

**263**

**LIT**

Bl. Donggala

LAPORAN AKHIR PENELITIAN  
PENGEMBANGAN METODE ELISA UNTUK MENDETEKSI ANTIGEN  
EKSKRETORI-SEKRETORI *Schistosoma japonicum*  
PADA PENDERITA SCHISTOSOMIASIS.



Samarang  
Made Agus Nurjana  
Sitti Chadijah  
Intan Tolistiawaty  
Malonda Maksud  
Andi Tenriangka

BALAI LITBANG P2B2 DONGGALA  
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN  
KEMENTERIAN KESEHATAN RI  
TAHUN 2012

LAPORAN AKHIR PENELITIAN  
PENGEMBANGAN METODE ELISA UNTUK MENDETEKSI ANTIGEN  
EKSKRETORI-SEKRETORI *Schistosoma japonicum*  
PADA PENDERITA SCHISTOSOMIASIS.



Samarang

Made Agus Nurjana

Sitti Chadijah

Intan Tolistiawaty

Malonda Maksud

Andi Tenriangka

**BALAI LITBANG P2B2 DONGGALA**  
**BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN**  
**KEMENTERIAN KESEHATAN RI**  
**TAHUN 2012**

i

Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan	
PERPUSTAKAAN	
Tanggal :	14 - 6 - 2013
No. Induk :	
No. Klass :	263
	CIT

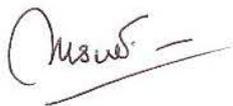
## LEMBAR PENGESAHAN

Judul Penelitian :

PENGEMBANGAN METODE ELISA UNTUK MENDETEKSI ANTIGEN  
EKSKRETORI-SEKRETORI *Schistosoma japonicum*  
PADA PENDERITA SCHISTOSOMIASIS  
TAHUN 2012.

Disetujui

Mengetahui,  
Panitia Pembina Ilmiah PTIKM  
Ketua



DR. Ir. Inswiasri, M.Kes  
NIP. 195410071983112001

Kepala Balai Litbang P2B2 Donggala



Jastal, SKM., M.Si  
NIP. 197001021995011001

Tanggal Disetujui reviewer : 11 Januari 2013

## **2. SUSUNAN TIM PENELITIAN**

**Ketua Pelaksana :**

**Samarang, SKM, M.Si**

**Anggota Tim Pelaksanaan Penelitian :**

**Made Agus Nurjana, SKM, M.Epid (Peneliti)**

**Sitti Chadijah, SKM, M.Si (Peneliti)**

**drh. Intan Tolistiawaty (Peneliti)**

**Malonda Maksud, SKM (Teknisi)**

**Andi Tenriangka, S.Sos (Administrasi)**

**Sumber Dana : DIPA Balai Litbang P2B2 Donggala 2012**

**Waktu Penelitian : April – Desember 2012**

### 3. SURAT KEPUTUSAN PENELITIAN

**KEPUTUSAN  
KEPALA BALAI PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN  
PENGENDALIAN PENYAKIT BERSUMBER BINATANG  
(BALAI LITBANG P2B2) DONGGALA  
NOMOR : LB.01.03/XVII/626/2012**

**TENTANG  
PEMBENTUKAN TIM PELAKSANAAN PENELITIAN  
BALAI LITBANG P2B2 DONGGALA  
TAHUN 2012**

**KEPALA BALAI PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN  
PENGENDALIAN PENYAKIT BERSUMBER BINATANG  
(BALAI LITBANG P2B2) DONGGALA**

**Menimbang**

:

- a. bahwa untuk melaksanakan kegiatan Penelitian di Balai Litbang P2B2 Donggala tahun 2012 perlu dibentuk Tim Pelaksana Penelitian;
- b. bahwa berdasarkan pertimbangan sebagaimana dimaksud pada huruf a, maka dipandang perlu menetapkan Keputusan Kepala Balai Litbang P2B2 Donggala tentang Pembentukan Tim Pelaksana Penelitian;

**Mengingat**

:

1. undang-undang Nomor 36 tahun 2009 tentang Kesehatan (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2009 Nomor 144, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 5063);

2. Undang-undang Nomor 18 tahun 2002 tentang Sistem Nasional Penelitian, Pengembangan, Penerapan Ilmu Pengetahuan dan Teknologi (Lembaran Negara Republik Indonesia TAHUN 2002 Nomor 84, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 4219);
3. Undang-undang Nomor 14 Tahun 2001 tentang Paten (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2002 Nomor 109, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 4130);
4. Peraturan Pemerintah Nomor 39 Tahun 1995 tentang Penelitian dan Pengembangan Kesehatan (Lembaran Negara Tahun 1995 Nomor 67, Tambahan Lembaran Negara Nomor 3609);
5. Peraturan Pemerintah Nomor 20 Tahun 2005 tentang Alih Teknologi Kekayaan Intelektual serta Hasil Penelitian dan Pengembangan oleh Perguruan Tinggi dan Lembaga Penelitian dan Pengembangan (Lembaran Negara tahun 2005 Nomor 43, Tambahan Lembaran Negara Nomor 4497);
6. Peraturan Presiden Nomor 10 Tahun 2005 tentang Unit Organisasi dan Tugas Eselon I Kementerian Negara Republik Indonesia sebagaimana telah diubah terakhir dengan Peraturan Presiden Nomor 50 tahun 2008;
7. Instruksi Presiden Nomor 4 Tahun 2003 tentang Pengkoordinasian Perumusan dan Pelaksanaan Kebijakan Strategis Pembangunan Nasional Ilmu Pengetahuan dan Teknologi;
8. Keputusan Menteri Kesehatan Nomor 791/Menkes/SK/VII/1999 tentang Koordinasi Penyelenggaraan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan;

9. Keputusan Menteri Kesehatan Nomor 1179A/Menkes/SK/X/1999 tentang Kebijakan Nasional Penelitian dan Pengembangan Kesehatan;
10. Peraturan Menteri Kesehatan Nomor 1575/Menkes/Per/XI/2005 tentang Organisasi dan Tata Kerja Departemen Kesehatan sebagaimana telah diubah terakhir dengan Peraturan Menteri Kesehatan Nomor 439/Menkes/Per/VI/2009 tentang Perubahan kedua atas Peraturan Menteri Kesehatan Nomor 1575/Menkes/Per/XI/2005 tentang Organisasi dan Tata kerja Departemen Kesehatan;
11. Keputusan Menteri Kesehatan Nomor 331/Menkes/SK/V/2006 tentang Rencana Strategis Departemen Kesehatan Tahun 2005-2009.

**Mempcrhatikan**

- DIPA Balai Litbang P2B2 Donggala Tahun Anggaran 2012 Nomor : 1288/024-11.2.01/24/2012 tanggal 09 Desember 2011;
- Persetujuan Etik (*Ethical Cleareance*) Nomor: KE.01.04/EC/247/2012 tentang persetujuan penelitian *Pengembangan Metode ELISA untuk Mendeteksi Antigen Eksretori - Sekretori Schistosoma japonicum pada Penderita Schistosomiasis*;

## MEMUTUSKAN

**Menetapkan** :

- KESATU** : Keputusan Kepala Balai Litbang P2B2 Donggala tentang Pembentukan Tim Pelaksana Penelitian Tahun 2012;
- KEDUA** : Pembentukan Tim Pelaksana Penelitian Tahun 2012 dengan Susunan Tim sebagaimana tersebut dengan lampiran keputusan ini;
- KETIGA** : Biaya pelaksanaan kegiatan penelitian ini dibebankan pada DIPA Balai Litbang P2B2 Donggala Tahun 2012;
- KEEMPAT** : Keputusan ini mulai berlaku sejak tanggal ditetapkan sampai dengan bulan Desember 2012, dengan ketentuan apabila dikemudian hari ternyata terdapat kekeliruan dalam penetapan ini, akan diadakan perubahan dan perbaikan kembali sebagaimana mestinya.

**Ditetapkan di Donggala  
Pada tanggal 16 April 2012**

**Kepala Balai Litbang P2B2 Donggala**



**Jastal, SKM, M.Si  
NIP. 197001021995011001**

Lampiran SK No. LB.01.03/XVII/626/2012

No.	Judul Penelitian	Nama Anggota Tim	Kedudukan dalam Penelitian
1.	Pengembangan Metode ELISA untuk Mendeteksi Antigen Ekskretori-Sekretori <i>Schistosoma japonicum</i> pada Penderita Schistosomiasis	1. Samarang, SKM, M.Si. 2. Made Agus Nurjana, SKM, M.Epid. 3. Sitti Chadijah, SKM, M.Si 4. Drh. Intan Tolistiawaty 5. Ma'onda Maksud, SKM 6. Andi Tenriangka, S.Sos.	Ketua Pelaksana Peneliti Peneliti Peneliti Teknisi Administrasi

Ditetapkan di Donggala  
Pada tanggal 16 April 2012

Kepala Balai Litbang P2B2 Donggala



Jastal, SKM, M.Si  
NIP. 197001021995011001

#### 4. KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas segala karuniaNya sehingga laporan akhir penelitian ini dapat diselesaikan. Tema yang dipilih dalam penelitian yang dilaksanakan sejak bulan April 2012 mengenai schistosomiasis, dengan judul Pengembangan Metode ELISA untuk Mendeteksi Antigen Ekskretori-Sekretori *Schistosoma japonicum* Pada Penderita Schistosomiasis.

Terima kasih penulis ucapkan kepada Bapak Max J. Herman dan Ibu Rini Sasanti selaku pembimbing dari tim komisi Pembina Penelitian Ilmiah (PPI) yang telah memberi arahan serta saran dalam penulisan protokol hingga pelaksanaan penelitian. Kepada drh. Fajar Satrija, M.Sc, Ph.D. selaku ketua departemen kesehatan masyarakat veteriner Institut Pertanian Bogor (IPB) dan Dr. drh. Sri Murtini, M.Si dosen mikrobiologi IPB yang telah memberikan bantuan saran dan bimbingan. Kepada seluruh tim PPI yang telah memberikan bantuan baik berupa moril maupun materil.

Penulis juga menyampaikan terima kasih kepada Kepala Balai Litbang P2B2 Donggala yang telah memberikan izin untuk mendanai penelitian ini. Kepala Dinas Kesehatan Propinsi Sulawesi Tengah Serta Kepala Dinas Kesehatan Kabupaten Poso yang telah memberikan izin kepada kami untuk melakukan penelitian di wilayah kerja mereka. Bapak Kaleb, selaku petugas laboratorium schistosomiasis yang telah banyak membantu selama pengumpulan data. Ungkapan terima kasih juga disampaikan kepada seluruh rekan-rekan, atas segala bantuan dan dukungan doa sehingga penelitian ini dapat terselesaikan sesuai dengan waktu yang telah ditentukan.

Semoga hasil dari penelitian ini dapat bermanfaat.

## 5. RINGKASAN EKSEKUTIF

### PENGEMBANGAN METODE ELISA UNTUK MENDETEKSI ANTIGEN EKSKRETORI-SEKRETORI *Schistosoma Japonicum* PADA PENDERITA SCHISTOSOMIASIS

Samarang, Made Agus Nurjana, Sitti Chadijah, Intan Tolistiawaty,  
Malonda Maksud, Andi Tenriangka

Di Indonesia schistosomiasis hanya ditemukan di Sulawesi Tengah yaitu di dataran tinggi lembah Napu, Lindu dan Bada. Pengendalian schistosomiasis di Sulawesi Tengah diawali tahun 1974 melalui pengobatan pada penderita, pemberantasan siput sebagai inang antara dengan moluskisida, dan melalui agroengineering, selanjutnya program pengendalian dilakukan oleh dinas kesehatan tahun 1982 hingga sekarang, namun hasilnya masih berfluktuasi. Menurut laporan dinas kesehatan propinsi Sulawesi Tengah, tahun 2009 di Kabupaten Poso dari 18 dusun yang menjadi fokus penularan schistosomiasis sekitar 3,80% masyarakat positif terinfeksi dari 2157 masyarakat yang diperiksa tinja. Tahun 2010 masyarakat Kabupaten Poso yang positif terinfeksi schistosomiasis meningkat menjadi 5,71% dari 8360 masyarakat yang diperiksa, dan Kabupaten Sigi dilaporkan 3,03% masyarakat positif schistosomiasis dari 4826 masyarakat diperiksa di tujuh desa. Pemeriksaan tinja secara konvensional yaitu tinja diperiksa dengan menggunakan mikroskop untuk melihat ada tidaknya telur cacing *S. japonicum* dengan metode Kato Katz, cara ini merupakan kegiatan rutin untuk menegakkan diagnosis (penentuan penderita) schistosomiasis di Sulawesi Tengah. Hasil pemeriksaan tidak dapat diketahui secara langsung dengan metode konvensional, namun harus menunggu hingga 3-5 hari. Kenyataan ini menimbulkan kejenuhan/kebosanan di masyarakat dan keterlambatan penemuan penderita, yang berdampak pada pengendalian. Hal ini mendorong peneliti untuk mengembangkan imunodiagnosis melalui pendeteksian antigen Ekskretori-Sekretori (ES) pada penderita schistosomiasis, agar hasil diagnosis dapat lebih cepat dan akurat dengan menggunakan metode *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA). Tujuan dari penelitian ini yang merupakan penelitian tahap pertama adalah untuk mendapatkan konsentrasi dan berat molekul dari antigen (Ag) ES dan antibodi (IgG) yang digunakan dalam optimasi uji ELISA serta mendapatkan konformasi model yang optimal untuk mendeteksi AgES pada penderita schistosomiasis.

Metode penelitian pengembangan ELISA ini merupakan penelitian eksperimen yang bersifat longitudinal. Tujuan akhirnya adalah untuk menghasilkan model *diagnostic test (Rapid test)* dengan metode ELISA agar dapat mendeteksi penderita schistosomiasis secara cepat. Penelitian ini merupakan penelitian awal yang dilaksanakan selama sembilan bulan yaitu sejak turunnya persetujuan Etik yaitu bulan April – Desember 2012. Penelitian ini menggunakan dua pendekatan perlakuan yaitu pada manusia dan pada hewan. Perlakuan pada manusia yaitu meliputi kegiatan survey tinja untuk memastikan penderita positif schistosomiasis, dan survey darah pada penderita yang dinyatakan positif dari hasil pemeriksaan survey tinja, untuk diambil serumnya. Dalam penelitian ini dilakukan juga pemeriksaan filariasis pada darah penderita yang menjadi sampel penelitian. Tujuannya adalah untuk menghindari terjadinya reaksi silang pada pembacaan ELISA antara schistosomiasis dengan filariasis. Perlakuan pada hewan yaitu untuk memproduksi antigen dan antibodi. Hal ini dilakukan melalui tiga tahap yaitu tahap pertama ; 1) Isolasi, Produksi dan karakterisasi antigen ES. 2) Produksi antibodi poliklonal dan karakterisasi. 3) Optimasi uji ELISA.

Hasil pengembangan metode ELISA dalam penelitian ini yaitu : diperoleh konformasi model IgG *capture* dengan konsentrasi antibodi satu  $\mu\text{g/ml}$  dapat mendeteksi AgES dalam serum penderita schistosomiasis hingga 20 kali pengenceran. Dengan perbandingan nilai absorbansi jarak nilai terjauh 2 kali lipat dari nilai serum negatif. Hasil penelitian ini mengindikasikan bahwa metode ELISA yang dikembangkan dapat digunakan untuk penemuan penderita schistosomiasis secara dini.

Kesimpulan dari penelitian ini adalah konformasi model yang diperoleh dalam pengembangan metode ELISA pada penelitian ini dapat mendeteksi AgES dalam serum penderita schistosomiasis. Disarankan kepada program pengendalian schistosomiasis dalam rangka penemuan penderita sebaiknya menggunakan metode ELISA agar lebih cepat dan akurat, sehingga tidak menimbulkan kejenuhan/kebosanan pada masyarakat dan keterlambatan penemuan pada penderita schistosomiasis dapat diatasi.

## 6. ABSTRAK

### PENGEMBANGAN METODE ELISA UNTUK MENDETEKSI ANTIGEN EKSKRETORI-SEKRETORI *Schistosoma Japonicum* PADA PENDERITA SCHISTOSOMIASIS

*Samarang, Made Agus Nurjana, Sitti Chadijah, Intan Tolistiawaty,  
Malonda Maksud, Andi Tenriangka*

Pengembangan metode ELISA untuk mendeteksi antigen ekskretori-sekretori *Schistosoma japonicum* (*S. japonicum*) pada penderita schistosomiasis, merupakan penelitian longitudinal. Penelitian dilakukan di Napu Kabupaten Poso selama sembilan bulan, yaitu dari bulan April hingga Desember 2012. Tujuan dari penelitian tahun ini yang merupakan penelitian tahap pertama adalah mendapatkan konsentrasi dan berat molekul dari antigen ekskretori-sekretori (AgES) dan antibodi (IgG) yang digunakan pada optimasi ELISA dan mendapatkan konformasi model yang optimal untuk mendeteksi AgES pada penderita schistosomiasis. Penelitian ini dilaksanakan dengan dua pendekatan yaitu pada manusia dan hewan. Pada manusia yaitu dilakukan dua kegiatan 1) Survei tinja. 2) Survei darah. Perlakuan yang dilakukan pada hewan menggunakan tiga tahapan yaitu tahap pertama isolasi cacing *S. japonicum*, produksi AgES, dan karakterisasi. Tahap kedua produksi antibodi poliklonal anti ES *S. japonicum*, dan karakterisasi, dan tahap ketiga yaitu optimasi uji ELISA. Hasil penelitian yaitu diperoleh konformasi model IgG capture dengan konsentrasi antibodi 1 µg/ml dapat mendeteksi AgES dalam serum penderita schistosomiasis hingga 20 kali pengenceran. Dengan perbandingan nilai absorbansi jarak nilai terjauh 2 kali lipat dari nilai serum negatif. Hasil penelitian ini mengindikasikan bahwa metode ELISA dapat digunakan untuk penemuan penderita schistosomiasis secara dini. Kesimpulan dari penelitian ini adalah konformasi model yang diperoleh dalam pengembangan metode ELISA pada penelitian ini dapat mendeteksi AgES pada penderita schistosomiasis.

Kata Kunci : Schistosomiasis, ELISA, *Schistosoma japonicum*, Ekskretori-Sekretori, Napu

## 7. ABSTRACT

### *DEVELOPMENT OF ELISA METHOD FOR DETECTING EXCRETORY-SECRETORY ANTIGEN *Schistosoma japonicum* IN HUMAN SCHISTOSOMIASIS*

*Samarang, Made Agus Nurjana, Sitti Chadijah, Intan Tolistiawaty,  
Malonda Maksud, Andi Tenriangka*

*Development of ELISA method for detecting excretory- secretory antigen *Schistosoma japonicum* (*S.japonicum*) in human schistosomiasis, a longitudinal study. The study was conducted in Poso Napu for nine months, from April to December 2012. The purpose of the study this year which is the first stage of the research is to get the concentration, and molecular weight of excretory-secretory antigen(AgES) and antibody (IgG) used in the optimization ELISA model and obtain an optimal conformation to detect AgES in human schistosomiasis. This study was conducted with the two approaches in humans and animal. In humans that do two activities 1) Stool survey 2) survey of blood. The treatment is done in animal using three stages of the first phase of isolation *S. japonicum* worm, the production of AgES, and characterization. The second stage of polyclonal antibodies anti ES *S. japonicum* production, and the third stage of the optimization of the ELISA test. The results are obtained conformational models capture the IgG antibody concentrations one  $\mu\text{g/ml}$  can be detected in the serum of patients with schistosomiasis AgES up to 20 times dilution. By comparison of absorbance values farthest distance second times the value of the negative serum. The results of this study indicate that the ELISA method can be used for early discovery of schistosomiasis patients. Conclusion is a model conformation obtained in development of ELISA method in this study can detect AgES in patients with schistosomiasis.*

*Key word : Schistosomiasis, ELISA, *Schistosoma japonicum*, Excretory-Secretory, Napu.*

8. DAFTAR ISI	Halaman
1. Judul Penelitian	i
2. Susunan Tim Peneliti	ii
3. Surat Keputusan Penelitian	iii
4. Kata Pengantar	viii
5. Ringkasan Eksekutif	ix
6. Abstrak Bahasa Indonesia	xi
7. Abstrak Bahasa Inggris	xii
8. Daftar Isi	xiii
9. Daftar Tabel/Gambar/Grafik/Peta	xiv
10. Daftar Lampiran	xv
Isi Laporan Penelitian	
1. Pendahuluan	1
1.1 Latar Belakang	1
2. Tinjauan Pustaka	3
3. Tujuan dan Manfaat	5
3.1 Tujuan Penelitian	5
3.1.1 Tujuan Umum	5
3.1.2 Tujuan Khusus	5
3.2 Manfaat Penelitian	5
4. Hipotesis	5
5. Metode	6
5.1 Tempat Dan Waktu Penelitian	6
5.2 Desain Penelitian	6
5.3 Alur Penelitian	6
a. Alur Pembuatan Serum	6
b. Alur Pembuatan Antigen	7
c. Alur pembuatan Antibodi Poliklonal	8
5.4 Prosedur Penelitian	9
5.5 Perlakuan Pada Manusia	9
a. Survei Tinja	9
b. Survei Darah	10

5.6	Perlakuan Pada Hewan	11
	Tahap 1. Isolasi, Produksi dan Karakterisasi AgES <i>S. japonicum</i>	11
	Tahap 2. Produksi Antibodi Poliklonal, dan Karakterisasi	13
	Tahap 3. Optimasi Uji ELISA	16
6.	Hasil	17
6.1	Gambaran Umum Lokasi Penelitian	17
6.2	Survei Tinja dan Darah	19
6.3	Isolasi, Produksi dan Karakterisasi AgES	19
6.4	Produksi dan Karakterisasi Antibodi Poliklonal	22
6.5	Optimasi Uji ELISA	23
	a. Coating AgES	23
	b. Coating IgG	25
	c. Optimasi Uji Penentuan Nilai Positif Schistosomiasis	26
7.	Pembahasan	28
7.1	Perlakuan Pada <b>Manusia</b>	28
7.2	Perlakuan Pada Hewan	28
	a. Isolasi Produksi dan Karakterisasi AgES	28
	b. Produksi dan Karakterisasi Antibodi	31
7.3	Optimasi Uji ELISA	32
	a. Coating AgES	32
	b. Coating IgG	33
	c. Penentuan Nilai Absorbansi Positif schistosomiasis	34
8.	Kesimpulan dan Saran	35
8.1	Kesimpulan	35
8.2	Saran	35
9.	Ucapan Terima Kasih	36
10.	Daftar Kepustakaan	37
11.	Lampiran	40

## 9. DAFTAR TABEL/GAMBAR/GRAFIK/PETA

No.	Judul Tabel	Halaman
Tabel 1.	Tata cara pengisian larutan BSA dan aquabides	14
Tabel 2.	Hasil survei tinja dan darah di desa Mekarsari dan Tamadue di Napu tahun 2012	19
Tabel 3.	Persentase keong terkumpul berdasarkan ukuran	21
Tabel 4.	Persentase koleksi keong berdasarkan daerah focus	21
Tabel 5.	Pembentukan antibodi Poliklonal pada kambing perlakuan berdasarkan hasil uji AGPT	22

No.	Judul Gambar	Halaman
Gambar 1.	Peta Lokasi Penelitian	17
Gambar 2.	Jumlah tikus tertangkap berdasarkan lokasi focus di Dataran Tinggi Napu tahun 2012	20
Gambar 3.	Persentase positif tikus yang tertangkap di Dataran Tinggi Napu tahun 2012	20
Gambar 4.	Profil pretein AgES <i>S. japonicum</i>	22
Gambar 5.	Hasil uji AGPT AgES dengan serum kambing	23
Gambar 6.	Hasil sebaran optimasi uji ELISA AgES 10 µg/ml	24
Gambar 7.	Hasil sebaran optimasi uji ELISA AgES 2 µg/ml	24
Gambar 8.	Hasil sebaran optimasi uji ELISA AgES 1 µg/ml	25
Gambar 9.	Sebaran Absorbansi Serum Positif Dengan IgG Coating 2 µg/ml	25
Gambar 10.	Sebaran Absorbansi Serum Positif Dengan IgG Coating 1 µg/ml	26
Gambar 11.	Hasil Penentuan Nilai Absorbansi Positif Schistosomiasis Pada Konsentrasi IgG Coating 2 µg/ml	26
Gambar 12.	Hasil Penentuan Nilai Absorbansi Positif Schistosomiasis Pada Konsentrasi IgG Coating 1 µg/ml	27
Gambar 13.	Perbedaan warna secara visual coating IgG konsentrasi 1 µg/ml dengan 2 µg/ml.	27

## 10. DAFTAR LAMPIRAN

No.	Judul Lampiran	Halaman
Lampiran 1.	Izin penelitian	40
Lampiran 2.	Etik Penelitian	41
Lampiran 3.	Lembar persetujuan	42
Lampiran 4.	Form Pemeriksaan Responden	43
Lampiran 5.	Form Pemeriksaan Keong	44
Lampiran 6	Form Pemeriksaan Tinja	45
Lampiran 7.	Form Pemeriksaan Tikus	46
Lampiran 8.	Komposisi Reagen Untuk (SDS-PAGE)	47
Lampiran 9.	Foto Survei Keong Untuk Infeksi Sercaria Ke Mencit	48
Lampiran 10.	Foto Survei Tikus Untuk Produksi Antigen ES	48
Lampiran 11.	Foto Produksi Antibodi, Karakteristik, Optimasi Uji ELISA	49
Lampiran 12.	Foto Hasil Optimasi Uji ELISA	50

## 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Schistosomiasis adalah penyakit zoonotik dan merupakan masalah kesehatan masyarakat, yang disebabkan oleh sejenis parasit cacing dari famili *Schistosomatidae* yang memiliki habitat pada pembuluh darah disekitar usus atau kandung kemih. Penyebaran schistosomiasis sangat luas di daerah tropis maupun subtropics.<sup>1</sup> Infeksi *Schistosoma* dapat menimbulkan gejala-gejala yang bersifat umum seperti gejala keracunan, disentri, penurunan berat badan, penurunan nafsu makan, kekurusan dan lambatnya pertumbuhan pada anak-anak.<sup>2</sup> Pada penderita yang sudah kronis dapat menimbulkan pembengkakan hati yang umumnya berakhir dengan kematian.<sup>3</sup>

Di Indonesia schistosomiasis pada manusia hanya ditemukan di Sulawesi Tengah daerah dataran tinggi Lembah Napu, Lindu, dan Bada yang disebabkan oleh spesies cacing *Schistosoma japonicum*. Pengendalian schistosomiasis di Sulawesi Tengah diawali tahun 1974 melalui pengobatan penderita, pemberantasan siput sebagai inang antara dengan moluskisida, dan melalui agroengineering, selanjutnya program pengendalian dilakukan oleh dinas kesehatan tahun 1982 hingga sekarang, namun hasilnya masih berfluktuasi.<sup>4,5</sup>

Program pengendalian yang dilakukan hingga saat ini belum dapat menekan angka kejadian penyakit, karena adanya reinfeksi dari berbagai reservoir termasuk hewan liar diantaranya tikus, ternak masyarakat bahkan masyarakat sendiri sebagai pembawa, sehingga schistosomiasis sulit untuk dikendalikan.<sup>6</sup> Selama ini program pengendalian dan pengobatan meliputi fisik maupun kimia, termasuk dalam penggunaan moluskisida dengan penemuan penderita melalui pemeriksaan tinja secara konvensional.

Deteksi dini pada masa pre paten untuk penderita schistosomiasis di Sulawesi Tengah hingga kini belum dilakukan. Sehingga penderita hanya dapat terdeteksi bila cacing dalam tubuh penderita telah berproduksi (bertelur) melalui pemeriksaan tinja secara konvensional. Menurut laporan dinas kesehatan propinsi Sulawesi Tengah, tahun 2009 di Kabupaten Poso dari 18 dusun yang menjadi fokus penularan schistosomiasis sekitar 3,80% masyarakat positif terinfeksi dari 2157 masyarakat yang diperiksa tinja. Tahun 2010 masyarakat Kabupaten Poso yang positif terinfeksi meningkat menjadi 5,71% dari 8360 masyarakat yang diperiksa, dan

Kabupaten Sigi dilaporkan 3,03% masyarakat positif schistosomiasis dari 4826 masyarakat diperiksa di tujuh desa.<sup>7</sup> Pemeriksaan tinja secara konvensional dengan metode Kato Katz, merupakan kegiatan rutin untuk menegakkan diagnosis schistosomiasis di Sulawesi Tengah. Akan tetapi hasil pemeriksaan tidak dapat diketahui secara langsung namun harus menunggu hingga 3-5 hari, sehingga perlu terobosan baru yang dapat mendeteksi schistosomiasis secara dini dengan cepat dan akurat, untuk mengetahui keberadaan cacing dalam tubuh penderita sebelum terjadi perubahan patofisiologis atau patologi. Keterbatasan teknik pemeriksaan schistosomiasis secara konvensional ini mendorong peneliti, untuk mengembangkan imunodiagnosis melalui pendeteksian antigen ES pada penderita schistosomiasis, sehingga hasil diagnosis dapat lebih akurat dan cepat dengan menggunakan metode *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA). Dalam penelitian ini dilakukan juga pemeriksaan filariasis pada darah penderita yang menjadi sampel penelitian. Tujuannya adalah untuk menghindari terjadinya cross reaksi pada pembacaan ELISA antara schistosomiasis dengan filariasis.

a. Pertimbangan / Justifikasi Fokus Penelitian

Penelitian tentang pengembangan metode ELISA untuk mendeteksi penderita schistosomiasis dipilih karena metode ini dapat mendeteksi penderita schistosomiasis secara dini, dan belum pernah dilakukan di Indonesia., khususnya Sulawesi Tengah.

Pertanyaan Penelitian

1. Berapa konsentrasi dan berat molekul dari antibodi dan antigen yang digunakan pada optimasi uji yang dilakukan.
2. Bagaimana konformasi model yang optimal untuk mendeteksi antigen ES.

## 2. TINJAUAN PUSTAKA

Diagnosa Schistosomiasis secara umum dapat ditegakkan dengan menggunakan dua metode yaitu secara klinis dan secara laboratorium. Penegakan diagnosis secara klinis kurang menyakinkan karena penyakit schistosomiasis dapat dikecohkan dengan penyakit lain yang mempunyai gejala yang sama, seperti penyakit kuning (lever), fasciolosis, kanker dan lainnya.<sup>1</sup> Sehingga diperlukan pemeriksaan secara laboratorium, antara lain secara mikroskopis (konvensional), dimana penderita hanya dapat terdeteksi bila cacing dalam tubuh penderita telah berproduksi (bertelur). Pemeriksaan secara konvensional melalui pemeriksaan tinja dengan metode Kato Katz, membutuhkan waktu beberapa hari untuk mendapatkan hasil pemeriksaan.<sup>5</sup> Teknik pemeriksaan laboratorium lainnya yaitu secara serologi, imunologis yang menggunakan antibodi dengan target antigen parasit yang dicari,<sup>8</sup> dan pemeriksaan secara molekuler yang dapat menentukan urutan DNA target yang diperiksa dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Ketiga metode deteksi ini lebih sensitive dan spesifik dibandingkan pemeriksaan parasitologis,<sup>9</sup> serta lebih cepat dibandingkan dengan metode konvensional.

Dari beberapa metode pemeriksaan secara laboratorium peneliti mencoba untuk mengembangkan metode pemeriksaan secara imunologi dengan uji ELISA. Peneliti melakukan optimasi uji menggunakan antibodi poliklonal, untuk mendapatkan konformasi model yang optimal untuk mendeteksi antigen ES *S. japonicum* pada penderita schistosomiasis. Antibodi poliklonal diproduksi dalam penelitian ini adalah merupakan antibodi hasil hiperimunisasi. Hiperimunisasi merupakan imunisasi yang dilakukan secara sengaja terhadap hewan coba yaitu menggunakan seekor kambing dengan suatu imunogen spesifik.<sup>10</sup> Pembentukan antibodi terhadap hewan coba dapat menimbulkan respon yang berbeda. Perbedaan waktu dari respon pembentukan antibodi pada host dapat bervariasi dan tergantung pada imunogenisitas, bentuk dan stabilitas stimulant, spesies hewan, rute injeksi, serta sensitivitas uji yang digunakan untuk mendeteksi antibodi pertama yang terbentuk.<sup>11</sup> Respon host terhadap imunogen yang diberikan tidak hanya ditentukan oleh sifat fisikokimia imunogen, namun juga ditentukan oleh beberapa faktor terkait host (hewan yang diinjeksi imunogen), termasuk kedalamnya yaitu genetik, umur, status nutrisi, dan efek sekunder yang diturunkan dari suatu proses penyakit.<sup>12</sup>

Deteksi schistosomiasis teknik serologi dengan metode ELISA, menggunakan antigen dari telur telah dilakukan oleh Turner P *et al* 2004, didapatkan hasil spesifisitas 97% dengan sensitifitas 96% untuk *S. mansoni* dan 92 % untuk *S. haematobium*.<sup>13</sup> Deteksi antigen ekskretori dan sekretori (ES) *S. japonicum* yang dikeluarkan ke sirkulasi inang merupakan pendekatan baru untuk mendeteksi infeksi cacing parasit. Antigen ES umumnya berupa protein yang merupakan produk hasil metabolisme cacing yang diproduksi sejak cacing tersebut berhasil menetap (*establish*) dalam tubuh induk semangnya. Deteksi dengan menggunakan metode ELISA lebih sensitive dan spesifik dibandingkan pemeriksaan parasitologis.<sup>9</sup>

### 3. TUJUAN DAN MANFAAT

#### 3.1 Tujuan Penelitian

##### 3.1.1 Tujuan Umum

Mengembangkan metode ELISA dengan poliklonal antibodi untuk mendeteksi antigen ekskretori-sekretori *S. japonicum* pada penderita schistosomiasis.

##### 3.1.2 Tujuan Khusus

1. Mendapatkan konsentrasi dan berat molekul dari antigen dan antibodi yang digunakan dalam optimasi uji ELISA.
2. Mendapatkan konformasi model yang optimal dengan konsentrasi antigen dan antibodi untuk mendeteksi antigen ES pada penderita schistosomiasis.

#### 3.2 Manfaat Penelitian

1. Diharapkan pengembangan metode ELISA ini digunakan oleh program sebagai metode untuk mendeteksi penderita schistosomiasis secara dini.
2. Diharapkan menjadi model untuk pengembangan diagnostik kit pada penyakit yang disebabkan oleh cacing dan parasit lainnya.
3. Diharapkan deteksi dini penderita schistosomiasis pada masyarakat, dapat ditegakkan dengan menggunakan rapid tes dari diagnostik kit yang telah dikembangkan dan dapat digunakan baik dilapangan maupun di tempat pelayanan kesehatan.
4. Menambah wawasan dan keterampilan pada peneliti sendiri.

### 4. HIPOTESIS

Dengan optimasi uji ELISA dapat diperoleh konformasi yang optimal untuk mendeteksi AgES *S. japonicum* pada penderita schistosomiasis.

## 5. METODE

### 5.1 Tempat Dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di daerah endemis tertinggi di Dataran Tinggi Napu, Kabupaten Poso, Desa Mekarsari dan Desa Tamadue selama 9 bulan, dari April – Desember 2012.

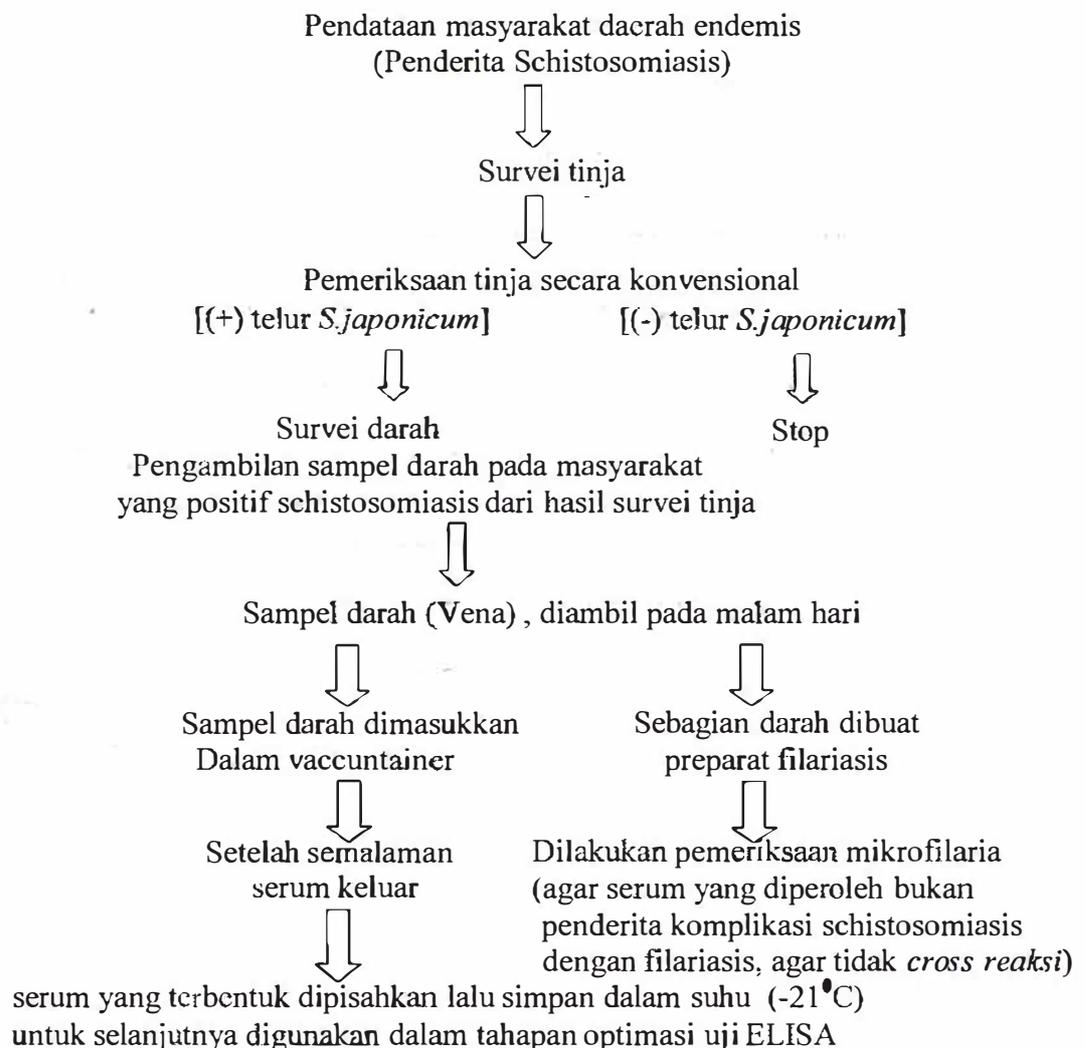
### 5.2 Desain Penelitian

Desain penelitian ini adalah merupakan Studi Ekperimental.

### 5.3 Alur Penelitian

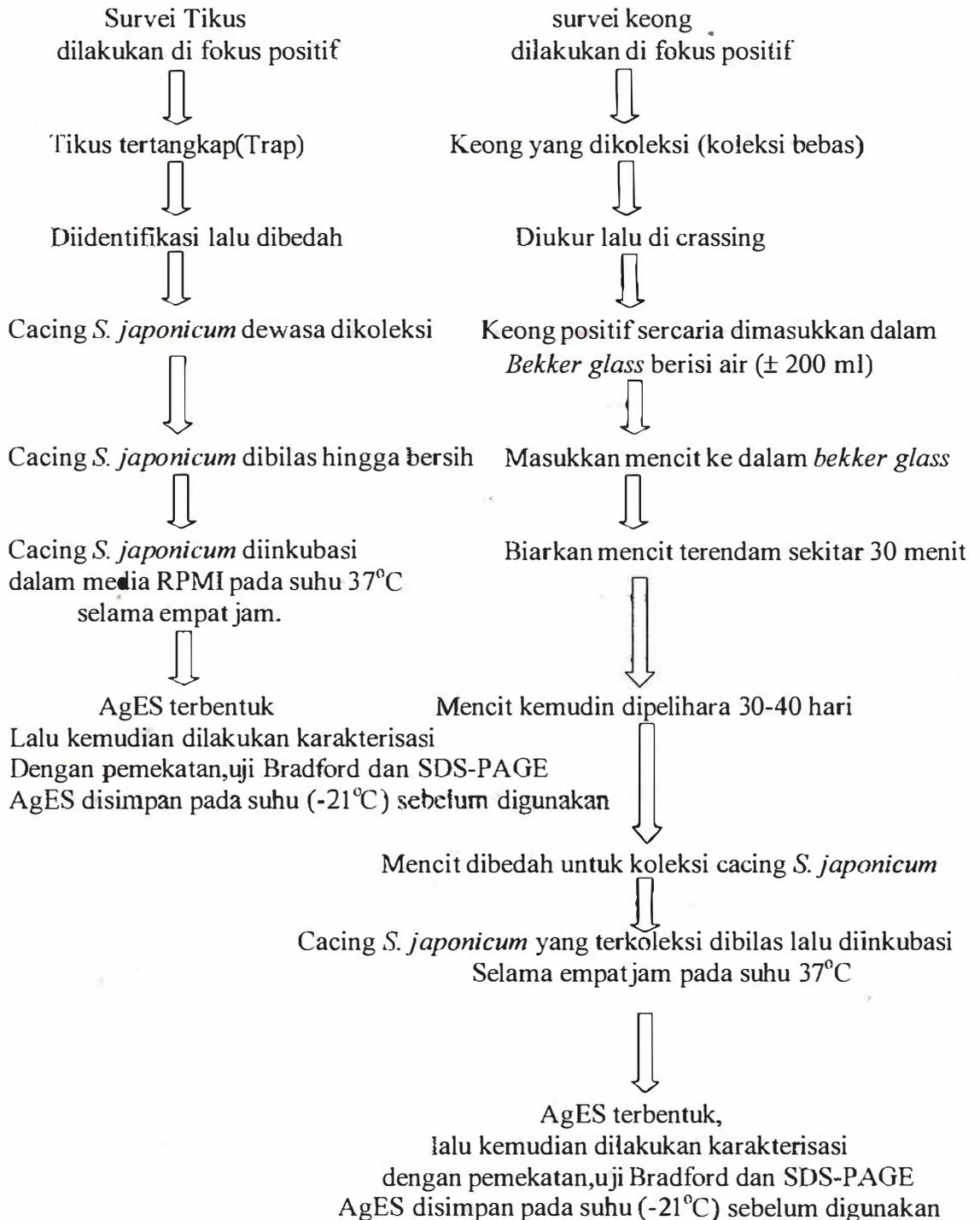
Alur penelitian disini terbagi atas tiga tahapan produksi yaitu pembuatan serum, pembuatan antigen ES dan pembuatan antibodi poliklonal.

#### 1. Alur Pembuatan Serum



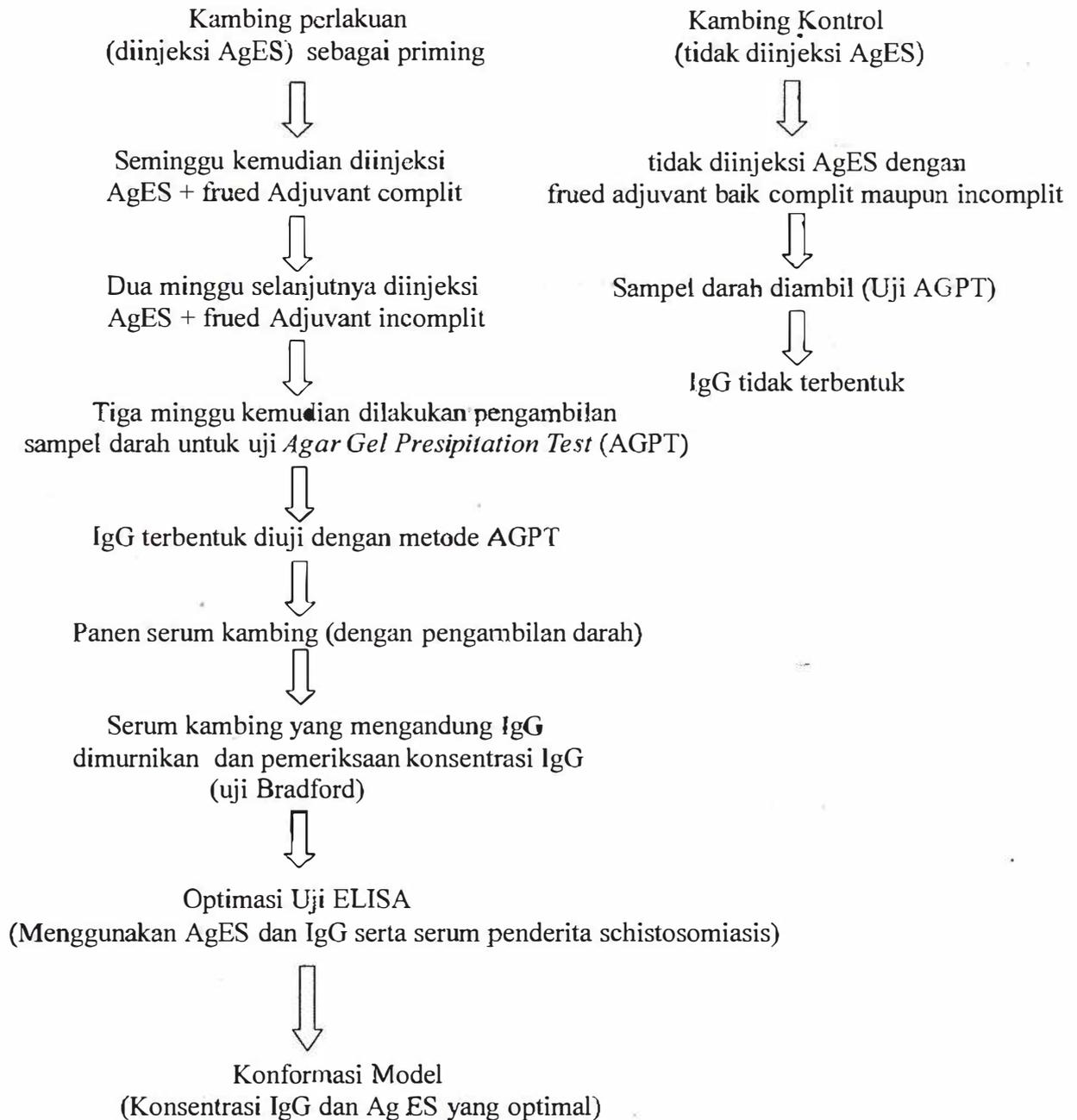
## 2. Alur Pembuatan Antigen Ekskretori-Sekretori

Pembuatan antigen ES dilakukan dengan koleksi cacing *S. japonicum* dari dua metode yaitu survei tikus dengan infeksi sercaria ke mencit.



### 3. Alur Pembuatan Antibodi Poliklonal (Eksperimen Pada Kambing)

Dalam pembuatan antibodi, digunakan dua ekor kambing satu sebagai perlakuan dan satunya lagi sebagai control, adapun alur kegiatannya sebagai berikut.



#### **5.4 Prosedur Penelitian**

Pengembangan metode ELISA untuk mendeteksi antigen ekskretori-sekretori *Schistosoma japonicum* pada penderita schistosomiasis dilakukan terhadap manusia dan hewan. Pada manusia yaitu penderita schistosomiasis dilakukan dua kegiatan. 1.) Survei tinja dan 2.) Pengambilan darah yaitu pada masyarakat yang dinyatakan positif schistosomiasis dari hasil pemeriksaan tinja. Perlakuan terhadap hewan melalui tiga tahapan yaitu : 1) Isolasi, produksi dan karakterisasi AgES *S. Japonicum*. 2) Produksi antibodi poliklonal dan karakterisasi. 3) Optimasi uji ELISA.

#### **5.5 Perlakuan Pada Manusia**

Persiapan sebelum dilakukan survei tinja yaitu dengan : Sehari sebelum pengumpulan tinja, penderita schistosomiasis diberi pot untuk wadah tinja sebanyak 3 buah per orang. Tinja penderita schistosomiasis dikumpulkan selama 3 hari. Tinja sebanyak kurang lebih 100 gr ditampung dalam pot tinja, saat penderita buang air besar dipagi hari. Selama 3 hari petugas mengumpulkan pot yang telah berisi tinja penderita schistosomiasis. Bagi penderita yang belum mengumpulkan tinja pada hari yang ditentukan maka petugas akan mengunjungi kembali pada hari berikut hingga 3 hari. Jika selama 3 hari kunjungan susulan petugas, penderita schistosomiasis tidak mengumpulkan tinja maka pasien dianggap batal.

##### **a.) Survei Tinja**

Pembuatan sediaan atau preparat tinja yaitu dengan tinja yang telah terkumpul diambil dengan batang lidi (*stick*) sebesar  $\pm$  ujung kelingking, diletakkan di atas kertas minyak (yang tidak tembus air) kemudian disaring menggunakan kasa halus yang terbuat dari bahan baja (*screenware*) dengan ukuran  $\pm$  3 x 4 cm. Kasa halus ditekan menggunakan lidi, akan muncul dibagian atas kasa, tinja yang telah tersaring. Tinja yang telah tersaring diambil dengan batang lidi, kemudian dicetak dengan karton berlubang yang sebelumnya telah diketahui isinya sebanyak  $\pm$  50 mg (karton Kato). Slide yang digunakan terlebih dahulu diberi nomor kode yang sesuai dengan kotak tinja pada labelnya. Setiap kotak tinja dibuat tiga preparat sampel tinja. Kemudian tinja ditutup dengan *callophane tape* (ukuran  $\pm$  22 x 30 mm) yang telah direndam dalam larutan *Gliserynmalachiet green* selama 24 jam. Tinja diratakan dengan pinggiran slide sampai sediaan tinja menjadi tipis dan rata. Untuk menghisap kelebihan cairan

### *Laporan akhir penelitian: Untuk kalangan terbatas*

dari pinggiran *callophane tape*, sediaan diletakkan terbalik di atas *tissue*. Sediaan disusun dalam *slide box* yang telah diberi label (nama desa dan tanggal pelaksanaan), kemudian diperiksa di bawah *compound* mikroskop. Pada *slide box* diberi label dari desa mana preparat tersebut diambil dan tanggal pelaksanaannya. Daftar nama masyarakat yang positif ditemukan telur *S. japonicum* dibuat dalam rangkuman untuk digunakan sebagai pedoman pengambilan sampel darah selanjutnya.

#### **b.) Survei darah penderita schistosomiasis**

Survei darah penderita schistosomiasis dilakukan pada malam hari, tujuannya adalah agar sampel darah yang diambil dari penderita schistosomiasis dapat dibuat specimen untuk pemeriksaan filariasis. Hal ini dilakukan agar dalam pendeteksian antigen ES penderita positif schistosomiasis, tidak terjadi cross reaksi dengan penderita filariasis pada saat optimasi uji ELISA. Langkah yang dilakukan adalah petugas harus menggunakan sarung tangan terlebih dahulu sebagai pelindung diri. Daerah vena mediana cubiti dibersihkan dengan alkohol 70%. Lalu tangan direntangkan, pasang ikatan pembendung dilengan bagian atas (diatas siku) pasien. Minta pasien untuk mengepalkan tangannya beberapa kali agar vena terlihat jelas. Tegangkan kulit diatas vena dengan jari tangan dan kiri agar vena tidak bergerak, lalu tusuk kulit diatas vena dengan jarum hingga menembus lumen vena. Lepaskan pembendungan dan ambillah darah sebanyak 3 cc. Letakkan kapas diatas jarum kemudian jarum dicabut perlahan. Mintakan pasien menekan bekas tusukan dengan kapas tadi, lalu diberi plester. Darah yang telah diambil lalu dialirkan dari syringe ke dalam tabung vacuum melalui dinding tabung, sisakan sekitar 3 tetes darah dalam syring. Berikan label berisi tanggal, no urut, nama pasien, dan lokasi pada tabung vaccuntainer. Selanjutnya sisa darah dalam syring diletakkan di atas objek glass untuk dibuat preparat filariasis. Specimen filaria dikeringkan dengan cara dianginkan, lalu disimpan dalam box slide, dan specimen siap untuk diperiksa.

#### **b.1) Pembuatan Serum Penderita**

Penanganan darah dalam *vaccuntainer* yaitu diletakkan dalam suhu ruang sekitar 2-3 jam, setelah serum terpisah dengan sel darah merah maka dimasukkan dalam suhu kulkas selama semalam. Keesokan hari serum yang telah terbentuk dipisahkan dan ditampung dalam *evendor tube* lalu *dicentrifuge*. *Evendor tube* yang digunakan yaitu telah diberi label sesuai *vaccuntainer* darah yaitu no urut, nama pasien, dan lokasi serta tanggal pembuatan. Serum

penderita schistosomiasis yang telah terbentuk kemudian disimpan dalam freezer suhu  $-21^{\circ}\text{C}$  sebelum digunakan.

#### **b.2) Pemeriksaan Slide Filariasis**

Slide filariasis diperiksa dengan menggunakan mikroskop *coumpound*, dengan pembesaran  $10 \times 10$  untuk pencarian lapang pandang, dan  $10 \times 40$  untuk mengidentifikasi mikrofilaria yang ditemukan.

### **5.6 Perlakuan Pada Hewan**

#### **Tahap 1) Isolasi, Produksi dan Karakterisasi AgES *S. japonicum***

##### **Koleksi Cacing *S. japonicum***

###### **a. Survei Tikus**

Cacing *S. japonicum* dikoleksi dari tikus yang tertangkap pada fokus positif dengan menggunakan perangkap mati dan peangkap hidup. Perangkap yang digunakan yaitu terbuat dari besi tempa. Tikus yang tertangkap dikumpulkan lalu dibawa ke laboratorium schistosomiasis. Untuk mengeluarkan cacing, dilakukan pembedahan pada tikus. Dalam pembedahan terutama yang diperhatikan adalah saluran cerna percabangan usus dan hati yaitu vena porta dan vena mesenterika. Cacing dewasa yang telah dikoleksi dicuci tiga kali dengan larutan NaCl fisiologis untuk menghilangkan sisa darah yang menempel ditubuh cacing. Kondisi fisik cacing diamati dengan mikroskop stereo atau lup, Cacing yang masih hidup dan utuh dikumpulkan dalam wadah yang berisi NaCl fisiologis.

###### **b. Infeksi Sercaria**

Metode lain yang digunakan untuk mengantisipasi nihilnya cacing *S. japonicum* dikoleksi dari survei tikus, yaitu dengan menginfeksi secaraia pada mencit. Penginfeksian sercaria pada mencit diawali dengan survei keong di focus positif dengan metode koleksi bebas. Keong yang diperoleh diidentifikasi dengan mengukur, mengcrassing lalu diperiksa dibawah mikroskop *coumpound* jantan atau betina serta ada tidaknya sercaria. Setiap keong yang mengandung sercaria setelah dicrassing dimasukkan dalam bekker glass yang berisi air sebanyak 250 cc. Mencit dimasukkan dalam bekker yang telah berisi sercaria, diinfeksi selama 30 menit. Mencit yang telah diinfeksi dengan sercaria, kemudian dipelihara sekitar 40 hari untuk selanjutnya dilakukan pembedahan.

### **Isolasi dan Produksi antigen ES**

Isolasi dan produksi antigen ES dalam penelitian ini yang telah dimodifikasi<sup>14</sup>. Antigen ES merupakan hasil metabolisme cacing *S. japonicum* digunakan untuk menghasilkan antibodi IgG asal kambing dalam penelitian ini dihasilkan dengan cara : Cacing yang telah dikoleksi dan masih hidup dipindahkan ke dalam petridisk 50 ml berisi larutan *Phosphate Buffer Saline* (PBS). Cacing yang terlihat bersih dipindahkan ke dalam wadah yang berisi media RPMI 1640 mengandung antibiotik yang bersuhu 37<sup>0</sup>C selama 15 menit. Kemudian semua cacing yang masih hidup dan terlihat bersih dipindahkan kedalam larutan RPMI 400 µl yang baru dalam *well mikroplate* dan diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 4 jam (2 ekor cacing dalam 400 µl RPMI). Setelah inkubasi selesai larutan yang mengandung ES antigen dikumpulkan dalam satu wadah untuk disimpan pada suhu -21<sup>0</sup>C sebelum digunakan.

### **Karakterisasi AgES *S. japonicum***

Antigen ES yang diproduksi di sentrifugasi pada suhu 4<sup>0</sup>C dengan kecepatan 2500 x g selama 10 menit. Supernatan dan pellet dipisahkan, lalu dilakukan uji Bradford untuk mengetahui konsentrasi AgES yang dihasilkan dengan standar larutan BSA (*Bovine Serum Albumin*). Jika konsentrasi yang dimiliki lebih rendah dari 1.000 mg/ml maka sebaiknya dilakukan pemekatan. Pemekatan dilakukan dengan, supernatant dan pellet diendapkan dengan *Ammonium sulfat* 40% (w/v) selama 24 jam pada suhu 4<sup>0</sup>C sambil *distirer*. Pellet dilarutkan dengan PBS perbandingan 1:4 sebelum diendapkan dengan *Ammonium sulfat*. Supernatan dan pellet yang telah diendapkan kemudian didialisis dengan menggunakan membrane selulose dalam larutan PBS 500 ml selama 4 jam, dimana PBS diganti dalam setiap jam. Supernatan dan larutan pellet yang telah dimurnikan disimpan pada suhu -20<sup>0</sup>C hingga saat digunakan. Karakterisasi antigen ES yang telah dimurnikan dilakukan dengan mengukur konsentrasi protein menggunakan metode Bradford (1976)<sup>15</sup>, dan menentukan pola pita protein dari AgES dengan metode *Sodium Deodecil Sulphate-Poly Acrilamide Gel Elektrophoresis* (SDS-PAGE) (Laemmli 1970)<sup>16</sup>. Profil protein terlihat dalam gel agar yang diperoleh dari uji SDS-PAGE berat molekulnya dihitung menggunakan uji regresi linear, dengan satuan kilo Dalton (kDa).

## **Tahap 2) Produksi Antibodi Poliklonal dan Karakterisasi**

### **Persiapan Hewan Coba**

Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini yaitu dua ekor kambing, satu ekor sebagai control dan satu ekor sebagai perlakuan. Kambing perlakuan digunakan untuk memproduksi poliklonal antibodi, yaitu memperoleh immunoglobulin g (IgG) dari serum. Kedua ekor kambing dipelihara dalam kandang yang tidak kontak dengan tanah. Sebulan sebelum perlakuan kambing dirawat dengan pemberian obat cacing, obat scabies serta vitamin B Kompleks agar kambing terbebas dari penyakit cacing dan kulit selama penelitian. Sebelum perlakuan dilakukan pemeriksaan feses pada kambing untuk memastikan kambing terbebas dari penyakit kecacingan. Pakan yang diberikan pada kambing yaitu berupa rumput hijau yang telah dilayukan terlebih dahulu, tujuannya agar metascarcia yang ada pada rumput tersebut dapat dihindari.

### **Produksi Antibodi Poliklonal**

Kambing perlakuan diimunisasi pada bulan Juli 2012, dengan menggunakan antigen ES *S. japonicum* yang telah dimurnikan dengan dosis 150 µg/ekor, sebelum penyuntikan kambing dipelihara dikandang dan diberi obat cacing agar bebas dari penyakit cacing dan selalu dijaga agar tidak terkena infeksi penyakit lain. Penyuntikan pertama dengan menggunakan antigen ES tanpa ditambahkan *adjuvant* dengan *rute* intra vena (I.V). *Rute* penyuntikan kedua yaitu dibawah kulit (S.C) menggunakan antigen ES tambah *adjuvant* komplit perbandingan 1:1. Setelah selang dua minggu dilakukan penyuntikan ketiga dengan pemberian antigen ES ditambahkan *adjuvant* inkomplit masing-masing perbandingan 1:1. Pada minggu ketiga darah diambil melalui vena untuk pemeriksaan secara kualitatif dengan metode *Agar Gel Precipitation Test* (AGPT).<sup>17</sup> Pemeriksaan ini bertujuan untuk membuktikan antibodi anti ES *S. japonicum* telah terbentuk dalam tubuh kambing. Selanjutnya bila pada perlakuan pertama antibodi belum terbentuk, maka dilakukan 2 kali penyuntikan booster antigen yang diemulsikan dalam *Frued Adjuvant incomplete* (1:1) secara SC dengan interval tiga minggu. Pemeriksaan AGPT diulang kembali untuk pemeriksaan antibodi. Antibodi yang telah terbentuk selanjutnya dimurnikan dengan menggunakan *purification antibodi kit* (Montage®). Konsentrasi antibodi diukur dengan menggunakan metode Bradford.

### Teknik Pemeriksaan Metode Bradford<sup>15</sup>

Konsentrat Bradford terdiri dari 100 mg *Commassie Brilliant Blue* yang dilarutkan dalam 50 ml etanol 95% dan ditambahkan sebanyak 100 ml asam fosfat 85% (w/v) serta diencerkan dengan aquabides hingga volume larutan mencapai 1 liter kemudian disaring menggunakan kertas saring. Konsentrat Bradford tersebut diencerkan dengan dua kali pengenceran menggunakan aquades dengan perbandingan 1:4 dan 1:9.

Larutan protein *Bovine Serum Albumin* (BSA) standar dibuat dengan perbandingan 1:1 antara *Bovine Serum Albumin* (BSA) dengan aquabides (1 mg dalam 1 ml) kemudian dihomogenkan. Kemudian sebanyak 11 tabung reaksi yang telah disterilisasi disiapkan. Masing-masing tabung diisi dengan larutan BSA dan aquabides (Tabel 1). Masing-masing larutan dihomogenkan dan diambil sebanyak 100  $\mu$ l dari setiap tabung kemudian dimasukkan ke dalam masing-masing tabung baru yang sebelumnya telah dimasukkan 5 ml larutan Bradford sesuai urutan tabung.

Tabel 1. Tata cara pengisian larutan BSA dan Aquabides

Tabung	Larutan BSA	Aquabides
1	0 $\mu$ l	1000 $\mu$ l
2	100 $\mu$ l	900 $\mu$ l
3	200 $\mu$ l	800 $\mu$ l
4	300 $\mu$ l	700 $\mu$ l
5	400 $\mu$ l	600 $\mu$ l
6	500 $\mu$ l	500 $\mu$ l
7	600 $\mu$ l	400 $\mu$ l
8	700 $\mu$ l	300 $\mu$ l
9	800 $\mu$ l	200 $\mu$ l
10	900 $\mu$ l	100 $\mu$ l
11	1000 $\mu$ l	0 $\mu$ l

Larutan protein *Bovine Serum Albumin* (BSA) digunakan untuk membuat grafik konsentrasi protein standar pada spektrofotometer *U 2001*<sup>TM</sup> yang diukur dengan panjang gelombang ( $\lambda$ ) 595 nm sebelum mengukur protein sampel antigen. Masing-masing larutan BSA yang telah ditambahkan aquabides diambil sebanyak 100  $\mu$ l dimasukkan ke dalam 11 tabung baru. Kesebelas tabung baru yang telah terisi 100  $\mu$ l larutan BSA, kemudian ditambahkan dengan larutan Bradford sebanyak 5 ml. 100  $\mu$ l sampel yang akan diperiksa diisikan ke dalam tabung lainnya. Sampel berupa ES cacing yang akan diperiksa dibuat duplo,

### **Laporan akhir penelitian: Untuk kalangan terbatas**

kemudian setiap tabung sampel ditambahkan dengan larutan Bradford sebanyak 5 ml. Tabung yang berisi larutan standart dan sampel dilarutkan hingga homogen dengan menggunakan *fortex*. Pembacaan konsentrasi menggunakan spektrofotometer (*U 2001™*) dengan panjang gelombang ( $\lambda$ ) 595 nm.

### **Teknik Agar Gel Precipitation Test (AGPT)<sup>17</sup>**

*Agar Gel Precipitation Test* (AGPT) merupakan uji presipitasi antigen yang terlarut. Bahan untuk AGPT terdiri atas *Phosphate Buffer Saline* (PBS) dengan pH 7.4, aquabides, *agarose* 1%, dan *Na citrate* 0.001%. Campuran tersebut dipanaskan dalam *microwave* atau dengan penangas air sampai agar larut dan mendidih. Sebanyak 4 ml larutan agar dituang diatas gelas objek hingga seluruh permukaan gelas objek tertutup dengan agar dan dibiarkan hingga mengeras. Agar yang telah mengeras, dilubangi menggunakan *puncher* agar. Lubang pada bagian tengah diisi dengan antigen yang telah disonikasi dan enam lubang disekelilingnya diisi dengan serum antibodi yang akan diuji. Agar disimpan di dalam wadah tertutup yang telah dialasi dengan kertas atau tissue basah untuk menjaga kelembaban dan didiamkan selama 24 hingga 48 jam pada suhu ruang. Setelah 24 hingga 48 jam pengamatan dapat dilakukan dengan melihat ada-tidaknya garis presipitasi yang terbentuk.

### **Pemurnian Immunoglobulin G (Ig G)**

Pemurnian IgG dilakukan menggunakan *Montage® Antibody Purification Kit and Spin Columns with PROSEP®-A Media*. Media *PROSEP®-A* yang digunakan dipre-ekuilibrasikan menggunakan 10 ml *Binding Buffer A* dengan mensentrifus *spin column* dengan kecepatan 500 x g selama 30 menit pada suhu 4°C. Sampel berupa serum kelinci anti *Fasciola gigantica* kerbau dan domba disaring menggunakan 0.2  $\mu$ m *Steriflip-GP filter*. Kemudian sebanyak 10 ml serum yang telah difiltrasi ditambahkan dengan 10 ml *Binding Buffer A* (perbandingan 1:1 v/v) yang disentrifus dengan kecepatan 500 x g selama 30 menit pada suhu 4°C. Setelah 30 menit, supernatan didasar tabung dibuang kemudian *spin column* dibilas menggunakan 20 ml *Binding Buffer A* yang disentrifus dengan kecepatan 500 x g selama 30 menit pada suhu 4°C untuk menghilangkan kontaminan yang tidak terikat. Setelah itu, sebanyak 10 ml *Elution Buffer B2* ditambahkan langsung kedalam *spin column* dalam tabung steril baru yang telah diisi 1.3 ml *Neutralization Buffer C* yang disentrifus dengan kecepatan 4500 x g selama 40 menit pada suhu 4°C. Supernatan didasar tabung yang mengandung Ig G diambil, kemudian

difiltrasi menggunakan Amicon 30.000 yang disentrifus dengan kecepatan  $4500 \times g$  selama 25 menit pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$ . Supernatan berupa IgG yang tertinggal didalam filter disimpan dalam tabung-tabung *mikrotube* volume 1.5 ml, disimpan dalam suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **Tahap 3 Optimasi ELISA**

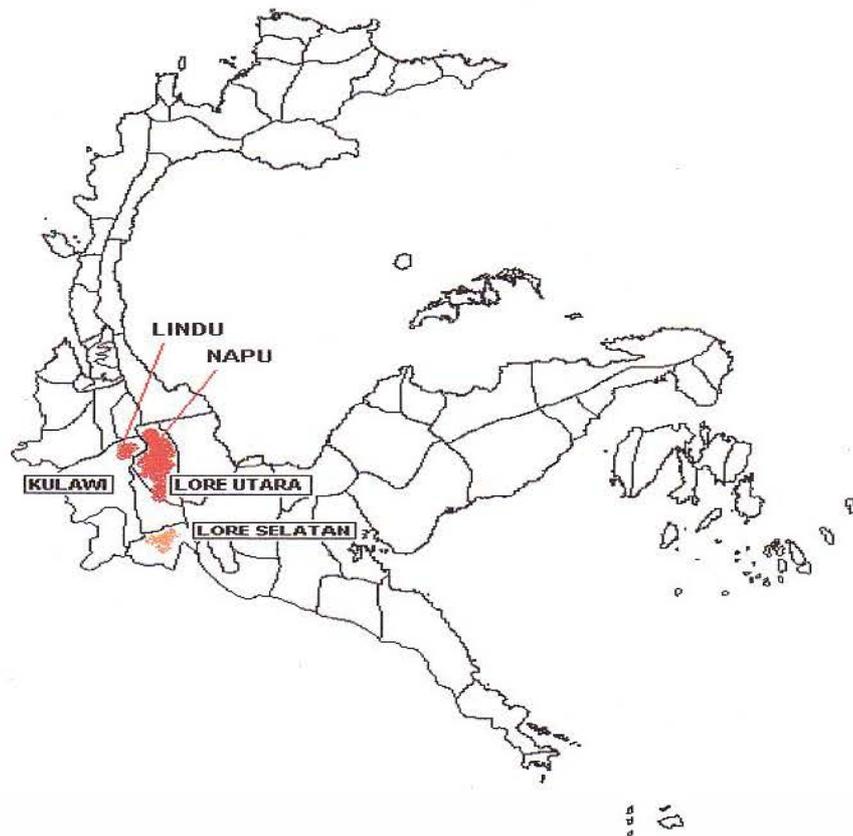
#### **Uji Optimasi *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)**

Untuk optimasi uji ELISA seperti yang dilakukan oleh Estuningsih (2006)<sup>18</sup>, yang dimodifikasi. Penentuan konformasi dan konsentrasi dilakukan dengan cara AgES sebagai antigen *capture* dicoatingkan dalam NUNC dalam beberapa konsentrasi pengenceran 1:100, 1:500, dan 1:1000. Inkubasi dilakukan selama semalam, pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$ , setelah dicuci sebanyak tiga kali dengan PBS Tween 20 dan sekali dengan PBS diblocking menggunakan BSA 0,2%. Mikroplate diinkubasi selama satu jam pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$ . Selanjutnya setelah dicuci seperti langkah pertama, titrasi dilakukan terhadap sampel IgG anti ES *S.japonicum* yaitu 1/500, dan 1/1000 inkubasi kembali selama satu jam pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$ . Cuci kembali lalu konjugate anti *goat* yang telah dikonjugasi dengan enzim peroksidase dimasukkan sebanyak  $100 \mu\text{l @ well}$ , larutan diinkubasi kembali dengan waktu dan suhu yang sama. Substrat dimasukkan setelah *mikroplate* dicuci seperti langkah sebelumnya. Substrat digunakan untuk mendapatkan perubahan warna, nilai absorbansi dibaca dengan menggunakan ELISA reader. Setiap sampel dibuat duplo serta dibuatkan control negatif yaitu dari PBS untuk mendapatkan konformasi terbaik dengan menghitung nilai terjauh rata-rata nilai absorbansi positif dari nilai rata-rata nilai absorbansi negatif. Pada optimasi uji ini dilakukan pula urutan kegiatan yang sama pada pendeteksian AgES dalam serum positif dari penderita pengenceran 20 kali, dengan coating IgG pengenceran 1:500, dan 1:1000. Nilai absorbansi sampel adalah nilai absorbansi yang diperoleh dari hasil pembacaan ELISA Reader. Nilai *cut off* dihitung dari rata-rata nilai absorbansi sampel *blank* (PBS) negatif schistosomiasis. Tujuannya adalah untuk melihat berapa batas dari nilai absorbansi sampel dinyatakan sebagai negatif schistosomiasis, dan batasan nilai absorbansi dari sampel yang dinyatakan sebagai positif schistosomiasis.

## 6. HASIL PENELITIAN

### 6.1 Gambaran Umum Lokasi Penelitian

Dataran tinggi Napu – Besoa, merupakan dataran tinggi yang terletak arah tenggara Kota Palu kurang lebih 150 km pada titik koordinat  $01^{\circ} 26' 23''$  LS dan  $120^{\circ} 20' 09''$  BT. Dataran ini merupakan suatu daerah dengan topografi berbukit-bukit dan berlembah. Dataran tinggi Napu terkenal karena kesuburan tanahnya, banyak sayuran dan buah-buahan yang dihasilkan dari daerah ini. Penggunaan lahan di Dataran Tinggi Napu selain pemukiman merupakan lahan pertanian sayuran, perkebunan coklat, tegalan/tanah lading, sawah irigasi, padang rumput dan hutan. Secara administrasi Dataran Tinggi Napu terdiri dari Kecamatan Lore Utara, Lore Timur dan Lore Piore, sedangkan Dataran Tinggi Besoa merupakan wilayah dari Kecamatan Lore Tengah. Dataran tinggi Napu – Besoa ini masuk dalam wilayah Kabupaten Poso.



Gambar 1. Peta lokasi Penelitian

Pembagian administrasi masing-masing kecamatan di Dataran Tinggi Napi-Besoa sebagai berikut :

- Kecamatan Lore Utara terdiri dari Desa Sedoa, Watumaeta, Alitupu, Wuasa, Kaduwaa, dan Bumi Banyusari.
- Kecamatan Lore Timur terdiri dari Desa Talabosa, Betue, Watutau, Siliwanga dan Wanga.
- Kecamatan Lore Tengah terdiri dari Desa Torire, Rompo, Baliura, Katu, Lempe, Hanggira, Doda dan Bariri.<sup>19</sup>

Lembah Napu adalah Dataran Tinggi Sulawesi Tengah yaitu kurang lebih 1200 meter dari permukaan laut, dikelilingi oleh pegunungan sehingga bentuknya seperti kuali besar. Di tengahnya mengalir sungai Lariang yang berhulu di Tawaelia (Desa Sedoa), dan bermuara di Selat Makassar Mamuju Sulawesi Selatan. Semua sungai dan anak sungai Lembah Napu bermuara di sungai Lariang, sehingga sungai ini makin ke Selatan semakin besar dan dalam. Dataran lembah Napu sebagian terdiri dari padang rumput, dataran perkampungan dan hutan rimba. Menurut sejarahnya lembah Napu adalah Danau yang luas yang disebut "Rano Raba" yang dikeringkan oleh penduduk asli yang bermukim disekeliling perbukitan berbentuk paguyuban dipimpin oleh seorang yang dituakan "TUANA". Bukti pemukiman mereka hingga saat ini masih tersisa, Rano Raba dikeringkan melalui upacara adat dengan mengalirkan aliran danau di sebelah Selatan desa Torire sekarang, akhirnya menjadi sungai Lariang yang melewati Lore Selatan kemudian bermuara di Mamuju Sulawesi Selatan.<sup>20</sup>

Dataran Tinggi Napu terdiri dari 19 desa, yang merupakan daerah endemis schistosomiasis ada 12 desa diantaranya: Desa Winowanga, Maholo, Mekarsari, Tamadue, Sedoa, Watumaeta, Banyusari, Kaduwaa, Dodolo, Wanga, Betue, dan Torire. Menurut data Dinas Kesehatan Kabupaten Poso tahun 2011, hasil pemeriksaan tinja yang dilakukan pada 10124 jiwa dari 12 desa prevalensi tertinggi masyarakat terinfeksi schistosomiasis yaitu pada desa Mekarsari dan Tamadue. Dalam penelitian ini desa Mekarsari dan desa Tamadue dipilih sebagai lokasi pengambilan sampel tinja dan serum. Penduduk desa Mekarsari terdiri dari 1100 jiwa, jumlah diperiksa 9500 jiwa dan positif schistosomiasis yaitu 66%. Jumlah penduduk desa Tamadue 1093 jiwa, diperiksa tinjanya 723 jiwa dan positif schistosomiasis yaitu 69%. Pekerjaan penduduk desa Mekarsari dan desa Tamadue 90% adalah petani dan selebihnya adalah pedagang dan pegawai.<sup>19</sup>

## 6.2 Survei Tinja Dan Darah

Survey tinja dan darah dilakukan pada daerah endemis tinggi yaitu desa Mekarsari dan desa Tamadue. Dalam penelitian pengembangan metode ELISA ini dibutuhkan sampel serum penderita schistosomiasis untuk mendeteksi AgES. Survei tinja dilakukan untuk memastikan penderita schistosomiasis, yang kemudian dilanjutkan dengan pengambilan darah pada penderita tersebut dengan hasil seperti yang tersaji dalam Tabel 2, berikut. Dalam penelitian ini dilakukan pula pembuatan sediaan darah untuk pemeriksaan filariasis. Jumlah sediaan darah untuk pemeriksaan filariasis, sama dengan jumlah orang yang diambil darahnya untuk pembuatan serum yaitu 27 orang dari 37 yang dinyatakan positif schistosomiasis dari survei tinja. Hasil pemeriksaan specimen filariasis dari masyarakat desa Mekarsari 12 orang dan desa Tamadue 15 orang, yaitu 27 orang menunjukkan hasil negatif mikrofilaria.

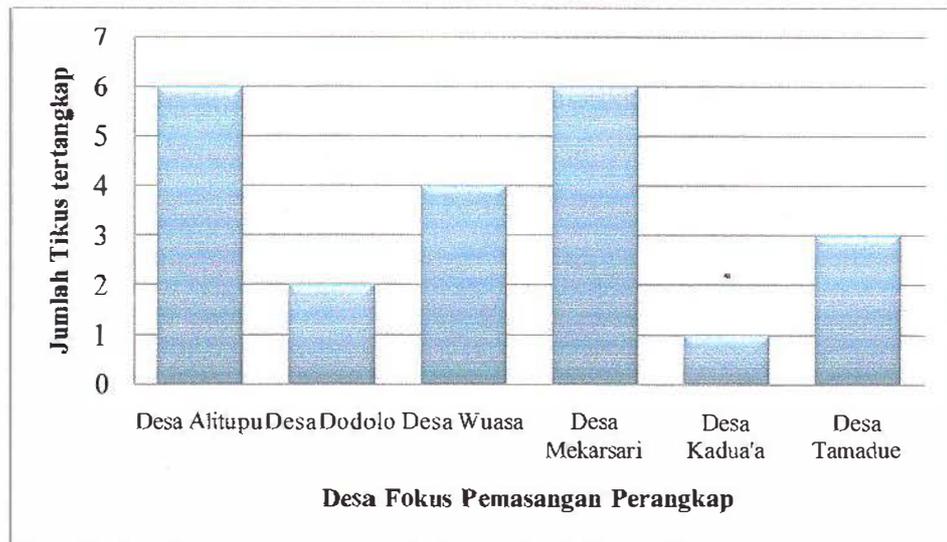
Tabel 2. Hasil Survei Tinja  
Di Desa Mekarsari dan Tamadue Di Napu Tahun 2012

No	Desa	Jumlah diperiksa	$\Sigma$ (+) Tinja (org)	Persentase (%)
1	Mekarsari	610	17	2,8
2	Tamadue	270	20	7,4
	Total	880	37	4,2

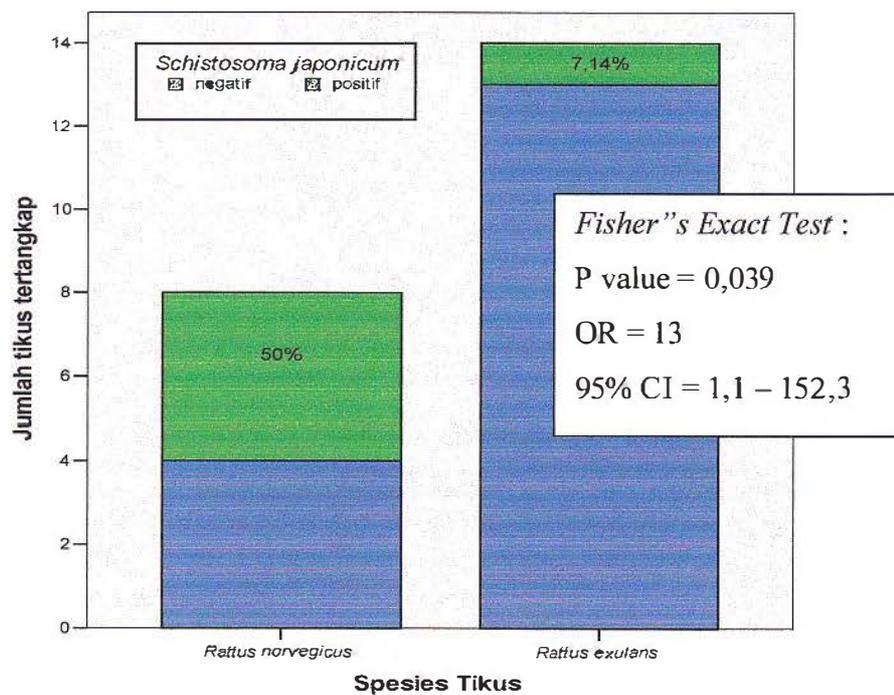
## 6.3 Isolasi, Produksi dan Karakterisasi Antigen ES

### a. Isolasi dan Produksi Antigen ES

Cacing *S. japonicum* dikoleksi dari tikus yang tertangkap di beberapa focus positif di Napu Kabupaten Poso. Dalam penelitian ini proses isolasi cacing *S. japonicum* diawali dengan pemasangan perangkat pada focus-focus positif, yang ada di desa Alitupu, Dodolo, Wuasa, Mekarsari, Kaduwa'a, dan Tamadue. Jumlah tikus yang tertangkap berdasarkan focus dari 22 kali pemasangan di Dataran tinggi Napu, secara rinci seperti yang tersaji dalam Gambar 2. Hasil identifikasi tikus menunjukkan ada dua jenis tikus yang tertangkap yaitu *Rattus exulans* (*R. exulans*) sebanyak 14 ekor dan *Rattus norvegicus* (*R. norvegicus*) sebanyak 8 ekor. Cacing yang dikoleksi dari tikus tersebut mampu menghasilkan antigen ES sebanyak 45,2 ml sebelum pemumian dengan konsentrasi protein 1,351 mg/ml. Tingkat infeksi cacing *S. japonicum* pada tikus setelah dilakukan nekropsi secara keseluruhan adalah 22,7%. Dimana infeksi pada *R. norvegicus* lebih tinggi (50%) dibandingkan dengan *R. exulans* (7,14%) (Gambar 3).



Gambar 2. Jumlah Tikus Tertangkap Berdasarkan Lokasi Fokus Di Dataran Tinggi Napu Tahun 2012



Gambar 3. Persentase Positif Tikus Yang Tertangkap Di Dataran Tinggi Napu Tahun 2012

Langkah antisipasi bila tidak ditemukannya tikus positif dari fokus, maka dalam penelitian ini dilakukan kegiatan infeksi sercricia pada mencit. Infeksi sercricia pada mencit

diawali dengan kegiatan survei keong, untuk menemukan cercaria yang masih hidup dan aktif. Survei keong yang dilakukan adalah menggunakan metode koleksi bebas. Hasil yang diperoleh dari enam focus keong dengan 22 kali dilakukan survei yaitu jumlah keong yang ditemukan 932, dengan persentase jenis kelamin betina 79,08% (737) dan jenis kelamin jantan 20,92% (195). Persentase keong positif dan negatif cercaria yaitu keong negatif cercaria 864 (92,70%) dan keong positif cercaria 68 (7,30%). Keong positif yang mengandung cercaria diinfeksi ke 40 ekor mencit, 18 mencit diinfeksi dengan 2 keong positif cercaria dan 22 ekor mencit lainnya diinfeksi dengan satu keong positif cercaria. Antigen ES hasil mencit infeksi diperoleh sebanyak 85 ml AgES dengan konsentrasi 0.169 mg/ml. Untuk persentase berdasarkan ukuran keong dan jumlah focus yang ditempati dapat dilihat secara rinci pada Tabel 3 dan 4.

Tabel 3. Persentase Keong Terkumpul Berdasarkan Ukuran

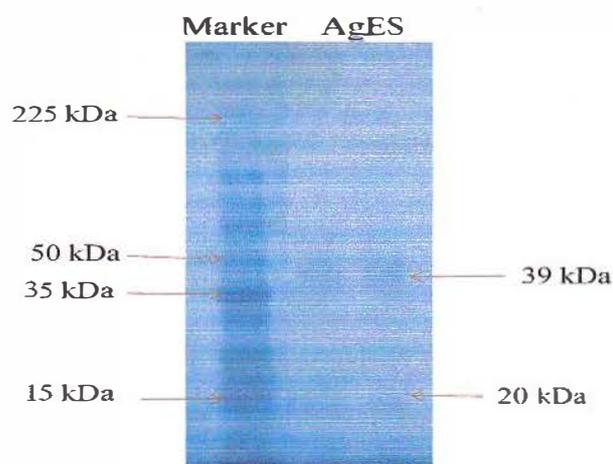
Ukuran (mm)	Jumlah terkoleksi	Persentase (%)
2	41	4.40
3	246	26.39
3.5	1	0.11
4	322	34.55
5	290	31.12
6	28	3.00
7	4	0.43
Total	932	100

Tabel 4. Persentase Koleksi Keong Berdasarkan Daerah Fokus

Nama Fokus	Jumlah dilakukan koleksi	Persentase (%)
Alitupu	6	27.27
Dodolo	2	9.09
Kaduwa'a	1	4.55
Mekarsari	6	27.27
Tamadue	3	13.64
Wuasa	4	18.18
Total	22	100

### b. Karakterisasi Antigen ES

Konsentrasi antigen ES yang dihasilkan diukur dengan menggunakan uji Bradford, konsentrasi yang diperoleh yaitu 1.351 mg/ml. Antigen ES *S. japonicum* dalam penelitian ini, memiliki dua pola pita polipeptida, dengan kisaran berat molekul 20 dan 39 kDa. Profil protein antigen ES yang diproduksi melalui uji elektroforesis menggunakan pewarnaan *Commasie Brilliant Blue* seperti yang disajikan pada Gambar 4. Antigen ES *S. japonicum* yang dihasilkan dalam penelitian ini, digunakan sebagai antigen yang akan menggerakkan sistem imun pada kambing untuk menghasilkan antibodi poliklonal (IgG) serta mendeteksi keberadaan antibodi poliklonal (IgG) dengan uji AGPT. Antigen ES *S. japonicum* tersebut juga digunakan sebagai kontrol positif pada optimasi uji ELISA.



Gambar 4. Profil Protein Antigen ES *S.japonicum*

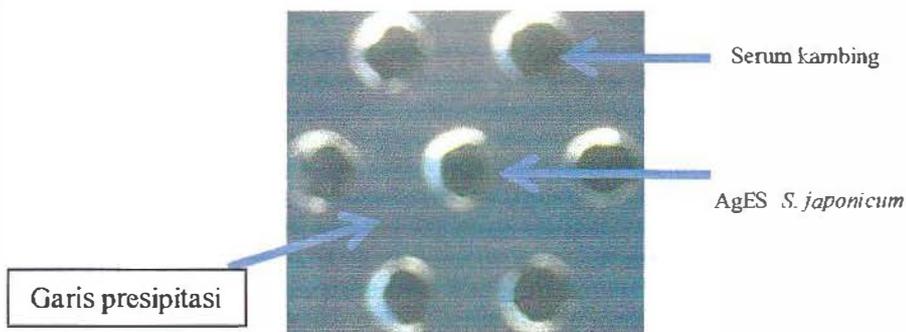
### 6.4 Produksi dan Karakterisasi Antibodi Poliklonal

Berdasarkan pemeriksaan AGPT, kambing yang diimunisasi dengan antigen ES *S. japonicum* menunjukkan adanya pembentukan antibodi terhadap ES *S. japonicum* pada minggu ke - 12 (Tabel 5).

Tabel 5. Pembentukan Antibodi Poliklonal Pada Kambing Perlakuan Berdasarkan Hasil Uji AGPT

Antigen	Minggu														
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<i>ES S. japonicum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

Konsentrasi antibodi yang dihasilkan yaitu 0.931 mg/ml, diukur menggunakan metode Bradford setelah dilakukan pemurnian. Pembentukan antibodi pada kambing perlakuan ditandai dengan adanya garis presipitasi pada media agar semi solid dalam uji AGPT. Pengujian kualitas dilakukan dengan uji AGPT antara AgES dengan serum kambing perlakuan. Garis presipitasi yang terbentuk dari uji AGPT ini seperti yang terlihat pada Gambar 5.



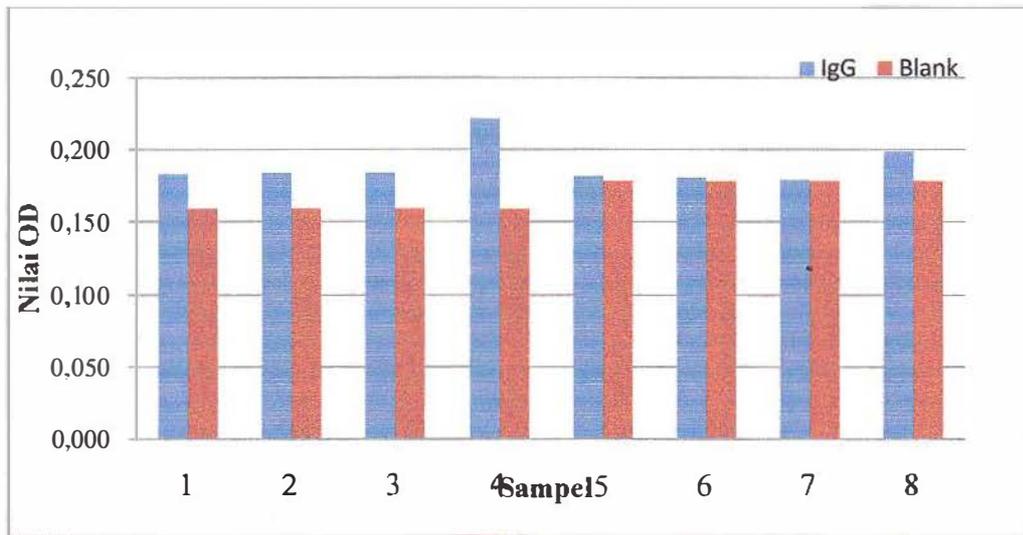
Gambar 5. Hasil Uji AGPT AgES Dengan Serum Kambing

## 6.5 Optimasi Uji ELISA

### a. Coating AgES

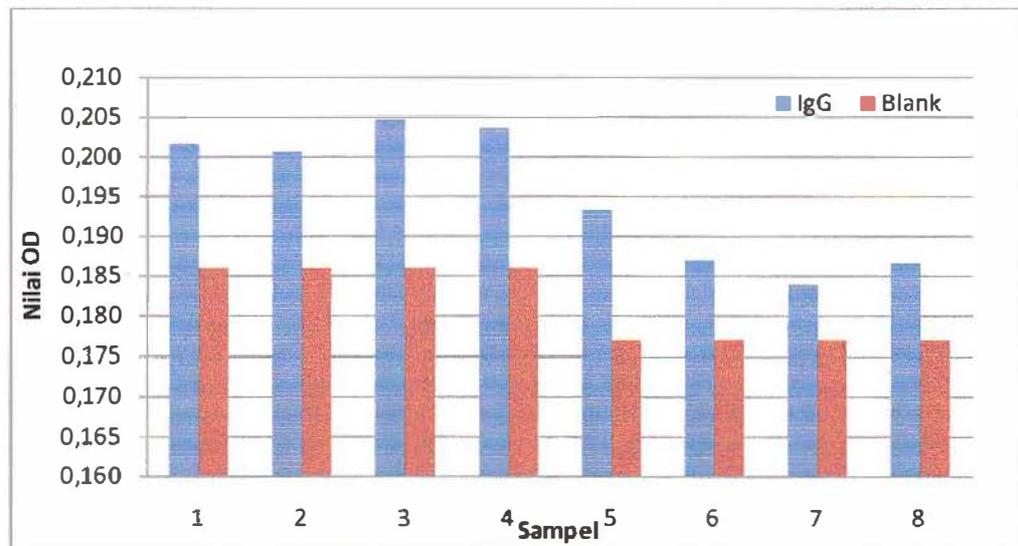
Optimasi uji ELISA penentuan konsentrasi AgES dan IgG dilakukan dengan menggunakan tiga kombinasi konsentrasi. Kombinasi konsentrasi ELISA yang digunakan yaitu Konsentrasi antigen ES yaitu 10, 2, dan 1  $\mu\text{g/ml}$ , dan IgG sebagai antibodi deteksi dengan konsentrasi 2  $\mu\text{g/ml}$  dan 1  $\mu\text{g/ml}$ . Kombinasi yang digunakan antigen ES sebagai penangkap dan IgG sebagai sampel antibodi deteksi. Antigen yang digunakan dalam uji ini adalah ES *S. japonicum* dengan konsentrasi 1351  $\mu\text{g/ml}$ .

Hasil pengujian pada kombinasi konsentrasi AgES 10  $\mu\text{g/ml}$  dengan IgG 2  $\mu\text{g/ml}$ , didapatkan kelipatan nilai absorbansi atau *optical density* (OD) sebesar 1,15-1,4 kali lipat dari nilai absorbansi sampel negatif. Hasil kombinasi konsentrasi AgES 10  $\mu\text{g/ml}$  dengan IgG 1  $\mu\text{g/ml}$ , diperoleh kelipatan nilai absorbansi sebesar 1,0-1,12 kali lipat dari nilai absorbansi sampel negatif ( Gambar 6).



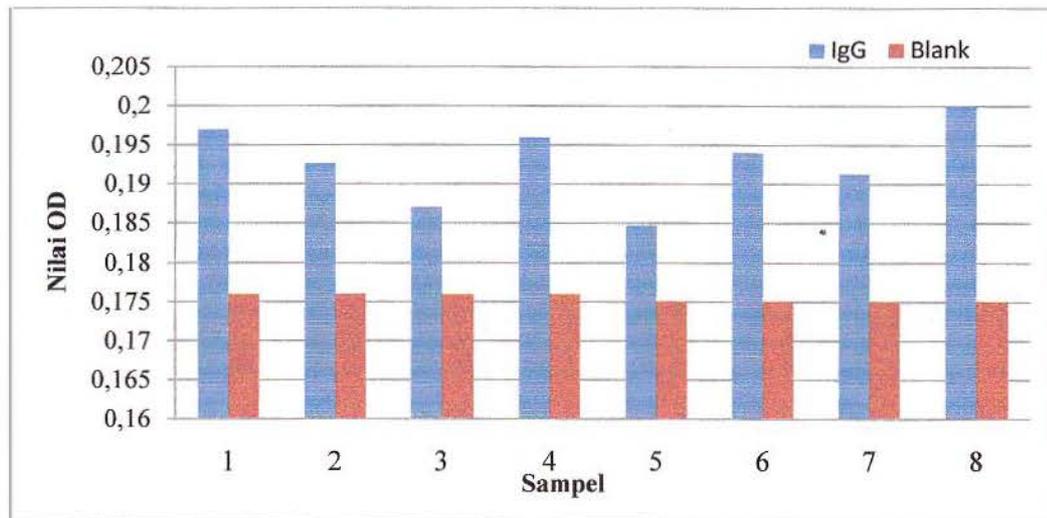
Gambar 6. Hasil Sebaran Optimasi Uji ELISA AgES 10 µg/ml : IgG Sampel (1-4) 2 µg/ml dan AgES 10 µg/ml : Sampel (5-8) 1 µg/ml

Hasil pengujian pada kombinasi AgES 2 µg/ml dengan IgG 2 µg/ml dan AgES 2 µg/ml dengan IgG 1 µg/ml didapatkan kelipatan nilai absorbansi sampel positif sebesar 1,07-1,10 dan 1,03-1,09 kali lipat dari nilai absorbansi sampel negatif ( Gambar 7).



Gambar 7. Hasil Sebaran Optimasi Uji ELISA AgES 2 µg/ml : IgG Sampel (1-4) 2 µg/ml dan AgES 2 µg/ml : Sampel (5-8) 1 µg/ml

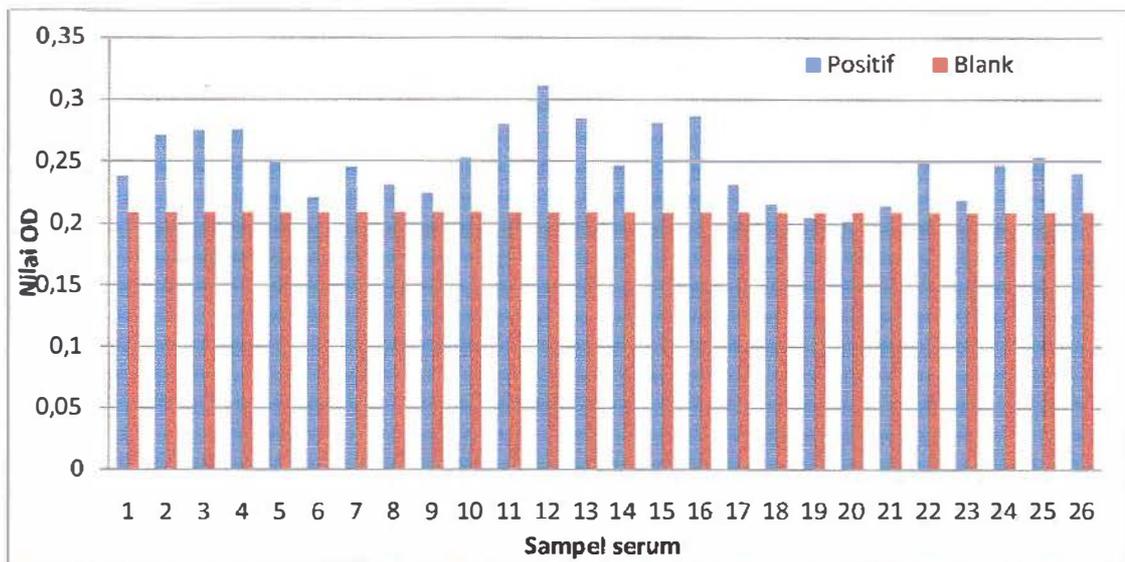
Sedangkan untuk kombinasi konsentrasi AgES 1 µg/ml dengan IgG 2 µg/ml dan AgES 1 µg/ml dengan IgG 1 µg/ml didapatkan kelipatan nilai absorbansi sampel positif sebesar 1,06-1,12 dan 1,05-1,14 kali lipat dari nilai absorbansi sampel negatif ( Gambar 8).



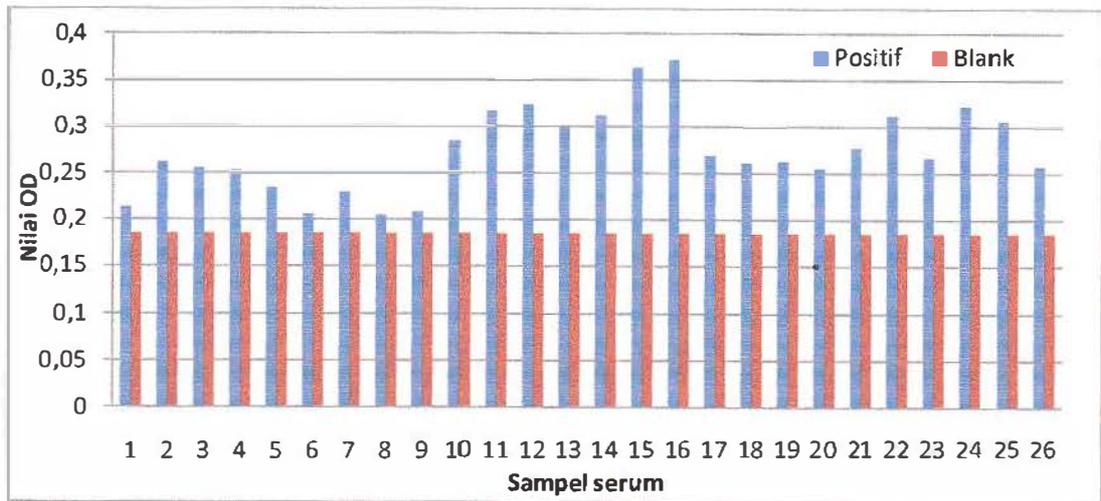
Gambar 8. Hasil Sebaran Optimasi Uji ELISA AgES 1 µg/ml : IgG Sampel (1-4) 2 µg/ml dan AgES 1 µg/ml : Sampel (5-8) 1 µg/ml

**b. Coating Ig G (2 dan 1 µg/ml)**

Setelah dilakukan optimasi uji ELISA pada penentuan konformasi dan konsentrasi dengan coating AgES, maka dilakukan optimasi IgG dengan serum positif pada pengenceran 20 kali. Hasil sebaran nilai absorbansi dari konsentrasi IgG 2 µg/ml dapat dilihat seperti pada Gambar 9, dimana nilai absorbansi serum positif yaitu 0.97 – 1.5 kali dengan nilai OD sampel blank (PBS).



Gambar 9. Sebaran Absorbansi Serum Positif dengan IgG Coating 2 µg/ml

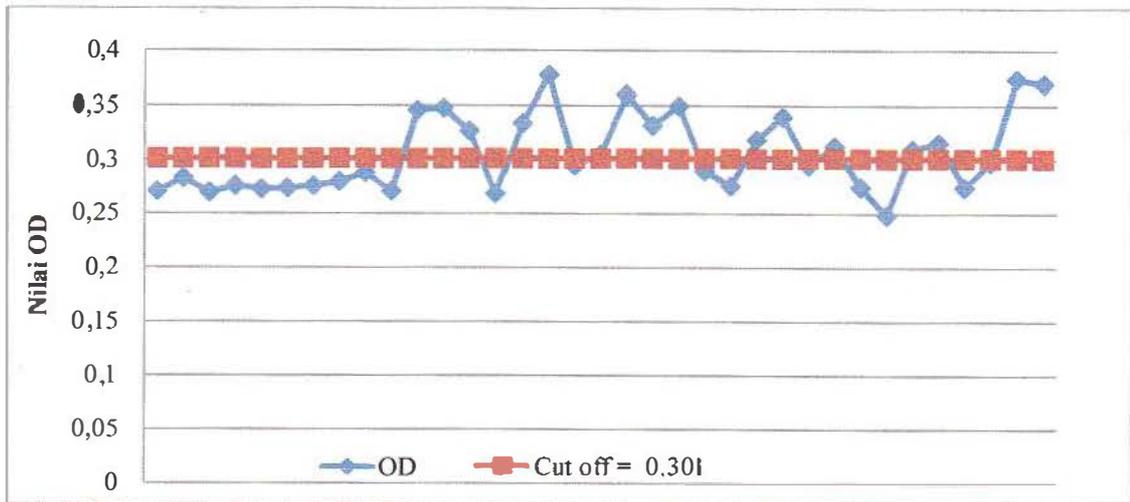


Gambar 10. Sebaran Absorbansi Serum Positif dengan IgG Coating 1 µg/ml

Coating IgG 1µg/ml seperti pada Gambar 10, nilai absorbansi serum positif yaitu 1,1 – 2 kali dari nilai absorbansi sampel negatif / blank .

**c. Optimasi Uji Penentuan Nilai Positif Schistosomiasis**

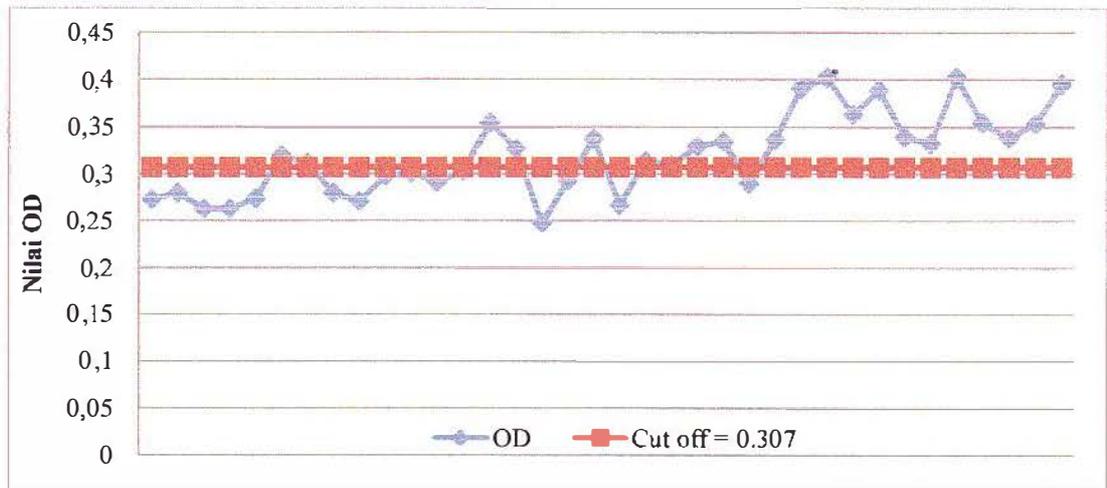
Penentuan nilai absorbansi positif schistosomiasis dilakukan dengan coating IgG dengan dua konsentrasi yaitu 2 µg/ml dan 1 µg/ml. Nilai absorbansi serum negatif pada coating IgG konsentrasi 2 µg/ml, berkisar antara 0.271-0.288 dan nilai absorbansi serum positif yaitu berkisar antara 0.271 – 0.378, dengan nilai cut off 0.301, terlihat seperti pada Gambar 11.



Gambar 11. Hasil Penentuan Nilai Absorbansi Positif Schistosomiasis Pada Konsentrasi IgG Coating 2 µg/ml

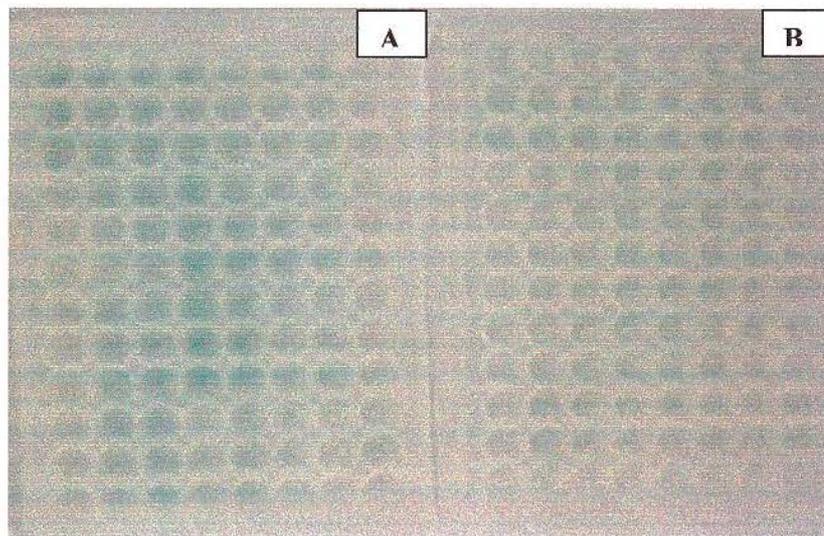
**Laporan akhir penelitian: Untuk kalangan terbatas**

Sebaran nilai absorbansi serum negatif pada coating IgG konsentrasi 1 µg/ml, berkisar antara 0.263-0.32 dan nilai absorbansi serum positif yaitu berkisar antara 0.248 – 0.403, dengan nilai cut off 0.307 seperti pada Gambar 12 berikut.



Gambar 12. Hasil Penentuan Nilai Absorbansi Positif Schistosomiasis Pada Konsentrasi IgG Coating 1 µg/ml

Secara visual hasil dari coating IgG 1 µg/ml kode (A) dengan 2 µg/ml yaitu kode (B), dapat dilihat seperti gambar 13 berikut,



Gambar 13. Perbedaan warna secara visual coating IgG konsentrasi 1 µg/ml dengan 2 µg/ml.

## 7. PEMBAHASAN

### 7.1 Perlakuan Pada Manusia

Perlakuan pada manusia dalam penelitian ini, adalah bertujuan untuk mengoleksi sampel serum positif dari penderita schistosomiasis. Serum yang dikoleksi tersebut adalah digunakan untuk pendeteksian AgES pada tahap uji Optimasi ELISA. Sebelum dilakukan pengambilan darah pada penderita schistosomiasis, maka terlebih dahulu dilakukan pemeriksaan telur dalam tinja masyarakat yang menurut data Dinkes Kesehatan Kabupaten Poso, merupakan daerah endemis. Berdasarkan data Dinkes Kabupaten Poso tahun 2011, dari 12 desa yang telah di survei menunjukkan prevalensi tertinggi yaitu pada desa Mekarsari 66% dan desa Tamadue 69%. Hasil survei tinja yang dilakukan dari 610 jiwa di desa Tamadue diperoleh 17 orang positif telur *S.japonicum*, pada desa Mekarsari jumlah orang yang diperiksa yaitu 270 jiwa dan positif telur *S.japonicum* yaitu 20 orang. Sehingga pengambilan darah dilakukan pada 37 orang, namun karena saat pengambilan darah ada beberapa masyarakat tidak berada ditempat yaitu keluar daerah dan tidak bersedia diambil darahnya, maka hanya dilakukan pada 27 orang saja. Pengambilan darah untuk pembuatan serum pada penderita schistosomiasis dilakukan pada malam hari. Hal ini dilakukan agar sebagian dari darah yang terkoleksi dapat dibuat untuk specimen filariasis. Hasil pemeriksaan filariasis dari penderita schistosomiasis tidak ditemukan microfilaria, ini berarti serum yang dikoleksi untuk pendeteksian AgES *S.japonicum* bukan berasal dari penderita yang menderita komplikasi antara filariasis dan schistosomiasis. Dimana diketahui bahwa cacing filaria dan cacing *S.japonicum* merupakan cacing *Trematoda* darah, sehingga jika ada responden yang menderita komplikasi kemungkinan dalam tahap pendeteksian AgES terjadi cross reaksi.

### 7.2 Perlakuan Pada Hewan

#### A. Isolasi, Produksi dan Karakterisasi AgES

Isolasi cacing *S.japonicum* dilakukan untuk memproduksi AgES yang merupakan imunogen untuk pembentukan antibodi poliklonal pada kambing perlakuan. Dalam penelitian ini dilakukan dua cara untuk mendapatkan cacing *S.japonicum*, yaitu dengan cara melakukan survei tikus pada daerah focus dan melakukan survei keong. Survei tikus dilakukan pada 22 titik focus di enam desa diperoleh dua spesies tikus yaitu *R. norvegicus* (Berkenhout) dan *R. exulans* (Peale). Spesies ini juga pernah dilaporkan tertangkap di danau Lindu dan Bada yang

*Laporan akhir penelitian: Untuk kalangan terbatas*

merupakan daerah endemis schistosomiasis di Sulawesi Tengah<sup>(21, 22)</sup>. Jumlah tikus yang tertangkap relatif sedikit, kemungkinan disebabkan oleh pemasangan perangkap dilakukan pada musim hujan. Infeksi *S. japonicum* pada tikus liar yang tertangkap 22,7%, angka ini lebih tinggi dibandingkan dengan beberapa hasil pemeriksaan yang pernah dilakukan sebelumnya di Dataran Tinggi Napu maupun di Lindu<sup>(23,24)</sup>. Namun survei yang pernah dilakukan oleh Loka Litbang P2B2 Donggala (sekarang Balai Litbang P2B2 Donggala) pernah menemukan tingkat infeksi yang lebih tinggi yaitu mencapai 55,56% di Lindu dan 37,5% di Napu<sup>(21)</sup>.

Tingkat infeksi dari tikus yang tertangkap yaitu 22,17%, dan berdasarkan spesies maka 50% positif terinfeksi schistosomiasis pada spesies *R. norvegicus* dan hanya 7.14% positif schistosomiasis pada spesies *R. exulans*. Untuk melihat apakah ada hubungan antara spesies tikus dengan infeksi schistosomiasis maka dilakukan uji analisis dengan *fisher's exact*. Hasilnya menunjukkan bahwa ada hubungan antara keduanya ( $p$  value < 0,05). Hal ini menunjukkan bahwa tikus liar jenis *R. norvegicus*. lebih besar kemungkinan untuk terinfeksi *S. japonicum* dibandingkan dengan *R. exulans*. Hasil uji dengan *Fisher exact test* yang menunjukkan ada hubungan antara keduanya, namun nilai CI (Confident Interval) sangat lebar sehingga hubungan yang nampak antara **keduanya** kemungkinan hanya *chance* (kebetulan), hal ini dapat diakibatkan oleh jumlah tikus yang tertangkap pada penelitian ini relative sedikit. Namun bila dikaitkan dengan perilaku tikus dan keberadaan *sercaria* pada aliran air, maka *R. norvegicus* lebih besar kemungkinan untuk terinfeksi *Schistosoma japonicum* dibandingkan dengan *R. exulans*. Infeksi dapat terjadi **diakibatkan** tikus **kontak dengan air** yang infeksi (mengandung *sercaria*)<sup>(25, 26)</sup>.

Survei keong dilakukan untuk mendapatkan *sercaria* hidup dan aktif guna menginfeksi mencit. Survei keong dilakukan sebanyak 22 kali, hasil ditemukan 932 keong dengan ukuran 2-7 mm. Hasil crassing diperoleh 68 keong positif *sercaria*. Rata-rata keong mengandung *sercaria* berukuran 3-5 mm, sedangkan ukuran keong terbanyak ditemukan yaitu 4 mm atau 322 (34.55%). Kegiatan ini dilakukan karena mengantisipasi keterbatasan ditemukannya tikus positif dilapangan. Penginfeksian *sercaria* pada mencit dilakukan pada 40 ekor mencit, 18 ekor mencit diinfeksi dengan dua ekor keong positif dan 22 ekor mencit diinfeksi dengan satu ekor keong positif *sercaria*. Mencit yang terinfeksi dipelihara hingga 30-40 hari sebelum dibedah. Hasil isolasi cacing dari infeksi *sercaria* pada 22 mencit yang dipelihara selama 30

hari kemudian dibedah yaitu berupa cacing muda, sedangkan pada mencit yang dipelihara selama 40 hari sebelum pembedahan diperoleh cacing *S. japonicum* yang telah dewasa. Jumlah AgES yang diproduksi dari mencit yang diinfeksi sercaria yaitu sebanyak 85 ml AgES.

AgES yang dihasilkan dari lima ekor tikus positif yang tertangkap di daerah focus adalah sebanyak 45,2 ml. AgES yang dihasilkan dari tikus lapang ini kemudian dipekatkan dan dimurnikan, sehingga dari 45,2 ml diperoleh hanya 5 ml AgES murni, dengan konsentrasi sebesar 1.351 mg/ml melalui uji Bradford. Konsentrasi AgES dari hasil infeksi sercaria ke mencit yaitu 0,169 mg/ml, AgES yang dihasilkan sebanyak 85 ml sebelum pemurnian. Konsentrasi AgES hasil infeksi lebih rendah dari pada AgES tikus lapang, hal ini disebabkan karena cacing yang diisolasi dari mencit terinfeksi masih merupakan cacing muda (belum dewasa), terutama mencit yang hanya dipelihara selama 30 hari setelah infeksi. Berdasarkan penelitian terdahulu bahwa waktu yang dibutuhkan untuk cacing dewasa, setelah infeksi yaitu 40-60 hari.<sup>1</sup> AgES merupakan hasil dari metabolisme cacing yang sebagian besar adalah protein. Protein merupakan antigen yang terbaik karena ukuran dan kerumitan strukturnya.<sup>27</sup>

Konsentrasi protein ES *S. japonicum* yang dihasilkan 1351 µg/ml memiliki konsentrasi cukup sebagai antigen. Persyaratan sebuah antigen yang baik agar dapat menginduksi antibodi berkisar antara 50-1000 µg/ml. Berdasarkan persyaratan konsentrasi tersebut maka antigen ES *S. japonicum* yang dihasilkan termasuk dalam antigen yang baik digunakan untuk menginduksi antibodi. Berdasarkan kualitas antigen yang dihasilkan, konsentrasi AgES dari tikus lapang yaitu 1,351 mg/ml digunakan sebagai imunogen yang akan menggerakkan system imun kambing percobaan dengan konsentrasi 200 µl perinjeksi. Antigen dapat berupa polisakarida, protein, lemak, asam inti atau lipopolisakarida, maupun lipoprotein.<sup>27</sup> Ciri pokok antigenisitas suatu bahan atau senyawa ditentukan dari limitasi fisikokimiawi serta derajat keasingan.<sup>28</sup> Limitasi fisikokimiawi berupa ukuran molekul yaitu besar, kaku, struktur kimia kompleks, sedangkan derajat keasingan adalah derajat suseptibilitas antigen di dalam tubuh.<sup>29</sup> Substansi antigenik dihasilkan oleh hewan, tumbuhan, serta cacing parasit tidak hanya terkandung dalam jaringan tubuh, namun juga terdapat dalam hasil metabolisme berupa Ekskretori/Sekretori (E/S) baik berasal dari hewan, tanaman, maupun cacing parasit.<sup>30</sup> Substansi antigenik yang berupa enzim merupakan imunogen utama yang diperoleh dari E/S telur *Schistosoma mansoni*.<sup>31</sup>

Profil protein AgES yang dihasilkan dalam penelitian ini, melalui uji elektroforesis menggunakan pewarnaan *Commassie Brilliant Blue*, menunjukkan dua pola pita protein yaitu 39 kDa dan 20 kDa (Gambar 3). Pola pita protein yang dihasilkan memiliki berat molekul, warna dan ketebalan berbeda, dimana kemampuan deteksi dari pewarna yang digunakan, konsentrasi pewarnaan serta pH berpengaruh terhadap keragaman pola protein, baik jumlah, intensitas, warna, ketebalan, maupun berat molekul dari setiap fraksi yang terpisah.<sup>32</sup> Sedikitnya fraksi yang terpisah dapat pula disebabkan oleh degradasi protein selama homogenisasi atau sewaktu ekstraksi.<sup>33</sup> Profil protein ES yang dihasilkan dari spesies cacing yang sama, dan inangnya pun spesiesnya sama, tetapi berasal dari geografis berbeda dapat menghasilkan protein yang berbeda.<sup>34</sup> Perbedaan profil protein ES cacing dipengaruhi oleh berbagai hal seperti teknik isolasi, analisa dan spesies parasit, spesies inang serta geografi asal inang.<sup>35</sup> Hampir semua protein yang berat molekulnya lebih besar dari 8000 dalton bersifat antigenik.<sup>27</sup> Berdasarkan penelitian Guyton *et al*, AgES yang diproduksi dalam penelitian ini dengan berat molekul 39 dan 20 kDa, mempunyai sifat antigenik yang mampu menginduksi antibodi.

#### **B. Produksi dan Karakterisasi antibodi**

Antibodi poliklonal asal kambing terbentuk setelah minggu ke 12, imunisasi dengan AgES *S. japonicum* (Tabel 5). Garis presipitasi yang belum tampak pada pengujian serum kambing pada minggu pertama hingga minggu kesebelas, disebabkan oleh konsentrasi antibodi dalam serum darah kambing belum dapat dideteksi melalui AGPT. Pembentukan antibodi dapat bervariasi dan tergantung pada imunogenitas, bentuk, stabilitas stimulant, spesies hewan, rute injeksi, serta sensitivitas uji yang digunakan untuk mendeteksi antibodi.<sup>36</sup> Konsentrasi antibodi terendah mampu dideteksi menggunakan uji AGPT adalah 30 µg/ml,<sup>28</sup> sedangkan menurut Kuby antibodi minimal dalam serum yang dapat dideteksi oleh uji AGPT sebesar 20 µg/ml.<sup>29</sup>

Antibodi yang diproduksi secara visual dilakukan melalui uji kualitas metode AGPT (Gambar 4). Presipitasi yang terbentuk mulai hitungan menit hingga jam terlihat sebagai suatu garis opa dalam suatu media agar semisolid. Garis opa yang terbentuk disebut sebagai garis presipitasi.<sup>37</sup> Jumlah antibodi minimal yang dapat dideteksi pada uji AGPT yaitu 30 µg/ml antibodi. AGPT dapat digunakan untuk mendeteksi antigen yang berbeda dengan satu jenis

antibodi ataupun antibodi yang berbeda dengan satu jenis antigen yang terdapat pada sampel serum.<sup>37</sup> Garis presipitasi yang terbentuk merupakan bukti bahwa antibodi yang terdapat dalam serum darah kambing adalah antibodi poliklonal. Antibodi poliklonal merupakan antibodi hasil hiperimunisasi atau imunisasi yang dilakukan secara sengaja terhadap hewan dengan suatu imunogen yang spesifik.<sup>(36,37)</sup> Antibodi poliklonal merupakan kumpulan berbagai klon antibodi yang memiliki spesifisitas, afinitas, dan isotope yang berbeda.

Konsentrasi antibodi poliklonal yang dihasilkan yaitu 0,931 mg/ml akan digunakan pada tahap optimasi uji ELISA, sebagai sampel positif dan antibodi *capture* pada penentuan konsentrasi dan konformasi model dalam penelitian ini. Konsentrasi protein yang baik dalam pendeteksian uji ELISA yaitu berkisar antara 1-10 mg/ml.<sup>38</sup>

### **7.3 Optimasi Uji ELISA**

#### **a. Coating AgES**

Tahap optimasi uji ELISA adalah merupakan tahap pengujian dari beberapa konsentrasi yang digunakan dalam menentukan konformasi AgES dan IgG yang akan digunakan dalam pendeteksian AgES dalam serum penderita. Tahap awal optimasi uji ELISA dengan coating AgES, adalah untuk melihat besaran nilai *optical density* atau absorbansi dari IgG. Besaran nilai ansorbansi dari IgG, merupakan dasar konsentrasi yang akan digunakan dalam pendeteksian adalah AgES *S. japonicum* yang terkandung dalam serum masyarakat daerah schistosomiasis. Konsentrasi AgES yang digunakan untuk coating terbagi atas tiga konsentrasi, yaitu : 10 µg/ml, 2 µg/ml, dan 1 µg/ml. Kecocokan keterikatan antara AgES yang di coating dengan IgG yang ditangkap, dilihat pada konsentrasi dua dan satu µg/ml melalui nilai absorbansi. Konsentrasi AgES 10 µg/ml : 2 µg/ml IgG diperoleh nilai absorbansi berkisar antara 0.183-0.222, dengan nilai kelipatan 1.15-1.4 kali lipat dari nilai sampel negatif. Konsentrasi AgES 10 µg/ml : 1 µg/ml IgG diperoleh nilai absorbansi berkisar antara 0.179-0.199, dengan nilai kelipatan 1.0-1.12 kali lipat dari nilai sampel negatif. Konsentrasi AgES 2 µg/ml : 2 µg/ml IgG diperoleh nilai absorbansi berkisar antara 0.201-0.205, dengan nilai kelipatan 1.07-1.10 kali lipat dari nilai sampel negatif. Konsentrasi AgES 2 µg/ml : 1 µg/ml IgG diperoleh nilai absorbansi berkisar antara 0.184-0.193, dengan nilai kelipatan 1.03-1.09 kali lipat dari nilai sampel negatif. Konsentrasi AgES 1 µg/ml : 2 µg/ml IgG diperoleh nilai absorbansi berkisar antara 0.187-0.197, dengan nilai kelipatan 1.06-1.12 kali lipat dari nilai

sampel negatif. Konsentrasi AgES 1 µg/ml : 1 µg/ml IgG diperoleh nilai absorbansi berkisar antara 0.185-0.2, dengan nilai kelipatan 1.05-1.2 kali lipat dari nilai sampel negatif. Berdasarkan nilai absorbansi IgG dari delapan kombinasi konsentrasi yang digunakan, diperoleh nilai absorbansi IgG tertinggi sebesar 0.222 pada kombinasi 10 : 2, dengan nilai kelipatan 1,4 kali lipat dari nilai absorbansi sampel negatif. Hal ini juga terlihat pada kombinasi konsentrasi 1: 1, nilai absorbansi 0.2 dengan nilai kelipatan 1,2 kali lipat dengan nilai absorbansi sampel negatif. Hasil optimasi uji ELISA dengan coating AgES ini memperlihatkan bahwa pada konsentrasi 10, 2, dan 1 µg/ml dapat mengikat IgG pada konsentrasi 2 dan 1 µg/ml dengan kelipatan 1.2 hingga 1.5 kali dengan sampel negatif. Hal serupa telah dilakukan pada pengembangan diagnostic tahun 1992 di China dengan hasil 10<sup>(-9)</sup> g/ml dapat mendeksi *circulating* antigen pada penderita schistosomiasis.<sup>39</sup>

#### **b. Coating IgG**

Berdasarkan hasil optimasi uji pada coating AgES yaitu diperoleh nilai kelipatan IgG 1.2-1.5 kali lipat dari nilai absorbansi sampel negatif, maka dilakukan optimasi pada IgG dengan konsentrasi 2 dan 1 µg/ml. coating IgG pada perlakuan ini dikombinasikan dengan serum positif penderita schistosomiasis dengan 20 kali pengenceran. Hasil diperoleh pada konsentrasi IgG 2 µg/ml, yaitu dengan nilai kelipatan 0.97-1.5 kali lipat dengan nilai sampel negatif (Gambar 8). Pada konsentrasi IgG 1 µg/ml, diperoleh nilai kelipatan sebesar 1.1-2 kali lipat dari nilai sampel negatif (Gambar 9). Secara visual juga terlihat perbedaan warna antara konsentrasi IgG 2 µg/ml dengan 1 µg/ml pada pengikatan AgES dalam serum penderita schistosomiasis. Pada konsentrasi 1 µg/ml terlihat visualisasi warna biru yang terjadi lebih pekat dibandingkan dengan pengikatan AgES pada konsentrasi 2 µg/ml IgG coating seperti terlihat pada Gambar 13.

Semakin kecil konsentrasi IgG yang digunakan dalam pengikatan AgES *S. japonicum* dalam dalam darah penderita mengindikasikan akan semakin sensitif model yang dikembangkan.<sup>39</sup> Pendeteksian secara imunologi telah dikembangkan dan diaplikasikan sejak tahun 1960 an di China, namun karena banyaknya hambatan dan variasi sensitifitas yang ditemukan sehingga model pendeteksian terus dikembangkan, salah satu hambatannya adalah terjadinya cross reaksi.<sup>40</sup> Dalam penelitian ini, untuk menghindari terjadinya cross reaksi yang berdampak pada hasil yaitu false positif, maka semua darah sebagai sampel dilakukan

pemeriksaan filariasis. Hasil dari pemeriksaan secara mikroskopis tidak diperoleh microfilaria dalam darah penderita schistosomiasis. Pemeriksaan kecacingan secara lengkap pada masyarakat yang digunakan darahnya sebagai sampel pada penelitian ini tidak dilakukan, namun menurut penelitian tahun 2011 di Chagsha China oleh Xu *et al*, bahwa cross reaksi yang disebabkan oleh *Nematoda* sangat rendah yaitu berkisar antara 0-20%.<sup>41</sup>

**c. Penentuan Nilai Absorbansi Positif Schistosomiasis**

Optimasi uji ELISA untuk menentukan nilai absorbansi positif dan negatif schistosomiasis, dilakukan dengan membandingkan serum positif dan serum negatif schistosomiasis dengan nilai absorbansi PBS. Optimasi yang dilakukan dalam penelitian ini menggunakan dua konsentrasi IgG capture yaitu 2 µg/ml dan 1 µg/ml. Nilai absorbansi yang diperoleh dari optimasi IgG 2 µg/ml pada serum negatif, berkisar antara 0.271-0.288, dan nilai absorbansi pada serum positif berkisar antara 0.271-0.378 dengan cut off 0.301 (Gambar 10). Pada konsentrasi 2 µg/ml ada sekitar 38% sampel serum positif yang berada dibawah nilai cut off dalam hal ini zone negatif, sehingga perlu optimasi dan melakukan perbandingan dengan hasil mikroskopis untuk mendapatkan konformasi model yang optimal. Nilai absorbansi yang diperoleh dari optimasi IgG 1 µg/ml pada serum negatif, berkisar antara 0.263-0.32, dan nilai absorbansi pada serum positif berkisar antara 0.248-0.403 dengan cut off 0.307 (Gambar 11). Pada konsentrasi 1 µg/ml ada sekitar 19% sampel serum positif yang berada dibawah nilai cut off dalam hal ini zone negatif, sedangkan untuk serum negatif 100% dibawah nilai cut off.

Berdasarkan hasil dari dua konsentrasi yang digunakan dalam optimasi penentuan nilai absorbansi positif dan negatif, maka dalam penelitian tahap pertama pengembangan metode ELISA untuk mendeteksi ekskretori-sekretori *S. japonicum* pada penderita schistosomiasis, diperoleh konformasi optimal yaitu IgG 1 µg/ml dengan serum penderita 20 kali pengenceran. Dalam hal penentuan model sangat membutuhkan banyak ulangan dan pengamatan pada aspek yang dapat menjadi penghambat.<sup>40</sup>

## 8. KESIMPULAN DAN SARAN

### 8.1 Kesimpulan

1. Konsentrasi antigen yang digunakan dalam optimasi uji ELISA adalah 10 µg/ml, 2 µg/ml, dan 1 µg/ml dengan berat molekul 39 kDa dan 20 kDa, sedangkan konsentrasi antibodi yang digunakan adalah 2 µg/ml dan 1 µg/ml. Konsentrasi antigen ES dan antibodi yang terbaik diperoleh dari optimasi uji ELISA yaitu 10: 2 (µg/ml).
2. Konformasi optimal yang diperoleh dari optimalisasi yaitu pada antibodi 1 µg/ml sebagai *capture* mampu mendeteksi AgES dalam serum penderita dengan pengenceran 20 kali.

### 8.2 Saran

1. Perlu penelitian lanjutan untuk mendapatkan sensitifitas dan spesifisitas agar dapat menjadi acuan dalam pembuatan diagnostik cepat untuk pendeteksian schistosomiasis.
2. Sebaiknya dalam penemuan penderita schistosomiasis, program kesehatan menggunakan metode immunodiagnosis melalui uji ELISA agar penderita schistosomiasis dapat terdeteksi lebih dini.

## 9. UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dapat terlaksana berkat dukungan Dana dari Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Kemenkes R.I tahun anggaran 2012. Dalam kesempatan ini, kami mengucapkan terima kasih kepada Kepala Badan Litbang Kesehatan, Ketua PPI Pusat Teknologi Kesehatan Masyarakat, Badan Litbang Kesehatan serta Kepala Balai Litbang P2B2 Donggala atas disetujuinya usulan penelitian ini.

Kami juga mengucapkan terima kasih kepada Pemerintah Daerah Propinsi Sulawesi Tengah, Pemda Kabupaten Poso, Dinas Kesehatan (Dinkes) Provinsi Sulawesi Tengah, Dinkes Kabupaten Poso, Puskesmas Maholo, atas izin penelitian dan dukungan yang telah diberikan kepada kami.

Penelitian ini juga tidak akan dapat terselenggara apabila tidak mendapat dukungan penuh dari bapak/ibu staf Dinkes Kabupaten Poso, Ketua Departemen Kesmavet (Kesehatan Masyarakat Veteriner) IPB Bogor Bapak drh. Fadjar Satrija, M.S, Ph.D dan Dosen Mikrobiologi IPB Bogor Ibu Dr. drh. Sri Murtini, M.Si yang telah mendukung dan memberi izin kerja sama dengan laboratorium Terpadu Institut Pertanian Bogor. Teman-teman Balai Litbang P2B2 Donggala (drh. Gunawan, Leonardo Taruk Lobo, Risti, Ludiah, Irfais dan teman-teman lainnya) yang telah memberikan bantuan baik moril maupun materil selama kegiatan penelitian ini berlangsung sehingga dapat terselesaikan sesuai dengan yang diharapkan. Terima kasih yang tak terhingga juga kami ucapkan kepada masyarakat Napu (Mekarsari dan Tamadue) yang secara koperatif telah mendukung kegiatan penelitian ini.

## 10. DAFTAR KEPUSTAKAAN

1. Garcia LS, Bruckner DA. *Diagnostik parasitologi kedokteran*. Penerbit buku kedokteran. EGC. Editor, Dr. Lesmana Padmasutra. Hal. 244-252. 1996.
2. Malek EA. *Snail-Transmitted Parasitic Diseases*. Departement of Tropical Medicine, Tulane University Medical Center. New Orleans, Louisiana. Page 131-170. 1980.
3. Soedarto. *Zoonosisi Kedokteran*, Airlangga press, Surabaya, 2003.
4. Sudomo M. Schistosomiasis control in Indonesia. *Majalah Parasitologi Indonesia* 13 (1-2): 1-10. 2000.
5. Sudomo M. *Some aspects of schistosome transmission in Central Sulawesi, Indonesia*. [Doctorate Disertation] Bandung Institute of Technology. 1980.
6. Ridwan Y. "Potensi hewan reservoir dalam penularan Schistosomiasis pada manusia Di Sulawesi Tengah. FKH, Institut Pertanian Bogor, Bogor, 2004.
7. [DINKES] Dinas Kesehatan Propinsi Sulawesi Tengah. Laporan Tahunan Schistosomiasis Sulawesi Tengah. 2010.
8. Espino AM, Díaz A, Pérez A, Finlay CM. Dynamics of Antigenemia and Coproantigens during a Human *Fasciola hepatica* Outbreak. American Society for Microbiology. *Journal Clin Microbiol* 36 (9): 2723-2726. 1998.
9. Charlier J, Meulemeester LD, Claerebout E, Williams D, Vercruysse J. Qualitative and Quantitative Evaluation of Coprological and Serological Techniques for The Diagnosis of Fasciolosis in Cattle. *Veterinary Parasitology* 153 : 44-51, 2008.
10. Smith JR. *Produksi Serum Hiperimun*. Burgess GW, Editor. Yogyakarta: Gajah mada University Press. 1995.
11. Herscovitz HB. *Immunophysiology : Cell Function and Cellular Interactions*. Immunology II. Philadelphia: W.B. Saunders Company :151-199, 1978.
12. Jackson AL. 1978. *Antigens and Immunogenicity*. Di dalam Bellanti, Joseph A, Editor. *Immunology II*. Philadelphia: W.B. Saunders Company (101-150).
13. Turner P, Lalloo K, Bligh J, Armstrong M, Whitty CJM, Daenhoff MJ, and Chiodini PL. Serological speciation of human schistosome infections by ELISA with a panel of three antigens. *Journal Clin Pathol*. 57(11): 1193-1196. 2004.
14. Estuningsih SE. Diagnosis of *Fasciola gigantica* Infection in Cattle Using Capture-ELISA Assay for Detecting Antigen in Faeces *Jurnal Ilmu Ternak & Veteriner* 11(3): 229-234. 2006.

*Laporan akhir penelitian: Untuk kalangan terbatas*

15. Bradford MM. A Rapid and Sensitive Method for The Quatitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing The Principle of Protein Dye Binding. *Anal Biochem.* 72 : 248-254. 1976.
16. Laemli UK. Cleavage of Structural Protein During The Assembly of The Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685. 1970.
17. Eisen HN. *Immunology*. Di dalam: Davis, Bernard D, editor. *Microbiology 2<sup>nd</sup> Ed*. Maryland: Harper & Row, Inc. hlm 349-597. 1973.
18. Estuningsih SE, Spithill T, Raadsma H, Law R, Adiwinata G, Meeusen L, Piedrafittal D. 2009. Development and application of a fecal antigen diagnostic sandwich elisa for estimating prevalence of *Fasciola gigantica* in cattle in Central Java, Indonesia. *Journal of Parasitology* 95 (2): 450-455.
19. [DINKES] Dinas Kesehatan Propinsi Sulawesi Tengah. Laporan Tahunan Schistosomiasis Sulawesi Tengah. 2011.
20. <http://inamuse.wordpress.com/2009/07/06/sejarah-kehidupan-di-lembah-napu-sulawesi-tengah>
21. Jastal, Gardjito TA, Anastasia H, Mujiyanto. Analisis Spasial epidemiologi schistosomiasis menggunakan pengindraan jauh dan system informasi geografis di Lembah Napu dan Lindu Kab. Donggala. Donggala: Loka Litbang P2B2 Donggala, 2008.
22. Iskandar F, Lumeno HH. Isolasi penyebab demam keong dari tikus liar di sekitar Danau Lindu Sulawesi Tengah. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner p. 389-93. 2002.
23. Tjitra E. Penelitian-penelitian Schistosomiasis di Indonesia. *Cermin Dunia Kedokteran*. No. 96:31-6. 1994.
24. Sudomo M, Pretty, Sasono MD. Pemberantasan Schistosomiasis di Indonesia. *Buletin Penelitian Kesehatan*. Vol. 35(1):36-45. 2007.
25. Hadidjaja P. Schistosomiasis di Sulawesi Tengah, Indonesia. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia; 1985.
26. Miyazaki I. *An illustrated book of helminthic zoonoses*. Tokyo: International Medical Foundation of Japan; 1991.
27. Guyton AC, and Hall JE. *Fisiologi Kedokteran Edisi ke-11*. Irawati et al, penerjemah; Rachman LY, editor. Jakarta: EGC. Terjemahan dari: Textbook of Medical Physiology 11<sup>th</sup> Edition. 2007.
28. Tizzard. *An Introduction to Veterinary Immunology 7<sup>th</sup> Ed*. Elsevier : Philadelphia. 2004.

29. Kuby. *Immunology 6<sup>th</sup> Ed*. New York: W.H Freeman Company. 2007.
30. Balqis U. *Karakterisasi Protease dari Ekskretori/Sekretori Stadium L3 Ascaridia galli* [Tesis]. Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor. 2006.
31. Marcilla A *et al*. Leucine Aminopeptidase Is an Immunodominant Antigen of *Fasciola hepatica* Excretory and Secretory Products in Human Infections. *J Clin Vacc Immunol* 15 (1): 95-100. 2008.
32. Retnani EB. Sestodosis dan serangga yang berpotensi sebagai inang antara pada ayam ras petelur comersial di daerah bogor [disertasi]. Program Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor. 2010.
33. De Vera ME, Sato K, Oyong G, Claveria FG. Comparison of protein profile of co-existing *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* parasite in *bos taurus* (cattle) and *bubalus bubalis* (philippine water buffalo). *Journal Protozool. Res* 19: 1-9. 2009.
34. Gupta SC, Ghosh S, Joseph D, Singh BP. Diagnosis of experimental *Fasciola gigantica* in cattle by affinity purified antigen. *Indian Journal Anim* 7: 963-966. 2003.
35. Allam AF, El-Agamy ESI, Helmy MH. Molecular and immunological characterization of *fasciola* spesies. *Journal Biomed* 59: 191-195. 2002.
36. Black JG. *Microbiology: Principles and Explorations 6<sup>th</sup> Ed*. Virginia: John Wiley & Sons, Inc.470-492. 2005.
37. Zola H. *Monoclonal antibodies. A Manual Of Techniques*. CRC Press, Boca Raton, California: 214. 1987.
38. Kemeny DM. *A Practical Guide to ELISA*. Pergamon Press Oxford: 115. 1991.
39. Zhonghua Yi Xua Za Zhi. A highly sensitive diagnostic kit for evaluating therapiutic effect in schistosomiasis cases, *Journal PubMed* 72(11): 686-8,704. 1992.
40. Zhou Yb, Zheng Hm, Jiang Q-w. A diagnostic challaenge for schistosomiasis japonica in China: consequences on praziquantel-based morbidity control. *Journal Parasite& Vector* 4: 194. 2011.
41. Xu J, Peeling RW, Chen JX, Wu XH, Dao Z, Wang SP, Feng T, Chen SH, Li H, Guo JG, Zhou XN. Evaluation of immunoassay for the diagnosis of *Schistosoma japonicum* infection using archived sera. *Journal Neglected Tropical Diseases*. (5): 949. 2011.

## **11. LAMPIRAN**

Lampiran 1.

### **IZIN PENELITIAN**

Penelitian ini telah mendapat izin dari Kantor Pelayanan Perizinan Terpadu Daerah (KP2TD). Persetujuan izin penelitian juga dilakukan di daerah penelitian di lokasi pengambilan sampel darah dan tinja, yaitu di Kabupaten Poso.



PEMERINTAH PROVINSI SULAWESI TENGAH  
KANTOR PELAYANAN PERIZINAN TERPADU DAERAH  
(KP2TD)

Alamat : Jalan Jenderal Ahmad Yani No. 16 Telp. (0451) 458714, Fax. (0451) 458714  
P A L U

Kode Pos 94111

REKOMENDASI IZIN PENELITIAN

Nomor : 070/149/REK-PL/KP2TD/2012

- Mem baca** Balai Penelitian Dan Pengembangan Pengendalian Penyakit Bersumber Binatang (Balai Litbang P2B2) Donggala, Kementerian Kesehatan RI, Nomor Lb. 01.03/XVII/604/2012, Tanggal 12 April 2012 Permohonan penelitian Riset dan Survey.
- Men gingat**
- Undang-Undang Nomor 32 Tahun 2004 tentang Pemerintahan Daerah (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2004 Nomor 125);
  - Peraturan Pemerintah Nomor 38 Tahun 2007 tentang Pembagian Urusan Pemerintahan di Daerah;
  - Peraturan Pemerintah Nomor 41 Tahun 2007 tentang Organisasi Perangkat Daerah (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2007 Nomor 89, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 4741);
  - Surat keputusan Menteri Dalam Negeri Nomor : SD 5 Februari 2012 tanggal 5 Juli 1972 tentang Kegiatan Riset dan Survey diwajibkan melapor diri kepada Gubernur Kepala Daerah atau Pejabat ditunjuk;
  - Keputusan Direktur Jenderal Sosial Politik Nomor: 14 Tahun 1981 Tentang Surat Pemberitahuan Penelitian;
  - Peraturan Daerah Provinsi Sulawesi Tengah Nomor 3 Tahun 2009 tentang Organisasi dan Tata Kerja Lembaga lain bagian dari Perangkat Daerah Provinsi Sulawesi Tengah (Lembaran Daerah Provinsi Sulawesi Tengah Tahun 2009 Nomor 03);
  - Peraturan Gubernur Sulawesi Tengah Nomor 72 Tahun 2009 tentang Uraian Tugas, Fungsi dan Tata Kerja Kantor Pelayanan Perizinan Terpadu Daerah (KP2TD) Provinsi Sulawesi Tengah (Berita Daerah Provinsi Sulawesi Tengah Tahun 2009 Nomor 72);
  - Peraturan Gubernur Sulawesi Tengah Nomor 8 Tahun 2010 tentang Penyelenggaraan Publik di Lingkungan Sulawesi Tengah (Berita Daerah Provinsi Sulawesi Tengah Tahun 2010 Nomor 86);
  - Peraturan Gubernur Sulawesi Tengah Nomor 11 Tahun 2010 tentang Pendelegasian Kewenangan Gubernur untuk Penandatanganan Perizinan dan Non Perizinan Kepada kepala Kantor Pelayanan Perizinan Terpadu Daerah (KP2TD) Provinsi Sulawesi Tengah;
  - Peraturan Gubernur Sulawesi Tengah Nomor 02 Tahun 2010 tentang Tata Cara Penerbitan Perizinan dan Non Perizinan pada Kantor Pelayanan Perizinan Terpadu Daerah (KP2TD) Provinsi Sulawesi Tengah.
- Mem perhatikan** Proposal yang bersangkutan
- Yang bertanda tangan di bawah ini :
- Gubernur Sulawesi Tengah,
- Cq. Kepala Kantor Pelayanan Perizinan Terpadu Daerah (KP2TD) Provinsi Sulawesi Tengah
- Men erangkan bahwa pada prinsipnya memenuhi persyaratan untuk diterbitkan Rekomendasi izin Penelitian kepada :
- N a m a : Samarang, SKM, M.Si
  - A l a m a t : Jl. Banteng No 35 Palu
  - B i d a n g P e n e l i t i a n : Kesehatan
  - P e k e r j a a n : PNS
  - K e b a n g s a a n : Indonesia
  - M a k s u d D a n T u j u a n : Mengembangkan Metode ELISA dengan polifional antibodi untuk mendeteksi antigen ekskretori-sekretori
  - J u d u l P e n e l i t i a n : Pengembangan Metode ELISA untuk Mendeteksi Antigen Ekskretori-Sekretori Schistosoma Japonicum pada Penderita Schistosomiasis
  - P e n a n g g u n g J a w a b P e n e l i t i a n : Samarang, SKM, M.Si

- |                           |   |
|---------------------------|---|
| i. Pengikut Peserta / Tim | 1. Made Agus Nurjana, SKM, M. Epid<br>2. Siti Chadijah, SKM, M.Si<br>3. drh. Intan Tolistiawaty<br>4. Malonda Maksud, SKM<br>5. Andi Tenriangka, S. Sos |
| j. Instansi yang dituju   | Pemerintah Provinsi Sulawesi Tengah, Dinas Kesehatan Daerah Provinsi Sulawesi Tengah, Dinas Kesehatan Kabupaten Poso                                    |
| k. Lokasi Penelitian      | Dataran Tinggi Napu Kabupaten Poso dan Provinsi Sulawesi Tengah   |

Sebelum mengadakan kegiatan penelitian/pengambilan Data harus melapor kepada pihak yang berwenang setempat.

Tidak dibenarkan melakukan kegiatan yang tidak sesuai atau tidak ada kaitannya dengan jadwal penelitian sebagaimana dimaksud diatas.

Harus menaati semua ketentuan/perundang-undangan yang berlaku, serta mengindahkan segala tatakrama kehidupan masyarakat setempat.

Melaporkan hasil pelaksanaannya kepada Gubernur Sulawesi Tengah Cq. Kepala Kantor Pelayanan Perizinan Terpadu Daerah (KP2TD) Provinsi Sulawesi Tengah dan yang ditembuskan kepada Kepala Badan Kesatuan Bangsa, Politik, dan Perlindungan Masyarakat Provinsi Sulawesi Tengah.

Surat Rekomendasi izin ini akan dicabut dan dinyatakan batal, Apabila pemegang surat rekomendasi tidak menaati ketentuan sebagaimana dimaksud diatas.

Diharapkan agar pihak yang terkait dapat memiienkan bantuan fasilitas yang diperlukan.

Demikian surat rekomendasi izin ini dibuat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya dan berlaku sejak tanggal 13 April 2012 s/d 30 November 2012.

Ditetapkan di, PALU

Pada Tanggal 13 April 2012

a.n. GUBERNUR SULAWESI TENGAH

KEPALA KANTOR

PELAYANAN PERIZINAN TERPADU DAERAH (KP2TD)

PROVINSI SULAWESI TENGAH



RAMLI SANUDIN, SE, M.Si

Pembina

NIP. 19580926 199403 1 009

Disusun di sampaikan Kepada Yth :

Gubernur Sulawesi Tengah (Sebagai Laporan) di Palu

Rekan Kesbangpol dan Linmas Kementerian Dalam Negeri di Jakarta

Kepala Badan Kesbangpol dan Linmas Daerah Prov. Sulawesi Tengah di Palu

Kepala Dinas Kesehatan Daerah Provinsi Sulawesi Tengah di Palu

Kepala Badan Kesbangpol dan Linmas Kabupaten Poso di Poso

Kepala Dinas Kesehatan Kabupaten Poso di Poso



KEMENTERIAN KESEHATAN  
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN  
Jalan Percetakan Negara No. 29 Jakarta 10560 Kotak Pos 1236  
Telepon: (021) 4261088 Faksimile: (021) 4243933  
E-mail: sehan@litbang.depkes.go.id, litbang@litbang.depkes.go.id  
http://www.litbang.depkes.go.id

PERSETUJUAN ETIK (ETHICAL APPROVAL)

Nomor: KE.01/49/EC/2474/2012

Yang bertanda tangan di bawah ini, Ketua Komisi Etik Penelitian Kesehatan Badan Litbang Kesehatan, setelah dilaksanakan pembahasan dan penilaian dengan ini memutuskan protokol penelitian yang berjudul:

**"Pengembangan Metode ELISA untuk Mendeteksi Antigen  
Ekskretori - Sekretori *Schistosoma japonicum* pada Penderita  
Schistosomiasis"**

yang mengikutsertakan manusia sebagai subyek penelitian, dengan Ketua Pelaksana / Peneliti Utama:

Samarang, SKM., M.Si.

seperti disetujui pelaksanaannya. Persetujuan ini berlaku sejak tanggal ditetapkan sampai dengan batas waktu pelaksanaan penelitian seperti tertera dalam protokol.

Pada akhir penelitian, laporan pelaksanaan penelitian harus diserahkan kepada KEPK-BPPK. Jika ada perubahan protokol dan / atau perpanjangan penelitian harus mengajukan kembali permohonan kajian etik penelitian (amandemen protokol).

Jakarta, 11 April 2012

Ketua  
Komisi Etik Penelitian Kesehatan  
Badan Litbang Kesehatan

Prof. Dr. M. Sudomo

Lampiran 3.

### LEMBAR PERSETUJUAN

#### TANDA TANGAN

Saya telah membaca atau dibacakan pada saya apa yang tertera di atas ini dan saya telah diberi kesempatan untuk mengajukan pertanyaan dan membicarakan proyek penelitian ini dengan anggota tim penelitian. Saya memahami maksud, risiko, waktu dan prosedur penelitian ini. Dengan membubuhkan tanda tangan saya di bawah ini, saya menyatakan keikutsertaan saya secara sukarela dalam penelitian ini.

<b>Nama Responden dan Wali</b>	<b>Tanggal/bulan/tahun</b>	<b>Tanda tangan/cap jempol</b>
<b>Nama Saksi</b>	<b>Tanggal/bulan/tahun</b>	<b>Tanda tangan/cap jempol</b>
<b>Nama Penanggungjawab Penelitian</b>	<b>Tanggal/bulan/tahun</b>	<b>Tanda tangan/cap jempol</b>

**Keterangan:**

- Persetujuan dan tanda tangan responden diwakili orang tua/wali
- Nama saksi diwakili oleh ketua RT/RW atau Lurah setempat

Lampiran 4.

**FORM PEMERIKSAAN RESPONDEN**

Nama responden :

Jenis kelamin :

Umur :

Pemeriksaan klinis :

Riwayat penyakit

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Hasil pemeriksaan tinja :



*Laporan akhir penelitian: Untuk kalangan terbatas*

Lampiran 6.

**FORMULIR PEMERIKSAAN TINJA SCHISTOSOMIASIS**

DESA : ..... CARA PEMERIKSAAN : .....  
 WKT. PELAKSANAAN : .....  
 JLH. PDDK : .....

**SEBELUM / SESUDAH PENGOBATAN KE:**

NO. KODE		NAMA	UMUR		Jmlh telur Schistosomiasis			Jmlh telur Schistosomiasis			Telur lain		
KK	N0		LK	PR	I	II	III	I	II	III	As.	Hw.	Tt.
	1												
	2												
	3												
	4												
	5												
	6												
	7												
	8												
	9												
	0												
	1												
	2												
	3												
	4												
	5												
	6												
	7												
	8												
	9												
	0												

Keterangan : As =  
 Ascaris  
 Tt = Trichuris t.  
 Hw = Hookworm

*Laporan akhir penelitian: Untuk kalangan terbatas*

Lampiran 7.

**FORMULIR PEMERIKSAAN TIKUS**

PROPINSI : SULAWESI TENGAH KECAMATAN :  
 KABUPATEN : DESA :

No.	Tgl	Desa	Spesies	Jenis kelamin	Ukuran panjang (Cm)				Berat (Gram)	Parasit yang ditemukan		
					Total	Ekor	Telinga	Telapak kaki belakang-kuku		<i>S. japonicum</i>		Cacing lain
										Telur	adult	
1												
2												
3												
4												
5												
6												
7												
8												
9												
0												
1												
2												
3												
4												
5												
6												
7												
8												
9												

Lampiran 8

**KOMPOSISI REAGEN UNTUK (SDS-PAGE)**

Komposisi *Buffer* elektroda (pH 8,4)

Tris HCL .....	3,03 g
Glisin .....	14,4 g
SDS .....	1 g
H <sub>2</sub> O .....	100 ml

Komposisi *Buffer* sampel (pH 6,9)

Tris HCL .....	0,152 g
SDS .....	1 g
β- mercaptoethanol .....	0,66 g
Gliserol .....	2 ml
Bromphenol blue .....	4 mg
H <sub>2</sub> O .....	100ml

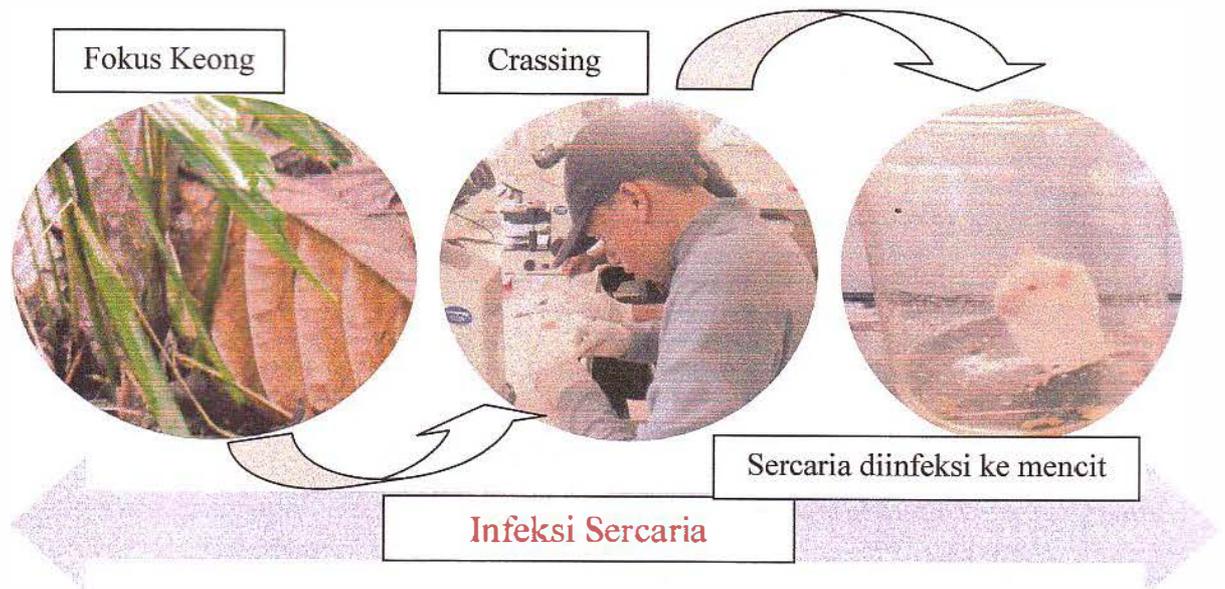
Komposisi larutan pewarna

Coomasie brilliant blue G-250 .....	0,15 %
Methanol .....	75 ml
Asam asetat .....	15 ml
H <sub>2</sub> O .....	60 ml

Komposisi larutan pencuci warna

Methanol .....	50 %
Asam asetat .....	10 %
H <sub>2</sub> O .....	40 %

Lampiran 9. Survei Keong Untuk Infeksi Sercaria Ke Mencit



Lampiran 10. Survei Tikus Untuk Produksi Antigen ES



Pemasangan perangkat tikus



Pembedahan



Koleksi Cacing *S. japonicum*



Inkubasi *S. japonicum* / Produksi AgES

Lampiran 11. **Produksi Antibodi, Karakterisasi dan Optimasi Uji ELISA**



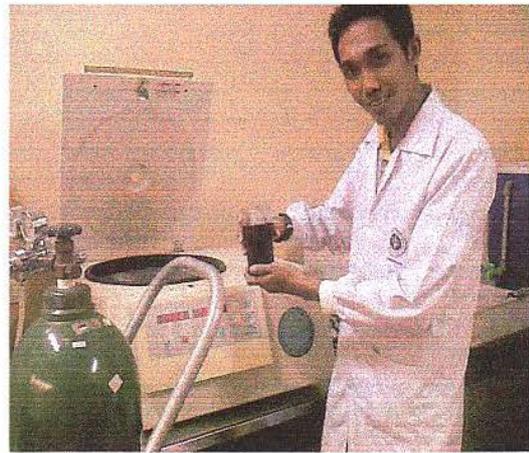
Persiapan Ambil Darah Kambing



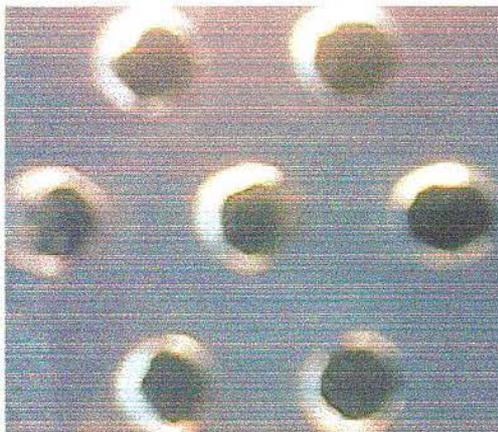
Pengambilan Darah Melalui Vena Jungularis



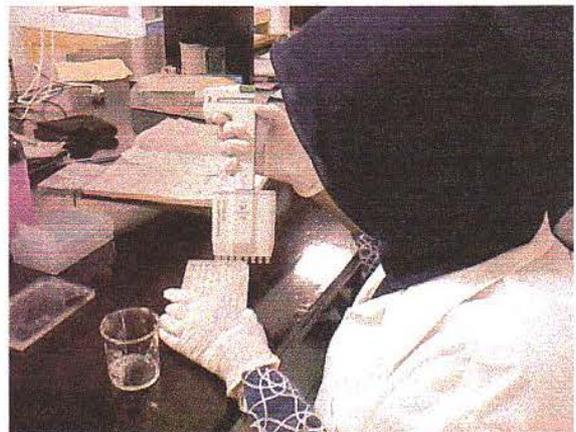
Sampel Darah Untuk Pembuatan Serum



Pemurnian Ig G



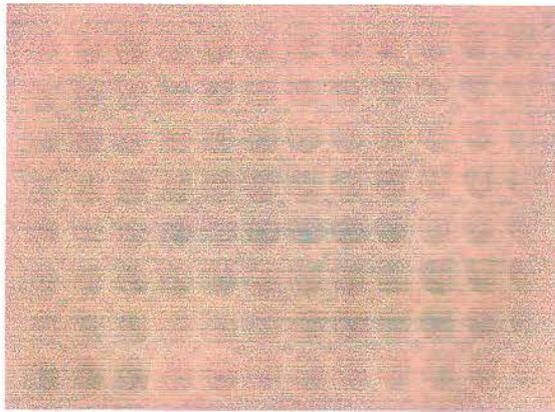
Hasil AGPT Visualisasi IgG



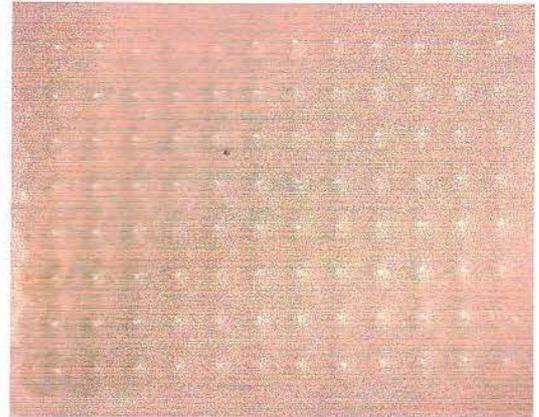
Uji ELISA Tahap Optimasi

Lampiran 12.

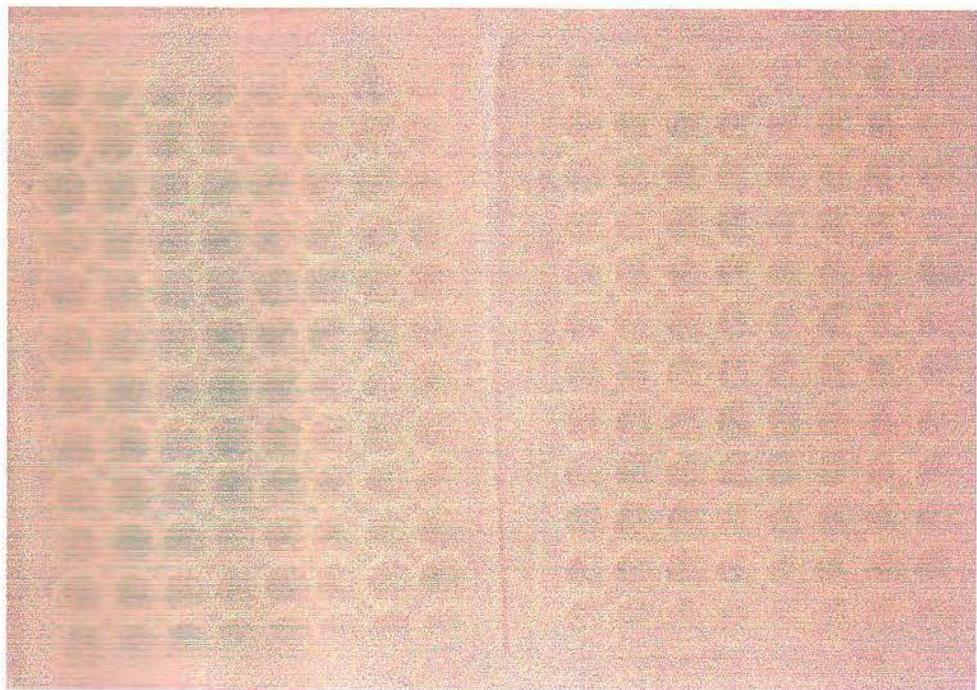
**Hasil Optimasi Uji ELISA**



**Coating IgG 1 µg/ml**



**Coating Ig G 2 µg/ml**



**Perbandingan Secara Visual IgG Coating 1 µg/ml dengan 2 µg/ml**