

SKRIPSI

**KARAKTERISASI PROTEIN LARVA KEDUA (L₂) JARINGAN
CACING *Taxocara cati* DENGAN MENGGUNAKAN METODE
WESTERN BLOT**



ANDRIANI
SURABAYA – JAWA TIMUR

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2005**

**KARAKTERISASI PROTEIN LARVA KEDUA (L₂) JARINGAN
CACING *Toxocara cati* DENGAN MENGGUNAKAN METODE
WESTERN BLOT**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

Pada

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

Oleh:

ANDRIANI

NIM. 060112906

Menyetujui

Komisi Pembimbing,



(Kusnoto, M.Si., drh.)

Pembimbing pertama



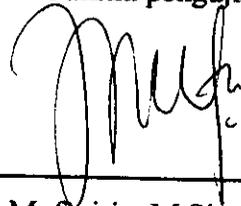
(Hana Eliyani, M.Kes., drh.)

Pembimbing kedua

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

Mengetahui

Panitia penguji,



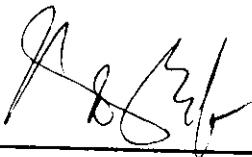
Mufasirin, M.Si., drh

Ketua penguji



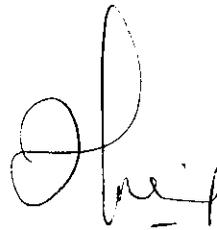
Prof. Dr. Sri Subekti, DEA., drh

Sekretaris penguji



Kusnoto, M.Si., drh

Pembimbing I



Halimah Puspitawati, M.Kes., drh

Anggota penguji



Hana Eliyani, M.Kes., drh

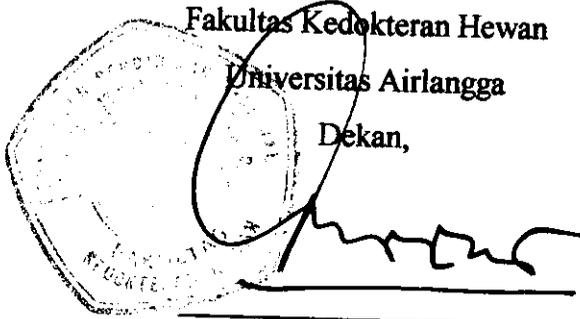
Pembimbing II

Surabaya, 10 juni 2005

Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga

Dekan,



Prof. Dr. Ismudiono, M.S., drh

NIP. 130 687 297

KARAKTERISASI PROTEIN LARVA KEDUA (L₂) JARINGAN CACING *Toxocara cati* DENGAN MENGGUNAKAN METODE WESTERN BLOT

ANDRIANI

ABSTRAK

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui karakteristik protein spesifik larva kedua (L₂) jaringan *Toxocara cati* menggunakan teknik *Western blot*. Hasil penelitian ini dapat dijadikan acuan sehubungan dengan sifat protein imunogenik *T. cati* untuk keperluan diagnosis toxocariasis secara serologis atau imunologis.

Larva kedua jaringan cacing *T. cati* diisolasi dari mencit yang mendapat infeksi buatan *T. cati*. Setelah 3-4 hari mencit dieutanasia memakai eter, kemudian dibedah untuk diambil saluran pencernaan, organ *visceral* (hati, jantung, ginjal dan paru-paru) dan jaringan somatik. Organ-organ tersebut diiris tipis-tipis, dicuci dalam larutan PBS 10%, direndam dalam larutan tripsin 1% kemudian diinkubasi pada suhu 37°C, agar L₂ jaringan yang berada dalam organ dapat dikoleksi.

Whole extract L₂ jaringan cacing *T. cati* didapatkan melalui proses sonikasi sampai menjadi homogenat, kemudian ditera untuk mengetahui kadar protein di dalamnya. Sebagian homogenat digunakan untuk pembuatan antibodi poliklonal anti-L₂ jaringan, sisanya untuk 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 ditransfer ke membran nitroselulose menggunakan teknik *Western blot*, kemudian membran direaksikan dengan antibodi poliklonal dan divisualisasikan dengan pewarnaan *Western blue*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat enam fraksi protein L₂ jaringan *T. cati* dengan berat molekul (BM): 135,5 kDa, 117,5 kDa, 44,8 kDa, 31,9 kDa, 17,1 kDa, dan 6,5 kDa.

UCAPAN TERIMA KASIH

Puja dan puji syukur kehadirat Allah SWT, yang telah melimpahkan rahmat dan hidayahNya sehingga penulis dapat menyelesaikan tulisan ini sebagai salah satu syarat memperoleh gelar sarjana Kedokteran Hewan Pada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Melalui skripsi yang berjudul "**Karakterisasi Protein Larva Kedua (L₂) Jaringan Cacing *Toxocara cati* dengan Menggunakan Metode *Western blot*" penulis mencoba mengungkapkan karakteristik protein spesifik L₂ jaringan cacing *Toxocara cati* dengan menggunakan metode *Western blot*.**

Berkaitan dengan itu pula, penulis ingin mengucapkan terima kasih dan penghargaan kepada yang terhormat:

1. Bapak Prof. Dr. Ismudiono, M.S., drh. selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga beserta staf pimpinan atas kesempatan yang diberikan.
2. Bapak Kusnoto, M.Si. drh. sebagai dosen pembimbing pertama yang membimbing penulis dalam proses penelitian dan penulisan skripsi ini.
3. Ibu Hana Eliyani, M.Kes., drh. sebagai dosen pembimbing kedua yang penuh kesabaran membimbing penulis hingga terselesaikannya tulisan ini.
4. Bapak Iwan Syahrial Hamid, M.Si., drh. sebagai dosen wali dan seluruh dosen Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga yang telah memberikan ilmu kepada penulis selama perkuliahan.
5. Tim penguji atas kesediaan meluangkan waktu untuk menguji penulis.

6. Seluruh keluarga yang sangat penulis cintai: Ayahanda, Ibunda dan kakak tersayang atas segala pengorbanan seluruh jiwa raga yang tak ternilai dengan apapun serta dukungan dan memberi semangat.
7. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang telah memberikan bantuan langsung maupun tidak langsung demi penyempurnaan tulisan ini.

Penulis menyadari bahwa tulisan ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu kritik, masukan dan saran yang bersifat membangun sangat penulis harapkan dari para pembaca.

Akhirnya penulis hanya mampu memohon kepada Allah SWT semoga amal kebaikan yang tak ternilai tersebut, mendapatkan balasan yang setimpal dari Allah SWT. Semoga tulisan ini dapat memberikan manfaat dan menambah wawasan pengetahuan bagi pembaca. Amin.

Surabaya, April 2005

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
LEMBAR PENGESAHAN.....	ii
ABSTRAK.....	iv
UCAPAN TERIMA KASIH.....	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
BAB 1: PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Landasan Teori.....	3
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 Habitat.....	6
2.1.3 Siklus Hidup dan Cara Penularan.....	7
2.2 Tinjauan Toxocariasis.....	9
2.2.1 Aspek Zoonosis.....	9

2.2.2 Patogenesis.....	10
2.2.3 Diagnosis Toxocariasis.....	11
2.3 Tinjauan Antigen Parasit.....	12
2.4 Tinjauan Antibodi.....	14
2.5 Karakterisasi Protein <i>Toxocara cati</i>	15
BAB 3: METODE PENELITIAN.....	17
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	17
3.2 Bahan Penelitian.....	17
3.3 Alat-Alat Penelitian.....	18
3.4 Metode Penelitian.....	19
3.4.1 Tahap Isolasi L ₂ Telur Infektif dan Cacing Dewasa.....	19
3.4.2 Tahap Isolasi L ₂ Jaringan Cacing <i>Toxocara cati</i>	20
3.4.3 Tahap Pembuatan <i>Whole Extract</i> L ₂ Jaringan <i>T.cati</i>	21
3.4.4 Tahap Pembuatan Antibodi poliklonal pada kelinci.....	21
3.4.4 Tahap Analisis Protein dengan Teknik SDS-PAGE.....	22
3.4.5 Tahap Analisis Protein Dengan Teknik <i>Western blot</i>	23
3.5 Tahapan Penelitian.....	26
BAB 4: HASIL PENELITIAN.....	27
BAB 5: PEMBAHASAN.....	29
BAB 6: KESIMPULAN DAN SARAN.....	33
6.1 Kesimpulan.....	33
6.2 Saran.....	33
RINGKASAN	34

DAFTAR PUSTAKA	36
LAMPIRAN	40

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
3.1. Skema Tahapan Penelitian.....	26
4.1. Hasil karakterisasi protein L ₂ jaringan <i>T. cati</i> dengan antibodi poliklonal anti-L ₂ jaringan dari serum kelinci menggunakan teknik <i>Western blot</i>	27
5.1. Karakterisasi protein berbagai stadium <i>T. cati</i> dengan antibodi poliklonal anti-L ₂ jaringan dari serum kelinci menggunakan teknik <i>Western blot</i>	30

BAB I

PENDAHULUAN

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Toxocariasis yang disebabkan *Toxocara cati* merupakan salah satu penyakit parasit yang disebabkan oleh cacing nematoda. Penyakit ini bersifat zoonosis, karena dapat menginfeksi manusia. Hospes definitif dari cacing *T. cati* adalah anak kucing dan kucing jantan dewasa (Hubner *et al.*, 2001).

Toxocariasis pada manusia lazim disebut *human toxocariasis*, penyebabnya adalah cacing *Toxocara spp.* Manifestasi klinis yang terjadi pada manusia yaitu *visceral toxocariasis* yang disebabkan oleh *visceral larva migran* dan *ocular toxocariasis* yang disebabkan oleh *ocular larva migran*. Bila infeksi terjadi lebih berat maka larva *Toxocara spp* dapat mencapai otak (Havasiova-Reiterova *et al.*, 1995; Hubner *et al.*, 2001).

Toxocariasis ditularkan pada manusia secara *per oral*, melalui makanan dan minuman yang terkontaminasi telur infeksius *T. cati* yang mengandung larva stadium dua (L₂). Sumber infeksi utama pada manusia, khususnya anak-anak adalah dari tanah yang terkontaminasi telur infeksius (Mark, 1991; Radman *et al.*, 2000; Alonso *et al.*, 2000).

Siklus hidup *T. cati* pada hospes transpor termasuk manusia diawali dari tertelannya telur infeksius yang mengandung L₂. *Toxocara cati* mempunyai hospes definitif anak kucing dan kucing jantan dewasa. Telur akan menetas dan mengeluarkan L₂ lalu penetrasi pada mukosa usus halus bagian proksimal, kemudian terbawa sistem sirkulasi melalui sistem portal menuju hati. Pada tubuh

hospes definitif L₂ jaringan akan terbawa kembali ke dalam usus halus menjadi larva stadium ketiga (L₃) kemudian berkembang menjadi larva stadium keempat (L₄). Larva keempat akan menjadi dewasa dalam lumen usus halus. Larva yang berada di jaringan dan organ tubuh yang tidak kembali ke usus halus biasa disebut L₂ dorman. Larva kedua dorman dapat ditemukan pada jaringan somatik, organ paru, hati, ginjal, mata, bahkan dapat mencapai otak (Levine, 1978; Kilpatrick, 1992; Havasiova-Reiterova *et al.*, 1995).

Larva kedua bila berada pada hospes transpor tidak akan berkembang menjadi L₃. Hewan yang bertindak sebagai hospes transpor adalah cacing tanah, kecoa, ayam, anjing, anak kambing, terutama mencit, jadi larva kedua statis menetap dalam jaringan (Levine, 1978).

Diagnosis toxocariasis secara konvensional dengan pemeriksaan feses dari hospes transpor sampai saat ini sulit dilakukan. Telur cacing ataupun cacing dewasa *T. cati* tidak pernah didapatkan pada sediaan yang diperiksa. Diagnosis berdasarkan gejala klinis juga sulit dijadikan pegangan, mengingat banyaknya variasi gejala yang ditimbulkan oleh infeksi ini. Masalah-masalah tersebut perlu diatasi dengan melakukan uji lain yang lebih spesifik, yakni dengan uji serologis atau imunologis, salah satunya menggunakan teknik *Western blot* terhadap protein antigen *T. cati*.

Kusnoto (2003) telah melakukan analisis protein antigen dari L₂ telur infeksius dan cacing dewasa *T. cati* dengan teknik *Western blot*. Hasil yang didapatkan berupa pita ikatan antigen dan antibodi pada BM 30,3 kDa dan 24,0 kDa. Lebih lanjut dinyatakan bahwa penelitian tentang protein antigen L₂

jaringan cacing *T. cati* untuk diagnosis imunologis belum dilakukan sehingga perlu dikembangkan penelitian lebih lanjut.

Penelitian ini mencoba untuk mengetahui karakteristik protein L₂ jaringan cacing *T. cati* dengan metode SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*). Hasil analisis yang didapat masih berupa *crude protein*, kemudian direaksikan dengan antibodi poliklonal anti-L₂ jaringan *T. cati* menggunakan teknik *Western blot*. Hasil tersebut diharapkan nantinya dapat dikembangkan sebagai bahan diagnostik toxocariasis secara serologis atau imunologis.

1.2 Rumusan Masalah

Dari uraian latar belakang di atas maka masalah penelitian yang dapat dirumuskan adalah bagaimana karakteristik protein spesifik L₂ jaringan cacing *T. cati* bila direaksikan dengan antibodi poliklonal anti-L₂ jaringan menggunakan teknik *Western blot*?

1.3 Landasan Teori

Berdasarkan siklus hidup *T. cati* yang kompleks, pengamatan terhadap protein antigen cacing tersebut bisa dilakukan pada stadium telur, larva (L₁, L₂, L₃, L₄) maupun cacing dewasa. Pada telur cacing protein antigenik dapat diperoleh dari kulit telur (*egg shell*), membrana vitelin atau *granular layer*, sedangkan pada stadium larva dan dewasa yang sering digunakan adalah E-S

antigen, antigen somatik, *surface antigen*, homogenat larva dan homogenat cacing dewasa (Safar *et al.*, 1992; el-Massry, 1999; Abdel-Rahman *et al.*, 2000).

Larva kedua jaringan merupakan larva migran yang berasal dari saluran usus kemudian masuk ke dalam *portal hepatic system*, hati, paru dan organ *visceral* lain. Telur infeksi yang mengandung L₂ dan cacing dewasa *Toxocara vitulorum* dapat dikenali oleh sistem imun tubuh hospes, sehingga dapat memicu terbentuknya antibodi (Starke *et al.*, 1996 dikutip oleh Kusnoto, 2003). Larva kedua jaringan *T. cati* sangat dimungkinkan untuk dapat dikenali perangkat imun tubuh hospes, sehingga nantinya dapat memicu terbentuknya antibodi yang lebih kuat.

Kusnoto (2003) telah melakukan analisis protein pada L₂ telur infeksi *T. cati* yang direaksikan dengan antibodi poliklonal anti-L₂ *T. cati* yang berasal dari kelinci, dengan menggunakan teknik *Western blot*. Hasil analisis protein pita ikatan antigen dan antibodi ditunjukkan BM 30,3 kDa dan 24,0 kDa. Hasil tersebut berarti bahwa ekstrak larva infeksi dapat digunakan sebagai sumber protein dengan imunogenitas dan antigenitas yang tinggi. Analisis protein L₂ jaringan *T. cati* dengan metode *Western blot*, untuk mengetahui apakah protein L₂ jaringan mempunyai daya ikat yang tinggi terhadap antibodi poliklonal anti-L₂ jaringan dari serum kelinci. Daya ikat digambarkan dengan terbentuknya pita ikatan antara antigen dan antibodi poliklonal tersebut.

sangat lebar dan bergaris. Ciri khas lain pada cacing genus *Toxocara* yaitu mempunyai sebuah *granula ventriculus posterior* pada dasar esophagus dan tidak mempunyai sekum. Telur cacing *T. cati* berukuran 65-75 mikron (Soulsby, 1986; Kusumamihardja, 1993), berbentuk agak bulat atau subglobular, dinding telurnya sangat tebal karena terbungkus membran khitin sehingga sangat tahan terhadap pengaruh lingkungan yang tidak sesuai (Warren, 1993 dikutip oleh Ulum, 2004).

Habitat cacing *T. cati* biasa terdapat pada usus halus anak kucing dan kucing jantan dewasa, selain itu juga ditemukan pada felidae lain dan mustelidae. Cacing ini juga memiliki hospes transpor yaitu cacing tanah, kecoa, ayam, anak kambing dan tikus (Levine, 1978). Angka kejadian tertinggi terdapat pada anak kucing umur 12-24 minggu, sedangkan pada kucing umur 0-4 minggu tidak pernah dijumpai telur cacing (O'Lorcain, 1994).

2.1.3 Siklus Hidup dan Cara Penularan

Siklus hidup cacing *T. cati* dimulai dari dikeluarkannya telur oleh cacing dewasa bersama feses hospes definitif dan pada umumnya telur yang dikeluarkan adalah telur fertil. Setelah tujuh hari telur fertil ini akan berkembang menjadi larva stadium pertama (L_1), kemudian L_1 akan berkembang menjadi larva stadium kedua (L_2) yang merupakan telur infeksi setelah kurun waktu 21- 28 hari dan dalam pertumbuhannya juga harus didukung oleh lingkungan yang sesuai. Infeksi toxocariasis akan terjadi bila telur infeksi yang mengandung L_2 tersebut tertelan bersama makanan dan minuman. Pada dua hari pertama setelah infeksi, L_2 dapat ditemukan pada dinding lambung, kemudian pada hari ketiga sebagian besar larva

tersebut akan berpindah melalui sistem portal menuju organ hati dan paru yang kemudian akan diteruskan menuju trakhea pada hari kelima. Hari kesepuluh L_2 akan kembali lagi ke lambung dan di tempat ini jumlah larva tersebut akan mengalami peningkatan yang pesat. Pada hari ke-21, L_2 akan memasuki dinding lambung dan jaringan ambing untuk berubah menjadi larva stadium ketiga (L_3) dan selanjutnya berkembang menjadi larva stadium keempat (L_4) yang dapat ditemukan di dinding usus, isi lambung, dan lumen usus, kemudian yang terakhir larva berkembang menjadi cacing dewasa (Levine, 1978). Sebagian L_2 yang bermigrasi ada yang tertinggal dalam organ, sehingga larva tersebut masih dapat ditemukan pada paru, hati, isi usus, dan lambung. Larva kedua juga bisa ditemukan pada jaringan otot tikus, kecoa, ayam, domba dan hewan lain yang terinfeksi oleh telur infeksi (Kusumamihardja, 1993).

Menurut Levine (1978), apabila telur infeksi yang mengandung L_2 menginfeksi selain hospes definitif maka setelah telur menetas dalam lambung akan terjadi *visceral larva migran* dan L_2 akan menetap di organ dalam seperti paru, hati, ginjal, jantung, dapat juga ditemukan dalam jaringan somatik, bahkan bisa terjadi *ocular larva migran* yang kemudian menuju mata dan otak.

Cara penularan atau berpindahnya cacing *T. cati* yang paling utama yaitu melalui air susu induk kepada anaknya (*transmamary transmission*) (Parsons, 1987). Hal ini terjadi apabila L_2 *T. cati* menginfeksi kucing betina dewasa. Larva kedua yang masuk tubuh tidak dapat secara langsung berubah menjadi L_3 , tetapi L_2 harus menunggu sampai kucing betina dewasa tersebut bunting dan

melahirkan. Faktor-faktor penting yang mempengaruhi penularan cacing *T. cati* antara lain umur hewan, jenis kelamin, jenis hospes (Parsons, 1987).

2.2 Toxocariasis

2.2.1 Aspek Zoonosis

Toxocariasis adalah penyakit yang disebabkan oleh cacing nematoda dari genus *Toxocara*. Toxocariasis pada anjing disebabkan cacing *Toxocara canis*, pada sapi disebabkan cacing *Toxocara vitulorum* dan pada kucing disebabkan oleh cacing *Toxocara cati*. Toxocariasis digolongkan sebagai penyakit zoonosis karena selain menginfeksi hewan, *Toxocara spp* juga dapat menginfeksi manusia (Humbert *et al.*, 2001).

Cara penularan ke manusia yaitu melalui makanan dan minuman yang terkontaminasi telur infeksius yang berasal dari feses anak anjing, anak sapi, anak kucing dan kucing jantan dewasa atau bisa juga berasal dari larva yang berada dalam jaringan (otot), maupun air susu (Ito *et al.*, 1986; Alonso *et al.*, 2000; Radman *et al.*, 2000). Kejadian penyakit toxocariasis banyak didapatkan pada anak-anak, karena seringnya kontak dengan tanah yang terkontaminasi, kurang higienis dan makanan yang kotor atau tercemari (Overgaw, 1997 dikutip oleh Ulum, 2004). Kebiasaan kucing menimbun fesesnya dalam tanah akan membuat telur cacing semakin tahan terhadap lingkungan yang tidak sesuai. Kontak langsung dengan hospes definitif tidak dianggap beresiko menimbulkan toxocariasis pada manusia.

2.2.2 Patogenesis

Human toxocariasis memiliki manifestasi klinis berupa *visceral toxocariasis* yang disebabkan oleh *visceral larva migrans* dan *ocular toxocariasis* disebabkan oleh *ocular larva migrans*. Pada anak-anak, gejala klinis yang bisa diamati adalah batuk dan adanya larva di bawah kulit. Pada umumnya gejala klinis *toxocariasis* bervariasi sehingga diagnosis sulit dilakukan, oleh karena itu dibutuhkan diagnosis secara serologis dan imunologis (Pratiwi, 1998; Hubner *et al.*, 2001).

Sindrom *visceral larva migrans*, migrasi larva melalui paru-paru akan menyebabkan *asthma-like reaction* seperti yang terjadi pada *T. canis* dan bisa juga terjadi *pulmonary eosinophilia* (Playfair, 1992; Roitt *et al.*, 1998).

Apabila telur infeksi *Toxocara spp* tertelan oleh hospes, maka telur itu akan menetas dan diikuti penetrasi larva pada mukosa yang akhirnya akan dapat mencapai paru-paru melalui aliran darah, penetrasi larva inilah yang dapat menyebabkan *pneumonitis* yang serius.

Goffete *et al.*, (2000) melakukan suatu penelitian pada wanita umur 40 tahun yang menderita *toxocariasis*, ternyata didapatkan hasil titer antibodi yang lebih tinggi dalam cairan *serebrospinal* dibanding titer antibodi dalam serum. Di samping itu pemeriksaan terhadap cairan *serebrospinal* menunjukkan *eosinophili pleocytosis*, sehingga dapat disimpulkan *toxocariasis* dapat mengakibatkan hipersensitivitas sampai pada *spinal cord*. Selain itu migrasi larva cacing nematoda juga menyebabkan *pyogenic liver absces* ini terjadi pada negara-negara tropis (Rayes *et al.*, 2001).

2.2.3 Diagnosis Toxocariasis

Diagnosis toxocariasis dapat dilakukan dengan beberapa pemeriksaan, antara lain dengan metode konvensional atau menemukan telur cacing *T. cati* pada feses. Diagnosis tersebut hanya dapat dilakukan pada hospes definitif yaitu anak kucing dan kucing jantan dewasa, sedangkan pada hewan selain hospes definitif seperti kucing betina dewasa dan hewan lain maupun pada manusia yang merupakan hospes transpor tidak dapat dilakukan pemeriksaan feses, karena telur cacing tidak pernah ditemukan pada sediaan yang diperiksa (Warren, 1993 dikutip oleh Kusnoto, 2003).

Diagnosis toxocariasis yang lain yaitu dengan berdasarkan gejala klinis, tetapi hal ini sulit dilakukan karena gejala yang ditimbulkan toxocariasis sangat bervariasi, tidak spesifik dan organ yang diinvasi berganti-ganti (Uga *et al.*, 1990; Prokopowicz and Sosnowska, 1990).

Diagnosis lain melalui pemeriksaan serologik diperlukan untuk mendeteksi toxocariasis pada hospes transpor (Petithory *et al.*, 1994 dikutip oleh Kusnoto, 2003). Beberapa metode yang dapat digunakan untuk imunodiagnosis pada infeksi nematoda adalah: 1) uji aglutinasi cepat; 2) imunodifusi; 3) immunoelektroforesis; 4) ELISA; 5) immunoblotting; 6) imunohistokimia (Warren, 1993 dikutip oleh Kusnoto 2003).

2.3 Antigen Parasit

Definisi dari antigen adalah substansi yang dapat dikenali sistem imun tubuh sebagai benda asing (*non self*) yang diukur berdasarkan keberhasilan mengikat antibodi. Antigen yang bersifat antigenik sebaiknya memiliki molekul harus besar dan susunan kimiawi kompleks, agar lebih mudah mengikat antibodi (Rantam, 2003).

Definisi protein antigen adalah zat asing, protein asing atau organisme asing yang dapat menimbulkan respon imun. Protein merupakan kelompok senyawa yang terbesar dan terdapat sebagai biomolekul, yaitu sekitar 50% berat kering senyawa organik total yang terdapat dalam sel. Protein merupakan makromolekul dengan struktur yang kompleks dan berperan sebagai antigen yang jauh lebih baik dari pada polimer besar sederhana, misalnya lemak, karbohidrat, dan asam nukleat dan polimer satu asam amino (Baratawidjaja, 2000).

Imunogen adalah bagian dari antigen yang diukur berdasarkan kemampuannya memicu sistem imun adaptif untuk menghasilkan antibodi (Abbas *et al.*, 2000). Adapun molekul dikatakan bersifat imunogen bila terjamin keasingannya dan mempunyai berat molekul lebih dari 5 kDa, dan untuk molekul yang lebih kecil dikatakan imunogenik bila terkait pada makromolekul sebagai karier (Tizard, 1982; Manus, 1986). Antigen parasit akan menjadi imunogen apabila dikenali sebagai *non self* dengan berat molekul tertentu. Secara kimiawi zat imunogen parasit dapat berupa protein, lipida, karbohidrat, glikoprotein dan glikolipida yang masing-masing mempunyai karakteristik ukuran, susunan rantai,

dan jumlah determinan yang mungkin berbeda (Anders, 1982 dikutip oleh Pratiwi, 1998).

Dalam siklus hidupnya, cacing *T. cati* mengalami beberapa stadium dan masing-masing stadium itu memiliki perangkat antigen yang berbeda, hal ini berguna untuk menghindari sistem imun tubuh hospes. Perbedaan struktur morfologi pada berbagai stadium tersebut menyebabkan perbedaan imunogenitas dalam memicu terbentuknya antibodi (Warren, 1993 dikutip oleh Ulum, 2004).

Pada telur cacing, protein antigenik dapat diperoleh pada kulit telur (*egg shell*), membran vitelin (*vitelline membrane*) dan *granular layer*. Pada stadium larva dan dewasa, protein antigenik dapat diperoleh dari E-S *antigen*, selain itu juga ada beberapa sumber antigen lain misalnya: antigen somatik, *surface antigen*, ekstrak larva dan ekstrak cacing dewasa (Bowman *et al.*, 1987; Safar *et al.*, 1992; Starke *et al.*, 1996; el-Massry, 1999; Abdel-Rahman *et al.*, 2000).

Berdasarkan sumber dan lokasi parasit, antigen terbagi menjadi beberapa macam antara lain: 1). Eksoantigen yang berasal dari parasit hidup atau dalam media buatan merupakan produk ekskresi berupa metabolit; 2). Somatik antigen terlarut yang berasal dari cacing stadium dewasa atau larva yang hancur atau dari sel permukaan tubuh parasit; 3). Parasit yang mati atau fragmen larva cacing. Berdasarkan stadium dan siklus hidup maka antigen dibagi menjadi: 1). Spesifikasi genus, spesies, *strain* dan stadium hidup; 2). Parasit yang mengalami perubahan bentuk (Tizard, 1982; Page *et al.*, 1991; el-Massry, 1999; Warren, 1993 dikutip oleh Kusnoto, 2003).

2.4 Antibodi

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 spesies lain. Berat molekul antibodi pada umumnya berkisar antara 95.000 Da sampai 150.000 Da 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.

2.5 Karakterisasi Protein *Toxocara cati*

Karakterisasi protein dapat dilakukan dengan teknik elektroforesis. Elektroforesis merupakan metode pemisahan yang mempunyai prinsip kerja menggunakan perbedaan kecepatan gerak partikel-partikel bermuatan bila partikel tersebut terdapat dalam suatu medan listrik (Wongsosupantio, 1990). Metode ini sering digunakan untuk karakterisasi protein antigen, selain itu juga untuk mengetahui titik isoelektrik dengan IEF (*iso electric focusing*) (Rantam, 2003).

Metode elektroforesis yang dapat digunakan untuk karakterisasi protein antigen ada beberapa teknik yaitu SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis*), *Western blot*, *Dot blot* dan elusi. Setiap metode elektroforesis tersebut mempunyai aplikasi yang berbeda menurut tujuan dan kebutuhan yang akan dikehendaki (Ahadianto, 2004).

Metode SDS-PAGE digunakan untuk menentukan berat molekul protein antigen. Metode ini menggunakan gel *polyacrilamide* dan detergen ionik *sodium dodecyl sulphate*. Penggunaan *polyacrilamide* dalam teknik ini memiliki keuntungan yaitu menghindarkan pita yang cembung pada gel (Wongsosupantio, 1990). Metode SDS-PAGE memiliki kelemahan mengingat protein yang dideteksi ditampilkan dalam bentuk umum, baik protein spesifik maupun protein non spesifik (Rantam, 2003).

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 poliklonal. 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).

Kecuntungan 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*, *colorimetric* pada uji enzim dan *ligand binding assay*. Prinsip kerja dari *Western blot* yaitu protein yang mempunyai berat molekul beragam, pertama kali dianalisis dengan SDS-PAGE, sehingga protein dengan berat molekul yang berbeda akan terpisah pada area gel. Kemudian dilanjutkan dengan mentransfer susunan protein yang terpisah tersebut dari gel ke membran nitroselulose yang sesuai dan akhirnya dilabel 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, 1988).

BAB III

METODE PENELITIAN

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan kurang lebih enam bulan, sejak awal bulan Juni hingga November 2004. Tempat penelitian dilakukan di Laboratorium Helmintologi bagian Parasitologi Veteriner dan di Laboratorium Virologi bagian Mikrobiologi Veteriner, FKH Unair Surabaya, serta di *Tropical Disease Center* (TDC) Universitas Airlangga Surabaya.

3.2 Bahan Penelitian

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini larva kedua (L₂) jaringan dari cacing *T. cati*. Larva kedua jaringan ini didapat dari mencit yang sebelumnya telah diinfeksi buatan dengan telur infeksi yang mengandung L₂ cacing *T. cati*. Telur cacing *T. cati* diperoleh dari kucing yang menderita toxocariasis yang berasal dari beberapa tempat dan pasar di kota Surabaya.

Bahan kimia dan bahan-bahan lain yang digunakan dalam penelitian yaitu: kloroform, kaporit 0,5%, formalin 10%, *phosphate buffer saline* (PBS) dengan pH 7,2, *aquadest*, 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* 10% terdiri dari *Acrylamide* (Merk) 0,66 ml, Tris-HCl (Promega) pH

6,8, SDS 0,5% 0,8 ml, *aquadest* 0,74 ml, TEMED (Bio-rad) 4 μ l, Amoniumpersulfat (Promega) 10% 20 μ l. Larutan penyangga *separating gel* 12% pH 8 (*Acrylamide* 2,5 ml; Tris HCl pH 8,8 1,2 ml; SDS 0,5 % 1,2 ml; *aquadest* 1,1 ml; TEMED 50 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% 50 μ l; *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), antibodi poliklonal, konjugat (Sigma), *Western blue* (Promega), *Bovine Serum Albumin* (Promega) 10%.

3.3 Alat-Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: gelas objek, gelas penutup, cawan petri, *sput disposable*, jarum trokar, corong, mortir, penggerus, tabung reaksi, tabung plastik, sentrifus, penyaring teh, filter ukuran 25 μ m, pipet plastik, penyemprot, mikroskop *inverted*, mikroskop cahaya, seperangkat sonikator, sonde, beker gelas, pinset, pisau scalpel, gunting bedah, nampan plastik, nampan aluminium, alat penimbang digital, inkubator dan *freezer* bersuhu -30°C, *chamber* untuk running SDS-PAGE, membran nitroselulose, *electrophoresis equipment* (SDS-PAGE), *trans blotter* (Bio-red), kertas

terletak di antara larutan sukrosa konsentrasi 30% dan konsentrasi 35%, telur diambil dengan spuit berjarum trokar kemudian disaring menggunakan saringan berdiameter 25 μm (T 200), lalu dipindahkan ke cawan petri yang berisi PBS 10% dan diberi beberapa tetes formalin 10% untuk mencegah pertumbuhan mikroorganisme pengganggu. Telur yang diperoleh diinkubasi pada suhu ruang sampai menjadi L₂ telur infeksius selama 21-28 hari. Selama proses inkubasi, telur diamati setiap hari untuk mengetahui perkembangannya dan mengawasi adanya pertumbuhan mikroorganisme pengganggu. Cawan petri harus selalu ditambah dengan PBS 10%, agar telur di dalam cawan mendapatkan zat makanan yang cukup (Ahadianto, 2004).

3.4.2 Tahap Isolasi L₂ Jaringan Cacing *T.cati* dari Mencit

Isolasi L₂ jaringan *T. cati* diawali dengan melakukan proses infeksi buatan pada mencit sebagai salah satu hospes tranpor. Telur infeksius mengandung L₂ yang akan diinfeksi adalah hasil isolasi sebelumnya.

Mencit sebanyak 13 ekor selanjutnya diinfeksi secara *per oral* menggunakan sonde dengan dosis 1200 butir/ekor, lalu dipelihara selama 3-4 hari. Mencit dirawat dan diamati setiap hari. Kemudian mencit dieutanasia dengan eter dan dibedah untuk diambil organ saluran pencernaan, organ *visceral* (hati, jantung, ginjal dan paru-paru) dan jaringan somatik. Bagian-bagian organ tersebut diiris tipis-tipis dan dicuci pada PBS 10% kemudian direndam dalam larutan tripsin 1% pada tempat yang berbeda. Organ-organ tersebut diinkubasi pada suhu 37°C agar L₂ jaringan dapat lepas. Setiap 30 menit organ dikeluarkan

dari inkubator untuk diambil L₂ jaringan yang lepas, lalu diinkubasi lagi demikian sampai L₂ jaringan habis. Larva kedua jaringan hasil isolasi diletakkan dalam tabung plastik, ditutup rapat dan disimpan dalam *freezer* suhu -30°C .

3.4.3 Tahap Pembuatan *Whole Extract Larva Kedua (L₂) Jaringan T.cati*

Larva kedua jaringan *T. cati* yang telah diisolasi, ditambah PBS 10% lalu dihancurkan dengan sonikator 3 kali dalam waktu 1 menit dengan interval istirahat 1 menit dan frekuensi 30 KHz. Sonikasi ini dikatakan berhasil bila L₂ jaringan hancur lebih dari 90% menjadi homogenat. Hasil dari sonikasi tersebut kemudian disentrifus kembali dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit, setelah itu supernatan diambil dimasukkan *microtube* dan disimpan dalam *freezer* -30°C . Hasil berupa homogenat ditera kadar proteinnya, sebagian digunakan pembuatan antibodi poliklonal anti-L₂ jaringan *T. cati*, sisanya dianalisis dengan metode SDS-PAGE yang nanti dipakai sebagai acuan untuk melakukan teknik *Western blot*.

3.4.4 Tahap Pembuatan Antibodi Poliklonal pada Kelinci

Antibodi poliklonal dibuat dengan cara menginjeksikan homogenat L₂ jaringan cacing *T. cati* pada kelinci jantan. Kelinci yang dipakai sebanyak empat ekor, ras angora dengan umur 3 bulan. Injeksi dilakukan secara subkutan dengan dosis 1000 $\mu\text{g/ekor}$. Imunisasi dilakukan sebanyak empat kali dengan interval dua minggu. Imunisasi pertama ditambahkan CFA (*Complete Freund's adjuvant*) dengan perbandingan 1:1, penyuntikan selanjutnya ditambahkan dengan IFA

(*In Complete Freund's adjuvant*) dengan perbandingan 1:1. Dua minggu setelah *booster* terakhir dilakukan pengambilan darah kelinci, kemudian disentrifus untuk mendapatkan serum yang mengandung antibodi poliklonal anti-L₂ jaringan *T.cati*. Titer antibodi diukur dengan uji ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) (Rantam, 2003).

3.4.5 Tahap Analisis Protein dengan Teknik SDS-PAGE

Gel pemisah (akrilamid) dimasukkan pada *glass plate* dengan posisi vertikal, dilanjutkan dengan pemberian butanol di atas *glass plate* sampai mengeras (*separating gel*). Butanol dibuang dan dibersihkan dengan PBS, kemudian dikeringkan dengan kertas *Whatmann*. Setelah itu ditambahkan *stacking gel* 10%, *comb* dimasukkan tepat di atas gel diantara *glass plate* dan tunggu sampai mengeras sehingga gel siap digunakan.

Setelah gel siap, *comb* diangkat dengan hati-hati dan dicuci dengan larutan penyangga. Sampel sebanyak 15 µl dicampur dengan *Laemmli buffer* dengan perbandingan 1:1 kemudian dipanaskan dalam *Waterbath* 100°C selama 5 menit. *Glass plate* diletakkan pada *frame* dan dimasukkan ke dalam bak elektroforesis (*chamber*). Bak elektroforesis diisi larutan penyangga elektroforesis (*running buffer*) dan sampel dimasukkan pada sumuran (*stacking gel*) sebanyak 15 µl. Elektroforesis dijalankan pada kondisi voltase 125 V, 40 mA selama 1-2 jam, hingga reaksi gel mencapai dasar gel. Elektroforesis kemudian dimatikan, plate dibuka dan gel hasil *running* dicuci dengan larutan buffer sebanyak tiga kali. Pencucian pertama menggunakan 25 ml metanol 50%, 3,75 ml asam asetat 7,5 %

dan 21,25 ml *aquadest* selama 30 menit, kedua dengan 2,5 ml metanol 5%, 3,75 ml asam asetat 7,5 % dan 93,75 ml *aquadest* selama 20 menit dan pencucian ketiga menggunakan glutaraldehid 10% selama 25 menit. Selanjutnya gel dipersiapkan untuk karakterisasi protein dengan teknik *Western blot* (Rantam, 2003).

3.4.6 Tahap Analisis Protein dengan Teknik *Western blot*

Gel yang mengandung fragmen protein yang terpisah berdasarkan berat molekulnya dilepas dari *glass plate*. Lima kertas *Whatmann* disusun dan dipotong dengan ukuran 10 x 12 cm dibasahi dengan *buffer* transblot, selanjutnya gel PAGE diletakkan di atas kertas *Whatmann* sebanyak lima potong yang tersusun dan diratakan sehingga tidak ada udara di bawah gel, demikian juga membran nitroselulose diletakkan di atas gel dan diratakan sehingga di bawah membran bebas udara, kemudian lima potong kertas *Whatmann* diletakkan di atas membran nitroselulose yang dibasahi dengan *buffer transblot*, sehingga membran nitroselulose kedua sisinya diapit oleh masing-masing lima potong kertas *Whatmann*.

Fastblot ditutup kemudian arus listrik positif-negatif dinyalakan pada tegangan 125 V dan arus listrik 40 mA. Proses transfer protein ini membutuhkan waktu 24 jam (*over night*). Setelah 24 jam, membran yang mengandung fragmen protein dicuci tiga kali dengan *washing buffer* dan digoyang dalam *waterbath shaker* masing-masing 5 menit. Membran nitroselulose diblok dengan *Bovine*

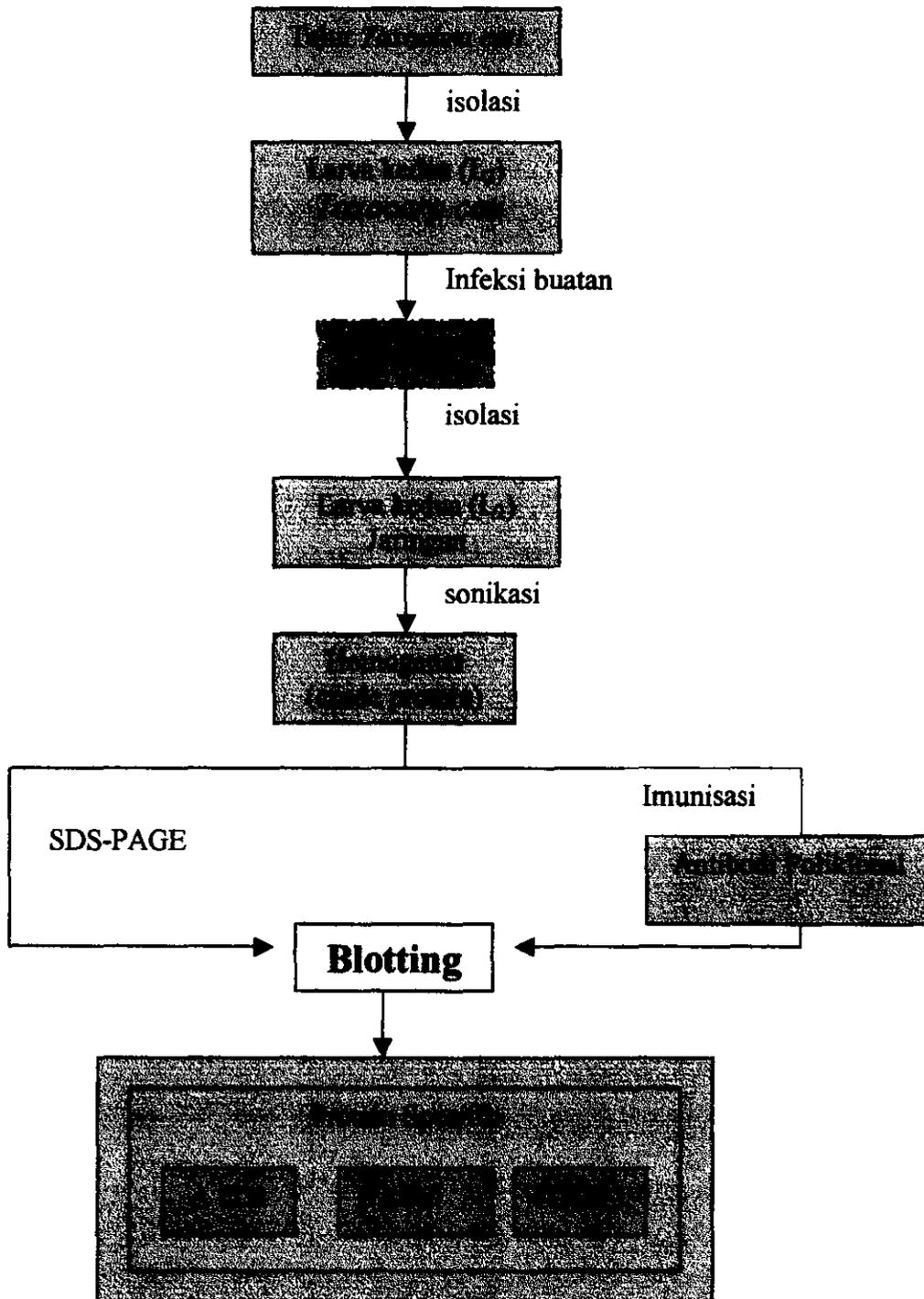
Serum Albumin (BSA) 10 % dan digoyang dalam *waterbath shaker* selama 30 menit.

Membran nitroselulose dicuci kembali dengan *washing buffer* tiga kali masing-masing 5 menit digoyang dalam *waterbath shaker* dan direaksikan dengan antibodi pertama (antibodi poliklonal) dengan pengenceran 1:100, kemudian digoyang dengan *waterbath shaker* selama 30 menit. Membran nitroselulose dicuci kembali dengan *washing buffer* tiga kali masing-masing selama 5 menit digoyang dalam *waterbath shaker*, kemudian reaksi dengan antibodi kedua atau konjugat (*antirabbit*) dengan pengenceran 1:1000. Membran dicuci lagi dengan *washing buffer* tiga kali masing-masing selama 5 menit digoyang dalam *waterbath shaker*, kemudian divisualisasikan dengan pewarnaan *Western blue* dan digoyang dalam *waterbath shaker* secara horizontal sampai timbul warna, kemudian reaksi dihentikan dengan pemberian *aquadest*, jika warna sudah kuat maka membran diangkat dan dikeringkan dengan udara. Membran nitroselulose yang terlihat ada pita (*band*) dapat disimpan sebagai dokumen.

Berat molekul protein antigen ditentukan melalui persamaan regresi linier berdasarkan nilai *Rf* (*Retardation factor*) dari setiap pita yang terbentuk pada teknik *Western blot*.

Berat molekul protein antigen sebagai fungsi Y sedangkan nilai *Rf* adalah fungsi X pada persamaan $Y = a + bX$. Nilai *Rf* didapatkan melalui pembagian antara jarak pergerakan protein dari tempat awal dan jarak pergerakan warna dari tempat awal (Rantam, 2003; Sudjana, 2001 dikutip oleh Ulum, 2004).

3.5 Tahapan Penelitian



Gambar 3.1 Skema Tahapan Penelitian

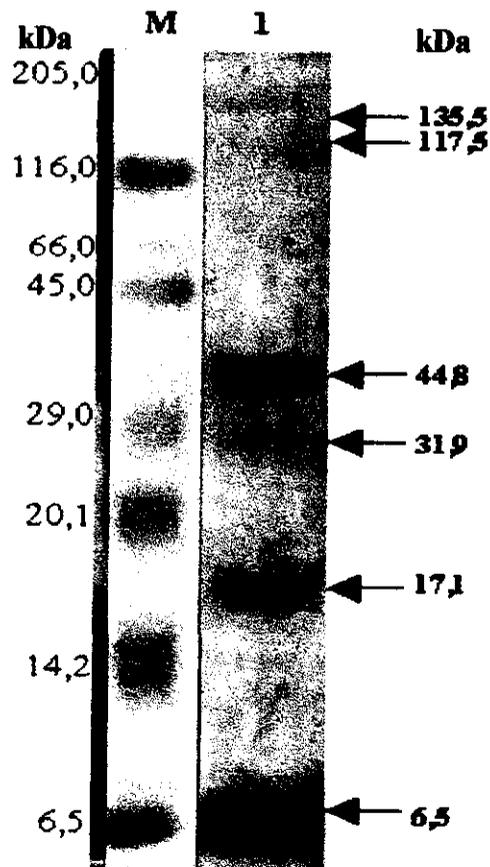
BAB IV

HASIL PENELITIAN

BAB IV

HASIL PENELITIAN

Analisis fraksi protein terhadap L₂ jaringan cacing *T. cati* yang direaksikan dengan antibodi anti-L₂ jaringan menggunakan teknik *Western blot*, diperoleh hasil berturut-turut dari atas ke bawah berupa enam buah pita protein L₂ jaringan *T. cati*. Gambaran selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Hasil karakterisasi protein *T. cati* dengan antibodi poliklonal anti-L₂ Jaringan dari serum kelinci menggunakan teknik *Western blot*. M= marker; kolom 1= L₂ Jaringan *T. cati*.

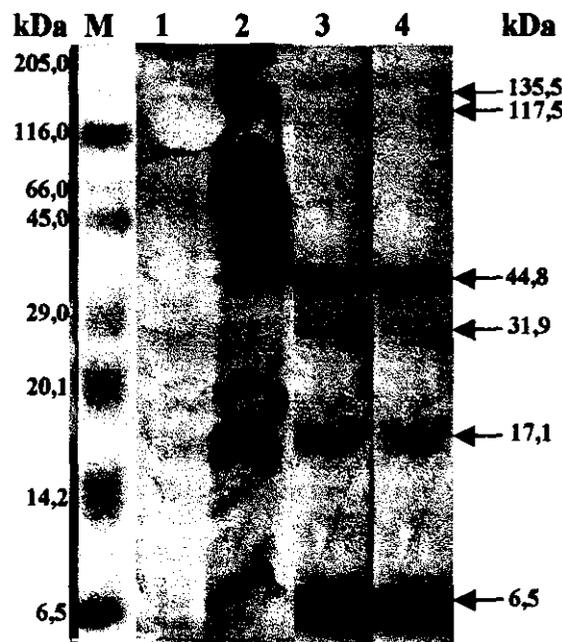
Pada penelitian ini pita-pita protein pada marker mempunyai persamaan regresi linier $Y = 5,237 + 1,549X$. Perhitungan dilakukan melalui program SPSS (*statistical program for social society*) for windows, yang menunjukkan korelasi negatif dengan nilai $r = -0,981$, a (*intercep*)= 5,273 dan b (*slope*)= -1,549. perhitungan selengkapnya dapat dilihat pada Lampiran 1.

Hasil analisis protein dari L₂ jaringan cacing *T. cati* didapatkan enam macam pita protein yaitu masing-masing dengan berat molekul (BM) 135,5 kDa, 117,5 kDa, 44,8 kDa, 31,9 kDa, 17,1 kDa, 6,5 kDa.

Diantara enam fraksi protein tersebut pita protein dengan BM 44,8 kDa, 17,1 kDa dan 6,5 kDa terlihat lebih tebal warna pita protein yang terbentuk, sedangkan protein lainnya terlihat lebih tipis dengan intensitas warna yang rendah.

BAB V

PEMBAHASAN



Gambar 5.1 Hasil karakterisasi protein *T. cati* dengan antibodi poliklonal anti-L₂ Jaringan dari serum kelinci menggunakan teknik *Western blot*. M=marker; kolom 1= Ekskretori-sekretori *T. cati*; kolom 2= cacing dewasa *T. cati*; kolom 3=L₂ *T. cati* ; kolom 4 = L₂ Jaringan *T. cati*. Diambil dari laporan penelitian Kusnoto, 2004.

Pita protein antigen L₂ telur infeksiif tampak pada BM 135,5 kDa, 117,5 kDa, 44,8 kDa, 31,9 kDa, 17,1 kDa dan 6,5 kDa. Protein antigen cacing dewasa *T. cati*, mempunyai pita protein pada BM 135,5 kDa, 117,5 kDa, 44,8 kDa dan 17,1 kDa, sedangkan protein dengan BM 31,9 kDa dan 6,5 kDa tidak ditunjukkan pada kolom ini. Protein antigen dari E-S *T. cati* pita protein yang terbentuk tidak begitu jelas, sehingga sulit untuk membandingkannya dengan protein antigen L₂ jaringan.

Perbedaan pita protein dengan BM 31,9 kDa dan 6,5 kDa pada antigen cacing dewasa *T. cati*, disebabkan perbedaan struktur morfologi dari stadium cacing dewasa dan L₂ jaringan, sehingga imunogenitas dan konsentrasi protein yang dihasilkan juga berbeda. Ikatan yang terjadi pada protein BM 31,9 kDa dan

6,5 kDa memberi arti bahwa antibodi yang direaksikan sesuai dengan antigen yang digunakan, atau dapat disimpulkan bahwa antigen yang berikatan dan menunjukkan pita protein bersifat imunogen (Maria, 2003).

Persamaan pita protein pada BM 135,5 kDa, 117,5 kDa, 44,8 kDa dan 17,1 kDa pada berbagai stadium, menunjukkan bahwa di dalam antigen cacing dewasa dan L₂ telur infeksi *T. cati* mengandung protein yang sama dengan protein antigen L₂ jaringan *T. cati*, sehingga dapat berikatan dengan antibodi anti-L₂ jaringan *T. cati* dan membentuk pita protein. Hal ini dapat disimpulkan bahwa pita protein dengan BM 135,5 kDa, 117,5 kDa, 44,8 kDa dan 17,1 kDa pada L₂ jaringan memiliki imunogenitas yang tinggi dan berpotensi untuk dijadikan bahan diagnostik toxocariasis (Kusnoto, 2003).

Protein antigen E-S *T. cati* tidak dapat membentuk pita protein yang jelas, sehingga sulit menentukan BM protein di dalamnya. Ikatan antara antigen dan antibodi yang tidak terbentuk, menunjukkan bahwa konsentrasi protein dalam E-S tidak sesuai dengan konsentrasi antibodi yang direaksikan. Konsentrasi protein antigen yang digunakan sangat berpengaruh terhadap imunogenitas dari antigen (Abbas *et al.*, 2000).

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

Beberapa faktor yang mempengaruhi efektivitas *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 antigen secara radiografi, enzimatis dan imunologis (Artama, 1991 dikutip oleh Maria, 2003).

Mengingat perhitungan menggunakan regresi linier 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).

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil yang diperoleh dari identifikasi protein L₂ jaringan cacing *Toxocara cati* yang setelah ditambahkan antibodi poliklonal anti-L₂ jaringan dari serum kelinci menggunakan teknik *Western blot*, didapatkan enam fraksi protein spesifik dengan berat molekul 135,5 kDa, 117,5 kDa, 44,8 kDa, 31,9 kDa, 17,1 kDa, dan 6,5 kDa.

6.2 Saran

Saran yang dianjurkan dari hasil penelitian ini adalah perlu adanya penelitian lebih lanjut dari keenam pita protein tersebut, untuk identifikasi protein murni agar nantinya dapat dijadikan sebagai bahan diagnostik toxocariasis secara serologis atau imunologis.

RINGKASAN

Andriani. "Karakterisasi protein larva kedua (L₂) jaringan cacing *Toxocara cati* dengan menggunakan metode *Western blot*". Penelitian ini dilaksanakan di bawah bimbingan Kusnoto, M.Si., Drh. sebagai pembimbing pertama dan Hana Eliyani, M.Kes., Drh. sebagai pembimbing kedua.

Toxocariasis yang disebabkan cacing *T. cati* merupakan salah satu penyakit yang terpenting yang disebabkan oleh cacing nematoda. Penyakit ini bersifat zoonosis, karena dapat menginfeksi manusia. Hospes definitif cacing *T. cati* adalah anak kucing dan kucing jantan dewasa. Sumber infeksi utama pada manusia adalah dari tanah yang terkontaminasi telur infeksi. Infeksi pada manusia dibedakan menjadi dua yaitu *visceral* dan *ocular larva migran*.

Diagnosis toxocariasis secara konvensional dengan pemeriksaan feses dari hospes transpor sampai saat ini sulit dilakukan. Telur cacing dan cacing dewasa *T. cati* tidak pernah didapatkan pada sediaan yang diperiksa. Diagnosis berdasarkan gejala klinis juga sulit dijadikan pegangan, mengingat banyaknya 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*.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui dan memperoleh karakteristik protein spesifik L₂ jaringan cacing *T. cati* dengan menggunakan metode *Western blot*.

Larva kedua jaringan cacing *T. cati* diisolasi dari mencit yang mendapat infeksi buatan *T. cati*. Setelah 3-4 hari mencit dieutanasia memakai eter, kemudian dibedah untuk diambil saluran pencernaan, organ *visceral* (hati, jantung, ginjal dan paru-paru) dan jaringan somatik. Organ tersebut diiris tipis, dicuci dalam larutan PBS 10%, direndam dalam larutan tripsin 1% dan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C, agar L₂ jaringan yang berada dalam organ dapat dikoleksi.

Whole extract L₂ jaringan cacing *T. cati* didapatkan melalui proses sonikasi sampai menjadi homogenat, kemudian ditera untuk mengetahui kadar protein di dalamnya. Sebagian homogenat digunakan untuk pembuatan antibodi poliklonal anti-L₂ jaringan, sisanya untuk 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 ditransfer ke membran nitroselulose menggunakan teknik *Western blot*, kemudian membran direaksikan dengan antibodi poliklonal dan divisualisasikan dengan pewarnaan *Western blue*.

Dari hasil penelitian diatas didapatkan enam macam pita protein L₂ jaringan *T. cati* dengan berat molekul 135,5 kDa, 117,5 kDa, 44,8 kDa, 31,9 kDa, 17,1 kDa, dan 6,5 kDa.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, disarankan adanya penelitian lanjutan terhadap keenam pita protein yang dihasilkan, untuk mengidentifikasi protein murni dari L₂ jaringan cacing *T. cati* tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A. K., A. H. Lichtman and J. S. Pober. 2000. *Cellular and Molecular Immunology*. 4th ed. Saunders Company. Philadelphia.
- Abdel-Rahman, E. H., K. N. Abdel-Megeed and M. A. Hassanain. 2000. Structural Characterization and Immunocatalization of Egg Antigen Cross-React with *Toxocara vitulorum*, *Fasciola gigantica* and *Moniezia expansa*. Abstract. J. Egypt. Soc. Parasitol. 30(2): 581-91.
- Ahadianto, H. 2004. Purifikasi protein spesifik larva kedua (L₂) *Toxocara cati* menggunakan teknik elusi. Skripsi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Alonso, J. M., M. V. Bojanich, M. Chamarro, J. O. Gorodner. 2000. *Toxocara* seroprevalence in children from a subtropical city in Argentina. Abstract. Rev. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 42(4): 235-7.
- Baratawidjaya, K. G. 2000. *Imunologi Dasar*. Balai Penerbit FKUI. Jakarta.
- Bowman, D. D., M. Mika-Grieve and R. B. Grieve. 1987. *Toxocara canis*: Monoclonal Antibodies to Larval Excretory-Secretory Antigen that Bind with Genus and Species Specificity to the Cuticular Surface of Infection Larvae. Exp Parasitol: 64(3): 458-65.
- el-Massry, A. A. 1999. Characterization of Antigenic Property of *Toxocara canis* and *Toxocara leonine* Adults and Larvae Through Immunodiagnostic Electrophoresis (SDS-PGE) and Western Blot Technique. J Egypt Soc Parasitol; 29(2): 335-45.
- 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. 1988. *Antibodies. A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Havasiova-Reiterova, K., O. Tomasovicova and P. Dubinsky. 1995. Effect of Various Doses of Infective *Toxocara canis* and *Toxocara cati* Eggs on Humoral Response and Distribution of Larvae in Mice. Parasitol. Res. 81(1): 13-7.

- Hubner, J., M. Uhlikova, M. Leissova. 2001. Diagnosis of the early phase of larval toxocariasis using IgG avidity. *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* Apr;50(2):67-70.
- Humbert P, Niezborala M, Salembier R, Aubin F, Piarroux R, Buchet S and Barale T. 2000. Skin Manifestations associated with toxocariosis: 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 migran due to ingestion of raw chickens or cow liver. *Nippon Naikagaku 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.* 4thed. Elsevier Science Ltd/Garland Publishing. New York, US.
- Kilpatrick, M. E. 1992. Toxocariasis. In: *Tropical Medicine.* 7th ed. London: W. B. Saunders Company; pp. 761-4.
- Kusnoto. 2003. *Isolasi dan Karakterisasi Protein Immunologi Larva Stadium II Toxocara cati Isolat Lokal.* Tesis. Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga. Hal. 3: 11-13: 14.
- Kusumamihardja, S. 1993. *Parasit dan Parastosis pada Hewan Ternak dan Hewan Piaraan di Indonesia.* PAU Bioteknologi, IPB, Bogor.
- Levine, N. D. 1978. *Textbook of Veterinary.* Burgers Publishing Company. Diterjemahkan oleh: Ashadi G. 1990. Wardiato Ed. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Manus, D. P. M. 1986. Intermediary metabolism in parasitic helminth. In: Howell. *Procc. Of the Sixth International Congress of Parasites.* Pp. 79-89.
- Maria, A.P. 2003. *Provil Protein Antigen Larva stadium kedua (L₂) cacing Toxocara vitulorum.* Skripsi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Marx MB. 1991. Parasites, pets, and people. *Abstract. Prim. Care.* 18(1):153-65.
- O'Lorcain, P. 1994. Epidemiology of *Toxocara spp.* in stary dogs and cat in Dublin. Ireland. *J. Helminthol.* 68(4):331-6.
- Page AP, Richards DT, Lewis JW, Omar HM and Maicel RM. 1991. Comparison of Isolate and Spesies of *Toxocara* and *Toxocaris* by Biosinthetic Labelling of Somatic and ES Protein from Infektif Larvae. *J. Parasitol.* 103: 261-265.

- Parsons J.C. 1987. Ascarid infections of cats and dogs. *Vet. Clin. Noth. Am. Pract.* 17(6): 1307-39.
- Playfair, J. H. L. 1992. *Immunology at a Glance*. 5th Ed. Blackwell Scientific Publications. University Press, Cambridge.
- Pratiwi, T. 1998. Penentuan Protein Immunogen Larva *Toxocara vitulorum* sebagai usaha menentukan metode imunodiagnosis dini *Toxocariasis* pada induk sapi. Disertasi. Program pasca sarjana Universitas Airlangga. Hal. 1-3 : 10-16 : 27-28 : 61-66.
- Prokopowicz, D. and D. Sosnowska. 1990. *Toxocariasis*. Abstrac. *Przegl. Epidemiol.* 44(3): 193-8.
- Radman, N. E., S. M. Archelli, R. D. Fonrouge, M. del V Guardis, 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 Immunologi*. Airlangga University Press. Surabaya. Hal.79-84.
- Rayes, A. A., D. Teixeira, J. C. Serufo, V. Nobre, C. M. Antunes and J. R. Lambertucci. 2001. Human toxocariasis and pyogenic liver abcess: a posible association. *Am J Gastroenterol*; 96(2):563-6.
- Roitt, I., J. Brostoff and D. 1998. *Immunology*. 4th ed. Mosby, Times Mirror International Publiser Limited. Barcelona, Spain.
- Safar, E. H., F. el-Rifaei and K. M. Maklad. 1992. Protein Chromatographic Study on Adult *Ascaris lumbricoides*, *Ascaris vitulorum* and *Toxocara canis*. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 22(1):27-30.
- Soulsby, E. J. L. 1986. *Helminth, Arthropods and Protozoa of Domestic Animals*. Bailliere Tindall and Cassel. London.
- Starke, W. A., R. Z. Machado., G. H. Bechara and M. C. Zocoller. 1996. Skin Hypersensitivity Test in Buffaloes Parasitized with *Toxocara vitulorum*. *Vet Parasitol*; 63(3-4): 283-90.
- Tizard, R. 1982. *An Introduction to Veterinary Immunology*. WB Saunders Company. Diterjemahkan oleh Masduki Partoredjo dan Soehardjo Hardjosworo. 1987. Airlangga University Press. Hal: 303-324.

- Uga, S., T. Matsumura, K. Fujisawa, K. Okubo, N. Kataoka and K. Kondo. 1990. 1990. Incidence of seropositivity to Human Toxocariasis in Hyogo Prefecture, Japan and Its possible role in ophthalmic disease. *Jpn. J. Parasitol.* 39(5):500-502.
- Ulum, M.A. 2004. Gambaran Protein Larva Kedua (L₂) Telur Infektif dan Cacing Dewasa *Toxacara cati*. Skripsi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Wongsosupantio S. 1990. Pedoman Kuliah Elektroforesis Gel Protein. Pusat Antar Universitas-Bioteknologi UGM. Yogyakarta.

Lampiran 1. Regresi Linier Untuk Menentukan Hubungan Antara Nilai Rf Pada *Western blot* dengan Berat Molekul Protein

Tabel Jarak antara gel preparasi dan pita yang terbentuk pada *Western blot*

Jarak	Rf	BM (y kDa)	BM y Da	Log y (Da)
3.0	0.041	205.0	205000	5.312
11.0	0.149	116.0	116000	5.064
18.0	0.243	66.0	66000	4.820
21.0	0.284	45.0	45000	4.653
33.0	0.446	29.0	29000	4.462
42.0	0.568	20.1	20100	4.303
56.0	0.757	14.2	14200	4.152
70.0	0.946	6.5	6500	3.813

Summarize

Case Summaries^a

	RF	log MR (Da)
1	.041	5.312
2	.149	5.064
3	.243	4.820
4	.284	4.653
5	.446	4.462
6	.568	4.303
7	.757	4.152
8	.946	3.813
Total	N	8
	Sum	36.579
	Mean	4.57238
	Std. Deviation	.492032

^a Limited to first 100 cases.

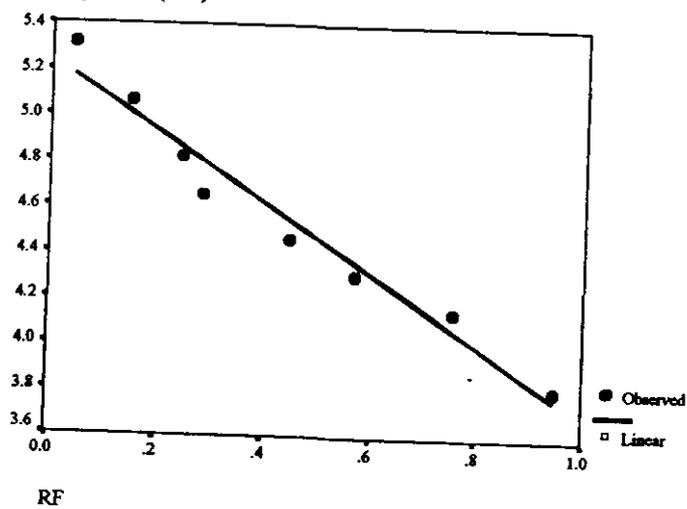
Curve Fit

MODEL: MOD_2.

Independent: RF

Dependent	Mth	Rsqr	d.f.	F	Sigf	b0	b1
MR	LIN	.962	6	152.06	.000	5.2375	-1.5495

log MR (Da)



Regression

Variables Entered/Removed^a

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	RF ^a		Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: log MR (Da)

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.981 ^a	.962	.956	.103546

a. Predictors: (Constant), RF

ANOVA^b

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	1.630	1	1.630	152.060	.000 ^a
	Residual	.064	6	.011		
	Total	1.695	7			

a. Predictors: (Constant), RF

b. Dependent Variable: log MR (Da)

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	5.237	.065		80.344	.000
	RF	-1.549	.126	-.981	-12.331	.000

a. Dependent Variable: log MR (Da)

Berdasarkan perhitungan regresi diketahui bahwa terdapat hubungan negatif sangat erat antara nilai r_f dengan BM protein pada *marker*, koefisien korelasi (r) sebesar -0,981 dengan persamaan garis regresi : $(y) = a + b x$ sehingga diperoleh $(y) = 5,237 - 1,549x$

Persamaan ini digunakan untuk menghitung BM pada sampel yaitu sebagai berikut :

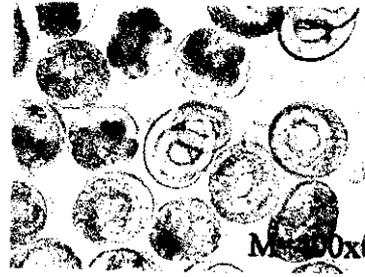
Tabel Berat Molekul Sampel

Jarak (mm)	Rf	log y Da	BM Da	BM kDa
5.0	0.068	5.132	135518.94	135.5
8.0	0.108	5.070	117489.76	117.5
28.0	0.378	4.651	44771.33	44.8
35.0	0.473	4.504	31915.38	31.9
48.0	0.649	4.232	17060.82	17.1
68.0	0.919	3.814	6516.28	6.5

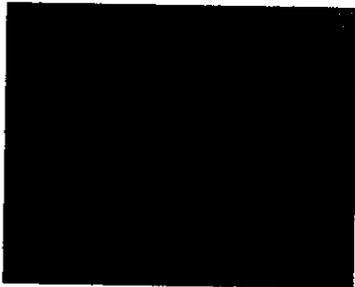
Lampiran 2. Gambar Berbagai Stadium Cacing *Toxocara cati*



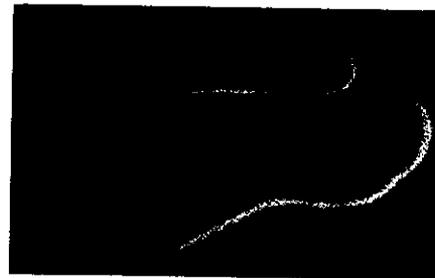
Telur



L₁ dan L₂

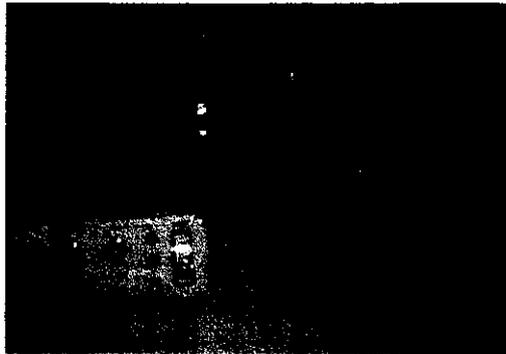


L₂ Jaringan



Cacing dewasa

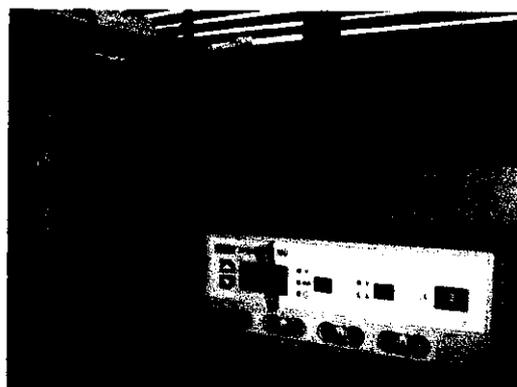
Lampiran 3. Gambar Alat Penelitian



Alat Sonikasi



Alat SDS-PAGE



Alat *Western blot*