

Antigenesitas, Sensitivitas dan Spesifisitas Protein 27 -28 kDa dari Material *Excretory-Secretory* (ES) *Fasciola* spp pada Diagnosis Distomatosis Serum Sapi dengan Teknik *Indirect-ELISA*

Antigenecity, Sensitivity and Spesificity of 27 -28 kDa Protein of *Fasciola* spp *Excretory-Secretory* (ES) Material for Distomatosis Diagnosis in Cattle Sera by Using *Indirect -ELISA* Technique

Kusnoto

Departemen Parasitologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, Surabaya ,
e-mail: kusnotokk@yahoo.com, kusnoto3k@unair.ac.id

Abstract

This research was aimed to find out antigenic protein with high sensitivity and specivicity for producing a diagnostic kit of distomatosis through blood test of patients. Isolation and identifi cation of protein originated from ES of *Fasciola* spp were focused to get P27-28 kDa. In the first step mature of *Fasciola* spp adult were incubated in RPMI medium for producing ES protein. The second step, the protein fractions were determinated to carry out based on MR result and then this protein was isolated by preparative gel electrophoresis. The third step, the specific protein was identified by SDS - PAGE with silver stain. The fourth step, tests of sensitivity and specificity for CatL protein which was isolated in the second step and these procedure were also carried out for ES protein which was isolated in the first step. The result showed: 1) It was isolated various proteins, that were proteins in the molecular weight (MW) 40, 35, and 27 -28 kDa and 2) As a material for diagnostic test, P27 -28 kDa with the points 63.6% of sensitivity and 87.5% spesificity was better than ES protein with the points 100% of sensitivity but its sensitivity was 0%.

Key words: *Fasciola* spp, antigenecity, sensitivity and spesificity.

Pendahuluan

Fasciolosis atau distomatosis adalah penyakit yang disebabkan oleh infeksi cacing trematoda *Fasciola* spp. (Bunnag *et al.*, 1992; Jithendran and Bhat, 1999; Tolan, 2003). Untuk memastikan keberadaan cacing hati di dalam tubuh ternak ada beberapa kendala, antara lain teknik yang digunakan dan umur cacing. Teknik deteksi secara konvensional dengan menemukan telur cacing dalam feses hanya dapat dilakukan apabila cacing sudah dewasa dan memproduksi telur yakni sudah melewati masa periode prepaten (13-16 minggu). Perubahan enzimatik dalam darah secara tidak langsung juga dapat digunakan untuk menduga keberadaan parasit di dalam hati setelah melalui diagnosis banding. Uji serologik dengan teknik ELISA dapat digunakan untuk mendeteksi adanya antibodi di dalam darah, teknik ini sangat sensitif dan dapat digunakan untuk mendeteksi infeksi dini ataupun yang sudah lanjut. Namun teknik ini mempunyai kelemahan, yaitu tidak dapat mendeteksi secara pasti apakah infeksi cacing masih berlangsung atau sudah berlalu, di samping itu apabila antigen yang digunakan tidak spesifik, maka

spesifisitas uji menjadi rendah. Oleh karena itu perlu dicoba mengembangkan teknik tersebut dengan mempertimbangkan protein antigen dominan dan mengisolasinya, sehingga didapatkan protein murni guna memperoleh bahan uji yang lebih spesifik terhadap *Fasciola* spp dan mudah diaplikasikan.

Infeksi oleh cacing genus *Fasciola*, yang dikenal dengan sebutan fasciolosis atau distomatosis, pada sapi dan kerbau biasanya bersifat kronis, sedangkan pada domba dan kambing bersifat akut. Penyakit ini pada ternak perlu mendapat perhatian, karena kerugian yang ditimbulkan amat besar (diperkirakan 20 milyar rupiah per tahun) berupa penurunan berat badan, terhambatnya pertumbuhan, hati yang terbuang dan kematian hewan. Di samping itu kerugian dapat berupa penurunan tenaga kerja dan daya tahan terhadap penyakit lain yang tidak terhitung (Levine, 1978; Soulsby, 1986).

Penegakan diagnosis distomatosis memerlukan uji dan bahan uji dengan spesifisitas tinggi. Teknik *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) merupakan metode yang baik dan dapat dikembangkan untuk mendiagnosis penyakit tersebut. Spesifisitas bahan

uji juga diperlukan mengingat banyaknya protein yang tidak spesifik pada infeksi parasit. Penggunaan antigen *crude protein* untuk diagnosis distomatosis tidaklah spesifik, karena antigen ini terdiri dari berbagai macam protein sehingga dikenali pula oleh antibodi terhadap cacing lain. Oleh karena itu perlu dilakukan isolasi dan karakterisasi terhadap protein spesifik, agar diperoleh protein murni dengan antigenesitas dan spesifisitas yang tinggi. Dalam hal ini *cathepsin-L* (CatL), yang terdapat dalam *excretory-secretory* (ES) material, memiliki antigenesitas yang dapat diandalkan karena merupakan antigen yang sangat potensial pada *Fasciola* spp (Estuningsih, 2003; Estuningsih dkk., 2003). Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi protein CatL dari protein ES *Fasciola* spp yang diperkirakan memiliki massa molekul relatif (MR) 27-28 kDa dan melakukan karakterisasi. Selanjutnya dilakukan pengujian antigenesitas sensitivitas dan spesifisitas terhadap serum tersangka maupun penderita distomatosis. Mengingat kemungkinan terjadi reaksi silang (*cross reaction*) antar sesama infeksi parasit, maka perlu adanya kontrol positif, dalam hal ini digunakan serum sapi yang terinfeksi cacing kelas Nematoda (*nematodosis*).

Hal yang perlu diperhatikan adalah bahwa pada semua stadium selalu terdapat protein yang tetap di samping beberapa protein lain yang berbeda, karena profil protein pada setiap stadium kehidupan parasit pada umumnya mempunyai kesamaan ataupun perbedaan bergantung kepada stadium hidupnya (Patterson, 1989). Protein yang selalu dapat ditemukan pada seluruh stadium dikenal dengan protein dominan (*predominantly protein*) (Kooyman *et al.*, 2000).

Penelitian ini merupakan lanjutan dari penelitian tentang Identifikasi Protein Spesifik *Fasciola* spp dengan Teknik SDS-PAGE dan *Western Blot*, bertujuan untuk mengisolasi protein CatL dari material ES *Fasciola* spp sebagai dasar pengembangan diagnosis distomatosis pada sapi. Penelitian ini terdiri dari beberapa tahap, yaitu membuat antigen ES *Fasciola* spp dengan *Rose Park Memorial Institute* (RPMI), isolasi protein CatL, pengujian sensitivitas dan spesifisitas protein CatL maupun ES terhadap serum sapi tersangka maupun penderita distomatosis.

Metode Penelitian

Isolasi material ES *Fasciola* spp

Fasciola spp dewasa diisolasi dari saluran empedu sapi Madura penderita distomatosis yang dipotong di Rumah Potong Hewan (RPH) Pegirian Surabaya. Cacing dewasa kemudian diinkubasikan dalam medium RPMI dan *phosphate buffer saline* (PBS) pada suhu 37°C untuk mendapatkan material *excretory/secretory* (ES). Material ES kemudian

disimpan untuk isolasi protein dengan MR 27-28 kDa dan pengujian sensitivitas maupun spesifisitas.

Isolasi Protein

Gel silinder dimasukkan melalui sistem selang dan protein eluasi ditranspor sampai bawah membran dialisis. Selanjutnya sampel dicampur dengan *Laemmli buffer*. Untuk gel pemisah protein digunakan konsentrasi 17% akrilamid kemudian di biarkan polimerisasi pada suhu ruang. Setelah itu ditambahkan akrilamid 4%, kemudian 250 µl sampel dimasukkan. Arus listrik yang digunakan 99,9 Volt, 50 mA dan 12 W dan selanjutnya protein ditampung dalam 125 tabung 4 ml dan jika sudah bereaksi sampai bawah, maka koleksi protein dihentikan. Selanjutnya protein ditaruh pada suhu 4°C dan dilakukan analisis protein lagi secara biokimiawi untuk menentukan protein CatL (Rantam, 1997).

Analisis Protein Hasil Isolasi dengan Teknik SDS-PAGE

Protein hasil elusi dari material ES cacing dewasa *Fasciola* spp selanjutnya dilakukan *running* dengan teknik *sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE). Komposisi SDS-PAGE yang digunakan adalah *separating gel* 12% (2,5 ml akrilamid; 1,2 ml Tris-HCl pH 8,8; 1,2 ml SDS 0,5%; 1,1 ml aquadest, 50 µl Temed dan 30 µl APS 10%) dan *stacking gel* 10% (0,66 ml akrilamid; 0,8 ml Tris-HCl pH 6,8; 0,8 ml SDS 0,5%; 0,74 ml aquadest; 4 µl Temed dan 20 µl APS 10%). Setelah larutan gel pemisah 12% dimasukkan ke dalam *gel plate* pada posisi vertikal kemudian di atasnya diberi butanol sampai mengeras kemudian butanol dibuang dan dibersihkan dengan PBS dan dikeringkan dengan kertas *Whatman*.

Selanjutnya ditambahkan *stacking gel* dan setelah itu dimasukkan *comb* dan ditunggu sampai siap untuk *running*. *Plate* berisi gel kemudian dipasang pada Minigel Twin G-42 slab dan dituangkan *electrophoresis buffer* (30,29 g Tris aminomethan; 144,13 g glisin; 10 g SDS dalam 1000 ml aquadest).

Sebanyak 15 µl sampel berupa protein spesifik dari ES *Fasciola* spp dewasa ditambah *Laemmli buffer* sama banyak. Sampel kemudian didenaturasi dengan *Laemmli buffer* (Tris-HCl pH 6,8 1,0 ml, gliserin 0,8 ml, SDS 10% 1,6 ml, bromfenolblue 0,5% 0,4 ml, merkaptoetanol 5% 50 µl, dan aquades 3,8 ml) pada pemanasan 100°C selama 5 menit, dimasukkan pada sumuran *stacking gel*. Sebagai marker digunakan protein dengan berat molekul pada kisaran 14,5-200 kDa produksi BIO-RAD. Elektrophoresis di-*running* dengan tegangan 40 V dengan kuat arus 10 mA dan ditingkatkan menjadi 120 V 25 mA ketika sampel telah melewati *stacking gel*; kira-kira selama 1-2 jam.

Pencucian terhadap gel hasil *running* dilakukan 3 tahap, yaitu: 1) Pencucian pertama, menggunakan 25 ml metanol 50%, 3,75 ml asam asetat 7,5% dan 71,25 ml aquadest selama 30 menit; 2) Pencucian kedua, menggunakan 2,5 ml metanol 5%, 3,75 ml asam asetat 7,5% dan 93,75 ml aquadest selama 20 menit; dan 3) Pencucian ketiga, menggunakan glutaraldehid 10% selama 25 menit. Gel kemudian diwarnai dengan teknik pewarnaan silver (1,6 g AgNO₃ dalam 8 ml aquadest; 42 ml NaOH 0,36%; 2,8 ml NH₃ 25% dalam 147 ml aquadest) selama 15 menit, dilanjutkan pencucian 2 kali 2 menit dengan 100 ml aquadest dan kemudian ditambahkan larutan pengembang warna (200 µl asam sitrat 5%; 100 µl formaldehid 37% dalam aquadest 200ml) dan dilakukan pencucian kembali selama 2 kali 2 menit dengan 100 ml aquadest. Setelah gel terwarnai kemudian dimasukkan dalam larutan asam asetat 10% untuk menghentikan proses pengecatan. Selanjutnya gel didokumentasi dan disimpan pada larutan gliserin 10% (Harlow dan Lane, 1988).

Uji Antigenisitas Protein 27-28 kDa dan ES terhadap Serum Sapi dengan Teknik *indirect*-ELISA

Pengujian antigenisitas dilakukan terhadap protein 27-28 kDa dan ES hasil isolasi dari tahap sebelumnya sebagai antigen terhadap antibodi (anti-*Fasciola* spp) dari sampel serum darah sapi. Pengujian dilakukan dengan teknik *indirect*-ELISA dan serum diperoleh dari sapi tersangka dan penderita distomatosis yang sebelumnya dilakukan skrining dengan pengamatan pascamati maupun pemeriksaan feses secara mikroskopis.

Uji Sensitivitas dan Spesifisitas Protein 27-28 kDa dan ES terhadap Serum Darah Sapi Tersangka dan Penderita Distomatosis

Serum darah yang diuji dipastikan berasal dari sapi penderita Distomatosis dengan infeksi tunggal. Untuk memastikan keberadaan infeksi tersebut diambil serum darah sapi yang dipotong di RPH Pegirian Surabaya dengan memeriksa saluran pencernaan dan hepar sapi sampel, disamping itu juga dilakukan pengambilan sampel feses untuk diperiksa keberadaan telur cacing dengan mikroskop pembesaran 100x. Sampel yang memenuhi kriteria ditentukan sebanyak 22 ekor sapi penderita distomatosis dan 8 serum kontrol positif dari serum sapi Madura yang terinfeksi cacing Nematoda. Serum tersebut kemudian diperiksa dengan teknik *indirect*-ELISA. Antigen yang digunakan adalah protein 27-28 kDa (CatL) dan ES *Fasciola* spp hasil isolasi dari tahap sebelumnya. Sensitivitas dan spesifisitas dihitung dengan tabulasi silang seperti terlihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Tabulasi Silang Penghitungan Nilai Sensitivitas dan Spesifisitas

	Hasil ELISA		Total
	OD +	OD -	
Distomatosis +	a	b	a + b
Distomatosis -	c	d	c + d
Total	a + c	b + d	a + b + c + d

$$\text{Sensitivitas} = \frac{a}{a + b} \times 100 \%$$

$$\text{Spesifisitas} = \frac{d}{c + d} \times 100 \%$$

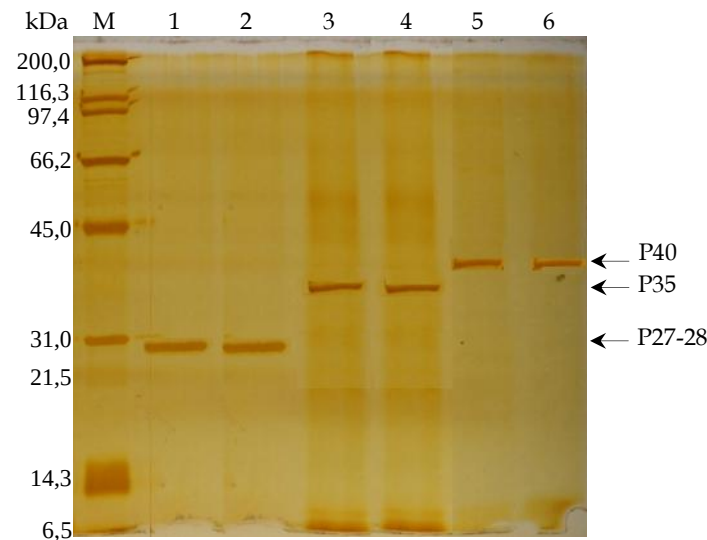
Hasil dan Pembahasan

Isolasi Protein 27-28 kDa dari *Excretory-Secretory* (ES) *Fasciola* spp

Berdasarkan hasil preparasi protein dengan teknik SDS-PAGE dan karakterisasi protein dengan teknik *Western blot* dari penelitian terdahulu diperoleh beberapa protein spesifik antara lain 130, 108, 58, 45, 40, 35, 26, 27, 25, 18, 15 dan 8 kDa (Mumpuni dkk., 2005). Oleh karena itu pada penelitian ini telah dilakukan isolasi protein spesifik tersebut yang difokuskan pada protein dengan MR 27-28 kDa, namun demikian juga dilakukan isolasi terhadap P35 dan P45 kDa. Protein hasil isolasi tersebut kemudian dilakukan *running* SDS-PAGE kembali. Dokumentasi hasil analisis protein murni hasil isolasi dari ES *Fasciola* spp disajikan pada Gambar 1.

Pada Gambar 1 protein dengan MR 27-28 kDa tampak lebih dominan dibanding protein yang lain, sedangkan protein dengan MR 40 dan 35 kDa tampak diekspresikan dengan kualitas yang hampir sama. Perbedaan ekspresi pita protein antara P27-28 dengan protein lain ini menunjukkan perbedaan secara genetik di antara ketiga protein tersebut, karena meskipun berat molekul sama tetapi bila ekspresinya terdapat perbedaan, maka secara genetik terdapat perbedaan pula (Kusnoto, 2003). Hal ini juga memberikan gambaran bahwa P27-28 (*cathepsin L*) dapat dimanfaatkan sebagai bahan uji (antigen) untuk diagnosis distomatosis (Spithill *et al.*, 1999; Cornevale *et al.*, 2001).

Berdasarkan analisis regresi tersebut diperoleh hubungan berbentuk kubik dengan nilai $b_0 = 5,462$, $b_1 = 3,906$, $b_2 = 5,964$, dan $b_3 = 3,7$ sehingga diperoleh persamaan garis regresi $y = 5,462 - 3,906x + 5,964x^2 + 3,7x^3$. Persamaan garis tersebut digunakan untuk menghitung MR protein pada sampel (Tabel 3).



Gambar 1. Analisis protein hasil isolasi catL dari protein ES *Fasciola* spp dengan teknik SDS-PAGE. M, marker (Sigma); Kolom 1-2, catL (P27-28); kolom 3-4, P35; dan kolom 5-6, P40 kDa.

Tabel 2. Penghitungan MR Protein pada Marker

Jarak	RF ¹	MR ² (y KDa)	MR ² (y Da)	log y (Da)
5.0	0.044	200.0	200000	5.301
14.5	0.127	116.3	116300	5.066
16.5	0.145	97.4	97400	4.989
27.5	0.241	66.0	66000	4.820
43.0	0.377	45.0	45000	4.653
69.0	0.605	31.0	31000	4.491
77.0	0.675	21.5	21500	4.332
102.0	0.895	14.3	14300	4.155
113.0	0.991	6.5	6500	3.813

¹RF=*Retardation factor*, merupakan jarak pergerakan protein dari tempat awal dibanding jarak pergerakan w arna dari tempat awal; ²MR=massa molekul relatif.

Tabel 3. Hasil Penghitungan Berat Molekul Protein Cacing *Fasciola* spp pada Gel SDS-PAGE

No.	Jarak	Rf	Log y ¹ Da	MR ² Da	MR ² kDa
1	47.0	0.412	4.606	40364.50	40
2	55.0	0.482	4.550	35481.30	35
3	70.5	0.618	4.452	28313.90	28
4	73.0	0.640	4.435	27227.00	27

¹y=5,462-3,906x+5,964x²+3,7x³; ²MR=massa molekul relatif.

Uji Antigenisitas Protein CatL dan ES terhadap Serum Sapi dengan Teknik *indirect*-ELISA

Rata-rata nilai *optical density* (OD) yang diperoleh dari hasil pemeriksaan serum darah sapi tersangka maupun penderita distomatosis dengan teknik *indirect*-ELISA baik menggunakan antigen P27-28 (catL) maupun ES disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Rata-rata Nilai *Optical Density* Hasil Pengujian Antigenesitas P27-28 dan ES *Fasciola* spp terhadap Antibodi dengan Teknik *Indirect*-ELISA

Antigen coating	Nilai OD ₄₀₅
Protein 27-28	0,241 ^b
Protein ES	0,756 ^a
Kontrol (-) Serum	0,110
Kontrol (-) PBS	0,005

^{a, b} superskrip berbeda pada kolom sama menunjukan perbedaan sangat nyata ($p < 0,01$)

Pada Tabel 4 terlihat bahwa hasil pembacaan nilai OD₄₀₅ untuk antigen ES adalah sebesar 0,756, sedangkan pada antigen catL diperoleh nilai OD₄₀₅ sebesar 0,241. Berdasarkan hasil analisis statistik dengan uji *t* tak berpasangan (*independent t-test*) dapat diketahui bahwa, hasil pembacaan nilai OD untuk antigen ES (0,756) secara sangat nyata menunjukkan hasil lebih tinggi dibanding antigen catL (0,241) ($p < 0,01$). Hasil tersebut menunjukkan bahwa nilai antigenitas ES terhadap antibodi (anti-*Fasciola* spp) dalam serum sapi lebih tinggi dibandingkan dengan CatL. Hal ini kemungkinan dapat terjadi karena di dalam ES material terkandung berbagai protein (*crude protein*), masing-masing protein itu dapat berikatan secara spesifik dengan antibodi (anti-*Fasciola* spp) yang juga beragam baik kelas maupun subkelasnya, sehingga pada pembacaan dengan ELISA *-reader* menunjukkan nilai OD yang lebih tinggi.

Pada infeksi alam terjadi paparan berupa parasit (*Fasciola* spp) utuh. Rantam (2003) menyatakan bahwa, limfosit T dan B hanya mampu mengenali satu epitop yang spesifik. Jadi adanya respon imun yang diinduksi oleh banyak epitop, maka diperlukan pengaktifan limfosit untuk berdeferensiasi menjadi bermacam-macam limfosit spesifik terhadap epitop. Pengaktifan masing-masing limfosit tersebut dapat menumbuhkan banyak klon dari sel yang sama untuk merespon antigen, sehingga mengakibatkan proliferasi dan diferensiasi limfosit dengan spesifisitas yang

berbeda, oleh karena itu dikenal dengan antibodi poliklonal.

Pada CatL terkandung protein yang lebih murni yaitu pada MR antara 27-28 kDa sehingga antibodi yang terikat secara spesifik lebih sedikit, dengan demikian dalam pembacaan dengan ELISA *-reader* menunjukkan nilai OD yang lebih rendah. Walaupun penggunaan CatL menunjukkan hasil dengan OD rendah, namun secara keseluruhan akan mendapatkan hasil yang lebih spesifik. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Safar *et al.* (1992) yang menyatakan bahwa, penggunaan *partially purified antigen* sebagai bahan uji pada serodiagnosis helmintiasis dengan teknik ELISA menunjukkan hasil yang lebih spesifik dibanding dengan *crude extract*.

Uji Sensitivitas dan Spesifisitas P27-28 pada Diagnosis Distomatosis dalam Serum Darah Sapi

Hasil penghitungan nilai sensitivitas dan spesifisitas P27-28 dan ES pada diagnosis distomatosis dalam serum darah Sapi dengan tabulasi silang dapat dilihat pada Tabel 5 dan 6.

Pada Tabel 5 terlihat bahwa nilai sensitivitas P27-28 (protein catL) terhadap antibodi dalam serum darah sapi penderita distomatosis adalah sebesar 63,6% dan nilai spesifisitas yang diperoleh adalah 87,5%. Nilai sensitivitas dan spesifisitas P27-28 sebagai antigen pada penelitian ini tergolong rendah hal ini kemungkinan karena serum kontrol positif (terinfeksi cacing selain *Fasciola* spp) yang digunakan dalam jumlah sedikit, hal ini mengingat keterbatasan waktu dan banyaknya infeksi campuran (*mixed infection*) dari beberapa cacing dalam satu ekor sapi. Kemungkinan lain adalah penggunaan kontrol positif cacing dari kelas Nematoda yang tidak satu kelas (lain kelas) dengan *Fasciola* spp yang termasuk kelas Trematoda. Kondisi ini bisa berbeda apabila digunakan juga cacing yang satu kelas (sesama trematoda) dalam proporsi yang sesuai.

Pada Tabel 6 terlihat bahwa nilai sensitivitas protein ES terhadap antibodi dalam serum darah sapi penderita distomatosis adalah sebesar 100 % tetapi spesifisitas yang diperoleh adalah 0%. Nilai sensitivitas yang diperoleh dengan menggunakan protein ES memang sempurna tetapi nilai spesifisitasnya sangat rendah (0%), hal ini menggambarkan kejadian reaksi silang yang tinggi pada infeksi cacing sekalipun pembandingan yang digunakan adalah cacing lain kelas.

Tabel 5. Hasil Penghitungan Nilai Sensitivitas dan Spesifisitas P27 -28 pada Diagnosis Distomatosis Serum Sapi dengan Tabulasi Silang

	Hasil ELISA		Total
	OD +	OD -	
Distomatosis +	14	8	22
Sensitivitas	63,6 %	36,4 %	100 %
Distomatosis -	1	7	8
Spesifisitas	12,5 %	87,5 %	100 %
Total	15	15	30

Tabel 6. Hasil Penghitungan Nilai Sensitivitas dan Spesifisitas Protein ES pada Diagnosis Distomatosis Serum Sapi dengan Tabulasi Silang

	Hasil ELISA		Total
	OD +	OD -	
Distomatosis +	22	0	22
Sensitivitas	100 %	0 %	100 %
Distomatosis -	8	0	8
Spesifisitas	100 %	0 %	100 %
Total	30	0	30

Mumpuni dkk. (2005) menyatakan bahwa, pada protein 130, 108, 58, 45, 25, 18 dan 15 kDa selain menunjukkan ikatan dengan *Fasciola* spp juga berikatan dengan *Paramphistomum* spp hal ini tidak banyak bermanfaat untuk bahan diagnostik karena akan menghasilkan reaksi silang (*false positif*). Reaksi silang ini dapat terjadi dengan cacing dari kelas lain dan biasanya terjadi pada protein dengan MR tinggi (Kusnoto, 2003). Pengamatan dengan *immunoblotting* menunjukkan polipeptida dari telur *F. gigantica* dikenali oleh antiserum kelinci anti-cacing dewasa. Komponen protein dengan berat molekul (MR) 240 kDa dan 206 kDa dari telur *F. gigantica*, *Toxocara vitulorum* dan *Moniezia expansa* dikenali oleh antiserum anti-cacing dewasa yang berbeda (Abdel-Rahman *et al.*, 2000).

Pada pengamatan terhadap *whole worm extract* dengan teknik *immunoblotting* dinyatakan bahwa, antiserum anti-*F. gigantica* terjadi reaksi silang dengan antigen *T. vitulorum* pada MR 133 kDa, dan antigen *M. expansa* pada MR 210 kDa. Adapun antigen *F. gigantica* terjadi reaksi silang dengan antiserum anti-*T. vitulorum* pada MR 133 kDa dan anti-*M. expansa* pada MR 52 kDa Abdel-Rahman and Megeed (2000). Sementara itu Kusnoto (2003) menyatakan bahwa dengan teknik *Western blot* antigen *F. gigantica* dikenali oleh antiserum terhadap larva kedua (anti-L2) *Toxocara cati* pada MR 133 kDa.

Hal ini menunjukkan bahwa polipeptida tersebut spesifisitasnya rendah karena dapat dikenali oleh antisera cacing lain.

Keberadaan reaksi silang pada penggunaan antigen ekstrak *crude protein* memberikan indikasi bahwa pada uji imunodiagnostik membutuhkan bahan uji yang lebih spesifik. Purifikasi protein cacing *T. vitulorum* dewasa ternyata menghasilkan fraksi protein yang dapat meningkatkan spesifisitas (*specific activity*) dibanding dengan *crude extract* (Abdel-Rahman, 2000). Hal ini juga tampak pada penggunaan *crude extract* cacing *T. canis* yang menunjukkan reaksi silang dengan antibodi terhadap *A. vitulorum* dan *A. lumbricoides*, tetapi reaksi silang tidak terjadi bila digunakan *partially purified antigen* (Safar *et al.*, 1992).

Reaksi silang antara *Fasciola* spp dengan antiserum Nematoda lebih sering terjadi pada protein dengan MR tinggi, yaitu sekitar 80 kDa bahkan lebih dari 100 kDa (Kusnoto, 2003). Dengan teknik *enzyme-linked immunoelectrotransfer blotting* dapat terlihat pita reaksi silang, yaitu antibodi mengenali antigen dengan MR sekitar 200 kDa, apabila menggunakan antibodi lebih spesifik (antibodi monoklonal) dapat mengenali antigen dengan MR sekitar 80 kDa Bowman (1987). Oleh karena induk semang yang terinfeksi oleh parasit akan menimbulkan respon imun terhadap banyak epitop,

maka perlu dikembangkan bahan uji yang lebih spesifik, yaitu dengan jalan membuat manipulasi sistem imun dengan cara hibridoma, yang merupakan turunan klon tunggal dari sel B yang teraktivasi untuk memproduksi antibodi yang homogen atau *single molecular species of antibody* yang hasilnya dikenal dengan antibodi monoklonal (*monoclonal antibody*) (Rantam, 2003).

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa: 1) Telah berhasil diisolasi protein *cathepsin-L* (CatL) dari ES *Fasciola* spp, yaitu pada MR 27-28 kDa, 2) Sebagai bahan uji, P27-28 (protein CatL) dengan nilai antigenitas (*optical density*) 0,241, nilai sensitivitas 63,6% dan spesifisitas 87,5% lebih baik dibanding protein ES dengan sensitivitas 100% tetapi spesifisitasnya 0%.

Daftar Pustaka

- Abdel-Rahman EH. 2000. Isolation and structural characterization of *Toxocara vitulorum* specific antigen and its potency in diagnosis of toxocariasis among buffalo calves. *J Egypt Soc Parasitol.* Aug. 30(2): 387-400.
- Abdel-Rahman EH and Abdel-Megeed KN. 2000. Molecular identity of major cross-reactive adult antigens in *Fasciola gigantica*, *Toxocara vitulorum* and *Moniezia expanza*. Abstract. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 30(2): 561-71.
- Abdel-Rahman EH, Abdel-Megeed KN, and Hassanain MA. 2000. Structural characterization dan immunocatalization of egg antigens cross-react with *Toxocara vitulorum*, *Fasciola gigantica* and *Moniezia expanza*. Abstract. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 30(2): 581-91.
- Bowman DD, Mika-Grieve M, Grieve RB. 1987. *Toxocara canis*: monoclonal antibodies to larval excretory-secretory antigens that bind with genus and species specificity to the cuticular surface of infective larvae. *Exp Parasitol.* 64(3): 458-65.
- Bunnag D, Bunnag T, and Goldsmith R. 1992. Liver fluke infections. In: *Tropical Medicine*. 7th ed. Strickland GT. Ed. London: W.B. Saunders Company. pp. 761-4.
- Cornevale S, Rodriguez MI, Guarnera EA, Carmona C, Tanos T, and Angel SO. 2001. Immunodiagnosis of fasciolosis using recombinant pro cathepsin L cystein protease. *Diag. microbiol. Infect. Dis.* 41(1-2): 43-49.
- Estuningsih SE. 2003. Antigen *Fasciola gigantica*. Workshop Pengembangan Diagnostik Fasciolosis dengan ELISA untuk Deteksi Cathepsin L. Balai Penelitian Veteriner. Bogor.
- Estuningsih SE, Adiwinata G, Widjajanti S, dan Pienrafita D. 2003. Pengembangan teknik capture ELISA Fasciolosis pada sapi dengan antibodi monoklonal. *Buletin Ilmu Veteriner.* Bogor. 1(1): 18-27.
- Harlow, E.N., and D. Lane. 1988. *Antibodies. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbour Laboratory. USA.
- Jithendran, K.P., and T.K. Bhat. 1999. Epidemiology of parasitoses in dairy animals in the North West Humid Himalayan Region of India with particular reference to gastrointestinal nematodes. *Trop Anim Health Prod.* 31(4): 205-14.
- Kooyman FN, Schallig HD, Van Leeuwen MA, Mac Kellar A, Huntly JF, Cornelissen AW, Vervelde L, 2000. Protection in lambs vaccinated *Haemonchus contortus* antigens is age related, and correlates with IgE rather than IgG1 antibody. *Parasite Immunol.* 22(1): 13-20.
- Kusnoto. 2003. Isolasi dan karakterisasi protein imunogenik larva stadium II *Toxocara cati* isolat lokal. Thesis. Pascasarjana. Universitas Airlangga.
- Kusumamihardja S. 1993. Parasit dan Parasitosis pada Hewan Ternak dan Hewan Piaraan di Indonesia. Bogor. PAU Bioteknologi. IPB.
- Levine ND. 1978. *Textbook of Veterinary Parasitology.* Burgers Publishing Company. Diterjemahkan oleh: Ashadi G. 1990. Wardiarto Ed. Yogyakarta. Gajah Mada University Press.
- Mumpuni S, Subekti BS, dan Kusnoto. 2006. Identifikasi fraksi protein spesifik *excretory-secretory Fasciola* spp stadium dewasa dan juvenil. *Majalah Kedokteran Hewan.* 22(1): 36-41
- Patterson RM, 1989. The immune respon to helminth parasites. In: *ELISA Technology in Diagnosis and Research.* Graham and Burgers Eds. James Cook University of North Queensland, Australia. pp: 279-297
- Rantam, F.A. 1997. Bornavirus and cells culture. Isolation infections *Bornavirus* from human and animal and their characterization. Diss. Vet. Med. FV - Berlin.
- Rantam, F.A. 2003. Metode Imunologi. Cetakan Pertama. Airlangga University Press. 3-9, 147-156.

- Safar EH, el-Rifaei F, and Maklad KM. 1992. Protein chromatographic study on adult *Ascaris lumbricoides*, *Ascaris vitulorum* and *Toxocara canis*. J. Egypt. Soc. Parasitol. 22(1): 171-6.
- Soulsby EJJ. 1986. Helminth, Arthropods and Protozoa of Domestic Animals. Bailliere Tindall and Cassell. London.
- Spithill TW, Smooker PM, Sexton DL, Bozas E, Morrison CA, Creaney J, and Parson JC. 1999. Development of vaccines against *Fasciola hepatica*. In: Fasciolosis (J.P. Dalton Ed) CAB International.
- Tolan. 2003. Fascioliasis. eMedicine Instant Access to the Minds of Medicine.