

# Karakterisasi dan Isolasi Protein Spesifik dari Material *Excretory-Secretory* (ES) *Toxocara cati* untuk Pengembangan Diagnostik Toxocariasis dengan Teknik ELISA

## (Characterization and Isolation of Specific Protein from *Excretory-Secretory* (ES) Material of L2 Dormant of *Toxocara cati* for the Diagnostic Development of Toxocariasis by ELISA Tehnique)

Kusnoto\*, Sri Subekti\*, I Ketut Sudiana\*\*, Soedarto\*\*

### ABSTRACT

The objective of this study was to get the specific protein of *T. cati* that could be used as biomarker in kit diagnostic to toxocariasis diagnosis through antibody test by ELISA technique. This study was conducted by isolating and characterizing *T. cati* protein from secretory-excretory (ES) material of L2 dormant (L2D) by pure protein that was reacted with polyclonal antibody sera. For the first step, ES protein of L2D was identified by SDS-PAGE with Coomassie blue staining. The second step, protein was transferred to nitrocellulose membrane by using polyclonal antibody of anti-L2D *T. cati* that was visualized through goat-anti rabbit conjugate and BCIP+NBT staining. The third step to decide the specific protein fractions based on the molecule weight (MW), and then the specific protein was isolated by elution technique. The fourth was to evaluate the antigenicity, sensitivity and specificity of pure protein by IgG-ELISA as a response against L2D *T. cati* immunization toward mice. The results of the study showed that: *T. cati* have more protein with varied molecular weight ranging from 8 to 200 kDa. The specific proteins of *T. cati* recognized by the anti-L2D *T. cati* sera are the proteins of MW 168, 140, 120, 80, 70, 42, 32, 30, 24, 18, 14, 12 dan 10 kDa. The antigenicity of protein of *T. cati* was higher than that of other worms (*D. caninum* and *Ancylostoma* spp.). The sensitivity of protein of *T. cati* in mice with immunization was 100%, the specificity was 87.5% and the false positive was 12.5%.

**Key words:** toxocariasis, diagnostic, sensitivity, specificity, ELISA

### PENDAHULUAN

Dampak yang ditimbulkan toxocariasis sangat berat terutama bila terjadi ocular larva migrans maupun bila larva sampai ke otak (Havasiova-Reiterova *et al.*, 1995), maka perlu dipikirkan penggunaan imunodiagnosis. Disamping itu, diagnosis dengan pemeriksaan feses untuk menemukan telur cacing tidak dapat dilakukan pada hospes aberan karena siklus hidup cacing terhenti pada stadium larva kedua (L2). Untuk pengembangan imunodiagnosis toxocariasis diperlukan protein dengan sensitivitas dan spesifisitas tinggi, protein tersebut pada *T. cati* hingga saat ini belum ditemukan. Toxocariasis adalah penyakit yang disebabkan oleh infeksi cacing *Toxocara* spp. dan bersifat zoonosis. Stadium dewasa dari parasit ini dapat ditemukan

pada hewan muda dan induk jantan hospes definitif. Hospes definitif *Toxocara vitulorum* adalah sapi dan kerbau sedang *Toxocara canis* adalah anjing dan *Toxocara cati* adalah kucing, ada kemungkinan dapat ditemukan *T. canis* pada kucing dan *T. cati* pada anjing (Lee *et al.* 1993; Li *et al.*, 2006). Hewan lain bahkan manusia dapat terserang toxocariasis dari ketiga spesies tersebut dalam bentuk infeksi L2 dengan gejala klinis yang variatif (Uga *et al.*, 1990; Humbert *et al.*, 2000; Hubner *et al.*, 2001).

Toxocariasis perlu mendapat perhatian karena populasi anjing dan kucing di Indonesia cukup tinggi serta kedekatan hewan kesayangan ini dengan manusia. Kebiasaan kucing menimbun feses dengan tanah setelah defikasi dapat memperlama daya tahan telur cacing di dalam tanah,

\* Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

\*\* Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

hal ini perlu diwaspadai mengingat anak-anak senang berada di tanah gembur (Kusnoto dkk., 2002). Prevalensi toxocariasis pada kucing di Surabaya tergolong tinggi, yaitu sebesar 74% (Sudiana dkk., 1994), pada kucing liar sebesar 60,9% dari 69 sampel dan pada anjing (dari tempat pemotongan anjing) sebesar 31,3% dari 48 sampel (Kusnoto dkk., 2002). Keberadaan telur *Toxocara* spp. dalam tanah di sekitar rumah potong hewan adalah 31,9%, sedangkan di sekitar peternakan sapi perah sebesar 20,6% (Kusnoto dkk., 2001). Keadaan ini dapat meningkatkan resiko toxocariasis pada manusia (Beer et al., 1999). Kilpatrick (1992) menyatakan bahwa, toxocariasis pada manusia merupakan hasil infeksi L2 *T. canis* dan *T. cati* atau mungkin spesies lain. Penyakit tersebut pada manusia dikenal dengan sebutan *human toxocariasis*, yang merupakan salah satu penyakit cacing zoonosis yang sangat umum (Humbert et al., 2000; Soedarto, 2003).

Nematoda parasitik terutama superfamili Ascaridoidea menginfeksi seluruh kelompok vertebrata dan banyak genus maupun spesies yang berpengaruh besar terhadap sosio-ekonomi (Li et al., 2006). Genus yang penting terutama adalah *Toxocara*, karena beberapa spesies *Toxocara* dapat ditularkan dari hewan ke manusia (zoonotik) dan dapat menyebabkan gangguan klinis yang berarti (Humbert et al., 2000; Pawlowski, 2001; Despommier, 2003; Fisher, 2003). Sebagai contoh, larva *Toxocara canis* dapat menyerang jaringan manusia dan menyebabkan *visceral larvae migrans* (VLM), *ocular larvae migrans* (OLM), *eosinophilic meningoencephalitis* (EME) dan atau *covert toxocariasis* (CT) (Hubner et al., 2001; Soedarto, 2003; Vidal et al., 2003). Sumber utama infeksi pada manusia adalah tanah terkontaminasi dengan telur infeksi (Radman et al., 2000), terutama pada anak yang masih mempunyai sifat *geophagia* dan kontak dengan hewan penderita (Alonso et al., 2000), maupun yang memasukkan jarinya ke mulut (Marx, 1991).

Dalam satu siklus hidup *Toxocara* spp. mengalami beberapa stadium, yakni stadium telur, stadium larva pertama (L1), kedua (L2), ketiga (L3), keempat (L4), dan cacing dewasa sehingga memiliki profil protein yang berbeda. Pengamatan terhadap telur *T. vitulorum* didapatkan protein dengan berat molekul (BM) 240 dan 206 kDa yang dapat dikenali oleh antibodi terhadap cacing dewasa, namun dapat dikenali pula oleh antibodi terhadap cacing lain (Abdel-Rahman et al., 2000). Pengamatan terhadap *surface antigen* dan *excretory-secretory* (ES) *antigen* dari larva infeksi *T. canis* didapatkan reaksi silang dengan antibodi terhadap *T. canis* dan *T. cati* pada BM 200 kDa, sedangkan yang lebih spesifik diperkirakan

pada BM 80 kDa (Bowman et al., 1987). Hasil identifikasi protein *T. vitulorum* dewasa dengan teknik *Western blot* menunjukkan protein spesifik yaitu diperkirakan pada BM 34,8 dan 44,9 kDa (Sri Subekti dkk., 2002), 133 dan 143 kDa (Abdel Rahman dan Megeed, 2000), 92 dan 87 kDa (Abdel-Rahman, 2000), namun beberapa protein tersebut ada yang masih menunjukkan reaksi silang dengan antibodi terhadap cacing lain. Berdasarkan hasil uji *skin test*, respon imun humoral berupa reaksi hipersensitifitas yang ditunjukkan pada anak kerbau terhadap ekstrak larva infeksi *T. vitulorum* lebih tinggi dibandingkan dengan antigen ES. Kenyataan tersebut memberikan indikasi bahwa perlu dilakukan karakterisasi lebih lanjut terhadap protein *Toxocara* spp. agar dapat ditemukan protein dengan sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi dan dapat digunakan sebagai bahan uji (antigen) pada diagnosis toxocarariasis secara imunologik khususnya dengan teknik ELISA.

Telah diketahui, bahwa toxocariasis mungkin terjadi pada manusia di seluruh dunia, termasuk manifestasi klinisnya, yaitu *visceral* dan *ocular larvae migrans* (Hubner et al., 2001). Mengingat dampak yang ditimbulkan sangat berat, maka perlu dipikirkan penggunaan imunodiagnosis pada manusia. Keberadaan larva dalam jaringan akan menimbulkan jejas, sehingga timbul respons imun yang ditandai dengan keberadaan imunoglobulin E dan peningkatan kadar eosinofil yang merupakan jenis khusus dari *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* (ADCC). Respons tersebut dilengkapi dengan kecenderungan dari cacing untuk menstimulasi subset  $Th_2CD_4^+$  dari sel Th mensekresi IL-4 dan IL-5. Interleukin-4 merupakan limfokin yang merangsang sel B untuk berdeferensiasi menjadi sel plasma dan menghasilkan Ig E, sedangkan IL-5 merupakan pemicu potensial terhadap pembentukan eosinofil (Abbas et al., 2000). Interleukin-4 dan IL-5 berperan dalam kontrol produksi Ig E dan Ig G1, sedangkan  $Th_1CD_8^+$  menghasilkan interferon gamma yang menghambat reaksi hipersensitivitas dan memicu produksi Ig G2. Antibodi yang dihasilkan oleh sel-sel imun tubuh tersebut bersifat spesifik baik terhadap *T. cati* dan sebagian beredar dalam darah perifer, sehingga dapat dideteksi dengan teknik imunodiagnostik, yang pada prinsipnya adalah mendeteksi ikatan antigen-antibodi spesifik terhadap *T. cati* dalam serum penderita. Karena dalam pemeriksaan tersebut diperlukan antibodi dan antigen spesifik terhadap *Toxocara* spp., maka perlu dikaji lebih lanjut tentang imunogenisitas dan antigenisitas penyebab penyakit tersebut dengan mempersiapkan perangkat diagnostik yang mempunyai nilai sensitivitas dan spesifisitas tinggi, sehingga penyakit tersebut dapat didiagnosis lebih dini, cepat, tepat dan akurat.

Radman *et al.* (2000) menyetujui bahwa diagnosis dini dan pengobatan dapat menyelamatkan hidup penderita toxocariasis.

Protein spesifik sangat diperlukan untuk pengembangan diagnosis toxocariasis dengan pemeriksaan antibodi khususnya dengan menggunakan teknik ELISA. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan analisis, karakterisasi dan isolasi protein spesifik *T. cati* sehingga dapat dimanfaatkan untuk pengembangan diagnostik pada kasus toxocariasis dengan pemeriksaan serum menggunakan teknik *indirect-ELISA*.

## MATERI DAN METODE

**Jenis dan Rancangan Penelitian.** Dilakukan dua macam penelitian, yaitu: 1) Penelitian deskriptif, untuk menentukan karakter morfologi, protein secara biokimiawi dan imunologik *Toxocara cati* dengan uji *blotting*, nilai sensitivitas dan spesifisitas dengan teknik ELISA pada serum hewan coba (mencit) dan serum hewan terinfeksi secara alami; 2) *True experimental study*, yaitu menggunakan: *Posttest only control groups design* untuk mempelajari respons imun humoral mencit dalam memproduksi Ig G (Campbell dan Stanley, 1963; Zainuddin, 2000).

**Prosedur Penelitian.** Prosedur penelitian ini terdapat beberapa tahap, yaitu: 1) Tahap pertama adalah koleksi dan identifikasi cacing *Toxocara* spp.; 2) Tahap kedua adalah identifikasi protein cacing *Toxocara* spp. dengan teknik SDS-PAGE; 3) Tahap ketiga adalah karakterisasi protein dengan teknik *Western blot* dan isolasi protein spesifik; 4) Tahap keempat adalah uji antigenisitas, sensitivitas dan spesifisitas protein dengan teknik ELISA pada hewan coba (mencit yang diimunisasi berbagai homogenat cacing).

**Koleksi Sampel *Toxocara* spp. dari Kucing.** Kucing penderita toxocariasis yang diperoleh dari beberapa pasar di Surabaya diberi obat cacing piperazine sitrat untuk memperoleh cacing *Toxocara* spp. dewasa. Cacing dewasa kemudian dibersihkan dengan NaCl fisiologis dan diinkubasi dalam medium NaCl fisiologis dan *phosphat buffer saline* (PBS) pada suhu inkubator 37° C selama 4 jam. Kemudian telur cacing dipisahkan dengan cairan supernatan dengan penyaring ukuran 25 µm. Telur cacing kemudian dipupuk sedangkan supernatannya yang berisi material *excretory-secretory* (ES) disimpan dalam *Freezer* -20° C hingga digunakan.

**Isolasi larva stadium ke-2 (L2) dan L2 dorman.** Apabila telur yang diperoleh dari cacing dewasa tersebut jumlahnya kurang maka dilakukan isolasi dari feses kucing penderita dengan memisahkan telur dari kotoran dengan teknik *preparation of gradients* (DrenchRite, 1996).

Selanjutnya telur cacing diidentifikasi, kemudian dipupuk dalam medium PBS + NaCl pada suhu ruang selama 21–28 hari untuk memperoleh L2. Kemudian L2 yang diperoleh sebagian dibuat homogenat dan sebagian lagi untuk produksi L2 dorman. Larva kedua dorman (L2D) dibuat dengan cara menginfeksi mencit dengan L2 *Toxocara* spp. dengan dosis 10 butir per gram berat badan secara per oral. Empat hari setelah infeksi semua mencit dikorbankan untuk dilakukan isolasi L2 dorman dengan preparasi jaringan. Kemudian L2 dorman yang diperoleh diinkubasi dalam medium RPMI dan PBS pada suhu inkubator 37° C selama 4 jam. Kemudian L2 dipisahkan dengan melakukan sentrifus terhadap cairan medium, supernatan yang berisi material ES disimpan dalam *Freezer* pada suhu -20° C hingga digunakan, sedangkan L2 dorman disiapkan untuk pembuatan homogenat *whole L2 dorman*.

**Identifikasi protein cacing *Toxocara cati* dengan teknik SDS-PAGE.** Tahap kedua ini terdiri dari: 1) Pembuatan homogenat (*whole worm extract*); 2) Identifikasi protein *Toxocara canis* dengan SDS-PAGE; dan 3) Penentuan berat molekul (BM) protein. Teknik pembuatan homogenat cacing (*whole worm extract*) adalah: bagian tubuh cacing *T. cati* dihancurkan secara manual dengan mortar kemudian dimasukkan tabung reaksi (ukuran 10 ml) dan disuspensi dengan 3 ml PBS, selanjutnya dilakukan sonikasi pada frekuensi 35 kHz dengan pola 3 × 60 detik dengan interval istirahat 60 detik. Suspensi tersebut kemudian dihancurkan lagi dengan bantuan 10% detergen garam natrium N-lauroilsarkosin serta dipusingkan pada 5.000 rpm (3000 g) selama 15 menit. Supernatan diambil dan dipusingkan kembali pada 35.000 rpm (10.000 g) selama 25 menit. Pelet dan supernatan dipisahkan, selanjutnya pelet disimpan untuk bahan analisis protein dengan SDS-PAGE, *blotting* dan imunisasi pada kelinci dan mencit. Hasil pembuatan homogenat *Toxocara canis* dilakukan *running* dengan teknik *sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE).

Komposisi SDS-PAGE yang dipakai adalah *separating gel* 12% (2,5 ml acrylamide; 1,2 ml Tris-HCl pH 8,8; 1,2 ml SDS 0,5%; 1,1 ml aquadest, 50 µl Temed dan 30 µl APS 10%) dan *stacking gel* 10% (0,66 ml acrylamide; 0,8 ml Tris-HCl pH 6,8; 0,8 ml SDS 0,5%; 0,74 ml aquadest; 4 µl TEMED dan 20 µl APS 10%).

Setelah larutan gel pemisah 15% dimasukkan pada gel *plate* pada posisi vertikal kemudian di atasnya diberi butanol sampai mengeras dan kemudian butanol dibuang dan dibersihkan dengan PBS dan dikeringkan dengan kertas *Whatman*. Selanjutnya ditambahkan *stacking gel* dan

setelah itu dimasukkan *comb* dan ditunggu sampai betul-betul *set*. *Plate* berisi gel kemudian dipasang pada Minigel Twin G-42 slab dan dituangkan *electrophoresis buffer* (30,29 g Tris aminomethan; 144,13 g glisin; 10 g SDS dalam 1000 ml aquadest). Sebanyak 15 µl sampel berupa homogenat *T. cati* ditambah *Lamlli buffer* sama banyak. Kemudian sampel didenaturasi dengan *Lamlli buffer* (Tris-HCl pH 6,8 1,0 ml, gliserin 0,8 ml, SDS 10% 1,6 ml, bromfenolblue 0,5% 0,4 ml, merkaptoetanol 5% 50 µl, aquades 3,8 ml) pada pemanasan 100° C selama 5 menit, dimasukkan pada sumuran *stacking gel*. Sebagai marker digunakan protein dengan berat molekul pada kisaran 14,5–200 kDa produksi BIO-RAD. Elektrophoresis dinyalakan dengan tegangan 40 V dengan kuat arus 10 mA dan ditingkatkan menjadi 120 V 25 mA ketika sampel telah melewati *stacking gel*; kira-kira selama 1-2 jam. Pencucian terhadap gel hasil *running* dilakukan tiga tahap, yaitu: 1) Pencucian pertama, menggunakan 25 ml metanol 50%, 3,75 ml asam asetat 7,5% dan 71,25 ml akuades selama 30 menit; 2) Pencucian kedua, menggunakan 2,5 ml metanol 5%, 3,75 ml asam asetat 7,5% dan 93,75 ml aquadest selama 20 menit; dan 3) Pencucian ketiga, menggunakan glutaraldehida 10% selama 25 menit. Gel kemudian diwarnai dengan teknik pewarnaan *coumasie blue* selama 15 menit, dilanjutkan pencucian dua kali 2 menit dengan 100 ml aquadest. Setelah gel terwarnai kemudian dimasukkan dalam larutan asam asetat 10% untuk menghentikan proses pengecatan. Selanjutnya gel dapat didokumentasi dengan kamera digital, disimpan pada larutan gliserin 10% atau dikeringkan (Harlow dan Lane, 1988).

Penentuan berat molekul (BM) protein hasil *running* SDS-PAGE dan *Western blot* dilakukan dengan bantuan protein standar (marker, Biorad). Penentuan BM protein dilakukan dengan mencari hubungan (korelasi) antara nilai *retardation factor* (RF) dengan log berat molekul (BM) protein marker. Nilai RF diperoleh dengan menghitung hasil pembagian antara jarak pergerakan pita protein dari tempat awal (jarak pita) dengan jarak pergerakan warna dari tempat awal (panjang gel) (Hostettmann *et al.*, 1986; Rantam, 2003). Secara praktis penghitungan nilai RF dapat dirumuskan sebagai berikut:

$$RF = \frac{\text{Jarak pergerakan protein dari tempat awal}}{\text{Panjang gel (Jarak pergerakan warna dari tempat awal)}}$$

Formula yang diperoleh dapat berupa regresi linier, kuadratik atau kubik dan digunakan untuk menghitung BM pada sampel dengan menentukan nilai RF sampel (X) dan BM sampel (Y).

### Karakterisasi protein dengan *Western blot* dan isolasi protein spesifik.

Tahap ketiga terdiri dari 1) Pembuatan antibodi poliklonal; 2) Karakterisasi protein dengan *Western blot*; 3) Isolasi protein spesifik; dan 4) Identifikasi protein murni hasil isolasi. Pembuatan antibodi poliklonal dilakukan dengan cara menyuntikkan protein dari excretory-secretory (ES) larva kedua dorman yang tinggal dalam jaringan hospes (L2D) *T. cati* pada kelinci ras Angora. Penyuntikan pertama, homogenat ditambah *complete Freund's adjuvant* (CFA) sama banyak, selanjutnya dilakukan *booster* sebanyak 4 kali dengan interval 2 minggu. Pada saat *booster*, homogenat ditambah *incomplete Freund's adjuvant* (IFA) sama banyak. Dua minggu setelah penyuntikan terakhir dilakukan pengambilan darah kelinci untuk mendapatkan serum anti-*T. cati*.

Karakterisasi protein dengan *Western blot* dilakukan dengan cara: homogenat *Toxocara canis* dilakukan *running* lagi dengan teknik SDS-PAGE dan akhirnya protein ditransfer ke membran *nitrocellulose* dan selanjutnya dilakukan *blotting*. Adapun prosedur kerja karakterisasi protein adalah meliputi *semi-dry blotting* dan *blotting*. Pada tahap *semi-dry blotting*, dilakukan beberapa hal sebagai berikut: Protein dari gel kemudian ditransfer ke membran nitroselulosa (PVDF) dengan cara memotong kertas Whatman dan PVDF sesuai dengan besarnya gel. Enam *sheets* kertas absorben pada anoda bufer I dan 3 *sheets* pada anoda bufer II dan 6 *sheets* pada katoda bufer. Membran PVDF di inkubasikan pada anoda bufer II selama 5 menit kemudian disusun 6 *sheets* kertas absorben dari bufer I, 3 *sheets* dari bufer II, PVDF, poliakrilamid dan 6 *sheets* kertas absorben dari katoda bufer. Selanjutnya diberi aliran listrik dengan 0,8 mA/cm<sup>2</sup> dari gel. Setelah protein ditransfer, PVDF dicuci dengan aquadest selama 10 menit dan larutan TBS selama 10 menit yang selanjutnya dilakukan *blotting*.

Adapun tahapan *blotting* adalah sebagai berikut: Membran PVDF *blot* diblok dengan BSA 10% selama 30 menit pada temperatur ruangan kemudian dicuci dengan larutan TBS dua kali. Selanjutnya direaksikan dengan antibodi monoklonal dan poliklonal. Setelah itu diinkubasikan pada temperatur ruangan selama 1 jam. Setelah dicuci dengan larutan TBS sebanyak tiga kali direaksikan dengan konjugat alkalin fosfatase dan substrat p-NPP dan diwarnai dengan BCIP/NBT. Akhirnya dikeringkan pada temperatur ruangan. Dari hasil ini kemudian ditentukan BM protein, protein spesifik dan didokumentasi, kemudian dilakukan isolasi protein.

**Isolasi dan identifikasi protein spesifik dengan teknik elusi.** Proses preparasi gel ini diawali seperti proses

SDS-PAGE, akan tetapi setelah proses *running*, gel hasil *running* tidak diwarnai seperti halnya pada prosedur SDS-PAGE. Perbedaan lainnya terlihat pada jumlah kolom pada gel, pada satu gel SDS-PAGE dapat terdiri dari sepuluh kolom, sedangkan pada gel yang dipakai pada elusi hanya digunakan satu kolom untuk marker dan sisa gel yang lainnya dibuat menjadi satu kolom yang lebar. Sampel yang dibutuhkan untuk proses elusi sebanyak 180 µl, hal ini dikarenakan sampel yang dibutuhkan untuk satu kolom pada gel kurang lebih 20 µl, untuk elusi sembilan kolom dijadikan menjadi satu kolom sehingga sembilan kolom tersebut dikalikan dengan 20 µl menjadi 180 µl (Rantam, 2003).

Pada proses elusi, setelah *running*, dilanjutkan dengan pemotongan marker untuk selanjutnya marker tersebut diwarnai menggunakan pewarnaan *coumasie blue*. Marker yang telah diwarnai nantinya berguna sebagai acuan pada proses pemotongan gel band/pita yang diinginkan. Gel hasil pemotongan tersebut kemudian dimasukkan dalam plastik selofan. Setelah gel masuk ke dalam selofan, ujung selofan bagian bawah diikat dan dilanjutkan dengan penambahan cairan PBS 1 kali 2 ml. Kemudian ujung selofan diikat pada bagian atasnya. Setelah itu dilakukan proses *running* pada *electroelusi* yang telah ditambahkan larutan buffer 500 µl dengan cara meletakkan selofan tersebut pada kutub anoda katoda yang ada pada *electroelusi* dengan tegangan 125 volt, 40 mA. Proses ini dilakukan kurang lebih selama 45 menit (Bhadwaj, 1999). Tujuan dari proses ini adalah memisahkan protein antigen dengan gel sehingga nantinya didapatkan cairan hasil protein antigen yang telah dimurnikan dan gel. Setelah *running* selesai, cairan hasil *running* yang terdapat dalam selofan dimasukkan ke dalam tabung Ependorf dan disimpan pada suhu -7° C (Rantam, 2003). Protein murni hasil isolasi selanjutnya dilakukan identifikasi protein lagi menggunakan teknik SDS-PAGE dengan prosedur yang sama dengan sebelumnya, hal ini dilakukan untuk menentukan protein spesifik yang didapatkan. Gel hasil *running* didokumentasikan dengan bantuan kamera digital.

**Uji antigenisitas, sensitivitas dan spesifisitas pada diagnosis toxocariasis dalam serum darah hewan coba (mencit).** Tahap ini meliputi: 1) Imunisasi pada mencit; 2) Uji antigenisitas; dan 3) Uji sensitivitas dan spesifisitas pada hewan coba (mencit) dengan *indirect-ELISA*. Mencit Balb/c jantan umur 6–8 minggu dibagi menjadi beberapa kelompok: Kelompok 1, diimunisasi dengan homogenat *T. cati*; Kelompok 2, diimunisasi dengan homogenat cacing *Ancylostoma* spp.; Kelompok 3, diimunisasi dengan homogenat cacing *D. caninum*; Kelompok 4, diinjeksi dengan

ajuvan sebagai kontrol. Imunisasi dilakukan sebanyak lima kali dengan interval waktu 2 minggu. Imunisasi pertama dengan penambahan *complete Freund's adjuvant* sama banyak dan imunisasi berikutnya (*booster*) dengan protein yang sama dalam *incomplete Freund's adjuvant*. Aplikasi imunisasi dilakukan secara subkutan dengan dosis 200 µg protein/ekor. Dua minggu setelah *booster* terakhir serum dipanen untuk dilakukan uji sensitivitas dan spesifisitas dengan *indirect-ELISA*.

Uji antigenisitas protein murni dilakukan dengan melakukan analisis nilai *optical density* (OD) hasil pembacaan dengan *ELISA-reader* dengan uji Anava. Untuk menentukan sensitivitas dan spesifisitas protein *T. cati* dilakukan pengujian terhadap serum mencit yang telah diimunisasi protein ES *T. cati* dan homogenat cacing lain.

Untuk penilaian hasil uji sensitivitas dan spesifisitas adalah nilai sensitivitas dinyatakan tinggi apabila protein murni dapat mendeteksi antibodi semua hewan yang menderita toxocariasis. Spesifisitas dinyatakan tinggi apabila protein murni (antigenik) tersebut dapat mendeteksi semua hewan yang menderita toxocariasis, tetapi tidak didapatkan *false positive* dengan penyakit cacing lain. Sensitivitas dihitung berdasarkan nilai yang diperoleh dari perbandingan antara OD (+) dengan jumlah antara OD (+) dan OD (-) dari hasil pemeriksaan serum toxocariasis (+) dengan yang dinyatakan dalam persen. Spesifisitas dihitung berdasarkan nilai yang diperoleh dari perbandingan antara OD (-) dengan jumlah antara OD (+) dan OD (-) dari hasil pemeriksaan serum darah toxocariasis (-) yang dinyatakan dalam persen (Tabel 1) (de Savigny, 1980).

**Tabel 1.** Tabulasi Silang Penghitungan Nilai Sensitivitas dan Spesifisitas

Hasil pemeriksaan rutin*	Hasil ELISA		Jumlah
	OD +	OD -	
Toxocariasis +	a	b	a + b
Toxocariasis -	c	d	c + d
Total	a + c	b + d	a + b + c + d

\*pemeriksaan feses secara konvensional

$$\text{Sensitivitas} = \frac{a}{a + b} \times 100\%$$

$$\text{Spesifisitas} = \frac{d}{c + d} \times 100\%$$

**Analisis data.** Data yang diperoleh pada penelitian ini berupa karakter protein, nilai antigenisitas, sensitivitas

dan spesifisitas. Berat molekul protein cacing dan karakter protein spesifik *T. cati* disajikan secara deskriptif, akan tetapi penghitungan BM protein hasil *running* dilakukan dengan menggunakan rumus korelasi regresi (**Hostettmann et al.**, 1986). Nilai antigenisitas yang diukur berdasarkan nilai OD serum mencit diinterpretasikan secara kuantitatif dan kualitatif. Secara kuantitatif nilai OD dianalisis dengan Anava yang dilanjutkan dengan uji HSD1% menggunakan SPSS *for Windows rel. 13* (**Santoso**, 2000). Secara kualitatif (OD + dan -) disajikan secara deskriptif dengan tabulasi silang, sedangkan nilai sensitivitas dan spesifisitas dinyatakan dalam bentuk persen (**de Savigny**, 1980).

## HASIL DAN DISKUSI

### Identifikasi Protein *Toxocara cati* Berdasarkan Berat Molekul

Untuk mengetahui berat molekul (BM) protein *T. cati* dilakukan identifikasi protein dengan teknik *sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE). Hasil *running* SDS-PAGE dengan pewarnaan *coomasi blue* disajikan pada Gambar 1a. Berdasarkan hasil analisis regresi terhadap hasil identifikasi protein cacing *T. cati* dapat diketahui terdapat beberapa pita protein antara lain dengan BM 168, 140, 120, 91, 80, 70, 62, 54, 51, 48, 45, 42, 38, 35, 34, 33, 32, 30, 29, 27, 25, 24, 23, 20, 18, dan 14 kDa. Jumlah protein yang banyak ini dapat dimengerti karena cacing merupakan organisma multiseluler. Pada *running* kedua didapatkan protein dengan BM di bawah 20 kDa lebih banyak dibanding *running* pertama, bahkan pernah didapatkan protein di bawah 10 kDa. Protein dari BM rendah lebih banyak yang muncul karena digunakan marker dengan BM protein terendah 6,5 kDa. Hal ini sesuai dengan pendapat Harlow dan Lane (1998) yang menyatakan, bahwa untuk mendapatkan berat molekul (BM) yang tepat, diperhitungkan dengan marker protein yang berkisar antara 6,5 kDa sampai dengan 205 kDa.

Dari hasil analisis protein cacing *T. cati* didapatkan perbedaan ekspresi beberapa protein, yaitu pada protein dengan BM 24, 35, 54, 140 dan 168 kDa tampak diekspresikan lebih tebal dibanding protein lain. Hal ini mungkin juga ada kaitannya antara genetik dan kadar protein homogenat (**Kusnoto**, 2003; 2008). Lebih lanjut dinyatakan, bahwa mengingat penghitungan BM protein menggunakan rumus regresi dan mungkin dapat terjadi perbedaan relatif dalam menentukan jarak pita protein maupun panjang dan awal pengukuran gel, maka dalam menentukan BM protein ini menanggung resiko selisih atau penyimpangan dari berat yang sebenarnya, sehingga

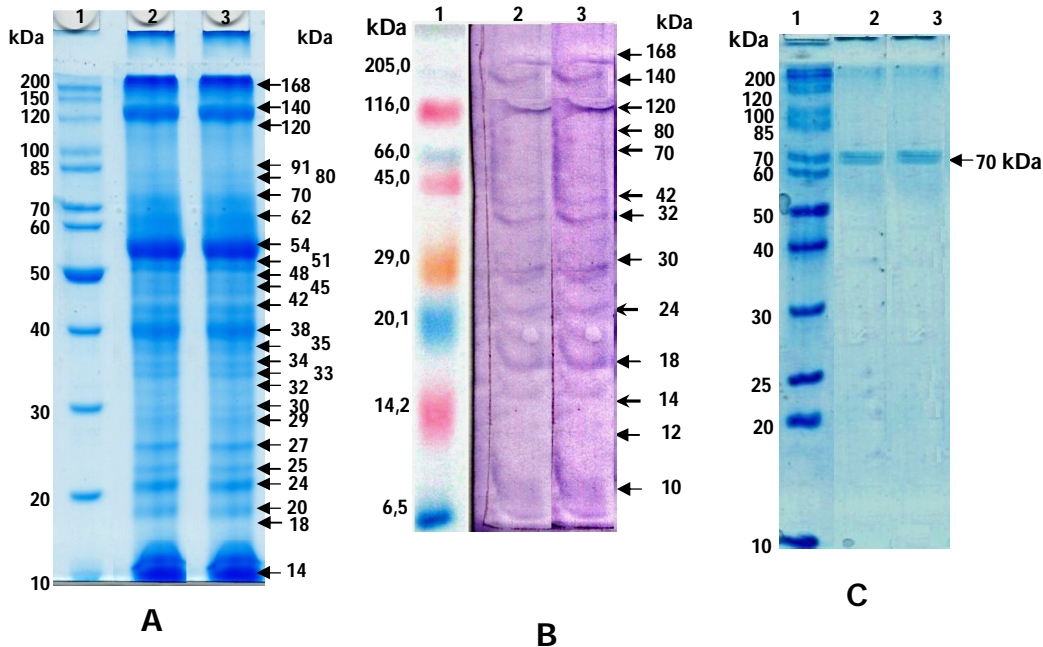
kemungkinan ada beberapa BM protein yang memiliki sedikit perbedaan dengan penelitian lain tetapi sebenarnya yang dimaksud adalah protein yang sama.

Hasil penelitian ini memberi gambaran begitu banyak protein yang ditemukan pada *T. cati*, namun demikian hal yang lebih ekstrim dinyatakan oleh **Page et al.** (1992), bahwa sekret *Toxocara* spp. dengan analisis gel dua-dimensi setidaknya mengandung 50 makromolekul yang berbeda. **Maizels** (2004) menyatakan, bahwa meskipun memiliki banyak komponen mungkin berasal dari hasil gen individual. Produk utama *Toxocara excretory-secretory* (TES) adalah seluruh glikosilat, ada yang besar dan total material sekret mengandung 400 µg karbohidrat per mg protein.

### Karakterisasi protein *Toxocara cati* dengan Teknik *Western Blot*

Hasil karakterisasi protein ES L2D *T. cati* dengan serum anti-L2D *T. cati* menggunakan teknik *Western blot* dapat dilihat pada Gambar 1b. Hasil *Western blot* dengan pewarnaan BCIP+NBT menunjukkan terdapat beberapa pita protein spesifik, pita ikatan tersebut dari atas ke bawah masing-masing adalah pada protein dengan BM 168, 140, 120, 80, 70, 42, 32, 30, 24, 18, 14, 12 dan 10 kDa.

Hasil karakterisasi protein tersebut menunjukkan beberapa pita ikatan antigen-antibodi (Ag-Ab) dengan kualitas yang berbeda. Perbedaan karakter yang terjadi pada pita ikatan antara Ag-Ab tersebut menunjukkan bahwa kemungkinan selain terdapat perbedaan kadar protein dalam homogenat juga memang protein tersebut berbeda secara genetik walaupun protein tersebut memiliki BM yang sama (**Kusnoto**, 2008). Konsentrasi protein yang digunakan sebagai sumber antigen sangat berpengaruh terhadap imunogenisitas protein tersebut (**Abbas et al.**, 2000), namun demikian pada uji yang lebih peka tidak menutup kemungkinan pita yang lebih tipis justru lebih spesifik (**Kusnoto dkk.**, 2005; **Kusnoto**, 2008) dan dapat juga memiliki antigenisitas yang lebih tinggi. Hal ini sesuai dengan pendapat **Obwaller et al.**, 2001) yang menyatakan, bahwa miosin (*miocin*) dari parasit nematoda memicu respons imun humoral (RIH) dan seluler dengan kuat dan banyak diteliti sebagai kandidat vaksin miosin. Pada parasit nematoda, miosin diperlukan untuk mobilitas parasit, pada waktu yang sama miosin menjadi terbuka dari kutikula bilamana salah satu parasit dihancurkan dan menjadi antigen yang penting. Pada cacing *Toxocara* spp., miosin menunjukkan sebagai antigen yang kuat, khususnya bagian rantai berat (*heavy chain*).



**Gambar 1.** Hasil identifikasi, karakterisasi dan isolasi protein *T. cati*. A, SDS-PAGE dengan pewarnaan *coomassil blue*, kolom 1 = marker, 2-3 = sampel *T. cati*; B, *Western blot*, kolom 1 = marker Rainbow (Sigma), kolom 2-3 ES L2D *T. cati*; C, SDS-PAGE hasil elusi p70 *T. cati*.

### Identifikasi Protein dari Hasil Isolasi dengan Teknik SDS-PAGE

Analisis protein hasil elusi protein cacing *T. cati* dilakukan untuk mendapatkan protein murni yang akan digunakan pada uji antigenisitas dengan teknik ELISA. Isolasi protein *T. cati* difokuskan pada protein dengan BM 70 kDa ditampilkan pada Gambar 1C. Protein ES dari *Toxocara* spp. (TES) terutama diistilahkan TES-32, TES-55, TES 70 dan lain-lain sesuai dengan berat molekul (dalam kDa) yang tampil pada SDS-PAGE dan sekarang banyak memiliki nama gen individual menurut fungsi protein (Maizels, 2004). TES-70 merupakan glikoprotein yang relatif banyak disekresi, baru-baru ini didapatkan sebagai *C-type lectin* baru. Sekuen utuh dari gen protein tersebut dinyatakan kemungkinan sebagai *C-type lectin*, sekarang telah didesain CTL-4 dan rekombinan antibodi spesifik CTL-4 (Tc-CTL-4, *C-type lectin 4*) terhadap TES-70. Protein ini diprediksi lebih panjang dari CTL-1 (TES-32), mengandung duplikasi dari N-terminal sistein dan *threonine-rich tracts*, tetapi sekuen secara substansial masih lebih pendek dari yang diperkirakan untuk protein 70 kDa. Protein ini tampak seperti segmen *threonine-rich* yang merupakan rantai berat O-glikosilasi. Walaupun TES-70 secara natif tidak terikat pada monosakarida imobilisasi, namun memperlihatkan aktivitas seperti lektin terutama

dalam pengikatan diri pada permukaan sel epitel pada gaya *calcium-dependent* (Loukas *et al.*, 2000). Suatu yang penting untuk ditunjukkan adalah bahwa ligan pada lektin *T. canis* termasuk determinan pada permukaan sel hospes. Aktivitas *lectin-like* TES-70 mungkin juga menjelaskan tentang aktivitasnya yang selektif terhadap imunoglobulin normal dalam reaksi imunopresipitasi (Maizels, 2004).

### Hasil uji antigenisitas, sensitivitas dan spesifisitas protein murni *Toxocara cati* pada diagnosis toxocarosis dalam serum darah mencit yang diimunisasi berbagai homogenat cacing

Antigen yang digunakan pada uji antigenisitas dengan teknik *indirect-ELISA* ini adalah protein 70 kDa dari ES L2D *T. cati*. Rata-rata nilai OD pada mencit yang diimunisasi dengan L2D *T. cati* adalah sebesar 0,558, pada mencit yang diimunisasi homogenat *Ancylostoma* spp. sebesar 0,254, pada mencit yang diimunisasi homogenat *D. caninum* sebesar 0,247, sedangkan pada kontrol adalah sebesar 0,207. Setelah dilakukan analisis statistik dengan uji Anava terhadap hasil pembacaan nilai OD serum mencit tersebut dapat diketahui, bahwa terdapat perbedaan sangat bermakna ( $p < 0,01$ ) diantara nilai OD serum mencit pada berbagai perlakuan. Berdasarkan hasil analisis statistik dengan uji HSD 5% dapat diketahui bahwa, hasil pembacaan nilai OD serum mencit yang diimunisasi L2D *T. cati* secara bermakna

( $p < 0,05$ ) menunjukkan hasil lebih tinggi dibanding serum mencit yang diimunisasi *Ancylostoma* spp., *D. caninum* dan serum kontrol (Tabel 2).

**Tabel 2.** Rata-rata Nilai *Optical Density* Hasil Uji Antigenesitas Protein Murni Terhadap Serum Mencit yang Diimunisasi Berbagai Homogenat Cacing

Antibodi (serum)	Rata-rata Nilai OD <sub>405</sub> ± SD
Anti-L2J <i>T. cati</i>	0,558 <sup>b</sup> ± 0,039
Anti- <i>Ancylostoma</i> spp.	0,254 <sup>a</sup> ± 0,137
Anti- <i>D. caninum</i>	0,247 <sup>a</sup> ± 0,125
Kontrol (-) Serum	0,208 <sup>a</sup> ± 0,003

<sup>a,b</sup>superskrip berbeda pada kolom sama menunjukkan perbedaan sangat bermakna ( $p < 0,01$ )

Hasil tersebut (seperti terlihat pada Tabel 2) menunjukkan bahwa nilai antigenesitas protein murni terhadap antibodi anti-L2D *T. cati* dalam serum mencit lebih tinggi dibandingkan dengan antibodi anti-*Ancylostoma* spp. dan *D. caninum*. Hal ini kemungkinan dapat terjadi karena adanya perbedaan antigenik antara protein *T. cati* dengan *Ancylostoma* spp. dan *D. caninum*, dalam memicu respons imun mencit. Walaupun secara material dalam tubuh cacing terkandung berbagai protein (*crude protein*), masing-masing protein itu dapat memicu respons imun mencit dengan membentuk antibodi yang juga beragam baik klas maupun subklasnya, namun belum tentu dapat berikatan secara spesifik dengan protein murni *T. cati*, sehingga dalam pembacaan dengan ELISA-*reader* menunjukkan nilai OD yang lebih rendah.

Limfosit T dan B hanya mampu mengenali satu epitop yang spesifik. Jadi adanya respons imun yang diinduksi oleh banyak epitop, maka diperlukan pengaktifan limfosit untuk berdeferensiasi menjadi berbagai limfosit spesifik terhadap epitop. Pengaktifan berbagai limfosit tersebut dapat menumbuhkan banyak klon dari sel yang sama untuk merespons antigen, sehingga mengakibatkan proliferasi dan diferensiasi limfosit dengan spesifisitas yang berbeda, oleh karena itu dikenal dengan antibodi poliklonal (Rantam, 2003). Karena antigen yang digunakan adalah protein murni dari ES L2D *T. cati*, maka antibodi anti-*Ancylostoma* spp. dan anti-*D. caninum* yang terikat secara spesifik lebih sedikit, dengan demikian dalam pembacaan dengan ELISA-*reader* menunjukkan nilai OD yang lebih rendah.

### Hasil uji sensitivitas dan spesifisitas protein murni pada diagnosis toxocariasis dalam serum darah mencit yang diimunisasi berbagai homogenat cacing

Untuk menyatakan hasil positif maka nilai OD pada sampel harus melebihi  $2 \times$  COV kontrol (-) atau lebih besar dari nilai rata-rata OD kontrol negatif. Pada penelitian ini nilai OD kontrol negatif sebesar 0,208, sehingga OD dinyatakan positif jika lebih besar dari  $2 \times 0,208$  ( $> 0,415$ ) dan dinyatakan negatif (-) jika nilai OD yang diperoleh pada sampel (perlakuan) lebih kecil dari  $2 \times 0,208$  ( $< 0,415$ ).

Berdasarkan tabulasi silang pada Tabel 3, dapat diketahui nilai OD + hasil ELISA sebesar 8 dari 8 sampel serum mencit yang diimunisasi homogenat L2D *T. cati* sehingga didapatkan nilai sensitivitas 100%. Nilai OD - hasil ELISA sebesar 14 dari 16 sampel serum mencit yang diimunisasi homogenat cacing *Ancylostoma* spp. dan *D. caninum*, sehingga didapatkan nilai spesifisitas sebesar 87,5%.

**Tabel 3.** Tabulasi Silang Hasil Penghitungan Nilai Sensitivitas dan Spesifisitas Protein Murni *Toxocara cati* pada Diagnosis Toxocariasis Serum Hewan Coba (Mencit)

Imunisasi <i>T. cati</i> *	Hasil ELISA		Total
	OD +	OD -	
Toxocariasis +	8 (100%)	0 (0%)	8
Toxocariasis -	2 (12,5%)	14 (87,5%)	16
Total	10	14	24

\* *Toxocara* +, mencit yang diimunisasi homogenat L2D *T. cati* spp.; *Toxocara* -, mencit yang diimunisasi homogenat cacing lain (*Ancylostoma* spp. dan *D. caninum*); (OD+, OD > COV kontrol (0,415).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa nilai sensitivitas protein murni hasil isolasi dari ES L2D *Toxocara* spp. terhadap antibodi anti-L2D *T. cati* dalam serum darah mencit adalah sebesar 100% dan spesifisitas 87,5%. Nilai sensitivitas yang diperoleh pada penelitian ini tergolong sangat tinggi dibandingkan dengan hasil yang diperoleh oleh Glickman *et al.* (1978) yaitu didapatkan nilai sensitivitas yang lebih rendah yaitu sebesar 78,3%, namun nilai spesifisitas yang diperoleh lebih tinggi yaitu sebesar 92,3%. Secara umum penggunaan antigen *T. cati* pada pemeriksaan serum dengan teknik ELISA sensitivitas dinyatakan tinggi bila pada rentang 80-100% dan spesifisitas dinyatakan sangat tinggi bila pada rentang 86-100% (Park *et al.*, 2002; Dubinsky *et al.*, 2000; Yamasaki *et al.*, 2000).



Nilai spesifisitas yang diperoleh pada penelitian ini adalah sebesar 87,5%, hal ini berarti masih terjadi *false positif* sebesar 12,5%. Hal ini menggambarkan betapa tinggi kejadian reaksi silang yang terjadi pada infeksi parasit khususnya cacing, bahkan sekalipun kontrol yang digunakan adalah cacing lain klas. Apalagi jika digunakan antigen yang masih berupa *crude protein*. Spesifisitas tidak menjadi masalah besar bagi negara maju karena infeksi parasit tidak bersifat umum dan infeksi cacing dari tanah terkontaminasi (*soil-transmitted*) dengan prevalensi rendah, namun demikian hal ini merupakan masalah yang berarti pada serodiagnosis di negara tropik. Seroprevalensi infeksi *Toxocara* spp. yang tinggi didapatkan di negara berkembang dengan iklim lembab yang cocok untuk perkembangan telur cacing di dalam tanah (Magnaval *et al.*, 2001; Kaplan *et al.*, 2002; Kaplan *et al.*, 2008).

## SIMPULAN DAN SARAN

### Simpulan

Berdasarkan hasil analisis protein, *T. cati* memiliki banyak protein dengan berat molekul beragam dari 8 hingga 200 kDa. Protein spesifik terhadap anti-L2D *T. cati* dari ES L2D *T. cati* adalah 168, 120, 91, 80, 70, 62, 51, 48, 45, 42, 38, 35, 32, 24, 18, 14 dan 11 kDa. Ditinjau dari nilai OD pada ELISA, protein 70 kDa *T. cati* memiliki antigenisitas yang tinggi terhadap serum anti-L2D *T. cati*, tetapi memiliki antigenisitas yang lebih rendah terhadap cacing lain (*Ancylostoma* spp. dan *D. caninum*). Nilai sensitivitas protein murni *T. cati* pada diagnosis toxocariasis dengan IgG-ELISA adalah 100% dengan spesifisitas 87,5%.

### Saran

Teknik ELISA dapat dikembangkan untuk diagnosis toxocariasis dengan menggunakan protein murni sebagai antigen, khususnya protein dengan BM 70 kDa pada *T. cati*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abbas AK, Lichtman AH and Pober JS, 2000. Cellular and Molecular Immunology. 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia Saunders Company. pp 41–63, 270–291.
- Abdel-Rahman EH and Abdel-Megeed KN, 2000. Molecular identity of major cross-reactive adult antigens in *Fasciola gigantica*, *Toxocara vitulorum* and *Moniezia expansa*. Abstract. J. Egypt. Soc. Parasitol. 30: 561–71.
- Abdel-Rahman EH, Abdel-Megeed KN and Hassanain MA, 2000. Structural characterization dan immunocatalization of egg antigens cross-react with *Toxocara vitulorum*, *Fasciola gigantica* and *Moniezia expansa*. Abstract. J. Egypt. Soc. Parasitol. 30: 581–91.
- Alonso JM, Bojanich MV, Chamarro M and Gorodner JO, 2000. *Toxocara* seroprevalence in children from a subtropical city in Argentina. Abstract. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 42: 235–7.
- Beer SA, Novosil'tsev GI and Mel'nikova LI, 1999. The role of water factor in the dissemination of *Toxocara* eggs and the spread of toxocariasis in a megalopolis. Abstract. Parazitologii; 33: 129–35.
- Bhadwaj D, 1999. Electroelusi of Protein from SDS-PAGE for Use in Immunization. Devesh@icgeb. Res in.
- Bowman DD, Mika-Grieve M and Grieve RB, 1987. *Toxocara canis*: monoclonal antibodies to larval excretory-secretory antigens that bind with genus and species specificity to the cuticular surface of infective larvae. Exp. Parasitol. 64: 458–65.
- de Savigny DH, 1980. The communication of ELISA data from laboratory to clinician. J. of Immunoassay. 1(1): 105–128.
- Despommier D, 2003. Toxocariasis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects. Clin Microbiol Rev 16: 265–272.
- Dubinsky P, Akao N, Reiterova K and Konakova G, 2000. Comparison of the sensitive screening kit with two ELISA sets for detection of anti-*Toxocara* antibodies. Southeast Asian J Trop Med Public Health; 31: 394–8.
- Fisher, 2003. *Toxocara cati*: an underestimated zoonotic agent. Trends Parasitol. 19: 167–170.
- Glickman LT, Schantz P, Dombroske R and Cypess R, 1978. Evaluation of serodiagnostic tests for visceral larvae migrans. Amer. J. trop. Med. Hyg; 27: 492–498.
- Harlow E and Lane D, 1988. Production of monoklonal antibodies. In: Antibodies. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Lab. New York. pp. 148–149.
- Havasiova-Reiterova K, Tomasovicova O and Dubinsky P, 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: 13–7.
- Hostettmann K, Hostettmann, M and Marston. 1986. Preparative Chromatography Techniques. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Terj. Padmawinata K dan Sutomo (1995). Penerbit ITB, Bandung. hal: 3–6, 27–36.
- Hubner J, Uhlikova M and Leissova M, 2001. Diagnosis of the early phase of larval toxocariasis using

- IgG avidity. *Epidemiol. Microbiol. Immunol.* 50: 67–70.
- Humbert P, Niezborala M, Salembier R, Aubin F, Piarroux R, Buchet S and Barale T**, 2000. Skin manifestations associated with toxocariasis: a case-control study. *Dermatol.* 201: 230–4.
- Kaplan M, Kuk S and Kalkan A**, 2002. Examination of *Toxocara* spp. in different playgrounds in Elazig. *Firat Univ. J. Health. Sci.* 16: 277–279.
- Kaplan M, Kalkan A, Kuk S, Demirdag K, Ozden M, and Kilic SS**, 2008. *Toxocara* seroprevalence in Schizophrenic patients in Turkey. *Yonsei Med. J.* 49: 224–229.
- Kilpatrick ME**, 1992. Toxocariasis. In: *Tropical Medicine*. 7<sup>th</sup> ed. London: WB Saunders Company. pp. 761–4.
- 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. hal. 8–19.
- Kusnoto, Koedarto S dan Sri Mumpuni S**, 2002. Kontaminasi Tanah di Sekitar Peternakan Sapi Perah dan Rumah Potong Hewan dengan Telur *Toxocara* spp. di Surabaya. *Laporan Penelitian Dosen Muda*. Lemlit, Universitas Airlangga, Surabaya.
- Kusnoto**, 2003. Isolasi dan Karakterisasi Protein Imunogenik Larva stadium II *Toxocara cati* Isolasi Lokal. Thesis Program Pascasarjana, Universitas Airlangga, Surabaya. hal. 25–47.
- Kusnoto, Sosilawati SM dan Sri Subekti**, 2005. Isolasi dan karakterisasi protein cathepsin-L dari excretory/secretory material *Fasciola* spp untuk pengembangan diagnosis distomatosis dengan teknik ELISA. Seminar Nasional Biomolekuler dalam Bidang Peternakan. Elmi Hotel, FKH UNAIR. hal. 19–41.
- Kusnoto**, 2008. Antigenesitas, Sensitivitas dan Spesifisitas Protein 27-28 kDa dari Material Excretory-Secretory (ES) *Fasciola* spp pada Diagnosis Distomatosis Serum Sapi dengan Teknik Indirect-ELISA. *Media Kedokteran Hewan*; 24: 1–8.
- Lee CC, Cheng NABY and Bohari Y**, 1993. *Toxocara canis* from domestic cats in Kuala Lumpur. *Trop Biomed* 10: 79–80.
- Li MW, Zhu XQ, Gasser RB, Lin RQ, Sani RA, Lun ZR and Jacobs DE**, 2006. The occurrence of *Toxocara malaysiensis* in cats in China, confirmed by sequence-based analyses of ribosomal DNA. *Parasitology Research*. ©Springer-Verlag. Accessed 3/9/2007.
- MagnaVal JF, Glickman LT, Dorchies P and Morassin B**, 2001. Highlights of human toxocariasis. *Korean J. Parasitol.* 39: 1–11.
- Maizels RM**, 2004. Glicoproteins. Home news opportunities organism people publication research teaching conferences. University of Edinburgh. ICAPB. Accessed 12/28/2005.
- Marx MB**, 1991. Parasites, pets, and people. *Abstract. Prim. Care.* 18(1): 153–65.
- Obwaller A, Duchêne M, Bruhn H, Steipe B, Tripp C, Kraft D, Wiedermann G, Auer H and Aspöck H**, 2001. Recombinant dissection of myosin heavy chain of *Toxocara canis* shows strong clustering of antigenic regions. *Parasitol Res* 87: 383–389.
- Park HY, Lee SU, Huh S, Kong Y and Magnaval JF**, 2002. A seroepidemiological survey for toxocariasis in apparently healthy residents in Gangwon-do, Korea. *Korean J. Parasitol.* 40: 113–7.
- Pawlowski Z**, 2001. Toxocariasis in humans: clinical expression and treatment dilemma. *J. Helminthol.* 75: 299–305.
- Radman NE, Archelli SM, Fonrouge RD, del V Guardis M and Linzitto OR**, 2000. Human toxocarosis. Its seroprevalence in the city of La Plata. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 95: 281–5.
- Rantam FA**, 2003. Metode Imunologi. Airlangga University Press. Surabaya. Hal. 3–9.
- Soedarto**, 2003. Zoonosis Kedokteran. Cetakan Pertama. Airlangga University Press. Hal. 114–115.
- Sri Subekti, Sri Mumpuni S, Koedarto S, Puspitawati H dan Kusnoto**, 2002. Isolasi dan Karakterisasi Protein Imunogenik Larva Stadium II *Toxocara vitulorum* sebagai Perangkat Kit Diagnostik pada Uji ELISA. *Laporan Penelitian*. Hibah DUE-Like Bacth III FKH Unair.
- Uga S, Matsumura T, Fujisawa K, Okubo K, Kataoka N and Kondo K**, 1990. Incidence of seropositivity to Human Toxocariasis in Hyogo Prefecture, Japan, and Its possible role in ophthalmic disease. *Jpn. J. Parasitol.* 39: 500–502.
- Vidal JE, Sztajn bok J and Seguro AC**, 2003. Eosinophilic meningoencephalitis due to *Toxocara canis*: case report and review of the literature. *Am J Trop Med Hyg* 69: 341–343.
- Yamasaki H, Araki K, Lim PKC, Zasmy N, Mak JW, Taib R and Aoki T**, 2000. Development of a highly specific recombinant *Toxocara canis* second-stage larvae excretory-secretory antigen for immunodiagnosis of human toxocariasis. *J. of Clinical Medical.* 38: 1409–13.