

Antigen Ekskretori-Sekretori Cacing Jantung (*Dirofilaria immitis*) Jantan dan Betina yang Berpotensi Sebagai Marka Diagnosis

**(EXCRETORY-SECRETORY ANTIGENS OF MALE AND FEMALE HEART WORMS
(DIROFILARIA IMMITIS) WHICH POTENTIALLY AS A DIAGNOSTIC MARKER)**

**I Gusti Made Krisna Erawan¹, Ida Tjahajati²,
Wisnu Nurcahyo³, Widya Asmara⁴**

¹Laboratorium Ilmu Penyakit Dalam,
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana,
Jln Sudirman, Denpasar, Bali .

²Bagian Penyakit Dalam, ³Bagian Parasitologi, ⁴Bagian Mikrobiologi,
FKH, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta
Telepon: 0361 223791; *Email*: krisnaerawan@yahoo.com

ABSTRAK

Cacing jantung (*Dirofilaria immitis*) merupakan penyebab penyakit parasit yang serius pada anjing. Dirofilariasis pada umumnya didiagnosis dengan pemeriksaan mikrofilaria dan deteksi antigen. Pemeriksaan mikrofilaria di dalam darah memiliki sensitivitas yang sangat rendah karena adanya *occult infections* (infeksi tanpa mikrofilaria). Sebagian uji antigen *D. immitis* yang tersedia saat ini hanya mampu mendeteksi antigen cacing betina. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi antigen ekskretori-sekretori cacing jantan (MES) dan betina (FES) yang berpotensi sebagai marka diagnosis. Identifikasi antigen dilakukan dengan analisis *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) dan *Western Blotting*. Hasil analisis dengan SDS-PAGE dengan pewarnaan *Coomassie blue* terhadap MES menunjukkan adanya <12 pita protein dengan bobot molekul 14–118 kDa, sedangkan FES terdiri atas <18 pita protein dengan bobot molekul 10–205 kDa. Protein dengan bobot molekul 59 kDa berpotensi sebagai marka diagnosis dirofilariasis.

Kata-kata kunci : antigen ekskretori-sekretori, *Dirofilaria immitis*, marka diagnosis, SDS-PAGE, *Western Blotting*

ABSTRACT

Heart worm (*Dirofilaria immitis*) is the causative agent of a serious parasitic disease in dogs. Dirofilariasis is generally diagnosed by microfilariae examination and specific antigen testing. Microfilariae examination has low sensitivity due to occult infections. The available antigen test at this time is able to detect circulating antigens secreted by adult female worms only. The aim of the present study was to identify male (MES) and female (FES) heart worms excretory-secretory antigens which have the potential as a diagnostic targets. Identification of antigen was done by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western Blotting analysis. The results of this study indicated that there were differences between the MES and the FES profiles. The results showed 12 bands in MES (14–118 kDa) and 18 bands in FES (10–205 kDa). Protein with a molecular weight of 59 kDa has the potential as diagnostic markers of dirofilariasis.

Key words : excretory-secretory antigens, *Dirofilaria immitis*, diagnostic marker, SDS-PAGE, Western Blotting

PENDAHULUAN

Dirofilaria immitis merupakan penyebab penyakit parasit yang serius pada anjing. Cacing tersebut hidup pada arteri pulmonalis dan ventrikel kanan, sehingga disebut sebagai cacing jantung. Cacing *D. immitis* di samping menginfeksi anjing, juga menginfeksi kucing, serigala, rubah, *coyote*, *ferret*, tikus air, singa laut, *coatimundi* (Atkins, 2005), macan tutul salju (Murata, et al., 2003), berang-berang (Wang et al., 2008), *oncilla* (Filoni et al., 2009), dan orangutan (Duran-Struuck et al., 2005). Cacing *D. immitis* juga dilaporkan menginfeksi manusia (Lee et al., 2000; Theis et al., 2001; Alia et al., 2013).

Metode yang paling umum digunakan untuk mendiagnosis infeksi oleh *D. immitis* pada anjing adalah pemeriksaan antigen spesifik dan/ atau pemeriksaan mikrofilaria (Ranjbar-Bahadori et al., 2007). Metode pemeriksaan mikrofilaria di dalam darah memiliki sensitivitas yang sangat rendah karena adanya *occult infection* (infeksi tanpa disertai adanya mikrofilaria pada darah perifer). Jumlah *occult infection* tersebut dapat mencapai 10–67% pada anjing yang terinfeksi secara alami (Song et al., 2002). Saat ini telah tersedia uji untuk mendeteksi antigen *D. immitis* yang beredar dalam darah, akan tetapi diagnosis *D. immitis* dengan deteksi antigen parasit di dalam darah tersebut masih memiliki kelemahan. Sebagian uji antigen *D. immitis* yang tersedia saat ini hanya mampu mendeteksi antigen cacing betina. McCall et al. (2000) menyatakan bahwa infeksi oleh cacing jantan saja tidak dapat dideteksi oleh sepuluh jenis/merk uji antigen *D. immitis*. Dalam hal ini perlu diidentifikasi antigen cacing jantan dan betina yang dapat dijadikan sebagai marka diagnosis dari infeksi aktif.

Berdasarkan topologi antigen cacing dapat dibedakan dalam tiga golongan, yaitu antigen permukaan, antigen somatik, dan antigen ekskretori-sekretori (Soeyoko, 1998). Cacing *D. immitis* pada waktu masih hidup dapat melepaskan metabolit ke dalam sirkulasi darah yang disebut hasil ekskretori-sekretori (ES). Hasil ES yang dilepaskan oleh *D. immitis* meliputi alergen dan *neutrophil chemotactic factors* yang bertanggung jawab terhadap respons kebal inang (Kaneko et al., 1990). Antigen ES tersebut berupa *surface coat* (lapisan permukaan yang dilepaskan pada waktu

stadium larva berganti kulit atau cacing dewasa pada waktu terjadi proses *shedding/surface turnover*), *moulting fluid*, *parturition fluid*, hasil-hasil metabolisme, dan ekskretori-sekretori lainnya yang mempunyai sifat imunogenik, serta beredar di dalam serum, urin, maupun cairan tubuh inang sebagai antigen beredar (Soeyoko, 1998). Menurut Chenthamarakshan et al. (1993) antigen filaria yang ada di dalam cairan tubuh sebagai hasil sekresi dari parasit memiliki nilai yang sangat penting dalam imunoparasitologi dan antigen tersebut dapat berperan sebagai marka untuk diagnosis dari infeksi yang sedang aktif.

Perbedaan profil antigen ES *D. immitis* jantan dan betina dan respons kebal inang terhadap antigen tersebut belum banyak dilaporkan oleh para peneliti. Penelitian ini bertujuan menganalisis antigen ES *D. immitis* jantan dan betina dewasa dengan *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) dan *Western blotting* untuk mengetahui protein yang dapat dijadikan sebagai marka diagnosis.

METODE PENELITIAN

Isolasi Antigen ES *D. immitis*

Antigen ES cacing *D. immitis* dewasa dipersiapkan sebagaimana dilakukan oleh Weil (1987). Secara singkat metode tersebut, seperti uraian berikut ini. Cacing dewasa diperoleh dari arteri pulmonalis dan/atau ventrikel kanan anjing penderita. Cacing tersebut dicuci dengan *Phosphate Buffered Saline* (PBS) pH 7,2 steril. Cacing jantan dan betina dipisahkan dan ditempatkan pada media *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI)-1640 dengan suplemen glukosa 1%, penicillin 100 U/mL, streptomycin 100 µg/mL, dan fungizone 0,25 µg/mL, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dalam 5% CO₂, dan media diganti setiap hari. Selanjutnya media kultur cacing dikonsentrasikan sebagaimana dilakukan oleh Soeyoko (1998). Media cacing jantan dan betina dipresipitasi dengan amonium sulfat jenuh selama satu malam kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm pada suhu minus 4°C selama 30 menit sehingga diperoleh endapan protein. Endapan protein disuspensikan, kemudian didialisis dengan larutan PBS 0,1 M untuk mengurangi konsentrasi garam di dalam larutan.

Produksi Antibodi Anti-ES *D. immitis*

Pada penelitian ini digunakan mencit BALB/c berumur dua bulan dengan bobot 28,90–39,52 gram. Setiap mencit diimunisasi dengan menyuntikkan 5 µg antigen ES cacing jantan (MES) dan antigen ES cacing betina (FES) masing-masing pada lima ekor mencit dalam *Freund's complete adjuvant* secara subkutan. Dua ekor mencit digunakan sebagai kontrol. Satu, dua, dan tiga minggu setelah penyuntikan yang pertama, mencit perlakuan disuntik lagi dengan 5 µg antigen ES dalam *Freund's incomplete adjuvant* secara subkutan. Darah mencit diambil pada hari ke-0, 21, 28, 35, 49, dan 63 pascapenyuntikan yang pertama. Darah disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama lima menit untuk pemisahan antibodi anti-ES *D. immitis* dalam serum. Serum dipisahkan dan disimpan pada suhu minus 20°C sampai saatnya digunakan.

Analisis Antigen ES *D. immitis* dengan SDS-PAGE

Analisis kualitatif antigen ES *D. immitis* dilakukan dengan SDS-PAGE menurut metode Laemmli seperti dilakukan oleh Kaneko *et al.* (1990) dan Song *et al.* (2002) dengan sedikit modifikasi. Pada penelitian ini digunakan gel minislabs yang mengandung 12% akrilamid dan 0,5% SDS. Antigen ES dilarutkan dalam buffer sampel dan dipanaskan selama dua menit di dalam air mendidih. Sebanyak 20 µL antigen ES dan 10 µL marka protein dimasukkan ke dalam setiap sumuran, kemudian dielektroforesis pada 100 volt selama 120 menit. Selanjutnya gel diwarnai dengan *Coomassie blue*. Bobot molekul antigen ES *D. immitis* dari masing-masing pita diduga dengan menggunakan bobot molekul marka (Bio-Rad®, USA).

Identifikasi Antigen ES *D. immitis* dengan Western Blotting

Setelah dilakukan SDS-PAGE menggunakan sampel serum anjing yang terinfeksi *D. immitis* dilanjutkan dengan *Western Blotting*. Pita protein pada gel poliakrilamid ditransfer secara elektroforetik ke membran nitroselulosa pada tegangan 80 volt selama 120 menit di dalam *transfer buffer*. Membran nitroselulosa diblok dengan 1% *bovine serum albumin* (BSA) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama satu malam. Membran nitro-selulosa yang telah diblok dipotong kecil-kecil dan direaksikan pada temperatur kamar selama satu jam dengan antibodi anti-ES *D. immitis* dalam serum mencit

yang telah diencerkan dengan *Tris Buffer Saline* (TBS) dengan perbandingan 1:100. Setelah ditambahkan konjugat (*alkalin phosphatase-conjugated anti mouse IgG*) yang dilarutkan di dalam PBS dengan perbandingan 1:3000, membran nitroselulosa diinkubasi pada temperatur kamar selama satu jam. Pita antigenik pada membran nitroselulosa diwarnai dengan cairan substrat *5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitroblue tetrazolium* (BCIP/NBT) (Bio-Rad®, USA).

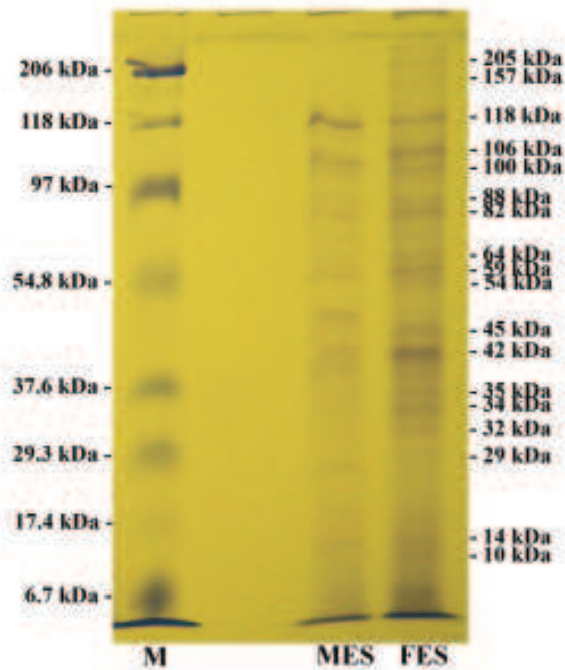
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil analisis SDS-PAGE dengan pewarnaan *Coomassie blue* terhadap MES menunjukkan adanya 12 pita protein dengan bobot molekul 14, 29, 39, 42, 49, 59, 82, 88, 100, 106, 113, dan 118 kDa, sedangkan FES terdiri atas 18 pita protein dengan bobot molekul 10, 14, 29, 32, 34, 35, 42, 45, 54, 59, 64, 82, 88, 100, 106, 118, 157, dan 205 kDa. Hasil SDS-PAGE antigen ES *D. immitis* disajikan pada Gambar 1.

Kaneko *et al.* (1990) melaporkan ada delapan pita protein pada MES dan 12 pita protein pada FES dengan pewarnaan *Coomassie blue*, sedangkan dengan pewarnaan *silver* ditemukan tambahan delapan pita protein pada MES dan sembilan pita protein pada FES, sehingga total pita protein yang ditemukan adalah 16 pita protein pada MES dengan bobot molekul 14–121 kDa dan 21 pita protein pada FES dengan bobot molekul 14–136 kDa.

Dalam penelitian ini ditemukan pita protein pada MES yang memiliki bobot molekul yang sama seperti ditemukan oleh Kaneko *et al.* (1990) yaitu bobot molekul 14, 29, dan 59 kDa. Pita protein pada FES yang sama adalah pita protein dengan bobot molekul 14, 29, 32, 54, dan 59 kDa. Pita protein dengan bobot molekul yang tidak sama dengan temuan Kaneko *et al.* (1990) ditemukan baik pada MES maupun FES. Menurut peneliti tersebut perbedaan pita protein dapat disebabkan karena perbedaan kondisi kultur *in vitro*. Dalam penelitiannya peneliti tersebut menggunakan Eagle's *Minimum Essential Medium* (MEM) sebagai media kultur, sedangkan penelitian ini menggunakan media RPMI-1640.

Scott *et al.* (1988) melakukan analisis terhadap antigen permukaan cacing *D. immitis* dewasa jantan dan betina dan menemukan jumlah pita protein yang terbatas dengan bobot



Gambar 1. Pita protein Ekskretori Sekretori cacing jantung (*D. immitis*) jantan dan betina. (M = marka protein; MES = antigen ES cacing jantan, FES = antigen ES cacing betina)

molekul 14,5, 16, 17,5, 20, dan 49 kDa. Oge *et al.* (2005) menemukan pita protein pada antigen somatik *D. immitis* dengan bobot molekul 6,5–205 kDa, sebanyak 33 pita protein pada antigen somatik cacing jantan dan 28 pita protein pada antigen somatik cacing betina. Perbandingan hasil penelitian ini menunjukkan bahwa perbedaan asal antigen menghasilkan jumlah pita protein dan bobot molekul yang berbeda.

Uji *Western Blotting* menunjukkan bahwa antibodi anti-MES dan anti-FES yang dihasilkan dalam penelitian ini dapat bereaksi secara spesifik dengan protein dengan bobot molekul 59 kDa yang ada di dalam sampel serum anjing yang terinfeksi *D. immitis* (Gambar 2).

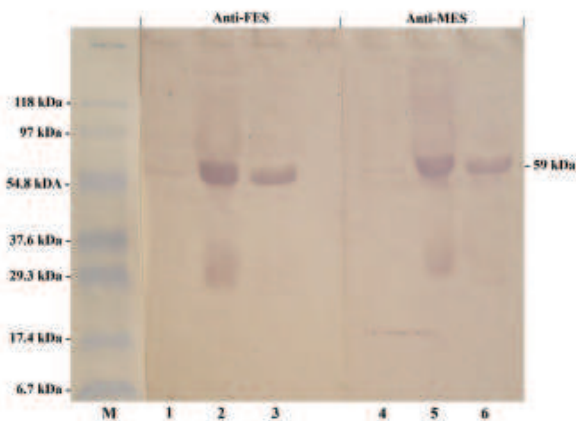
Protein dengan bobot molekul 59 kDa tersebut juga dapat ditemukan pada kultur *D. immitis*, baik kultur cacing jantung jantan maupun betina (Gambar 1), sehingga protein tersebut berpotensi sebagai marka diagnosis dirofilariasis, karena dapat dideteksi pada serum anjing yang terinfeksi oleh cacing jantung jantan dan/atau cacing betina.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan antara profil MES dengan FES; MES terdiri atas 12 pita protein dengan bobot molekul 14–118 kDa, sedangkan FES terdiri atas 18 pita protein dengan bobot molekul 10–205 kDa. Uji *Western Blotting* menunjukkan bahwa antibodi anti-MES dan anti-FES dapat bereaksi secara spesifik dengan protein dengan bobot molekul 59 kDa, dan protein tersebut berpotensi sebagai marka diagnosis dirofilariasis.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengembangkan pembuatan kit diagnosis yang dapat dipakai untuk mendeteksi antigen MES dan sekaligus juga FES yang beredar di dalam darah atau cairan tubuh lainnya.



Gambar 2. Hasil *Western Blotting* (M = marka protein; 1, 4 = serum anjing tidak terinfeksi *D. immitis*; 2, 3, 5, 6 = serum anjing terinfeksi *D. immitis*; 1, 2, 3 direaksikan dengan anti-FES; 4, 5, 6 direaksikan dengan anti-MES)

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih disampaikan kepada Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi, Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan atas bantuan dana melalui skim Penelitian Disertasi Doktor tahun anggaran 2013 dengan Surat Perjanjian Penugasan Nomor: 175.34/UN14.2/PNL.01.03.00/2013.

DAFTAR PUSTAKA

- Alia YY, May HK, Amall HA. 2013. Serological study of *Dirofilaria immitis* in human from some villages in Al-Hindya part of Karbala Governorate. *Int J of Sci and Nature* 4: 185–188.
- Atkins C. 2005. Canine Heartworm Disease. Dalam: Ettinger SJ, Felman EC (Ed). *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 6th Ed. Vol. 2. St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.
- Chenthamarakshan V, Padigel UM, Ramaprasad P, Reddy MVR, Harinath BC. 1993. Diagnostic utility of fractionated urinary filarial antigen. *J Biosci* 18: 319–326.
- Duran-Struuck R, Jost C, Hernandez AH. 2005. *Dirofilaria immitis* prevalence in a canine population in the Samana Peninsula (Dominican Republic) – June 2001. *Vet Parasitol* 133: 323–327.
- Filoni C, Pena HFJ, Gennari SM, Cristo DS, Torres LN, Catao-Dias JL. 2009. Heartworm (*Dirofilaria immitis*) disease in a Brazilian oncilla (*Leopardus tigrinus*). *Pesq Vet Bras* 29: 474–478.
- Kaneko H, Hayasaki M, Ohishi I. 1990. Antigenic identification of excretory-secretory product of adult *Dirofilaria immitis*. *Jpn J Vet Sci* 52: 995–1000.
- Lee KJ, Park GM, Yong TS, Im K, Jung SH, Jeong NY, Lee WY, Yong SJ, Shin KC. 2000. The first Korean case of human pulmonary Dirofilariasis. *Yonsei Med J* 41: 285–288.
- McCall JW, Supakaorndej N, Donoghue AR, TurnBull RK. 2000. Study to determine the performance of commercially available canine heartworm antigen test kits. In *Proceedings American Association of Veterinary Parasitologists, 45th Annual Meeting, July 22–25, 2000. Salt Lake City, Utah.*
- Murata K, Yanai T, Agatsuma T, Uni S. 2003. *Dirofilaria immitis* infection of a snow leopard (*Uncia uncia*) in a Japanese Zoo with mitochondrial DNA analysis. *J Vet Med Sci* 65: 945–947.
- Oge H, Oge S, Yildirim A, Kircali F, Kara M. 2005. Immunoblotting analysis of somatic components of *Dirofilaria immitis*. *Parasite* 12: 179–182.
- Ranjbar-Bahadori S, Eslami A, Bokaic S. 2007. Evaluation of different methods for diagnosis of *Dirofilaria immitis*. *Pakistan J of Biol Sci* 10: 1938–1940.
- Scott AL, Diala C, Moraga DA, Ibrahim MS. 1988. *Dirofilaria immitis*: Biochemical and immunological characterization of the surface antigens from adult parasites. *Exp Parasitol* 67: 307–323.
- Soeyoko. 1998. Pengembangan antibodi monoklonal spesifik terhadap antigen beredar *Brugia malayi* untuk diagnosis filariasis malayi. (Disertasi). Yogyakarta. Universitas Gadjah Mada.
- Song KH, Hayasaki M, Cholic C, Cho KW, Han HR, Jeong BH, Jeon MH, Park BK, Kom DH. 2002. Immunological responses of dogs experimentally infected with *Dirofilaria immitis*. *J Vet Sci* 3: 109–114.
- Theis JH, Gilson A, Simon GE, Bradshaw B, Clark D. 2001. Case Report: Unusual location of *Dirofilaria immitis* in a 28-year-old man necessitates orchietomy. *Am J Trop Med Hyg* 64: 317–322.
- Wang FI, Guo JJC, Tsai YC, Lin JYC. 2008. *Dirofilaria immitis* infection in a captive eurasian otter (*Lutra lutra*). *JVCS* 1: 138–141.
- Weil GJ. 1987. *Dirofilaria immitis*: Identification and partial characterization of parasite antigens in the serum of infected dogs. *Exp Parasitol* 64: 244–251.