

---

# Fraksinasi Protein Tegumen Cacing Hati (*Fasciola sp*) dan Tanggap Kebalnya pada Mencit

(FRACTIONATION TEGUMENT PROTEIN OF LIVER FLUKE  
(*FASCIOLA SP.*) AND THEIR IMMUNE RESPONSE IN MICE)

IDA AYU PASTI APSARI

Lab Parasitologi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan,  
Universitas Udayana, Jalan Dr.Goris Denpasar 80232

## ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengisolasi, mengidentifikasi, dan mengetahui tanggap kebal fraksi protein tegumen cacing hati pada mencit.

Protein tegumen diisolasi berdasarkan metode Oaks *et al.*, (1981) yang dimodifikasi oleh Wiest *et al.*, (1991) menggunakan tiga macam deterjen yaitu *sodium dodecyl sulphate* (SDS), triton X-100, dan *cetyl trimethyl ammonium bromide* (CTAB).

Protein yang terisolasi difraksinasi dengan *sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE).

Fraksi protein yang dihasilkan disuntikkan pada mencit untuk melihat tanggap kebalnya. Tanggap kebal yang terbentuk diukur dengan *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA).

Hasil penelitian mendapatkan pola fraksi protein yang sama dari ketiga deterjen yang digunakan. Protein tegumen cacing hati terfraksinasi menjadi 13 macam fraksi yang mempunyai berat molekul antara 6,5 kDa sampai 116 kDa. Fraksi protein utama yaitu berat molekul 12,9 kDa (P1), 26,6 kDa (P2), 40,6 kDa (P3) dan 60,9 kDa (P4), disuntikan pada mencit yang kemudian menghasilkan tanggap kebal yang tidak berbeda nyata ( $P > 0,05$ ).

Kata kunci : Tegumen, deterjen, SDS-PAGE, ELISA

**J Vet 2001 2 (3) : 83-88**

## ABSTRACT

Fresh *Fasciola Sp.* collected from infected cattle were used in this study. Tegument proteins were isolated using method described by Oaks *et al.* (1981) that has been modified by Wiest *et al.* (1991) three different detergent, such as sodium dodecyl sulphate (SDS), triton X-100 and cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) were used as lysis buffer for the tegument.

The proteins isolated from the tegument were then separated by sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Four major bands P1, P2, P3 and P4 with molecular weight approximately 12.9, 26.6, 40.6 and 60.9 kDa were respectively were isolated from gel. Each protein were injected into three mice.

The immune response of mice injected with each protein determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The result showed that there was no statistically significant ( $P > 0.05$ ) among three treatment.

Key words : Tegument, detergent, SDS-PAGE, ELISA

**J Vet 2001 2 (3) : 83-88**

## PENDAHULUAN

Pada saat ini, kemajuan dan perkembangan bioteknologi sudah sangat pesat sehingga memungkinkan untuk pembuatan vaksin serta reagen diagnostik terhadap cacing hati. Untuk maksud ini diperlukan cara atau metode isolasi antigen yang sesuai. Identifikasi dan karakterisasi antigen adalah hal yang mutlak guna pengembangan reagen diagnostik tersebut.

Penelitian terhadap antigen dari bahan tegumen beberapa spesies cacing sudah pernah dilakukan (Parkhouse *et al.*, 1981 yang dikutip oleh Anders *et al.*, 1982; Oaks *et al.*, 1981; Freedman *et al.*, 1988). Semua peneliti tersebut menggunakan deterjen untuk melarutkan antigen permukaan cacing. Informasi tentang efek deterjen untuk melarutkan permukaan cacing hati yang dihubungkan dengan sifat antigenesitas antigen permukaannya masih sangat terbatas, untuk itu perlu dilakukan penelitian untuk melihat pengaruh deterjen terhadap cacing hati.

Cacing hati sepanjang tubuhnya ditutupi oleh tegumen. Membran plasma terluar dilapisi oleh glikokaliks. Tegumen dan glikokaliks berperan dalam menimbulkan tanggap kebal dan juga pada interaksi secara fisiologis antara induk semang dan parasit (Smith dan Halton 1983 yang dikutip oleh Ikeda dan Oikawa, 1991). Cacing hati menghindarkan diri dari tanggap kebal induk semang melalui perubahan antigenesitas tegumen dan glikokaliks.

Deterjen melarutkan komponen lemak dan protein yang terdapat pada membran sel. Tingkat kelarutan membran permukaan dan protein yang terlarut berbeda-beda tergantung dari konsentrasi deterjen, kekuatan ionik deterjen dan pH dari deterjen yang

bersangkutan (Anders *et al.*, 1982). Protein yang larut merupakan antigen terbaik diantara komponen yang menyusun tegumen, karena besarnya ukuran dan kompleksnya struktur melekulnya. Dengan elektroforesis, protein dapat dipisahkan menjadi fraksi-fraksi protein berdasarkan berat melekulnya. Menurut Tizard (1982) dan Goodman (1982), kebanyakan protein yang memiliki sifat antigenik adalah yang berat melekulnya lebih besar dari 10 kDa.

## MATERI DAN METODE

### Bahan Penelitian

Penelitian ini menggunakan cacing hati yang diperoleh dari Rumah Pemotongan Hewan dengan tiga deterjen yaitu *sodium dodecyl sulphate* (SDS), triton X-100, *cetyl trimethyl ammonium bromide* (CTAB) sebagai bahan untuk isolasi protein. Gel akrilamid sebagai bahan untuk fraksinasi protein serta hewan percobaan mencit digunakan untuk melihat tanggap kebalnya yang akan dideteksi dengan ELISA menggunakan *antimouse IgG alkaline phosphatase conjugate*.

### Analisis Protein

Analisis protein tegumen secara kuantitatif menggunakan metode Oaks *et al.*, (1981) yang dimodifikasi oleh Wiest *et al.*, (1991) yaitu cacing hati segar yang diambil dari saluran empedu sapi, dicuci dengan *phosphate buffer saline* (PBS) steril sampai bersih. Setiap perlakuan menggunakan sepuluh cacing hati yang dimasukkan ke dalam tabung plastik. Tabung dikocok menggunakan vorteks dengan kecepatan maksimal selama 30 menit dan setiap lima menit ditambahkan 1 mM PMSF. Untuk perlakuan dengan deterjen (SDS, triton X-100, CTAB)

masing-masing ditambahkan 1 ml.. Hasil ekstraksi ini dipusing dengan kecepatan 15.000 g selama 15 menit pada 4°C. Supernatan hasil pemusingan diambil untuk dilakukan lyofilisasi menggunakan *freeze-dryer*. Hasil *freeze-dryer* ini berupa serbuk kering protein tegumen yang selanjutnya ditentukan konsentrasinya menggunakan *Bio-rad protein microassay* (Bradford, 1978).

Analisis protein secara kualitatif dengan metode Laemmli (1970) menggunakan SDS-Page untuk menentukan fraksi protein yang terbentuk. Fraksi protein yang terbentuk dari hasil elektroforesis, kemudian ditentukan berat molekulnya melalui perhitungan mobilitas relatif yang kemudian diestimasi pada kurva kalibrasi karakteristik protein standar.

#### Isolasi Protein dari PAGE

Isolasi protein dari *polyacrilamide gel electrophoresis* (PAGE) menurut metode Miller *et al.*, (1989) yaitu fraksi-fraksi protein yang terdapat pada PAGE dipilih empat jenis yang mempunyai berat molekul di atas 10 kDa (P1, P2, P3, dan P4). Masing-masing fraksi protein yang terpilih ini dipotong, dicuci tiga kali dengan PBS steril pH 7,4, dihancurkan dengan mortal, dan dilarutkan dengan PBS steril. Isolasi protein dari PAGE bertujuan untuk memperoleh protein sebagai antigen yang akan diinjeksikan pada mencit.

Protein antigen P1, P2, P3, dan P4 diemulsikan dengan *Freud adjuvant complete* 1:1. Kemudian setiap protein antigen diinjeksikan pada tiga ekor mencit dengan dosis 0,2 ml (2 mg/ml) tiap ekor mencit secara intraperitoneal. Injeksi diulang setiap dua minggu sekali dengan dosis yang sama. Pada injeksi yang ketiga diemulsikan dengan *Freud adjuvant complete*. Setelah delapan minggu dilakukan

pengambilan darah mencit untuk mengetahui tanggap kebalnya.

#### Analisis Data

Data yang diperoleh berupa konsentrasi protein hasil isolasi tegumen cacing hati, banyaknya fraksi protein dan berat molekul protein tegumen hasil elektroforesis, dan imunogenesitas protein yaitu tanggap kebal yang terbentuk pada mencit, dianalisis secara deskriptif dan analisis Varian (Gill, 1978).

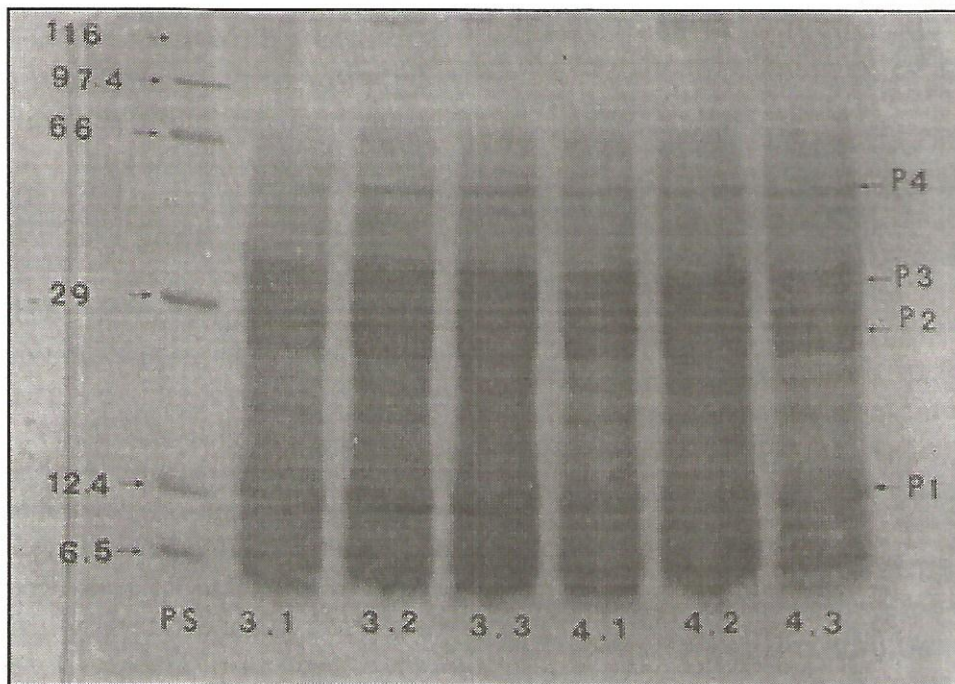
### HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis protein tegumen secara kuantitatif didapatkan hasil seperti Tabel 1. Rata-rata konsentrasi protein tegumen diisolasi tanpa deterjen, dengan SDS, triton X-100 dan CTAB berturut-turut adalah  $71,81 \pm 7,22 \mu\text{g}/\text{mg}$ ,  $66,04 \pm 24,61 \mu\text{g}/\text{mg}$ ,  $69,18 \pm 14,45 \mu\text{g}/\text{mg}$ , dan  $127,78 \pm 9,03 \mu\text{g}/\text{mg}$  dalam ekstrak kering. Hasil analisis varian menunjukkan perlakuan dengan deterjen pada protein tegumen menghasilkan konsentrasi protein yang berbeda sangat nyata ( $P < 0,01$ ). Analisis lebih lanjut dengan *Tuckey's HSD* menunjukkan perlakuan dengan deterjen CTAB sangat nyata ( $P < 0,01$ ) menghasilkan konsentrasi protein paling tinggi jika dibandingkan dengan ketiga perlakuan yang lain (Tabel 1). Hasil penelitian ini didukung oleh Freedman *et al.*, (1988) yang menyebutkan bahwa CTAB merupakan deterjen yang dapat melarutkan protein permukaan cacing paling baik jika dibandingkan dengan deterjen yang lain. Dalam penelitian ini, CTAB melarutkan protein lebih efisien dan mempunyai sifat mendenaturasi protein paling rendah jika dibandingkan dengan deterjen SDS dan triton X-100 sehingga dengan CTAB, protein tegumen lebih banyak dapat diisolasi.

Tabel 1. Konsentrasi Protein Tegumen Cacing Hati Hasil Isolasi dengan Deterjen yang Berbeda

Perlakuan	Ulangan	Konsentrasi protein ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	Rata-rata
Tanpa deterjen	1	70,236	71,82 a 7,22 (SD)
	2	79,684	
	3	65,512	
Deterjen SDS	1	32,236	66,04 a 24,61 (SD)
	2	79,900	
	3	90,708	
Deterjen triton X-100	1	49,764	69,18 a 14,45 (SD)
	2	84,408	
	3	3,384	
Deterjen CTAB	1	126,928	127,96 b 9,03 (SD)
	2	139,528	
	3	117,480	

Keterangan : huruf yang sama kearah kolom menunjukkan tidak berbeda nyata ( $P > 0,05$ ).  
SD = Standar Deviasi



Keterangan :  
 P1, P2, P3, dan P4 = Protein tegumen yang disuntikkan ke mencit  
 PS = Protein Standar  
 3.1, 3.2, 3.3 = Perlakuan dengan Triton X-100  
 4.1, 4.2, 4.3 = Perlakuan dengan CTAB

Gambar 1. Pola Protein Tegumen dengan Triton X-100 dan CTAB pada 15% SDS-PAGE

Tabel 2. Hasil Uji ELISA (OD) terhadap Protein (Antigen) Terpilih

Pengenceran	No	Kontrol	P1	P2	P3	P4
10 <sup>-1</sup>	1	0,291	1,129	0,843	0,851	0,994
	2	0,262	0,713	0,797	0,810	0,923
	3	0,251	0,837	0,798	0,996	1,185
10 <sup>-2</sup>	1	0,252	0,966	0,728	0,850	0,823
	2	0,249	0,707	0,726	0,740	0,890
	3	0,238	0,682	0,792	0,987	1,233
10 <sup>-3</sup>	1	0,209	0,868	0,558	0,482	0,466
	2	0,218	0,406	0,336	0,678	0,796
	3	0,197	0,425	0,635	0,548	1,018
10 <sup>-4</sup>	1	0,189	0,742	0,292	0,314	0,292
	2	0,180	0,284	0,252	0,549	0,603
	3	0,183	0,289	0,287	0,449	0,690

Analisis protein secara kualitatif dengan 15% SDS-PAGE terhadap protein yang terisolasi, baik tanpa deterjen maupun dengan deterjen hasilnya adalah sama, yaitu diperoleh gambaran 13 macam fraksi protein yang terpisah. Identifikasi fraksi-fraksi protein ini berdasarkan berat molekulnya diperoleh kisaran antara 6,5 kDa sampai 116 kDa.

Antigen yang diinjeksikan ke mencit dipilih pita-pita (*band*) protein utama yaitu P1, P2, P3, dan P4. Setelah dilakukan perhitungan mobilitas relatif (*Rf*) dan diestimasi ke kurva kalibrasi karakteristik protein standar menurut rumus Weber dan Osborn (1969) yang disitir oleh Supardi (1983), diperoleh berat molekul berturut-turut 12,897 kDa, 26,615 kDa, 40,613 kDa, dan 61,973 kDa.

Fraksi-fraksi protein utama ini dipilih sebagai antigen yang diinjeksikan ke mencit dan ternyata dapat menimbulkan tanggapan kebal dengan terbentuknya antibodi yang dapat dideteksi pada uji ELISA (Tabel 2).

Tabel 2 menunjukkan tanggapan kebal mencit terhadap P1, P2, P3 dan P4 yang jelas berbeda jika dibandingkan dengan kontrol, namun secara statistika ternyata tidak berbeda nyata ( $P > 0,05$ ). Dari hasil ini dapat disimpulkan bahwa antigen yang berasal dari protein tegumen cacing hati dengan berat molekul lebih dari 10 kDa, ternyata membentuk tanggapan kebal yang berbeda tidak nyata ( $P > 0,05$ ).

## KESIMPULAN

Protein tegumen cacing hati terpisah menjadi 13 macam fraksi protein yang mempunyai berat molekul antara 6,5 kDa sampai 116 kDa. Berdasarkan nilai OD fraksi protein dengan berat molekul berbeda membentuk tanggapan kebal yang secara statistika tidak berbeda nyata.

DAFTAR PUSTAKA

- Anders, R.F., R.J. Howard, and G.F. Mitchell.** 1982. Parasite Antigens and Methods of Analysis In : Immunology of Parasitic infection by Sydney Cohe and Kenneth S.W. Second Ed. Blackwell Scientific Pub. Oxford-London : 73-83.
- Bradford, C.E.** 1978. A Rapid and Sensitive Method for Qualitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Binding. Anal. Biochem. 72- 248.
- Freedman, D.O., T.B. Nutman, and E.A. Ottesen.** 1988. Enhached Solubilization of Immunoreactive Protein from *Brugia malayi* Adult Parasite Using Cetyltrimethyl Ammonium Bromide. Exp.Par. 65, 241-244.
- Georgi, J.R., and M.E. Georgi.** 1990. Parasitology for Veterinarians. 5<sup>th</sup> Ed. W.B. Saunders Company.
- Gill, J.L.** 1978. Design and Analysis of Experimental in the Animal and Medical Science. 1<sup>st</sup> Ed. Iowa State University, Press Ames, Iowa, USA.
- Goodman, J.W.** 1982. Immunogenicity and Antigenic Specificity In : Basic and Clinical Immunology. Ed.B. Stites, D.P. and A.I. Terr, Lange Medical Book. 7<sup>th</sup> Ed. 101-108
- Hanna, R.E.B.** 1980. *Fasciola hepatica* Glycocalyx Replacement in Juvenile as Possible Mechanism for Protection Against Host Immunity. Exp.Parasitol. 50-103.
- Ikeda, T., and Y. Oikawa.** 1991. *Paragonimus ohirai* : Immunobiochemical Characterization the Tegumental Glycocalyx of Excysted Juvenile Recognized by a Monoclonal Antibodies. Exp.Parasitol. 72, 252-261.
- Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of Stuctural Protein During Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature. 227, 680-685.
- Miller, S., D.M. Rekosh, and P.T. Levende.** 1989. *Schistosoma mansoni* :Identification and Characterization Schistomula Polypeptides. Exp. Parasitol. 69, 244-262.
- Oaks, J.M., G.D. Cain, D.A. Mower, and R.K. Raj.** 1981. Disruption and Removal of the Tegumen from *Schistosoma mansoni* with Triton X-100. J.Parasitol. 67 (6)761-775.
- Supardi, W.** 1983. Isolasi dan Karakterisasi Suatu Protease Sulfidril dan Spermatozoa Sapi Fresien Holstein. Disertasi Doktor, ITB, Bandung.
- Tizard, I.A.N.** 1982. Pengantar Imunologi Veteriner. Edisi Kedua. UI.Press. Jakarta.
- Wiest, P.W., G.R. Old, and W.D. Bowen.** 1991. *Shistosoma mansoni* : Protein Phosphorilation During Transformation of Cercariae to Schistomula. Exp.Parasitol. 73, 214-222.