

## PEMBAHASAN UMUM

Prosentase  $L_1$  yang berkembang menjadi  $L_2$  adalah 89,46% (Gambar 7) sedangkan prosentase  $L_2$  yang berkembang menjadi  $L_3$  adalah 12,7% (Tabel 1). Kemampuan  $L_3$  *Ascaridia galli* berkembang di dalam saluran cerna ayam *Isa Brown* dipengaruhi oleh besarnya dosis infeksi yang diberikan pada satu waktu. Semakin besar dosis  $L_2$  yang diberikan pada satu waktu semakin tinggi pula prosentase  $L_3$  yang berkembang. Prosentase perkembangan  $L_3$  yang paling tinggi ditemukan pada kelompok E, yaitu pada ayam yang diberikan satu kali dosis 6000  $L_2$  sekaligus.

*A. galli* adalah cacing nematoda yang berpredelesi di dalam usus halus unggas. Ayam jenis *New Hampshire* lebih rentan terinfeksi oleh *A. galli* dibandingkan jenis ayam petelur komersial lainnya seperti *Skalborg*, *ISA Brown*, dan ayam hasil persilangan *New Hampshire* dan *Skalborg* (Schou *et al.* 2003). Dahl *et al.* (2002) menemukan berbagai stadium kehidupan cacing *A. galli* di dalam saluran cerna ayam jenis *Lohmann Brown* pada 10 minggu infeksi dengan dosis  $1000 \pm 50 L_2 A. galli$ .

Pada penelitian ini, cacing *A. galli* dapat melangsungkan kehidupannya pada saluran cerna ayam petelur jenis *ISA Brown*. Dosis pemberian  $L_2$  mempengaruhi populasi  $L_3$  yang ditemukan tujuh hari pascainfeksi. Pada kelompok ayam yang diberikan enam kali dosis 1000  $L_2$  dengan interval waktu setiap kali pemberian 30 menit ditemukan jumlah  $L_3$  yang paling sedikit (8,39%). Seperti yang disajikan pada Tabel 1, semakin tinggi dosis  $L_2$  yang diberikan semakin banyak pula jumlah  $L_3$  yang ditemukan. Pada kelompok ayam yang diberikan sekaligus dosis 6000  $L_2$  ditemukan jumlah  $L_3$  yang paling banyak (21,48%).

Selama menjalani kehidupan di dalam tubuh inang definitif, *A. galli* dan ayam petelur saling berinteraksi untuk mencapai keseimbangan kehidupan antara *A. galli* sebagai parasit dan ayam petelur sebagai inang definitif. Interaksi *A. galli* dengan inang definitif diperantarai oleh ekskretori/sekretori yang dilepaskan melalui proses anabolik dan katabolik oleh cacing selama *establish* di dalam tubuh inang definitif. Rhoads *et al.* (2001) membuktikan bahwa ekskretori/sekretori

*Ascaris suum* pada babi berperan sebagai molekul biologi aktif untuk penetasan telur, *molting*, pemecah jaringan inang, invasi dan migrasi larva ke jaringan.

Stadium L<sub>3</sub> *A. galli* melepaskan ekskretori/sekretori dengan berat molekul 28 kDa yang divisualisasikan melalui SDS PAGE (Gambar 8). Rata-rata kuantitas protein ekskretori/sekretori stadium L<sub>3</sub> *A. galli* sebelum pemekatan adalah 0,065 mg/ml dan setelah pemekatan adalah 0,595 mg/ml. Hasil uji kuantitas protein standar terhadap BSA pada UV spektrofotometer dengan panjang gelombang 280 nm ( $R^2 = 0,99$ ) disajikan pada Tabel 2. *Establishment* cacing di dalam tubuh dilawan melalui mekanisme respons imunitas oleh inang definitif. Ekskretori/sekretori berperan sebagai sumber antigen protektif yang dapat memicu tanggap kebal inang definitif (Jimenez *et al* 2000). Antigen ekskretori/sekretori merupakan komponen imunogenik (Chung *et al.* 1997 dan Kim *et al.* 2000). Lagapa *et al* (2002) menyatakan bahwa substansi yang diekskresi/sekresikan cacing merupakan target yang potensial untuk memicu respons imun dan dapat dikenal oleh antibodi pada hewan terinfeksi.

Antigen ekskretori/sekretori stadium L<sub>3</sub> *A. galli* dapat memicu pembentukan antibodi ayam petelur. Antibodi terdeteksi melalui uji AGPT pada minggu keempat, kelima, dan keenam pascaimunisasi berturut-turut pada satu, dua, dan tiga ekor ayam yang diimunisasi (Tabel 3). Pada penelitian ini terbukti bahwa ekskretori/ sekretori stadium L<sub>3</sub> *A. galli* dapat berperan sebagai antigen. Pada ayam petelur jenis *HySex Brown*, antibodi yang didistribusikan di dalam serum juga didepositkan ke dalam kuning telur (*yolk*) pada minggu keempat pascaimunisasi. Gambar 9 menunjukkan titer antibodi di dalam kuning telur melalui uji ELISA. Titer antibodi *optical density* (OD) mulai meningkat pada minggu kedua, dan mencapai puncaknya pada minggu kedelapan dan kesembilan pascaimunisasi. Titer antibodi mulai menurun pada minggu ke-10 pascaimunisasi. Roitt dan Delves (2001) menyatakan bahwa pemaparan antigen ekskretori/sekretori cacing dapat menggerakkan pelepasan interleukin (IL-4 dan IL-5) oleh sel T helper-2 (Th-2). IL-4 dapat membangkitkan sel B menjadi sel plasma pembentuk antibodi.

Pada penelitian ini, antibodi yang didepositkan ke dalam kuning telur ayam *HySex Brown* berhasil dipurifikasi melalui proses tahapan pengendapan

dengan amonium sulfat, dialisis, pengendapan dengan PEG 6000, dan melalui teknik kromatografi. Pada teknik FPLC, eluat IgY dapat dimonitor pada komputer yang menyebabkan naiknya garis sehingga terbentuk puncak (*peak*) pada fraksi keempat (Gambar 10). Kuantitas protein IgY pada tiap-tiap tahap purifikasi disajikan pada Tabel 4.

Pada uji ELISA diketahui bahwa konsentrasi optimum cairan ekskretori/sekretori stadium L<sub>3</sub> *A. galli* yang dibutuhkan adalah 0,15 µg dalam setiap sumur ELISA. Gambar 11 menunjukkan titer antibodi di dalam serum ayam percobaan. Selain pada kelompok ayam kontrol, peningkatan titer antibodi terjadi pada semua kelompok ayam percobaan mulai minggu pertama sampai minggu ke-10 pascainfeksi. Titer antibodi semua kelompok ayam percobaan meningkat signifikan ( $P < 0,05$ ) hanya terhadap kelompok kontrol pada minggu pertama, kedua, kelima, dan ke-10 pascainfeksi.

Menurut Else dan Finkelman (1998) antibodi dapat mencegah perlekatan larva pada mukosa usus halus, dan bersama mukus menjerat larva untuk dikeluarkan bersama tinja. Tizard (1996) menyatakan bahwa IL-5 yang dilepaskan oleh Th-2 karena rangsangan antigen cacing dapat menggertak eosinofosis, mobilisasi sel eosinofil, dan degranulasi sel eosinofil untuk melepaskan substansi helmintoksik seperti enzim proteolitik, peroksidase, dan *major basic protein*. Temuan Roitt dan Delves (2001), Else dan Finkelman (1998), dan Tizard (1996) sesuai dengan hasil penelitian ini, dimana jumlah larva *A. galli* yang ditemukan pada saluran cerna ayam *Hysex Brown* yang diimunisasi sebelum ditantang menurun secara signifikan dibandingkan dengan ayam yang tidak diimunisasi tetapi diinfeksi dengan dosis 1000 L<sub>2</sub> *A. galli* (Tabel 5).

Produksi antibodi yang dirangsang oleh antigen asal cacing akan memicu mastositis. Sel mast mukosa berdegranulasi melepaskan kandungannya seperti histamin, leukotriene-D<sub>4</sub>, dan PGE<sub>2</sub>. Substansi tersebut akan dilepaskan pada kutikula cacing nematoda apabila antibodi telah berikatan dengan antigen. Kolaborasi antigen, antibodi, dan substansi granula sel eosinofil dan sel mast mukosa juga menimbulkan respons inflamasi untuk menghambat invasi cacing ke jaringan (Kraneveld *et al.* 1998; Kay 2001<sup>a</sup>; dan Kay 2001<sup>b</sup>)).

Tanggap kebal dipicu melalui mekanisme sitotoksitas seluler tergantung antibodi (ADCC) yang khas (Klei 1997). Immunoglobulin melekat pada permukaan cacing, sel eosinofil kemudian melekat melalui reseptor Fc, sehingga sel eosinofil teraktivasi dan melepaskan sekresi protein dari granula yang dapat merusak parasit bersangkutan (Stuart 1999). Tanggap ini dapat terjadi karena ekskretori/sekretori dapat merangsang sel Th2 untuk memproduksi interleukin (IL), yaitu IL-4 dan IL-5. IL-4 merangsang produksi antibodi, sedangkan IL-5 merangsang pembentukan dan perkembangan sel eosinofil (Roitt dan Delves 2001).

Cross-linking juga akan menimbulkan sinyal aktivasi fosfolipase A<sub>2</sub> dan sinyal aktivasi gen sitokin untuk menghasilkan mediator sekunder granul sel mast. Fosfolipase A<sub>2</sub> mempengaruhi membran fosfolipid menghasilkan asam arachidonat, leukotrin B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub>, prostaglandin D<sub>2</sub> dan platelet activating factor (PAF). Terhadap nukleus, akibat cross-linking akan memicu pelepasan IL-5 dari inti sel mast. Sinyal IL-5 dari sel Th-2 dan sel mast menurut Kay (2001<sup>b</sup>) berperan sebagai rekrutmen eosinofil. Aktivasi sel mast dan eosinofil untuk melepaskan produk granulnya akan menimbulkan edema mukosa, sekresi mukus, infiltrasi leukosit, dan kerusakan epitel, sebagai rangkaian penyebab reaksi hipersensitivitas tipe I. Jika suatu reaksi hipersensitivitas bersifat segera dan berlangsung sistemik disebut *anafilaksis* (Kay 2001<sup>a</sup>).

Untuk membuktikan adanya ikatan antigen dengan antibodi yang telah dipurifikasi pada penelitian ini, dilakukan pendeteksian antigen pada jaringan cacing *A. galli* melalui metode imunohistokimia. Diantara teknik imunohistokimia yang telah banyak dikembangkan, teknik *polymer peroxidase* merupakan teknik yang sering digunakan. Teknik ini menggunakan dua antibodi, yaitu antibodi primer dan antibodi sekunder yang telah dikonjugasikan dengan peroksidase. Teknik imunohistokimia ditujukan untuk mendeteksi suatu molekul di dalam jaringan berdasarkan ikatan antigen-antibodi. Reaksi yang ditimbulkan dapat diamati dengan mikroskop cahaya, dan memberikan gambaran kualitatif dari intensitas produk warna yang terbentuk (Lehr *et al.* 1999; Ding dan Candido 2000; Nagano *et al.* 2004; Yarim *et al.* 2004; Rostaing *et al.* 2004; dan Motoi *et al.* 2005).

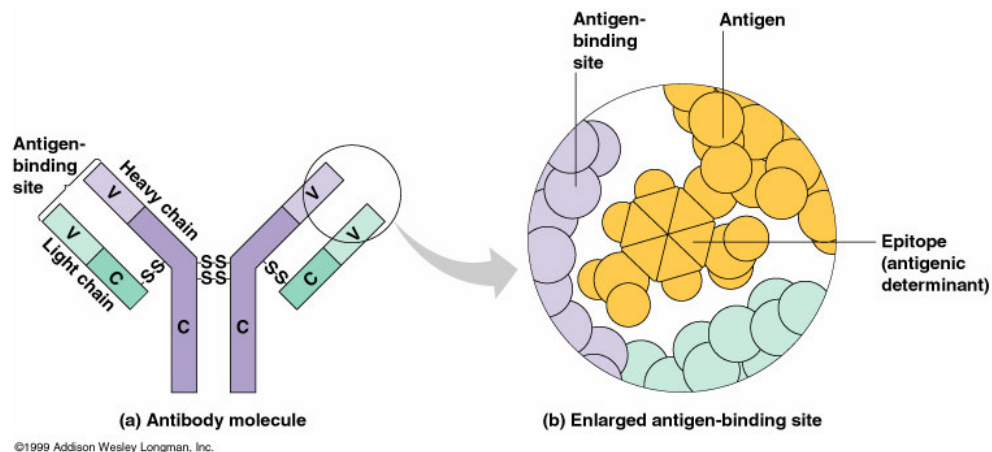
Untuk mendeteksi peroksidase, ditambahkan suatu kromogen yang dapat menghasilkan endapan berwarna (kromogranin) pada suatu reaksi sehingga produk dapat divisualisasi. Tujuan umum teknik imunohistokimia adalah untuk mengidentifikasi dan mengkarakterisasi komponen struktur dan fungsi sel, oleh karena itu kompleks antigen dan antibodi yang terjadi harus dilabel dengan suatu cara khusus agar dapat divisualisasi. Substansi yang cocok untuk melabel kompleks tersebut adalah yang memberikan reaksi warna yang tegas. Kromogen yang digunakan pada reaksi yang berperoksidase adalah AEC.

Gambar 12 menunjukkan hasil uji imunohistokimia terhadap jaringan tubuh cacing *A. galli* dewasa. Warna jingga yang terbentuk membuktikan reaksi positif antara antigen dan IgY terlihat pada kutikula cacing *A. galli* potongan melintang (Gambar 12 A). Reaksi positif juga terlihat pada bagian mulut dan disepanjang saluran cerna cacing *A. galli* (Gambar 12 B). Nagano *et al.* (2004) membuktikan bahwa uji immunostaining membuktikan bahwa pada sel-sel epitel intestinal cacing dewasa dan pada telur intrauterin *C. sinensis* terdapat antigen yang dapat dikenal oleh antibodi melalui uji imunohistokimia. Keberadaan antigen pada suatu jaringan dilaporkan oleh Rostaing *et al.* (2004) bahwa antigen yang terdapat pada otot, epidermis, intestinal, dan sel-sel neuron cacing nematoda *Caenorhabditis elegans* dapat dikenal oleh antibodi monoklonal tikus dan poliklonal kelinci. Penelitian Yarim *et al.* (2004) membuktikan pula bahwa uji imunohistokimia dapat mendeteksi keberadaan enzim  $3\beta$ -hydroxysteroid-dehidrogenase ( $3\beta$ -HSD) pada *bradyzoit* yang menutupi sarcocysts di dalam otot skelet domba sebagai inang intermediet *Sarcocystis spp.*

Penelitian terhadap kelangsungan hidup cacing *A. galli* membuktikan bahwa kelompok ayam percobaan yang diimunisasi aktif dan disertai imunisasi pasif dapat mengurangi kelangsungan hidup larva *A. galli* di dalam usus halus ayam petelur. Jumlah larva *A. galli* menurun signifikan ( $P < 0,05$ ) pada kelompok ayam yang diberikan 260  $\mu$ g ekskretori/sekretori, dan satu minggu setelah infeksi dosis 1000 L<sub>2</sub> diberikan juga 10 kali 0,875 mg IgY selama 10 hari dibandingkan dengan kelompok ayam yang hanya diinfeksi dosis 1000 L<sub>2</sub> tetapi tidak diimunisasi. Penurunan jumlah larva *A. galli* terjadi juga pada kelompok ayam yang diinfeksi dan hanya diimunisasi aktif atau imunisasi pasif, tetapi hasil uji

statistik menunjukkan penurunan jumlah larva tidak signifikan ( $P > 0,05$ ) (Tabel 5). Hal ini berarti bahwa ayam yang telah diimunisasi dengan ekskretori/sekretori stadium  $L_3$  *A. galli* dan diinfeksi oleh larva infeksi maka akan mengurangi jumlah larva di dalam usus halus. Ayam tersebut diimunisasi lagi secara pasif maka kelangsungan hidup *A. galli* di dalam usus halus semakin berkurang jumlahnya. Pada ayam yang diinfeksi oleh larva infeksi dan hanya diimunisasi secara pasif, populasi larva dapat dikurangi meskipun pengaruhnya tidak signifikan.

Hasil penelitian ini mendukung penemuan Tizard (1996) bahwa antiserum spesifik memainkan peran netralisasi dan proteksi. Kombinasi antibodi spesifik dan ekskretori/sekretori membentuk kompleks imun (*blocking*) pada kutikula, oral, dan anal (*excretory pores*) larva cacing nematoda *Toxocara canis*. Todorova (2000) membuktikan bahwa IgG yang dihasilkan oleh tikus yang diinfeksi dengan *Trichinella spiralis* dapat menghambat aktivitas enzim proteolitik yang dilepaskan oleh stadium  $L_1$  *T. spiralis*.

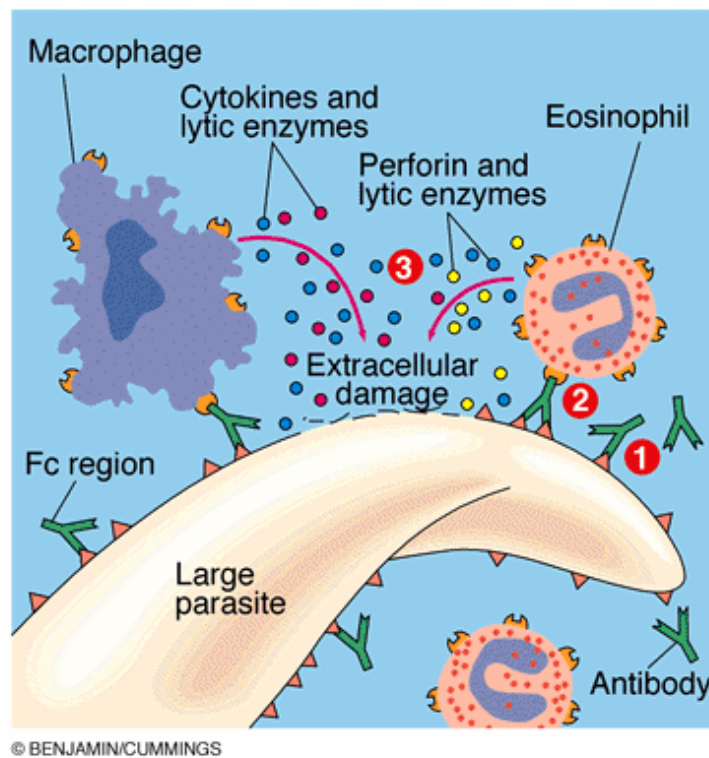


Gambar 15. Ikatan antara epitop (*antigenic determinant*) pada antigen dan paratop (*antigen binding site*) pada F(ab) antibodi

Penelitian kami terdahulu merefleksikan adanya keterlibatan sel-sel efektor secara bersama-sama bereaksi terhadap antigen *A. galli* (Athallah 1999; dan Tiuria *et al.* 2000). Keterlibatan sel eosinofil, hiperplasia dan proliferasi sel mast mukosa dibuktikan oleh Darmawi (2003), dan sel goblet dibuktikan oleh Balqis (2004), bahwa sel-sel efektor tersebut berperan pada mekanisme tanggap kebal selaput lendir mukosa usus halus. Sudah diketahui bahwa aktifitas sel-sel tersebut hanya dapat tersensitisasi apabila determinan antigen (epitop) telah

tersambung dengan bagian variabel antibodi (Else dan Finkelman 1998). Gambar 15 menunjukkan ikatan antigen-antibodi yang merupakan suatu ikatan antara epitop (*active site*) dan paratop (*antigen binding site* pada antibodi). Ikatan antigen-antibodi tersebut adalah ikatan yang kuat karena merupakan ikatan hidrogen multipel, ikatan ion, kekuatan vander Waals, dan interaksi hidrofobik (Perez 2000).

Peningkatan titer antibodi pada kelompok ayam yang diimunisasi diperlukan untuk meningkatkan fungsi sel eosinofil dan makrofag yang berperan sebagai sel efektor untuk menghancurkan kutikula cacing. Gambar 16 menguraikan bahwa fungsi tersebut dimungkinkan karena sel efektor antara lain mempunyai sejumlah lisosom yang mengandung enzim litik seperti hidrolase dan peroksidase di dalam sitoplasma. Selain itu, sel eosinofil dan makrofag mempunyai reseptor terhadap fragmen Fc antibodi. Adanya reseptor tersebut meningkatkan kemampuan sel efektor untuk menghancurkan kutikula cacing nematoda yang dilapisi oleh antibodi (Roitt dan Delves 2001).



Gambar 16. Mekanisme penghancuran kutikula cacing oleh sistem imunitas

Sebagai sel fagosit, makrofag mengekspresikan *major histocompatibility complex* (MHC) kelas II pada permukaannya. Ekspresi MHC II meningkat apabila makrofag diaktivasi. Hal ini penting karena selain sebagai sel efektor, makrofag juga berfungsi menyajikan antigen kepada sel T yang diperankan bersama ekspresi MHC kelas II. Makrofag mempunyai reseptor untuk berbagai jenis limfokin misalnya migration inhibitory factor dan  $\gamma$ -interferon. Untuk memacu proliferasi sel T dan B, makrofag memproduksi mediator seperti IL-1 (Kresno 2001).

Untuk menyingkirkan cacing dari dalam lumen usus diperlukan proses yang lebih rumit dengan melibatkan respons humoral dan selular (Harnett *et al.* 1997). Interleukin juga diketahui merangsang proliferasi sel goblet untuk menutupi selaput lendir mukosa di sepanjang permukaan saluran pencernaan. Sel goblet penghasil material yang kental, tebal, lengket dan elastis yang disebut lendir (mukus) (Castagliuolo *et al.* 1998). Lendir ini merupakan campuran glikoprotein, glikolipid, bercampur dengan air, elektrolit-elektrolit, enzim, garam, dan sekresi kelenjar, bekerjasama dengan imunoglobulin yang disekresikan ke permukaan mukosa. Kesemuanya membentuk gel yang dapat melindungi permukaan mukosa dan epitel saluran pencernaan dari ancaman agen penyakit (Harnett *et al.* 1997).

Timanova *et al.* (1999) membuktikan bahwa cacing *A. galli* menghasilkan poliprotein *A. galli fatty acid binding protein* (AgFABP) yang dapat berikatan dengan asam lemak dan bersifat sebagai alergen. Alergen ini merangsang reaksi hipersensitifitas tipe I akut lokal pada daerah intestinum terinfeksi. Kombinasi antigen cacing dengan sel mast-terikat antibodi disertai degranulasi sel mast melepaskan senyawa histamin vasoaktif. Senyawa ini menstimulir otot licin dan meningkatkan permeabilitas vaskular. Kontraksi membran muskular intestinum ini meningkatkan permeabilitas kapiler intestinal, meningkatkan aliran cairan ke dalam lumen intestinum yang berimplikasi pada pengeluaran populasi cacing.

## KESIMPULAN UMUM

1. Stadium L<sub>3</sub> *A. galli* melepaskan ekskretori/sekretori dengan berat molekul 28 kDa.
2. Ekskretori/sekretori stadium L<sub>3</sub> *A. galli* berpotensi sebagai antigen pemicu pembentukan antibodi IgY di dalam kuning telur dan serum ayam petelur.
3. IgY kuning telur yang dipicu oleh antigen ekskretori/sekretori stadium L<sub>3</sub> *A. galli* berpotensi sebagai penghambat kelangsungan hidup *A. galli*.

## SARAN

1. IgY yang telah berhasil dipurifikasi pada penelitian ini perlu diteliti karakternya, terutama ketahanannya terhadap temperatur dan pH yang sesuai karena aplikasi IgY untuk imunisasi pasif diberikan secara oral yang akan melewati traktus digestivus bagian atas sebelum mencapai situs predelesi *A. galli* pada usus halus ayam.
2. Pada penelitian ini masih ditemukan cacing *A. galli* yang *establish* di dalam usus halus ayam petelur, meskipun ayam tersebut sudah diimunisasi secara aktif dan pasif. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian yang menitik-beratkan pada peranan imunitas seluler ayam petelur terhadap cacing *A. galli*.