wardiarso (Ed). Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- More, S. 1995. *Struktur Antigen Parasit. Dalam Teknologi ELISA dalam Diagnosis dan Penelitian.* G. W. Burgess (Ed). Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Parsons, J. C. 1987. Ascarid Infection in 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.
- Provet. 2002. *Toxocara cati.* Provet.
<http://www.provet.co.uk/health/disease/toxocaracati.htm>.

- 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. Airlangga University Press. Surabaya.
- Roitt, I, Brostoff J., Male .D. 1998. Immunology. 4th Ed. Barcelona, Spain: Mosby, Times Mirror International Publishers Limited.
- 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. Dalam Teknologi ELISA dalam Diagnosis dan Penelitian. G. W. Burgess (Ed). Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Soeharsono. 2002. Zoonosis, Penyakit Menular dari Hewan ke Manusia. Kanisius. Yogyakarta.
- Sosiawati, S. M., S. Subekti., S. Koedarto., H. Puspitawati., Kusnoto. 2007. Penuntun Praktikum Ilmu Penyakit Helmint Veteriner. Edisi 2 cetakan 3. Departemen Pendidikan Nasional Universitas Airlangga.. Surabaya.
- Soulsby, E. J. L. 1986. Helminth, Arthropods and Protozoa of Domestic Animlas. Bailliere Tindall and Cassel. London.
- Suwarno, R. Ernawati, A. P. Rahardjo, N. Sianita, J. Rahmani, F. A. Rantam. 2003. Prinsip Dasar, Optimalisasi dan Interpretasi Hasil Uji ELISA. Laboratorium Virologi dan Imunologi. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya. Hal 1-10.
- Tizard, I. R. 1982. An Introduction of Veterinary Immunologi. 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.
- Viqar-Zaman, 1997. Atlas Parasitologi Kedokteran. Edisi II. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Warren, K. S. 1993. Immunology and Molecular Biology of Parasit Infections. Edinburgh, Black well Sc. PP.55.

Lampiran 1. Analisis Statistik Nilai *Optical Density* dengan Uji ANAVA

Summarize

Case Summaries^a

			OD Serum Mencit	
Perlakuan	P0	1	.434	
		2	.486	
		3	.516	
		4	.519	
		5	.519	
		Total	Sum	2.474
			Mean	.49480
			Std. Deviation	.036725
	P1	1	.821	
		2	1.089	
		3	1.011	
		4	.667	
		5	1.094	
		Total	Sum	4.682
			Mean	.93640
		Std. Deviation	.186804	
P2	1	.992		
	2	.966		
	3	.959		
	4	.994		
	5	.959		
	Total	Sum	4.870	
		Mean	.97400	
		Std. Deviation	.017593	
P3	1	.842		
	2	.737		
	3	.461		
	4	.484		
	5	1.044		
	Total	Sum	3.568	
		Mean	.71360	
		Std. Deviation	.246334	
Total	Sum	15.594		
	Mean	.77970		
	Std. Deviation	.243674		

a. Limited to first 100 cases.

Oneway**Descriptives**

OD Serum Mencit

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Minimum	Maximum
P0	5	.49480	.036725	.016424	.434	.519
P1	5	.93640	.186804	.083541	.667	1.094
P2	5	.97400	.017593	.007868	.959	.994
P3	5	.71360	.246334	.110164	.461	1.044
Total	20	.77970	.243674	.054487	.434	1.094

Test of Homogeneity of Variances

OD Serum Mencit

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
8.025	3	16	.002

ANOVA

OD Serum Mencit

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.739	3	.246	10.137	.001
Within Groups	.389	16	.024		
Total	1.128	19			

Post Hoc Tests

OD Serum Mencit

Duncan^a

Perlakuan	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
P0	5	.49480		
P3	5		.71360	
P1	5			.93640
P2	5			.97400
Sig.		1.000	1.000	.708

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

Lampiran 2. Nilai *optical density* (OD) Setiap Serum Mencit Pada Setiap Perlakuan

Perlakuan	Mencit ke-	Nilai OD	Keterangan
P0	1	0.434	Dosis kontrol 0 butir/gr berat badan
	2	0.486	
	3	0.516	
	4	0.519	
	5	0.519	
P1	1	0.821	Dosis 10 butir/gr berat badan
	2	1.089	
	3	1.011	
	4	0.667	
	5	1.094	
P2	1	0.992	Dosis 17 butir/gr berat badan
	2	0.966	
	3	0.959	
	4	0.994	
	5	0.959	
P3	1	0.842	Dosis 170 butir/gr berat badan
	2	0.737	
	3	0.461	
	4	0.484	
	5	1.044	

Lampiran 3. Bahan-bahan yang digunakan untuk uji *Indirect* ELISA

1. PBS (phosphate buffered saline)

pH : 7,4

Konsentrasi : Fosfat : 10 mmol/l

NaCl : 140 mmol/l

Timbang : NaCl : 8 g

KCl : 0,2 g

KH_2PO_4 : 0.2 g

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$: 2,89 G

Aquades ad : 1 liter

Simpan pada 4° C

2. CARBONATE BUFFER (Buffer untuk coating Ag)

pH : 9,6

Konsentrasi : 50 mmol/l

Timbang : Na_2CO_3 : 1,59 g

NaHCO_3 : 2,93 g

Aquades 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. WASHING BUFFER (Buffer untuk pencuci)

PBS-Tween

Timbang : Tween-20 : 1 ml

PBS ad 1 liter

KATALOG :

- Tween-20 (lihat Blocking Buffer)

4. BLOCKING BUFFER (Buffer untuk pengencer/blocking)

a. PBS-Tween-CREAMER : pH : 7,4

Konsentrasi : Fosfat : 10 mmol/l

NaCl : 140 mmol/l

Tween-20 : 1 ml

Creamer : 5 g

Timbang : Creamer : 0,5 g

PBS-Tween ad 100 ml

KATALOG :

- Tween-20. 500 ml cat. 20605 cas : 9005-64-5 Lot. 107989. USB
- NaCl (Sodium Chloride Analytical Reagent). 1 kg. 31434 Riedel-de-haen

5. SUBSTRAT BUFFER

TMB-substrat (Cat.No. 80-1302 ASSAY DESIGNS)

6. CONJUGAT

Ig G anti mouse Conjugate HRP (Horse Peroxidase)

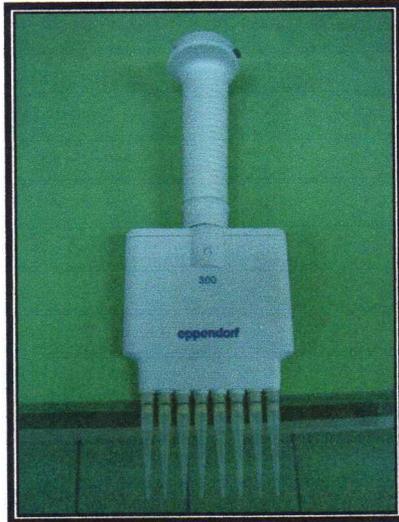
Encerkan dengan blocking buffer 1: 100

7. STOP REAKSI

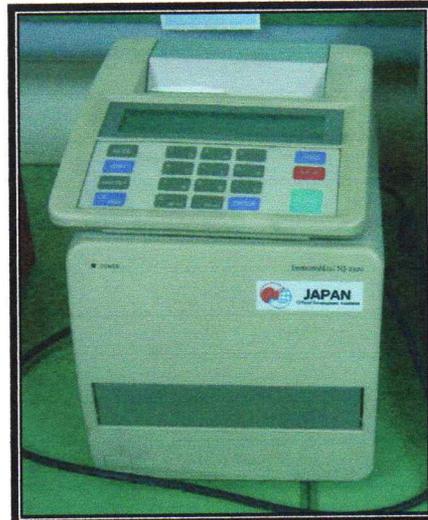
H₂SO₄ (Sulfuric Acid) 1 N

K. 24187931734 MERCK

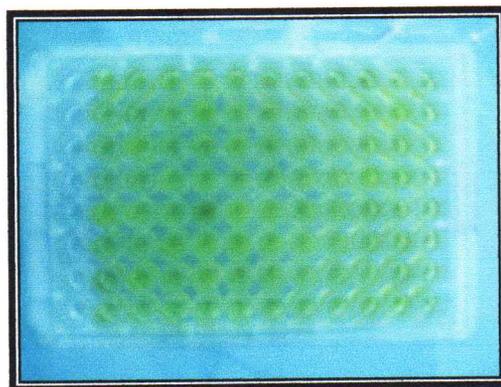
Lampiran 4. Gambar Peralatan Penelitian



Pipet eppendorf



ELISA-Reader



Microplate ELISA