

SKRIPSI

REAKSI SILANG SOMATIC, EXCRETORY SECRETORY DAN INTESTINE ANTIGEN *Toxocara cati* DENGAN SERUM ANTI *Toxocara canis*



Oleh :

INTAN MAYA RAHARJENG

NIM. 060413349

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2008**

**REAKSI SILANG *SOMATIC, EXCRETORY SECRETORY*
DAN *INTESTINE ANTIGEN Toxocara cati* DENGAN
SERUM ANTI *Toxocara canis***

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

Oleh

INTAN MAYA RAHARJENG
NIM 060413349

Menyetujui

Komisi Pembimbing,



(Prof. Dr. Hj. Sri Subekti BS., DEA., drh)
Pembimbing Pertama



(Pratisto, drh)
Pembimbing kedua

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi berjudul:

Reaksi Silang *Somatic, Excretory Secretary* dan *Intestine Antigen Toxocara cati* Dengan Serum Anti *Toxocara canis*

Tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu 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, 12 Juni 2008



Intan Maya Raharjeng
NIM 060413349

Telah dinilai pada Seminar Hasil Penelitian

Tanggal: 16 juli 2008

KOMISI PENILAI SEMINAR HASIL PENELITIAN

Ketua : Sri Mumpuni Sosiawatii, M.S., drh
Sekretaris : Jola Rahmahani, M. Kes.,drh
Anggota : Dr. Lucia Tri Suwanti, M.P.,drh
Pembimbing I : Prof.Dr.Hj. Sri Subekti BS., DEA.,drh
Pembimbing II : Pratisto,drh

Telah diuji pada

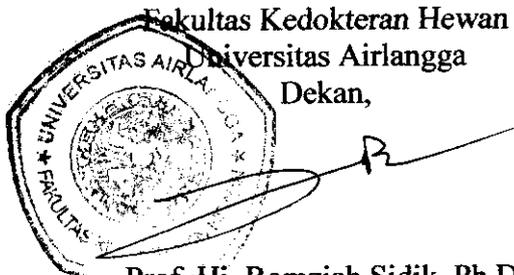
Tanggal : 28 Juli 2008

KOMISI PENGUJI SKRIPSI

Ketua : Sri Mumpuni Sosiawatii, M.S., drh
Anggota : Jola Rahmahani, M. Kes.,drh
: Dr. Lucia Tri Suwanti, M.P.,drh
: Prof.Dr.Hj. Sri Subekti BS., DEA.,drh
: Pratisto,drh

Surabaya, 12 juni 2008

Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga
Dekan,



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

**CROSS REACTION SOMATIC, EXCRETORY SECRETORY AND
INTESTINE ANTIGEN OF *Toxocara cati* WITH ANTI
Toxocara canis SERUM**

Intan Maya Raharjeng

ABSTRACT

The aim of this research were to find out and get the cross reaction of *somatic, excretory secretory* and *intestine* antigen of *T. cati* with anti *T. canis* serum.

Second larvae stage (L2) were obtained from adult worm and feces contamination with egg that have been isolated from Toxocariosis of dog. Adult worms were incubated in 37°C to get the egg. The feces isolation were done with preparation gradien technics to get the egg. Then, eggs were incubated in normal temperature using PBS media until L2 of *T. canis* appears in 21-28 days. Moreover, L2 of *T. canis* were infected to mice for anti *T. canis* serum with doses that 17 infective eggs / gram body weight orally. For getting *Somatic*, *E-S* and *Intestine* antigen, surgical procedure were done to adult worm manually continued with homogenitation procedure. The result of homogenate antigen of *T. cati* and *T. canis* serum were evaluated by using *Western blot* technique.

The result of the research showed cross reaction *somatic, excretory secretory* and *intestine* antigen of *T. cati* with anti *T. canis* serum from mice, using *Western blot* technique.

Key words : Antigen, *Toxocara cati*, *Toxocara canis*, *Western blot*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur Kehadirat Allah SWT atas rahmat dan karunia yang telah dilimpahkan sehingga penulis dapat melaksanakan penelitian dan menyelesaikan skripsi dengan judul **Reaksi Silang Somatic, Excretory secretory dan Intestine Antigen *Toxocara cati* dengan Serum Anti *Toxocara canis*.**

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada:

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

Prof. Dr. Hj. Sri Subekti BS., DEA., drh sebagai pembimbing pertama dan Pratisto, drh sebagai pembimbing kedua atas segala bantuan, saran dan bimbingannya sampai dengan terselesaikannya penulisan skripsi ini.

Sri Mumpuni Sosiawatii, M.S., drh selaku ketua penguji skripsi, Jola Rahmahani, M. Kes., drh. selaku sekretaris penguji dan Dr. Lucia Tri Suwanti, M.P., drh. selaku anggota penguji.

Kusnoto, drh., M.Si sebagai pembimbing penelitian yang telah memberikan bantuan, saran, bimbingan serta membantu penyempurnaan tulisan ini. Mbak Helen sebagai pembimbing dalam pelaksanaan *Western Blot* di TDC.

Benjamin Chr. T., M. Si., drh sebagai dosen wali dan seluruh Staf pengajar Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas wawasan keilmuan selama mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas

Airlangga serta bapak Suwarno yang telah banyak membantu dalam pelaksanaan penelitian di Laboratorium Helmintologi.

Keluarga yang sangat penulis cintai Ayahanda Susiswo dan Ibunda Triyunanik, kakak Areh Judha Asmara, Winantya Adi Sarjana serta Adik Yeshinta Satriana Utama, Adhinata Nicola Wiratama atas doa, kasih sayang, dukungan dan semangat yang telah diberikan kepada penulis.

Rekan Penelitian Fira Yani, Erik J, Mbak Ainun dan Mbak Ninis atas kerjasamanya selama penelitian. Ratna W, Dhian Ayu K, Desty A, Laksmi Budi, serta seluruh teman-teman angkatan 2004 dan Kosan biru 45 terima kasih atas segala perhatian, bantuan dan semangat yang telah diberikan kepada penulis.

Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang telah memberikan bantuan baik secara langsung maupun tidak langsung dalam penyelesaian tulisan ini.

Penulis menyadari bahwa penulisan skripsi ini jauh dari sempurna, oleh karena itu kritik dan saran dari pembaca sangat penulis harapkan. Semoga penulisan skripsi ini dapat bermanfaat bagi pembaca.

Surabaya, Juni 2008

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
LEMBAR PENGESAHAN.....	ii
ABSTRACT.....	vi
UCAPAN TERIMA KASIH.....	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
SINGKATAN DAN ARTI GAMBAR.....	xiv
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Landasan Teori.....	4
1.4 Tujuan Penelitian.....	5
1.5 Manfaat Penelitian.....	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Tinjauan <i>Toxocara cati</i>	6
2.1.1 Klasifikasi.....	6
2.1.2 Morfologi dan siklus hidup.....	6
2.1.3 Siklus hidup dan penularan	7
2.2 Tinjauan <i>Toxocara canis</i>	10
2.2.1 Klasifikasi.....	10
2.2.2 Morfologi dan siklus hidup.....	10
2.2.3 Siklus hidup dan penularan	11
2.3 Toxocariasis	14
2.3.1 Aspek zoonosis.....	14
2.3.2 Patogenesis	15
2.3.3 Diagnosis Toxocariasis	17
2.4 Antigen Parasit	18
2.4.1 Aspek biologi antigen parasit.....	18
2.4.2 Antigen cacing <i>Toxocara</i>	19
2.5 Antibodi.....	22
2.6 Metode <i>Westren blot</i>	23
BAB 3 MATERI DAN METODE.....	25
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	25
3.2 Peralatan Penelitian.....	25
3.3 Bahan Penelitian.....	25
3.4 Metode Penelitian.....	26
3.4.1 Isolasi L2 telur infeksiif dan cacing dewasa.....	26

3.4.2 Pembuatan E-S antigen <i>T. cati</i>	27
3.4.3 Pembuatan <i>somatic</i> antigen <i>T. cati</i>	27
3.4.4 Pembuatan <i>intestine</i> antigen <i>T. cati</i>	28
3.4.5 Pembuatan antibodi poliklonal pada mencit	29
3.4.6 Analisis dengan teknik SDS-PAGE	30
3.4.7 Analisis dengan <i>semi dry blotting</i>	31
3.4.8 Blotting.....	31
3.4.9 Bagan metode penelitian	32
BAB 4 HASIL PENELITIAN	33
4.1 Isolasi larva stadium kedua <i>T. canis</i>	33
4.2 Hasil peneraan kadar protein homogenat <i>T. cati</i>	34
4.3 Hasil Karakterisasi protein dengan <i>Westen blot</i>	34
BAB 5 PEMBAHASAN	37
5.1 Isolasi larva stadium <i>T. canis</i>	37
5.2 Peneraan kadar protein antigen <i>T. cati</i>	37
5.3 Hasil Analisisprotein dengan <i>Western blot</i>	39
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	41
6.1 Kesimpulan.....	41
6.2 Saran.....	41
RINGKASAN	42
DAFTAR PUSTAKA	44
LAMPIRAN	49

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.2 Kadar protein Homogenat <i>Toxocara cati</i>	34
4.3 Hasil Karakterisasi protein dengan <i>Western blot</i>	36

DAFTAR GAMBAR

Gambar		Halaman
2.1	a. Identifikasi cacing <i>Toxocara cati</i> dewasa.....	7
	b. Bagian anterior dari cacing <i>Toxocara cati</i> dewasa	7
2.2	Siklus hidup <i>Toxocara cati</i>	9
2.3	a. Identifikasi cacing <i>Toxocara canis</i> dewasa.....	11
	b. Bagian anterior dari cacing <i>Toxocara canis</i> dewasa.....	11
2.4	Siklus hidup <i>Toxocara canis</i>	15
4.1	Hasil identifikasi telur cacing <i>T. canis</i> dan perkembangannya mencapai L ₂	33
4.3	Hasil analisis protein <i>T. cati</i> dengan serum anti <i>T. canis</i> dengan teknik <i>Western blot</i>	35

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Bioanalitik (Penghitungan kadar Protein).....	50
2. Cara kerja SDS- PAGE.....	51
3. Penghitungan persamaan regresi pada marker <i>Western blot</i>	53
4. Teknik Gradien Preparasi.....	55
5. Gambar alat-alat penelitian.....	56

SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG

APS	= Amonium Persulfat
BM	= Berat Molekul
Cm	= centimeter
Da	= Dalton
ELISA	= enzyme-linked immunosorbent assay
E-S	= excretory secretory
gr	= Gram
IgA	= Imonoglobulin A
IgD	= Imunoglobulin D
IgE	= Imunoglobulin E
IgG	= Imunoglobulin G
IgM	= Imunoglobulin M
kDa	= KiloDalton
L₁	= Larva stadium kesatu
L₂	= Larva stadium kedua
L₃	= Larva stadium ketiga
L₄	= Larva stadium keempat
mA	= mili ampere
ml	= mili liter
mm	= mili meter
OLM	= Ocular Larva Migrans
PBS	= Phospat Buffer Saline
PVDF	= Polyvinylidene difluorid
rpm	= rotation per minute
SDS-PAGE	= Sodium Deodecyl Sulphate Poliacrilamid Gel Electroforesis
TBS	= Tris Buffer Saline
<i>T.canis</i>	= <i>Toxocara canis</i>
<i>T.cati</i>	= <i>Toxocara cati</i>
TEMED	= Tetrametil etilendiamin
VLM	= Vascular Larva Migrans
V	= Volt
WB	= Western Blot
>	= Lebih besar
%	= Persen
µg	= Mikro gram
µl	= Mikro liter
°	= Derajat
±	= kurang lebih

BAB 1

PENDAHULUAN

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang penelitian

Toxocariasis adalah penyakit yang disebabkan oleh cacing dari genus *Toxocara*. Terdapat tiga spesies cacing dari genus *Toxocara*, yaitu *T. vitulorum* menyerang anak sapi dan anak kerbau serta pejantannya. *T. cati* menyerang kucing, *T. canis* menyerang anjing. Anak sapi dan kerbau, anjing, dan kucing maupun pejantannya, masing-masing merupakan induk semang definitif bagi ketiga spesies tersebut. *Toxocara* spp tidak saja berbahaya bagi induk semang definitif tetapi juga dilaporkan dapat menginfeksi manusia, sehingga tergolong zoonosis (Uga *et al.* ,1990).

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).

Populasi serta angka kejadian toxocariasis pada kucing dan anjing 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 mempunyai kebiasaan buruk yaitu memasukkan jari-jari tangan ke dalam mulut tanpa mencuci tangan dulu setelah mereka bermain tanah hal ini beresiko besar terinfeksi toxocariasis (Klein, 2005). Penanganan toxocariasis yang disebabkan

oleh cacing *T. cati* maupun *T. canis* perlu mendapatkan perhatian yang khusus, agar dapat mengurangi populasi anjing maupun kucing yang menderita toxocariasis dan resiko penyebarannya pada manusia (Provet, 2002). Cacing *cati* maupun *canis* dapat menginfeksi Anjing maupun Kucing. Hal ini karena sebagian besar jenis parasit sering kali mempunyai profil antigen yang sama (Abdel-Rahman *et al.*, 2000).

Permasalahan yang timbul selama ini adalah bahwa diagnosis toxocariasis berdasarkan gejala klinis sulit untuk dilakukan karena gejala klinis yang timbul sangat bervariasi (Uga *et al.*, 1990).

Diagnosis toxocariasis secara konvensional dengan pemeriksaan feses dari induk semang tranpor sampai saat ini sulit untuk dilakukan. Telur cacing ataupun cacing dewasa dari *T. cati* maupun *T. canis* tidak pernah ditemukan pada sediaan yang diperiksa, karena diagnosis toxocariasis dengan cara pemeriksaan telur cacing pada feses hanya dapat dilakukan pada hospes definitif saja. Sedangkan hospes non definitif seperti anjing maupun kucing betina dewasa, manusia maupun pada hospes *paratenic* lainnya tidak mungkin ditemukan cacing dewasa dalam ususnya, sehingga tidak dapat ditemukan adanya telur cacing *T. cati* maupun *T. canis* di dalam feses. Upaya yang dapat dilakukan untuk mengatasi masalah toxocariasis ini adalah dengan mengembangkan teknik diagnosis yang lebih sensitif terhadap infeksi *T. cati* maupun *T. canis*, yaitu dengan melakukan diagnosis toxocariasis dengan pemeriksaan imunologis atau serologis.

Berdasarkan respons imun yang ditimbulkan dari infeksi toxocariasis tersebut, maka antibodi yang dihasilkan oleh sel imun tubuh bersifat spesifik, sehingga dapat dideteksi secara imunologis yaitu dengan melihat ikatan antara antigen antibodi dalam serum penderita.

Western blot ini digunakan untuk ekspresikan protein yang kemudian direaksikan dengan antibodi, campuran antigen dan digunakan untuk membedakan reaksi silang.

Tidak hanya reaksi silang antigenik yang harus dipertimbangkan, tetapi reaksi-silang antara dan di dalam filum cacing merupakan masalah yang lebih penting dalam imunodiagnosis. Hal ini merupakan sebab utama mengapa hanya relatif beberapa asai imunodiagnostik saja yang sekarang ini digunakan dalam infeksi cacing. Reaksi-silang antara parasit dari filum yang sama adalah paling menyulitkan karena banyak sekali BM yang sama sehingga sulit untuk diambil yang bersifat spesifik. Sebagai contoh, dalam kelompok yang paling beragam, yaitu nematoda (Burgess, 1995).

Walaupun banyak antigen yang sama dari sejumlah besar cacing, para peneliti mulai mengembangkan teknik ELISA dan *Western blot* untuk diagnosis infeksi cacing dengan menggunakan antigen yang diperoleh dari bagian khusus parasit tersebut. Sebagai contoh, ekskresi/sekresi (E-S), *somatic* dan *intestine* antigen. Reaksi-silang di antara banyak cacing benar-benar merupakan sumber bahan untuk diagnosis infeksi cacing lain yang pengumpulan bahan antigeniknya sulit (Burgess, 1995).

Berdasarkan latar belakang yang ada maka penelitian ini mencoba untuk mengetahui apakah terjadi reaksi silang antara *somatic, excretory secretory* dan *intestine* antigen *T. cati* dengan menggunakan serum anti *T. canis*. Hasil tersebut diharapkan dapat dikembangkan sebagai bahan uji spesifik diagnosis toxocariasis.

1.2 Rumusan Masalah

Dari uraian latar belakang di atas maka masalah penelitian yang dapat dirumuskan adalah, apakah terdapat reaksi silang antara serum anti *T. canis* terhadap antigen *T. cati* dengan melalui teknik *Western blot*?

1.3 Landasan teori

Cacing *cati* maupun *canis* dapat menginfeksi Anjing maupun Kucing. Hal ini karena sebagian besar jenis parasit sering kali mempunyai profil antigen yang sama (Abdel-Rahman *et al.*, 2000). Tetapi pada hasil pemeriksaan Toxocariasis secara konvensional tidak pernah di ketemukanya cacing dewasa pada hospes non definitif, maka perlu di lakukan uji serologis atau imunologi (Kusnoto, 2003).

Uji Toxocariasis secara serologis atau imunologis dengan menggunakan antigen dapat berasal dari tubuh cacing (*somatic, intestine*) atau cairan yang dikeluarkan cacing, misalnya *excretory secretory*. Menurut (Takeshi agatsuma *et al.*, 2007) bahwa E-S *T. canis* dengan *T. cati* mempunyai berat molekul antigen yang sama yaitu 57 kDa. Sedangkan *Intestine* antigen *T. cati* maupun *T. canis* juga terdapat kesamaan yaitu pada BM 55,5 kDa.

Karena siklus hidup cacing *Toxocara* yang kompleks dan rumit serta adanya persamaan antigen *T. cati* dengan *T. canis* maka perlu diadakan identifikasi lebih lanjut sampai tingkat spesies, sehingga perlu dilakukan reaksi silang.

1.4 Tujuan penelitian

Penelitian yang dilakukan ini bertujuan untuk mengetahui dan memperoleh reaksi silang *somatic*, *excretory secretory* dan *intestine* antigen *T. cati* dengan serum anti *T. canis*.

1.5 Manfaat penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan memberikan informasi ilmiah mengenai reaksi silang antara *somatic*, *excretory secretory* dan *intestine* antigen *T. cati* dengan serum anti *T. canis* yang selanjutnya dapat digunakan sebagai dasar diagnosis toxocariasis secara serologis atau imunologis.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Toxocara cati*

2.1.1 Klasifikasi

Klasifikasi cacing *Toxocara cati* menurut Kusumamihardja (1993) adalah sebagai berikut

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

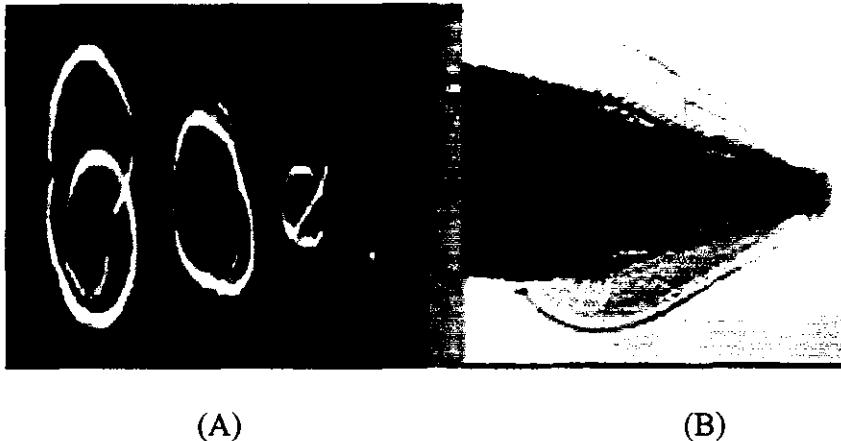
Sinonimnya *Toxocara mystax* (Levine, 1994)

2.1.2 Morfologi dan habitat

Cacing *T. cati* ini mempunyai habitat di usus halus anak kucing , kucing jantan dewasa, selain itu dapat ditemukan pada *felidae* lain dan *mustelidae*. *T. cati* juga mempunyai induk traspur yaitu cacing tanah, kecoa, ayam, anak kambing dan tikus (Levine, 1994).

Cacing jantan *T. cati* memiliki panjang antara 3-6 cm, spikula *unequal* dengan panjang 1,63-2,08 mm. Pada cacing betina panjangnya antara 4-10 cm. Ukuran

telur *T. cati* adalah 65-75 mikron, berbentuk agak bulat dan sub globular. Cacing *T. cati* ini memiliki *cervical alae* yang sangat lebar dengan garis-garis kutikuler yang sangat berdekatan (Soulsby, 1989; Kusumamiharja 1993).



Gambar 2.1 (A) Cacing *T. cati* dewasa (B) Bagian anterior dari cacing *T. cati* dewasa (Provet Healthcare Information, 2002)

2.1.3 Siklus Hidup dan Penularan *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).

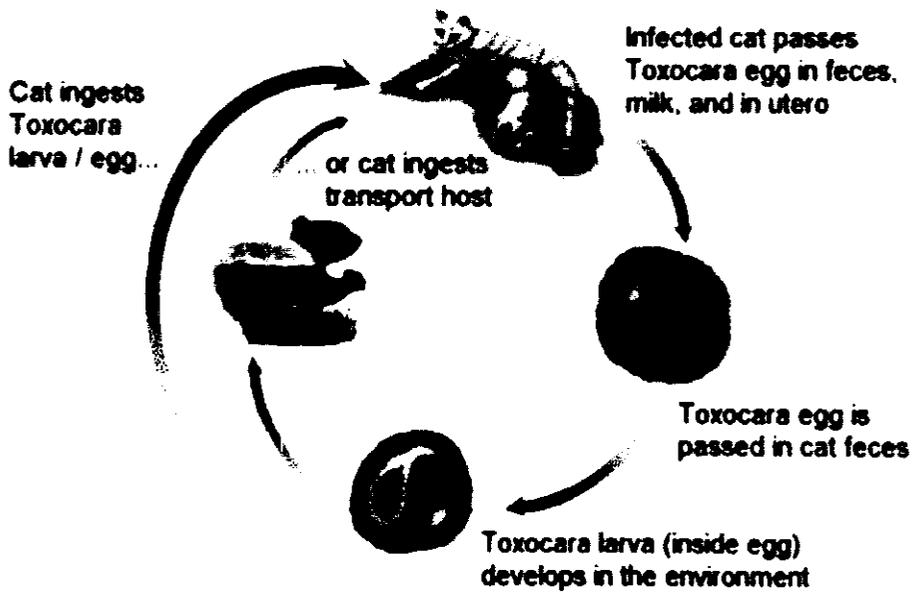
Siklus hidup cacing *T. cati* dimulai dari dikeluarkannya telur berembrio oleh cacing betina dewasa bersamaan dengan dikeluarkannya feses anak kucing berumur kurang dari 6 bulan, maupun kucing jantan dewasa yang menderita toxocariasis. Telur yang berembrio akan berkembang menjadi larva pertama (L_1) dalam tujuh hari, kemudian dari tahapan larva pertama akan berkembang lagi menjadi larva (L_2) yang merupakan telur infektif 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 infektif 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) akan terjadi *visceral larva migran* (VLM) serta menetap di dalam jaringan organ dalam maupun organ somatic. 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). *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* (Pappas P.W and Wardrop, 2008)

2.2 *Toxocara canis*

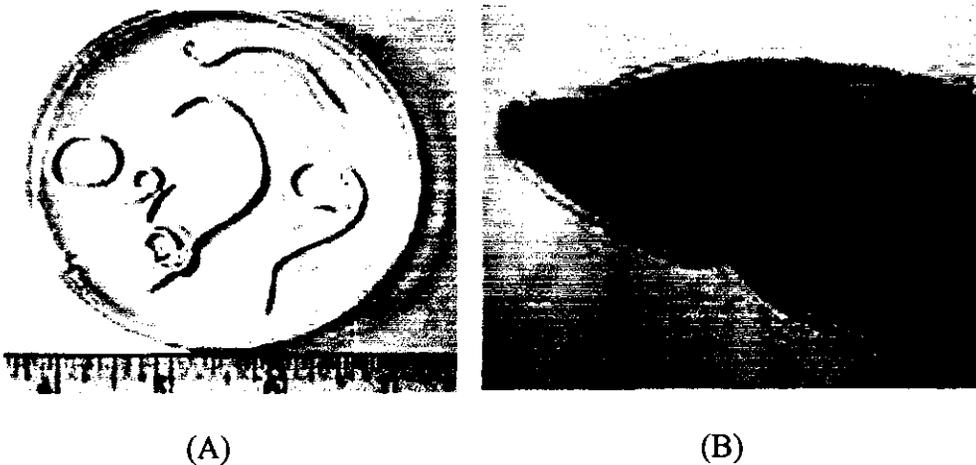
2.2.1 Klasifikasi

Klasifikasi cacing *Toxocara canis* menurut Soulsby (1986), adalah sebagai berikut

Phylum	: Nematelminthes
Kelas	: Nematoda
Sub klas	: Secernentea
Ordo	: Ascaridida
Super famili	: Ascaridoidea
Famili	: Ascarididea
Genus	: <i>Toxocara</i>
Spesies	: <i>Toxocara canis</i>

2.2.2 Morfologi dan habitat

Cacing *T. canis* mempunyai habitat di usus halus anjing dan serigala (Gillespi, 1998). Panjang cacing jantan kurang lebih 10 cm sedangkan cacing betina kurang lebih 18 cm (Subekti dkk, 2006). Cacing *Toxocara canis* mempunyai ciri khusus yaitu mempunyai *cervical alae* yang agak lebar, tubuh bagian anterior yang membengkok ke arah ventral. Organ kelamin betina meluas ke anterior dan posterior dan berakhir pada vulva. Pada posterior cacing jantan terdapat *terminal tail* (ekor), *caudal alae* dan spikula. Telur *T. canis* berbentuk sub globular, berkulit tebal, berukuran 90 x 75 mikron (Soulsby, 1986).



Gambar 2.3 (A) Cacing *T. canis* dewasa (B) Bagian anterior dari cacing dewasa *T. canis* (Provet Healthcare Information, 2002).

2.2.3 Siklus hidup dan cara penularan

Telur yang keluar bersama feces berkembang menjadi larva stadium II (telur infeksi) dalam waktu 10-15 hari, tetapi tidak menetas. Siklus hidup *Toxocara canis* adalah kompleks tergantung dari umur induk semang, kemungkinan infeksi meliputi *prenatal transmission (trans uterine)*, *lactogenic transmission (colostral)*, *direct transmission (tracheal migration)* dan bisa *paratenic host transmissi* (Subekti dkk, 2006).

Tracheal migration umumnya terjadi pada anjing umur kurang lebih tiga sampai enam bulan. Apabila anjing menelan telur infeksi maka telur akan menetas menjadi larva kedua (L2) di usus, L2 kemudian menembus dinding usus melalui pembuluh darah di limfe sampai *glandula mesenterika* dan terbawa aliran darah portal menuju hati diperlukan waktu dua hari setelah infeksi, lalu ke jantung, paru-paru, alveoli, bronkioli dan akhirnya sampai pada trakhea, dari trakhea lalu tertelan dan sampai pada lambung kembali pada hari kesepuluh setelah infeksi. Larva ketiga (L3) terjadi di paru-paru, trakhea atau esophagus.

Dalam waktu kurang lebih dua minggu setelah infeksi berkembang dari L3 menjadi larva keempat (L4) di usus halus, kemudian menjadi larva kelima (L5) dan stadium dewasa dicapai antara tiga sampai empat minggu setelah infeksi (Soulsby, 1986). Periode prepaten dicapai dalam waktu empat sampai lima minggu setelah infeksi (Urquhart *et al.*, 1994).

Tipe siklus hidup *T. canis* yang lain adalah *somatic migration*. Tipe ini terjadi pada anjing betina dewasa apabila menelan telur yang infeksi. Di usus telur menetas menjadi L2, pada tipe *somatic migration* ini setelah larva kedua (L2) menembus mukosa usus dan menyebar ke jaringan, L2 tinggal di otot atau jaringan lain (misal hati, paru-paru, ginjal) tidak kembali ke usus, tanpa berkembang lebih lanjut sampai pada saat anjing betina bunting.

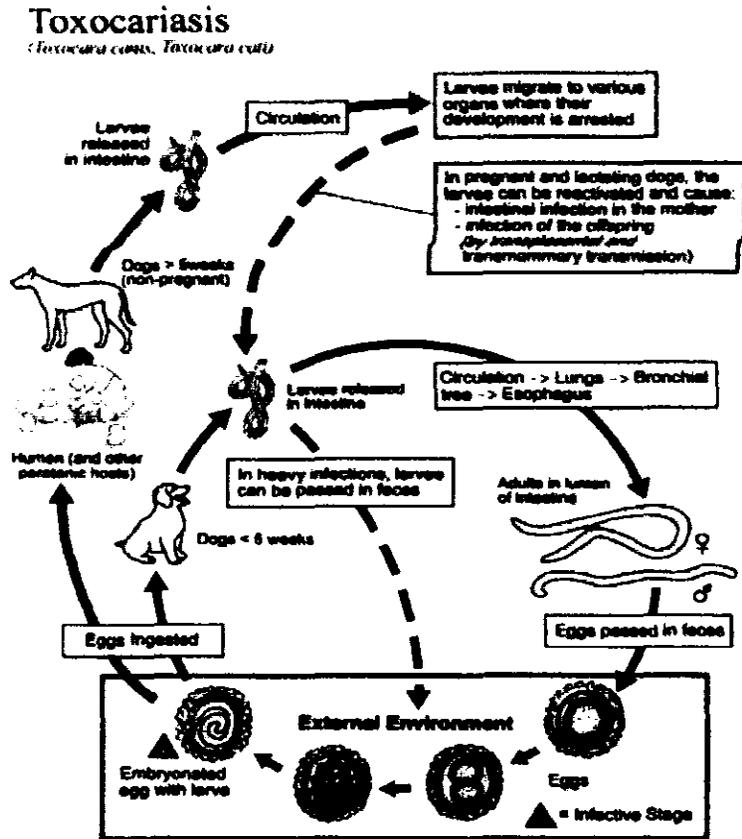
Perkembangan L2 tersebut tidak diketahui dengan jelas, tetapi apabila anjing betina tersebut bunting L2 mengalami migrasi ke uterus kemudian masuk fetus (*prenatal infection*), setelah L2 sampai pada hati fetus, L2 berkembang menjadi larva ketiga (L3), kemudian berkembang lagi menjadi larva keempat (L4) pada minggu pertama setelah fetus lahir, dan larva tersebut ditemukan pada paru dan lambung dari fetus. Larva kelima (L5) terjadi pada akhir minggu kedua setelah lahir, sedangkan cacing dewasa ditemukan pada minggu ketiga setelah kelahiran. Periode prepaten dari *prenatal infection* ini bervariasi antara 23-40 hari setelah lahir (Flynn, 1973; Soulsby, 1986).

Penularan pada anak anjing terjadi melalui air susu (*colostral infection* atau *transmamary infection*) karena pada anjing bunting sebagian larva migrasi keambing dan keluar melalui air susu. Larva yang keluar bersama air susu

tersebut akan menjadi cacing dewasa dalam waktu kurang lebih satu minggu setelah lahir.

Pada waktu induk menyusui anaknya sambil menjilati, apabila terdapat cacing yang belum dewasa keluar bersama tinja anak anjing dan terjilat oleh induk, maka cacing tersebut akan menjadi dewasa dalam waktu tiga minggu (Soulsby, 1986; Subekti dkk, 2006).

Parathenic host transmission terjadi apabila telur infeksi tertelan oleh hospes *parathenic* (seperti tikus dan mencit) dan berkembang menjadi larva kedua (L2) yang tinggal di dalam otot, apabila hospes tersebut termakan oleh anjing maka L2 akan langsung menjadi dewasa dalam waktu tiga minggu tanpa migrasi lagi. Periode prepaten dicapai dalam waktu empat sampai lima minggu setelah infeksi (Urquhart *et al.*, 1994).



Gambar 2.4 Siklus Hidup *T. canis* (Pappas P.W and Wardrop, 2008)

2.3 Toxocariasis

2.3.1 Aspek Zoonosis

Toxocara spp adalah penyebab terjadinya penyakit toxocariasis yang bersifat zoonosis. Toxocariasis yang terdapat pada anjing disebabkan oleh *T. canis*, pada kucing disebabkan oleh *T. cati* dan pada sapi disebabkan oleh *T. vitulorum* (Hubner *et al.*, 2001).

Toxocariasis pada manusia dapat terjadi apabila makanan atau minuman terkontaminasi oleh telur infeksius yang mengandung L2 yang dikeluarkan bersama feses anak anjing, anjing jantan dewasa, anak kucing, kucing jantan dewasa dan anak sapi. Menurut Ito *et al.*, (1986); Alonso *et al.*, (2000); Radman *et al.*, (2000) menyatakan bahwa penularan *Toxocara* spp. juga bisa terjadi dari larva yang berada dalam jaringan induk semang (L2J) maupun air susu.

Kejadian toxocariasis banyak terjadi pada anak-anak kecil hal ini dikarenakan seringnya mereka kontak langsung dengan tanah yang terkontaminasi dengan feses kucing maupun anjing, disamping itu juga karena tingkat kebersihan yang kurang serta makanan atau minuman yang tercemari oleh telur infeksius *Toxocara* spp. Gejala klinis pada anak antara lain batuk, asma, demam, mual dan muntah (Overgaauw, 1997).

2.3.2 Patogenesis

Cacing *Toxocara* spp. dalam usus bersaing dengan induk semang dalam memperoleh makanan, sehingga menyebabkan kerusakan, pembesaran perut yang jelas, gangguan pencernaan, diare dengan konstipasi, muntah dan sebagainya. Apabila massa cacing berjumlah sangat banyak sehingga dapat menyumbat dinding usus menyebabkan dinding usus menjadi sobek dan berakibat pada kematian induk definitif (Levine, 1994).

Kilpatrick (1992), menyatakan bahwa *human toxocariasis* adalah merupakan hasil infeksi dari toxocara anjing dan kucing, yaitu *T. canis* dan *T. cati* atau mungkin dari species toxocara lain.

Visceral larva migran (VLM), Larva yang bermigrasi dapat masuk ke setiap organ, termasuk organ otak sehingga menimbulkan tanda klinis tergantung dimana tempat predileksinya (Levine, 1994), sedangkan tertelannya telur infeksi yang kemudian menetas menjadi larva menembus mukosa kemudian mencapai paru-paru melalui sistem portal sehingga menyebabkan reaksi hipersensitifitas didalamnya dan akibat tingginya Ig E dapat menyebabkan pneumonitis yang serius (Stites *et al.*, 1997). *Visceral larva migran* sering terjadi pada anak-anak usia 1-4 tahun, namun tidak menutup kemungkinan juga terjadi pada manusia dewasa. Gejala klinis yang dapat ditimbulkannya, antara lain: demam, sakit abdominal, sakit kepala, anorexia, berat badan menurun, batuk, sesak nafas, pruritus, *leucocytosis*, *hepatosplenomegaly* dan *hypereosinophilia*. Kematian dapat terjadi akibat gejala VLM pada jantung, syaraf atau paru-paru, namun kejadian tersebut jarang terjadi (CDC, 2004; Logar *et al.*, 2004; Nash 2006)

Menurut Rayes *et al.*, (2001) infeksi cacing *Toxocara* spp dengan larva migran melalui jaringan merupakan salah satu predisposisi penyebab *pyogenic liver abses*, khususnya di daerah tropis yang banyak terdapat parasit ini.

Larva *Toxocara* dapat bermigrasi hingga mencapai mata dan menimbulkan gejala yang disebut dengan *Ocular Larva Migrans (OLM)*. *Ocular larva migrans* biasanya terjadi pada anak-anak usia 7-8 tahun. *Ocular* infeksi kadang-kadang dapat didahului atau terjadi bersamaan dengan bentuk visceral. Keberadaan larva dalam mata dapat menimbulkan kerusakan yang bersifat progresif, sehingga dapat menyebabkan menurunnya kemampuan penglihatan atau bahkan terjadinya kebutaan. Gejala-gejala yang timbul akibat OLM antara lain *uveitis*, *posterior* dan

peripheral retinochoroiditis, vitritis, endophthalmitis, papilitis dan *strabismus* (paling sering terjadi). Endophthalmias yang disebabkan oleh larva *Toxocara* sering dikelirukan dengan retinoblastoma, sehingga pada akhirnya dilakukan operasi pengangkatan bola mata. Bagian dari mata yang sering terinfeksi oleh OLM adalah retina bagian perifer dan *vitreous*. Infeksi pada OLM pada umumnya bersifat unilateral dan tanpa disertai adanya gejala-gejala sistemik dan eosinophilia (CDC, 2004; Logar *et al.*, 2004; Nash 2006).

Berdasarkan lokasi lesi yang ditimbulkan akibat larva *Toxocara* spp dapat terjadi pada posterior fundus, perifer fundus atau keduanya, juga dapat terjadi *papillary oedema (redness)*, lesi *chorioretinal* dan *traction retinal detachment*. Pada *traction retinal detachment* dari makula yang penampakannya diawali dengan uveitis, disebabkan karena peradangan akibat respon terhadap larva *Toxocara* spp (Park *et al.*, 1999).

2.3.3 Diagnosis Toxocariosis

Diagnosis Toxocariosis dapat dilakukan dengan metode konvensional yaitu dengan memeriksa telur cacing pada feses, namun diagnosis secara konvensional ini hanya dapat dilakukan hanya pada hospes definitif saja, sedangkan pada hospes *parathenic* yang termasuk manusia, telur cacing tidak dapat ditemukan. Hal ini terjadi karena pada hospes tersebut, cacing tidak pernah menjadi dewasa dan hanya berbentuk Larva Dorman (Warren, 1993).

Diagnosis toxocariosis yang lain yaitu dengan berdasarkan gejala klinis, tetapi hal ini sulit untuk dilakukan karena gejala yang ditimbulkan toxocariosis

sangat bervariasi, tidak spesifik, dan organ yang diinvansi berganti-ganti (Uga *et al.*, 1990; Prokopowicz and Sosnowska, 1990).

Diagnosis lain melalui pemeriksaan serologik diperlukan untuk mendeteksi toxocariosis pada hospes transpor (Petithory *et al.*, 1994). Beberapa metode yang dapat digunakan untuk imunodiagnosis pada infeksi nematoda adalah : 1) uji aglutinasi cepat; 2) imunodifusi; 3) imunoelektroforesis; 4) ELISA 5) imunoblotting; 6) imunohistokimia (Warren, 1993).

2.4 Antigen Parasit

2.4.1 Aspek biologi antigen parasit

Secara umum, pengertian antigen adalah substansi yang dapat dikenali sebagai benda asing (*non self*) oleh sistem imun tubuh. Antigen adalah benda asing yang diukur berdasarkan keberhasilan dalam mengikat antibodi. Adapun imunogen, merupakan bagian dari antigen, diukur berdasarkan kemampuan memicu imun adaptif untuk menghasilkan antibodi (Abbas *et al.*, 2000). Pada umumnya, molekul yang bersifat imunogen adalah apabila terjamin keasingannya dan mempunyai BM > 5 kDa. Pada molekul yang lebih kecil, dapat menjadi imunogenik apabila terikat pada makromolekul sebagai karier (Tizards, 1982; Manus, 1986). Respon imun juga dipengaruhi oleh tingkat solubilitas protein antigen. Antibodi hanya akan mengikat pada bagian khusus makromolekul, yang kemudian dipakai sebagai penentu antigenik (*epitope*). Pada satu makromolekul mungkin terdapat sejumlah epitop yang masing-masing akan berikatan dengan antibodi yang sesuai (Abbas *et al.*, 2000).

Berbagai jenis antigen yang berasal dari parasit dapat diperinci berdasarkan sumber dan lokasi parasit, maupun populasi dan siklus hidup parasit. Berdasarkan sumber dan lokasi antara lain terdiri dari: 1) exoantigen terlarut, berasal dari parasit hidup atau parasit dalam media buatan merupakan produk ekskresi berupa metabolik; 2) somatik antigen terlarut, berasal dari cacing stadium dewasa atau larva yang hancur atau dari sel permukaan tubuh parasit; 3) parasit yang mati atau fragmen-fragmen tubuhnya; 4) parasit yang hidup secara utuh; 5) cairan tubuh nematoda; dan 6) cairan kista larva cacing pita. Adapun berdasarkan stadium dan siklus hidup parasit antara lain terdiri dari: 1) spesifikasi genus, spesies, strain dan stadium hidup; dan 2) parasit yang mengalami perubahan bentuk (Tizard, 1982; Page *et al.*, 1991; Warren, 1993; el-Massry, 1999).

Antigen yang berasal dari parasit akan menjadi imunogenik apabila dikenali sebagai *non self* dengan BM tertentu. Secara kimiawi, zat imunogen parasit dapat berupa protein, lipida, karbohidrat, glikoprotein dan glikolipida. Masing-masing komponen kimiawi tersebut mempunyai karakteristik ukuran, susunan rantai dan jumlah determinan yang mungkin berbeda (Anders, 1982).

2.4.2 Antigen cacing *Toxocara* spp

Cacing genus *Toxocara* spp yang selama hidupnya mengalami beberapa generasi memiliki perangkat antigen yang berbeda-beda, hal ini dimanfaatkan agar terhindar dari sistem imun hospes. Adanya perbedaan stuktur morfologi pada berbagai generasi tersebut menyebabkan perbedaan imunogenisitas dalam memicu terbentuknya antibodi (Warren, 1993).

Mengingat siklus hidup yang kompleks dari *Toxocara* spp, maka pengamatan terhadap protein antigen cacing tersebut dilakukan terhadap telur, larva pada berbagai stadium (L1, L2, L3, L4) dan cacing dewasa. Pada telur cacing, protein antigenik dapat diperoleh pada kulit telur (*egg shell*), membran vitelina (*vitelline membrane*) dan granular layer (Abdel-Rahman *et al.*, 2000). Adapun pada stadium larva dan dewasa yang paling sering digunakan adalah E-S antigen, disamping itu juga ada beberapa sumber antigen yang terpakai, misalnya: antigen somatik (el-Massry, 1999), *surface antigen* (Bowman *et al.*, 1987), ekstrak larva (Starke *et al.*, 1996).

Protein yang telah banyak diamati adalah protein antigen *T. vitulorum* dan *T. canis*, sedangkan *T. cati* belum banyak dilakukan. Abdel-Rahman *et al.*, (2000), telah melakukan pengamatan terhadap telur *T. vitulorum* dengan teknik imunoblotting didapatkan protein dengan komponen 240 kDa dan 206 kDa yang dapat dikenali oleh antibodi anti-cacing dewasa, namun spesifisitasnya rendah karena dapat dikenali pula oleh antibodi anti-cacing dewasa *Fasciola gigantica* dan *Moniezia expansa*.

Berdasarkan hasil identifikasi protein dengan teknik *Western blot* menggunakan antibodi poliklonal anti L₂ *T. cati* didapatkan tiga macam protein, antara lain dengan BM 133,7 kDa; 30,3 kDa; dan 24,0 kDa. Bendryman (2008) yang mengutip dari (Starke *et al.*, 1996) dengan teknik *Western blot* antigen *Fasciola gigantica* dapat di deteksi dengan anti L₂ antisera *T. cati* pada BM 133 kDa. Fakta ini mengindikasikan bahwa larva infeksiif dapat digunakan sebagai sumber protein dengan imunogenitas dan antigenitas tinggi, namun demikian

perlu uji lanjutan untuk memperoleh antigen spesifik yang dapat digunakan sebagai uji imunodiagnostik untuk Toxocariasis dengan sensitifitas dan spesifitas yang tinggi.

Pengamatan terhadap antigen permukaan (*surface antigen*) kutikula dan antigen E-S dari larva infeksi *T. canis* dengan teknik *Western blot* didapatkan reaksi silang antara antibodi terhadap *T. canis* dan *T. cati* dengan protein pada BM sekitar 200 kDa, sedang yang lebih spesifik kira-kira pada BM 80 Kda (Bowman *et al.*, 1987).

Pada penelitian sebelumnya disebutkan bahwa BM 30,3 kDa menunjukkan pita reaksi antara antigen L1, L2 dan L2 jaringan dengan serum anti *T. cati* dewasa. Berdasarkan hasil penelitian Kusnoto (2003) fraksi protein antigen dengan BM 30,5 kDa berpeluang untuk digunakan sebagai bahan diagnostik toxocariasis baik pada hospes definitif maupun hospes aberan.

Berdasarkan karakterisasi protein E-S larva stadium kedua dorman cacing *Toxocara canis* sebelumnya sudah dianalisis dengan Teknik SDS-PAGE oleh Koesdarto (2006), kemudian dilanjutkan dengan teknik *Western blot* sehingga didapatkan delapan pita protein spesifik dengan BM 62,4 kDa; 46,6 kDa; 43,1 kDa; 37,3 kDa; 30,1 kDa; 24,4 kDa; 19,4 kDa; dan 10,7 kDa. Hal tersebut menunjukkan bahwa ke delapan protein itu merupakan protein spesifik *T. canis* yang bersumber dari L₂ *dorman*.

2.5 Antibodi

Antibodi adalah protein imunoglobulin yang disekresikan oleh sel B yang teraktifasi oleh antigen. Sifat khasnya adalah pada kondisi fisiologis berikatan dengan bahan (antigen) yang menyebabkan pembentukannya (Tizard, 1988).

Antibodi merupakan protein serum terlarut yang dihasilkan akibat adanya imunogen yang beredar di seluruh jaringan dan sirkulasi darah. Antibodi tersebut berupa imunoglobulin (Ig) yang mempunyai struktur *gamma globulin (γ-globulin)* dalam serum, karena berbentuk sferis atau globulin. Molekul antibodi dapat mengenali dan mengendapkan atau menetralkan serangan bakteri, virus atau protein asing dari species lain. Berat molekul antibodi pada umumnya berkisar antara 95 Kda – 150 kDa yang tergantung pada kelasnya. Macam antibodi atau imunoglobulin secara umum terdiri dari M (makroglobulin), G, A, D, dan E (Roitt *et al.*, 1998).

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).

Fungsi antibodi secara umum antara lain: 1) mengikat antigen; 2) Berinteraksi dengan jaringan hospes dan sistem efektor untuk fasilitas penolakan imunogen. Dalam melaksanakan fungsinya antibodi lebih sering dibantu oleh efektor lain, misalnya komplemen, fagosit dan sel sitotoksik (Roitt *et al.*, 1998).

2.6 Metode *Western blot*

Teknik *Western blot* merupakan teknik pemindahan makromolekul dari medium gel ke atas membran setelah proses elektroforesis. Tujuannya yaitu untuk mendapatkan protein antigenik yang lebih spesifik. Metode ini sangat efektif untuk mendeteksi antigen yang mempunyai ukuran kecil dalam larutan yang banyak mengandung protein. Antibodi yang digunakan dalam teknik ini harus mempunyai spesifikasi tinggi dan memiliki daya ikat yang stabil, misalnya berupa antibodi monoklonal. Teknik *Western blot* juga menggunakan membran nitroselulose untuk transfer protein. Membran nitroselulose mempunyai keunggulan dari membran yang lain yaitu mudah digunakan dan mempunyai kapasitas ikatan yang tinggi. Membran nitroselulose yang baru tahan terhadap aliran yang tinggi dan tidak mudah rapuh (Rantam, 2003).

Keuntungan metode *Western blot* adalah membran nitroselulose setelah direaksikan dengan substrat, pencucian, dan pereaksi dengan antibodi dapat disimpan beberapa bulan. Selain itu juga dengan metode ini mudah dilakukan pengecatan protein, *autoradiography*, *calorimetric* pada uji enzim dan *ligand binding assay*. Prinsip kerja dari *Western blot* yaitu protein yang mempunyai berat molekul beragam, pertama dianalisis dengan SDS-PAGE, sehingga protein dengan berat molekul yang berbeda akan terpisah pada area gel (Fatchiyah dkk, 2006). Kemudian dilanjutkan dengan mentransfer susunan protein yang terpisah tersebut dari gel ke membran nitroselulose yang sesuai dan akhirnya di label dengan antibodi (Rantam, 2003). Ikatan yang terjadi antara protein antigenik dengan antibodi divisualisasikan dengan pewarnaan yang diinginkan seperti *fast*

red atau *western blue* sehingga dapat diketahui informasi berat molekul dan jumlah protein yang spesifik (Harlow dan Lane, 1998).

BAB 3

MATERI DAN METODE

BAB 3 METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan bulan September 2007 sampai Mei 2008. Bertempat di Laboratorium Helmintologi Departemen Parasitologi Veteriner, Laboratorium *Helminthiasis, Tropical Disease Center* Universitas Airlangga Surabaya.

3.2 Peralatan Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain mikroskop *inverted*, mikroskop cahaya, mikroskop *dissecting*, gunting bedah, *scalpel*, pinset, nampan plastik, penyemprot, cawan petri, tabung reaksi, corong, mortar, jarum, *sput disposable*, sonde, filter ukuran 1mm, sentrifus, *object glass, cover glass, baker glass, microtube*, tabung konikal, pipet plastik, pipet eppendorf, inkubator, freezer, sonikator, gelas ukur. *Chamber* untuk running SDS-PAGE, membran nitroselulose, *electrophoresis equipment* (SDS-PAGE), *trans blotter* (Bio-red), kertas *Whatmann, Waterbath Shaker* (Sibata WS120 Japan).

3.3 Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan adalah homogenat dari hasil *somatic cacing* dewasa *T. cati*, gerusan *intestine cacing* dewasa *T. cati*, E-S dari hasil inkubasi cacing *T. cati* dewasa. cacing *T. canis* dewasa diperoleh dari tempat pemotongan anjing di daerah Surabaya, sedangkan *T. cati* diperoleh dari beberapa kucing yang

menderita toxocariasis. Bahan kimia yang digunakan antara lain *aquadest*, *Phospat Buffer Saline* (PBS) Tween 10%, kloroform, kaporit 0,5%, formalin 10%, larutan sukrosa dengan beberapa konsentrasi dan warna, larutan tripsin, eter.

Bahan untuk analisis protein dengan teknik SDS-PAGE adalah: Larutan penyangga elektroforesis terdiri dari Tris aminomethan (Sigma) 30,29 g, Glisin 144,13 g, SDS (Bio-rad) 10 g dalam 1000 ml *aquadest*. Larutan penyangga *stacking gel* 6 % terdiri dari *Acrylamide* (Merk) 0,66 ml, Tris-HCl (Promega) pH 6,8, SDS 10% 0,8 ml, *aquadest* 0,8 ml, TEMED (Bio-rad) 4 μ l, Amoniumpersulfat (Promega) 10% 20 μ l. Larutan penyangga *separating gel* 15 % pH 8 (*Acrylamide* 3,125 ml; Tris HCl pH 8,8 1,2 ml; SDS 10% 1,2 ml; *aquadest* 1,1 ml; TEMED 5 μ l; Amoniumpersulfat 10 % 30 μ l, Sampel, Larutan penyangga *Laemmli* pH 6,8 (Tris-HCl pH 6,8 1,0 ml; gliserin 0,8 ml; SDS 10 % 1,6 ml; *bromfenolblue* (Bio-rad) 0,5% 0,4 ml; merkaptetanol 5%; *aquadest* 3,8 ml).

Bahan untuk teknik *Western blot* yaitu: Gel PAGE yang mengandung protein. Buffer transblot (Tris aminomethan 15,15 g, Glisin 72 g, Metanol 1000 ml dan ditambahkan 5000 ml *aquadest*, HCl pH 6,8), cremer 4%, antibodi poliklonal, konjugat (Sigma), DAB 10%.

3.4 Metode Penelitian

3.4.1 Isolasi L₁ Telur Infektif dari Cacing Dewasa *T. canis*

Telur cacing yang diperoleh dari cacing *T. canis* dewasa dan feses penderita kemudian dimurnikan dengan teknik *preparation of gradients*. Selanjutnya telur cacing diidentifikasi, kemudian dipupuk dalam media PBS pada suhu kamar

selama 10 hari untuk memperoleh larva pertama (L1) dan 28 hari untuk memperoleh larva kedua (L2).

3.4.2 Pembuatan E-S (*Excretory secretory*) antigen *T. cati*

Pembuatan *excretory secretory* dilakukan dengan menginkubasikan cacing *Toxocara cati* dewasa dalam PBS pada suhu inkubator 37°C selama tiga hari. Cacing kemudian disingkirkan dari medium, PBS disaring dengan alat saring ukuran T 200 ($\pm 25 \mu\text{m}$). Filtrat diambil dan disimpan pada suhu -30°C.

Hasil *excretory secretory* yang dihasilkan oleh cacing tersebut kemudian dipadatkan di Laboratorium *Helminthiasis, Tropical Disease Center* dengan cara di sentrifuge dengan kecepatan 35.000 rpm sampai 40.000 rpm pada suhu -4° C selama 10 sampai 15 menit. Kemudian hasil padatan (Pelet) tersebut dipindahkan ke dalam *microtube* dengan menggunakan pipet mikro kemudian dilabel dan disimpan pada *freezer* dengan suhu -30° C, E-S siap dilakukan analisis protein dengan teknik SDS-PAGE dan selanjutnya teknik *Westren blot*.

3.4.3 Pembuatan homogenat *Somatic* antigen *T. cati*

Cacing dewasa *T. cati* yang sudah dikoleksi dilakukan pembedahan secara manual dengan menggunakan pinset dan gunting bedah yang ujungnya lancip. Tujuan pembedahan cacing ini adalah untuk mengambil intestin dan saluran reproduksinya dimana saluran reproduksinya tersebut berisi telur cacing. *Somatic* antigen ini yang diambil adalah kulit tubuh cacing yang bersih dari *intestine* dan saluran reproduksi (*Kutikula / slontongan*).

Kutikula cacing yang sudah dikoleksi tersebut, kemudian dilakukan penggerusan yang dikerjakan secara manual menggunakan mortar dan ditambah dengan sedikit larutan PBS 10%. Mortar pastele yang digunakan untuk menggerus sebelumnya sudah dicuci dengan alkohol 90% yang berfungsi untuk menghilangkan kontaminasi dari protein yang bukan berasal dari gerusan cacing tersebut, kemudian dibilas dengan *aquadest* dan diinkubasi pada suhu 37° C supaya protein *T. cati* tidak rusak karena pengaruh alkohol.

Hasil gerusan tubuh cacing tersebut, kemudian di sentrifus dengan kecepatan 5000 rpm dalam waktu kurang lebih 5 menit. Kemudian ambil supernatannya dan dipindahkan ke *microtube* untuk dilabel dan disimpan pada *frezeer* dengan suhu -30° C agar sampel tidak mudah rusak. Hasil gerusan tubuh cacing tadi siap dilakukan running dengan teknik SDS-PAGE dan selanjutnya *Western blot*.

3.4.4 Pembuatan homogenat *intestine T. cati*

Cacing dewasa *T. cati* yang sudah dikoleksi dilakukan pembedahan secara manual dengan menggunakan pinset dan gunting bedah yang ujungnya lancip untuk mengambil *intestine*.

Intestin yang dikoleksi tersebut kemudian dilakukan penggerusan secara manual dengan *mortar pastele* yang sebelumnya sudah dicuci dengan alkohol 90% yang berfungsi untuk menghilangkan kontaminasi dari protein yang bukan berasal dari gerusan cacing tersebut, kemudian dibilas dengan *aquadest* dan diinkubasikan pada suhu 37° C supaya protein *T. cati* tidak rusak karena pengaruh alkohol.

Hasil gerusan intestin cacing tersebut, kemudian di sentrifus dengan kecepatan 5000 rpm dalam waktu kurang lebih 5 menit. Cairan bening hasil sentrifus tersebut, diambil dan dipindahkan ke *microtube* untuk dilabel dan disimpan pada *freezer* dengan suhu -30° C agar sampel tidak mudah rusak . Homogenat hasil gerusan intestin cacing *T. cati* siap dilakukan running dengan teknik SDS-PAGE yang kemudian dilanjutkan ke teknik *Western blot*

3.4.5 Pembuatan Antibodi Poliklonal pada Mencit

Antibodi poliklonal dibuat dengan cara menginfeksi telur infeksi yang mengandung larva kedua cacing *T. canis* ke dalam tubuh mencit secara peroral (larva kedua cacing tersebut dimasukan ke spuit kemudian diinfeksi ke mulut mencit). Mencit yang digunakan sebanyak 30 ekor. Mencit diinfeksi dengan dosis 17 telur infeksi/gram berat badan atau sekitar 680 telur infeksi/ekor. Pengambilan darah mencit dilakukan pada hari ke 28 setelah di infeksi, pengambilan dilakukan lewat ekor. Kemudian darah disentrifus pada kecepatan 1500 rpm selama 5 menit untuk mendapatkan serum yang mengandung antibodi poliklonal anti L_2 *Toxocara canis*, kemudian serum disimpan dalam *freezer*. Serum yang digunakan untuk blotting sebanyak 5cc. Serum sebagai antibodi primer yang berikutnya akan direaksikan dengan membran nitrocelulose yang telah mengandung antigen *Toxocara cati* dalam metode *Western blot*.

3.4.6 Analisis Protein dengan Teknik SDS-PAGE

Analisis protein dilakukan dengan teknik *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) dengan komposisi *separating gel* 15 % (3,125 ml *acrylamide* ; 1,2 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8.8 ; 1,2 ml SDS 10%; 1,1 ml *aquadest*, 5 µl TEMED dan 30 µl APS 10 %) dan *stacking gel* 6 % (0,66 ml 30% *acrylamide*; 0,8 ml 0,5 M Tris HCl pH 6,8 ; 0,8 ml SDS 10 % ; 0,8 ml *aquadest*; 4µl TEMED dan 20 µl APS 10%). Setelah larutan *separating gel* 15 % dimasukkan dalam gel *plate* pada posisi vertikal kemudian di atasnya diberi butanol sampai mengeras dan kemudian butanol dibuang. Selanjutnya ditambahkan *stacking gel* 6 % dan setelah itu dimasukkan *comb* dan ditunggu sampai kering. *Plate* berisi gel kemudian dipasang pada Biometra dan dituangkan electrophoresis buffer (30,29 g *Tris aminomethan*; 144,13 g lisin; 10 g SDS dalam 1000 ml *aquadest*) sebanyak 15 µg sampel berupa antigen *cati* ditambah *Laemmli buffer* sama banyak. Kemudian sampel didenaturasi dengan *Laemmli buffer* (pH 6,8 Tris-HCl 1ml, gliserin 0,8 ml, SDS 10% 1,6 ml, *bromofenolblue* 0,5 % 0,4 ml, *merkptoetanol* 5 % 50 µl, *aquadest* 3,8 ml) pada pemanasan 100°C selama 5 menit, kemudian dimasukkan ke dalam sumuran *stacking gel*. Sebagai marker digunakan protein dengan berat molekul pada kisaran 10–200 kDa produksi Fermentas. Electrophoresis dinyalakan dengan tegangan 125 V dan kuat arus 40 mA selama 1 jam.

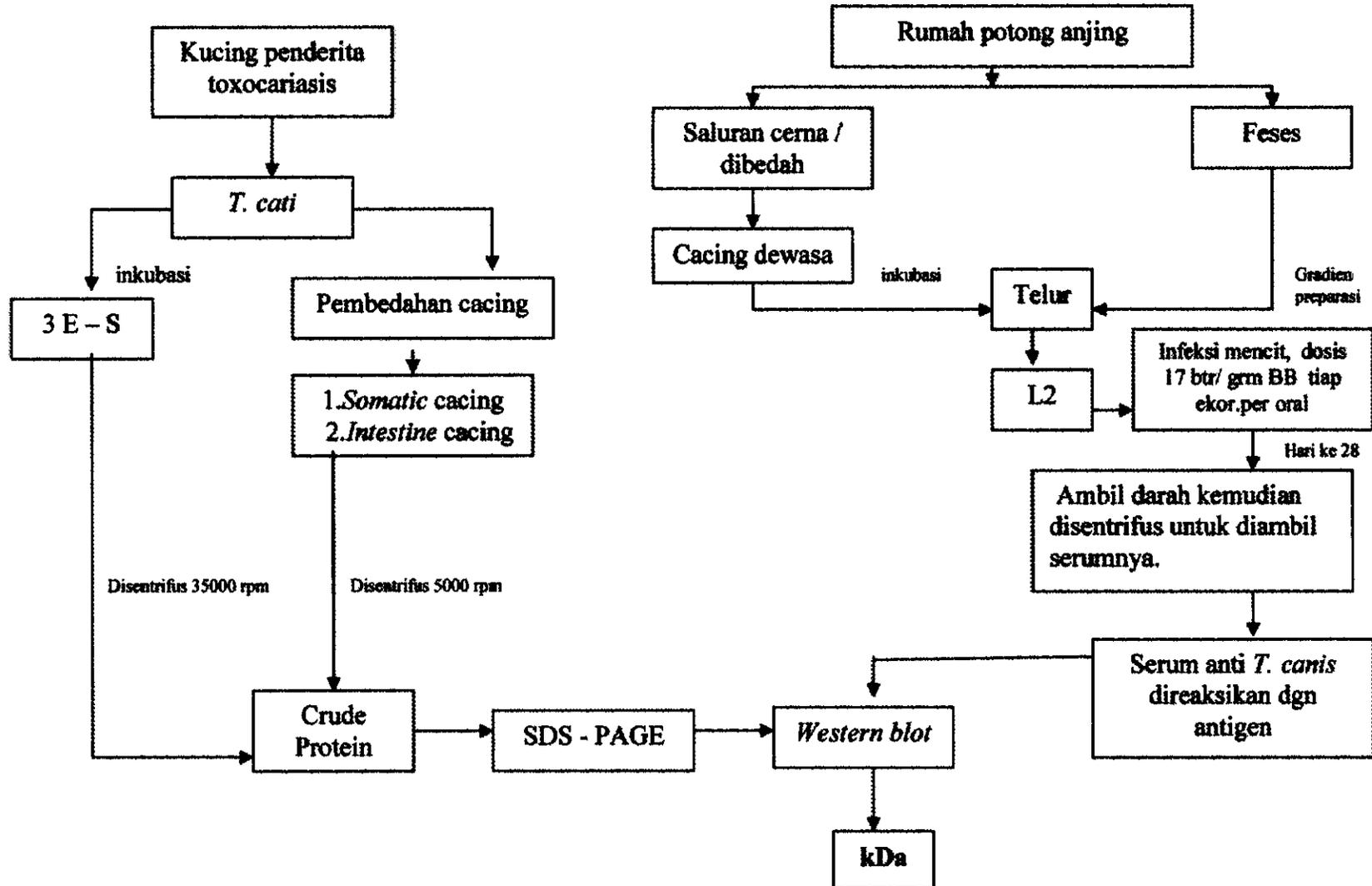
3.4.7 Semi-dry blotting

Protein dari gel kemudian ditransfer ke membran nitroselulose dengan cara memotong kertas saring dan membran nitroselulose sesuai dengan lebarnya gel. Kertas saring direndam terlebih dahulu dalam larutan *trans blot* PH 8,3. Kemudian menyusun kertas saring, membran dan gel dengan urutan dari atas yaitu 5 lembar kertas saring, membran nitroselulose, gel dan 5 lembar kertas saring. Katoda berada di atas dan anoda berada di bawah, selanjutnya dilakukan running dengan tegangan 15 V dan kuat arus 80 mA selama 30 menit. Setelah itu, membran dikeluarkan dan dicuci dalam PBS *Tween* sebanyak tiga kali selama 30 menit. Selanjutnya dilakukan *blotting*.

3.4.8 Blotting

Membran nitroselulose diblok dengan *creamer* 4% kemudian dicuci dengan larutan PBS *Tween*. Direaksikan dengan antibodi poliklonal anti *canis* selama 1,5 jam yang didapatkan dari pengambilan darah mencit yang telah diinfeksi *L₂ T. canis* yang kemudian diencerkan dengan perbandingan 1:100. Setelah itu dilakukan pencucian dengan larutan PBS *Tween*, kemudian ditambahkan konjugat *anti-mouse* lalu dicuci dengan larutan PBS *tween*. Selanjutnya diberi substrat DAB. Akhirnya dikeringkan di udara pada suhu ruang. Penghitungan berat molekul dilakukan dengan membandingkan standart marker.

3.4.9 Bagan Metode Penelitian



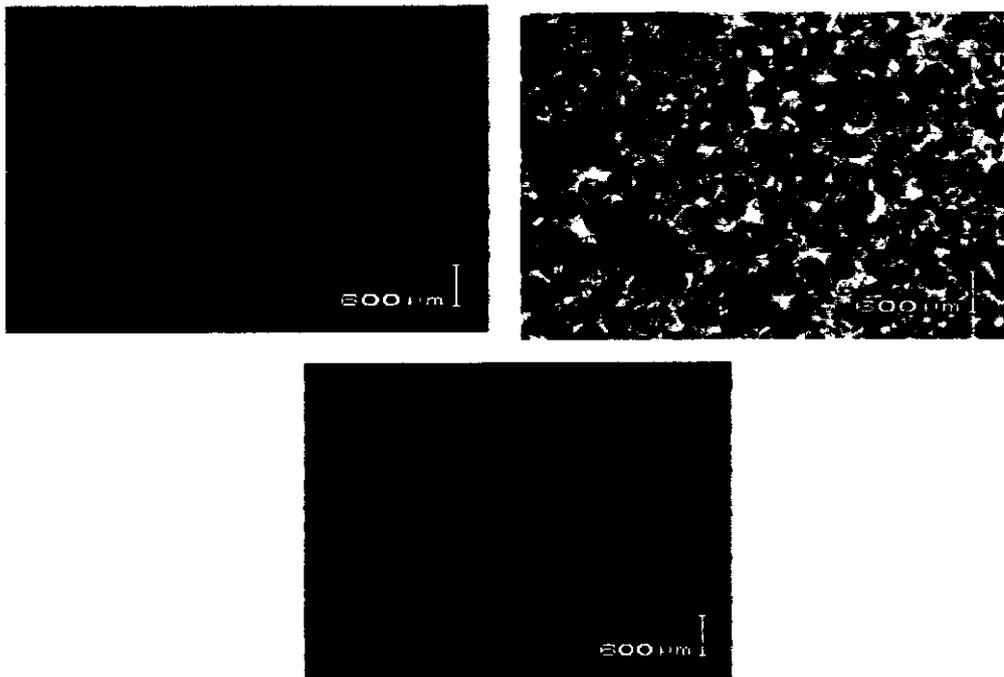
BAB 4

HASIL PENELITIAN

BAB 4 HASIL PENELITIAN

4.1 Hasil Isolasi Larva Stadium Kedua (L₂) *Toxocara canis*

Untuk memperoleh L₂ *T. canis* pada penelitian ini dilakukan isolasi telur cacing baik dari inkubasi cacing dewasa maupun dari feses kucing penderita toxocariosis. Telur kemudian dimurnikan dari feses dengan metode gradien preparasi, selanjutnya dipupuk dalam petridish berisi media PBS pada suhu kamar. Perkembangan telur hingga mencapai L₂ diikuti pemeriksaan dengan mikroskop inverted (M=100x dan 400x). Dua puluh delapan hari pasca pemupukan dilakukan pemanenan L₂, seperti tampak pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Hasil identifikasi telur cacing *T. canis* dari hasil pemupukan dan perkembangannya hingga menjadi L₂. A= Telur cacing *T. canis* L₁, B= Telur cacing *T. canis* L₂ (100x), C= Telur cacing *T. canis* L₂ (400x)

4.2 Hasil Peneraan Kadar Protein Homogenat *Toxocara cati*

Setelah dilakukan homogenisasi antigen, homogenat yang diperoleh ditera kadar proteinnya dengan teknik spektrofotometer seperti terlihat pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Kadar Protein Homogenat *Toxocara cati*

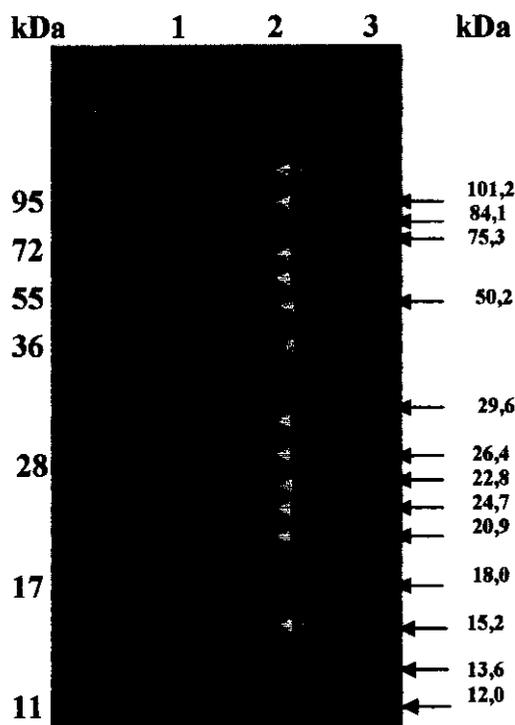
NO	Jenis Sampel (Homogenat)	Absorben		Kadar Protein ($\mu\text{g} / \text{ml}$)
		Sampel	Standar	
1	<i>Somatic antigen</i>	0,029	0,971 ²	1911,43
2	<i>Intestine antigen</i>	0,069	0,897 ¹	4923,07
3	<i>Excretory Secretary antigen</i>	0,052	0,970 ³	3430,93

Keterangan: Kadar protein standar = 6,4g%; 1 = Absorben standar pada pemeriksaan I; 2= Absorben standar pada pemeriksaan II; 3 = Absorben standar pada pemeriksaan III.

Setelah dilakukan pengukuran kadar protein dengan teknik spektrofotometer ternyata didapatkan kadar protein yang berbeda. Hal ini karena secara material bahan yang ditera juga berbeda. Hasil peneraan protein tersebut digunakan untuk pengenceran antigen pada waktu uji ELISA, SDS-PAGE dan *Western blot*.

4.3 Hasil Karakterisasi Protein dengan *Western blot*

Analisis Protein *somatic*, *excretory secretary*, dan *intestine T. cati* yang direaksikan dengan serum anti *T. canis* dengan menggunakan teknik *Western blot*, diperoleh hasil berturut-turut yang disajikan pada Gambar 4.3 dan Tabel 4.3.



Gambar 4.3 Hasil analisis protein *T. cati* dengan serum anti *T. canis* dengan teknik *Western blot*. M= Marker; kolom 1= *Somatic T. cati*; kolom 2= *Intestine T. cati*; kolom 3= *E-S T. cati*

Hasil analisis regresi menggunakan program SPSS (*statistical product and service solution*) for windows antara nilai Rf dan log BM (Da) protein pada marker didapatkan bentuk kubik dengan Persamaan $y = a + bx + cx^2 + dx^3$ nilainya $a = 5,754$, $b = -4,520$, $c = 5,376$, $d = -2,61$. Sehingga didapatkan persamaan garis $y = 5,754 - 4,520x + 5,376x^2 - 2,61x^3$. Perhitungan selengkapnya dapat dilihat pada lampiran.

Hasil analisis protein dari *somatic T. cati* dengan berat molekul (BM) 17,2 kDa, *intestine T. cati* dengan berat molekul (BM) 26,4 kDa, dan *excretory secretory T. cati* dengan berat molekul (BM) 26,4 kDa; 20,9 kDa; 18 kDa; 15,2 kDa dan 12,0 kDa terlihat lebih dominan (tebal) warna pita protein yang

terbentuk, sedangkan pita protein lainnya terlihat lebih tipis dengan intensitas warna yang rendah.

Tabel 4.3 Hasil karakterisasi protein dengan *Western blot*

No	PITA		
	<i>1.Somatic</i> Merah muda (kDa)	<i>2.Intestine</i> Biru (kDa)	<i>3.Excretory Secretary</i> Hitam (kDa)
1	142,6	142,6	-
2	101,2	101,2	101,2
3	-	-	84,1
4	-	-	75,3
5	63,0	63,0	-
6	56,0	56,0	-
7	-	-	50,2
8	47,3	47,3	-
9	39,5	39,5	-
10	-	29,6	29,6
11	-	26,4	26,4
12	-	24,7	24,7
13	22,8	22,8	22,8
14	20,9	20,9	20,9
15	-	-	18,0
16	17,2	-	-
17	-	15,2	15,2
18	-	-	13,6
19	-	-	12,0

BAB 5

PEMBAHASAN

BAB 5 PEMBAHASAN

5.1 Hasil Isolasi Larva Stadium Kedua (L_2) *Toxocara canis*

Larva stadium kedua *T. canis* pada penelitian ini diperoleh dengan cara isolasi telur cacing baik dari inkubasi cacing dewasa maupun dari feses anjing penderita toxocariasis. Telur dimurnikan dengan metode preparasi gradien dan selanjutnya dipupuk dengan media PBS pada suhu kamar. Adapun waktu yang dibutuhkan untuk perkembangan menjadi larva stadium pertama (L_1) adalah 7-8 hari, sedangkan waktu perkembangan menjadi L_2 adalah 21-28 hari (Kusumamiharja, 1993).

Pengamatan telur dilakukan sampai perkembangannya menjadi L_2 dengan pemeriksaan mikroskop inverted (Pembesaran 100x dan 400x). Pada larva stadium (L_1) terdapat membran vitelin yang masih tebal dan kokoh serta bentuk larva di dalamnya masih gemuk dan pendek dan pergerakannya tidak begitu aktif dibandingkan L_2 yang berbentuk panjang, melingkar, berbentuk seperti angka delapan, pergerakan aktif dan organ dalam larva sudah mulai terlihat (Trisunuwatii, 1998). Telur dinyatakan infeksiif apabila sudah berisi L_2 hidup.

5.2 Peneraan Kadar Protein Antigen *Toxocara canis*

Setelah diperoleh homogenat selanjutnya dilakukan pemeriksaan kadar protein antigen tersebut dengan spektrofotometer. Kadar protein yang diperoleh dari pemeriksaan *somatic*, *excretory secretory* dan *intestine* antigen *Toxocara cati* berturut-turut adalah 1.911,43 $\mu\text{g/ml}$; 4.923,07 $\mu\text{g/ml}$; dan 3.430,93 $\mu\text{g/ml}$. Hasil

ini digunakan untuk pengenceran antigen pada waktu SDS-PAGE dan *Western blot*. Hal ini untuk mengetahui kadar protein antigen yang akan diujikan.

Protein antigen dengan kadar yang optimal juga sangat diperlukan untuk menghasilkan pita protein yang baik. Homogenat cacing yang berasal dari telur, larva dan cacing dewasa akan memberikan reaksi yang optimal jika mengandung protein lebih dari 1000 mikrogram/ml (Kusnoto,2003).

Beberapa faktor yang mempengaruhi efektifitas *Western blot* yaitu tebal dan macam gel yang digunakan, jenis protein, lama transfer dan macam transfer, tanpa mempengaruhi atau mengurangi reaktifitas dari protein. Proses *Western blot* memberikan kemungkinan mendeteksi protein antgen secara radiografi, enzimatik dan imunologis (Artama, 1991 dikutip oleh Maria,2003).

Berdasarkan hasil pengamatan terhadap hasil *running* SDS-PAGE dan *Blotting* menunjukkan bahwa keberhasilan *running* tersebut dipengaruhi oleh beberapa hal antara lain kebersihan isolat, tingkat kemurnian isolat dan kadar protein dalam homogenat. Kebersihan isolat mempengaruhi kualitas pita protein yang terbentuk pada gel, pita terlihat tajam dengan gel terang, sehingga memudahkan analisis protein dan dokumentasi. Isolat atau homogenat yang murni akan menghasilkan pita protein yang jelas sehingga dapat memudahkan analisis berat molekul (BM) pada pita yang terbentuk (Kusnoto,2003).

5.3 Hasil Karakterisasi Protein dengan *Western blot*

Analisis protein *somatic*, *excretory secretory* dan *intestine T. cati* dilakukan dengan menggunakan metode *Western blot*. Prinsip dasar dari teknik ini adalah melakukan analisis protein dengan teknik SDS-PAGE (*sodium deodecyl sulphate polyacrilamid gel*) dan didapatkan protein dengan berat molekul yang berbeda yang terpisah pada area gel, kemudian ditransfer dari polyacrilamid gel ke membran nitroselulose dengan teknik *Western blot*. Posisi protein antigen pada membran dapat dilihat dari ikatan protein antigen dengan serum anti *T. canis*. Untuk mendapatkan berat molekul (BM) yang tepat, diperhitungkan dengan marker protein yang berkisar antara 65.000 Da sampai 205.000 Da (Harlow dan Lane.1998; Rantam, 2003).

Pada gambar 4.3 dan Tabel 4.3 terlihat adanya protein berupa pita yang merupakan hasil reaksi silang antara serum anti *T. canis* dengan berbagai antigen cacing *T. cati* yang digunakan. Dari penelitian ini didapatkan sembilan pita protein dari *somatic* antigen *T. cati* yang dikenali oleh serum anti *T. canis*, yang ditunjukkan dengan BM 142,6 kDa; 101,2kDa; 63 kDa; 56 kDa; 47,3 kDa; 39,5 kDa; 22,8 kDa; 20,9 kDa; dan 17,2 kDa.

Dari protein *intestine* antigen *T. cati* yang dapat dikenali oleh serum anti *T. canis* didapatkan 12 pita protein, yang ditunjukkan dengan BM 142,6 kDa; 101,2kDa; 63 kDa; 56 kDa; 47,3 kDa; 39,5 kDa; 29,6 kDa; 26,4 kDa; 24,7 kDa; 22,8 kDa; 20 kDa; dan 15,2 kDa. Sedangkan protein E-S antigen *T. cati* yang mampu dikenali oleh serum anti *T. canis* didapatkan 13 pita protein, yang

ditunjukkan dengan BM 101,2 kDa; 84,1 kDa; 75,3 kDa; 50,2 kDa; 29,6 kDa; 26,4 kDa; 24,7 kDa; 22,8 kDa; 20,9 kDa; 18,0 kDa; 15,2 kDa; 13,6 kDa; dan 12,0 kDa.

Mengingat perhitungan dan kemungkinan perbedaan relatif dalam menentukan jarak pita protein maupun panjang dan awal pengukuran gel, maka kemungkinan ada beberapa pita protein telah memiliki sedikit perbedaan dengan penelitian lain tetapi sebenarnya yang dimaksud adalah pita protein yang sama (Kusnoto, 2003).

Berat molekul dari ketiga antigen cacing *Toxocara cati* tadi menunjukkan bahwa di dalam *somatic*, *intestine* dan E-S antigen *T. cati* mengandung protein yang sama sehingga dapat dikenali oleh serum anti *T. canis* dan membentuk pita protein, khususnya *Intestine* dan *excretory secretory* hal ini disebabkan adanya kemiripan protein dalam antigen cacing tersebut. Kusnoto (2003) menyatakan hal ini disebabkan bahwa E-S mengandung sekresi dari kelenjar *intestine* dan kutikula sehingga semua cairan yang dikeluarkan cacing baik pada saat makan atau buang kotoran merupakan hasil dari produk metabolismenya.

Abdel-Rahman *et al* (2000) menyatakan, bahwa reaksi antara antigen cacing lain yang sebagian besar mempunyai jenis parasit dan mempunyai profil antigen protein yang hampir sama dan mampu mengenali antibodi anti L₂ *T. cati* maupun *T. canis* dimana antara antigen dan antibodi mampu berikatan dengan baik sehingga hal ini sering kali mengakibatkan terjadinya reaksi silang.

Namun demikian perlu uji lanjutan untuk memperoleh antigen spesifik yang dapat digunakan sebagai uji imunodiagnostik untuk *Toxocariasis* dengan sensitifitas dan spesifitas yang tinggi (Bendryman, 2008).

BAB 6

KESIMPULAN DAN SARAN

BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Karena antigen *cati* dapat dikenali oleh serum anti *canis* maka kesimpulan penelitian ini adalah adanya reaksi silang antara *somatic*, *excretory secretory* dan *intestine* antigen *T. cati* yang ditambahkan serum anti *T. canis* dengan menggunakan teknik *Western Blot*.

6.2 Saran

Saran yang dianjurkan dalam penelitian ini adalah perlu adanya penelitian lebih lanjut terhadap pita reaksi silang tersebut, untuk identifikasi protein murni sehingga dapat digunakan sebagai bahan diagnostik toxocariasis secara serologis atau imunologis.

RINGKASAN

RINGKASAN

Intan Maya Raharjeng . “ Reaksi silang *Somatic, Excretory secretory* dan *Intestine* antigen *Toxocara cati* dengan serum anti *Toxocara canis*”.

Toxocariasis yang disebabkan cacing *T. cati* maupun *T. canis* merupakan salah satu penyakit yang terpenting yang disebabkan oleh cacing nematoda. Penyakit ini bersifat zoonosis, karena dapat menginfeksi manusia .Sumber infeksi utama pada manusia adalah dari tanah yang terkontaminasi telur infeksi. Infeksi pada Manusia dibedakan menjadi dua yaitu *visceral* dan *ocular larva migrans*.

Diagnosis toxocariasis secara konvensional dengan pemeriksaan feses dari hospes transport sampai saat ini sulit dilakukan. Telur cacing dan cacing dewasa *T. cati* maupun *T. canis* sulit untuk diperiksa. Diagnosis berdasarkan gejala klinis juga sulit dilakukan, mengingat banyak variasi gejala yang ditimbulkan oleh infeksi ini. Masalah tersebut perlu diatasi dengan melakukan uji lain yang lebih spesifik yaitu dengan uji serologis atau imunologis menggunakan teknik *Western blot* terhadap protein antigen *T.cati* dengan serum anti *T. canis*.

Penelitian berikut ini dilaksanakan untuk mengetahui apakah terdapat reaksi silang diantara *somatic, intestine* dan E-S antigen *Toxocara cati* dengan serum anti *Toxocara canis*. Dimana serum anti *T. canis* diperoleh dari mencit yang terinfeksi L₂.

Antigen *T. cati* diperoleh dengan proses pembedahan kemudian di sentrifus sampai menjadi homogenat lalu di tera kadar proteinnya. Kemudian dilakukan analisis protein dengan teknik SDS-PAGE yaitu melakukan pemisahan protein

sesuai berat molekul menggunakan gel poliakrilamid dengan cara elektroforesis. Gel yang mengandung fragmen protein hasil SDS-PAGE ditrasfer ke membran nitroselulose menggunakan teknik *Western blot*, kemudian membrane direaksikan dengan antibodi poliklonal dan divisualisasikan dengan pewarnaan DAB.

Berdasarkan hasil yang diperoleh dari penelitian ini maka didapatkan adanya reaksi silang antara *somatic*, *excretory secretory* dan *intestine* antigen *T. cati* yang ditambahkan serum anti *T. canis* dari mencit menggunakan teknik *Western blot*.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, peneliti menyarankan untuk dilakukan penelitian lanjutan terhadap pita reaksi silang protein tersebut, untuk mengidentifikasi protein murni dari ketiga antigen *T. cati* tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas A.K., Lichtman A.H, Pober J.S. 2000. Cellular and Molecular Immunology. 4th ed. Philadelphia Saunders Company
- Abdel- Rahman, EH, Abdel- Megeed KN, and Hassanain MA. 2000. Structural characterization dan immunocatalization of egg antigens cross-react with *Toxocara vitulorum*, *Fasciola gigantica* and *Moniezia expanza*. Abstract. J. Egypt. Soc. Parasitol. 30(2): 581-91
- Alonso, J. M., M. V. Bojanich, M. Chamarro, and J. O. Gonodner. 2000. *Toxocara* Seroprevalence in Children from a Subtropical City in Argentina. Abstract. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 42(4) :235-7
- Baratawidjaja, K. G. 2000. Immunologi Dasar. Edisi keempat. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Bendryman S, Kusnoto and Juniastuti. 2008. Mouse sera imunoglobuline profile specific protein of *T. cati* as a marker choice base in the antibody examination. Faculty of Veterinary Medicine, Airlangga University. (International seminar management strategy of animal health and production control on anticipation global warmingfor achievement of millennium development goals)
- Bowman DD, M. Mike-Grieve, and R. B. Grieve. 1987. *Tococara canis*: Monoclonal Antibodies to Larva Excretory-Secretory Antigen that Bind With Genus and Species Specificity to the Cuticular Surface of Infective Larvae. Exp. Parasitol.64(3):456-65
- Brooks, W. C 2003. Roundworms : Cats and Kitten. <http://www.veterinarypartner.com/Content.Plx?P=A&A=498&s=2.pp> :[27 nov 2007]
- Burgess, G.W.1995. Teknologi ELISA dalam Diagnosis dan Penelitian . Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. Hubner,J.,M. Uhlikova, and M. Leissova.2001.
- Centers for Disease Control, 2004. Toxocariosis. Division of Parasitic Disease National Center for Infectious Disease Centers for disease Control and Prevention.<http://www.cdc.gov/DPDx/HTML/frames/SZ/Toxocariosis/dyToxocariasis-page1.htm#life%20cyclepp>:[17 januari 2008].
- el-Massry AA.1999. Charactrization of antigenic Property of *Toxocara canis* and *Toxocara leonine* Adults and Larvae Trough Immunodiagnostic Electrophoresis (SDS-PAGE) and Western Blot T echnique. J. Egypt. Soc. Parasitol; 29(2):335-45.

- Fatchiyah; E.L. Arumingtyas; S. Widyarti; Rahayu. 2006. *Analisa Biologi Molekuler Isolasi DNA, PCR dan RFLP, SDS-PAGE, Immunoblotting dan Isoenzyme Laboratorium Biologi Molekuler*. Universitas Brawijaya Malang.
- Flynn, R.J. 1973. *Parasites of Laboratory Animal*. 1st Ed. The Iowa State University Press Iilndes. 229-45
- Gillespi S.H .1998. The Epidemiology of *Toxocara canis* *Parasitology Today*; 4: 180-2
- Goffette, S., A. P Jeanjean., T. P. Duprez and G. Bigaignon., C. J. Sindic. 2000. Eosinophilic Pleocytosis and Myelitis Related to *Toxocara canis* Infection. *Eur J Neurol*; 7(6): 703-6
- Harlow, E. and D. Lane.1998. *Antibodies. A Labortory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Hubner J, Uhlikova M, and Leissova M. 2001. Diagnosis of the early phase of Larva *Toxocarariosis* using Ig G Avidity. *Epidemiol Mikrobiol Imunol*; 50 (2): 67-70
- Humbert P, Nierborola M, Salembier R, Aubin F, Piarroux R, Buchet S, and Barale T. 2000. Skin Manifestations Associated with *Toxocarariasis* : A Case Control Study. *Dermatology*; 201 (3): 230-4
- Ito, K., K. Sakai., T. Okajima., K.Quichi., A. Fumakushi., J. Nishimura., H. Ibayashi and M. Tsuji. 1986. Three cases of visceral larva migrans due to ingestion of Raw chicken or cow liver. *Nihon Naikagoko Zassi*. 75:759-766
- Klein, J. 2005. *Toxocarariasis*. <http://kidshealth.Org/parent/infectious/parasitic/toxocarariasis.Html>.pp:[02 mei2008]
- Kilpatrick M.E. 1992. *Toxocarariasis*. In : *Tropical Medicine*. 7th ad. London: W.B. Saunders Company.pp.761-4
- Koesdarto. S., Koesnoto dan Suwarno.2006. Pengembangan Diagnosis *Toxocarariasis* Menggunakan Teknik Sandwich ELISA dengan Antibodi Monoklonal Anti-Protein Spesifik *Toxocara canis* Isolat Lokal. Laporan Penelitian Hibah Bersaing XIV Lembaga Penelitian Universitas Airlangga. Depdiknas.
- Kusnoto. 2003. Isolasi dan Karakterisasi Protein Immunologik Larva stadium II *Toxocara cati* Isolat Lokal. *Tesis*. Program pasca Sarjana Universitas Airlangga.

- Kusnoto. 2004. Karakterisasi Protein *T. cati* dengan antibodi Poliklonal Anti-Larva dua Jaringan dari seru Kelinci menggunakan Teknik *Western blot*. **Penelitian Pendahuluan**. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga
- 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 Piraan di Indonesia. Bogor: PAU Bioteknologi, IPB
- Levine N.D 1994 . Textbook of Veterinary Parasitology. Burgers Publishing Company. Diterjemahkan oleh: Ashadi G. 1994. Wardiarso Ed. Yogyakarta: Gajah Mada University Press
- Logar, J., Soba, B., Kraut, A., Stirn-Kranjc, B. 2004. Seroprevalence of Toxocara antibodies among patients suspected of ocular toxocariasis in Slovenia. *Korean. J. Parasitology*. 42(3):137-140
- Manus DPM.1986. Intermediary metabolism in Parasitic helminth. In: Howell. *Procc. Of the sixth International Congress of Parasites*. Pp. 79-89.
- Morales, O.L.,C. Lopez, R. S. Nicholls, C. Agudelo. 2002. Identification of *Toxocara canis* Antigen By Western blot in Experimentally Infected Rabbits. [Hhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/sister/entrez?Cmd = Retrieve & PubMed &list uids=10605487&dept:pp\[maret 2008\]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sister/entrez?Cmd = Retrieve & PubMed &list uids=10605487&dept:pp[maret 2008])
- Nash, H. 2006. Raundworm (*Toxocara leonina*, *Toxocara cati*). [http://www.pet education.com/article.cfm/cis=2cat=1622&articleid=762.pp\[jan.2008\]](http://www.pet education.com/article.cfm/cis=2cat=1622&articleid=762.pp[jan.2008])
- Overgaauw P.A.1997. Aspect of *Toxocara* Epidemiology: Human Toxocariasis. *Crit Rev. Microbial*. 23(3):331-6
- Page A.P, Richards DT, Lewis JW, Omar HM and Maicel RM. 1991. Comparison Of Isolate and Species Of *Toxocara* and *Toxocaris* by Biosintetic Labelling Of Somatic and ES Protein From Infektif Larvae. *J.Parasitol*.103:261-265
- Pappas P.W. and Wardrop S.M.2008. *Journal of Toxocariasis*.
- Park SP, Huh S, Magnaval JF .1999. A cases of presumed ocular toxocariasis in a 28 years old woman . *Korean J Optalmol* . Dec;13(2):115-9

- Parsons, J. C. 1987. Ascarid Infection in Cats and Dogs. *Vet. Clin. Noth. Am. Pract.* 17(6):1307-39.
- Prokopowicz, D. and D. Sosnowska.1990. Toxocariasis. *Abstrac. Przegl. Epidemiol.*44(3):193-8
- Provet Healthcare Information, 2002. *Toxocara cati* Prov.
<http://www.provet.co.uk/health/disease/toxocaracati.htm>.pp:[maret 2008]
- 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) :281-6*
- Rantam, F.A. 2003. *Metode Immunologi*. Airlangga University Press. Surabaya
- Rayes AA, Teixeira D, Serufo JC, Nobre V, antunes CM, and Lamburtucci JR. 2001. Human toxocariasis and pyogenic liver abscess: a possible association. *Am J Gastroenterol*;96(2):563-6
- Roitt I, Brostoff J, and Male D. 1998. *Immunology*. 4 Ed. Barcelona, Spain: Mosby, Times Mirror International Publisers Limited.
- Safar E.H., el-Rifaei F., and Maklad K.M. 1992. Protein chromatographic study on adult *Ascaris lumbricoides*, *Ascaris vitulorum* and *Toxocara canis*. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 22(1):171-6
- Saske. 2004. *Helminthologia*.<http://72.14.235.104/search/q=cache:x2v8p2y>.
- Soulsby E.J.L. 1989. *Toxocariasis*. *Brit. Vet. J.* 139:471-475
- Subekti S., S. Koesdarto., S.Mumpuni., Koesnoto. 2006. *Ilmu Penyakit Nematoda Veteriner. Buku Ajar. Fakultas Kedokteran Hewan .Surabaya.*
- Starke WA, MachadoRZ, Bechara GH, and Zocoller MC.1996. Skin hypersensitivity test in buffaloes parasitized with *Toxocara vitulorum*. *Vet Parasitol ;63(3-4):283-90*
- Stites DP,Terr AI, Parlow TG. 1997. *Medical Immunology*. 9 Ed. USA: A. Simon & Schuster Company, Prentice-Hall International Inc.

- Takeshi agatsuma *et al*, 2007., characterization of a *Toxocara canis* species-specific. E-S antigen (TcES-57) and development of double sandwich ELISA for diagnosis of visceral larva migrans. Departement of Parasitology, Fakultas of Medicine. University Paradeniya, Srilanka. TRskLpKIJ <http://synape.koreamed.org/Data/PDFData/0066KJP/KJP-45-19.pdf>.pp[17 juli 2008].
- Tizard I.R. 1982. An Introduction of Veterinary Immunology. W.B. Saunders Company. Diterjemahkan oleh Masduki Partodirejo dan Soehardjo Hardjosworo. 1987. Airlangga University Press. Hal 303-3
- Trisunuwati P. 1997. Penentuan protein imunogen larva *Toxocara vitulorum*, sebagai usaha menemukan metode imunodiagnosis dini Toxocariasis pada induk sapi. Disertasi. Program Pascasarjana Uniersitas Airlangga.
- Uga, S., T. Matsumura., K. Fujisawa., K. Okubo., N. Kataoka and K. Kondo. 1990. Insidence of seropositivity to Human Toxocariasis in Hyogo Prefecture, Japan, and its possible Role in Opththalmic Disease. Japan. J.Parasitol.39 (5):500-502.
- Urquhart, G.M., J. Armour, J.L.Duncan, A.M. Dunn and F.W. Jennings. 1994. Veterinary Parasitology. 3rd Ed. Departement of Veterinary Parasitology. The faculty of Veterinary of Medicine. The university Glasgow. Scotland Longmann Scintitic and Technical. 61-71
- Warren, K. S.1993. Immunology and Molecular biology of Parasite Infection. Eidinburgh, Blackwell Sc.P.55

LAMPIRAN

Lampiran 1

BIO ANALITIKA**TOTAL PROTEIN
BIURET****Pereaksi:**

1. Pereaksi BIURET
2. Standart POTEIN (Simpan pada 6°C)
3. NaCl 0,9 %
4. Blanko Biuret

BAHAN : Serum atau plasma (jernih)**Absorbance : 540 nm – 550 nm (546 nm).****CARA KERJA:**

Siapkan 3 tabung reaksi dan kerjakan sbb:

	Tes	Standar	Blanko
Pereaksi Biuret,ml	2,50	2,50	2,50
Serum/ Plasma, ml	0,05	-	-
Standar,ml	-	0,05	-

Campur tangguhkan selama 30 menit, lalu

Baca dalam spektrofotometer.

Cara Mikro:

	Tes	Standar	Blanko
NaCl 0,9%, ml	1,00	1,00	1,00
Serum/ Plasma,ml	0,02	-	-
Standar	-	0,02	-
Pereaksi Biuret,ml	1,00	1,00	1,00

Campur, tangguhkan selama 15 menit ,lalu dibaca

Dalam spektrofotometer.

PERHITUNGAN:

$$\text{g/dl Total Protein} = \frac{D_t}{D_s} \times \text{kadar standar}$$

Angka normal : 6,0-8,2 g/dl

Untuk diperhatikan:**Khusus untuk serum/ plasma yang keruh, buatlah blankoserum abb:****0,05 ml Serum/ Plasma + 2,5 ml Blanko Biuret. Perhitungannya****Abs Tes – Abs Blanko Serum = D_t**

Pustaka: Varley's:Prac. Clin Biochemistry:Sixth ED; Alan H Gowenlo ck:p 407-408.

Lampiran : 2**Cara Kerja SDS-PAGE****SDS-PAGE 15%**

1. Siapkan semua bahan yang diperlukan :

- ❖ Acrilamid
- ❖ Tris HCl pH 8,8
- ❖ Tris HCl pH 6,8
- ❖ SDS 10%
- ❖ Aquadest
- ❖ Temed
- ❖ APS 10%, 4°C
- ❖ E Buffer
- ❖ Methanol 50%
- ❖ Methanol 5%
- ❖ Acetic Acid/ Asam Asetat 7,5%
- ❖ Glutaral Dehide 10%
- ❖ NaOh 0,36%
- ❖ NH₃
- ❖ AgNO₃
- ❖ Formaldehide
- ❖ Zitronensoure 5%
- ❖ Butanol

2.Membuat Running Gel

Bahan:

- ❖ Acrilamid 3,215 ml
- ❖ Tris HCl pH 8.8 1,2 ml
- ❖ SDS 10% 1,2 ml
- ❖ Aquadest 1,1 ml
- ❖ Temed 5,0 µl
- ❖ APS 10% 30 µl

3.Masukkan lewat dinding kaca sampai 1 cm dari atas.

4. Tambahkan butanol diatasnya sampai penuh.

5. Membuat Stacking Gel 6%

- ❖ Acrilamid 0,66 ml
- ❖ Tris HCl pH 6,8 0,8 ml
- ❖ SDS 10% 0,8 ml
- ❖ Aquadest 0,8 ml
- ❖ Temed 4,0 µl
- ❖ APS 10% 20 µl

6. Masukkan keatas cetakan Running Gel sampai penuh kemudian masukkan comb ke stacking gel dan inkubasi selama 25 menit

7. Siapkan sampel (Laemmli Buffer + sampel) masukkan kedalam ependorf dan tutup ependorf ditusuk dengan jarum ½ tusukan, langsung godok dengan 100°C selama 5 menit.

8. Setelah inkubasi selesai lepaskan comb dan cuci dengan E Buffer 1X

9. Masukkan cetakan tadi ke Bio Rad.

10. Tuangi dengan E Buffer 1X (kira-kira 800 ml).

11. Masukkan sample kedalam lobang comb tadi dan hilangkan gelembung udara tadi dengan jarum.
12. Pasang listrik dengan 125 V dan 40 mA.
13. Tunggu sampai sampel turun seluruhnya.
14. Matikan listrik dan lepas agarnya pelan-pelan.
15. Masukkan ke petridish yang sudah ada larutan pencucian.
16. Tahap pencucian:
 - Pencucian I:
 - ↓ Methanol 2,5 ml
 - ↓ Asam asetat 3,75 ml
 - ↓ Aquadest 71,25 ml
 Goyang dengan kecepatan 42 selama 30 menit

 - Pencucian II:
 - ↓ Methanol 2,5 ml
 - ↓ Asam asetat 3,75 ml
 - ↓ Aquadest 93,75 ml
 Goyang dengan kecepatan 42 selama 30 menit

 - Pencucian III: Glutaraldehyd 10%
 - ↓ Glutaridehyd 10 ml
 - ↓ Aquadest 90 ml

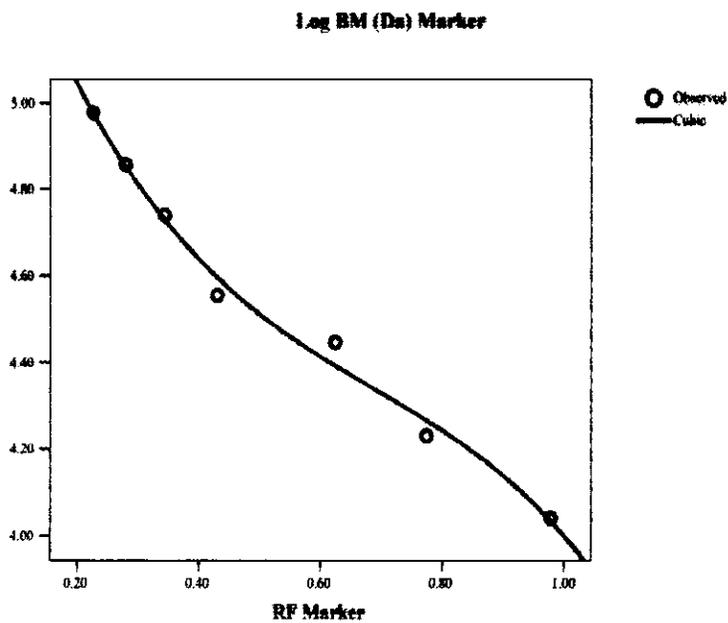
 - Pencucian IV:
 - ↓ Pencucian dengan aquadest @ 100 ml 3X selama 30 menit.
17. Tahap Pewarnaan:
 - Timbang AgNO_3 0,8 g + 4 ml DW, campur dan masukkan kedalam larutan yang terdiri dari :
 - NaOH 0,36% 21 ml
 - NH_3 1,4 ml
 - Aquadest 73,5 ml
 Masukkan kedalam petridish dan goyang dengan kecepatan 42 selama 15 menit. Kemudian buang.
18. Cuci dengan aquadest @ 100 ml 2X selama 2 menit.
19. Masukkan pengembang warna yang terdiri dari:
 - Formaldehyd 3,7% 50 μl
 - Zitronensaure 5% 100 μl
 - Aquadest 100 ml
 Tunggu 5 menit sambil goyang terus.
20. Masukkan stop reaksi dengan Acetic acid 10%
21. Cuci dengan aquadest @ 100 ml 2X selama 2 menit.
22. Beri Gliserol 10%
 - Gliserol 10 ml
 - Aquadest 90 ml

Lampiran :3**Penghitungan Persamaan Regresi pada marker**

BM (y kDa)	BM (y Da)	log y (Da)
95.0	95000	4.978
72.0	72000	4.857
55.0	55000	4.740
36.0	36000	4.556
28.0	28000	4.447
17.0	17000	4.230
11.0	11000	4.041

Panjang Gel
93mm

Panjang gel =93 (jarak antara separating gel hingga warna terakhir)

Curve Fit

Lanjutan lampiran :3**Cubic****Model Summary**

R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
.996	.991	.982	.045

The independent variable is RF Marker.

ANOVA

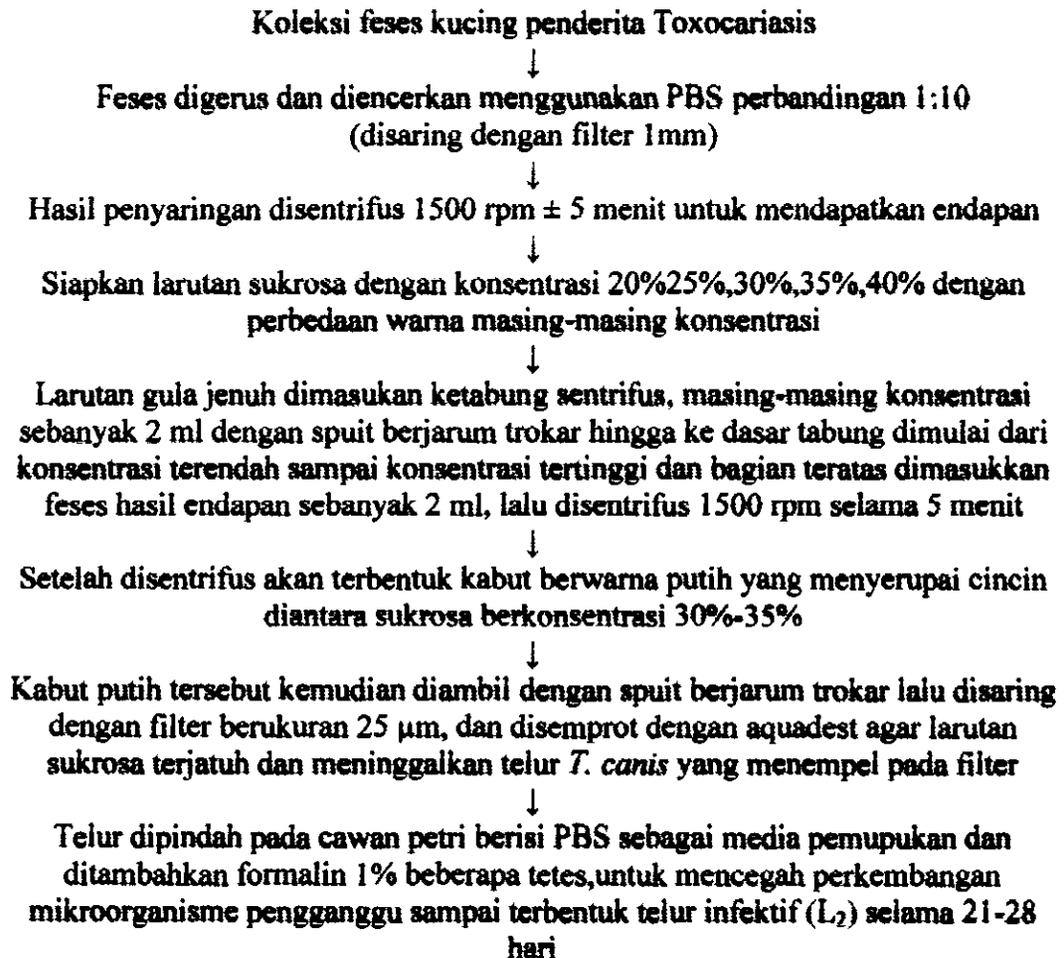
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Regression	.680	3	.227	111.254	.001
Residual	.006	3	.002		
Total	.686	6			

The independent variable is RF Marker.

Coefficients

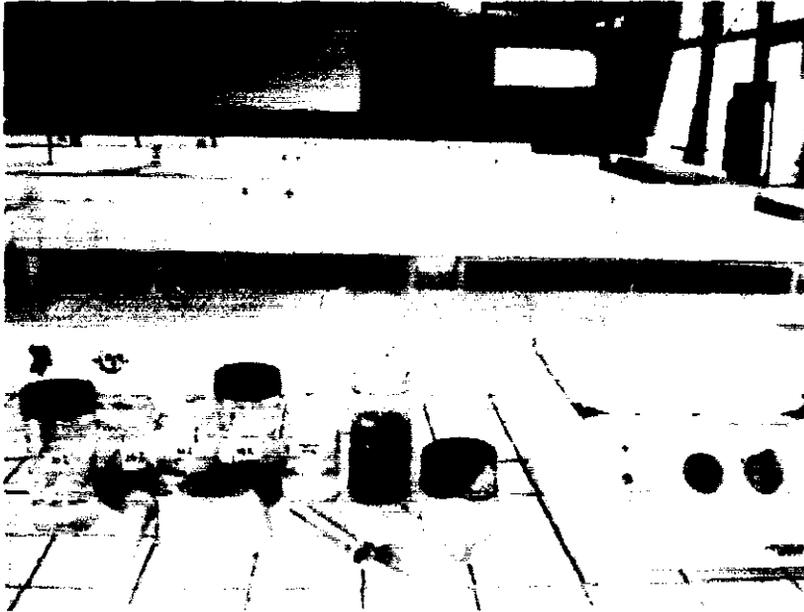
	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
RF Marker	-4.520	1.647	-3.735	-2.745	.071
RF Marker ** 2	5.376	2.964	.5333	1.814	.167
RF Marker ** 3	-2.610	1.622	-2.631	-1.609	.206
(Constant)	5.754	.270		21.340	.000

$$y = a + bx + cx^2 + dx^3$$

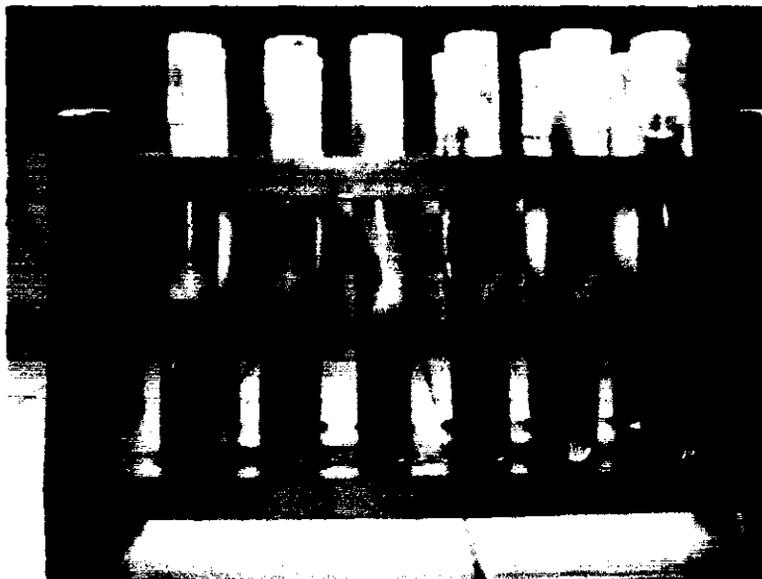
Lampiran 4**Teknik Gradien Preparasi**

Lampiran 5: Foto penelitian

1. Alat dan bahan untuk pemupukan telur *Toxocara canis*

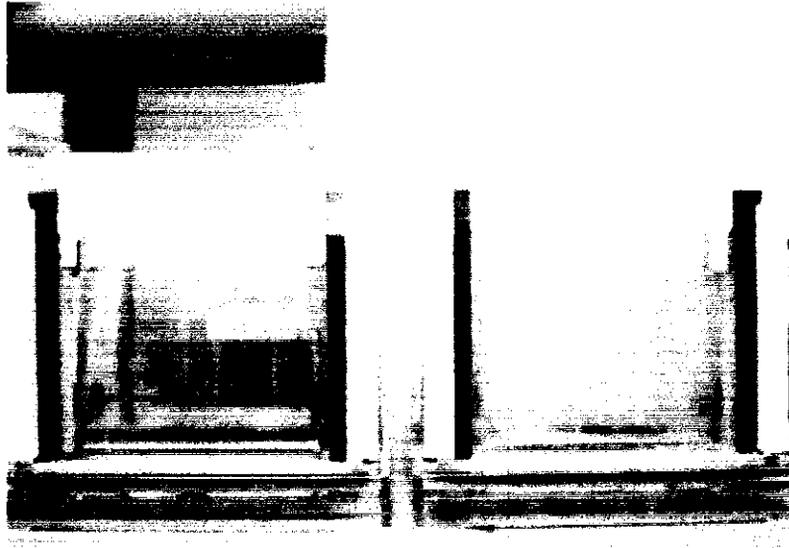


2. Teknik gradien preparasi

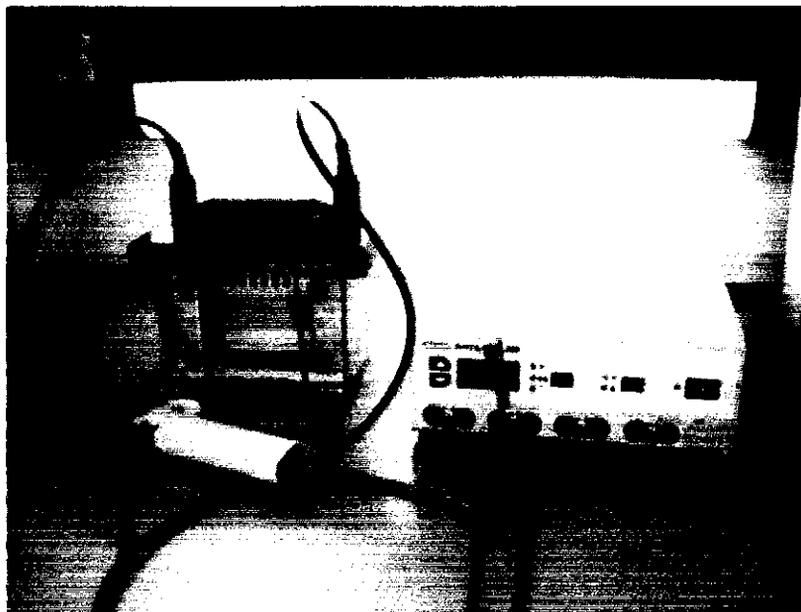


Lanjutan lampiran 5

3. Pembuatan Gel Elektroforesis

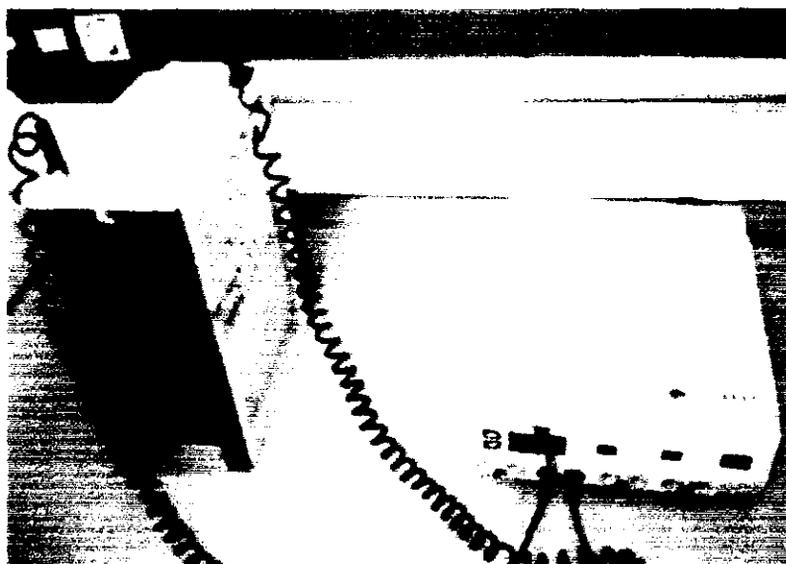


4. Alat Elektroforesis



Lanjutan lampiran 5

5. Alat *Blotting* metoda Wet



6. Tahap pencucian

