

KONSENTRASI PROTEIN ANTIGEN EKSKRETORI/SEKRETORI DAN SOMATIK PADA *Fasciola gigantica* DAN *Eurytrema pancreaticum*

The Protein Concentration of Excretory/Secretory and Somatic Antigen from Fasciola gigantica and Eurytrema pancreaticum

Muhammad Hambal¹, Darmawi², Nurmayasari³, Ummu Balqis⁴, Teuku Reza Ferasyi⁵, dan Siti Aisyah⁴

¹Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

²Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

³Program Studi Pendidikan Dokter Hewan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

⁴Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

⁵Laboratorium Kesehatan Masyarakat Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

Corresponding author: hambal.m@unsyiah.ac.id

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengetahui perbedaan konsentrasi protein antara ekskretori dan somatik pada cacing *Fasciola gigantica* (*F. Gigantica*) dan *Eurytrema pancreaticum* (*E. pancreaticum*). Sebanyak 32 cacing *F. gigantica* dewasa dan 30 cacing *E. pancreaticum* masing-masing dimasukkan ke dalam 80 ml Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 dan dieramkan dalam inkubator selama 6 jam, kemudian diisolasi protein ekskretori/sekretori dan protein somatik dari masing-masing cacing tersebut, setelah itu dilakukan pengukuran konsentrasi protein dengan menggunakan metode Lowry. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi protein ekskretori/sekretori *F. gigantica* dan *E. pancreaticum* masing-masing adalah 3,386 dan 0,128 mg/ml, konsentrasi protein somatik *F. gigantica* dan *E. pancreaticum* masing-masing adalah 8,028 dan 0,534 mg/ml. Dapat disimpulkan bahwa konsentrasi protein somatik pada *F. gigantica* lebih tinggi di bandingkan konsentrasi protein ekskretori/sekretori pada *F. gigantica* dan *E. pancreaticum*. Konsentrasi protein antigen ekskretori/sekretori pada *F. gigantica* lebih tinggi dibandingkan konsentrasi protein ekskretori/sekretori pada *E. pancreaticum*.

Kata kunci: *Fasciola gigantica*, *Eurytrema pancreaticum*, konsentrasi protein

ABSTRACT

The study was aimed at finding out the difference of protein content between excretory/secretory and somatic antigen of *Fasciola gigantica* as well as between excretory/secretory of *Fasciola gigantica* and *Eurytrema pancreaticum*. As many as 32 *Fasciola gigantica* and 30 *Eurytrema pancreaticum* were placed into 80 ml Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 and incubated for 6 hours. Excretory/secretory as well as somatic antigen was isolated and the concentration of protein was determined, using Lowry method. The result revealed the different of protein concentration. The concentrations of excretory/secretory antigen protein in *Fasciola gigantica* and *Eurytrema pancreaticum* were 3.386 mg/ml and 0.128, mg/ml respectively. The concentrations of somatic protein and *Fasciola gigantica* and *Eurytrema pancreaticum* were 8.028 mg/ml and 0.534 mg/ml, respectively. It can be concluded that the protein concentration from somatic tissue of *Fasciola gigantica* and *Eurytrema pancreaticum* is higher than the protein concentration from excretory/secretory of *Fasciola gigantica* and *Eurytrema pancreaticum*. The protein concentration from excretory/secretory antigen of *Fasciola gigantica* is higher than the protein concentration from excretory/secretory antigen of *Eurytrema pancreaticum*.

Key words: *Fasciola gigantica*, *Eurytrema pancreaticum*, protein concentration

PENDAHULUAN

Fasciolosis dan *Eurythremiasis* merupakan penyakit parasit yang disebabkan oleh *Fasciola* spp. dan *Eurytrema* spp. Cacing yang tergolong kelompok trematoda ini biasanya menyerang berbagai jenis mamalia dan bersifat zoonosis (Estuningsih *et al.*, 2004).

Ekskretori/sekretori (ES) merupakan antigen hasil produk metabolisme pada cacing yang dapat memicu respons kebal inang definitif (Mumpuni *et al.*, 2006). Selain ES, terdapat juga antigen somatik dan antigen permukaan yang juga antigen parasit yang dapat dikenali oleh inangnya. Menurut Nuzhat *et al.* (1984) antigen ES lebih dapat dikenali oleh sistem respons kebal dibandingkan antigen somatik dan antigen permukaan, sehingga diduga lebih potensial untuk dijadikan media imunodiagnosis.

Peneliti terdahulu telah meneliti tentang protein dari cacing *Dictyocaulus viviparus* (McKeand *et al.*, 1995), *Ascaridia galli* (*A. galli*) (Timanova *et al.*, 1999), *Cysticercus* dari *Tania saginata* (Allepuz *et al.*,

2012), dan *Fasciola* spp. dan *Eurytrema* spp. (Estuningsih *et al.*, 2004).

Penelitian ini difokuskan pada penentuan konsentrasi kuantitas protein, sebagai langkah awal memahami karakter antigen yang dihasilkan melalui ES, serta somatik antigen pada *Fasciola gigantica* (*F. gigantica*) dan *Eurytrema pancreaticum* (*E. pancreaticum*). Penentuan konsentrasi protein adalah salah satu cara untuk menentukan antigen yang memiliki peran penting dalam proses imunodiagnosis.

MATERI DAN METODE

Sampel cacing yang diperoleh dimasukkan ke dalam plastik steril yang berisi larutan Roswell Park Memorial Institute (RPMI), kemudian dibawa ke Laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Syiah Kuala untuk dimasukkan ke dalam inkubator. Setelah itu, cairan tersebut dipindahkan ke dalam eppendorf, kemudian disimpan di dalam freezer, untuk dilakukan

pemeriksaan. Penentuan konsentrasi protein dilakukan menggunakan metode Lowry. Pembuatan protein ES dan somatik antigen dari *F. gigantica*, seperti telah dijelaskan Estuningsih (2004).

Pembuatan ES *F. gigantica* dan *E. Pancreaticum*

Sebanyak 32 ekor *F. gigantica* dan 30 ekor *E. pancreaticum* dewasa, masing-masing dimasukkan ke dalam 20 ml RPMI 1640 dan dieramkan dalam inkubator selama 6 jam. *Fasciola gigantica* dan *E. pancreaticum* dikeluarkan dan larutan RPMI 1640 tersebut dan disentrifuga 1500 RPM selama 15 menit. Supernatan dikoleksi untuk diuji kuantitas proteinnya (Estuningsih, 2004).

Pembuatan Somatik pada *F. gigantica* dan *E. pancreaticum*

Sebanyak 32 ekor *F. gigantica* dan 30 ekor *E. pancreaticum* dewasa, dengan berat masing-masing 3,5 dan 3,2 g digunakan sehingga pengencerannya masing-masing menjadi 3,5 dan 3,2 ml *phosphate buffered saline* (PBS). Kemudian, cacing sebanyak 32 dan 30 ekor dimasukkan ke dalam mortil, selanjutnya ditambahkan dengan 3,5 dan 3,2 ml PBS, sehingga masing-masing volume gerusan cacing dengan larutan PBS adalah 1:2. Masing-masing larutan PBS tersebut disentrifuga 1500 rpm selama 15 menit, dan supernatannya dikoleksi untuk diuji kuantitas proteinnya (Darmawi *et al.*, 2009).

Penentuan Panjang Gelombang Maksimum *Bovine Serum Albumin* (BSA)

Pengukuran panjang gelombang maksimum *bovine serum albumin* (BSA) dihitung dengan metode Lowry. Metode Lowry digunakan secara luas untuk mengukur konsentrasi protein secara kuantitatif. Larutan standar protein yang digunakan adalah BSA. Reagen yang terdiri atas 1 ml larutan stok 1% (b/v) BSA dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya, ditambahkan dengan 5 ml pereaksi Lowry A, kemudian larutan masing-masing tersebut dihomogenkan selama 10 menit. Setelah itu ditambahkan 0,5 ml reagen Lowry B, Campuran ini lalu dikocok dan dibiarkan pada suhu kamar selama 30 menit. Kompleks yang terbentuk diukur absorbansinya pada panjang gelombang 500-750 nm dengan interval 20 nm (Lowry *et al.*, 1951).

Pembuatan Kurva Standar BSA

Kurva standar BSA dibuat menggunakan larutan stok 1% (b/v) BSA dengan variasi konsentrasi 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1 mg/ml. Larutan BSA dengan konsentrasi yang berbeda-beda ini diambil 1 ml, ditambahkan 5 ml reagen Lowry A, dikocok pada suhu ruang selama 10 menit lalu ditambahkan 0,5 ml reagen Lowry B. Campuran ini lalu dikocok dan dibiarkan pada suhu ruang selama 30 menit. Kompleks yang terbentuk diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh pada penentuan panjang gelombang. Sebagai blanko digunakan akuades untuk menggantikan larutan BSA.

Pengukuran Konsentrasi Protein

Sebanyak 1 ml larutan ES dan somatik (supernatan) pada *F. gigantica* dan *E. pancreaticum* ditambahkan 5 ml pereaksi Lowry A dan dikocok segera agar bercampur rata, kemudian dibiarkan selama 10 menit selanjutnya ditambahkan 0,5 ml pereaksi Lowry B dan dikocok sampai bercampur dengan baik, lalu dibiarkan selama 30 menit agar reaksi berjalan sempurna. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 600 nm. Perhitungan konsentrasi protein dilakukan mensubstitusikan absorbansi larutan yang diperoleh pada penentuan konsentrasi protein ke dalam persamaan regresi kurva kalibrasi larutan standar protein.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Total waktu yang diperlukan untuk pengambilan sampel proses ekstraksi ES dalam somatik antigen berikut pengukuran kadar dari ES dan somatik antigen adalah 40 hari. Kesulitan yang dialami dalam proses ini adalah susahnya mendapatkan sapi yang terinfeksi oleh parasit trematoda tersebut, terutama *E. pancreaticum*, sehingga pengumpulan sampel membutuhkan waktu yang relatif lama. Umumnya sapi yang terinfeksi oleh *E. pancreaticum* adalah jenis sapi aceh yang dipelihara secara tradisional dan berdasarkan wawancara. Sapi-sapi tersebut berasal dari Kabupaten Aceh Besar dan Pidie.

Berdasarkan pengamatan cairan somatik antigen berwarna lebih pekat, dibandingkan cairan ES antigen. Hal ini mungkin disebabkan karena larutan somatik antigen merupakan campuran seluruh sel-sel tubuh dan cairan dari organisme *F. gigantica* dan *E. pancreaticum*. Larutan ES antigen *F. gigantica* berwarna cokelat kemerahan sedangkan *E. pancreaticum* berwarna krem keputihan. Kedua larutan tersebut memiliki bau spesifik yang khas.

Panjang Gelombang Maksimum BSA

Panjang gelombang maksimum ditentukan agar mengetahui waktu absorpsi mencapai maksimum sehingga waktu tersebut dapat digunakan untuk meningkatkan proses absorpsi larutan Folin-Ciocalteu fenol dan dapat menghasilkan warna kebiruan yang dapat dibaca di antara 500-740 nm). Pada penelitian ini diperoleh pada panjang gelombang 600 nm dan absorbansinya ialah sebesar 0,34.

Kurva Standar BSA

Kurva standar BSA perlu dilakukan karena menjadi dasar penentuan konsentrasi kadar protein di dalam larutan. Sebagai kurva standar yang menghubungkan antara konsentrasi dan absorbannya. Konsentrasi standar BSA sebelumnya didapatkan dari nilai absorban panjang gelombang maksimum BSA. Setelah itu, pada nilai panjang gelombang 600 nm dapat digunakan untuk mengukur konsentrasi BSA. Selanjutnya, kurva standar digunakan untuk menghitung konsentrasi sampel yang konsentrasinya belum diketahui.

Konsentrasi Protein dari ES dan Somatik pada *F. gigantica* dan *E. pancreaticum*

Nilai absorbansi terhadap protein ES dan somatik pada *F. gigantica* dan *E. pancreaticum* adalah 0,34. Berdasarkan persamaan regresi $Y = 0,554X - 0,019$ ($R^2 = 0,984$), nilai konsentrasi protein ES pada *F. gigantica* dan *E. pancreaticum* masing-masing adalah 3,386 dan 0,128 mg/ml. Konsentrasi protein somatik *F. gigantica* dan *E. pancreaticum* masing-masing adalah 8,028 dan 0,534 mg/ml. Hasil uji konsentrasi protein standar terhadap BSA pada UV spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm ($R^2 = 0,984$) disajikan pada Tabel 1. Meskipun dari hasil jumlah konsentrasi protein ekskretori/sekretori lebih rendah dibandingkan somatik antigen pada *F. gigantica* dan *E. pancreaticum*, namun antigen ES mempunyai sifat untuk lebih dapat dikenali oleh sistem tanggap kebal daripada antigen somatik dan antigen permukaan sehingga diduga lebih protektif untuk memicu respons tanggap kebal (Nuzhat *et al.*, 1984).

Tabel 1. Konsentrasi protein ekskretori/sekretori dan somatik pada *Fasciola gigantica* dan *Eurytrema pancreaticum*

Sampel	Abs sampel	Kadar protein (mg/ml)	X pengenceran
FG (ES)	0,488	0,846570397	3,386281588
FG (Somatik)	0,575	1,003610108	8,028880866
EP (ES)	0,090	0,128158845	0,128158845
EP (Somatik)	0,315	0,534296029	0,543296029

FG= *Fasciola gigantica*, ES= Ekskretori/sekretori, EP= *Eurytrema pancreaticum*

Para peneliti telah mendeteksi penyakit ini dengan berbagai teknik, salah satunya dengan menggunakan metode teknik *sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) dan *immunoblotting*. Analisis dengan SDS-PAGE ditemukan bahwa ES produk terdiri atas 6 polipeptida dan analisis *immunoblotting* terhadap antiserum penderita fascioliasis menunjukkan terdapat 12 komponen yang ditandai dengan kuat yang mempunyai berat molekul antara kurang dari 14,4-38 kDa. Dengan teknik ini hanya satu *band* antigen dari 27 kDa yang 100% sensitif dan 98% spesifik untuk diagnosis terhadap *human fascioliasis* (Intapan *et al.*, 1998).

Para peneliti terdahulu memperlihatkan bahwa ES larva *Ascaridia galli* (*A. galli*) mengandung protein dengan konsentrasi 0,065 mg/ml dan setelah dipisahkan dengan vivaspin 30.000 MWCO meningkat menjadi 0,595 mg/ml. Konsentrasi tersebut diperoleh dari kultivasi 4-10 l *A. galli* dalam setiap ml RPMI 1640. Berat molekul protein ekskretori/sekretori larva *A. galli* adalah 28 kDa. Penelitian terdahulu membuktikan bahwa konsentrasi protein yang dilepaskan oleh 10 ekor *A. galli* betina dewasa yang dikultur dalam 20 ml medium RPMI adalah 0,380 mg/ml (Darmawi *et al.*, 2009).

Antigen cacing nematoda dapat juga diperoleh pada setiap stadium kehidupannya. Tiuria *et al.* (2003). telah

membuktikan bahwa berat molekul antigen ES stadium L dan cacing dewasa *A. galli* berturut-turut adalah 35 kDa dan 40-66 kDa, sedangkan antigen somatiknya adalah 45-66 kDa. Menurut Karimi *et al.* (2008) ES antigen menunjukkan reaksi yang lebih kuat terhadap antiserum dibandingkan somatik antigen, begitu pula pada somatik menunjukkan reaksi kuat dengan antiserum diajukan kepada ES antigen. Pada produk ES dan somatik antigen tidak ada perbedaan antar antigenitas ES dan somatik pada *Ornithobilharzia turkestanicum* dengan gel difusi tes, sehingga dapat dijadikan sebagai serodiagnosis dari *ornithobilharziosis* pada domba dengan menggunakan *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA).

KESIMPULAN

Konsentrasi protein somatik pada *F. gigantica* lebih tinggi konsentrasi protein ES pada *F. gigantica* dan *E. pancreaticum*.

DAFTAR PUSTAKA

- Allepez, A., S. Gabriel, P. Dorny, J.F. Napp, M.J.Vilar, L. Lives, L. Picart, and A. Ortuna. 2012. Comparison of bovine cysticercosis prevalence detected by antigen ELISA and visual inspection in the north east of Spain. *Res. Vet. Sci.* 92:393-395.
- Darmawi, U. Balqis, R. Tiuria, R.D. Soejoedono, dan F.H. Pasaribu. 2009. Penentuan konsentrasi dan berat molekul protein ekskretori/sekretori stadium L3 *Ascaridia galli*. *J. Ked. Hewan.* 3(1):197-202.
- Estuningsih, S.E., G. Adiwinata, S. Widjajanti, dan D. Piedrafita. 2004. Pengaruh infestasi cacing hati *Fasciola gigantica* terhadap gambaran darah sel leukosit eosinofil pada domba. *JITV.* 9(3):191-196.
- Intapan, I.M., W. Mallewong, C. Wongkham, K.T. Nakarn, K. Teamviteevanich, K. Pipitgool, and V. Sukolapongh. 1998. Excretory secretory antigenic components of adult *Fasciola gigantica* recognized by infected human sera. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 29:579-583.
- Karimi, G.H.R., M. Abdigoudarzi, M. Valizadeh, and H. Miranzadeh. 2008. Comparison of excretory/secretory and somatic antigens of *Ornithobilharzia turkestanicum*. *Iranian J. Parasitol.* 3(4):19-22.
- Lowry, O.H., N.J. Roserbrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- McKeand, J.B., D.P. Knox, J.L. Duncan, and M.W. Kennedy. 1995. Protective immunisation of guinea pigs against *dictyocaulus viviparus* using excretory/secretory product of adult parasites. *Int. J. Parasitol.* 25:93-104.
- Mumpuni, S.B.S., Subekti, dan Kusnoto. 2006. Identifikasi fraksi protein spesifik *excretorysecretory Fasciola* spp. stadium dewasa dan juvenil. *Majalah Kedokteran Hewan.* 22(1):36-41.
- Nuzhat, A.K., R. Hussain, and E.A. Ottesen. 1984. Excretory/secretory and somatic antigens in the diagnosis of human fascioliasis. *Clin. Exp. Immunol.* 56:567-576.
- Timanova, A., S. Müller, T. Marti, I. Bankov, and R.D. Walter. 1999. *Ascaridia galli* fatty acid-binding protein, a member of the nematode polyprotein allergens family. *Eur. J. Biochem.* 261:569-576.
- Tiuria, R., Y. Ridwan, and S. Murtini. 2003. Study of bioactive substance from *Ascaridia galli* adult worm that stimulate intestinal mucosal defense mechanism in chicken for medical purpose. *Proceeding of the Seminar on Science and Technology, Indonesia-Toray Science Foundation.* Jakarta-Indonesia:56-64.