



## Pendahuluan

Toxocariasis merupakan salah satu jenis penyakit cacing yang bersifat zoonosis yang disebabkan oleh nematoda dari genus *Toxocara* (Hubner *et al*, 2001). Toxocariasis pada manusia disebut *human toxocariasis* yang merupakan hasil infeksi dari *Toxocara canis* dan *Toxocara cati* (Kilpatrick, 1992). Hospes definitif cacing *Toxocara canis* adalah anjing jantan dewasa dan anak anjing. Sedangkan hospes definitif cacing *Toxocara cati* adalah kucing jantan dewasa dan anak kucing (Hubner *et al*, 2001). Manusia adalah hospes paratenik dari cacing *Toxocara canis* dimana larva tidak akan berkembang menjadi cacing dewasa (Tolan, 2007).

Telur dari cacing *Toxocara* umumnya akan mengkontaminasi lingkungan manusia, karena pada kenyataannya banyak anjing dan kucing dijadikan peliharaan manusia, maupun sebagai hewan liar di jalan kota besar (CMR, 2003). Penelitian di Amerika menyebutkan bahwa 20% anjing mengeluarkan telur *Toxocara* dalam fesusnya. Di Inggris 24% sampel tanah yang diambil dari taman umum mengandung telur *Toxocara* (CDC, 2006).

Permasalahan yang sering dihadapi dari toxocariasis adalah sulitnya diagnosis penyakit tersebut sedini mungkin. Hal ini disebabkan karena larva kedua (L<sub>2</sub>) *T. canis* yang berada di dalam tubuh hospes paratenik dan hospes transpor seperti cacing tanah, kecoa, ayam, anak kambing dan khususnya manusia tidak pernah berkembang menjadi larva tiga (L<sub>3</sub>). Dalam tubuh induk semang larva tidak dapat berkembang menjadi cacing dewasa dan tetap tinggal di jaringan sebagai L<sub>2</sub> *dorman* (Levine, 1978), Sehingga tidak dapat dilakukan pemeriksaan secara konvensional dengan cara menemukan telur cacing di dalam feses untuk menetapkan diagnosis.

Penularan Toxocariasis pada manusia dapat melalui makanan atau minuman yang terkontaminasi oleh telur infeksius atau larva jaringan, terutama apabila cara pemasakan organ atau jaringan tersebut kurang sempurna (Ito *et al.*, 1986), tetapi sumber infeksi yang utama adalah tanah yang terkontaminasi oleh telur infeksius (Radman *et al.*, 2000). Anak memiliki potensi yang lebih besar untuk terinfeksi *T. canis* karena kebiasaan bermain mereka dan kecenderungan untuk memasukkan tangan ke dalam mulut, terutama anak yang memiliki sifat *geophagia* (Tolan, 2007).

Manifestasi klinis dari *human toxocariasis* dibagi menjadi tiga, yaitu *Visceral Larva Migrans* (VLM), disebabkan oleh migrasi larva ke organ internal manusia, *Ocular Larva Migrans* (OLM) yang memiliki efek patologis pada mata dan *nervus opticus hospes* (Huh, 2006), dan toxocariasis tersembunyi dengan gejala klinis asimtomatis (Tolan, 2007). Kejadian OLM menyebabkan peradangan dan pembentukan luka di retina. Setiap tahunnya lebih dari 700 orang terinfeksi *Toxocara* dan mengakibatkan kehilangan penglihatan secara permanen. Diperkirakan 10.000 orang di Amerika terinfeksi *Toxocara* dengan gejala klinis VLM (CDC,2006).

Soulsby (1986) menyatakan bahwa siklus hidup *Toxocara canis* adalah kompleks dan berdasarkan umur hospes yang dapat terinfeksi. Ada beberapa cara penularan *Toxocara canis* yaitu penularan secara prenatal (transuterin), colostrum (*lactogenic*), langsung dan melalui hospes paratenik.

Apabila telur infeksius yang mengandung larva stadium kedua (L<sub>2</sub>) tertelan manusia, maka telur akan menetas dan mengeluarkan larva ke dalam usus halus, kemudian terjadi penetrasi larva pada mukosa dan kemudian terbawa sirkulasi darah menuju ke hati melalui sistem portal. Sebagian larva tinggal di dalam hati dan menyebabkan pembentukan granuloma, yang lain terbawa ke paru-paru dan masuk dalam sistem sirkulasi dan terbawa ke berbagai organ tubuh. Larva menembus pembuluh darah dan bermigrasi menuju jaringan sekitarnya (Kilpatrick, 1992). Larva yang tidak kembali ke usus halus tidak mengalami

perkembangan lebih lanjut sehingga tetap tinggal di jaringan yang disebut larva *dorman*. Telur infeksi yang mengandung L<sub>2</sub> dan cacing dewasa *T. vitulorum* dapat dikenali oleh sistem imun tubuh hospes sehingga dapat memicu terbentuknya antibodi (Starke *et al.*, 1996 dikutip oleh Kusnoto 2003).

Pengamatan terhadap sumber protein antigenik toxocariasis dapat dilakukan pada telur, L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub>, L<sub>4</sub> dan cacing dewasa. Pada telur cacing protein dapat diperoleh dari kulit, *vitellin membrane* dan *granular layer*, sedangkan pada stadium larva dan cacing dewasa yang paling sering digunakan adalah E-S (*excretory-secretory*), disamping itu juga ada sumber protein lain yang dapat digunakan yaitu *surface antigen*, ekstrak larva dan ekstrak cacing dewasa (Safar *et al.*, 1992; Abdel-Rahman *et al.*, 2000).

Pada antigen somatik cacing *T. canis* dan *T. leonina* dewasa yang diambil dari anjing dengan metode *sodium deodecyl sulphate polycrilamid gel electrophoresis* (SDS-PAGE) menunjukkan terdapat fraksi protein yang mirip dengan BM 90,00; 91,95 kDa pada *T. canis*, sedangkan pada *T. leonina* terdapat fraksi protein dengan BM 69,25-70,56 kDa (el-Massry *et al.*, 1999). Pada somatik larva antigen *T. canis* menunjukkan profil protein yang sangat berbeda bila dibandingkan dengan *T. leonina*, kecuali pada satu pita protein, yaitu dengan BM 66,85-66,89 kDa. Pada metode *Western blot* menunjukkan reaksi silang antara antigen somatik *T. canis* dan *T. leonina* pada dua pita protein dengan BM 90,00-91,95 kDa dan 69,25-70,56 kDa, sedangkan pita protein yang menunjukkan reaksi spesifik untuk *T. canis* dewasa adalah fraksi protein dengan BM 125,37 kDa dan 117,73 kDa.

Penelitian ini mencoba untuk mengetahui karakteristik protein antigenik *excretory secretory* L<sub>2</sub> *dorman* cacing *Toxocara canis* dengan metode SDS-PAGE (*sodium deodecyl sulphate poliacrilamid gel electrophoresis*). Hasil yang didapat masih berupa *crude protein*, kemudian direaksikan dengan antibodi anti-L<sub>2</sub> cacing *Toxocara canis* dengan metode *Western blot* sehingga didapatkan protein antigenik yang lebih spesifik. Hasil tersebut diharapkan dapat dikembangkan sebagai bahan diagnostik toxocariasis secara imunologis.

## **Rumusan masalah**

Dari uraian latar belakang di atas maka masalah penelitian yang dapat dirumuskan adalah, bagaimana karakteristik protein antigenik E-S L<sub>2</sub> *dorman* cacing *Toxocara canis* bila direaksikan dengan antibodi anti L<sub>2</sub> dengan teknik *Western blot* ?

## **Landasan teori**

Berdasarkan siklus hidup *T. canis* yang kompleks, pengamatan terhadap protein antigen cacing tersebut dilakukan pada stadium telur, larva (L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub>, L<sub>4</sub>) maupun cacing dewasa. Pada telur cacing protein antigenik diperoleh dari kulit telur (*egg shell*), membrana vitellina atau *granular layer*, sedangkan pada stadium larva dan dewasa yang sering digunakan adalah *excretory-secretory antigen*, antigen somatik, *surface antigen*, homogenat larva dan homogenat cacing dewasa (Safar *et al.*, 1992; el-Massry, 1999; Abdel-Rahman *et al.*, 2000)

Larva kedua jaringan adalah larva migran yang berasal dari saluran usus kemudian masuk kedalam *portal hepatic system*, hati, paru-paru, dan organ visceral lain. Telur infeksi yang mengandung L<sub>2</sub> dan cacing dewasa *Toxocara vitulorum* dapat dikenali perangkat imun tubuh hospes, sehingga dapat memicu terbentuknya antibodi (Starke *et al.*, 1996 dikutip oleh Kusnoto, 2003). Larva kedua jaringan *T. canis* sangat dimungkinkan untuk dikenali perangkat imun tubuh hospes, sehingga nantinya dapat memicu terbentuknya antibodi yang lebih kuat.

Serodiagnosis dengan teknik ELISA yang menggunakan antigen *crude protein* sudah digunakan secara luas, tetapi ternyata masih memiliki kelemahan yaitu timbulnya reaksi silang. Penelitian yang terbaru dilakukan untuk mengevaluasi diagnosis dengan teknik ELISA yang menggunakan antigen *crude protein* dibandingkan dengan antigen *excretory-secretory*. Hasil dari penelitian itu menyebutkan bahwa persentase sensitifitas teknik ELISA dengan *excretory-secretory antigen* adalah 92,5% yang ternyata lebih baik daripada menggunakan antigen *crude protein* (88,2%). Persentase spesifisitas dari *excretory-secretory antigen* adalah 93,1% sedangkan *crude protein* hanya 87,8% (Choi, 2003).

*Western blot* adalah suatu metode di dalam biologi molekuler atau biokimia atau imunogenetik untuk mendeteksi protein (Wikipedia, 2007). Tujuan dari metode *Western blot* adalah untuk mendapatkan protein antigenik yang lebih spesifik (Rantam, 2003). Kusnoto (2003) telah melakukan analisis pada L<sub>2</sub> *T. cati* yang direaksikan dengan antibodi poliklonal anti-L<sub>2</sub> *T. cati* yang berasal dari kelinci, dengan menggunakan teknik *Western blot*. Hasil analisis protein pita ikatan antigen dan antibodi menunjukkan BM 30,3 kDa dan 24,0 kDa. Hasil tersebut berarti bahwa ekstrak larva infeksiif dapat digunakan sebagai sumber protein dengan imunogenitas dan antigenitas yang tinggi.

## **Tujuan Penelitian**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakter protein antigenik *excretory secretory* larva stadium kedua *dorman* cacing *Toxocara canis* jika direaksikan dengan antibodi anti-L<sub>2</sub> cacing *Toxocara canis* dengan teknik *Western blot*. Secara umum penelitian ini ditujukan untuk menemukan protein antigenik *T. canis* yang dapat dikembangkan sebagai bahan uji pada diagnosis toxocariasis secara imunologis.

### **1.5 Manfaat Penelitian**

Hasil penelitian ini diharapkan memberikan manfaat antara lain :

1. Memberikan informasi ilmiah mengenai berat molekul dari fraksi protein antigenik E-S L<sub>2</sub> *dorman* cacing *Toxocara canis* yang direaksikan dengan antibodi anti L<sub>2</sub> *Toxocara canis* dengan metode *Western blot*, sehingga bermanfaat untuk diagnosis toxocariasis secara imunologis
2. Dapat dijadikan pembelajaran awal dalam pembuatan kit diagnostik toxocariasis.

## **Bahan dan Metode**

Penelitian ini dilaksanakan selama empat bulan, sejak bulan Agustus hingga Desember, 2006. Tempat penelitian dilakukan di laboratorium Helminologi bagian Parasitologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan dan di Tropical Disease Center (TDC) Universitas Airlangga Surabaya.

### **Bahan Penelitian**

Bahan utama yang digunakan dalam uji *Western blot* adalah E-S Larva kedua *dorman* cacing *T. canis* dan serum mencit yang mengandung antibodi anti L<sub>2</sub> cacing *T. canis*. Telur yang mengandung L<sub>2</sub> infeksiif digunakan untuk menginfeksi mencit. Hewan coba yang digunakan adalah mencit jantan dewasa sebanyak 14 ekor dengan berat rata-rata 50 gram.

Bahan kimia dan bahan lain yang digunakan adalah aquadest, PBS dan Tripsin 1%. Larutan gula jenuh dengan berbagai konsentrasi dan warna digunakan untuk mengumpulkan telur infeksius dan RPMI sebagai media hidup L<sub>2</sub>.

Bahan untuk analisis protein spesifik dengan metode *Western blot* dimulai dengan *running* SDS. Bahan-bahan yang digunakan untuk *running* SDS antara lain adalah akrilamid, Tris HCl pH 8,8, SDS 0,5%, Aquadest, TEMED, APS, Tris HCl pH 6,8, butanol, *laemli buffer* dan sampel.

Untuk memindahkan protein dari gel ke membran nitroselulose dibutuhkan transfer *buffer* pH 8,3. Bahan untuk membuat transfer *buffer* adalah tris base aminomethan, glisin, methanol, aquadest. Protein yang sudah berpindah dari gel ke membran nitroselulose kemudian dilakukan blocking dengan BSA dan pencucian secara bertahap dengan TBS, larutan creamer, tween. Dilanjutkan dengan penambahan serum anti-L<sub>2</sub> *T. canis* dengan titer antibodi rata-rata 0,1223 yang telah diuji dengan teknik *indirect* ELISA, konjugate *anti mouse* kemudian dilakukan pewarnaan menggunakan *western blue*.

### **Alat-Alat Penelitian**

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah : gelas obyek, *cover glass*, cawan petri, gunting, pinset, *sputum disposable*, jarum trokar, gelas ukur, tabung reaksi, tabung plastik, sentrifus, penyaring teh, kain screen ukuran T200, kain sablon, penyemprot, mikroskop inverted, mikroskop cahaya, inkubator, *freezer* bersuhu -30°C, *chamber* untuk *running* SDS, *beaker glass*, comb, kertas filter, gabus, membran nitroselulose, alat untuk elektroforesis, *trans blotter*, kertas whatman, *waterbath shaker*, *microtube*, mikropipet, *yellow tip* dan *blue tip* dan alat *blotting*.

### **Metode Penelitian**

#### **Tahap Pengumpulan Telur Infektif**

Feses anjing yang diduga terinfeksi *Toxocara* diambil untuk diperiksa dibawah mikroskop cahaya. Bila didalam fekes anjing tersebut ditemukan telur *Toxocara canis*, artinya anjing tersebut positif terinfeksi. Feses anjing yang positif terinfeksi dikumpulkan, selanjutnya ditampung dalam gelas ukur. Feses diencerkan dengan air dengan perbandingan 1:100, satu gram fekes diencerkan dengan 100 cc air. kemudian disaring dengan saringan teh. Hasil saringan disimpan dan diamkan selama 1 hari hingga fekes mengendap. Cairan yang ada di atas endapan fekes dibuang.

Feses yang telah diendapkan dimasukan kedalam tabung reaksi atau tabung plastik, kemudian disentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm selama 5-10 menit. Sambil menunggu larutan gula jenuh disiapkan dengan konsentrasi 20%, 25%, 30%, 35%, dan 40%. Larutan gula jenuh dimasukan ke dalam tabung reaksi dari konsentrasi rendah ke konsentrasi tinggi, kemudian ditambahkan ± 1ml fekes di bagian paling atas larutan. Lakukan sentrifugasi dengan kekuatan 3000 rpm selama 10 menit. Setelah sentrifugasi maka telur cacing *T. canis* akan terkumpul pada larutan gula jenuh dengan konsentrasi 30% dan membentuk gambaran kabut putih.

*Sputum disposable* dan jarum trokar digunakan untuk mengambil telur cacing yang ada pada larutan gula jenuh konsentrasi 30%. Larutan tersebut disaring dengan kain screen ukuran T200, pelan-pelan disemprotkan dengan aquadest untuk menghilangkan larutan gula jenuh. Hasil saringan dipindahkan ke dalam cawan petri dengan menyemprotkan PBS. Hasil saringan diperiksa di bawah mikroskop inverted. Formalin 10% ditambahkan kedalam

cawan petri sebanyak 0,5 sampai satu ml untuk menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Diamkan selama 21-28 hari untuk mendapatkan L<sub>2</sub> infeksi.

### Tahap Isolasi E-S L<sub>2</sub> *Dorman*

Mencit diinfeksi dengan telur infeksi peroral sebanyak 17 telur infeksi/gram berat badan atau sekitar 850 telur infeksi/ekor. Kemudian mencit dimatikan dengan menggunakan ether dengan cara dihirupkan. Mencit yang sudah mati kemudian dihilangkan kulitnya, kemudian jaringan tubuh mencit dipisahkan menjadi 3 bagian dalam petri yang berbeda, yaitu petri pertama berisi organ saluran pencernaan, petri kedua berisi paru-paru, jantung, hepar, sedangkan petri ketiga berisi otak dan musculus. Jaringan tubuh mencit dipotong menjadi bagian yang lebih kecil dengan gunting, kemudian dicuci dengan akuades. Air yang digunakan untuk mencuci ditampung lalu diamati dibawah mikroskop. Jika ditemukan larva di dalam cairan tersebut maka diambil menggunakan mikropipet dan *yellow tip*, kemudian dipindahkan kedalam petri yang sudah diisi dengan PBS. Diulangi selama tiga kali pencucian.

Jaringan tubuh mencit yang sudah dicuci dengan akuades kemudian dicuci dengan larutan PBS. Jaringan tubuh mencit direndam dengan tripsin 1% dan diinkubasi dalam inkubator suhu 37°C. Jaringan tubuh mencit yang diinkubasi setiap satu jam diamati dibawah mikroskop inverted. Jika tampak adanya larva, cairan yang digunakan untuk merendam disaring dengan kain screen ukuran T200. Kain screen kemudian disemprot dengan aquadest, hasil semprotan diletakan dalam petri baru lalu diperiksa dibawah mikroskop *inverted*. Larva dikumpulkan dengan cara menggoyang petri supaya larva terkumpul di tengah, kemudian diambil menggunakan mikropipet dan *yellow tip*. Periksa dengan teliti supaya tidak ada larva yang tersisa.

Larva stadium kedua yang terkumpul kemudian ditempatkan pada petri yang mengandung media RPMI, kemudian dimasukan kedalam inkubator bersuhu 37°C selama 4 jam. Setelah 4 jam larutan rpmi akan mengandung E-S L<sub>2</sub> *dorman*, kemudian digunakan penyaring dengan kain sablon ukuran T200, untuk menyaring L<sub>2</sub> *dorman* sehingga yang tinggal hanya E-S L<sub>2</sub> *dorman* dan digunakan sebagai antigen pada analisis protein dengan metode *Western blot*.

### Tahap Analisis Protein dengan Teknik SDS-PAGE

Langkah pertama adalah menyiapkan bahan untuk membuat *running gel* 12%. Kemudian bahan tersebut dimasukan melewati dinding *glass plate* sampai kira-kira 1 cm dari atas *glass plate*. Untuk meratakan permukaannya ditambahkan butanol sampai penuh. Inkubasi selama 25 menit sampai gel tersebut beku (gunakan sisa media running gel yang ada di *beaker glass* sebagai parameter). Jika gel dimiringkan pada saat membuang butanol tidak ikut miring artinya gel sudah membeku, kemudian sisa butanol dibersihkan dengan kertas saring.

Langkah selanjutnya adalah menyiapkan bahan untuk *stacking gel* 6%. Setelah itu bahan untuk *stacking gel* dimasukan keatas cetakan *running gel*, kemudian *comb* dimasukan kedalam *stacking gel*, inkubasi selama 25 menit. Sambil menunggu gel beku sampel yang akan digunakan disiapkan. Sampel E-S L<sub>2</sub> cacing *T. canis* dicampurkan dengan *laemli buffer* kedalam *mikrotube* dengan perbandingan 3:1, yaitu 15 µl sampel ditambah 5 µl *laemli buffer*. kemudian dimasukan dalam air mendidih 100°C selama 5 menit.

Jika proses inkubasi selesai, *comb* dilepaskan dan *stacking gel* dibuang, kemudian dicuci dengan E-buffer yang sudah diencerkan (80ml E-buffer + Aqua ad 800ml) dengan cara menuangkan di sela-sela gel sampai gelembung hilang. Cetakan geldimasukan kedalam alat

elektroforesis (Biorad). E-buffer dituangkan sampai penuh ( $\pm 500\text{ml}$ ). Sampel sebanyak  $20\ \mu\text{l}$  dimasukkan ke dalam sumuran yang dibuat oleh comb. Setelah itu dialirkan listrik dengan kekuatan  $125\ \text{V}$  dan  $\text{mA}=40$ . Ditunggu sampai semua sampel turun. Jika sudah satu jam aliran listrik dimatikan kemudian diangkat dan agar dilapaskan dengan hati-hati supaya tidak robek.

### **Tahap Analisis Protein dengan Metode *Western Blot* (Wet)**

Dimulai dari mengerjakan SDS-PAGE sampai running saja tanpa pencucian. Kemudian membuat trans blot atau transfer buffer dengan pH 8,8 sebanyak 3 liter. Setelah itu bahan dicampur.

Susun rapi kertas filter sebanyak 5 lembar, kemudian letakkan secara berturut-turut di atasnya membran nitroselulose, gel, kertas filter 5 lembar. Lapisan tadi dijepit dengan gabus. Kemudian lapisan tadi dimasukkan ke dalam alat *blotting*. *Transfer buffer* dituangkan ke dalam alat *blotting* sampai penuh ( $\pm 3$  liter). Alat *blotting* dijalankan dengan kekuatan  $125\ \text{V}$  dan  $250\ \text{mA}$  selama 1,5 jam.

Membran nitroselulose dikeluarkan dari cetakan kemudian *blocking* dengan BSA 1% dalam TBS, kemudian digoyang selama 1 jam. Pencucian dilanjutkan dengan TBS tween 0,05% sebanyak tiga kali.  $300\ \mu\text{l}$  serum anti- $L_2$  ditambahkan ke dalam 2% larutan kreamer selama satu sampai tiga jam, serum yang digunakan untuk *Western blot* memiliki titer sebesar 0,1223 yang telah diuji dengan teknik *indirect* ELISA. Larutan kreamer dibuang, kemudian lanjutkan pencucian dengan TBS sebanyak tiga kali, masing-masing selama 10 menit. *Conjugate antimouse* yang sudah diencerkan dengan TBS dengan perbandingan 1:1000 ditambahkan. Jika tahap pencucian sudah selesai, substrat *western blue* ditambahkan sebanyak 10 cc, lalu digoyang secara perlahan.

### **Rancangan Percobaan Dan Analisis Data**

BM protein antigen ditentukan melalui persamaan regresi berdasarkan nilai  $R_f$  (*Retardation factor*) dari setiap pita yang terbentuk pada teknik *Western blot*. Menurut Rybicky dan Maud (1996), berat molekul (BM) ditentukan berdasarkan log BM dari protein standart dan nilai  $R_f$ . Nilai  $R_f$  merupakan perbandingan antara jarak migrasi molekul protein dengan jarak migrasi zat warna, kemudian dicari persamaan dengan menentukan kurva standart dari  $R_f$  dan log BM sampel yang diketahui pada agar yang sama.

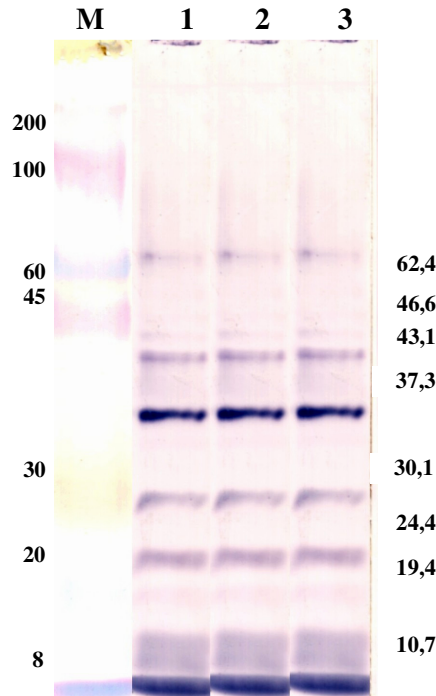
Menurut Rantam (2003), untuk menentukan BM antigen atau antibodi dilakukan dengan menghitung nilai  $R_f$  dari masing-masing band dengan rumus :

$$R_f = \frac{\text{Jarak pergerakan protein dari tempat awal}}{\text{Jarak pergerakan zat warna dari tempat awal}}$$

Masa molekul relatif ditentukan dengan cara mengkonversi data nilai  $R_f$  dan masa molekul relatif dari protein standart. Nilai  $R_f$  disimbolkan dengan X, sedangkan Y adalah logaritma berat molekul protein standart. Kemudian mencari persamaan regresi yang sesuai. Setelah persamaan regresi didapat, nilai X ( $R_f$ ) sampel dimasukkan ke dalam persamaan untuk mendapatkan nilai BM protein sampel.

## Hasil Penelitian

Analisis fraksi protein terhadap *excretory-secretory* L<sub>2</sub> dorman cacing *T. canis* yang direaksikan dengan antibodi anti L<sub>2</sub> menggunakan teknik *Western blot*, diperoleh hasil berturut-turut berupa delapan pita protein *excretory-secretory* *T. canis*. Gambaran selengkapnya dapat dilihat pada gambar 4.1



**Gambar 4.1 :** Hasil identifikasi protein *T. canis* terhadap serum anti-L<sub>2</sub> dengan teknik *Western blot*  
M= marker Rainbow (Sigma); kolom 1-3, ES L<sub>2</sub> *T. canis*.

Hasil analisis regresi menggunakan *statistical product and service solution* (SPSS) rel. 13 for Windows antara nilai rf dan log BM (Da) protein pada marker didapatkan bentuk kubik dengan nilai  $b_0 = 5,693$ ,  $b_1 = 4,484$ ,  $b_2 = 6,568$ ,  $b_3 = -3,905$  sehingga didapatkan persamaan garis  $y = 5,693 - 4,484x + 6,568x^2 - 3,905x^3$ . perhitungan selengkapnya dapat dilihat pada lampiran

Hasil analisis protein dari E-S larva kedua jaringan cacing *Toxocara canis* didapatkan delapan macam pita protein yaitu masing-masing dengan berat molekul (BM) 62,4 kDa, 46,6 kDa, 43,1 kDa, 37,3kDa, 30,1 kDa, 24,4 kDa, 19,4 kDa dan 10,7 kDa.

Diantara delapan fraksi protein tersebut pita protein dengan BM 43,1 kDa, 37,3 kDa, 30,1 kDa, 24,4 kDa dan 10,7 kDa terlihat lebih tebal warna pita protein yang terbentuk, sedangkan protein lainnya terlihat lebih tipis dengan intensitas warna yang rendah.

## Pembahasan

Pada penelitian ini dilakukan karakterisasi protein *excretory secretory* larva stadium kedua (L<sub>2</sub>) dorman *T. canis* dengan menggunakan metode *Western blot*. Prinsip dasar teknik ini adalah melakukan analisis protein dengan teknik SDS-PAGE (*sodium deodecyl sulphate*

*polyacrilamid gel*) dan didapatkan protein dengan berat molekul berbeda yang terpisah pada area gel, kemudian ditransfer dari polyacrilamid gel ke membran nitroselulose dengan teknik *Western blot*. Posisi protein antigen pada membran dapat dilihat dari ikatan protein antigen dengan antibodi anti L<sub>2</sub> cacing *T. canis*. Untuk mendapatkan berat molekul (BM) yang tepat, diperhitungkan dengan marker protein yang berkisar antara 65.000 Da sampai 205.000 Da (Harlow dan Lane, 1988; Rantam, 2003).

Karakterisasi protein *excretory-secretory* larva kedua stadium *dorman* cacing *Toxocara canis* sebelumnya sudah pernah dianalisis dengan teknik SDS-PAGE oleh Koesdarto (2006). Dari penelitian tersebut didapatkan hasil protein dengan berat molekul (BM) 147,9 kDa; 120,2 kDa; 107,2 kDa; 95,5 kDa; 87,1 kDa; 79,4 kDa; 70,8 kDa; 63,1 kDa; 55,0 kDa; 49,0 kDa; 45,7 kDa; 42,7 kDa; 40,7 kDa; 37,2 kDa; 32,4 kDa, 30,2 kDa; 28,2 kDa; 24,0 kDa; 22,9 kDa; 20,0 kDa; 19,5 kDa dan 10,7 kDa.

Dari hasil analisis dengan teknik SDS-PAGE kemudian dilanjutkan karakterisasi protein dengan teknik *Western Blot* dan didapatkan delapan pita protein spesifik dengan BM 62,4 kDa, 46,6 kDa, 43,1 kDa, 37,3kDa, 30,1 kDa, 24,4 kDa, 19,4 kDa dan 10,7 kDa. Hal tersebut menunjukkan bahwa ke delapan protein itu merupakan protein spesifik *T. Canis* yang bersumber dari L<sub>2</sub> *dorman*.

Adanya kemiripan berat molekul (BM) yang diperoleh melalui teknik *Western blot* dan SDS-PAGE menunjukkan bahwa pita protein yang dimaksud kemungkinan sama. Hal ini karena perhitungan dilakukan secara regresi serta adanya kemungkinan perbedaan relatif dalam menentukan jarak pita protein maupun panjang dan awal pengukuran gel (Kusnoto, 2003).

Morales yang mengutip dari Magnaval menyatakan bahwa karakterisasi protein *Toxocara canis* dengan teknik *Western blot* didapatkan tujuh pita protein yang terbagi menjadi dua kategori, yaitu fraksi protein dengan BM tinggi meliputi 200 kDa, 147 kDa, dan 132 kDa, sedangkan fraksi rotein dengan BM rendah meliputi 35 kDa, 30 kDa, 28 kDa dan 24 kDa. Fraksi protein dengan BM tinggi memiliki kemungkinan yang lebih besar untuk terjadinya reaksi silang sedangkan fraksi protein dengan BM rendah lebih spesifik untuk genus *Toxocara* (Morales, 2002).

Penelitian yang dilakukan oleh Morales (2002) untuk mendapatkan protein spesifik *T. canis* digunakan *excretory secretory* larva stadium kedua sebagai antigen dan serum yang berasal dari kelinci terinfeksi menggunakan teknik *Western blot*, diperoleh sembilan pita protein dengan BM 200 kDa, 116 kDa, 92 kDa, 80 kDa, 66 kDa, 45 kDa, 35 kDa, 31 kDa, dan 28 kDa (Morales, 2002).

Dari pernyataan diatas diketahui terdapat beberapa pita protein yang berpeluang untuk dikembangkan sebagai bahan diagnosis Toxocariasis melalui pemeriksaan imunologis, yaitu protein dengan BM 46,6 kDa, 37,3 kDa, 30,1 kDa dan 24,4 kDa.

Protein antigen *excretory secretory* larva stadium kedua *dorman* *Toxocara canis* dapat membentuk pita protein yang jelas, sehingga dapat dengan mudah menentukan BM protein di dalamnya. Ikatan antara antigen dengan antibodi yang terbentuk menunjukkan bahwa konsentrasi protein dalam *excretory secretory* larva stadium kedua *dorman* sesuai dengan antibodi yang direaksikan. Konsentrasi protein antigen yang digunakan sangat berpengaruh terhadap imunogenitas dari antigen (Abbas *et al.*, 2000).

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

Beberapa faktor yang mempengaruhi efektifitas *Western blot* yaitu tebal dan macam gel yang digunakan, jenis protein, lama transfer dan macam transfer, tanpa mempengaruhi atau

mengurangi reaktifitas dari protein. Proses *Western blot* memberikan kemungkinan mendeteksi protein antigen secara radiografi, enzimatis dan imunologis (Artama, 1991 dikutip oleh Maria, 2003).

## **Kesimpulan Dan Saran**

### **Kesimpulan**

Berdasarkan hasil yang diperoleh dari identifikasi protein *excretory secretory* larva kedua *dorman* cacing *Toxocara canis* yang sudah ditambahkan antibodi anti larva-kedua dari serum mencit menggunakan teknik *Western blot*, didapatkan delapan fraksi protein antigenik dengan berat molekul (BM) 62,4 kDa, 46,6 kDa, 43,1 kDa, 37,3 kDa, 30,1 kDa, 24,4 kDa, 19,4 kDa dan 10,7 kDa.

### **Saran**

Saran yang dianjurkan dalam penelitian ini adalah perlu adanya penelitian lebih lanjut dari kelima pita protein antigenik dari delapan pita protein yang diperoleh, untuk identifikasi protein murni sehingga dapat digunakan sebagai bahan diagnosis toxocariasis secara serologis.

### **Daftar Pustaka**

- Abbas, A. K., A. H. Litchman and Pober. 2000. Cellular and Mollecular Immunologi. 4<sup>th</sup> ed. Saunders Company. Philadelphia.
- Abdel-Rahman, E. H., K. N. Abdel-Megged and M. A. Hassanain. 2000. Structural Characterization and Immunocatalization of Egg Antigen Cross-React with *Toxocara vitulorum*, *Fasciola gigantica* and *Moniezia expanza*. Abstract. J. Egypth. Soc. Parasitol. 30(2): 581-91.
- CDC. 2006. Toxocariasis. <http://www.cdc.com>
- CMR. 2003. *Toxocara* infection. <http://www.cmr.com>
- Choi, M. H., I. C. Park, S. Li and S. T. Hong. 2003. excretory-secretory antigen is better than crude antigen for the serodiagnosis of clonorchiasis by ELISA. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list\\_uids=12666728&dopt=Abstract](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=12666728&dopt=Abstract).
- el-Massry, A. A. 1999. Characterization of Antigenic Property of *Toxocara canis* and *Toxocara leonina* Adults and Larvae Through Immuno diagnostic Electrophoresis (SDS-PAGE) and Western Blot Technique. J Egypt Soc Parasitol; 29(2): 335-45.
- Harlow, E. And D. Lane. 1988. Antibodies. A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Laboratory.
- Hubner, J., M. Leissova. 2001. Diagnosis of the early phase of larval toxocariasis using IgG avidity. *Epidemol Mikrobiol Imunol*. Apr; 50(2); 67-70.

- Huh, S. 2006. Toxocariasis. <http://www.emedicine.com/med/topic2293.htm>
- Ito, K. K. Sakai, T. Okajima, K. Quichi, A. Funikoshi, J. Nishimura, H. Ibayashi, and M. Tsuji. 1986. Three cases of visceral larva migrans due to ingestion of raw chicken or cow liver. *Nippon Naikagaku Zasshi*. 75: 759-766.
- Kilpatrick, M. E. 1992. Toxocariasis. In; Tropical Medicine. 7<sup>th</sup> ed. London: W. B. Saunders Company; pp. 761-4.
- Kusnoto. 2003. Isolasi dan Karakterisasi Protein Immunologi Larva Stadium II *Toxocara cati* Isolat Lokal. **Tesis**. Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga. Hal.3: 11-13:14.
- Levine, N. D. 1978. Textbook of Veterinary Parasitology. Burgers Publishing Company. Diterjemahkan oleh: Ashadi G. 1990. Wardianto Ed. Gajah Mada University Press. Yogyakarta
- Maria, A.P. 2003. Profil Protein Antigen Larva Stadium Kedua (L<sub>2</sub>) cacing *Toxocara vitulorum*. **Skripsi** Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Morales, O. L., M. C. Lopez, R. S. Nicholls, C. Agudelo. Identification of *Toxocara canis* Antigen By Western blot in Experimentally Infected Rabbits. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/siter/entrez?Cmd=Retrieve&PubMed&list\\_uids=10605487&dept](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/siter/entrez?Cmd=Retrieve&PubMed&list_uids=10605487&dept)
- Radman, N. E.S. M. Archelli, R. D. Fonrouge, M. del V Guardis, O. R. Linzitto. 2000. Human Toxocariasis. Its seroprevalence in the city of la plata. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. May-Jun; 95(3): 281-5.
- Rantam, F. A. 2003. Metode Immunologi. Airlangga University Press. Surabaya. Hal. 79-78.
- Saffar, E. H., F. el-Rifaei and K. M. Maklad. 1992. Protein Chromatographic Study on Adult *Ascaris lumbricoides*, *Ascaris suum*, *Ascaris vitulorum*, and *Toxocara canis*. **J. Egypt. Soc. Parasitol.** 22(1):27-30.
- Soulsby, E. J. L. 1986. Helminth, Arthropods and Protozoa of Domestic Animals. Bailliere Tindall and Cassel. London.
- Starke, W. A., R. Z. Machado., G. H. Bechara and M. C. Zocoller. 1996. Skin Hypersensitivity Test in Buffaloes Parasitized with *Toxocara vitulorum*. **Vet Parasitol**; 63(3-4): 283-90.
- Sun, H.2006. Toxocariasis. <http://www.emedicine.com/med/topic2293.htm>
- Tolan, R. W. 2007. Toxocariasis. <http://www.emedicine.com/ped/topic2270.htm>
- Wikipedia. 2007. Western blot. <http://www.wikipedia.com>