

# KARAKTERISASI ANTIGEN PROTEIN DARI *FASCIOLA GIGANTICA* PADA BERBAGAI UMUR

S. ENDAH ESTUNINGSIH dan S. WIDJAJANTI

Balai Penelitian Veteriner  
Jalan R.E. Martadinata 30, P.O. Box 151, Bogor 16114, Indonesia

(Diterima dewan redaksi 28 Desember 1998)

## ABSTRACT

ESTUNINGSIH, S. E. and S. WIDJAJANTI. 1999. Characterisation of protein antigen from *Fasciola gigantica* of different age. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 4 (1): 60-64.

The protein antigens extracted from adult fluke *Fasciola gigantica*, 3, 6 and 9 weeks old and newly excysted juvenile (NEJ) were identified using SDS-PAGE and immunoblotting techniques. Sera from fat-tailed sheep which artificially infected with the metacercariae of *F. gigantica* were used for immunoblotting. The results showed that the protein antigen profile of adult fluke, 6 and 9 weeks old flukes had similar. Bands with molecular weight between 24 kDa to 114 kDa. Protein bands with molecular weight <24 kDa and >198 kDa were also detected from the adult fluke. The use of immunoblotting technique, there were two antigenic protein molecules identified from adult fluke, NEJ and 3, 6, and 9 weeks old fluke with the molecular weight 46 kDa and 47 kDa. The protein band with molecular weight >198 kDa shown thicker on the NEJ than that of adult fluke, and 6 and 9 weeks old flukes. The role of protein with molecular weight of 46 and 47 kDa were the interested findings need to be evaluated for serological analysis.

**Key words :** Protein antigen, *Fasciola gigantica*, SDS-PAGE, immunoblotting

## ABSTRAK

ESTUNINGSIH, S. E. dan S. WIDJAJANTI. 1999. Karakterisasi antigen protein dari *Fasciola gigantica* pada berbagai umur. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 4 (1): 60-64.

Identifikasi antigen protein dari ekstrak cacing hati *Fasciola gigantica* dewasa, cacing umur 3, 6 dan 9 minggu dan *newly excysted juvenile* (NEJ) telah dilakukan dengan menggunakan SDS-PAGE dan *immunoblotting*. Dalam uji ini digunakan serum domba ekor gemuk yang diinfeksi secara buatan dengan metaserkaria *F. gigantica*. Hasilnya menunjukkan bahwa cacing dewasa, cacing umur 6 dan 9 minggu mempunyai gambaran protein yang sama, yaitu mempunyai bobot molekul (BM) antara 24 kDa sampai dengan 114 kDa. Selain itu, pada cacing dewasa dapat terdeteksi pula protein dengan BM <24 kDa dan >198 kDa. Dengan tehnik *immunoblotting*, terdapat dua protein yang bersifat antigenik dengan BM 46 kDa dan 47 kDa yang terdeteksi pada cacing dewasa, NEJ, cacing umur 3, 6 dan 9 minggu. Adapun protein antigenik dengan BM >198 kDa terlihat lebih tebal segmen proteinnya pada NEJ dibandingkan dengan pada cacing dewasa, dan cacing yang berumur 6 dan 9 minggu. Protein antigen berbobot molekul 46 dan 47 kDa merupakan temuan yang perlu dikembangkan untuk bahan diagnosis secara serologis.

**Kata kunci :** Antigen protein, *Fasciola gigantica*, SDS-PAGE, *immunoblotting*

## PENDAHULUAN

Penyakit cacing hati (fasciolosis) yang disebabkan oleh cacing *Fasciola gigantica* telah tersebar di seluruh wilayah Indonesia dengan tingkat prevalensi yang cukup tinggi antara 10-90% (EDNEY dan MUKHLIS, 1962; SUHARDONO *et al.*, 1988). Menurut laporan DIREKTORAT JENDERAL PETERNAKAN (1991) kerugian ekonomi akibat penyakit fasciola dapat mencapai 513,6 milyar rupiah setiap tahunnya.

Upaya penanggulangan penyakit telah banyak dilakukan, salah satunya adalah dengan pengobatan. Namun demikian, penggunaan obat secara terus-menerus akan menimbulkan resistensi (OVEREND dan BOWEN, 1995). Selain itu, pengobatan memerlukan biaya yang tidak sedikit yang mungkin tidak terjangkau oleh peternak kecil. Penanggulangan melalui vaksinasi

belum dapat dilakukan karena belum ditemukan bahan baku vaksin yang potensial. Dari penelitian terdahulu telah diketahui bahwa protein *glutathion-s-transferase* (GST) dan *fatty acid binding protein* (FABP) cacing *F. gigantica* hanya mampu menurunkan infeksi masing-masing 16-18% dan 31% (ESTUNINGSIH *et al.*, 1997). Selanjutnya, penggunaan antigen dari ekstrak cacing dewasa *F. gigantica* mampu menurunkan infeksi sampai 57% pada domba ekor gemuk (WIDJAJANTI, 1996 data tidak dipublikasi).

Sehubungan dengan belum adanya data tentang antigen protein dari cacing *F. gigantica* dan mengingat perkembangan hidup cacing *F. gigantica* dalam tubuh ternak melalui berbagai tahap serta belum diketahuinya antigen protein yang mampu melindungi infeksi, maka perlu dilakukan identifikasi terhadap bagian protein

cacing *F. gigantica* dari berbagai umur yang bersifat antigenik dan imunogenik.

## MATERI DAN METODE

### Isolasi cacing *F. gigantica*, kultivasi *in-vitro* dan infeksi pada domba

Dalam penelitian ini diperlukan cacing *F. gigantica* dewasa, cacing *newly excysted juvenile* (NEJ), cacing umur 3, 6 dan 9 minggu. Cacing dewasa diperoleh dari hati sapi yang terinfeksi fasciola yang dipotong di RPH Bogor; sedangkan cacing umur 3, 6 dan 9 minggu dikoleksi dari domba ekor gemuk yang diinfeksi secara buatan. Lima belas ekor domba ekor gemuk diinfeksi dengan 500 metaserkaria *F. gigantica*; setelah infeksi 5 ekor domba dipotong pada minggu ke 3, 6 dan 9 cacingnya dikoleksi. Kemudian, cacing-cacing tersebut disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  sampai saat diperlukan sebagai bahan antigen. Sebelum domba dipotong, darah domba diambil terlebih dahulu, serum dipisahkan, yang selanjutnya digunakan dalam uji *immunoblotting*.

Untuk mendapatkan NEJ dilakukan penetasan (*excystment*) metaserkaria secara *in vitro* menurut prosedur yang ditulis oleh HANNA *et al.* (1975) dengan sedikit modifikasi: Metaserkaria dicuci dengan aquades dan direndam dalam larutan yang mengandung pepsin 1%, ditambah 40  $\mu\text{l}$  HCl per 10 ml aquades dan diinkubasikan pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 45 menit. Metaserkaria dicuci lagi dengan aquades 2 kali, selanjutnya direndam dalam larutan yang mengandung 1%  $\text{NaHCO}_3$ ; 0,8% NaCl; 0,2% asam taurokholat dan 0,02 mM Na-hidrosulfite yang ditambah 50  $\mu\text{l}$  HCl dan diinkubasikan lagi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 45 menit. Setelah dilakukan pencucian 2 kali seperti sebelumnya, metaserkaria ditempatkan dalam saringan yang berukuran 100  $\mu\text{m}$  dan direndam dalam medium RPMI tanpa phenol red (Sigma, R8755) yang mengandung 10% serum domba normal, fungizone dan gentamycin, kemudian diinkubasikan pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  dalam inkubator  $\text{CO}_2$  semalam. NEJ yang keluar dari cangkang metaserkaria akan mengumpul di bawah saringan, kemudian dikoleksi dan disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  sampai saatnya diperlukan.

### Pembuatan antigen protein *F. gigantica*

Pembuatan antigen protein dari cacing *F. gigantica* dilakukan menurut metode WIJFFELS *et al.* (1992) sebagai berikut: Cacing *F. gigantica* dewasa, NEJ, cacing umur 3, 6 dan 9 minggu masing-masing dibuat suspensi di dalam pelarut yang terdiri dari campuran 0,05% triton X-100 dalam 0,015 M NaCl

yang ditambah dengan 0,002 M *phenylmethylsulphonylfluoride* (PMSF) dan 10  $\mu\text{M}$  E64 (*trans-epoxysuccinyl l-leucylamino (4-guanidino)-butane*). Homogenisasi dilakukan secara manual dalam keadaan dingin (di dalam *ice bath*). Kemudian, suspensi disentrifugasi selama 1 jam dengan kecepatan 13.000 rpm pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$ . Supernatan dikoleksi dan disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  sampai saat diperlukan. Dalam pembuatan antigen perbandingan antara jumlah cacing dan pelarut sebagai berikut: jumlah cacing dewasa, cacing umur 3, 6 dan 9 minggu masing-masing adalah 1 ekor, sedangkan untuk NEJ adalah 500 ekor, jumlah pelarut masing-masing adalah 1 ml, 50  $\mu\text{l}$ , 100  $\mu\text{l}$ , 200  $\mu\text{l}$  dan 500  $\mu\text{l}$  untuk cacing dewasa, cacing umur 3, 6, 9 minggu dan NEJ.

Konsentrasi antigen protein dari ekstrak cacing *F. gigantica* tersebut diukur dengan menggunakan metode LOWRY (LOWRY *et al.*, 1951; PETERSON, 1983).

### Analisis molekul antigen protein ekstrak cacing secara SDS-PAGE

Uji *sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) dipakai untuk memisahkan protein berdasarkan bobot molekul. Untuk mengetahui bagian antigen protein cacing, sebanyak 4  $\mu\text{g}$  suspensi protein antigen dari masing-masing ekstrak cacing *F. gigantica* dewasa, NEJ, cacing umur 3, 6, dan 9 minggu yang dicampur dengan 10  $\mu\text{l}$  sampel buffer dan dipanaskan pada suhu  $90^{\circ}\text{C}$  selama 3 menit. Kemudian dilakukan proses elektroforesis menurut prosedur LAEMMLI (1970).

### Deteksi sifat antigenisitas, imunogenisitas antigen protein secara *immunoblotting*

Uji *immunoblotting* digunakan untuk mengetahui reaksi antigen antibodi sesuai dengan bobot molekul. *Immunoblotting* dikerjakan menurut prosedur THOWBIN *et al.* (1976). Komponen protein yang dipisahkan dengan SDS-PAGE dipindahkan pada kertas nitroselulose. Larutan skim milk 10% (*blotto*) dalam PBS-Tween digunakan sebagai *blocking buffer*, sedangkan untuk pengenceran serum digunakan larutan 5% *blotto*. Setelah inkubasi dengan serum (1:50), antibodi IgG dideteksi dengan *conjugate peroxidase anti-IgG anti-sheep* dan untuk substrat digunakan *diamino benzidine* (DAB).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Gambaran antigen protein cacing *F. gigantica* dari berbagai umur yang diperiksa dengan SDS-PAGE

dapat dilihat pada Gambar 1. Selanjutnya, bila endapan (*bands*) protein dari ekstrak masing-masing umur cacing dibandingkan dengan molekul protein acuan (*marker*) dapat ditemukan beberapa *band* protein yang secara ringkas tertera pada Tabel 1. Gambaran protein cacing *F. gigantica* dewasa, NEJ, cacing umur 3, 6 dan 9 minggu sangat beragam. Pada cacing dewasa, cacing umur 9 dan 6 minggu mempunyai bagian protein dengan bobot molekul yang sama, yaitu di antara bobot molekul 24 kDa sampai dengan 114 kDa. Akan tetapi, pada cacing umur 9 dan 6 minggu bagian protein yang mempunyai bobot molekul 73 kDa tidak terdeteksi. Pada cacing dewasa, protein dengan bobot molekul <24 kDa dan protein dengan bobot molekul >198 kDa dapat dideteksi. Cacing umur 3 minggu mempunyai protein yang sangat berbeda dengan cacing yang lain. Pada cacing ini hanya terdeteksi protein dengan bobot molekul 47 kDa dan 46 kDa. Protein yang dapat dideteksi pada NEJ ada pada kisaran bobot molekul 47 kDa sampai dengan 198 kDa, dan protein ini juga terdeteksi pada cacing dewasa, umur 9 dan 6 minggu, akan tetapi pada NEJ tidak terdeteksi protein dengan bobot molekul 75 kDa. Hasil penelitian ini sangat berbeda dengan laporan LAMMAS *et al.* (1985) yang mengidentifikasi protein NEJ *F. hepatica* pada bobot molekul 78, 45, 30, 26, 13,5, 13 dan 10,5 kDa.

BM (kDa)	Dewasa a	9 minggu	6 minggu	3 minggu	NEJ
>198	++	-	-	-	-
198	-	-	-	-	+
114	+	+	+	-	+
75	++	+	+	-	-
73	+	-	-	-	+
69	++	+	+	-	++++
49	++	+	+	-	+
47	+++	++	++	+	+
46	+	++	++	+	-
33	++	+	+	-	-
24	+++	+	+	-	-
23	+	-	-	-	-
22	+	-	-	-	-
21	+	-	-	-	-
14	++	-	-	-	-
13	++	-	-	-	-

**Keterangan :**

- BM = bobot molekul
- (-) = tidak ada protein pada bobot molekul tertentu
- (+) = protein terlihat tipis
- (++) = protein terlihat tebal
- (+++)= protein terlihat sangat tebal
- NEJ = *newly excysted juvenile*

**Gambar 1.** Gambaran protein cacing *Fasciola gigantica* pada berbagai umur yang diperiksa secara SDS-PAGE

- Keterangan :**
- DW = cacing dewasa
  - S = cacing umur 9 minggu
  - 6 = cacing umur 6 minggu
  - 3 = cacing umur 3 minggu
  - NEJ = cacing *juvenile*
  - MW = *molecular weight marker*

**Tabel 1.** Gambaran protein cacing *Fasciola gigantica* pada berbagai umur yang diperiksa secara SDS-PAGE

Protein standar	Stadium/umur cacing
-----------------	---------------------

Pengamatan secara *immunoblotting* yang menggunakan serum domba 9 minggu setelah diinfeksi *F. gigantica* dapat dilihat pada Gambar 2. Dari analisa *immunoblotting* dapat diketahui adanya *band* protein yang bersifat immunogenik terhadap serum dari domba yang diinfeksi metaserkaria, bobot molekul protein yang bersifat immunogenik sangat bervariasi (Tabel 2). Sifat antigenik dari antigen protein cacing *F. gigantica* dewasa dan umur 9 minggu sedikit berbeda. Protein dengan bobot molekul 7 kDa, 24 kDa dan 69 kDa tidak terdeteksi pada cacing umur 9 minggu, tetapi terdeteksi pada cacing dewasa. Ini merupakan komponen yang tidak immunogenik. Terdapat 2 jenis protein yang bersifat antigenik dengan bobot molekul 46 kDa dan 47 kDa yang terdeteksi pada cacing dewasa, cacing umur 9, 6 dan 3 minggu dan pada NEJ. Fraksi ini mempunyai sifat antibodi terhadap serum yang homologus, kemungkinan merupakan proteksi silang. Protein yang bersifat antigenik dengan bobot molekul >198 kDa terlihat lebih tebal pada NEJ, dibandingkan dengan pada cacing dewasa dan cacing umur 6 dan 9 minggu, diduga molekul tersebut mempunyai daya immunogenik lebih baik, akan tetapi pada cacing yang berumur 3 minggu immunogenisitas protein tersebut tidak terdeteksi. Pada *immunoblotting* terjadi reaksi antara antigen dan antibodi pada bobot molekul >198 kDa pada cacing yang berumur 9 minggu dan pada NEJ, akan tetapi pada SDS-PAGE protein tersebut

tidak dapat terdeteksi. Hal ini terjadi kemungkinan karena jumlah protein yang berbobot molekul >198 kDa tersebut pada cacing umur 9 minggu dan pada NEJ sangat sedikit (Tabel 1), sehingga pada waktu dilakukan uji SDS-PAGE, protein tersebut tidak terdeteksi dengan pewarnaan *Commassi Blue*, tetapi bisa ditransfer ke kertas netroselulose dan mempunyai daya immunogenik yang baik (Tabel 2).

**Tabel 2.** Gambaran respon antigenik protein cacing *Fasciola gigantica* pada berbagai umur yang diperiksa secara *immunoblotting*

Protein standar BM (kDa)	Respon antigenik pada stadium/umur cacing				
	Dewasa a	9 minggu	6 minggu	3 minggu	NEJ
>198	+	+	+	-	++++
198	+	+	-	-	-
114	+	+	-	-	+
75	+	+	-	-	-
69	+	-	-	-	-
49	-	-	-	-	+
47	+	++	++	+	++
46	+	++	++	+	++
27	++	+	+	-	-
24	+	-	-	-	-
20	++	+	+	-	-
14	+	+	-	-	-
7	+	-	-	-	-

**Gambar 2.** Gambaran respon antigenik protein cacing *Fasciola gigantica* pada berbagai umur yang diperiksa secara *immunoblotting*

**Keterangan :**  
 DW = cacing dewasa  
 S = cacing umur 9 minggu  
 6 = cacing umur 6 minggu  
 3 = cacing umur 3 minggu  
 NEJ = cacing *juvenile*  
 MW = *molecular weight marker*

**Keterangan :**

BM = bobot molekul  
 (-) = tidak terjadi reaksi antigen antibodi  
 (+) = terjadi reaksi antigen antibodi lemah  
 (++) = terjadi reaksi antigen antibodi kuat  
 (+++) = terjadi reaksi antigen antibodi sangat kuat  
 NEJ = *newly excysted juvenile*

## KESIMPULAN DAN SARAN

Dari pengamatan ini diketahui bahwa pada semua umur cacing *F. gigantica* terdapat dua jenis protein yang bersifat antigenik yang mempunyai bobot molekul 46 kDa dan 47 kDa. Dari reaksi *immunoblotting* kedua fraksi tersebut merupakan sifat immunologik yang baik pada semua umur cacing. Protein tersebut perlu dipelajari lebih lanjut, terutama protein yang berasal dari NEJ, yang dapat digunakan sebagai bahan diagnosis untuk mendeteksi infeksi fasciolosis secara dini pada hewan ruminansia, atau mempunyai sifat immunoproteksi silang.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Suharyanta, Sudrajat dan Yayan Daryani yang telah banyak membantu kelancaran pelaksanaan penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

Hasil penelitian ini sangat berbeda dengan temuan MIRANDA dan GARCIA (1995) yang mengidentifikasi antigen protein *F. hepatica* dari berbagai stadium (dari mulai telur sampai dewasa). Dari serum kelinci yang diinfeksi *F. hepatica* dilaporkan bahwa protein yang bersifat antigenik baik pada cacing dewasa maupun NEJ ada pada bobot molekul 10, 12, 15, 17, 21, 24, 29, 42, 66 dan 88 kDa. Selain itu, protein antigenik dengan bobot molekul 64 kDa juga dilaporkan oleh GORMAN *et al.* (1994). Perbedaan tersebut mungkin terjadi karena antara *F. gigantica* dan *F. hepatica* secara biologis tidak sama, walaupun keduanya termasuk ke dalam genus yang sama. Sebelumnya, dilaporkan bahwa *F. gigantica* berbeda dengan *F. hepatica* di dalam memberikan respon kekebalan pada sapi yang ditimbulkan akibat vaksinasi dengan *glutathion-s-transferase* (GST) karena adanya perbedaan epitope, yang dalam hal ini *F. gigantica* GST tidak memiliki epitop yang bersifat protektif seperti yang terdapat pada *F. hepatica* GST (ESTUNINGSIH *et al.*, 1997).

- DIREKTORAT JENDERAL PETERNAKAN. 1991. *Data Ekonomi Akibat Penyakit Hewan* 1990. Direktorat Kesehatan Hewan, Direktorat Jenderal Peternakan, Jakarta.
- EDNEY, J. M. and A. MUKHLIS. 1962. Fasciolosis on livestock in Indonesia. *Comm. Vet.* 2:49.
- ESTUNINGSIH, S. E., P. M. SMOOKER, J. A. ROBERTS, E. WIEDOSARI, S. WIDJAJANTI, S. VAIANO, S. PARTOUTOMO, and T. W. SPITHILL. 1997. Evaluation of antigens of *Fasciola gigantica* as vaccines against tropical fasciolosis in cattle. *Int. J. Parasitol.* 27 (11): 1419-1428.
- GORMAN, T., V. CONCHA, F. FREDES, A. FERREIRA, A. VALDES, and H. ALCAINO. 1994. Detection of antigens with diagnostic potential in animals with *Fasciola hepatica* infections. *Parasitologia al Dia* 18 (1-2): 26-32.
- HANNA, R. E. B, S. S. BAALAWY, and W. JURA. 1975. Methods for in vitro study on the invasive processes of *Fasciola gigantica*. *Res. Vet. Sci.* 19 : 96-97.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680-685.
- LAMMAS, D. A., W. P. H. DUFFUS, and D. W. TAYLOR. 1985. Identification of surface proteins of juvenile stages of *Fasciola hepatica*. *Res. Vet. Sci.* 38: 248-249.
- LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L., FARR, and R. J. RANDAL. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- MIRANDA, M. E. and V. Z. GARCIA. 1995. Antigen identification from different developmental stages of *Fasciola hepatica*. *Technica Pecuaría en Mexico* 33 (1): 8-16.
- OVEREND D. J. and F. L. BOWEN. 1995. Resistance of *Fasciola* to tricabendazole. *Aust. Vet. J.* 72 : 275-276.
- PETERSON, G. L. 1983. Determination of total protein. *Methods Enzymol.* 91:95-119.
- SUHARDONO, S. WIDJAJANTI, and S. PARTOUTOMO. 1988. Freshwater Snails of Medical and Veterinary Importance in Indonesia. ASIAN-PLANTI Technical Meeting on Snails and Slugs of Economic Importance. June 22-24, Bangkok, Thailand.
- THOWBIN, H., T. STAEHELIN, and J. GORDON. 1976. Electrophoretic transfer for proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some application. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76 : 4350-4354.
- WIJFFELS, G.L., J.L. SEXTON, L.SALVATORE, J.M. PETITT, D.C. HUMPHRIS, M. PANACIO, and T.W. SPITHILL. 1992. Primary sequence heterogeneity and tissue expression of glutathione S-transferase of *Fasciola hepatica*. *Exp. Parasitol.* 74 : 87-99.