

SKRIPSI

**RESPON IMUN HUMORAL PADA KELINCI YANG
DIINFEKSI BUATAN DAN DIIMUNISASI
LARVA STADIUM KEDUA
*Toxocara vitulorum***



Oleh :

NIKMAH YASMIN
SURABAYA – JAWA TIMUR

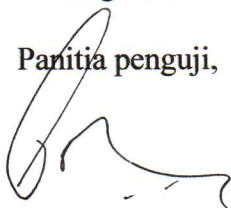
**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

2003

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,



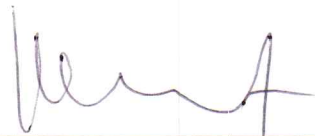
Dr. Setiawan Koesdarto, MSc., drh.

Ketua



Nanik Sianita, SU., drh

Sekretaris



Dr. Fedik A. Rantam, drh

Anggota



Poedji Hastutiek, MSi., drh

Anggota



Prof. Dr. Hj. Sri Subekti, DEA., drh

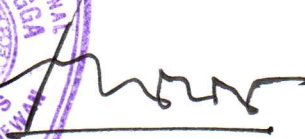
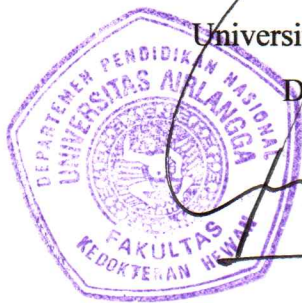
Anggota

Surabaya, 13 Mei 2003

Fakultas kedokteran hewan

Universitas airlangga

Dekan,



Prof. Dr. Ismudiono, MS., drh

NIP. 130 687 297

**RESPON IMUN HUMORAL PADA KELINCI YANG
DIINFEKSI BUATAN DAN DIIMUNISASI
LARVA STADIUM KEDUA
*Toxocara vitulorum***

Nikmah Yasmin

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan menentukan antigenitas dan respon imun protein larva stadium kedua (L₂) *Toxocara vitulorum* baik dalam bentuk telur infeksi maupun dalam bentuk homogenat.

Hewan coba yang digunakan adalah 12 ekor kelinci betina dewasa (*Lepus europaeus*) ras Angora dengan bobot badan rata-rata ± 5 kg dan disain percobaan yang digunakan adalah *The Post-test Only Control Group Design*. Kelinci dibagi menjadi tiga perlakuan yaitu, P₀ = Kontrol Injeksi dengan PBS; P₁ = Infeksi buatan dengan telur infeksi (L₂) *T. vitulorum*; P₂ = imunisasi homogenat L₂ *T. vitulorum*. Pada P₀ kelinci hanya diinjeksi dengan PBS sebanyak 0,6 ml, P₁ diinfeksi buatan dengan telur infeksi (L₂ aktif) *T. vitulorum* sebanyak 1000 butir telur / ekor / oral; P₂ diimunisasi dengan homogenat L₂ *T. vitulorum* yang dilarutkan dengan *Freund's complete adjuvant*, sebanyak 300 µg / ekor / s.c. Pada P₁ dilakukan pengulangan infeksi buatan dengan dosis yang sama, sedangkan pada P₂ dilakukan pengulangan yang dilarutkan dengan *Freund's incomplete adjuvant*, dengan dosis yang sama pula. Kedua pengulangan ini dilakukan pada minggu kedua.

Setelah empat minggu, 12 ekor kelinci tersebut diambil serum darahnya untuk diuji ELISA tidak langsung. Hasil dari uji ELISA berupa angka-angka yang menerangkan titer antibodi pada tiap-tiap kelinci, yang dinyatakan dengan nilai *optical density* (OD). Kemudian data yang diperoleh ditabulasi dan dianalisis dengan uji F dan dilanjutkan dengan uji LSD 5 %.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa L₂ *T. vitulorum* baik dalam bentuk aktif maupun bentuk homogenat bersifat antigenik karena dapat memacu timbulnya antibodi. Selain itu terdapat perbedaan respon imun yang sangat nyata ($p < 0,01$) antara P₁, P₂ dan P₀, sehingga dapat terlihat rata-rata nilai OD pada P₁ lebih tinggi dibandingkan P₂ maupun P₀.

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kehadiran Allah SWT, yang telah memberikan rahmat dan karunia kepada penulis untuk menyelesaikan skripsi ini yang diajukan untuk memenuhi syarat guna memperoleh gelar sarjana Kedokteran Hewan pada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Keberhasilan dalam Penulisan ini tidak luput dari bantuan dan kerjasama berbagai pihak. Dengan kerendahan hati, penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya dan penghargaan kepada:

1. Bapak Prof. Dr. Ismudiono, MS., drh selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga.
2. Ibu Poedji Hastutiek, Msi., drh sebagai pembimbing pertama dan Prof. Dr. Hj. Sri Subekti, DEA., drh sebagai pembimbing kedua yang telah bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis dengan perhatian dan kesabaran hingga terselesainya skripsi ini.
3. Ibu Suherni S, MKes., drh sebagai dosen wali dan seluruh bapak dan ibu dosen Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga yang telah membantu dan membekali ilmu selama perkuliahan.
4. Bapak Kusnoto, Msi., drh., Ibu Halimah, Mkes., drh., Ibu Sri Mumpuni, MKes., drh, Bpk. Dr. Setiawan Koesdarto, MSc., drh sebagai Pembimbing dalam Tim Due Like, dan Bpk Suwarno yang telah banyak membantu dalam penyelesaian skripsi ini.
5. Teman penelitian Etik, Maria, Agus, Choiril yang selalu menemani dan menyemangati, serta teman-teman Angkatan 98 FKH Universitas Airlangga.
6. Seluruh keluarga yang penulis cintai yaitu : Mama, Papa, kakakku Miftah Oriza Hamlet, Darius Yanuar Barkah, adikku Ditto Saladin, Bundo, Mami, Oom - tante, adik - adik kecilku Robbyansyah, Syahira, Jordan, Khusufi, serta untuk Andrie Truman yang telah memberikan semangat dan doa tiada henti selama penulisan skripsi ini.

7. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang telah membantu baik secara langsung maupun tidak langsung,

Penulis menyadari bahwa penulisan skripsi ini masih jauh dari sempurna, karena keterbatasan kemampuan yang dimiliki. Selain itu, penulis berharap bahwa penulisan skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi pembaca. Untuk itu dengan kerendahan hati, penulis bersedia menerima kritik maupun saran guna memperbaiki isi dari skripsi ini agar menjadi lebih sempurna.

Surabaya, 13 Mei 2003

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN.....	ii
ABSTRAK	iv
UCAPAN TERIMA KASIH.....	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Penelitian	1
1.2 Perumusan Masalah.....	4
1.3 Landasan Teori	4
1.4 Tujuan Penelitian.....	6
1.5 Hipotesis Penelitian.....	6
1.6 Manfaat Penelitian.....	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 Klasifikasi.....	7
2.2 Morfologi dan Hospes Definitif <i>T. vitulorum</i>	7
2.3 Siklus Hidup <i>T. vitulorum</i>	8
2.4 Hewan Percobaan Kelinci	10
2.5 Aspek Zoonosis	11
2.6 Antigen Parasit	12
2.7 Antibodi.....	14
2.8 Respon Imun Terhadap Infeksi Toxocariasis.....	15
2.9 Diagnosis Toxocariasis.....	16

BAB 3 METODE PENELITIAN.....	18
3.1 Tempat dan Waktu	18
3.2 Alat dan Bahan	18
3.3 Isolasi Telur Cacing <i>T.vitulum</i> dari <i>Feces</i> dan Pembuatan Homogenat	18
3.4 Hewan percobaan Kelinci	20
3.5 Uji <i>indirect</i> ELISA (<i>Enzymed-Linked Immunosorbent Assay</i>) ..	21
3.6 Rancangan Penelitian dan Analisis Data.....	22
3.7 Kerangka Operasional	23
BAB 4 HASIL PENELITIAN.....	24
4.1 Isolasi <i>T. vitulum</i>	24
4.2 Pembuatan Homogenat dan Penentuan Kadar Protein <i>L₂ T. vitulum</i>	25
4.3 Pengukuran Titer Antibodi dengan uji <i>indirect</i> ELISA	25
BAB 5 PEMBAHASAN	27
5.1 Isolasi <i>T.vitulum</i>	27
5.2 Pembuatan Homogenat dan Penentuan Kadar Protein <i>L₂ T. vitulum</i>	28
5.3 Pengukuran Titer Antibodi	29
BAB 6 SIMPULAN DAN SARAN	33
6.1 Simpulan.....	33
6.2 Saran.....	33
RINGKASAN	34
DAFTAR PUSTAKA.....	36
LAMPIRAN	40

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Nilai OD pada pemeriksaan antibodi kelinci dengan uji <i>indirect</i> ELISA.	25
4.2 Rata-rata dan simpangan baku (SD) nilai OD	26

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Siklus hidup <i>Toxocara vitulorum</i>	9
3.1 Kerangka Operasional	23
4.1 Larva stadium kedua (L ₂) <i>T. vitulorum</i>	24

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Hasil uji <i>indirect</i> ELISA	40
2. Analisis Statistik uji F	41
3. Bahan Uji <i>indirect</i> ELISA	43
4. Alat dan Bahan Penelitian	45

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Penelitian

Penyakit parasit pada ternak ruminansia yang sering menimbulkan kerugian ekonomi yang cukup besar salah satunya adalah toxocariasis yang disebabkan oleh cacing *Toxocara vitulorum*. Cacing nematoda dengan panjang 25 - 30 cm ini, tidak saja merugikan bagi ternak ruminansia, tetapi juga dilaporkan dapat menginfeksi manusia, sehingga tergolong zoonosis. Toxocariasis pada manusia dilaporkan telah terjadi di Jepang sebanyak 42 kasus (Kondo, 1989).

Angka prevalensi toxocariasis pada anak kerbau sudah diteliti di beberapa negara tropik. Di Srilangka terdapat 70 - 100% anak kerbau yang terserang toxocariasis (Robert, 1990). Untuk daerah Indonesia sendiri, di kota Malang Selatan menunjukkan angka prevalensi pada sapi 76% (Pratiwi dkk., 1992). Penelitian di Bali menunjukkan angka prevalensi pada anak sapi Bali umur 3 - 4 minggu mencapai 75% (Gunawan dan Putra, 1981), sedangkan di Garut pada anak sapi perah didapatkan angka prevalensi sebesar 54,24 % (Simon dan Syahrial, 1992). Di Surabaya angka prevalensi pada anak sapi sebesar 43% (Koesdarto dkk., 2000). Hasil diatas berdasarkan jumlah telur dalam *feces* anak sapi atau kerbau.

Pada anak sapi atau kerbau kerugian yang ditimbulkan sangat menyolok yaitu penurunan laju pertumbuhan sehingga berat badan normal tidak tercapai bahkan hambatan pertumbuhan tersebut mencapai 25 - 40% (Morley, 1978). Manusia dapat tertular penyakit ini karena makanan atau minuman yang

1.2 Perumusan Masalah

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

- 1) Apakah protein *L₂ T. vitulorum* baik dalam bentuk telur infektif (*L₂* aktif) maupun dalam bentuk homogenat bersifat antigenik pada kelinci ?
- 2) Apakah terdapat perbedaan respon imun humoral dalam hal ini titer antibodi antara kelinci yang diinfeksi buatan dalam bentuk telur infektif maupun kelinci yang diimunisasi *L₂* dalam bentuk homogenat?

1.3 Landasan Teori

Cacing *T. vitulorum* ini selama hidupnya mengalami beberapa generasi, yakni stadium telur, larva stadium pertama (*L₁*), kedua (*L₂*), ketiga (*L₃*), keempat (*L₄*) dan cacing dewasa, sehingga memiliki perangkat antigen yang berbeda. Perbedaan struktur dan morfologi pada beberapa generasi inilah yang menyebabkan perbedaan antigenitas dalam memicu terbentuknya antibodi (Warren, 1993). Antigen secara umum merupakan substansi yang dapat dikenali sebagai benda asing (*non self*) oleh sistem imun tubuh.

Antigen ialah benda asing yang diukur berdasarkan keberhasilan dalam mengikat antibodi (Abbas *et al.*, 2000). Pada telur cacing, protein antigen ini dapat diperoleh dari kulit telur, membrana vitelina dan *granular layer*. Penggunaan larva yang berasal dari saluran usus dan dapat masuk ke dalam sistem portal hepatic, hati, paru, dan organ *visceral* lain, sangat memungkinkan *L₂* lebih dikenali perangkat imun tubuh hospes, sehingga dapat memicu terbentuknya antibodi lebih kuat. Hal ini dapat dibuktikan dengan pemeriksaan

antibodi terhadap *T. vitulorum* dengan uji ELISA, bahwa penggunaan antigen L₂ pada mencit memberikan nilai *optical density* (OD) yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan antigen L₁ maupun dewasa (Kusnoto, 2003).

Berdasarkan penelitian sebelumnya (Maria, 2003) bahwa protein L₂ *T. vitulorum* menunjukkan pita protein dengan berat molekul yang berbeda. Penelitian tersebut menggunakan metode *Sodium Dodecyl Sulphat-Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) yang dapat digunakan untuk mendeteksi fraksi protein yang berdasarkan berat molekul. Fraksi protein yang didapatkan ada sembilan yaitu : 112,7 kDa, 96,6 kDa, 85,1 kDa, 65,9 kDa, 55,1 kDa, 43,8 kDa, dan 34,8 kDa, 32,2 kDa, 26,2 kDa.

Dalam upaya mengembangkan uji serologis, untuk melihat ikatan antigen antibodi, maka dikembangkan lebih spesifik lagi yaitu mengetahui antigenitas antara kelinci yang diinfeksi buatan dengan telur infeksi L₂ *T. vitulorum* dengan kelinci yang diimunisasi homogenat L₂ *T. vitulorum* dengan uji ELISA. Protein yang digunakan pada infeksi buatan adalah protein L₂ *T. vitulorum* yang telah diisolasi dan dipupuk pada media PBS dengan suhu kamar selama 21 - 28 hari (L₂ aktif), sedangkan pada imunisasi protein yang digunakan adalah homogenat L₂ *T. vitulorum* (*whole extract*) hasil sonikasi yang telah diketahui kadar proteinnya (Pratiwi, 1998).

Data hasil yang didapat berupa titer antibodi, dapat diperoleh dengan uji *indirect* ELISA, yang akan menghasilkan angka OD yang mencerminkan tinggi rendahnya titer antibodi tersebut. Pengujian dengan ELISA tidak langsung ini, bukan hanya bertujuan untuk mengetahui sifat antigenik L₂ *T. vitulorum*, akan tetapi dapat pula membandingkan respon imun dari masing-masing perlakuan.

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan yang ingin dicapai dalam penelitian ini adalah menentukan antigenitas protein L₂ *T. vitulorum* baik dalam bentuk telur infektif maupun dalam bentuk homogenat, serta mengetahui adanya perbedaan respon imun antara kelinci yang diinfeksi buatan dalam bentuk telur infektif maupun kelinci yang diimunisasi L₂ *T. vitulorum* dalam bentuk homogenat.

1.5 Hipotesis Penelitian

Pada penelitian ini hipotesis yang diajukan adalah sebagai berikut:

- 1) Protein L₂ *T. vitulorum* baik dalam bentuk telur infektif maupun homogenat bersifat antigenik.
- 3) Terdapat perbedaan respon imun humoral antara kelinci yang diinfeksi buatan dalam bentuk telur infektif maupun kelinci yang diimunisasi L₂ *T. vitulorum* dalam bentuk homogenat.

1.6 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai antigenitas dari protein antigen L₂ *T. vitulorum* baik dalam bentuk telur infektif (infeksi buatan) maupun bentuk homogenat (imunisasi) serta kemungkinannya untuk dapat digunakan sebagai bahan imunogen pada pembuatan antibodi poliklonal anti L₂ *T. vitulorum*.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Klasifikasi

Menurut Kusumamiharja (1993), klasifikasi cacing *T. vitulorum* adalah sebagai berikut :

Phylum	: Aschelminthes
Class	: Nematoda
Order	: Ascaridia
Family	: Ascarididae
Genus	: Toxocara
Species	: <i>Toxocara vitulorum</i> (Goeze, 1782)
	Sinonim <i>Neoascaris vitulorum</i> (Travassos, 1927)

2.2 Morfologi dan Hospes Definitif *T. vitulorum*

Ukuran cacing ini, jantannya mencapai 25 cm dengan garis tengah 5 mm, sedang betina panjangnya mencapai 30 cm dengan garis tengah 6 mm. Kutikula yang tipis tidak seperti jenis ascaris yang lain, oleh karena itu cacing ini lunak dan tembus pandang (transparan). Terdapat tiga bibir, pada dasarnya lebar, sedang ujungnya lebih kecil. Esofagus panjangnya sekitar 3 - 4,5 mm, yang jantan memiliki sekitar lima pasang papil kloaka, yang paling depan besar dan kembar. Vulva dari cacing ini terletak seperdelapan panjang badan jauh dari mulut, panjang spikulum sekitar 0,00 - 1,25 mm (Kusumamiharja, 1993).

Hospes yang sesuai adalah *Bubalus bubalis*, *Bos indicus*, *Bos taurus*, dan *Ovis aries* (Robert, 1993). Akan tetapi hospes yang utama ialah *Bubalus bubalis* dan *Bos sp.* Penemuan telur *T. vitulorum* pada *feces* kambing diperkirakan hanya karena termakanya telur cacing, yang dikeluarkan kembali melalui *feces*.

2.3 Siklus hidup *T. vitulorum*

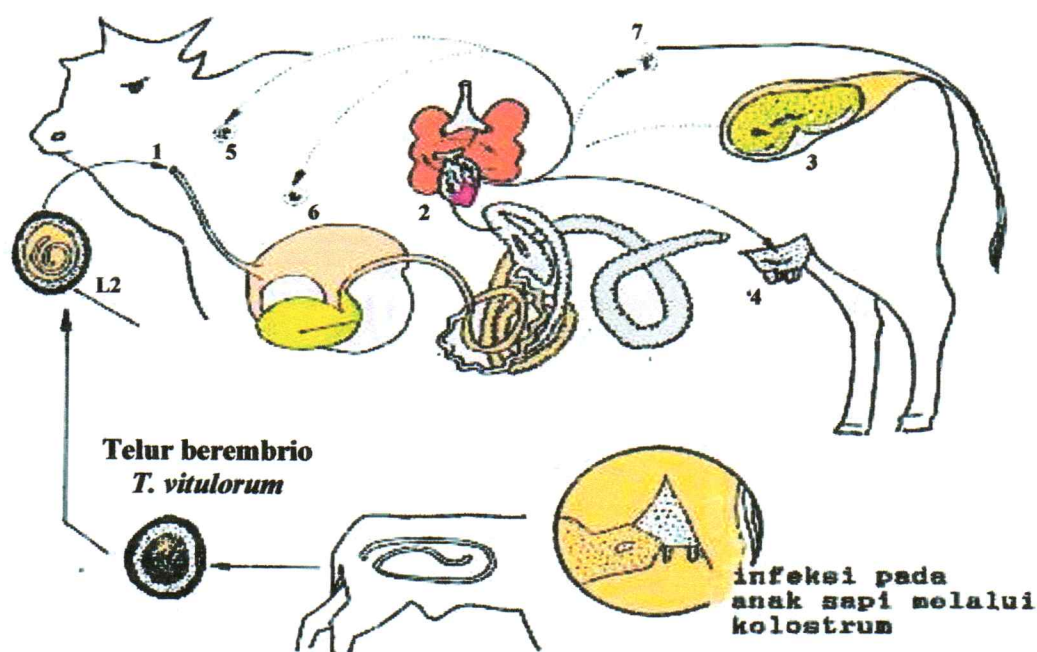
Siklus hidup cacing ini sangat kompleks dan mirip *Toxocara canis*, karena memerlukan hospes yang berbeda umur dan mempunyai periode stadium pada setiap hospes yang ditulari. *T. vitulorum* dewasa mengeluarkan telur bersama tinja hospes, dan pada umumnya merupakan telur fertil. Telur-telur fertil ini akan berkembang dengan baik pada suhu 28 - 30⁰ C, dan berkembang menjadi telur infektif dalam waktu 10 - 15 hari. Telur tersebut berukuran 69,5 x 69,5 hingga 99 x 79,2 mm berdinding tebal karena terbungkus membran khitin (Warren, 1993).

Infeksi toxocariasis ini terjadi pada saat sapi atau kerbau menelan telur infektif dan kemudian menetas dalam usus halus sekitar dua sampai delapan jam, kemudian akan menembus dinding dan masuk ke dalam aliran darah menuju paru, hati dan ginjal. Di dalam jaringan tersebut larva stadium kedua akan menetap dengan diselubungi jaringan fibrosa. Hal yang menarik pada kasus ini, L₂ tidak bisa berkembang menjadi L₃ apabila tidak terdapat pada tubuh hospes sapi betina dewasa yang bunting. Keadaan semacam inilah yang sering disebut larva dorman (Levine, 1978).

Menurut Robert (1993), pada waktu delapan sampai empat belas hari sebelum induk sapi melahirkan (pada bulan ke delapan dan seterusnya), stadium L₂ tersebut akan menjadi aktif kembali dan berkembang menjadi stadium L₃

untuk mencapai kelenjar susu dan keluar bersama kolostrum (larva dapat ditemukan antara 2-18 hari sesudah sapi atau kerbau beranak), sehingga anak sapi atau kerbau dapat terinfeksi melalui kolostrum.

Mekanisme aktivasi stadium masih belum diketahui secara tepat, akan tetapi kemungkinan disebabkan karena pengaruh hormonal yang berubah menjelang kelahiran (Rogers, 1989). Apabila tidak terjadi aktivasi dan migrasi kelenjar susu maka stadium L₂ masih tetap bertahan hingga kelahiran berikutnya (Robert, 1993).



Gambar 2.1 Siklus hidup *Toxocara vitulorum*
(Troncy *et al.*, 1981)

Keterangan gambar :

1. Sapi dewasa yang terinfeksi telur *T. vitulorum*
2. Migrasi larva menuju sistem portal hepatis
3. Infeksi transplacentar (jarang)
4. Migrasi larva ke ambing
- 5, 6, 7 . Pembentukan kista larva pada muskulus, otak, hati, dan organ lain

2.4 Hewan Percobaan Kelinci

Pada penelitian ini hewan coba yang digunakan adalah kelinci (*Lepus europaeus*). Kelinci jenis ini berasal dari Eropa dan sering disebut kelinci tegalan, selain itu hal yang istimewa adalah termasuk ras Angora yang memiliki bulu tebal. Bentuk dan sosok tubuhnya menarik, panjang badannya antara 50 - 70 cm, berat badannya 4 - 5 kg. Punggung melengkung dengan bagian samping badan agak rata, kepalanya kecil dengan disertai kumis yang panjang. Daun telinga bila ditarik kedepan bisa melampaui ujung hidung. Kaki depan pendek dan kaki belakang lebih panjang dua kali lipat (Sarwono, 1991).

Indera yang dimiliki kelinci sangat tajam, terutama pendengarannya, menyusul penciumannya, perasa dan peraba. Perkembangbiakan kelinci ini 3 - 4 kali dalam setahun dan setiap kali melahirkan 2 - 4 ekor anak. Kelinci betina siap kawin pada umur tujuh bulan, kemudian jelang dua bulan setelah melahirkan induk kelinci sudah dapat dikawinkan lagi. Lama kebuntingan sekitar 30 - 35 hari.

Dalam hal pakan, kelinci tidak begitu sulit, selama ditanah masih ada hijauan dan bisa ditumbuhi rumput, biji-bijian dan umbi-umbian. Untuk itu pakan yang diberikan antara lain sayuran hijau, meliputi kangkung, wortel, daun pepaya, dan jagung. Pada umumnya kelinci komersial yang ditenakkan jarang diberi air minum, namun perlu diingat bahwa kelinci merupakan makhluk hidup yang membutuhkan makanan dan minuman seperti makhluk hidup lainnya (Sarwono, 1991).

2.5 Aspek Zoonosis

Cara penularan toxocariasis pada manusia ada dua macam yaitu : pertama melalui minum air susu pada minggu pertama (kolostrum) yang mengandung larva stadium ketiga (L_3), dan yang kedua infeksi berupa telur embrio yang mencemari lingkungan bersama *feces* (Robert, 1993). Cara penularan pada manusia dapat terjadi akibat minum kolostrum yang mengandung L_3 telah dilaporkan oleh Gorp (1987) terjadi pada kelompok masyarakat yang kurang memahami higiene. Sedangkan pada penularan yang disebabkan oleh pencemaran lingkungan bersama *feces* telah dilaporkan oleh Robert (1990) di Srilangka.

Toxocariasis pada manusia diklasifikasikan berdasarkan gejala klinik menjadi *visceral toxocariasis* dan *ocular toxocariasis*. Kedua penyakit ini didefinisikan sebagai *visceral larvae migrans* (VLM) dan *ocular larvae migrans* (OLM) yang membutuhkan diagnosis secara imunologik (Uga *et al.*, 1990). Gejala klinis yang tampak pada anak-anak terutama batuk dan larva dibawah kulit (Pratiwi, 1998)

Gejala yang dapat diamati pada manusia adalah *hepatomegali*, *visceral syndrome eosinophillya*, *pneumonia recurrent* dan *ocular syndrome*. Namun belum ada angka prevalensi yang jelas, karena kemungkinan belum pernah ada penelitian pada kondisi lapangan toxocariasis pada manusia (Robert, 1993). Penelitian pada mencit menurut Barriga and Omar (1992) dengan infeksi buatan, menunjukkan bahwa dapat dikembangkan L_2 pada hati dan paru mencit kemungkinan terjadi keberhasilan perkembangan cacing tersebut pada hospes lain, atau tidak menutup kemungkinan pada manusia.

Angka prevalensi yang didapat lebih lanjut dinyatakan bahwa dengan uji ELISA terhadap orang-orang yang tinggal di kota Kobe dan sekitarnya didapatkan hasil 4,6% positif dari 196 kelompok orang dewasa (100 orang pria 96 wanita), 6,3% positif dari 80 kelompok anak-anak (45 laki-laki dan 35 perempuan), dan 29,2% positif dari 75 kelompok orang yang menunjukkan gejala/ tersangka penderita (pasien 41 pria dan 34 wanita umur 9 - 69 tahun) (Uga *et al.*, 1990).

2.6 Antigen Parasit

Pengertian antigen secara umum adalah substansi yang dapat dikenali sebagai benda asing (*non self*) oleh sistem imun tubuh, atau dengan kata lain antigen merupakan benda asing yang diukur berdasarkan kemampuan dalam mengikat antibodi (Abbas *et al.*, 2000). Protein merupakan antigen yang terbaik karena ukuran dan kerumitan strukturnya, hampir semua protein yang berat molekulnya (BM) lebih besar dari 1000 Dalton (Da) adalah antigenik (Tizard, 1982).

Secara kimiawi zat imunogen parasit dapat berupa protein, lipida, karbohidrat, glikoprotein, dan glikolipida. Menurut Anders (1982) masing-masing komponen kimiawi tersebut mempunyai karakteristik ukuran, susunan rantai dan jumlah determinan yang mungkin berbeda. Sebagian antigen dihasilkan parasit yang dapat memicu respon imun hospes (*host protective antigen*). Tizard (1982) juga menyatakan bahwa sistem kebal relatif tidak efisien

dalam pengendalian parasit cacing, sebab organisme ini telah beradaptasi terhadap eksistensi menjadi parasit obligat dan barangkali adaptasi ini telah melibatkan hubungan dengan sistem kebal dan mengatasi atau mengelakkannya.

Antigen yang berasal dari parasit terdapat berbagai macam jenis yang dirinci berdasarkan sumber dan lokasi parasit maupun siklus hidup parasit. Berdasarkan sumber dan lokasi parasit terdiri dari: 1) exoantigen terlarut, berasal dari parasit hidup atau parasit dalam media buatan merupakan produk ekskresi berupa metabolit; 2) antigen somatik terlarut, berasal dari cacing stadium dewasa atau larva yang hancur atau dari sel permukaan tubuh parasit; 3) parasit yang mati / fragmen-fragmen tubuhnya; 4) parasit yang hidup secara utuh; 5) cairan tubuh nematoda; 6) cairan kista larva cacing pita. Sedangkan antigen berdasarkan siklus hidup parasit terdiri dari: 1) spesifikasi genus, spesies, strain dan stadium hidup; 2) parasit yang mengalami perubahan bentuk (Tizard, 1982 ; el-Massry, 1999).

Pada telur cacing, protein antigen dapat diperoleh pada kulit telur (*egg shell*), membrana vitelina (*vitellin membrane*) dan *granular layer* (Abdel Rahman, 2000). Mengingat siklus hidup yang kompleks dari *Toxocara sp*, maka pengamatan terhadap protein cacing tersebut dapat dilakukan terhadap telur, larva pada berbagai stadium (L_1 , L_2 , L_3 , L_4), dan cacing dewasa. Pada stadium larva dan dewasa yang paling sering digunakan adalah E-S antigen, disamping itu juga ada beberapa sumber antigen yang dipakai, misal antigen somatik (el-Massry, 1999), *surface antigen* (Kennedy *et al.*, 1987, dikutip oleh Pratiwi, 1998), ekstrak

larva (Starke *et al.*, 1996), dan ekstrak cacing dewasa (Safar *et al.*, 1992 ; Abdel-Rahman, 2000).

2.7 Antibodi

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

Tipe imunoglobulin yang umum diketahui ada 5 tipe yaitu M (makroglobulin), G, A, D, dan E (Roitt *et al.*, 1998) yang bertanggung jawab atas keberadaan antigen. Pada umumnya infeksi parasit terutama cacing, yang berperan adalah imunoglobulin E (Ig E), tetapi menurut Rajapakse (1992) imunoglobulin G (Ig G) lebih berperan pada infeksi *T.vitulum*. Adapun fungsi antibodi ada dua, 1) mengikat imunogen, 2) berinteraksi dengan jaringan hospes dan sistem efektor untuk fasilitas penolakan imunogen.

Tipe plasentasi hemochoreial memberikan kemungkinan transfer imunoglobulin intra uterin secara langsung, yaitu imunoglobulin G pada primata. Sedangkan pada sapi mempunyai tipe plasentasi sindesmochoreial, yaitu terjadi perlekatan langsung antara sel chorion dengan mukosa uterus tidak memberikan kesempatan transfer imunoglobulin induk ke anak di dalam uterus. Pada sapi, kuda dan babi terjadi transfer imunoglobulin ialah pada saat menyusui anaknya melalui kolostrum yang kaya akan imunoglobulin G dan A, sedikit imunoglobulin E dan M (Pratiwi, 1998).

Imunoglobulin G merupakan antibodi yang banyak ditemukan dalam tubuh dengan berat molekul 150.000 Da, serta mempunyai bentuk Y dengan lengan H, dengan berat molekul 50.000 Da, dan lengan L masing-masing dengan berat molekul 25.000 Da. Imunoglobulin yang terkandung dalam kolostrum lebih tinggi dibandingkan dengan jumlah dalam air susu. Pada kolostrum induk sapi kadar Ig G, ditemukan sejumlah 34.000 – 39.000 mg / 100 ml, kemudian menurun menjadi 50 - 750 mg / 100 ml pada air susu (Bambel, 1970).

Sel limfosit T juga dapat terikat kolostrum yang dihisap anak sapi, sehingga anak sapi akan mempunyai kemampuan untuk merespon antigen melalui perantaraan sel (Bambel, 1970).

2.8 Respon Imun Terhadap Toxocariasis

Respon imun spesifik terhadap infeksi beberapa cacing diperantarai oleh Ig E dan eosinofil yang merupakan tipe khusus dari *Antibodi-Dependent Cell-*

Mediated Cytotoxicity (ADCC). Antigen yang telah masuk kedalam tubuh hewan, akan ditangkap oleh makrofag yang secara langsung akan menampilkan antigen dan disebut *Antigen Presenting Cell* (APC). Kejadian ini akan memicu produksi IL-1 yang berfungsi sebagai *fibroblast growing factor* yang mengakibatkan larva akan diselubungi oleh jaringan fibrosa. Selain itu, APC tersebut akan dikenali oleh sel T yang kemudian membantu menjadi Th₂CD₄ dan Th₁CD₈. Subset inilah yang mensekresikan IL-5 dan IL-4 dan mempunyai fungsi tersendiri, yaitu IL-5 akan mengakibatkan eosinofil meningkat. Keadaan ini, mempunyai kemungkinan yang lebih efektif untuk mematikan cacing, daripada lekosit lain karena sifat toksik yang lebih dibanding neutrofil maupun makrofag. Pada kondisi IL-5 menurun, akan memacu terbentuknya jaringan granuloma pada organ yang terdapat larva dorman, sedangkan IL-4 akan mengakibatkan sel B menjadi sel plasma dan menghasilkan Ig E dan Ig G pada tubuh hospes dan disebut antibodi (Roitt *et al.*, 1998 ; Abbas *et al.*, 2000).

Khusus pada infeksi *T. vitulorum* ini, Ig G-lah yang lebih berperan daripada imunoglobulin yang lain, sehingga pada uji *indirect* ELISA ini, imunoglobulin yang terhitung adalah Ig G (Rajapakse, 1992).

2.9 Diagnosis Toxocariasis

Diagnosis penyakit ini melalui pemeriksaan *feces* tidak mutlak dilakukan karena mengingat parasit ini memiliki hospes pada tingkatan umur yang berbeda. Pada manusia, diagnosis melalui gejala klinis sulit dilakukan karena gejala

penyakit ini bervariasi (Uga *et al.*, 1990), tidak spesifik dan organ yang diinvasi berganti-ganti (Prokopowicz and Sosnowska., 1990).

Beberapa metode yang dapat dikembangkan untuk imunodiagnosis pada infeksi nematoda adalah: 1) uji aglutinasi cepat; 2) imunodifusi; 3) imunoelektroforesis; 4) ELISA; 5) imunoblotting dan 6) imunohistokimia (Warren, 1993). Namun, sebagian besar dari teknik tersebut tetap memerlukan antigen yang lebih spesifik agar reaksi antigen-antibodi yang diharapkan sebagai petanda terwujud.

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian dilakukan di Laboratorium Helminologi, Laboratorium Virologi-Imunologi, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dan Laboratorium *Tissue Culture, Tropical Disease Center* mulai bulan Agustus sampai bulan November 2002.

3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada tahap isolasi L₂ *T. vitulorum* adalah : mikroskop *inverted*, cawan petri, *sputit disposable*, jarum trokar, sonde, saringan 1mm, saringan 25 μ , sentrifus, gelas objek, pipet plastik, sonikator. Sedangkan pada uji *indirect* ELISA, adalah : *micropipett multichannel*, pipet tip, *microplatte* ELISA, *washing dish*, *ELISA reader* dan peralatan gelas lainnya.

Bahan- bahan yang digunakan pada isolasi L₂ *T. vitulorum* adalah : air destilasi, larutan sukrosa dengan konsentrasi yang berbeda, *phosphate buffer saline* (PBS). Pada imunisasi dan uji *indirect* ELISA bahan yang digunakan adalah *Freund's Complete Adjuvant* (FCA), *Freund's Incomplete Adjuvant* (FIA), PBS-Tween, *carbonat buffer*, *washing buffer*, *blocking buffer*, *conjugate*, *substrat buffer*, *substrat* dan NaOH 3N.

3.3 Isolasi Telur Cacing *T. vitulorum* dari Feces dan Pembuatan Homogenat

Telur cacing *T. vitulorum* yang terdapat pada *feces* sapi terinfeksi toxocariasis kemudian dimurnikan dengan metode gradien preparasi (*preparation*

of gradients) (Drenchrite, 1996) sebagai berikut: *feces* yang ada diencerkan menjadi larutan *feces* kemudian disaring menggunakan saringan 1mm, dilanjutkan dengan saringan atau filter dan disemprot dengan menggunakan air destilasi hingga terkumpul menjadi sampel *feces*. Kemudian sampel tersebut diambil 3 ml dan dimasukkan pada setiap tabung sentrifuse.

Larutan sukrosa dengan konsentrasi 20% (warna kuning), 30% (warna merah), 40% (warna hijau), dan 50% (tanpa warna atau jernih). Setiap larutan tersebut dimasukkan ke dalam tabung sentrifus masing-masing 2 ml, dimulai dari larutan sukrosa yang berkonsentrasi terendah hingga tertinggi. Cara meletakkan larutan tersebut dibantu dengan menggunakan *sputit* yang mempunyai jarum trokar hingga mencapai dasar tabung. Sampel disentrifus dengan kecepatan 1500 rpm selama 3-5 menit.

Telur *T. vitulorum* pada akhirnya akan terletak diantara larutan sukrosa 30% (warna merah) dan larutan sukrosa 40% (warna hijau). Hal ini dapat dilihat dengan mata, yaitu membentuk kabut putih yang menyerupai cincin. Telur diambil menggunakan *sputit* dengan jarum trokar kemudian disaring dengan saringan ± 25 mikron (T.200), setelah itu disemprot dengan aquadest supaya larutan sukrosa jatuh dan telur tetap tertinggal pada saringan. Pindahkan telur tersebut pada cawan petri dan kemudian ditambahkan PBS, sebagai media pertumbuhan. Telur diinkubasi pada suhu kamar untuk memperoleh L_2 .

Untuk mencegah kontaminasi jamur dan protozoa dapat ditambahkan 0,1 - 1 ml formalin 10%. L_2 aktif *T. vitulorum* akan diperoleh dalam waktu 21 - 28 hari. (Kusumamiharja, 1993). Hasil inilah yang akan digunakan pada infeksi buatan perlakuan pertama (P_1). Pembuatan homogenat L_2 *T. vitulorum* meliputi :

Hasil isolasi yang berupa kumpulan telur (L_2 aktif) dan cairan dengan perbandingan 1 : 1 atau 1 : 2 dihancurkan dengan cara sonikasi, dengan frekuensi getaran 20 kHz (20 ribu putaran per detik) selama 3 x 30 detik sebanyak 2 kali (Sambrook *et al.*, 1989). Hasil sonikasi tersebut dilakukan pemeriksaan secara mikroskopis untuk mengetahui keberhasilan penghancuran L_2 tersebut. Apabila yang hancur kurang dari 95% maka homogenat tersebut disentrifus dengan kecepatan 2000 rpm selama 5 menit, kemudian dipisahkan supernatan dan pelet.

Pelet yang ada diresuspensi $\pm$ 1 : 1 atau 1,5 kali dari volume semula. Kemudian dilakukan sonikasi ulang dan dilakukan sentrifus untuk pemisahan supernatan dan pelet. Keseluruhan supernatan dikumpulkan dan dihitung proteinnya dengan spektrofotometer untuk menentukan dosis imunisasi dan pengenceran antigen pada uji *indirect* ELISA.

3.4 Hewan Percobaan kelinci

Sebanyak 12 ekor kelinci betina dewasa (*Lepus europaeus*) ras Angora yang telah disiapkan dibagi menjadi tiga perlakuan yaitu P_0 : diinjeksi dengan PBS (kontrol) ; P_1 : diinfeksi buatan dengan telur infeksi (L_2 aktif) *T. vitulorum* ; P_2 : diimunisasi dengan homogenat L_2 *T. vitulorum*.

Pada perlakuan nol (P_0), empat ekor kelinci diinjeksi dengan *phosphat buffer saline* (PBS) sebanyak 0,6 ml / ekor secara *sub cutan*. Pada perlakuan pertama (P_1), empat ekor kelinci berikutnya diinfeksi buatan dengan telur infeksi (L_2 aktif) *T. vitulorum* sebanyak 1000 butir telur / ekor secara oral (Barriga and Omar., 1992), sedangkan pada perlakuan kedua (P_2) empat ekor kelinci diimunisasi dengan homogenat L_2 sebanyak 300 μ l / ekor secara *sub cutan*.

(Harlow and Lane., 1998). Khusus pada perlakuan kedua, sebelumnya homogenat *L₂ T.vitulorum* yang dilarutkan dengan *Freund's complete adjuvant* dan penicillin-streptomycin.

Pada minggu kedua, dilakukan pengulangan (*booster*) yaitu P_1 : di infeksi buatan ulang dengan telur infeksi (L₂ aktif) *T. vitulorum* dengan dosis yang sama, sedangkan P_2 : diimunisasi ulang dengan homogenat L₂ dengan dosis yang sama, akan tetapi sebelumnya dilarutkan dengan *Freund's incomplete adjuvant* dan penicillin-streptomycin. Adapun tujuan *booster* ini adalah untuk meningkatkan pembentukan antibodi serta untuk menghindari reaksi hipersensitivitas (Burgess, 1995).

Setelah satu bulan, 12 ekor kelinci tersebut diambil darahnya untuk mendapatkan serum antibodi baik sebagai kontrol maupun yang telah terinfeksi toxocariasis. Kemudian serum antibodi yang diperoleh diuji dengan teknik *indirect* ELISA yang menggunakan *conjugate anti rabbit* yang telah dilabel dengan enzim alkalin fosfatase, sedangkan pembacaan hasil tersebut dengan ELISA *reader*, dengan panjang gelombang 405 nm. Hasil yang diperoleh dinyatakan dalam nilai *optical density* (OD). Hasil tes *indirect* ELISA ini kemudian dirata-rata untuk mengetahui standar deviasi.

3.5 Uji *Indirect-ELISA* (*Enzymed-Linked Immunosorbent Assay*)

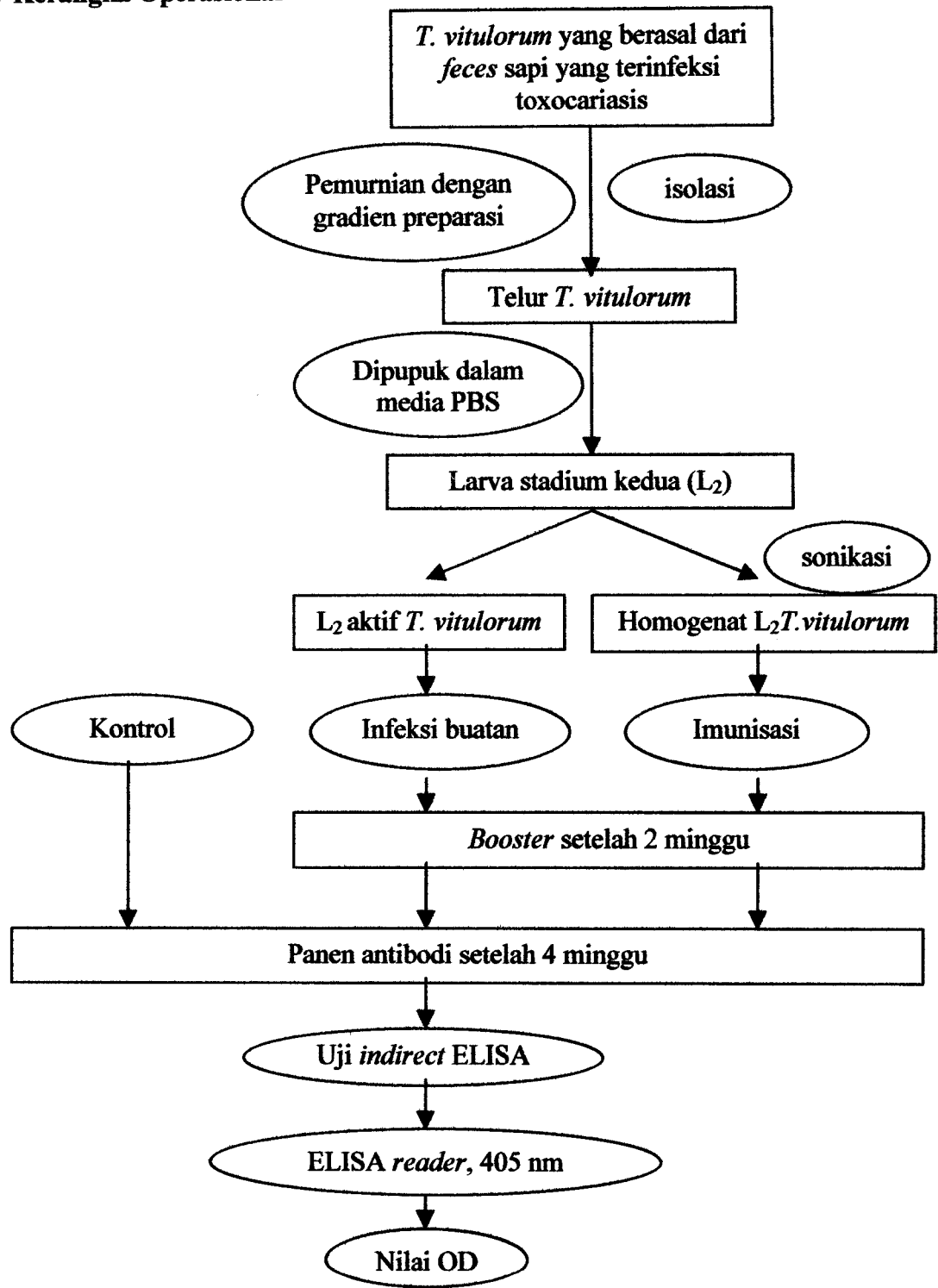
Cara kerja uji *indirect* ELISA menurut Burgess (1995), adalah: 1)Coating Antigen: Pertama-tama encerkan antigen dalam *carbonate buffer* dengan konsentrasi 1 – 10 µg / 100 µl, masukkan dalam sumuran sebanyak 100 µl. Inkubasi selama 1 jam pada suhu kamar atau simpan semalaman pada 4°C. Kemudian cuci dengan NaCl - *Tween* 20 sebanyak 3 kali. 2)Blocking: Isi setiap

sumuran dengan 200 μ l *blocking buffer*, inkubasi selama 1 jam pada suhu kamar dan cuci dengan NaCl – *Tween* 20 sebanyak 3 kali. 3) Inkubasi Serum, meliputi: encerkan serum / supernatan yang akan diperiksa dengan *blocking buffer*, biasanya 1 : 10 – 1 : 100 dan masukkan 100 μ l serum tiap sumuran. Inkubasi selama 1 jam pada suhu kamar (37 $^{\circ}$ C), kemudian cuci dengan NaCl – *Tween* 20 sebanyak 3 kali. 4) Inkubasi konjugat: Mula-mula encerkan konjugat dengan *blocking buffer* biasanya 1 : 1000 – 1 : 3000, kemudian masukkan 100 μ l konjugat tiap sumuran. Inkubasi selama 1 jam pada suhu kamar (37 $^{\circ}$ C) dan cuci dengan NaCl – *Tween* 20 sebanyak 3 kali. 5) Inkubasi substrat: Masukkan 100 μ l Substrat tiap sumuran, inkubasi 30 menit pada suhu kamar di ruang gelap. Kemudian tambahkan 50 μ l NaOH 3N tiap sumuran untuk stop reaksi. Langkah terakhir baca pada 405 nm dengan *ELISA reader*.

3.6 Rancangan Penelitian dan Analisis Data

Rancangan penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah *The Post-test Only Control Group Design* (Zainudin, 2001). Data yang telah diperoleh pada uji ELISA, ditabulasikan kemudian dianalisis dengan uji F, menggunakan *statistical program and service solution* (SPSS) rel 10,0 for Windows (Santoso, 2000). Apabila terdapat perbedaan bermakna, akan dilanjutkan dengan uji *least significant difference* (LSD) 5%.

3.7 Kerangka Operasional



Gambar 3.1 Kerangka Operasional

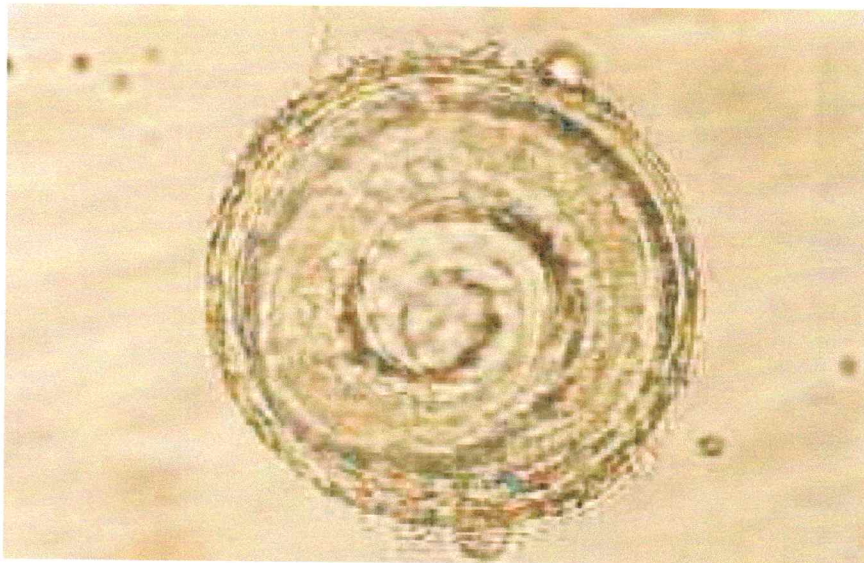
BAB 4

HASIL PENELITIAN

4.1 Isolasi *T. vitulorum*

Hasil isolasi cacing *T. vitulorum* yang berasal dari *feces* diperoleh larva stadium kedua (L_2) pada hari ke 28. Adapun tahapan perkembangbiakan telur cacing *T. vitulorum* hingga menjadi larva stadium kedua (L_2) adalah tahap pembelahan yaitu 1 sel, 2 sel, 4 sel, 8 sel, 32 sel dan seterusnya. Tahapan selanjutnya adalah morula, blastula dan gastrula kemudian menjadi larva stadium pertama (L_1) (Kusumamiharja, 1993). Selanjutnya L_1 mengalami moulting menjadi L_2 didalam telur yang merupakan telur infeksi.

Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada Gambar 4.1 Larva stadium kedua *T. vitulorum*.



Gambar 4.1 Larva Stadium Kedua *T. vitulorum* pembesaran 400 kali

4.2 Pembuatan Homogenat dan Penentuan Kadar Protein L₂ *Toxocara vitulorum*

Larva stadium kedua (L₂) *T. vitulorum* yang ada kemudian disonikasi dan diperiksa dibawah mikroskop untuk memastikan bahwa > 95% L₂ *T. vitulorum* telah hancur (Sambrook *et al.*, 1989). Homogenat tersebut diukur dengan alat spektrofotometer sehingga diketahui kadar proteinnya yaitu sebesar 606,5 µg / ml.

4.3 Pengukuran Titer Antibodi dengan Uji *Indirect* ELISA

Hasil pengamatan berupa nilai *optical density* (OD) antibodi kelinci dapat dilihat pada tabel 4.1 Hasil ELISA secara lengkap pada lampiran 1.

Tabel 4.1 Nilai OD pada pemeriksaan antibodi kelinci dengan uji *indirect* ELISA

Ulangan	P0	P1	P2
1.	0,328	1,742	1,493
2.	0,124	1,740	1,452
3.	0,197	1,736	1,441
4.	⊗	1,724	1,453

⊗ Mati pada masa adaptasi

Hasil pengamatan diatas selanjutnya dilakukan perhitungan dengan uji F. Berdasarkan hasil analisis tersebut dapat diketahui perbedaan yang sangat bermakna ($p < 0,01$) antara nilai OD P₁, P₂, P₀. Pada P₁ lebih tinggi dibandingkan OD pada P₂ dan P₀ Analisis statistik secara lengkap dapat dilihat pada Lampiran 2. Sedangkan rata-rata nilai OD dapat dilihat pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Rata-rata dan Simpangan Baku (SD) Nilai OD.

Perlakuan	$\bar{X} \pm SD$
P ₀	0,216 ^c $\pm$ 0,103
P ₁	1,736 ^a $\pm$ 0,008
P ₂	1,460 ^b $\pm$ 0,023

Keterangan: superskrip yang beda pada kolom sama menunjukkan perbedaan sangat nyata ($p < 0,01$).

BAB 5

PEMBAHASAN

5.1 Isolasi *T. vitulorum*

Isolasi pada *T. vitulorum* dilakukan dengan menggunakan media PBS memberikan hasil yang sangat memuaskan. Adapun waktu yang ditempuh oleh telur hingga menjadi larva stadium pertama (L_1) adalah 7 – 8 hari, sedangkan waktu yang dibutuhkan oleh telur hingga menjadi larva stadium kedua (L_2) adalah 21 – 28 hari. Urutan perkembangan telur hingga larva yaitu tahap pembelahan, meliputi 1 sel, 2 sel, 4 sel, 8 sel, 16 sel, 32 sel dan seterusnya. Selanjutnya adalah morula, blastula dan gastrula (Kusumamiharja, 1993).

Identifikasi pada tahap morula – blastula – gastrula ini, adalah sebagai berikut : pada tahap morula tampak isi dari telur *T. vitulorum* membentuk suatu gerombolan mirip buah anggur, sedangkan tahap blastula tampak bentukan menyerupai tapal kuda dan pada tahap gastrula tampak bentukan yang mirip dengan larva, akan tetapi belum jelas, kadang terlihat seperti kue donat pada bagian isi telur *T. vitulorum*.

Selama isolasi *T. vitulorum*, diamati setiap hari, karena tidak menutup kemungkinan terdapat parasit lain yang dijumpai pada biakan ini. Oleh karena itu ditambahkan formalin 10% sebanyak 0,1 – 1 ml. Tahapan selanjutnya adalah L_1 dan L_2 . Identifikasi terhadap kedua bentuk stadium larva ini tidak terlalu sulit, adapun profil dari L_1 adalah adanya membrana vitelina yang masih tebal dan kokoh, serta bentukan larva yang terdapat didalamnya tampak gemuk dan pendek,

besarnya larva tersebut lebih aktif dibandingkan L₂ yang berbentuk panjang dan lebih kurus. Membrana vitelina yang membungkusnya kurang lebih sama bentuknya.

5.2 Pembuatan Homogenat dan Penentuan Kadar Protein L₂ *T. vitulorum*

Setelah larva stadium kedua (L₂) didapatkan, langsung dilakukan sonikasi yaitu penghancuran protein L₂ *T. vitulorum* dengan alat sonikator pada frekuensi getaran 20 kHz (20 ribu putaran per detik). Hasil yang didapat pada sonikasi diperiksa dengan mikroskop, untuk mengetahui persentase kehancuran L₂ *T. vitulorum*. Pada kenyataannya hasil sonikasi tersebut tidak memuaskan, karena hanya 60 – 70% saja L₂ *T. vitulorum* yang berhasil hancur. Untuk itulah dilakukan sonikasi berikutnya. Pada pelaksanaan kedua sonikasi tersebut, yang perlu diperhatikan adalah frekuensi dan lamanya, yaitu 3 kali 30 detik (Sambrook *et al.*, 1989). Hal ini dilakukan mengingat kerentanan L₂ *T. vitulorum*, sehingga pengerjaan sonikasi ini dilakukan berkali-kali pada waktu yang singkat. Apabila sonikasi dilakukan dengan frekuensi dan waktu yang salah atau terlalu lama, maka L₂ *T. vitulorum* akan hangus atau rusak. Pada akhirnya hasil sonikasi yang didapatkan adalah > 95% L₂ *T. vitulorum* telah hancur (diperiksa dibawah mikroskop *inverted* dengan pembesaran 100 - 400 kali).

Kemurnian L₂ *T. vitulorum* yang digunakan sangat berpengaruh pada kualitas protein, sehingga dapat mempengaruhi antigenitas dan respon imun pada hewan coba. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya (Maria, 2003) yang menyatakan bahwa hasil sonikasi yang kurang baik akan menghasilkan gambaran lebih gelap sehingga pita protein yang terbentuk tidak terbaca.

Selanjutnya dilakukan pemeriksaan kadar protein L₂ tersebut. Alat yang digunakan adalah spektrofotometer dan hasil yang didapat yaitu, larutan Blanko 0,337, homogenat L₂ *T. vitulorum* 0,511 dengan standar albumin 400. Dari pembacaan hasil tersebut maka kadar protein L₂ *T. vitulorum* per ml adalah 606,5 µg. Angka yang didapat ini akan bermanfaat dalam penentuan dosis imunisasi serta tahap *coating* pada uji *indirect* ELISA.

5.3 Pengukuran Titer Antibodi

Darah apabila dibiarkan membeku akan meninggalkan serum yang mengandung berbagai bahan larut tanpa sel. Bahan tersebut adalah molekul antibodi yang digolongkan sebagai protein yang sering disebut imunoglobulin. Antibodi merupakan imunitas yang dapat melindungi tubuh terhadap infeksi mikroorganisme dan produk yang toksik. Antibodi yang telah diperoleh diukur titer antibodinya dengan uji *indirect* ELISA. Adapun prinsip kerja dari *indirect* ELISA ini adalah antigen mula-mula diikat benda padat (*coating*) kemudian ditambah antibodi yang akan dicari. Tahap selanjutnya ditambah *conjugate anti rabbit* yang telah diberi label enzim *alkaline phosphatase*. Tahap akhir ditambahkan substrat kromogenik yang bila bereaksi dengan enzim dapat menimbulkan perubahan warna (Burgess, 1995 ; Karnen, 2000). Uji *indirect* ELISA ini dipilih karena mempunyai sensitivitas yang tinggi.

Titer antibodi yang dihasilkan baik dalam bentuk telur infeksi maupun homogenat (Lampiran 1) dan nilai OD pada pemeriksaan antibodi kelinci (Tabel 4.1) terlihat bahwa nilai OD P₁ > OD P₂ > OD P₀ dan terdapat perbedaan yang

sangat nyata ($p < 0,01$). Hal ini menunjukkan bahwa respon imun dari masing-masing perlakuan berbeda sangat nyata.

Antibodi yang terbentuk dan telah diukur titernya, tidak begitu saja muncul, akan tetapi melalui beberapa serangkaian proses yang terjadi didalam tubuh hewan coba (kelinci) setelah diberi protein L₂ *T. vitulorum*. Makrofag yang menampilkan antigen, disebut *Antigen Presenting Cell* (APC) adalah pertahanan seluler pertama yang menangkap antigen, dan langsung dikenali oleh sel T. Sebaliknya, sel T juga mengaktivasi APC yang belum aktif. Respon tersebut dilengkapi kecenderungan dari cacing untuk menstimulasi subset Th₂ CD₄ dari sel T, yang mensekresi IL-4 dan IL-5. Interleukin 4 (IL-4) dan IL-5 berperan dalam kontrol produksi Ig E dan Ig G₁, sedangkan IL-5 sendiri akan menstimulasi perkembangan dan aktivasi eosinofil. Oleh karena itu kadar eosinofil meningkat dan cenderung lebih aktif untuk mematikan cacing daripada leukosit lain karena toksisitas yang lebih tinggi, sebaliknya apabila IL-5 rendah maka cenderung memicu terbentuknya granuloma, oleh karena itu pada saat L₂ mengalami larva dorman, jaringan sekitarnya akan terbentuk granuloma. Sel T juga dapat mengalami perkembangan menjadi subset Th₁CD₈ yang menghasilkan interferon gamma (IFN- γ) yang menghambat reaksi hipersensitivitas dan memacu terbentuknya Ig G₂ (Roit *et al.*, 1998 ; Abbas *et al.*, 2000).

Menurut Rajapakse (1992), Ig G₂ lebih berperan dalam infeksi *T. vitulorum* daripada Ig yang lain. Berdasarkan peranan Ig G (Ig G₁ dan Ig G₂) yang lebih dominan maka pada uji *indirect* ELISA ini titer antibodi yang diukur adalah Ig G. Sesuai dengan Burgess (1995), terdapat beberapa faktor yang terlibat

dalam optimalisasi respon imun dari sudut kualitas dan kuantitas antibodi yang diperoleh. Faktor-faktor tersebut adalah : Sifat alam imunogen, *adjuvan*, hewan yang dipilih, rute injeksi dan protokol dosis.

Berdasarkan faktor-faktor diatas, pemberian *adjuvan* baik *Freund's complete adjuvant* (FCA) maupun *Freund's incomplete adjuvant* (FIA) dan aplikasi secara *sub cutan* pada kelinci yang diimunisasi, berhubungan erat dengan proses degradasi protein pada tubuh kelinci. Pada tubuh atau jaringan, kedua faktor diatas mempengaruhi pembentukan depo protein yang akan dilepas secara bertahap (*gradual*), dimana degradasi ini berhubungan dengan respon imun yang timbul. Semakin cepat protein didegradasikan maka respon imun akan cepat hilang.

Oleh karena itu, pada kelinci yang diinfeksi buatan secara *per oral* titer antibodi akan lebih tinggi. Hal ini dikarenakan L_2 aktif yang dimasukkan, akan dengan mudah menuju jaringan-jaringan dan akan bertahan hidup pada waktu yang lama. Kelebihan lain yang dimiliki oleh L_2 aktif ini adalah daya virulensi yang tinggi sehingga respon imun yang timbul akan jauh lebih tinggi dan berjalan konsisten (Levine, 1978).

Faktor lain yang mempengaruhi antigenitas adalah perbedaan konsentrasi protein dari protein homogenat L_2 *T. vitulorum*. Hal ini ditunjukkan dengan adanya perbedaan pita-pita protein yang didapatkan berdasarkan hasil *running* SDS-PAGE, yang dilakukan oleh peneliti sebelumnya (Maria, 2003). Pada berat molekul (BM) yang sama bila diekspresikan dengan ketebalan pita yang berbeda,

mungkin memiliki antigenitas yang berbeda, sehingga respon imun yang ditimbulkan kemungkinan juga berbeda.

Rendahnya respon imun pada kelinci yang diimunisasi, juga dipengaruhi oleh dosis. Pada penelitian ini dosis yang digunakan sedikit diatas dosis minimal, yaitu 300 µg / ekor, sehingga respon imun yang muncul berbanding lurus dengan dosis. Makin tinggi dosis yang diberikan akan meningkatkan respon imun secara sebanding, tetapi pada dosis tertentu akan terjadi sebaliknya yaitu respon imun akan menurun atau bahkan hilang sama sekali keadaan ini disebut toleransi imunogenik (Subowo, 1993).

Dengan demikian respon imun dari protein L₂ *T. vitulorum* dalam kedua bentuk tersebut baik aktif maupun homogenat, keduanya mempunyai sifat antigenik, tetapi kemungkinan pada infeksi buatan, pemberian L₂ *T. vitulorum* yang aktif ini memicu respon imun lebih tinggi karena adanya daya virulensi terhadap kelinci, sehingga hasil yang didapat menunjukkan respon imun L₂ aktif lebih tinggi daripada L₂ dalam bentuk homogenat. Respon imun humoral ini menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($p < 0,01$), seperti tampak pada lampiran 2.

BAB 6

SIMPULAN DAN SARAN

6.1 Simpulan

Simpulan pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

- 1) Protein L₂ *T. vitulorum* bersifat antigenik.
- 2) Hasil uji *indirect* ELISA menunjukkan terdapat perbedaan yang sangat bermakna antara kelinci yang diinfeksi dengan telur infeksi yang mengandung L₂ dengan kelinci yang diimunisasi dengan homogenat L₂. Diketahui pula respon imun humoral pada infeksi buatan dengan telur infeksi (L₂) lebih tinggi dibandingkan dengan imunisasi dengan homogenat L₂.

6.2 Saran

Penelitian ini perlu dikembangkan lebih lanjut khususnya tentang titer antibodi yang paling tinggi pada L₂ *T. vitulorum* yang diinfeksi buatan pada waktu berikutnya, sehingga dapat dimanfaatkan sebagai bahan uji *western blott* dan mendukung cara diagnosis serologis yang lebih baik.

RINGKASAN

Nikmah Yasmin. Respon Imun Humoral Pada Kelinci yang Diinfeksi Buatan dan Diimunisasi Larva Stadium Kedua *Toxocara vitulorum*. Dibawah bimbingan Poedji Hastutiek., M.Si., drh sebagai dosen pembimbing pertama dan Prof. Dr. Hj. Sri Subekti, DEA.,drh. sebagai dosen pembimbing kedua.

Toxocara vitulorum adalah salah satu cacing nematoda yang sangat berbahaya bagi ternak ruminansia dan bersifat zoonosis. Cacing ini dapat mengakibatkan toxocariasis yang sangat berbahaya bagi manusia, khususnya pada anak-anak. Pada manusia dibedakan menjadi dua macam berdasarkan gejala klinik yaitu, *ocular toxocariasis* dan *visceral toxocariasis*. Pada anak sapi atau kerbau cara penularannya melalui kolostrum.

Diagnosis pada penyakit ini sangat sulit dilakukan karena memiliki hospes pada tingkatan umur yang berbeda, sehingga diagnosis serologik / imunologik sangat dibutuhkan.

Penelitian ini bertujuan mengetahui apakah protein L₂ *T.vitulorum* bersifat antigenik pada kelinci dan apakah terdapat perbedaan respon imun pada kelinci yang diinfeksi buatan dan kelinci yang diimunisasi. Hewan coba yang digunakan adalah 12 ekor kelinci Angora (*Lepus europaeus*) dengan berat badan $\pm$ 5kg / ekor, yang dibagi menjadi tiga perlakuan secara acak. Perlakuan nol: disuntik PBS (kontrol) sebanyak 0,6 ml / ekor / s.c, perlakuan pertama: diinfeksi buatan dengan L₂ *T.vitulorum* sebanyak 1000 butir telur / ekor / oral, perlakuan kedua: diimunisasi dengan homogenat L₂ *T.vitulorum* sebanyak 300 μ g / ekor /s.c. Setelah dua minggu dilakukan penyuntikan ulang (*booster*) pada perlakuan pertama dan kedua dengan dosis yang sama. Khusus pada perlakuan kedua pada awal imunisasi dilarutkan dengan *Freund's Complete Adjuvant* (FCA) dan pada booster ditambah dengan *Freund's Incomplete Adjuvant* (FIA). Panen antibodi dilakukan pada minggu keempat dan pengambilan darah melalui vena aurikularis pada tiap kelinci sebanyak 3 ml. Antibodi yang didapatkan kemudian diuji dengan ELISA-*indirect*, sedangkan pembacaan hasil dengan ELISA *reader* akan berupa

RINGKASAN

Nikmah Yasmin. Respon Imun Humoral Pada Kelinci yang Diinfeksi dan Diimunisasi Larva Stadium Kedua *Toxocara vitulorum*.
Dibawah bimbingan Poedji Hastutiek., M.Si., drh sebagai dosen pembimbing pertama dan Prof. Dr. Hj. Sri Subekti, DEA.,drh. sebagai dosen pembimbing kedua.

Toxocara vitulorum adalah salah satu cacing nematoda yang sangat berbahaya bagi ternak ruminansia dan bersifat zoonosis. Cacing ini dapat mengakibatkan toxocariasis yang sangat berbahaya bagi manusia, khususnya pada anak-anak. Pada manusia dibedakan menjadi dua macam berdasarkan gejala klinik yaitu, *ocular toxocariasis* dan *visceral toxocariasis*. Pada anak sapi atau kerbau cara penularannya melalui kolostrum.

Diagnosis pada penyakit ini sangat sulit dilakukan karena memiliki hospes pada tingkatan umur yang berbeda, sehingga diagnosis serologik / imunologik sangat dibutuhkan.

Penelitian ini bertujuan mengetahui apakah protein L₂ *T.vitulorum* bersifat antigenik pada kelinci dan apakah terdapat perbedaan respon imun pada kelinci yang diinfeksi buatan dan kelinci yang diimunisasi. Hewan coba yang digunakan adalah 12 ekor kelinci Angora (*Lepus europaeus*) dengan berat badan $\pm$ 5kg / ekor, yang dibagi menjadi tiga perlakuan secara acak. Perlakuan nol: disuntik PBS (kontrol) sebanyak 0,6 ml / ekor / s.c, perlakuan pertama: diinfeksi buatan dengan L₂ *T.vitulorum* sebanyak 1000 butir telur / ekor / oral, perlakuan kedua: diimunisasi dengan homogenat L₂ *T.vitulorum* sebanyak 300 μ g / ekor /s.c. Setelah dua minggu dilakukan penyuntikan ulang (*booster*) pada perlakuan pertama dan kedua dengan dosis yang sama. Khusus pada perlakuan kedua pada awal imunisasi dilarutkan dengan *Freund's Complete Adjuvant* (FCA) dan pada booster ditambah dengan *Freund's Incomplete Adjuvant* (FIA). Panen antibodi dilakukan pada minggu keempat dan pengambilan darah melalui vena aurikularis pada tiap kelinci sebanyak 3 ml. Antibodi yang didapatkan kemudian diuji dengan ELISA-*indirect*, sedangkan pembacaan hasil dengan ELISA *reader* akan berupa

angka / nilai *optical density* (OD) dengan panjang gelombang 405 nm. Penelitian ini menggunakan *Posttest Only Control Group Design*, dan data yang diperoleh ditabulasikan dan dianalisis dengan uji F, menggunakan *statistical program and service solution for windows* (SPSS) rel 10,0 dan dilanjutkan dengan uji *Least significant difference* (LSD) 5%.

Hasil penelitian menunjukkan adanya sifat antigenik pada protein L₂ *T. vitulorum* pada kelinci karena dapat berikatan dengan antibodi, protein ini dapat memicu terbentuknya antibodi pada kelinci. Selain itu terdapat perbedaan yang sangat nyata ($p < 0,01$) respon imun pada kelinci yang diinfeksi buatan (L₂ aktif) lebih tinggi daripada kelinci yang diimunisasi (homogenat L₂). Berdasarkan hasil penelitian ini, tingginya titer antibodi pada kelinci yang diinfeksi buatan (L₂ aktif *T. vitulorum*) dipengaruhi oleh bentuk larva yang merupakan stadium aktif, cara pemberian secara *per oral*, sehingga mempunyai kelebihan yaitu, daya virulensi yang tinggi dan memicu lebih bagus respon imun daripada kelinci yang diimunisasi (homogenat L₂ *T. vitulorum*).

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas A.K., Lichtmann A.H., Pober J.S., 2000. Cellular and Molecular Immunology 4th ed. Saunders Company. Philadelphia.
- Abdel-Rahman E.H., 2000. Isolation and structural characterization of *Toxocara vitulorum* specific antigen and its potency in diagnosis of Toxocariasis among buffalo calves. *J Egypt Soc Parasitol.* pp: 30(2) : 387-400.
- Anders R.F., Howard R.J. and Michell G.F., 1982. Parasitic and Methods of analysis. In Immunology of Parasite infection. Oxford :Blackwell Scientific Publication. pp : 529-539.
- Barriga O.O., Omar H.M., 1992. Immunity to *Toxocara vitulorum* repeated infections in rabbit model. Departemen of Veterinary Preventive Medicine, Ohio State University, Colombus 43210. Abstract. *Vet Immunol Immunopathol.* pp: 33(2) : 294-60.
- Bambel F.W.R., 1970. Transmission of passive immunity from mother to young. Amsterdam: North Holland Publishing & Co. pp: 158-159.
- Burgess G.W., 1995. Teknologi ELISA Dalam Diagnosis dan Penelitian. Diterjemahkan oleh Wayan T. Artama. Gadjah Mada University Press.
- Drenchrite, 1996. Larval Development Assay. A product of CSIRO research. Horizon Technology pty Limited. Roseville, Australia. pp: 6-15.
- el-Massry A.A., 1999. Characterization of antigenic property of property of *Toxocara canis* and *Toxascaris leonine* and larva through immunodiagnostic elektrophoresis (SDS – PAGE) and western blot technique. *J.Egypt. Soc. Parasitol.* pp: 29(2) : 335-45.
- Gorp T., 1987. *Toxocara vitulorum* a possible agent of larva migrant in human. *Helminth Zoonosis I*: 159-166.
- Gunawan M. dan Putra A.A.G., 1981. Surveilen Sapi Bali di Bali *Neoascaris vitulorum* pada Pedet. Dalam Laporan Tahunan Hasil Penyidikan Penyakit Hewan di Indonesia. Periode tahun 1978-1981. Hal: 7-15.
- Harlow E. and Lane D., 1998. Antibodies. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Labolatory. New York.
- Hubner J., Uhlikova M., Leissova M., 2001. Diagnosis of the early phase of larva toxocariasis using Ig G avidity. *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* pp: 50 (2) : 67 – 70.

- Ito K., Sakai K., Okajima T., Quchi K., Funakoshi A., Nishimura J., Ibayashi H. and Tsuji M., 1986. Three cases of visceral larva migrans due to ingestion of raw chickens or cow liver. *Nihon Naikagaku Zassi*. pp: 75: 759-766.
- Karnen B., 2000. *Imunologi Dasar*. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia Press, Jakarta. Hal. 31-32.
- Kilpatrick E., 1992. *Toxocariasis in : Tropical Medicine*. 7th ed. London : W.B. Saunders Company. pp: 761-4
- Koesdarto S., Kusnoto, Shoji U., Machfudz, Sri Mumpuni and Halimah P., 2000. The prevalensi of *Toxocara vitulorum* in dairy cows in Surabaya. Proceeding Seminar on Infectious Disease in The Tropics. TDC Airlangga University, Surabaya. Hal. 46-49.
- Kondo K., 1989. *Toxocariasis*. Saisin – Igaku. pp: 44:774-779.
- Kusnoto., 2003. Isolasi dan Karakterisasi Protein Imunogenik Larva Stadium II *Toxocara cati* Isolat Lokal. *Tesis*. Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga. Hal. 3 : 11-13 : 14.
- Kusnoto, Suwarno dan Juniastuti T., 2001. Imunogenitas suspensi homogenat berbagai stadium *Toxocara vitulorum* sebagai pemicu pembentukan antibodi pada mencit. Laporan Penelitian Dosen Muda. Lemlit, Universitas Airlangga, Surabaya.
- Kusumamihardja S., 1993. Parasit dan Parasitosis pada Hewan Ternak dan Hewan Piaraan di Indonesia. Pusat antar Universitas Bioteknologi Institut Pertanian Bogor. Hal. 137-139.
- Levine N.D., 1978. *Textbook of veterinary Parasitology*. Burgess Publishing Company. Diterjemahkan oleh : Ashadi G. 1990. Wardianto ed. Gajah Mada University press. Yogyakarta.
- Maria A.P.R., 2003. Profil Protein Antigen Larva Stadium Kedua (L2) Cacing *Toxocara vitulorum*. *Skripsi*. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Hal. 13-15 : 27-28.
- Morley A., 1978. Growth of Cattle on Phalaris and Lucerne Pastures stocking rate and anthelmintic treatment. *J. Agric. Syst.*, 3: 123-145.
- Playfair J.H.L., 1992. *Immunology at a Glance* 5th ed. Blackwell scientific Publication. University Press, Cambridge.
- Pratiwi T., Cornelissen and Nasich., 1992. A parasitological study on the impact of Nematodes on the production of livestock in the limestone.

- Pratiwi T., 1998. Penentuan protein imunogen larva *Toxocara vitulorum* sebagai usaha menemukan metode imunodiagnosis dini *Toxocariasis* pada induk sapi. **Disertasi**. Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga.
- Propokowicz D. and Sosnowska D., 1990. Toxocariasis Abstract. *Prezgl. Epidemiol.* pp: 44 (3) : 193-8.
- Rajapakse R.P.V.J., 1992. Immunological response of buffalo cows and calves to *toxocara vitulorum* infection. **Disertation**. Submitted for the Degree of Doctor of Philosophy. University of Paradeniya. Srilanka.
- Robert J.A., 1990 ^a. The eggs production of *Toxocara* infection in Asean Buffalo. *J. Parasitol*, 37: 113:120.
- Robert J.A., 1993. *Toxocara vitulorum* in ruminant. *Vet bull.* pp: 63 (6): 545-568.
- Rogers W.P., 1989. Dormancy in nematodes infections. In *Parasitology to Day*. Austr. Suppl. July, pp: 51
- Roitt I., Brostoff J. and Male D., 1998. Immunology 4th ed. Mosby, Times Mirror International Publisher Limited. Barcelona, Spain. pp:18.1-18.9
- Safar E.H., el-Rifaei F. and Makland K.M., 1992. Protein chromatography study on adult *Ascaris lumbricoides*, *Ascaris vitulorum* and *Toxocara canis*. *J.Egypt. Soc. Parasitol.* pp: 22(1) : 171-6.
- Sambrook J., Fritsch E.F., and Maniatis T., 1989. Molecular Clonning. A laboratory manual 2nd ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press. USA. pp: 2. 104-2.107.
- Santoso S., 2000. SPSS Statistik Parametrik. PT Elex Media Komputindo. Kelompok Gramedia-Jakarta.
- Sarwono B., 1991. Beternak Kelinci unggul. PT. Penebar Swadaya, Jakarta. Hal. 42-46 : 55-56.
- Simon H. dan Syahrial H., 1992. Infeksi alamiah *Toxocara vitulorum* pada anak sapi perah di Bayongbong Garut. *Hemerazoa*, 75 (1): 70-76.
- Starke W.A., Machudo R.Z., Bechara G.H. and Zocoller Mc., 1996. Skin hypersensitivity test in Buffaloes parasitized with *T.vitulorum*. *Vet.Parasitol.* pp: 63(3-4) 283-90.
- Subowo, 1993. Imunologi. Bandung. Penerbit Angkasa.

- Tizard I.R., 1982. An Introduction of veterinary immunology. W.B. Saunders Company. Diterjemahkan oleh Masduki Partadiredja dan Soehardjo Hardjosworo. 1987. Airlangga University Press. Hal. 303-324.
- Troncy P.M., Hard J. et Morel P.C., 1981. Preces de Parasitologie veterinaire Tropicale. Institut d'Elevage et de Medicine Veterinaire des pays tropicaux. (*I. EMUT*). France. p:39-40.
- Uga S., Matsumura T., Fujisawa K., Okubo K., Kataoka N., and Kondo K., 1990. Incidence of seropositivity to Human Toxocariasis in Hygo Prefecture, Japan, and its possible role in ophthalmic disease. *J. Jpn.Parasitol.* pp: 39(5):500-502.
- Warren K.S., 1993. Immunology and molecular biology of parasit infections. Edinburgh, Blackwell Sc. pp:55.
- Zainudin, 2001. Metodologi Penelitian Diktat kuliah Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga.

Lampiran 1. Hasil Uji *Indirect* ELISA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Po.1	1,412	1,418	1,340	1,178	0,879	0,821	0,328	0,171	0,077	0,057	0,018	0,004
Po.2	1,052	0,784	0,619	0,493	0,320	0,151	0,124	0,045	0,004	0,000	-0,010	0,014
Po.3	1,351	1,417	1,178	1,025	0,621	0,327	0,197	0,095	0,037	0,007	-0,002	-0,014
Po.4	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
P1.1	1,717	1,752	1,738	1,746	1,745	1,743	1,742	1,741	1,722	1,649	1,474	1,213
P1.2	1,714	1,726	1,725	1,733	1,734	1,731	1,740	1,731	1,735	1,732	1,728	0,994
P1.3	1,719	1,732	1,731	1,739	1,738	1,735	1,736	1,725	1,671	1,444	1,118	0,311
P1.4	1,717	1,723	1,721	1,738	1,723	1,725	1,724	1,720	1,708	1,552	1,245	0,349
P2.1	1,395	1,424	1,444	1,468	1,424	1,491	1,493	1,508	1,439	1,345	1,199	0,937
P2.2	1,565	1,408	1,428	1,417	1,441	1,443	1,452	1,480	1,346	1,446	1,136	1,058
P2.3	1,232	1,306	1,341	1,392	1,434	1,414	1,441	1,479	1,452	1,410	1,349	1,256
P2.4	1,317	1,278	1,354	1,357	1,445	1,460	1,453	1,487	1,434	1,476	1,365	1,154

Keterangan :

- * Mati pada masa adaptasi
 - Kolom 1. Pengenceran 10 kali
 - Kolom 2. Pengenceran 20 kali
 - Kolom 3. Pengenceran 40 kali
 - Kolom 4. Pengenceran 80 kali
 - Kolom 5. Pengenceran 160 kali
 - Kolom 6. Pengenceran 320 kali
 - Kolom 7. Pengenceran 640 kali
 - Kolom 8. Pengenceran 1280 kali
 - Kolom 9. Pengenceran 2560 kali
 - Kolom 10. Pengenceran 5120 kali
 - Kolom 11. Pengenceran 10240 kali
 - Kolom 12. Pengenceran 20480 kali
 - Rata- rata kontrol PBS = 0,001
- Berarti, uji *indirect* ELISA yang dilakukan dinilai baik (PBS < 0,05)

Lampiran 2. Analisa Statistik uji F

Case Processing Summary^a

	Cases					
	Included		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Nilai OD * Perlakuan	11	100.0%	0	.0%	11	100.0%

Case Summaries^a

Perlakuan Kontrol (Injeksi PBS)		1		.328
		2		.124
		3		.197
Total		N	3	
		Sum	.649	
		Mean	.21633	
		Std. Deviation	.103365	
Infeksi Buatan		1		1.742
		2		1.740
		3		1.736
		4		1.724
Total		N	4	
		Sum	6.942	
		Mean	1.73550	
		Std. Deviation	.008062	
Imunisasi protein Ag L2		1		1.493
		2		1.452
		3		1.441
		4		1.453
Total		N	4	
		Sum	5.839	
		Mean	1.45975	
		Std. Deviation	.022824	
Total		N	11	
		Sum	13.430	
		Mean	1.22091	
		Std. Deviation	.658638	

a. Limited to fist 100 cases.

Descriptives

Nilai OD

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Minimum	Maximum
Kontrol (Injeksi PBS)	3	.21633	.103365	.059678	.124	.328
	4	1.73550	.008062	.004031	1.724	1.742
	4	1.45975	.022824	.011412	1.441	1.493
	11	1.22091	.658638	.198587	.124	1.742

ANOVA

Nilai OD

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig
Between Groups	4.315	2	2.157	746.318	.000
Within Groups	.023	8	.003		
Total	4.338	10			

Post Hoc Tests

Multiple Comparison

Dependent Variabel: Nilai OD

LSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig
Kontrol (Injeksi PBS)	Infeksi Buatan	-1.51917*	.041065	.000
	Imunisasi protein Ag L2	-1.24342*	.041065	.000
Infeksi Buatan	Kontrol (Injeksi PBS)	1.51917*	.041065	.000
	Imunisasi protein Ag L2	.27575*	.038018	.000
Imunisasi protein Ag L2	Kontrol (Injeksi PBS)	1.24342*	.041065	.000
	Infeksi Buatan	-.27575*	.038018	.000

Lampiran 3. Bahan Uji *Indirect* ELISA

1). PBS - *Tween*

<i>Tween</i> 20	1 ml
PBS	ad. 1 liter

2). *Carbonat Buffer*

(*Buffer* untuk *coating antigen*)

- NaHCO ₃	2,93 gram
- Na ₂ CO ₃	1,59 gram
- Aquades	ad. 1 liter

simpan pada 4⁰C, tidak lebih dari dua minggu.

3). *Blocking Buffer*

(*Buffer* untuk *blocking* dan pengenceran serum)

PBS – *Tween*

- <i>Creamer</i>	1%
- PBS <i>tween</i>	ad. 100 ml

4). *Washing Buffer*

(*Buffer* untuk pencuci) NaCl – *Tween* 20

- NaCl	9 gram
- <i>Tween</i> 20	1ml
- Aquadest	ad. 1 liter

buat PH 8,6

5). *Conjugate*

- *Alkaline Phosphatase* – *conjugate anti rabbit Ig G*

- Encerkan dengan *Blocking Buffer* 1: 1000 – 1: 3000

6). *Substrat Buffer*

- MgCl 10 mg
 - Diethanolamin 9,7 ml
 - NaN₃ 20 mg
 - Aqua 80 ml
 - HCl pekat s/d PH 9,8
 - Aquadest ad. 100 ml
- (simpan pada suhu kamar)

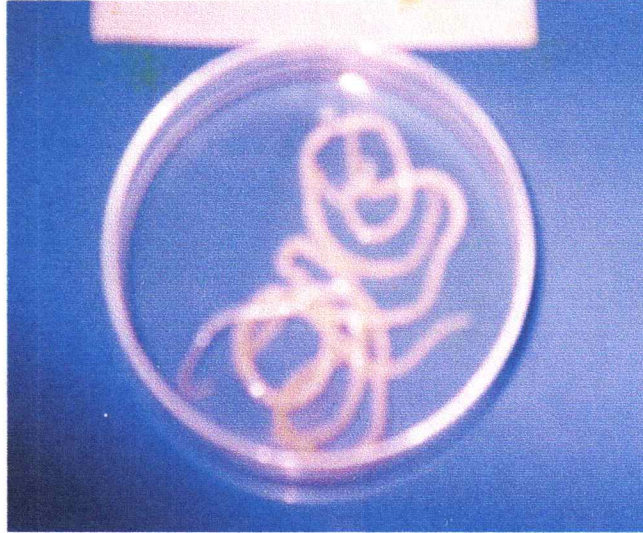
7). *Substrat*

- (*for Alkaline phosphatase*)
 - 4 NPP 10 mg
 - *Substrat Buffer* 10 ml
- harus segar.

8). *Stopper*

- NaOH 3 N

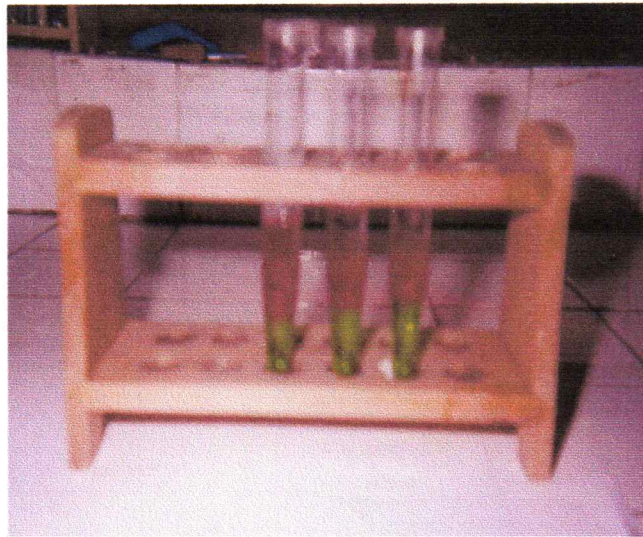
Lampiran 4. Alat dan Bahan Penelitian



Gambar 1. Cacing dewasa *T. vitulorum* yang diperoleh dari *feces* sapi penderita toxocariasis.



Gambar 2. Peralatan yang digunakan pada pemurnian telur.



Gambar 3. Bahan yang digunakan pada pemurnian telur dengan metode gradien preparasi.



Gambar 4. Peralatan yang digunakan untuk menghancurkan protein dengan sonikator.



Gambar 5. Proses pelaksanaan infeksi buatan melalui *peroral*.



Gambar 6. Proses pelaksanaan imunisasi melalui injeksi *sub cutan*.



Gambar 7. Kandang pemeliharaan hewan coba kelinci (*Lepus europaeus*).



Gambar 8. Pelaksanaan pengambilan darah melalui Vena auricularis.



Gambar 9. Peralatan yang digunakan untuk mencuci *microplate* pada uji ELISA.



Gambar 10. Peralatan yang digunakan untuk membaca hasil uji ELISA (ELISA reader).

LEMBAR PENGESAHAN

**RESPON IMUN HUMORAL PADA KELINCI YANG
DIINFEKSI BUATAN DAN DIIMUNISASI
LARVA STADIUM KEDUA**

Toxocara vitulorum

Skripsi sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh

NIKMAH YASMIN
Nim. 069812512

Menyetujui ,
Komisi Pembimbing
Tanggal 13 Mei 2003

Pembimbing Pertama



(Poedji Hastutiek, MSi, drh)

Pembimbing Kedua



(Prof. Dr. Hj. Sri Subekti, DEA., drh)

SKRIPSI

**RESPON IMUN HUMORAL PADA KELINCI YANG
DIINFEKSI BUATAN DAN DIIMUNISASI
LARVA STADIUM KEDUA
*Toxocara vitulorum***



Oleh :

NIKMAH YASMIN
SURABAYA – JAWA TIMUR

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2003**

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Penelitian

Penyakit parasit pada ternak ruminansia yang sering menimbulkan kerugian ekonomi yang cukup besar salah satunya adalah toxocariasis yang disebabkan oleh cacing *Toxocara vitulorum*. Cacing nematoda dengan panjang 25 - 30 cm ini, tidak saja merugikan bagi ternak ruminansia, tetapi juga dilaporkan dapat menginfeksi manusia, sehingga tergolong zoonosis. Toxocariasis pada manusia dilaporkan telah terjadi di Jepang sebanyak 42 kasus (Kondo, 1989).

Angka prevalensi toxocariasis pada anak kerbau sudah diteliti di beberapa negara tropik. Di Srilangka terdapat 70 - 100% anak kerbau yang terserang toxocariasis (Robert, 1990). Untuk daerah Indonesia sendiri, di kota Malang Selatan menunjukkan angka prevalensi pada sapi 76% (Pratiwi dkk., 1992). Penelitian di Bali menunjukkan angka prevalensi pada anak sapi Bali umur 3 - 4 minggu mencapai 75% (Gunawan dan Putra, 1981), sedangkan di Garut pada anak sapi perah didapatkan angka prevalensi sebesar 54,24 % (Simon dan Syahrial, 1992). Di Surabaya angka prevalensi pada anak sapi sebesar 43% (Koesdarto dkk., 2000). Hasil diatas berdasarkan jumlah telur dalam *feces* anak sapi atau kerbau.

Pada anak sapi atau kerbau kerugian yang ditimbulkan sangat menyolok yaitu penurunan laju pertumbuhan sehingga berat badan normal tidak tercapai bahkan hambatan pertumbuhan tersebut mencapai 25 - 40% (Morley, 1978). Manusia dapat tertular penyakit ini karena makanan atau minuman yang

terkontaminasi oleh telur infeksi (*embryonated egg*) atau larva jaringan terutama apabila pemasakan yang kurang sempurna (Ito *et al.*, 1986). Toxocariasis pada manusia adalah penyakit paling penting diantara infeksi oleh cacing nematoda, karena menyebabkan penyakit yang luas pada anak-anak, dan kerusakan mata pada orang dewasa (Playfair, 1992). Toxocariasis pada manusia dibagi menjadi dua bentuk yaitu *visceral toxocariasis* dan *ocular toxocariasis*. Kedua bentuk ini masing-masing diakibatkan adanya *visceral larvae migrans* dan *ocular larvae migrans*. (Uga *et al.*, 1990 ; Hubner *et al.*, 2001).

Siklus hidup *T. vitulorum* mengalami beberapa generasi, yaitu : telur, larva stadium pertama (L_1), L_2 , L_3 , L_4 , dan cacing dewasa. L_1 yang merupakan perkembangan dari telur infeksi sangat sulit ditemukan karena siklusnya sangat pendek. Sementara itu L_2 dapat ditemukan pada organ dalam hati, ginjal dan paru-paru sapi betina yang terinfeksi, dan L_3 dapat ditemukan dalam air susu (kolostrum) dari betina terinfeksi yang baru melahirkan (Robert, 1993).

Telur infeksi yang mengandung larva stadium kedua (L_2) apabila tertelan, telur tersebut akan menetas didalam usus halus kemudian dibawa oleh sistem portal. Pada organ hati, beberapa larva akan tinggal dan menyebabkan terbentuk granuloma, sedangkan yang lain dibawa oleh sistem sirkulasi dan masuk kebeberapa organ (Kilpatrick, 1992). Larva yang tidak kembali ke usus halus akan tetap tinggal di jaringan dan perkembangannya mengalami jalan buntu dan lazim disebut larva dorman (Levine, 1978).

Tipe penularan pada anak sapi atau kerbau sering disebut dengan *transcolostral* karena cara infeksi melalui kolostrum (Robert, 1993). Untuk memutuskan rantai penularan pada anak sapi atau kerbau ini, dapat dilakukan

dengan menghindarkan transmisi larva ke anak melalui air susu. Makhluk hidup lain yang ikut berperan dalam penyebaran penyakit ini adalah cacing tanah, kecoa, ayam, anjing, anak kambing dan khususnya mencit mempunyai fungsi sebagai hospes transpor. Masalah yang saat ini muncul adalah diagnosis penyakit ini berdasarkan pemeriksaan *feces*, yaitu mencari telur cacing dari *T. vitulorum*, tidaklah mutlak dilakukan, mengingat parasit ini memiliki hospes pada tingkatan umur berbeda serta dampak yang ditimbulkan sangatlah berat, terutama pada manusia (Kusnoto, 2003).

Penelitian ini mencoba mengetahui respon imun humoral kelinci dalam membentuk antibodi (imunoglobulin G) dari protein L₂ *T. vitulorum* baik dalam bentuk telur infeksi maupun homogenat. Upaya yang dapat dilakukan ialah dengan mengembangkan uji serologik untuk melihat ikatan antigen-antibodi. Agar mendapatkan hasil yang spesifik, diharapkan protein dalam bentuk homogenat L₂ sebagai imunogen yang dapat digunakan sebagai diagnosis secara serologik atau imunologik.

Sesuai dengan penelitian sebelumnya (Barriga and Omar., 1992) yang telah berhasil menggunakan hewan coba kelinci yang diuji dengan ELISA, maka pada penelitian ini digunakan kelinci Eropa (*Lepus europaeus*). Penggunaan hewan coba ini dipilih karena pemeliharaan dan *handling*-nya yang tergolong mudah, demikian pula saat pengambilan darah melalui vena auricularis.