

Evaluasi media biakan cacing dewasa *Brugia malayi* in vitro dengan suplemen glukosa

Sri Sumarni

Bagian Parasitologi Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

ABSTRACT

Sri Sumarni - *Evaluation of in vitro culture media of adult Brugia malayi with glucose supplementation*

Background: The circulating antigen of filariasis malayi patient is the excretory/secretory (ES) protein. It was used as antigen in monoclonal antibody production. The ES protein can be obtained by *in vitro* culture of filarial worm *Brugia malayi*.

Objective : The aims of this research was to evaluate *in vitro* culture media with glucose supplementation of adults *B.malayi* to obtain the ES protein maximally.

Methods: Adult males and females *B.malayi* were cultivated *in vitro* in medium with glucose supplementation in different concentrations (1%, 3% and 5%). The culture media were changed daily and analysis of its protein were carried out quantitatively using Bradford method, and gel electrophoresis (SDS PAGE) for qualitative protein analysis. The cuticle of adults *B.malayi* were extracted by detergent cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB).

Results: The effective culture medium was RPMI with 1% glucose supplementation to produce ES protein maximally, and longevity of worms could survive for 6 days. The quantitative protein concentration of female worms culture medium was 0.2-1.85 ug/ml, and the protein molecular weight of female worms cuticle was 26 kDa- 116 kDa. The protein concentration of male culture medium was 0.2-0.5 ug/ml, the molecular weight of adult male cuticle protein was 34 kDa- 56kDa. The peak concentration of protein in both cultivation was observed on the third day.

Conclusion: The best medium for *in vitro* cultivation of adults *B.malayi* was RPMI with 1% glucose supplementation. The protein concentration of the female culture media was higher than male .

Key words: glucose supplementaion - *in vitro* culture - filarial worms -*Brugia malayi* - ES protein

ABSTRAK

Sri Sumarni - *Evaluasi media biakan in vitro untuk Brugia malayi dewasa dengan suplemen glukosa*

Latar belakang penelitian: Protein ekskretori/sekretori (ES) *Brugia malayi* merupakan antigen beredar dalam tubuh penderita filariasis malayi, yang dapat digunakan sebagai antigen dalam pembuatan antibodi monoklonal spesifik terhadap infeksi *Brugia malayi* pada manusia. Protein ES dapat diperoleh dari biakan cacing dewasa *B.malayi in vitro*.

Tujuan penelitian: Untuk mengevaluasi pembuatan biakan cacing dewasa *B.malayi in vitro* dengan suplemen glukosa yang paling efektif untuk memperoleh protein ES secara maksimal.

Bahan dan cara penelitian : Cacing dewasa *B.malayi* dibiakkan *in vitro* dalam media RPMI dengan suplemen glukosa (1%, 3% dan 5%) sebagai sumber energi. Setiap hari media diganti dengan yang baru, media yang lama diukur kadar protein ESnya secara kuantitatif dengan cara Bradford. Protein selubung *B. malayi* diperoleh dengan cara ekstraksi menggunakan detergen cetyltrimethyl ammonium bromida (CTAB). Kumpulan media pada akhir biakan dan selubung *B.malayi* dianalisis proteinnya secara kualitatif dengan elektroforesis (SDS PAGE).

Hasil : Hasil penelitian menunjukkan bahwa media biakan cacing jantan maupun betina yang paling baik untuk mendapatkan kadar protein yang maksimal adalah media dengan suplemen 1% glucose, dan cacing dewasa dapat bertahan hidup sampai 6 hari. Kadar protein kuantitatif media biakan cacing betina (0,2 ug/ml - 1,85 ug/ml) , dan berat molekul protein selubung cacing dewasa betina 26 kDa-116 kDa. Kadar protein kuantitatif media biakan cacing jantan lebih rendah (0,15 ug/ml - 0,5 ug/ml). Berat molekul protein selubung cacing jantan 34 kDa-56kDa. Fluktuasi keluarnya kadar protein tertinggi pada kedua biakan adalah pada hari ketiga

Simpulan: Media biakan yang terbaik untuk mendapatkan protein ES adalah media RPMI dengan suplemen glukosa 1%. Kadar protein ES dari media biakan cacing betina lebih tinggi daripada cacing jantan.

PENGANTAR

Filariasis malayi masih merupakan masalah kesehatan yang penting di Indonesia, karena beberapa daerah di luar Jawa merupakan daerah endemik penyakit ini.

Stadium dewasa *B. malayi* mensekresi protein Ekskretori-sekretori (ES), yang berasal dari hasil metabolisme cacing dalam tubuh penderita. Protein ini dapat ditemukan dalam darah dan cairan tubuh penderita filariasis malayi dan dikenal sebagai antigen beredar.¹ Protein ES dapat disebarkan ke lingkungan sekitarnya dengan mekanisme transport protein yang berasal dari kelenjar-kelenjar ekskresi/sekresi cacing dewasa dan dari *parturition* serta *moulting fluid*. Diagnosis dengan deteksi antibodi dalam tubuh penderita kurang spesifik karena sering terjadi reaksi silang. Antibodi monoklonal yang dibuat terhadap protein ES dipilih untuk deteksi antigen beredar pada penderita filariasis malayi, karena antigen ES tidak mengenal *common epitop* (fosforilkolin) sehingga lebih spesifik.² Protein ES dapat diisolasi dari supernatan biakan cacing dewasa *B. malayi in vitro*. Berbagai cara membuat biakan dengan media yang berbeda telah dilakukan, namun biasanya digunakan suplemen FBS (*Fetal Bovine Serum*).³ Hasil biakan dengan cara demikian tidak dapat digunakan dalam pembuatan antibodi monoklonal yang spesifik, karena protein ES yang diperoleh tidak murni dan bercampur dengan protein FBS. Untuk memperoleh protein ES yang dapat digunakan dalam pembuatan antibodi monoklonal diperlukan media glukosa sebagai sumber energi pengganti FBS. Kwan Lim *et al.*⁴ telah menggunakan glukosa 1% sebagai sumber energi pengganti FBS dalam biakan dengan media RPMI tanpa HEPES, namun cacing hanya mampu hidup kurang lebih 1 minggu dalam biakan, sehingga produksi protein ES sangat sedikit, hanya dalam ukuran $\mu\text{g/ml}$.⁴ Kriteria keberhasilan biakan cacing dewasa adalah lamanya cacing hidup dalam biakan dan kemampuan reproduksinya. Kehidupan dapat dilihat dari gerakan aktif cacing dalam biakan dan kemampuan reproduksi dapat dilihat dari adanya mikrofilaria dalam media biakan, namun parameter ini berbeda untuk setiap jenis cacing filaria. Sistem biakan tanpa sel telah digunakan untuk cacing dewasa yang diinkubasikan pada suhu 35°-37° C dalam inkubator CO₂.⁵

Dalam penelitian ini dibuat biakan cacing dewasa *B. malayi in vitro* dengan modifikasi cara Kwan Lim *et al.* tersebut, yaitu dengan menggunakan kadar glukosa 1%, 3% dan 5% sebagai sumber energi dalam media RPMI dan HEPES yang diinkubasikan dalam inkubator CO₂. Apakah biakan dengan suplemen glukosa yang kadarnya berbeda akan mempengaruhi lamanya kehidupan cacing dewasa dalam biakan *in vitro*, hal ini belum pernah dilaporkan. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui cara yang paling efektif untuk mendapatkan protein ES secara maksimal dari biakan dengan berbagai konsentrasi glukosa. Diharapkan cara demikian dapat digunakan untuk memperoleh protein ES dalam jumlah besar, dan dapat digunakan untuk pembuatan antibodi monoklonal, sehingga diagnosis filariasis malayi dapat ditegakkan sebelum infeksi berlanjut menjadi kronis.

CARA PENELITIAN

Bahan dan alat

Bahan yang digunakan adalah cacing dewasa *B. malayi* yang dibiakkan dalam media RPMI + HEPES + glukosa (konsentrasi 1%, 3% dan 5%) serta ditambah dengan gentamisin dan fungizon. Reagen Bradford digunakan untuk analisis protein media biakan secara kuantitatif dan gel elektroforesis untuk analisis protein ES secara kualitatif. Peralatan yang digunakan adalah inkubator CO₂ untuk inkubasi biakan dan perangkat elektroforesis.

Prosedur pelaksanaan

1. Penyediaan cacing dewasa *B. malayi* Jerbil (*Meriones unguiculatus*) diinfeksi dengan larva stadium 3 (L₃) *B. malayi* yang diperoleh dari tubuh nyamuk *Aedes togoi*, yang dipelihara di Laboratorium Parasitologi FK UGM. Cacing dewasa dapat diperoleh setelah jerbil diinfeksi 3-4 bulan.
2. Biakan cacing dewasa *B. malayi in vitro*
Media biakan terdiri dari RPMI 1640 + 25 mM HEPES + glukosa (1%, 3% dan 5%) +100 unit/ml gentamisin + fungizon. Tiap flask mengandung 20 cc media dan berisi 30 ekor cacing dewasa. Biakan cacing dewasa jantan dan betina dibuat dengan cara sebagai berikut:

- Flask 1: 30 ekor cacing dewasa betina dalam 20 cc media dengan glukosa 1%
- Flask 2: 30 ekor cacing dewasa betina dalam 20 cc media dengan glukosa 3%
- Flask 3: 30 ekor cacing dewasa betina dalam 20 cc media dengan glukosa 5%
- Flask 4: 30 ekor cacing dewasa jantan dalam 20 cc media dengan glukosa 1%
- Flask 5: 30 ekor cacing dewasa jantan dalam 20 cc media dengan glukosa 3%
- Flask 6: 30 ekor cacing dewasa jantan dalam 20 cc media dengan glukosa 5%

Tiap hari media diganti dengan yang baru. Media lama dianalisis kadar protein kuantitatif setiap hari, untuk melihat protein ES yang dihasilkan (dengan cara Bradford). Media cacing betina terlebih dahulu disentrifugasi untuk memisahkan adanya mikrofilaria, baru kemudian dianalisis kadar proteinnya. Dengan demikian kadar protein kuantitatif biakan cacing jantan dan betina dapat diketahui. Setelah akhir biakan (semua cacing telah mati), media cacing betina dikumpulkan menjadi satu untuk diisolasi proteinnya. Cara isolasi protein ES dari media biakan adalah sebagai berikut: Media yang telah dikumpulkan disentrifugasi, cairan supernatannya diambil dan dipresipitaskan dengan ammonium sulfat jenuh sehingga diperoleh endapan protein. Endapan protein disuspensikan, kemudian didialisis dengan larutan 0,1 M PBS untuk mengurangi konsentrasi garam di dalam larutan protein. Protein yang diperoleh kemudian dianalisis secara kualitatif dengan menggunakan gel elektroforesis (SDS PAGE).⁶ Begitu pula dilakukan dengan biakan dari cacing jantan, sehingga dapat diketahui macam-macam berat molekul protein ES dari cacing jantan dan betina. Protein selubung cacing dewasa *B.malayi* jantan dan betina diperoleh dengan cara ekstraksi dengan menggunakan detergen cetylyrimethyl ammonium bromida (CTAB)⁷, kemudian dianalisis secara kualitatif dengan menggunakan elektroforesis gel (SDS PAGE).⁶

Analisis hasil

Hasil penelitian yang menunjukkan cara biakan dengan suplemen glukosa yang berbeda kadarnya, dilihat yang terbaik dapat menghasilkan protein ES yang terbanyak. Perbedaan kadar pro-

tein ES baik secara kuantitatif maupun kualitatif dianalisis secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian.

Dari biakan cacing dewasa betina dalam media RPMI dengan suplemen glukosa (1%, 3% dan 5%), diperoleh protein ES dari media biakan setiap harinya dan diukur kadarnya secara kuantitatif dengan metode Bradford. Hasilnya dapat dilihat pada TABEL 1.

TABEL 1. - Kadar protein ES (kuantitatif) dari biakan 30 ekor cacing dewasa betina

Hari ke:	Kadar protein ES (µg/ml) dalam biakan glukosa		
	1%	3%	5%
1	0,2	0,012	0,024
2	0,5	0,011	0,02
3	1,85	0,017	0,003
4	0,9	0,022	0,001
5	0,9	0,017	-
6	0,8	0,016	-

Hasil yang terlihat pada TABEL 1 menunjukkan bahwa media biakan yang terbaik adalah dengan suplemen glukosa 1%, cacing dewasa betina dapat hidup sampai hari ke-6. Protein ES yang dihasilkan dalam biakan dengan glukosa 1% pun kadarnya paling besar dengan puncaknya pada hari ke-3, dan menurun pada hari-hari berikutnya.

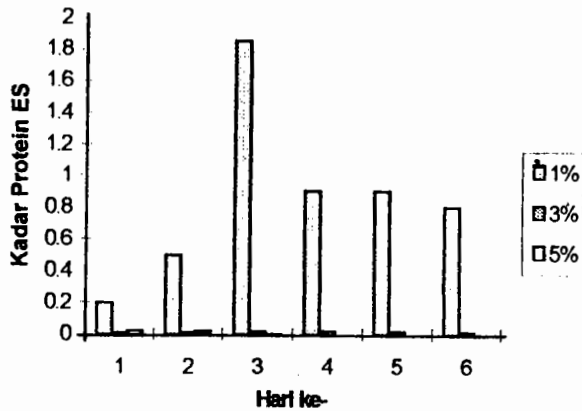
Kadar protein ES yang diperoleh dari biakan cacing dewasa jantan dalam media RPMI dengan suplemen glukosa 1%, 3% dan 5% dapat dilihat pada TABEL 2.

TABEL 2. - Kadar protein ES (kuantitatif) dari biakan 30 ekor cacing dewasa jantan

Hari ke :	Kadar protein ES (µg/ml) dalam biakan glukosa		
	1%	3%	5%
1	0,25	0,01	0,015
2	0,3	0,02	0,019
3	1,5	0,05	0,021
4	0,2	0,01	0,02
5	0,17	0,01	-
6	0,015	-	-

Kadar protein ES yang diperoleh dari biakan cacing jantan dengan suplemen glukosa 1%, 3% dan 5% sangat sedikit kurang dari 1 µg/ml. Kadar protein ES terbanyak diperoleh dari biakan dengan glukosa 1%, dan cacing jantan mampu

bertahan hidup sampai hari ke-6. Puncak dikeluarkannya protein terjadi pada hari ke-3 dan menurun pada hari-hari berikutnya. Makin tinggi kadar glukosa makin sedikit kadar protein yang diperoleh. Kadar protein ES yang diperoleh dari biakan cacing dewasa *B. malayi* pada penelitian ini sangat sedikit sehingga yang dapat digambarkan fluktuasinya hanya dari biakan cacing dewasa dengan suplemen glukosa 1%, seperti yang terlihat pada GAMBAR 1.



GAMBAR 1. - Fluktuasi kadar protein ES dari media biakan cacing betina

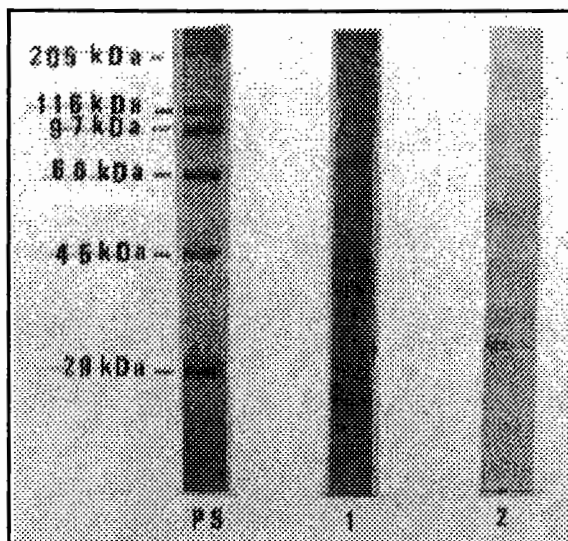
Analisis kadar protein ES yang dikumpulkan dari media biakan cacing betina dan cacing jantan secara kualitatif dilakukan dengan elektroforesis (SDS PAGE)⁶, dengan menggunakan 25 µl media biakan baik dari cacing jantan maupun cacing betina yang telah dimurnikan dengan ammonium sulfat jenuh. Hasilnya sangat mengecewakan:

tidak terdeteksi protein ES dalam gel elektroforesis karena protein yang terkumpul kadarnya kurang dari 1 µg/ml (kadar protein kuantitatif dari media biakan cacing betina hanya 0,090 µg/ml dan dari cacing jantan 0,075 µg/ml). Untuk melihat perbandingan macam-macam protein cacing betina dengan cacing jantan dalam penelitian ini dilakukan elektroforesis dari protein selubung cacing betina dan jantan *B.malayi*, hasilnya dapat dilihat pada GAMBAR 2.

Pada GAMBAR 2 terlihat bahwa protein selubung cacing betina mempunyai bermacam-macam pita protein dengan berat molekul yang bervariasi antara 26 kDa - 116 kDa, dan dari cacing jantan diperoleh protein dengan berat molekul 34 kDa - 56 kDa.

Pembahasan

Protein ES yang dihasilkan dari biakan cacing betina maupun jantan dengan suplemen glukosa 1% kadarnya paling besar dengan puncaknya pada hari ke-3, dan menurun pada hari ke-4, ke-5 dan pada hari ke-6 cacing telah mati semuanya. Hal ini disebabkan pada hari ke-1 kultivasi cacing *B.malayi* mengalami perubahan lingkungan hidup sehingga kurang aktif bergerak dan mengalami trauma akibat beberapa perlakuan yang dialaminya sebelum dikultivasi, seperti diambil dari jaringan inang dan dipindah ke dalam media biakan. Setelah penyesuaian dengan lingkungan dalam media biakan, cacing menjadi aktif sehingga pelepasan protein ES mencapai maksimal. Pada penelitian ini puncak pelepasan protein ES



GAMBAR 2. - Macam-macam protein selubung cacing *B.malayi*
1. cacing betina; 2. cacing jantan

diperoleh pada hari ketiga, hal ini sesuai dengan hasil penelitian dari Kwan Lim *et al.*, namun dalam penelitiannya puncak diperolehnya protein ES adalah pada hari ke 3-4.⁴

Pada hari-hari berikutnya pelepasan protein ES menurun karena gerakan cacing yang terlihat pada biakan menjadi kurang aktif dan semuanya mati pada hari ke-6. Hal ini disebabkan media biakan tidak mengandung serum yang merupakan nutrisi yang sangat penting untuk kelangsungan hidup cacing dalam biakan *in vitro*. Untuk memperoleh protein ES yang murni, sumber energi dalam biakan digantikan dengan glukosa yang menyebabkan kehidupan cacing menjadi terbatas. Penelitian Soeyoko menunjukkan cacing *B. malayi* mampu hidup sampai 9 hari dalam biakan dengan glukosa 1% dan puncak pelepasan protein ES terjadi pada hari ke-4.⁸ Franke dan Weinstein yang membuat biakan dengan sumber energi FBS dapat menunjukkan cacing bertahan hidup sampai 3,5 bulan³, meskipun menurut Court *et al.* hal ini tergantung pada jenis parasit dan FBS yang digunakan⁹. Pada biakan dengan glukosa 3%, cacing betina masih dapat bertahan hidup sampai hari ke-6, meskipun protein ES yang dihasilkan sangat sedikit (<1 µg/ml), dan mencapai puncak pada hari ke-4 (0,022 µg/ml). Biakan dengan menggunakan glukosa 5% ternyata yang paling jelek, karena cacing hanya dapat bertahan hidup sampai hari ke-4 saja. Begitu pula dengan biakan cacing jantan yang menghasilkan protein lebih sedikit dibanding cacing betina dalam berbagai konsentrasi glukosa. Perbedaan kadar protein yang diperoleh antara biakan cacing betina dan jantan disebabkan pada biakan cacing betina di samping protein ES sebagai hasil metabolisme cacing juga didapat protein dari *parturition fluid*², yang dalam penelitian ini dibuktikan dengan ditemukannya mikrofilaria yang diisolasi dari media biakan cacing betina sebelum diukur kadar proteinnya secara kuantitatif. Mikrofilaria tidak ditemukan dari isolasi media biakan cacing jantan. Makin tinggi kadar glukosa dalam biakan makin sedikit protein ES yang dihasilkan karena umur cacing dalam biakan makin pendek. Hal ini mungkin disebabkan kadar glukosa yang tinggi dapat menghambat proses pernafasan dari cacing.

Pada penelitian ini juga dilakukan analisis kadar protein ES yang dikumpulkan dari media biakan cacing betina dan cacing jantan secara

kualitatif dengan cara elektroforesis (SDS-PAGE)⁶. Hasilnya sangat mengecewakan karena tidak terdeteksi dalam gel, meskipun yang digunakan pada waktu elektroforesis sebanyak 25 µl media biakan yang telah dimurnikan dengan ammonium sulfat jenuh (kadar protein kuantitatif dari media biakan cacing betina adalah 0,090 µg/ml dan protein ES dari media biakan cacing jantan adalah 0,075 µg/ml). Hal ini dapat terjadi karena kadar protein yang terkumpul sangat sedikit (kurang dari 1 µg/ml). Keadaan demikian kemungkinan karena setiap biakan hanya menggunakan cacing dewasa 30 ekor, sedangkan Soeyoko memperoleh protein ES sebanyak 31 µg/ml dari kurang lebih 106 ekor cacing dewasa dalam waktu 2 tahun¹⁰. Kadar protein ES yang diperoleh dalam penelitian ini sangat sedikit, sehingga untuk melihat perbandingan kadar protein ES secara kualitatif dengan elektroforesis dibuat dari protein selubung cacing dewasa. Hal ini dilakukan karena protein ES yang diperoleh dari biakan dapat terdiri dari protein hasil metabolisme cacing, *parturition* dan *moulting fluid* juga protein selubung yang berasal dari proses *shedding/turn over* kutikula.^{2,11} Dari protein selubung cacing betina diperoleh bermacam-macam pita protein dengan berat molekul yang bervariasi antara 26 kDa-116 kDa, dan dari selubung cacing jantan diperoleh protein dengan berat molekul antara 34 kDa-56 kDa. Hal ini dapat memberi gambaran perbedaan macam protein ES dari cacing betina dan jantan yang seharusnya dapat diperoleh dari media biakan apabila digunakan jumlah cacing dewasa yang cukup banyak, karena dalam media dapat pula ditemukan protein selubung pada waktu cacing mengalami *moulting*.

SIMPULAN

Kadar protein ES terbanyak diperoleh dari biakan cacing dewasa baik jantan maupun betina dengan kadar glukosa 1%. Fluktuasi keluarannya protein ES memuncak pada hari ketiga, baik pada media biakan cacing jantan maupun betina. Protein ES dari cacing betina kadarnya lebih tinggi dibandingkan dengan cacing jantan.

KEPUSTAKAAN

1. Kurniawan L. Pengembangan antibodi monoklonal untuk filaria. Seminar Penyakit Menular. Cermin Dunia Kedokteran. 1987; Nomer khusus: 44-6.

2. Maizels RM, Denham DA, & Inge Sutanto. Secreted and circulating antigens of the filarial parasite *Brugia pahangi*. Analysis of *in vitro* released components and detection of parasite products *in vivo*. Mol & Biochem. Parasitol. 1985; 17: 297-8.
3. Franke ED & Weinstein PP. In vitro cultivation of *Dipetalonema vitae* third stage larvae. Evaluation of the culture media, serum and other supplements. J Parasitol 1984; 70(5):618-28.
4. Kwan Lim GE, Gregory, WP, Selkirk ME, Partono F. & Maizels RM. Secreted antigens of filarial nematodes: A survey and characterization of *in vitro* excreted/secreted products of adult *Brugia malayi*. Parasite Immunol 1989; 11: 629-65.
5. Mossinger J. Cultivation of adult worms *Brugia pahangi* In: Smyth, DJ. editor. In vitro cultivation of parasitic helminths. CRC Press. Boston. 1990; 174-5.
6. Zingales B. Analysis of proteins by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis. Genes and antigens of parasite. A Laboratory Manual. 1984; 357-72.
7. Freedman DO, Nutman TB, Ottesen EA. Enhanced solubilization of immunoreactive proteins from *Brugia malayi* adult parasites using cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB). Exp Parasitol 1988; 65: 244-50.
8. Soeyoko. Pengembangan antibodi monoklonal spesifik terhadap antigen beredar *Brugia malayi* untuk diagnosis filariasis malayi. [Disertasi]. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada, 1998.
9. Court JP, Martin-Short M & Lees GM. A comparison of the response of *Dipetalonema vitae* and *Brugia pahangi* adult worms to antifilarial agents in vitro. Trop Med Parasitol. 1986; 37: 375.
10. Soeyoko. Diagnosis filariasis malayi dengan Sandwich ELISA menggunakan antibodi monoklonal. BIKed. 1996; 28(2): 61-5.
11. Piessens WF, Fuhrman JA, Vickery AC. Immunology of lymphatic filariasis In: Wyler DJ. editor. Modern parasite biology: Cellular, immunology and molecular aspect, New York: Freeman & Co, 1990; 289-94.