

616, 980.4,

Karakterisasi Antigen Larva Filariform Cacing Kait (*Ancylostoma* spp.)

Oleh: Sri Sumarni, Soeyoko dan Umayah

Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran
Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

ABSTRACT

Sri Sumarni, Soeyoko and Umayah - *Characterization of antigens of hookworm larvae (Ancylostoma spp.)*

Cutaneous larva migrans (CLM) is caused by animal hookworm larvae in man. The conventional diagnosis and treatment of CLM will injure the skin of the patients, and the results are not satisfying. Therefore it should be necessary to do the serological test to diagnose CLM.

The antigens were prepared by extracting the hookworm larvae in CTAB detergent, and injected into Balb/C mice. Characterization of antigens were done quantitatively (by spectrophotometer) and qualitatively (by SDS PAGE electrophoresis).

The results showed that the titre rate of hookworm larvae antigens was 145 ug/ml. The antigens consist of 4 protein fractions with molecular weight of 25 KD, 55 KD, 66 KD and above 66 KD. Those antigens apparently generated high immune response in immunized mice.

Key Words: *Ancylostoma* spp. - CTAB detergent - SDS PAGE electrophoresis - immunology - parasitology

PENGANTAR

Macam-macam spesies cacing kait dapat menginfeksi dan menjadi dewasa dalam usus manusia, yaitu *Ancylostoma duodenale* dan *Necator americanus*. Tetapi ada pula cacing kait hewan (anjing dan kucing) yang dapat menginfeksi manusia dan menyebabkan larva migrans cutaneosa, yaitu: *Ancylostoma ceylanicum*, *A. caninum* dan *A. braziliense*. Ketiga macam cacing kait ini biasanya bersama-sama menginfeksi seekor anjing, sehingga dalam biakan yang dibuat dari tinja anjing dapat ditemukan ketiga macam spesies cacing kait tersebut (Noerhajati *et al.*, 1978).

Larva migrans cutaneosa pada manusia terjadi apabila larva filariform cacing kait hewan (*Ancylostoma* spp.) masuk ke dalam kulit, menimbulkan bercak merah yang terasa gatal. Didalam kulit larva tersebut membentuk semacam terowongan intrakutan yang sempit, berkelok-kelok dan semakin bertambah panjang setiap hari, yang dibentuk karena perpindahan larva. Perjalanan larva dalam jaringan menimbulkan eosinofilia lokal, pruritus dan terjadi infiltrasi di

sekitar terowongan tersebut. Hal ini dapat terjadi beberapa minggu sampai beberapa bulan.

Diagnosis larva migrans cutaneosa secara konvensional dapat dilakukan dengan melihat adanya bercak merah yang berkelok-kelok pada kulit, yang bertambah panjang setiap hari. Pengobatan dengan pemberian etil-klorida yang disempatkan pada kulit, lalu dilakukan pengambilan larva dengan membuat irisan pada kulit sering menimbulkan bekas luka yang lebih buruk daripada infeksi oleh larva itu sendiri (Faust *et al.*, 1977). Untuk mengatasi hal tersebut maka perlu dilakukan pemeriksaan serologis untuk diagnosis larva migrans cutaneosa, supaya meluasnya penyakit ini dapat dicegah tanpa mengurangi keindahan dan kemulusan kulit penderita.

Dengan perkembangan ilmu dan teknologi terutama dalam bidang imunologi, maka dapat dilakukan pemeriksaan serologis yang menggunakan antigen dari larva filariform cacing *Ancylostoma* spp. Protein larva cacing ini dapat diperoleh dengan cara mengekstraksi menggunakan "detergent". Yang paling efektif untuk mengekstraksi larva cacing adalah dengan "detergent" CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*) (Freedman *et al.*, 1988). Maka dalam penelitian ini dilakukan ekstraksi larva filariform *Ancylostoma* spp. dengan CTAB, untuk mendapat protein yang akan digunakan sebagai antigen. Juga dilakukan analisis kuantitatif dan kualitatif protein yang diperoleh. Untuk menguji sifat antigenisitas protein larva filariform *Ancylostoma* spp. yang didapat, dilakukan imunisasi pada mencit Balb/C dan uji Elisa dengan serum mencit tersebut (Campbell, 1984). Dengan mengetahui sifat-sifat antigen larva filariform cacing *Ancylostoma* spp, maka dapat digunakan dalam pemeriksaan serologis untuk mengetahui terjadinya infeksi larva migrans cutaneosa.

BAHAN DAN CARA KERJA

Penelitian dilakukan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, bulan Juni – September 1991. Dilakukan pembuatan biakan tinja anjing untuk memperoleh larva filariform *Ancylostoma* spp, dengan cara modifikasi Baerman-Whitlock (Sri Sumarni & Noerhajati, 1988). Larva yang diperoleh dikumpulkan dalam larutan PBS (*Phosphate Buffer Saline*) dan disimpan dalam suhu -20°C. Hal ini dilakukan berulang kali sampai jumlah larva mencapai ± 10 000 ekor. Kemudian larutan PBS diambil sampai bersih dengan pipet dan larva direndam dalam 2 cc larutan CTAB 1% dan dibiarkan selama 1 malam pada suhu 4°C. Larva dalam larutan CTAB disentrifus selama 2 jam dengan kecepatan 2 000 rpm, lalu supernatannya diambil. Ini diharapkan mengandung protein antigen dari permukaan tubuh larva filariform *Ancylostoma* spp. dan dilakukan penetapan protein secara kuantitatif dengan menggunakan spektrofotometer dengan sinar ultraviolet, panjang gelombang 280 nm.

Juga dilakukan penetapan protein secara kualitatif untuk mengetahui macam-macam fraksi protein yang ada, dengan cara elektroforesis dengan SDS PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Poly-Acrylamide GEL*) (Walker, 1986). Untuk uji antigenisitas protein yang diperoleh, dilakukan imunisasi dengan menyuntikkan antigen larva filariform *Ancylostoma* spp. pada mencit Balb/C secara subkutan. Pada penelitian ini digunakan 3 ekor mencit Balb/C, yang diambil serumnya

sebelum diimunisasi (sebagai serum kontrol negatif/serum preimun). Imunisasi dilakukan 3 x dengan dosis 100 µg/ml pada mencit masing-masing. Jarak tiap tahap imunisasi adalah 1 minggu, dan sebelum dilakukan imunisasi serum mencit diambil lebih dahulu. Satu minggu setelah imunisasi tahap III serum mencit diambil dan dilakukan imunisasi tahap IV dengan menyuntikkan antigen larva cacing secara intravena dengan dosis 100 µg/ml. Empat hari kemudian serum mencit diambil. Uji antibodi mencit yang sudah diimunisasi dilakukan dengan cara Elisa. Hasilnya dibaca dengan mikrospektrofotometer (*microElisa reader*) panjang gelombang 492 nm, untuk mengetahui titer antibodi. Sebagai kontrol positif digunakan serum mencit yang telah diinfeksi dengan larva filariform *Ancylostoma* spp.

HASIL PENELITIAN

Hasil analisis protein antigen larva filariform *Ancylostoma* spp.

1. Hasil penetapan kadar protein kuantitatif.

Besarnya kadar protein kuantitatif setelah diukur dengan spektrofotometer (sinar ultraviolet, panjang gelombang 280 nm) menunjukkan kadar yang bervariasi (TABEL 1).

TABEL 1. - Kadar protein larva filariform *Ancylostoma* spp. yang diperoleh dengan ekstraksi menggunakan *detergent* CTAB.

Percobaan	Jumlah Larva Diekstraksi	Kadar Protein (µg/ml)
I	10 000	183
II	10 000	118
III	10 000	133
Rerata	10 000	145

2. Hasil penetapan kadar protein kualitatif.

Setelah dilakukan elektroforesis dengan SDS-PAGE (Walker, 1986) terhadap larva filariform *Ancylostoma* spp., ternyata ekstrak larva cacing tersebut mengandung 4 macam fraksi protein dengan berat molekul (BM) yang bervariasi antara 25 000 - > 66 000 dalton atau antara 25 KD - > 66 KD (TABEL 2).

TABEL 2. - Berat molekul fraksi-fraksi protein larva filariform *Ancylostoma* spp.

No.	Protein	Berat Molekul (Dalton)
	I	> 66.000
	II	= 66.000
	III	55.000
	IV	25.000

Hasil uji antigenisitas protein larva filariform *Ancylostoma* spp.

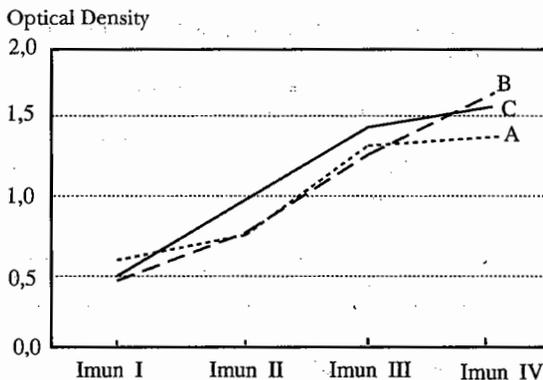
Pada penelitian ini telah dilakukan imunisasi pada 3 ekor mencit Balb/C untuk mengetahui antigenisitas protein larva filariform *Ancylostoma* spp. uji responsi antibodi pada mencit dilakukan dengan cara Elisa, hasilnya dapat dilihat pada TABEL 3.

TABEL 3. – Hasil pembacaan kenaikan titer antibodi mencit dengan *MicroElisa Reader* setelah imunisasi 4 x.

No. Mencit	Blank	Kontrol		OD Serum Setelah Imunisasi			
		Positif	Negatif	I	II	III	IV
1	0,044	1,103	0,295	0,429	0,696	1,213	1,476
2	0,044	1,103	0,295	0,530	0,705	1,182	1,696
3	0,044	1,103	0,295	0,476	0,863	1,287	1,538

OD: *Optical Density*

Hasil pembacaan kenaikan angka-angka OD serum mencit setelah diimunisasi I–IV menunjukkan kenaikan responsi imun atau kadar antibodi dalam serum mencit tersebut. Gambaran kenaikan responsi imun tiap-tiap mencit dapat dilihat pada grafik berikut ini (GAMBAR 1).



GAMBAR 1. – Kenaikan responsi imun tiap-tiap mencit setelah immunisasi I–IV.

PEMBAHASAN

Pada penelitian ini hanya dilakukan 3 kali percobaan untuk mengukur kadar protein larva filariform *Ancylostoma* spp. mengingat sulitnya mengumpulkan larva tersebut dalam jumlah besar. Setiap kali percobaan dikumpulkan $\pm 10\,000$ ekor larva filariform yang berasal dari biakan tinja anjing. Larva cacing tersebut diekstraksi dengan menggunakan *detergent* CTAB. *Detergent* ini mempunyai sifat menarik protein yang terdapat pada permukaan kulit larva filariform, sehingga protein terlarut dalam cairan ekstrak *buffer* CTAB. Banyak sedikitnya protein yang tertarik ke luar sangat tergantung pada efektifitas *detergent* dan ikatan biokimia protein permukaan kulit larva filariform *Ancylostoma* spp. (Goding, 1983). Pada percobaan ini diperoleh kadar protein antara 113–183 $\mu\text{g/ml}$ (TABEL 1). Hal ini mungkin disebabkan larva filariform *Ancylostoma* spp. yang

terkumpul tidak mempunyai tingkat kesegaran yang sama, sehingga ikatan protein pada tiap-tiap ekor larva filariform tidak sama.

Dari hasil pada TABEL 2 terlihat bahwa fraksi-fraksi protein larva filariform *Ancylostoma* spp. yang diperoleh terdapat 1 fraksi protein yang BM-nya > 66 000 dalton. Dari besarnya berat molekul protein yang diperoleh dapat menunjukkan sifat antigenisitas protein tersebut. Hal ini dapat dilihat dari hasil uji antigenisitas protein larva filariform *Ancylostoma* spp. setelah diimunisasikan pada mencit Balb/C.

Dari hasil pembacaan kenaikan angka-angka *optical density* (OD) serum mencit setelah diimunisasi I – IV, menunjukkan kenaikan responsi imun atau kadar antibodi dalam serum mencit tersebut (TABEL 3). Mulai imunisasi III pada ketiga ekor mencit menunjukkan hasil melebihi kontrol positif. Hal ini berarti bahwa protein larva filariform *Ancylostoma* spp. yang diperoleh dengan cara ekstraksi menggunakan *detergent* CTAB mempunyai sifat antigenisitas, meskipun titer antibodi yang diperoleh dari ketiga ekor mencit tersebut berbeda. Hal ini menunjukkan bahwa responsi imun mencit masing-masing berbeda, meskipun cara imunisasi dan dosis yang digunakan adalah sama. OD setelah imunisasi IV dengan cara intravena menunjukkan hasil yang meningkat baik pada mencit 1, 2 dan 3. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian antigen secara intravena dapat menyebabkan kenaikan titer antibodi yang maksimal. Karena antigen tersebut langsung dibawa oleh darah dan merangsang timbulnya responsi imun.

KESIMPULAN

1. Antigen larva filariform *Ancylostoma* spp. dapat diperoleh dengan cara ekstraksi menggunakan larutan *detergent* CTAB.
2. Kadar protein larva filariform *Ancylostoma* spp. rata-rata 145 µg/ml. Antigen tersebut terdiri dari 4 fraksi protein dengan berat molekul: 25 KD, 55 KD, 66 KD dan > 66 KD.
3. Protein larva filariform *Ancylostoma* spp. mempunyai sifat antigenisitas.

KEPUSTAKAAN

- Campbell, A. M. 1984 *Monoclonal Antibody Technology*. Elsevier Sci. Publ., Amsterdam.
- Faust, E. C., Russel, P. F., & Young, R. C. 1977 *Craig and Faust's Clinical Parasitology*, 8th ed. Lea & Febrieger, Philadelphia.
- Freedman, D. O., Nutman, T.B., & Offesen, E. A. 1988 Enhanced solubilization of immunonecture protein from *Brugia malayi* adults parasites using cecyl-trimethyl-ammonium-bromide (CTAB). *Experiment Parasit.* 65:244-50.
- Goding, J. W. 1983 *Monoclonal Antibodies Principles and Practice*. Academic Press Inc., London.
- Noerhajati, S., Soebagyo, L., Soenarno, Cholid, A. B., Sutarti, E., & Daryono 1978 Studies on the prevalence of hookworm in the dog intestine and the pathology of the intestinal wall. *SEA J. Trop. Med. Publ. Hlth* 9(2):237-43.
- Sri Sumarni, & Noerhajati, S. 1988 Daya infeksi larva filariform *Ancylostoma* sp. pada anjing setelah pemberian pupuk urea. *B. Penelit. Pasca Sarjana UGM* 4(1):599-607.
- Walker, J. M. 1986 SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins, dalam R. J. Slater (ed.): *Experiments in Molecular Biology*, pp. 149-58. Humana Press, Clifton, New Jersey.