

## Cross Reaction of *Haemonchus contortus* Antigen with Anti-*Fasciola gigantica* Serum by Using Western Blot Technique

### Reaksi Silang Antigen *Haemonchus contortus* dengan Serum Anti - *Fasciola gigantica* Menggunakan Teknik *Western Blot*

<sup>1)</sup>Firman Hadi Fanani,<sup>2)</sup>Kusnoto,<sup>2)</sup>Poedji Hastutiek, <sup>2)</sup>Setiawan Koesdarto, <sup>2)</sup>Endang Suprihati

<sup>1)</sup>Student, Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga,

<sup>2)</sup>Department of Veterinary Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga.

Received: 25-06-2020, Accepted: 25-06-2020, Published Online: 29-06-2020

Corresponding email : hadifirman339@gmail.com

#### Abstract

The purpose of this research to know cross reaction of *Haemonchus contortus* protein with anti-*Fasciola gigantica* serum by using the *Western Blot* technique. The result can be used as *Haemonchosis* serologic diagnostic. This research was conducted using *Haemonchus contortus* worms obtained from abomasum, especially cow worms and *Fasciola gigantica* worms obtained from the bile duct and gall bladder. The worms were crushed and added with Phosphate Buffer Saline (PBS) to make homogenates and then centrifuged at 3500 rpm for 15 minutes. Homogenate *Fasciola gigantica* was immunized to mice to get anti-*Fasciola gigantica* serum at a dose of 200 µg/mice and booster 3 times with a span of two weeks. Homogenates were carried out using the SDS-PAGE technique to analyze proteins using a brilliant blue dye. Cross reaction of *Haemonchus contortus* protein with anti-*Fasciola gigantica* serum by using *Western blot* technique and obtained 3 protein bands are 94.9, 52.7, 46.7 kDa.

**Keywords :** *Haemonchus contortus*, *Fasciola gigantica*, Cross reaction, *Western Blot*

#### Pendahuluan

Cacing merupakan organisme multiseluler yang mengandung berbagai macam protein, baik protein spesifik maupun protein non-spesifik yang memicu respon inang untuk membentuk antibodi yang beragam, sehingga memungkinkan terjadi reaksi silang saat dilakukan diagnosis dengan uji serologis (Kusnoto, 2009). Ternak dapat terinfeksi lebih dari satu jenis cacing yang memungkinkan terjadi reaksi silang antara antigen dan antibodi terhadap cacing yang berbeda kelas (Kusnoto, 2010). Telah banyak penelitian tentang reaksi silang, namun belum pernah dilakukan penelitian tentang reaksi silang antigen *Haemonchus contortus* terhadap serum anti-*Fasciola gigantica* dengan menggunakan teknik *Western blot*.

*Haemonchosis* merupakan penyakit cacing saluran pencernaan yang disebabkan oleh *H. contortus* pada domba dan kambing yang menyebabkan kerugian ekonomi yang sangat besar. Predileksi cacing ini terdapat pada abomasum, infeksi berat pada cacing ini dapat menimbulkan *bottle jaw* (Kusnoto dkk.,

2015). Kerugian ekonomi tersebut meliputi penurunan produktivitas hewan, penurunan berat badan, diare dan pada kasus berat mengakibatkan kematian (Githigia dkk., 2001).

Cacing *F. gigantica* juga mengakibatkan penyakit helminthiasis pada ruminansia. Tingkat infeksi fasciolosis cenderung lebih tinggi ditemukan pada hewan dewasa dibandingkan dengan hewan muda. Fasciolosis banyak menimbulkan kerugian ekonomi berupa penurunan berat badan dan karkas, produksi susu, gangguan reproduksi hingga kematian (Kurniasih, 2007). Hal ini menjadi perhatian penting terlebih lagi cacing *Fasciola* yang bersifat zoonosis. Pemeriksaan yang dapat dilakukan secara dini yaitu uji serologi, dengan mengukur banyaknya antibodi yang berada dalam serum (Sriasih dkk., 2013).

Uji laboratorium yang direkomendasikan untuk membantu meneguhkan diagnosis salah satunya yaitu uji serologik. Uji serologis adalah pengujian yang menggunakan serum sebagai sampel. Prinsip uji serologis adalah dengan cara mereaksikan antigen dan antibodi yang sesuai, antigen dapat diperoleh dari *Whole Worm*

*Extract* (WWE) cacing *H. contortus* (Yoshihara dkk., 1993). *Western Blot* merupakan metode yang digunakan untuk mengidentifikasi antibodi spesifik pada suatu protein dengan berat molekul tertentu yang telah dipisahkan (Agmar, 2012). Diagnosis secara serologis telah dianggap lebih akurat dibanding diagnosis secara konvensional. Metode *Western blot* dapat memperlihatkan protein dengan mereaksikan antibodi dan antigen yang kemudian digunakan untuk mengetahui adanya reaksi silang.

### Materi dan Metode Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada 1 Maret sampai 30 Juli 2018. Pengambilan sampel cacing *H. contortus* dan *F. gigantica* stadium dewasa dilakukan pada sapi yang dipotong di Rumah Potong Hewan (RPH) Pegirian Surabaya yang sudah diperiksa sebelumnya dan sapi didiagnosis menderita haemonchosis dan fasciolosis, Laboratorium Parasitologi Universitas Airlangga untuk pembuatan homogenat *H. contortus* dan *F. gigantica*, Unit Layanan Biologi Fakultas Sains Teknologi Universitas Airlangga Surabaya untuk *running* kadar protein, Laboratorium Teknobiologi Purifikasi dan Biologi Molekuler Universitas Surabaya untuk pemeriksaan SDS-PAGE dan *Western blot*.

### Alat dan Bahan Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah cawan petri, nampan plastic, *object glass*, *cover glass*, alat-alat bedah (pinset anatomis, pisau *scalpel*, dan gunting bedah), *beaker glass*, tabung erlenmeyer, gelas ukur, thermometer, penangas air, *stopwatch*, incubator, ELISA reader, *microplate* ELISA, spektrofotometer, alat pewarnaan *Commasie Brilliant Blue*, *sputit disposable*, jarum, kertas tisu, *microtube* 2 mL, rak tabung reaksi, corong, penyaring teh, pipet plastic, pipet *endorf*, mortar, stanfer, tabung sentrifus, tabung konikal, alat penimbang digital, Ph meter, membran nitroselulose, *chamber* untuk proses *running* SDS-PAGE, perangkat elektroferesis (SDS-PAGE), *electroblotter*, *trans blotter*, kertas *Whatmann*, kertas absorben, *waterbath*, *shaker*, *yellow tip*, *blue tip*, mikroskop *compound*, *freezer*, sonikator, dan alat sentrifugasi.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan 6 mencit jantan dewasa, protein *Whole Worm Extract* (WWE) cacing *F. gigantica* dan *H. contortus* stadium

dewasa. Bahan penelitian yang dibutuhkan antara lain : *Phosphate Buffer Saline* (PBS), *aquadest*, formalin 10%, NaCl fisiologis, alkohol 70%, *complete Freund's adjuvant* (CFA) (*Sigma cat* no. F5881), *incomplete Freund's adjuvant* (IFA), larutan *Bradford*.

Identifikasi protein dengan teknik SDS-PAGE menggunakan bahan-bahan, yang terdiri dari larutan penyangga elektroforesis, larutan penyangga *Laemli*, larutan *separating gel* 12%, larutan *stacking gel* 5%. Larutan penyangga *Laemli* terdiri dari 10 g atau mL gliserin (Merck), 0,154 g 10 mM *Dithioerythrit*, 23 mL SDS 10%, 12,50 mL 0,5 M Tris-HCl dengan pH 6,8 yang dilarutkan dalam 100 mL *aquadest* (Merck), dan beberapa tetes *Bromphenolblue* (Merck).

Bahan-bahan yang digunakan untuk melakukan uji karakterisasi *Western blot* yaitu gel SDS-PAGE yang telah di *running* mengandung protein yang dianalisis, *transfer buffer* (Tris aminomethan (*Sigma cat* no. 172-2051) 15,15 g, *glisin* 72 g, *methanol* 1000 mL dan ditambahkan 5000 mL *aquadest* (Merck), HCL pH 6,8, creamer 4%, antibodi poliklonal *F. gigantica* dan protein *H. contortus*, etanol, *washing buffer*, *Western blue*, konjugat (IgG antimouse), dan substrat (BCIP/NBT).

### Prosedur Penelitian

Koleksi cacing *H. contortus* didapatkan pada organ abomasum sapi dan untuk mendapatkan cacing *F. gigantica* pada organ hati sapi. Cacing yang didapatkan dimasukkan ke dalam cawan petri yang telah berisi *Phosphate Buffer Saline* (PBS). Cacing yang sudah diperoleh dipindahkan ke dalam cawan petri yang berisi PBS kemudian diinkubasi di dalam incubator dengan suhu 37 °C (Kusnoto, 2011).

Cacing *F. gigantica* dan *H. contortus* stadium dewasa, diidentifikasi sesuai dengan bentuk morfologi masing-masing cacing tersebut (Soulsby, 1986). Cacing dewasa yang telah disimpan di dalam NaCl fisiologis diambil satu persatu. Identifikasi tubuh cacing dewasa dengan meletakkan di *object glass* dan dijepit dengan *cover glass* lalu identifikasi dibawah mikroskop perbesaran 100x.

Cacing *H. contortus* dan *F. gigantica* stadium dewasa masing masing digerus secara terpisah dengan alat penggerus hipofisa sampai halus. Hasil gerusan ditambah dengan larutan PBS 3 mL. Larutan dimasukkan ke dalam tabung sentrifus kemudian disonikasi pada frekuensi 35 kHz dengan pola 3 x 60 detik dengan interval 60 detik. Kemudian

disentrifugasi dengan kecepatan 3.000 rpm selama 15 menit. Pelet dan *supernatant* dipisahkan kemudian diukur konsentrasinya dengan spektrofotometer dengan metode *Bradford* (Kusnoto dkk., 2011)

Sebanyak 200  $\mu$ L larutan *Bradford* dimasukkan ke dalam tabung steril. Tabung yang telah berisi 200  $\mu$ L larutan *Bradford* ditambahkan 790  $\mu$ L *aquadest* dan ditambahkan 10  $\mu$ L sampel WWE cacing *F. gigantica* dan *H. contortus* stadium dewasa. Blanko digunakan tabung reaksi steril yang telah diisi 800  $\mu$ L *aquadest* dan 200  $\mu$ L larutan *Bradford*. Besar protein dihitung berdasarkan kurva standar konsentrasi protein yang dibuat berdasarkan absorbansi konsentrasi standar menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 590 nm dengan metode *Bradford* (Kusnoto dkk., 2011).

Pembuatan antibodi poliklonal dilakukan dengan cara menyuntikkan protein *F. gigantica* pada mencit dengan dosis 200  $\mu$ g per ekor (Hanly dkk., 1995). Daerah penyuntikan terlebih dahulu didesinfeksi dengan alkohol 70%, kemudian protein *F. gigantica* disuntikkan pada bagian subkutan. Penyuntikan pertama, homogenate ditambah CFA sama banyak, selanjutnya dilakukan *booster* sebanyak 3 kali dengan interval 2 minggu. Pada saat *booster*, homogenat ditambah IFA sama banyak. Pada minggu kedua setelah *booster* terakhir dilakukan, dilakukan pengambilan darah melalui ekor sebanyak 0,5 mL dan disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit untuk mendapatkan serum anti-*F. gigantica* (Kusnoto dkk., 2005).

*Sodium Dodecyl Sulphate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis* merupakan teknik untuk menganalisis protein cacing. Bahan dari larutan *separating gel* 12% dimasukkan ke dalam *gel plate* dengan posisi vertikal. Bagian atas *gel plate* yang telah tercampur larutan *separating gel* 12% diberi butanol hingga mengeras, setelah mengeras butanol dibuang dan bilas dengan PBS selanjutnya dikeringkan dengan kertas *Whatmann*. *Gel plate* yang telah mengering tambahkan larutan *stacking gel* 4% dan masukkan pada *comb* hingga mengeras (Farghaly, 2009).

#### Karakterisasi protein dengan *Western Blot*

Homogenat cacing *H. contortus* di-*running* dengan SDS-PAGE kemudian gel yang telah mengandung fragmen protein dilepas dari

*glass plate* kemudian direndam 2 x 20 menit dalam *buffer transblot* dan siap ditransfer ke membran *nitrocelulosa*. Kertas *Whatmann* ukuran 10 x 12 cm sejumlah 3 lembar direndam dengan *buffer transblot* selama 2 x 20 menit dan diletakkan rata sempurna pada transblotter, setelah itu selembur membrane *nitrocelulose* dibasahi dengan etanol selama 1 menit dan direndam *buffer transblot* 2 x 20 menit, kemudian diletakkan rata sempurna diatas kertas *Whatman*. Gel yang telah siap ditransfer diletakkan rata sempurna diatas membran *nitrocelulosa*, kemudian gel ditutup dengan 3 lembar kertas *Whatman* yang sudah direndam dengan *buffer transblot* selama 2 x 20 menit dan diletakkan rata sempurna. Proses transfer dilakukan dengan tegangan konstan 100V dan kuat arus 40 mA selama 90 menit (Intan, 2008).

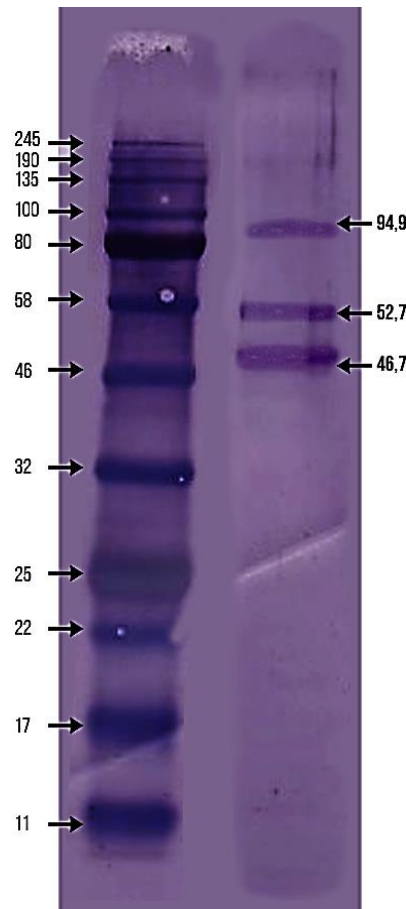
Penentuan berat molekul antigen atau antibodi dilakukan dengan menghitung nilai *Retardation factor* (Rf) dari masing-masing pita dengan rumus  $Rf = \text{Jarak} / \text{Panjang Gel}$ ; Keterangan: Jarak = Jarak pergerakan protein dari tempat awal; Panjang Gel = Jarak pergerakan zat warna dari tempat awal. Massa molekul relatif ditentukan dengan cara mengkonversi data nilai Rf dan massa molekul relatif dari *marker*. Nilai Rf disimbolkan dengan X, sedangkan Y adalah nilai log massa molekul relative *marker*. Kemudian mencari persamaan regresi yang sesuai. Setelah persamaan regresi didapat, nilai X (Rf) sampel dimasukkan ke dalam persamaan. Selanjutnya hasil dari persamaan dicari nilai anti-log untuk mendapatkan nilai massa molekul relatif protein (Kusnoto dkk., 2011).

#### Analisis Data

Data dalam penelitian ini berupa pita (*band*) ikatan antara protein *H. contortus* dengan serum anti-*F. gigantica* yang terjadi pada protein tertentu ditampilkan secara deskriptif, akan tetapi untuk menghitung berat molekul menggunakan SPSS ( *Statistical Product and Service Solution* ).

#### Hasil dan Pembahasan

Hasil reaksi silang protein *H. contortus* dengan serum anti *F. gigantica* didapatkan 3 pita protein dengan BM 46,7, 52,7 dan 94,9 kDa, untuk lebih jelas dapat dilihat pada Gambar 1.



**Gambar 1.** Hasil reaksi silang antigen *Haemonchus contortus* dengan serum anti-*Fasciola gigantica* dengan teknik *Western blot*. M: Marker, S: Reaksi silang *Haemonchus contortus* dengan *Fasciola gigantica*.

*Western blot* merupakan pemindahan makromolekul dari medium gel polyakrilamida ke atas membran nitroselulosa setelah proses elektroforesis. Teknik ini sangat efektif untuk mendeteksi antigen yang mempunyai ukuran kecil dalam larutan yang banyak mengandung protein. *Western blot* digunakan untuk identifikasi antigen spesifik yang dikenal oleh antibodi monoklonal ataupun poliklonal. *Western blot* mengkombinasi antara kemampuan pemisahan SDS-PAGE dengan pengenalan imunologi spesifik terhadap antibodi (Setiawan, 2012). Antibodi yang digunakan dalam teknik ini harus mempunyai spesifitas tinggi dan memiliki daya ikat stabil (Rantam, 2003). Hasil running SDS-PAGE dipengaruhi oleh beberapa hal antara lain, kebersihan, tingkat kemurnian dan kadar protein dalam homogenat. Kadar homogenat yang cukup akan menghasilkan pita protein yang cukup dan jelas sehingga dapat memudahkan analisis berat molekul (BM) yang terbentuk (Kusnoto, 2003).

Antibodi merupakan protein yang muncul sebagai respon terhadap infeksi atau imunisasi dan mempunyai kemampuan untuk bereaksi secara spesifik dengan epitop. Antibodi yang berbeda mengikat epitop yang berbeda sehingga setiap individu mempunyai jutaan antibodi yang berbeda. Antibodi spesifik yang berikatan dengan epitop antigen jika terjadi suatu paparan akan membentuk memori, sehingga suatu hari jika terjadi paparan ulang akan menghasilkan antibodi yang lebih tinggi. Paratop atau yang biasa disebut dengan *antigen-binding site* merupakan bagian dari antibodi yang berikatan dengan antigen, yaitu epitop (Goldsby dkk., 2003). Paratop tertentu akan berikatan dengan epitop yang tidak berhubungan begitu sebaliknya sehingga dapat terjadi reaksi silang antara antigen dan antibodi (Frank, 2002). Antigen dengan kadar protein yang optimal juga sangat diperlukan untuk menghasilkan pita protein yang baik. Homogenat cacing yang berasal dari telur, larva dan cacing dewasa akan memberikan reaksi

yang optimal jika mengandung protein lebih dari 800µg/ml (Kusnoto, 2003).

Penelitian ini menggunakan protein WWE *H. contortus* dengan serum anti-*Fasciola gigantica* yang didapatkan dari protein WWE *F. gigantica* yang diimunisasikan pada mencit dan dilakukan booster sebanyak 3 kali dengan interval 2 minggu. Hasil reaksi silang antara protein *H. contortus* dengan serum anti-*F. gigantica* menggunakan teknik *western blot* diperoleh 3 pita protein dengan BM antara lain 94,9, 52,7 dan 46,7 kDa. Berdasarkan penelitian Rani (2017) mengenai reaksi silang protein *H. contortus* dengan serum anti-L2 *Toxocara vitolorum* menggunakan teknik *western blot* menghasilkan protein dengan BM antara lain 141,3, 81,3, 64,6, 51,3, 46,8 dan 38 kDa. Antigen *H. contortus* dapat mengenali serum anti-*F. gigantica* dan L2 *T.vitolorum* pada protein dengan BM sama yaitu 46. Pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Arisandy (2005) menghasilkan protein dengan BM antara lain 33,5 dan 29,4 kDa. Sedangkan yang tidak terjadi reaksi silang antara lain 42,3, 39,3, 28,9, 24,4 dan 13,9 kDa.

Adanya reaksi silang antara antigen *H. contortus* dengan serum anti-*Fasciola gigantica* mengindikasikan bahwa protein tersebut tidak spesifik, sehingga spesifitas dari protein *H. contortus* rendah dan tidak dapat digunakan sebagai bahan diagnostik secara serologi terhadap haemonchosis karena dapat menyebabkan *false positif* terhadap Fasciolosis. Menurut Kusnoto (2008), protein yang tidak spesifik ini dapat dikembangkan menjadi kandidat vaksin helminthiasis dan adanya protein hasil reaksi silang yang menghasilkan BM yang sama memberi indikasi bahwa pada uji imunodiagnosis membutuhkan bahan uji yang lebih spesifik.

Protein yang tidak terjadi reaksi silang kemungkinan merupakan protein spesifik. Perlu dilakukan uji spesifitas lebih lanjut menggunakan uji elusi untuk mendapatkan BM protein spesifik cacing *H. contortus*. Protein spesifik yang dihasilkan dapat dimanfaatkan sebagai bahan awal pengembangan diagnosis penyakit haemonchosis secara serologis.

### Kesimpulan

Reaksi silang protein *Haemonchus contortus* dengan serum anti *Fasciola gigantica* didapatkan 3 pita protein yaitu pada Berat Molekul (BM) 46,7 ; 52,7 dan 94,9 kDa.

### Daftar Pustaka

- Kusnoto. 2003. Isolasi dan Karakterisasi Protein Immunologi Larva Stadium II *Toxocara cati* Isolat Lokal. [Tesis]. Program Pascasarjana Universitas Airlangga.
- Kusnoto. 2008. Antigenesitas, Sensitivitas dan Spesifitas Protein 27-28 kDa dari Material *Excretory-Secretory* (ES) *Fasciola* spp pada Diagnosis Distomatosis Serum Sapi dengan Teknik *Indirect-Elisa*.
- Kusnoto. 2009. Isolation of Specific Protein of *Toxocara canis* and Its the Evaluation to Diagnosis Toxocariasis at Animal Experimental with ELISA Technique. *Media Kedokteran Hewan*. 25 (3): 153-160.
- Kusnoto. 2010. Detection of Cross Reaction between *Toxocara cati* Antigens against Anti-*Toxocara canis* serum used *Western Blot Technique*. *Media Kedokteran Hewan*. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Kusnoto. 2011. Karakterisasi Molekul Protein *Toxocara cati* dan *Toxocara canis* untuk Pengembangan Diagnostik *Toxocara canis* dengan Teknik ELISA. *JBP Universitas Airlangga*. 12(1): 56-65.
- Agmar SY. 2012. *Western Blot*. Docstory.wordpress. 2012/03/17/western-blot/. [06 Agustus 2016]
- Githigia SM, Thamsborg SM, Munyua WK and Maingi N. 2001. Impact of Gastrointestinal Helminths on Production in Goats in Kenya. 42:22.
- Yoshihara S, Furuya T dan Goto N. 1993. Use of body fluid of adult female *Ascaris suum* as an antigen in the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for diagnosis of swine ascariasis. *J of Helminthology*. 67 (4): 279-286.
- Intan. 2008. Reaksi Silang Somatic, Excretory Secretory dan Intestine antigen *Toxocara cati* dengan serum anti *Toxocara canis*. [Skripsi]. Program sarjana Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga.
- Setiawan IM. 2012. Beberapa Teknik Pemeriksaan Laboratorium Biologi Molekuler. Yayasan Puri Cipta Bina Karya. Jakarta. 16-49.
- Rantam FA. 2003. Metode Immunologi. Airlangga University Press. Surabaya. hal. 8-9; 145-148; 150-156.

Soulsby E.J.L. 1986. Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals. Bailliere Tindall and Cassell London. 7<sup>th</sup> ed. 231-257.