
Pemisahan dan Penentuan Karakter Fraksi Protein ESA *Toxoplasma gondii* Secara Immunologik Untuk Pengembangan Diagnosa

Lale Budi Kusuma Dewi, Agrijanti

Jurusan Analis Kesehatan, Poltekkes Kemenkes Mataram, Indonesia

Article Info

Article history:

Received Nov 19th, 2020

Revised Mar 01st, 2021

Accepted Mar 09th, 2021

Keyword:

Toxoplasma gondii ESA,
Protein,
Fractionation,
Diagnosis Development,

ABSTRACT

Toxoplasmosis is a zoonotic disease that attacks vertebrates including humans. T gondii infection cause toxoplasmic encephalitis in immunocompromised patients, blindness, abortion, fetal abnormalities and even fetal death or miscarriage. the diagnosis of toxoplasmosis is mainly based on detection of specific antibodies in serum samples using the T gondii antigen protein. various kinds of antigens are explored to be used as bioresptors to detect antibodies against T gondii in the patient's body. the use of ESA protein has advantages in terms of simple preparation. The lacks is the protein contamination by extraparasitic components so that it can reduce the sensitivity and specificity of T gondii antibodies detection. The purpose of this study is to separate or purify antigenic ESA proteins to increase the sensitivity and specificity detection by purifying ESA proteins with gel filtration chromatography. The results obtained 3 fractionation, the protein ESA fractionation is one of fraction that has antigenic properties towards T Gondii. dipstick test with antigen using fraction 3 the results of ESA protein fractionation, 7 samples were positive from 8 positive samples, gave a sensitivity value of 87.5% and 6 samples were negative from 8 negative samples, giving a specificity value of 75%.

ABSTRAK

Toksoplasmosis adalah penyakit zoonosis yang menyerang vertebrata termasuk manusia. Infeksi *T. gondii* dapat menyebabkan ensefalitis toksoplasma pada pasien immunocompromised, kebutaan, aborsi, kelainan janin dan bahkan kematian janin atau keguguran. Diagnosis toksoplasmosis terutama didasarkan pada deteksi antibodi spesifik dalam sampel serum dengan menggunakan protein antigenik *T. gondii*. Berbagai macam antigen dieksplorasi untuk digunakan sebagai bioresseptor untuk mendeteksi antibodi terhadap *T. gondii* di dalam tubuh penderita. Penggunaan protein ESA memiliki keunggulan dalam hal kemudahan preparasi kekurangannya adalah protein terkontaminasi dengan komponen ekstraparasitik sehingga dapat mengurangi nilai sensitivitas dan spesifisitas deteksi terhadap antibodi *T. gondii*. Tujuan penelitian ini adalah memisahkan atau memurnikan protein ESA yang bersifat antigenik untuk meningkatkan sensitivitas dan spesifisitas deteksi dengan cara memurnikan protein ESA dengan kromatografi filtrasi gel. Hasil penelitian mendapatkan fraksi 3 hasil fraksinasi protein ESA merupakan salah satu fraksi yang memiliki sifat antigenik terhadap *T. gondii*. Uji dipstick dengan antigen menggunakan fraksi 3 hasil fraksinasi protein ESA, sebanyak 7 sampel dinyatakan positif dari 8 sampel positif, memberikan nilai sensitivitas sebesar 87,5% dan sebanyak 6 sampel dinyatakan negatif dari 8 sampel negatif, memberikan nilai spesifisitas 75%.

Kata Kunci : Protein ESA Toksoplasma gondii, Fraksinasi, Pengembangan Diagnosis

Pendahuluan

Toxoplasma gondii merupakan parasit intraseluler obligat yang menginfeksi berbagai mamalia dan burung dan menyebabkan toksoplasmosis. Manusia dapat terinfeksi karena menelan daging yang mengandung kista jaringan mentah atau setengah matang (Wang et al. 2011). Infeksi *T. gondii* dapat menyebabkan ensefalitis toksoplasma pada pasien immunocompromised, kebutaan, aborsi, kelainan janin dan bahkan kematian janin atau keguguran (Jiang et al. 2016).

Pengembangan metode yang sensitif dan spesifik untuk mendeteksi infeksi *Toxoplasma gondii* merupakan langkah kunci untuk pengobatan pasien yang dicurigai toksoplasmosis (Jiang et al. 2015). Beberapa teknik diagnosis secara serologis telah banyak dikembangkan dalam diagnosis toksoplasmosis pada hewan dan manusia. Beberapa teknik yang telah diketahui digunakan untuk diagnosis toksoplasmosis diantaranya adalah Dye test (*Sabin – Feldman Dye Test*), CFT (*Complement Fixation Test*), MAT (*Modified Agglutination Test*), CAT (*Card Agglutination Test*), DAT (direct agglutination test), IHA (*Indirect Hemagglutination Test*) dan LAT (*Latex Agglutination Test*), IFA (*Indirect Fluorescen Assay*) dan FA (*fluorescen assay*), ELISA (*Enzyme Linked Immunosorben Assay*) dan immunoblotting (Subekti et al. 2005). Selain itu, strip immunokromatografi (ICS) juga telah dilakukan yang memiliki banyak keuntungan dibandingkan immunoassays tradisional, seperti biaya rendah, operasi yang cepat dengan hasil yang langsung dapat diamati dan tidak ada persyaratan untuk peralatan khusus atau teknisi terampil (Jiang et al. 2015).

Protein yang digunakan untuk diagnosis toksoplasmosis bervariasi mulai dari protein natif seperti protein membran, STAg/LTA (*Soluble Of Tachyzoite Antigen/Lysate Of Tachyzoite Antigen*), ESA (*Excretory And Secretory Antigen*) dan fraksinasi dari protein natif tersebut sampai protein tunggal hasil teknologi rekombinan seperti SAG1, GRA7, MIC3, dan SAG2. Penggunaan protein natif memiliki keunggulan dalam hal kemudahan preparasi, sensitivitas dan spesifisitas cukup tinggi dan dapat digunakan untuk uji aviditas dengan baik tetapi kekurangannya adalah protein terkontaminasi dengan komponen ekstraparasitik sehingga dapat mengurangi nilai sensitivitas dan spesifisitas deteksi terhadap antibodi *T. gondii*. Sebaliknya protein tunggal memiliki keunggulan dalam hal spesifisitas dan sensitivitas yang lebih baik dibanding protein natif namun tidak selalu cocok untuk uji aviditas. Uji aviditas pada ELISA bermanfaat untuk determinasi prediktif kapan seseorang atau individu tersebut diperkirakan terinfeksi. Aviditas juga dapat digunakan untuk menentukan status infeksi serta kekuatan ikatan intrinsik antara antibodi dengan antigen. Apabila ikatan intrinsiknya lemah maka daya proteksinya juga lemah meskipun titernya cukup tinggi. Sebaliknya apabila ikatan intrinsik antigen-antibodinya cukup tinggi maka daya proteksinya cukup baik meskipun titernya tidak terlalu tinggi (Subekti et al. 2005).

Kromatografi filtrasi gel biasanya digunakan untuk memisahkan molekul dengan ukuran yang berbeda dan dapat mengatasi bentuk oligomer dari protein tertentu untuk tujuan pemurnian. Eluen yang digunakan untuk pemisahan protein yang stabil dalam buffer yang mengandung Tris-HCl, NaCl atau DTT (Duong-ly & Gabelli 2014).

Kromatografi filtrasi gel telah digunakan secara luas dengan tujuan pemurnian protein. Untuk meningkatkan sensitivity dan specificity imunodiagnostik *Clonorchis sinensis*, digunakan gel filtration chromatography untuk memurnikan protein yang akan digunakan sebagai antigen (ngoc, 2015).

Pemurnian protein dengan menggunakan kromatografi filtrasi gel diantaranya adalah pemurnian L-asparaginase bawang bombay dengan menggunakan sephadex G-100 (Setiawan et al. 2013) dan pemurnian protein kapang *Xylaria psidii* KT30 dengan sephadex G-50 (Munandar et al. 2014).

Berdasarkan uraian yang telah disampaikan, peneliti ingin melakukan penelitian yang bertujuan untuk memisahkan atau memurnikan protein ESA yang bersifat antigenik untuk meningkatkan sensitivitas dan spesifisitas deteksi dengan cara memurnikan protein ESA dengan kromatografi filtrasi gel sehingga fraksi protein tersebut untuk dapat digunakan sebagai antigen pada metode uji secara serologis untuk menegakkan diagnosis *T. gondii*.

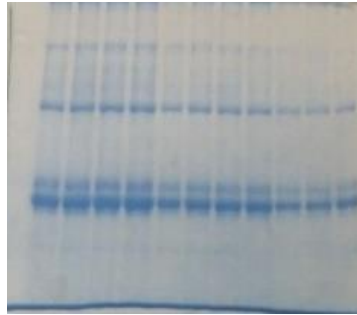
Metode Penelitian

Protein ESA dari takizoit *T. gondii* yang diperoleh dari laboratorium parasitologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya. Reagen yang digunakan untuk pembuatan antigen adalah protease inhibitor (TLCK, PMSF, EDTA), PBS, NaCl fisiologis, Tris Ammonium klorid, 0,5% Nonidet – P40. Reagen yang digunakan untuk elektroforesis dan western blot adalah Tris-HCL pH 6,8, SDS, β -mercaptoethanol (ME), marker BM, bromphenol blue dye, Comassie Brilliant Blue, Aquades, acrylamid, APS, TEMED, Tris-Buffered salin – Tween (TBST), bovine serum albumin, alkaline phosphatase – conjugated antihuman IgG Fab spesifik (Anti-Human IgGConjugated, Sigma), 5-bromo-4-chloro-3-indolyolphosphate (BCIP-AP), nitroblue tetrazolium, alkaline phosphatase substrate buffer, Sephadex G-200, glasswool. Kolom Kromatografi, Pipet mikro, centrifuse, mikroskop, apparatus Mini-Gel (Bio-Rad, Richmond, California)

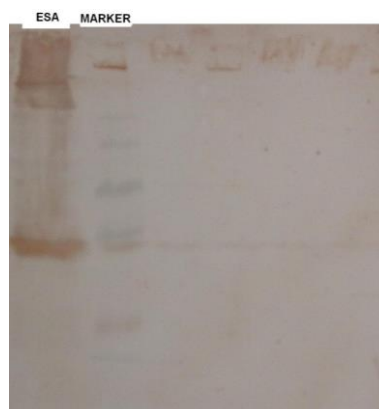
Sampel yang digunakan adalah takizoit *Toxoplasma gondii* yang didapatkan dari Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Dari takizoit tersebut diekstraksi protein ESA di Institut of Tropical Disease Universitas Airlangga Surabaya. Sampel Protein ESA dianalisa dengan menggunakan SDS PAGE dan Western Blotting untuk mengetahui pola fraksi protein ESA berdasarkan bobot molekul, sedangkan western blotting untuk mengetahui jenis fraksi protein yang bersifat antigenik terhadap *Toxoplasma gondii*. Langkah selanjutnya adalah pemisahan protein menggunakan kromatografi kolom. Sebelum menggunakan kromatografi kolom, dilakukan optimasi eluen yang bervariasi dengan menggunakan kromatografi lapis tipis. SDS PAGE, Western Blotting dan pemisahan protein ESA dilakukan di Laboratorium Immunologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Mataram dan *Laboratorium Toxoplasma Institute of Tropical Disease* Universitas Airlangga, Surabaya.

Hasil Penelitian dan Pembahasan

Hasil SDS PAGE protein ESA menunjukkan fraksi yang terdapat dalam protein tersebut sebanyak 7 fraksi dengan berat molekul 6, 18, 24, 35, 49, 97 dan 147 KDa dan berdasarkan hasil western blott menunjukkan fraksi protein dengan berat molekul 97 dan 35 KDa bersifat antigenik. Hasil SDS PAGE pada gambar 1 sedangkan hasil Western Blott protein ESA ditunjukkan pada gambar 2.



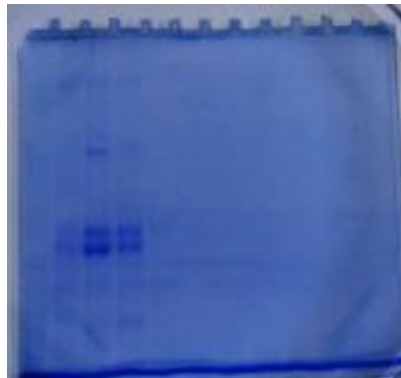
Gambar 1. Hasil SDS PAGE



Gambar 2. Hasil Western Blotting Protein ESA

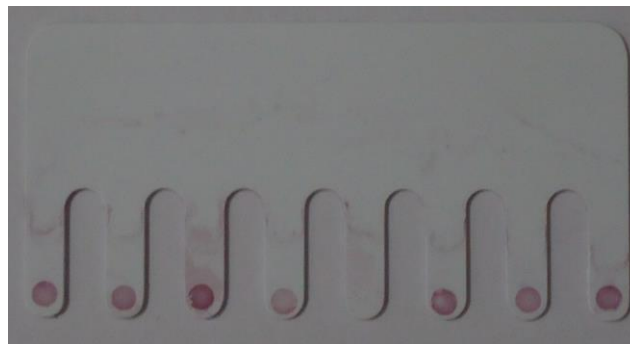
Dengan menggunakan protein ESA, dilakukan uji pendahuluan dengan menggunakan dipstik untuk mengetahui apakah protein tersebut memiliki fraksi protein yang bersifat antigenik dan dapat digunakan sebagai bioreseptor. Dalam uji dipstik tersebut, digunakan 4 sampel serum yang didapatkan dari laboratorium klinik dengan 4 sampel positif dan 4 sampel negatif.

Fraksinasi protein ESA dilakukan dengan menggunakan kromatografi filtrasi gel Sephadex G-200 dengan menggunakan eluen NaCl atau salin menghasilkan 9 fraksi protein ESA. Hasil fraksinasi dianalisa dengan menggunakan SDS PAGE. Hasil SDS PAGE hasil fraksinasi menunjukkan fraksi 1 mengandung 147 dan 97 KD, juga 35, 24 dan 18 yang tampak samar menunjukkan konsentrasinya rendah. Fraksi 2 mengandung 97, 35, 24 dan 18 KDa, fraksi 3 mengandung 97, 35, 24 dan 28 KDa dengan fraksi 97 dan 35 tampak samar menunjukkan konsentrasi rendah dalam fraksi 3. Fraksi 4 sampai fraksi 9 sudah tidak mengandung protein. Hasil SDS PAGE hasil fraksinasi protein ESA ditunjukkan dalam gambar 3



Gambar 3. Hasil Fraksinasi protein ESA

Terhadap fraksi protein yang mengandung protein antigenik dilakukan uji dipstik, yaitu fraksi 2 dan 3. Uji dipstik dilakukan dengan menggunakan 8 sampel positif dan 8 sampel negatif. Hasil uji dipstik dengan menggunakan fraksi 2 memberikan hasil yang kurang memuaskan karena semua sampel serum negatif dinyatakan positif sedangkan semua sampel positif dinyatakan positif. Uji dipstik dilanjutkan dengan menggunakan fraksi 3 yang memberikan hasil lebih baik dari fraksi 2. Hasil uji dipstik dengan menggunakan fraksi 3 adalah dari 8 sampel serum positif, 7 sampel dinyatakan positif, sedangkan dari 8 sampel serum negatif, 6 serum dinyatakan negatif. Hasil uji dipstik fraksi 3 dengan serum positif ditunjukkan dalam gambar 4 dan uji dipstik fraksi 3 dengan serum negatif ditunjukkan dalam gambar 5



Gambar 4. Hasil uji dipstik fraksi 3 dengan serum positif



Gambar 5. Hasil uji dipstik fraksi 3 dengan serum negatif

Protein dengan bobot molekul 16, 32, 38, 40, 43, 54, 60, 66 dan 97 sering kali dikenali dengan IgG aviditas tinggi pada toksoplasmosis kronis (Carla et al. 2002). Nilai spesifisitas 0% menunjukkan bahwa dengan protein ESA sebagai bioresptor sangat tidak spesifik karena protein ESA masih terkontaminasi dengan protein lain yang kemungkinan berasal dari komponen ekstraparasitik sehingga dapat mengurangi nilai sensitivitas dan spesifisitas deteksi terhadap antibodi *T. gondii* (Subekti et al. 2005). Untuk itu, perlu dilakukan pemurnian dengan kromatografi filtrasi gel untuk menghilangkan komponen pengganggu. Penggunaan protein natif memiliki keunggulan dalam hal kemudahan preparasi, sensitivitas dan spesifisitas cukup tinggi. Kekurangan penggunaan protein natif diantaranya, membutuhkan waktu preparasi lama, inkonsistensi kualitas, protein terkontaminasi dengan komponen ekstraparasitik dan resiko terinfeksi parasit hidup (Ching et al. 2014). Spesifisitas yang masih rendah dengan menggunakan antigen ini kemungkinan disebabkan oleh reaksi antigen dengan antibodi yang ditimbulkan oleh infeksi parasit lain, seperti misalnya toksocariasis. Dalam penelitian ini, serum negatif toksoplasmosis tidak di uji toksocariasis, sehingga tidak dapat diketahui reaksi silang yang terjadi antara antigen *T. gondii* dengan antibodi toxocariasis. Pada penelitian Ching et al. pada tahun 2014 mendeteksi toksoplasmosis pada manusia menggunakan *recombinant dense granular protein* (GRA5) dengan metode western blot. Spesifitas rGRA5 ditentukan dengan menggunakan sampel serum dari pasien yang didiagnosis dengan amoebiasis (3 sampel), cysticercosis (3 sampel), filariasis (3 sampel), dan toxocariasis (3 sampel). Spesifisitas metode ini mencapai 100% diuji dengan serum amoebiasis, cysticercosis dan filariasis, sedangkan dengan toksocariasis, dari 3 sampel negatif, satu sampel dinyatakan positif dengan persentase sebanyak 66,75%.

Pemurnian protein ESA menjadi fraksi protein dilakukan menggunakan sephadex G-200 dengan range pemisahan 5-600 KDa. Umumnya, pemisahan atau pemurnian dengan kromatografi filtrasi gel merupakan pemurnian akhir setelah pemurnian dengan beberapa langkah sebelumnya. Metode ini tidak bisa digunakan untuk pemurnian protein setelah tahap pemecahan sel karena terdapat banyak protein dengan ukuran yang sama. Untuk mendapatkan hasil pemurnian protein yang lebih baik, sebaiknya pemurnian tingkat pertama menggunakan kromatografi afinitas atau kromatografi penukar ion sebelum menggunakan kromatografi filtrasi gel. Jika dilakukan pemisahan terhadap sampel oligomerik, sampel yang diinjeksikan harus sangat pekat, untuk mencegah *overlapping* dari 2 fraksi yang berbeda atau cara lain adalah dengan menggunakan kolom yang lebih panjang (Duong-ly & Gabelli 2014).

Kesimpulan

Hasil uji dipstik dengan menggunakan fraksi 3 memberikan hasil yang lebih baik daripada hasil uji dipstik dengan protein ESA, dimana spesifisitasnya meningkat menjadi 75% walaupun diikuti dengan penurunan sensitivitas dari 100% menjadi 87,5%.

Daftar Pustaka

- Carla, A. et al., 2002. Detection of Antibodies to the 97 kDa Component of *Toxoplasma gondii* in Samples of Human Serum. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 97(October), pp.1009–1013.
- Ching, X.T. et al., 2014. Recombinant dense granular protein (GRA5) for detection of human toxoplasmosis by Western blot. *BioMed Research International*, 2014.

-
- Duong-ly, K.C. & Gabelli, S.B., 2014. *Gel Filtration Chromatography (Size Exclusion Chromatography) of Proteins* 1st ed., Elsevier Inc. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00009-4>.
- Jiang, W. et al., 2015. Biosensors and Bioelectronics A novel dynamic flow immunochromatographic test (DFICT) using gold nanoparticles for the serological detection of *Toxoplasma gondii* infection in dogs and cats. *Biosensors and Bioelectronic*, 72, pp.133–139. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2015.04.035>.
- Jiang, W. et al., 2016. Protein Expression and Purification Identification and characterization of an immunogenic antigen , enolase 2 , among excretory / secretory antigens (ESA) of *Toxoplasma gondii*. *Protein Expression and Purification*, 127, pp.88–97. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2016.07.011>.
- Munandar, A., Mustopa, A.Z. & Tarman, K., 2014. Aktivitas Antibakteri Protein Kapang *Xylaria psidii* KT30 Terhadap *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis* [Antibacterial Activity of Protein Fungus *Xylaria psidii* KT30 on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*]. *J. Teknol. dan Industri Pangan*, 25(No. 2 Th. 2014), pp.146–151.
- Setiawan, A.S.R., Wuryanti, W. & Aminin, A.L.N., 2013. Purifikasi L-Asparaginase Dari Bawang Bombay (*Allium cepa* L.) Menggunakan Kromatografi Filtrasi Gel SehadexG-100. *Chem Info*, 1(1), pp.27–34.
- Subekti, D.T., Artama, W.T. & Iskandar Tolibin, 2005. perkembangan kasus dan teknologi. , pp.253–263. Available at: <http://kalteng.litbang.pertanian.go.id/eng/pdf/all-pdf/peternakan/fullteks/lokakarya/lkzo05-41.pdf>.
- Wang, Y. et al., 2011. Parasitology International Development of an immunochromatographic strip for the rapid detection of *Toxoplasma gondii* circulating antigens. *Parasitology International*, 60(1), pp.105–107. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2010.11.002>.