

## **Respon Imun Mencit terhadap Protein 24 dan 71 kDa *Toxocara vitulorum* dalam Membentuk Antibodi dan Protektifitasnya terhadap Infeksi Buatan**

### ***Immune Response of Mice against 24 and 71 kDa proteins of *Toxocara vitulorum* in antibody Establising and their Protectivity againt Afificial infection***

**Candra Dwi Atma<sup>1</sup>, Kusnoto<sup>2</sup>, Eduardus Bimo Aksono H.P.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Departemen Mikrobiologi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Nusa Tenggara Barat

<sup>2</sup>Departemen Parasitologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, Surabaya

<sup>3</sup>Departemen Ilmu Kedokteran Dasar Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, Surabaya  
 Email : candra.atma@gmail.com

#### **Abstract**

This study aimed to get 24 and 71 kDa protein of *T. vitulorum* that have a high antigenicity and imunogenicity on ELISA and to get the protein which able to protect mice against artificial infection of L2 *T. vitulorum*. This study using mice Balb/c aged 6 to 8 weeks. Proteins isolated were 24 and 71 kDa. Proteins 24, 71 kDa and intestinal homogenates immunized in mice with the addition of adjuvant (1: 1) for 3 times with period of 2 weeks. Two weeks after the last booster, serum drawn from mice tested by Indirect ELISA to determine the value of optical density (OD). The next stage, mice were infected L2 with a dose of 10-17 larvae / g of body weight. The results showed the average OD value by ANOVA Factorial antigen P24 was not significantly different with antigen P71 *T. vitulorum*. Antigen 24 kDa and 71 kDa with different immunization, both were showed P0 significantly different with P1, P2 and P3. Based on percentage of L2 in the somatic tissue of mice, P0 were showed 79.1% of total number of L2 early infection, whereas the treatment of P1 were showed 0.04%, P2 and P3 showed as much as 0.02% and 0.04%. 24 and 71 kDa protein of *T. vitulorum* that have a high antigenicity and imunogenicity.

**Keywords :** *Toxocara vitulorum*, protein 24 kDa, protein 71 kDa, L2 *T. vitulorum*, Protection

#### **Abstrak**

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan protein 24 dan 71 kDa dari *T. vitulorum* yang memiliki antigenisitas dan imunogenisitas yang tinggi pada ELISA dan untuk mendapatkan protein yang mampu memproteksi mencit terhadap infeksi L2 *T. vitulorum*. Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah mencit Balb/c jantan umur 6–8 minggu. Protein yang diisolasi adalah 24 dan 71 kDa. Protein 24, 71 kDa dan homogenat ingesta diimunisasi pada mencit dengan penambahan adjuvan (1:1) selama 3 kali dengan jangka waktu 2 minggu. Dua minggu setelah *booster* terakhir, serum mencit diambil dan diuji dengan *Indirect-ELISA* untuk menentukan nilai *optical density* (OD). Tahap berikutnya, mencit diinfeksi L2 dengan dosis 10-17 larva / g berat badan mencit. Hasil penelitian menunjukkan rata-rata nilai OD antigen P24 tidak berbeda signifikan dengan antigen P71. Antigen 24 kDa dan 71 kDa dengan imunisasi yang berbeda, keduanya menunjukkan P0 berbeda nyata dengan P1, P2 dan P3. Berdasarkan persentase L2 dalam jaringan somatik mencit, P0 menunjukkan 79,1% dari total jumlah infeksi awal L2, sedangkan P1 adalah 0,04%, P2 dan P3 sebanyak 0,02% dan 0,04%. Protein 24 dan 71 kDa *T. vitulorum* memiliki antigenesitas dan imunogenisitas yang tinggi.

**Kata kunci :** *Toxocara vitulorum*, protein 24 kDa, protein 71 kDa, Larva 2 *T. vitulorum*, protektifitas

#### **Pendahuluan**

Toxocariasis adalah salah satu penyakit zoonosis yang disebabkan oleh *Toxocara vitulorum* yang tidak hanya berbahaya bagi sapi dan kerbau, tetapi juga sangat berbahaya bagi manusia apabila terinfeksi oleh larva 2 (Uga *et al.*, 1990). Usaha

penanggulangan penyakit yang disebabkan oleh cacing dengan menggunakan vaksin merupakan pilihan yang terbaik, tetapi vaksin tersebut belum ada di pasaran karena masih dalam taraf penelitian (Munn, 1997). *Toxocara vitulorum* merupakan parasit multi sel dan memiliki protein yang beragam yang dapat

dikembangkan menjadi vaksin (Abdel-Rahman, 2000). Pengembangan vaksin terhadap *T. vitulorum* memerlukan protein imunogenik yang dapat memicu produksi antibodi, protein tersebut hingga saat ini belum ditemukan. Isolasi protein menggunakan cara elusi untuk mendapatkan protein murni yang dapat dijadikan sebagai kandidat vaksin (Rantam, 2003; Kusnoto, 2008).

### Metode Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian *true experimental*, dan rancangan penelitian ini adalah *post test only control groups design* dengan tahap pertama identifikasi cacing dewasa dan isolasi L2 *T. vitulorum* yang diperoleh dari usus halus sapi jantan yang dipotong di Rumah Potong Hewan Surabaya. Tahap kedua pembuatan homogenat dari usus cacing *T. vitulorum* sebanyak 10 ekor dengan cara organ digerus secara manual menggunakan mortir hingga homogen, hasil gerusan tersebut dimasukkan dalam tabung reaksi yang berisi PBS. Suspensi disentrifugasi dengan kecepatan 5.000 rpm selama 5 menit. Pelet dan supernatan tersebut dipisahkan dan disimpan pada kulkas pendingin pada suhu -20 °C. Tahap ketiga identifikasi protein *T. vitulorum* dengan menggunakan uji SDS-PAGE. Tahap keempat isolasi protein 24 dan 71 kDa dengan menggunakan teknik elusi. Tahap kelima mengidentifikasi hasil elusi dengan menggunakan uji SDS-PAGE kembali. Tahap keenam peneraan protein 24 kDa, 71 kDa, dan homogenat ingesta.

Tahap ketujuh imunasi mencit sebanyak 24 mencit *Balb/c* jantan umur 6–8 minggu dibagi menjadi 4 kelompok dan dibagi secara acak. Kelompok pertama (P0) sebagai kontrol di injeksi dengan adjuvan secara *sub cutan* (SC), Kelompok kedua (P1) mencit diinjeksi dengan protein murni cacing *T. vitulorum* 24 kDa sebanyak 200 µg/ekor dan adjuvan secara SC, sedangkan pada perlakuan ketiga (P2) mencit diinjeksi

dengan protein murni cacing *T. vitulorum* 71 kDa 200 µg/ekor dan adjuvan secara SC, dan perlakuan keempat (P3) mencit diinjeksi secara SC dengan homogenat ingesta cacing dewasa *T. vitulorum* 200 µg/ekor dan adjuvan. Imunisasi dilakukan sebanyak 3 kali dengan interval waktu 2 minggu. Imunisasi pertama dengan penambahan *complete Freund's adjuvant* (CFA) sama banyak dan imunisasi berikutnya (*booster*) dengan protein yang sama dengan penambahan *incomplete Freund's adjuvant* (IFA). Tahap kedelapan Pengambilan serum mencit untuk melihat nilai OD menggunakan uji *indirect*-ELISA.

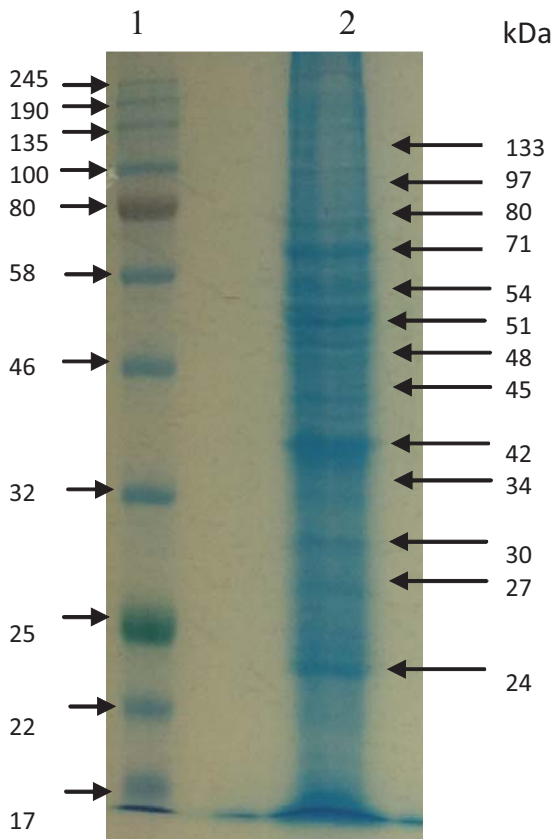
Tahap kesembilan dua minggu setelah *booster* terakhir pada waktu mencit diimunisasi, semua perlakuan di infeksi L2 *T. vitulorum* sebanyak 17 L2 per gram berat badan mencit secara per oral. Setelah 4 hari diinfeksi L2 *T. vitulorum*, semua mencit dikorbankan untuk melihat protektivitasnya. Organ somatik dipotong kecil-kecil sebanyak 10 g dan dimasukkan ke dalam beaker glass 100 mL yang terlebih dahulu di berikan larutan HCl-pepsin [1% HCl (37%), 1% pepsin (1 : 10.000) dalam aquadest. Perbandingan antara jaringan (g) dan cairan (mL) adalah sekitar 1:10 diaduk dan didiamkan selama 2 jam. saline ditambahkan ke beaker glass 500 mL dan diamkan selama 1 jam pada 40 °C untuk sedimentasi larva dan kemudian supernatan dibuang dan beaker glass yang berisi saline dibiarkan selama 1 jam. Sedimen kemudian disaring melalui saringan ke dalam 60 mL tabung kaca dan diamkan selama 1 jam. Setelah itu supernatan dibuang, sisa endapan dipindahkan ke Petri dish dan jumlah larva dihitung di bawah mikroskop stereoskopik. Jumlah larva di setiap jaringan dihitung dengan *multiplying the number of larvae in a gram of tissue* (lpg) dari total berat jaringan (Taira *et al.*, 2003).

### Hasil dan Pembahasan

Berdasarkan penghitungan regresi didapatkan

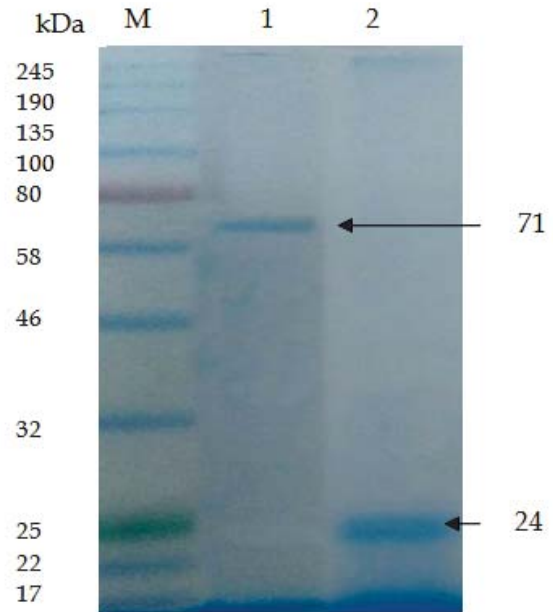
persamaan garis  $y = 2,794 - 5,14x + 7,205x^2 - 3,783x^3$ .  
 Persamaan garis regresi *cubic* didapat dari nilai *Retardation factor* (Rf) dengan log BM marker yang dapat dilihat pada Lampiran 1. Hasil analisis protein dari organ ingesta didapatkan beberapa pita protein dari BM yang tinggi ke rendah adalah 133, 97, 80, 71, 54, 51, 48, 45, 42, 34, 30, 27 dan 24 kDa. Protein BM dari somatik didapatkan 80, 71, 54, 45, 42, dan 24 kDa sedangkan ES 97, 80, 71, 54, 48, 42, 30, 27 dan 24 kDa.

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,



Gambar 1 Hasil analisis protein *T. vitulorum* menggunakan teknik SDS-PAGE dengan pewarnaan *Coomasie blue*. Kolom 1 = marker, kolom 2= intestin, 3=Somatik 4= ES. Dari ketiga antigen didapatkan BM 133, 97, 80, 71, 54, 51, 48, 45, 42, 34, 30, 27 dan 24 kDa

sehingga kemungkinan ada beberapa BM protein yang memiliki sedikit perbedaan dengan penelitian lain tetapi sebenarnya yang dimaksud adalah protein yang sama (Kusnoto,2016).



Gambar 2 Hasil Isolasi protein 24 kDa dan 71 kDa dengan teknik elusi. M= Marker, 1= protein 71 kDa, dan 2= protein 24 kDa.

Berdasarkan uji ANOVA Faktorial antigen P24 menunjukkan nilai OD rata-rata sebesar  $0.865 \pm 0.305$  dan antigen P71 dengan nilai OD rata-rata adalah sebesar  $0,868 \pm 0,300$ . Dapat disimpulkan antigen P24 dan antigen P71 tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $p>0,01$ ) dapat dilihat pada Tabel 1

Tabel 1 Rata-rata dan Standar Deviasi Nilai OD Antigen 24 kDa dan Antigen 71 kDa Terhadap Imunisasi yang sama

Antigen	Rata-rata $\pm$ SD
Antigen P24	$0.865a \pm 0.305$
Antigen P71	$0,868a \pm 0,300$

<sup>a</sup>Superskrip sama pada kolom menunjukkan tidak ada perbedaan yang sangat signifikan ( $p>0,01$ )

Hasil Rata-rata dan simpangan baku (SD) pada antigen 24 kDa dengan imunisasi yang berbeda

disajikan pada Tabel 2. Nilai OD rata-rata serum mencit kontrol adalah sebesar  $0,368 \pm 0,044$  yang menunjukkan perbedaan yang sangat signifikan ( $p < 0,01$ ) antara nilai OD P0 dengan P1, P2 dan P3. Perlakuan P1 sebesar  $1,069 \pm 0,153$ , P2 sebesar  $0,988 \pm 0,029$  dan P3  $1,037 \pm 0,059$ . Diketahui pula bahwa ketiga Perlakuan (P1, P2 dan P3) tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $p > 0,01$ ).

Tabel 2 Uji HSD (1%) pada Antigen sama (24 kDa) dengan Imunisasi yang Berbeda

Imunisasi	Rata-rata $\pm$ SD
P0	$0,368^a \pm 0,044$
P1	$1,069^b \pm 0,153$
P2	$1,069^b \pm 0,153$
P3	$1,037^b \pm 0,059$

<sup>a,b</sup>Superskrip berbeda pada kolom sama menunjukkan perbedaan yang sangat signifikan ( $p < 0,01$ ). P0= kontrol, P1= Imunisasi protein 24 kDa, P2= imunisasi protein 71 kDa dan P3= imunisasi homogenat ingesta dari cacing *T. vitulorum*.

Untuk rata-rata dan SD pada uji HSD 1% pada antigen 71 kDa terhadap imunisasi yang berbeda disajikan pada Tabel 3. Nilai OD rata-rata serum mencit kontrol (P0) adalah sebesar  $0,368 \pm 0,044$  yang menunjukkan perbedaan yang sangat signifikan ( $p < 0,01$ ) dengan P1, P2 dan P3. Perlakuan P1 sebesar  $1,013 \pm 0,039$ , P2 sebesar  $1,030 \pm 0,085$  dan P3  $1,063 \pm 0,062$ . Diketahui pula bahwa ketiga Perlakuan (P1, P2 dan P3) tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $p > 0,01$ ).

Tabel 3 Uji HSD (1%) pada Antigen sama (71 kDa) dengan Imunisasi yang Berbeda

Imunisasi	Rata-rata $\pm$ SD
P0	$0,368^a \pm 0,044$
P1	$1,013^b \pm 0,039$
P2	$1,030^b \pm 0,085$
P3	$1,063^b \pm 0,062$

<sup>a,b</sup>Superskrip berbeda pada kolom sama menunjukkan perbedaan yang sangat signifikan ( $p < 0,01$ ). P0= kontrol, P1= Imunisasi protein 24 kDa, P2= imunisasi protein 71 kDa dan P3= imunisasi homogenat ingesta dari cacing *T. vitulorum*.

Hal ini membuktikan bahwa protein murni 24 kDa, 71 kDa dan homogenat ingesta cacing *T. vitulorum* mempunyai kemampuan menstimulasi sistem imun humoral. Antibodi dapat dideteksi 5–7 hari sesudah penyuntikan protein. Setelah timbulnya antibodi pertama dimulailah biosintesis aktif antibodi sehingga terjadi peningkatan konsentrasi antibodi, yang mencapai titer antibodi tertinggi setelah 8–12 hari (Herscowitz, 1993).

Hasil uji tantangan mencit yang diimunisasi terhadap L2 *T. vitulorum* diamati melalui jaringan somatik mencit dapat dilihat pada Tabel 4 menunjukkan P0 (kontrol)  $8,925 \pm 0,108$  yang menunjukkan perbedaan yang sangat signifikan ( $p < 0,01$ ) dengan P1, P2 dan P3. Pada perlakuan (P1) memiliki rata-rata  $0,735 \pm 0,044$ . Pada perlakuan (P2) sebesar  $0,721 \pm 0,036$  dan perlakuan (P3)  $0,736 \pm 0,045$ . Diketahui pula bahwa ketiga Perlakuan (P1, P2 dan P3).

Tabel 4 Jumlah persentase L2 *T. vituorum* yang ditemukan pada jaringan somatik terhadap infeksi buatan L2 *T. vituorum*.

Perlakuan	Persentase jumlah L2 pada jaringan somatik mencit (y)	Transfotmasi ( $\sqrt{y+1/2}$ )
P0	79,1 %	$8,925^b \pm 0,108$
P1	0,04 %	$0,735^a \pm 0,044$
P2	0,02 %	$0,721^a \pm 0,036$
P3	0,04 %	$0,736^a \pm 0,045$

<sup>a, b</sup>Superskrip berbeda pada kolom sama menunjukkan perbedaan yang sangat signifikan ( $p < 0,01$ ). P0= kontrol, P1= Imunisasi protein 24 kDa, P2= imunisasi protein 71 kDa dan P3= imunisasi homogenat ingesta dari cacing *T. vitulorum*.

Berdasarkan presentase jumlah L2 pada jaringan somatik mencit menunjukkan P0 sebanyak 79,1% dari jumlah total awal infeksi L2, sedangkan pada perlakuan P1 sebanyak 0,04%, P2 sebanyak 0,02% dan P3 sebanyak 0,04%.

Penelitian ini terdapat adanya penurunan jumlah larva yang sangat signifikan pada perlakuan

mencit yang diimunisasi dengan protein 24 kDa, 71 kDa dan homogenat ingesta. Mencit yang diimunisasi dengan protein akan meningkatkan antibodi tubuh. Pada saat imunisasi atau infeksi parasit, antigen akan mengaktifkan sistem imun. Antigen parasit akan dikenali oleh epitel usus pada lokasi tertentu. Hal ini kemudian akan mengaktifasi pembentukan alarmin. Alarmin TSLP akan mengaktifasi sel dendritik (DC) yang merupakan *antigen presenting cell* (APC). Sel dendritik memiliki peranan penting dalam mengawali respon imun alami (*innate*) maupun adaptif (Allen, 2011).

Komponen dari cacing yang dikenali akan berikatan dengan PRR yang sesuai, kemudian diterjemahkan oleh sel dendritik menjadi suatu stimulus untuk sel T. Stimulus tersebut merupakan kaskade sinyal yang diawali dengan aktivasi *mitogen activated protein kinase* (MAPK) dan *nuclear factor KB* (NFKB) dan menginduksi ekspresi gen yang terlibat dalam maturasi sel dendritik dan kemampuannya untuk mengarahkan respon sel T menuju respon imun Th2. Hal ini akan mengawali respon sel T yang produktif (Rao, 2000).

Sel Th2 akan mengaktifkan IL-4 dan IL-5. pembentukan IL5 dan *alternatively activated macrophage* (AAM). IL5 dan *chemokine ligand* (CCL11) akan mendukung pembentukan eosinofil yang diharapkan dapat mematikan parasit cacing. Hal ini dapat terjadi setelah eosinofil berikatan dengan IgE yang menempel pada permukaan tubuh parasit cacing kemudian eosinofil akan mengeluarkan granulanya yang dapat bersifat toksik (Allen, 2011).

Respon lainnya adalah IL4 kemudian akan berikatan dengan reseptor IL4 (IL4R) sehingga menginduksi respons yang mendukung pembentukan AAM dan produksi IL6 yang akan mendukung respon humoral melalui aktivasi sel B yang akan menghasilkan IgG1, IgG4, IgE dan IgA. Immunoglobulin G1 berperan dalam mengurangi tingkat

kesuburan parasit cacing (Behnke, 2009).

## Kesimpulan

Protein 24 dan 71 kDa memiliki antigenisitas tinggi yang dibuktikan dengan nilai OD antigen P24 ( $0.865^a \pm 0.305$ ) dan antigen P71 ( $0,868^a \pm 0,300$ ). Protein 24 dan 71 kDa memiliki imunogenisitas tinggi terhadap imunisasi mencit yang dibuktikan dengan nilai OD kontrol (P0) ( $0.368 \pm 0.417$ ), imunisasi protein 24 kDa (P1) ( $1.041 \pm 0,110$ ), imunisasi protein 71 (P2) ( $1,009 \pm 0,064$ ) dan imunisasi homogenat ingesta (P3) ( $1.050 \pm 0.592$ ) menunjukkan ada perbedaan yang sangat signifikan ( $p < 0,01$ ) antara nilai OD P0 dengan P1, P2 dan P3. Tidak ada interaksi protein 24 dan 71 kDa dari cacing *T. vitulorum* baik sebagai antigen maupun imunogen. Protein 24 dan 71 kDa dari cacing *T. vitulorum* memiliki imunogenisitas tinggi yang dibuktikan dengan ujiantang L2 *T. vitulorum* berdasarkan larva cek P0 ( $8.925 \pm 0.108$ ), P1 ( $0.735 \pm 0.044$ ), P2 ( $0.721 \pm 0.036$ ) dan P3 ( $0.736 \pm 0.045$ ) terdapat perbedaan yang sangat signifikan ( $p < 0,01$ ) antara nilai OD P0 dengan P1, P2 dan P3.

## Daftar Pustaka

- Abdel-Rahman, E.H. (2000). Isolation and structural characterization of *Toxocara vitulorum* specific antigen and its potency in diagnosis of toxocarasis among buffalo calve. J. Egypt. Soc. Parasitol. 30 (2) 387-400.
- Allen JE and Maizels. (2011). Diversity and dialogue in immunity to helminths. Nat Publ Gr. 11(6):37588.
- Behnke JM, R. Ellia, Bradley, and K.J.Else. 2009. Regulatory T cells: a role in the control of helminthdriven intestinal pathology and worm survival. Immunol. 82(4):23408.
- Herskowitz. (1993). Molecular and Cellular Biology American Society for Microbiology.
- Kusnoto. (2003). Isolasi dan Karakteristik Protein Imunogenik Larva Stadium II *Toxocara cati* Isolasi lokal. Thesis Program pascasarjana, Universitas Airlangga, Surabaya.

- Munn, E.A. (1997). Rational design of nematode vaccines: hidden antigens. *International Journal for Parasitology*.
- Rantam, F.A. (2003). Metode Immunologi. Airlangga University Press. Surabaya. Hal. 3–9.
- Soedarto, 2003. Zoonosis Kedokteran. Cetakan Pertama. Airlangga University Press. Hal. 114–115.
- Rao A and Avni. (2000). Molecular aspects of Tcell differentiation. *Br Med Bull*. 56(4):96984.
- Taira, K., Christian. 2011. *Toxocara cati* larvae persist and retain high infectivity in muscles of experimentally infected chickens. *Journal Veterinary Parasitology*.
- Uga, S., T. Matsumura, Fujisawa, Okubo, Kataoka and Kondo, 1990. Incidence of seropositivity to Human Toxocariasis in Hyogo Prefecture, Japan, and Its possible role in ophthalmic disease. *Jpn. J. Parasitol*. 39: 500–502.