
**KONSENTRASI PROTEIN DAN PENENTUAN BERAT MOLEKUL
EKSKRETORI/SEKRETORI L₃ *Ascaridia galli***

*Protein Concentration and Determination of Excretory/Secretory
Molecular Weight Released by L₃ of *Ascaridia galli**

Darmawi¹, Ummu Balqis², Risa Tiuria³, Retno D. Soejoedono⁴, Fachriyan H. Pasaribu⁵

¹Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala,

²Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala

³Laboratorium Helminologi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor

⁴Laboratorium Imunologi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor

⁵Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor

e-mail: d_darmawi@yahoo.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan menentukan konsentrasi dan berat molekul protein ekskretori/sekretori larva (L₃) *Ascaridia galli* (*A. galli*). Larva L₃ diperoleh dari usus halus 100 ayam tujuh hari setelah pemberian dosis 6000 L₂ melalui esofagus ayam. Sebanyak 5–10 L₃ dikultur secara *in vitro* dalam setiap ml medium *Rosswell Park Memorial Institute* (RPMI 1640), pH 6,8, tanpa merah fenol dalam inkubator pada temperatur 37 °C dan 5% CO₂ selama 3 hari. Ke dalam medium ditambahkan 100 unit ml⁻¹ penisilin G, 100 µg ml⁻¹ streptomisin, 5 µg ml⁻¹ gentamisin dan 0,25 µg ml⁻¹ kanamisin. Ekskretori/sekretori dipreparasi dari produk metabolisme L₃ yang dilepaskan ke dalam medium kultur. Untuk mendapatkan protein ekskretori/sekretori, medium kultur dipekatkan dengan vivaspin 30.000 MWCO, dan kuantitas protein dihitung dengan metode Bradford. Berat molekul protein ekskretori/sekretori divisualisasikan dengan *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS PAGE). Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi protein ekskretori/sekretori adalah 0,595 mg/ml dengan berat molekul 28 kDa.

Kata kunci: *Ascaridia galli*, ekskretori/sekretori, larva

ABSTRACT

*A study was carried out to determine protein concentration and molecular weight of excretory/secretory product from larvae stage (L₃) of *Ascaridia galli* (*A. galli*). *Ascaridia galli* L₃ were recovered from intestines of 100 heads chickens 7 days after oesophagus inoculation with 6000 L₂. L₃ recovered in this manner were cultured (5–10 ml⁻¹) in flasks containing RPMI 1640 media, pH 6.8, without phenol red and supplemented with 100 units ml⁻¹ penicillin G, 100 µg ml⁻¹ streptomycin, 5 µg ml⁻¹ gentamycin, and 0.25 µg ml⁻¹ kanamycin. Cultures were incubated at 37 °C in 5% CO₂ and culture fluid was collected after 3 days in culture. Excretory/secretory protein was prepared from metabolic product of L₃ released in culture medium. To prepare excretory/secretory, culture medium were concentrated with vivaspin 30.000 MWCO, and protein concentration were counted as described in Bradford method. The molecular weight of excretory/secretory was determined with sodium dodecyl polyacrylamid gel electrophoresis (SDS PAGE). The result showed that protein concentration is 0,595 mg/ml. The molecular weight of excretory/secretory is 28 kDa.*

Keywords: *Ascaridia galli*, excretory/secretory, larvae

PENDAHULUAN

Cacing nematoda umumnya melepaskan ekskretori/sekretori sebagai produk metabolisme parasit. Peneliti terdahulu melaporkan bahwa ekskretori/sekretori dilepaskan oleh cacing nematoda seperti *Ascaris suum* pada babi (Rhoads *et al.*, 1997), *Ostertagia ostertagi* pada sapi (Cock *et al.*, 1993), *Ostertagia circumcincta*, *Haemonchus contortus* dan *Trichostrongylus spp.* pada ruminansia (Knox dan Jones 1990), dan *Onchocerca gipsoni* pada sapi (Harnett *et al.*, 1997) mengandung protein dengan berat molekul yang berbeda-beda. Rhoads *et al.* (1997) melaporkan bahwa pelepasan ekskretori/sekretori disebabkan oleh proses perkembangan dan *survival* parasit seperti penetasan telur, *molting*, dan *exsheathment*. Selain itu, ekskretori/sekretori dapat merangsang respon imunitas inang definitif.

Antigen ekskretori/sekretori *Dicτυocaulus viviparus* (cacing paru pada sapi) dapat dipanen dalam setiap interval waktu 24 selama tiga hari masa kultivasi di dalam medium RPMI 1640 (McKeand *et al.*, 1995). Penelitian Timanova *et al.* (1999) pada tubuh *A. galli* dewasa mengandung poliprotein yang disebut *A. galli fatty acid-binding protein* (AgFABP), bersifat sebagai *allergen* yang mengikat asam lemak dan retinoid dengan afinitas yang kuat. Namun, produk ekskretori/sekretori *L₃ A. galli* belum pernah dilaporkan. Ekskretori/sekretori *L₃ A. galli* diduga mengandung protein sebagai produk metabolisme. Ekskretori/ sekretori stadium *L₃* dipilih menjadi fokus penelitian karena pada stadium tersebut larva *A. galli* akan mengalami fase histotrofik. Pada fase ini larva mengekskresi/sekresikan metabolit untuk menembus *barrier* pertahanan selaput lendir mukosa saluran cerna.

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui kuantitas protein dan berat molekul ekskretori/sekretori yang dilepaskan oleh *L₃ A. galli*. Manfaat penelitian ini adalah sebagai sumber informasi tentang kuantitas protein dan berat molekul protein yang dilepaskan melalui produk ekskretori/sekretori larva *A. galli* pada ayam petelur.

MATERI DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Kandang Unggas, dan Laboratorium Imunologi, Departemen Ilmu Penyakit Hewan Kecil, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor. Waktu Penelitian berlangsung 6 bulan dari bulan Desember 2005 sampai dengan Mei 2006.

Prosedur Penelitian

Sebanyak 5-10 *L₃* dikultur secara *in vitro* dalam setiap ml medium *Rosswell Park Memorial Institute* (RPMI 1640). Ekskretori/sekretori dipreparasi dari produk metabolisme *L₃* yang dilepaskan ke dalam medium kultur. Medium kultur dipekatkan dengan vivaspin 30.000 MWCO, dan kuantitas protein ekskretori/sekretori dihitung dengan metode Bradford. Berat molekul protein ekskretori/sekretori divisualisasikan dengan *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS PAGE).

Preparasi Ekskretori/Sekretori *L₃ A. galli*

Larva *A. galli* diinkubasi dalam sumur *cell culture plate*, masing-masing sumur diisi 25-50 larva dalam 5 ml medium *Rosswell Park Memorial Institute* (RPMI 1640, Sigma-Aldrich), pH 6,8, tanpa merah fenol yang ditambahkan 100 unit ml⁻¹ penisilin G, 100 µg ml⁻¹ streptomisin, 5 µg ml⁻¹

gentamisin dan $0,25 \mu\text{g ml}^{-1}$ kanamisin dalam inkubator CO_2 selama 3 hari. Campuran medium dengan ekskretori/sekretori *L₃ A. galli* disentrifus pada 4000 rpm dengan temperatur $32 \text{ }^\circ\text{C}$ selama 5 menit. Supernatan disaring dengan membran filter $0,45 \mu\text{m}$ Minisart® (Sartorius), ditampung ke dalam tabung vivaspin 30.000 MWCO dan disentrifus pada 4000 rpm dengan temperatur $32 \text{ }^\circ\text{C}$ selama 5 menit. Filtrat dicuci dengan larutan *Phosphate Buffered Saline* (PBS) dan disentrifus kembali selama 3 menit. Filtrat diambil dan dijadikan sebagai produk ekskretori/sekretori *L₃ A. galli* (McKeand *et al.*, 1995).

Kuantitas Protein dari Ekskretori/Sekretori *L₃ A. galli*

Sepuluh miligram *Bovine Serum Albumin* (BSA) dilarutkan dengan 10 ml aquadestilata dan dibuat 15 tingkatan konsentrasi sebagai standar $100 \mu\text{l}$ dari masing-masing tingkatan ditempatkan dalam tabung reaksi steril lainnya dan ditambahkan dengan 5 ml larutan Bradford. Sebagai blanko digunakan 3 tabung reaksi steril masing-masing diisi dengan $100 \mu\text{l}$ aquadestilata dan ditambahkan dengan 5 ml larutan Bradford. Sebanyak $100 \mu\text{l}$ sampel antigen ekskretori/sekretori *L₃ A. galli* diisi ke dalam tabung reaksi steril dan masing-masing ditambahkan dengan 5 ml larutan Bradford. Standar, blanko, dan sampel masing-masing dimasukkan ke tabung kuvet untuk dilihat hasil absorbansinya dengan *Spectrophotometer* (Siles-Lucas dan Cuesta-Bandera, 1996). Data kuantitas protein ekskretori/sekretori larva *A. galli* dianalisis berdasarkan persamaan regresi kurva standar $Y = ax+b$ dari pengenceran BSA, Y adalah besarnya absorpsi, a adalah koefisien regresi, x

adalah konsentrasi sampel, dan b adalah suatu konstanta.

***Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamid Gel Electrophoresis* (SDS PAGE)**

Visualisasi berat molekul antigen dilakukan dengan menggunakan arus listrik tegangan 40 volt dengan kuat arus 12 mA pada suhu kamar selama 2 jam. Pada elektroforesis ini disiapkan dengan poliakrilamid 12,5%, gel pengumpul 4%, buffer elektroda dan buffer sampel. Penanda molekul dan sampel masing-masing dimasukkan ke dalam sumur elektroforesis (Laemmli, 1970). Gel diwarnai dengan *Comassie blue R 250* (Serva Germany) selama 30 menit dan dipucatkan dengan larutan pencuci sampai pita-pita protein tampak jelas.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Preparasi Ekskretori/sekretori *L₃ A. galli*

Setiap tabung vivaspin 30.000 MWCO yang digunakan untuk mengeksplorasi produk ekskretori/sekretori larva *A. galli*. Tabung-tabung tersebut mempunyai volume 20 ml dengan kapasitas *hole* 1,5 ml *concentrator*. Rata-rata 5-10 larva dikultur dalam setiap ml medium kultur. Total medium yang digunakan untuk kultivasi 76.195 larva adalah sebanyak 7 liter RPMI 1640. Dari 7 liter medium kultur berhasil diperoleh 525 ml metabolit larva *A. galli*.

Kuantitas Protein dari Ekskretori/Sekretori *L₃ A. galli*

Nilai absorbansi terhadap protein ekskretori/sekretori larva *A. galli* adalah 0,32. Berdasarkan persamaan regresi $Y = 0,7225X - 0,0073$ ($R^2=0,99$) standar protein, rata-rata kuantitas protein ekskretori/

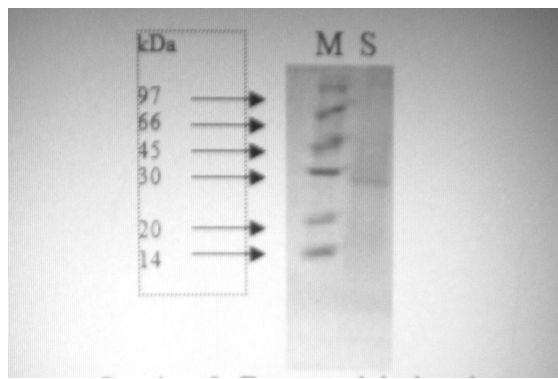
sekretori larva *A. galli* sebelum pemekatan adalah 0,065 mg/ml dan setelah pemekatan adalah 0,595 mg/ml. Hasil uji kuantitas protein standar terhadap BSA pada UV spektrofotometer dengan panjang gelombang 280 nm ($R^2 = 0,99$) disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Kuantitas protein ekskretori/sekretori larva *A. galli*

| No. | Kuantitas protein (mg/ml) | |
|-----------|---------------------------|-------------------|
| | Sebelum pemekatan | Setelah pemekatan |
| 1 | 0,057 | 0,636 |
| 2 | 0,048 | 0,685 |
| 3 | 0,072 | 0,574 |
| 4 | 0,085 | 0,560 |
| 5 | 0,063 | 0,520 |
| Rata-rata | 0,065 | 0,595 |

Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamid Gel Electrophoresis (SDS PAGE)

Visualisasi pita protein melalui SDS PAGE setelah pemekatan dengan vivaspin 30.000 MWCO menunjukkan berat molekul antigen adalah 28 kDa (Gambar 1).



Gambar 1. Berat molekul antigen ekskretori/sekretori L3 *A. galli*. (M= marker, S= sampel)

Hasil yang diperoleh pada penelitian ini menunjukkan bahwa ekskretori/sekretori larva *A. galli* mengandung protein dengan konsentrasi 0,065 mg/ml dan setelah dipekatkan dengan vivaspin 30.000 MWCO meningkat menjadi 0,595 mg/ml (Tabel 1). Konsentrasi tersebut diperoleh

dari kultivasi 4-10 L₃ *A. galli* dalam setiap ml RPMI 1640. Berat molekul protein ekskretori/sekretori larva *A. galli* adalah 28 kDa. Antigen cacing nematoda dapat diperoleh pada setiap stadium larva kehidupannya. Penelitian terdahulu membuktikan bahwa konsentrasi protein yang dilepaskan oleh 10 *A. galli* betina dewasa yang dikultur dalam 20 ml medium RPMI adalah 0,380 mg/ml dengan berat molekulnya 30 kDa (Darmawi, 2003).

Pada tubuh *A. galli* dewasa dibuktikan oleh Timanova *et al.* (1999) mengandung poliprotein. Protein yang dikenal sebagai *A. galli fatty acid-binding protein (AgFABP)* dikarakterisasi melalui deduksi rantai asam amino AgFABP merefleksikan bahwa poliprotein ini bersifat sebagai antigen yang dapat memicu alergi. Alergen mengikat asam lemak dan retinoid dengan afinitas yang kuat.

Ekskretori/sekretori yang dilepaskan cacing nematoda seperti *O. circumcincta* dan *O. gipsoni* pada sapi (Harnett *et al.*, 1997), *A. suum* pada babi (Rhoads *et al.*, 2001), *H. contortus* pada domba (Vervelde *et al.*, 2003) dan *A. galli* pada ayam petelur (Darmawi *et al.*, 2006) dapat berperan sebagai molekul biologik aktif pemicu respon imunitas inang definitif. Antigen cacing nematoda sering berubah-ubah seiring dengan kejadian *molting* yang dialaminya. Taylor *et al.* (1995) melaporkan bahwa cacing nematoda *O. volvulus* yang sering ditemukan pada manusia di Afrika dan Amerika Selatan mempunyai beberapa antigen yang terdapat pada *hypodermis* dan kutikula. Berat molekul antigen polipeptida mikrofilaria *O. volvulus* adalah 42 kDa. Pada stadium L₃ divisualisasikan dua jenis antigen protein masing-masing dengan berat molekul 52 dan 65 kDa, sedangkan

pada stadium dewasa antigen *O. volvulus* tidak terdeteksi.

Visualisasi berat molekul antigen juga ditemukan pada cacing nematoda yang lain. Pada stadium L₄, cacing *O. ostertagi* melepaskan ekskretori/sekretori dengan berat molekul 66, 70, dan 100 kDa (Cock *et al.*, 1993). Ekskretori/sekretori stadium L₁ *Trichinella spiralis* mempunyai berat molekul 25-55 kDa (Todorova, 2000). Hadas dan Stankiewicz (1997) melaporkan bahwa berat molekul proteinase pada L₃ dan cacing dewasa *H. contortus* dan *T. colubriformis* berkisar antara 35-200 kDa. Tsuji *et al.* (2001) membuktikan pula bahwa cDNA L₃ *A. suum* yang mengkode protein dengan berat molekul rendah 14 kDa apabila diikat dengan subunit toksin B kolera dapat berperan sebagai antigen untuk menginduksi imunitas protektif terhadap infeksi *A. suum* pada mencit.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan larva (L₃) *A. galli* melepaskan ekskretori/sekretori yang mengandung protein 0,065 mg/ml dan setelah pemekatan dengan vivaspin 0,595 mg/ml dengan berat molekul 28 kDa.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis menyampaikan terimakasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional yang telah membiayai penelitian ini melalui Proyek Penelitian Hibah Bersaing XIII Nomor: 014/SP3/PP/DP2M/IV/2004. Ucapan terimakasih dan penghargaan tulus disampaikan kepada Sulaeman dan Kosasih

atas bantuan teknis yang telah diberikan. Terimakasih juga kepada mahasiswa S1 FKH IPB, Rahanto Siregar, Janiati Karo Karo, Ela Nurmala Sari dan Indra Nur Rakhman yang telah membantu penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Campos, M., L. Martin, V. Diaz, I. Manas, B. Morales, and J. Lozana. 2004. Detection of circulating antigens in experimental anisakis by two-site enzyme-link immunosorbent assay. http://parasitology.informatik.uni-wuerzburg.de/login/n/h/j_004-1138-0.html.
- Cock, H.D., D.P. Knox, E. Claerebout, and D.C.D. Graaf. 1993. Partial characterization of proteolytic enzymes in different developmental stages of *Ostertagia ostertagi*. *The Journal of Helminthology*. 67:271-278.
- Darmawi. 2003. Pengaruh pemberian antigen ekskretori-sekretori (es) *Ascaridia galli* dewasa terhadap tanggap kebal sel eosinofil dan sel mast mukosa usus halus ayam petelur. *Tesis*. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Darmawi, U. Balqis, R. Tiuria, M.T. Suhartono, R.D. Soejoedono, B.P. Priosoerjanto, F.H. Pasaribu, and M. Hambal. 2006. Protease activity of excretory/secretory released by invasive stage of *Ascaridia galli*. *Proceeding: ASEAN Biochemistry Seminar and Workshop (ENZYMES: Industrial and Medical Prospects)*, Surabaya, 6-7th February.
- Hadas, E. and M. Stankiewicz. 1997. Proteolytic enzymes of infective larvae and adults of *Trichostrongylus*

- colubriiformis* and *Haemonchus contortus*. **Parasitology Research**, 83:47-51.
- Harnett, W., M. MacDonald, G. Preece, M. Patterson, and M.E. Parkhouse. 1997. Production of monoclonal antibodies against excretory-secretory products of adult male *Onchocerca gibsoni*. **Journal of Parasitol.** 83(2):316-319.
- Knox, D.P. and D.G. Jones. 1990. Studies on the presence and the release of proteolytic enzymes (proteinases) in gastrointestinal nematodes of ruminants. **The International Journal for Parasitology.** 20:243-249.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **The Nature.** 227:680-685.
- McKeand, J.B., D.P. Knox, J.L. Duncan, and M.W. Kennedy. 1995. Protective immunisation of guinea pigs against *dictyocaulus viviparus* using excretory/secretory product of adult parasites. **International Journal for Parasitology.** 25:93-104.
- Rhoads, M.L., R.H. Fetterer, and J.F. Urban Jr. 1997. Secretion an aminopeptidase during transition of third to fourth-stage larvae of *Ascaris suum*. **The Journal of Parasitology.** 83(5):780-784.
- Rhoads, M.L., R.H. Fetterer, and J.F. Urban Jr. 2001. Release of hyaluronidase during *in vitro* development of *ascaris suum* from the third to fourth larval stage. **Parasitol. Res.** 87(9):693-697.
- Siles-Lucas, M. and C. Cuesta-Bandera. 1996. *Echinococcus granulosus* in Spain: Strain Differentiation by SDS-PAGE of Somatic and Excretory/Secretory Proteins. **The Journal of Helminthol.** 70:253-257.
- Taylor, M.J., N. Abdel-Wahab, Y. Wu, R.E. Jenkins, and A.E. Bianco. 1995. *Onchocerca volvulus* larval antigen, ovb20, induces partial protection in a rodent model of onchocerciasis. **Infection and Immunity.** 63(11):4417-4422.
- Timanova, A., S. Müller, T. Marti, I. Bankov, and R.D. Walter. 1999. *Ascaridia galli* fatty acid-binding protein, a member of the nematode polyprotein allergens family. **Eur. J. Biochem.** 261:569-576.
- Todorova, V.K. 2000. Proteolytic enzymes secreted by larval stage of the parasitic nematode *Trichinella spiralis*. **Folia Parasitologica.** 47:141-145.
- Tsuji, N., K. Suzuki, H. Kasuga-Aoki, Y. Matsumoto, T. Arakawa, K. Ishiwata, and T. Isobe. 2001. Intranasal immunization with recombinant *ascaris suum* 14-kilodalton antigen coupled with cholera toxin B subunit induces protective immunity to *A. suum* Infection in Mice. **Infection and Immunity.** 69(12):7285-7292.
- Vervelde, L., N. Bakker, F.N.J. Kooyman, A.W.C.A. Cornelissen, C.M.C. Bank, A.K. Nyame, R.D. Cummings, and I.V. Die. 2003. Vaccination-induced protection of lambs against the parasitic nematode *Haemonchus contortus* correlates with high IgG antibody responses to the ldnf glycan antigen. **Glycobiology.** 13(11):795-804. <http://glycob.oupjournals.org/cgi/content/full/13/11/795>.

