

KARAKTERISASI ANTIBODI MONOKLONAL TERHADAP PROTEIN MEMBRAN *Toxoplasma gondii* ISOLAT LOKAL

CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES TOWARDS MEMBRANE PROTEIN OF LOCAL ISOLATE *Toxoplasma gondii*

Rini Widayanti, Widya Asmara, Wayan T. Artama

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada

INTISARI

Toksoplasmosis merupakan penyakit zoonosis yang dapat ditularkan melalui makanan dan minuman yang tercemar ookista infeksi. Gejala yang ditimbulkan biasanya asimtomatis, tetapi pada hewan bunting dan wanita hamil dapat mengakibatkan abortus, lahir mati dan cacat bawaan. Pemeriksaan yang ada sekarang ini untuk mendeteksi adanya antibodi dalam serum sehingga butuh waktu lama. Antibodi monoklonal merupakan alat deteksi antigen *T. gondii* dalam serum dan cairan tubuh lainnya, sehingga dengan antibodi monoklonal infeksi dapat didiagnosa lebih dini. Isolasi protein solubel dan membran dilakukan dengan cara sonikasi dan sentrifugasi. Identifikasi protein membran dengan menggunakan *Sulfonyl Dodecyl Sulphate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE). Karakterisasi antibodi monoklonal yaitu TL 88, TL 106 dan TL 129 terhadap protein membran *T. gondii* dilakukan dengan *immunoblotting* menggunakan protein membran, protein solubel dan protein E/S *T. gondii* isolat lokal stadium takizoit. Hasil *immunoblotting* dengan protein E/S menunjukkan bahwa antibodi monoklonal tersebut mengenal epitop pada protein E/S. Antibodi monoklonal TL 106 dan TL 129 bereaksi spesifik terhadap epitop pada protein membran dan solubel. Epitop yang dikenal antibodi TL 106 terdapat pada protein 33 kDa, 32 kDa dan 59 kDa, sedang TL 129 mengenal epitop pada protein 43 kDa, 39 kDa, 59 kDa dan 85 kDa.

Kata kunci: *Toxoplasma gondii*, takizoit, protein membran, antibodi monoklonal

ABSTRACT

Toxoplasmosis is a zoonotic disease which was capable to infec all mammals. Usually, humans suffer *T. gondii* by ingested of underccoked or raw meats. Infection is usually asytmotamic and only rarely causes a serious illnes, but infection in animal and woman pregnant sometimes results in abortus, stilbirth and permanent damage to the foetus. Serologic data showed that the rate of toxoplasmosis occurrence was high enough. The diagnostic test which were applied now is to detect antibody content in the serum, but it take a quiet long time to do. For that reason we need a better methode which can detect *T. gondii* in the serum and others body liquid faster and more accurate. The objective of this research was to characterize monoclonal antibodies against membrane proteins of local isolate *T. gondii* tachyzoites. Fractination of soluble and membrane proteins tachyzoites was done by sonication and centrifugation. The proteins were then identified by SDS-PAGE. The antibodies were characterized by immunohybridization with membrane protein, soluble protein and E/S protein of local isolate *T. gondii* tachyzoites. Immunoblotting by E/S protein showed that monoclonal antibodies were recognized with E/S protein epitopes. The antibodies TL 106 and TL 129 reacted specifically to membrane and soluble protein epitops. Monoclonal antibody TL 106 recognized epitopes of 33 kDa, 32 kDa and 59 kDa protein, whereas TL 129 recognized epitops of 43 kDa, 39 kDa, 59 kDa, 85 kDa protein.

Key words: *Toxoplasma gondii*, tachyzoite, membrane protein, monoclonal antibody

PENGANTAR

Toxoplasma gondii adalah parasit intra seluler obligat yang dapat menginfeksi bangsa burung dan mamalia termasuk manusia dan toksoplasmosis merupakan penyakit zoonosis yang dapat ditularkan melalui makanan dan minuman yang tercemar ookista infeksi, daging atau organ lain yang mengandung kista jaringan yang dimasak tidak sempurna, atau karena berkecambah (Dubey, 1990 dan Anonim 1995). Gejala yang ditimbulkan biasanya asimtomatis, tetapi pada inang immunocompromised timbul gejala penyakit. Pada hewan bunting dan wanita hamil dapat mengakibatkan abortus, lahir mati dan kelainan kongenital (Frenkel, 1990).

Data serologis menunjukkan bahwa kejadian toksoplasmosis pada hewan dan manusia cukup tinggi. Pemeriksaan rutin yang saat ini masih dipergunakan adalah uji immunoblot IgM-IgA, IgM ISAGA dan IgM-IgA ELISA's (Gross *et al.*, 1997). Tetapi, semua uji tersebut di atas untuk mendeteksi adanya antibodi dalam serum sehingga membutuhkan waktu lama.

Antibodi monoklonal merupakan alat deteksi antigen *T. gondii* dalam serum dan cairan tubuh lainnya, sehingga dengan antibodi monoklonal infeksi dapat didiagnosa lebih dini (Araujo *et al.*, 1980). Selain untuk diagnosa, antibodi monoklonal dapat juga untuk karakterisasi protein membran dan protein solubel (Johnson *et al.*, 1983). Toksoplasmosis menimbulkan kerugian yang besar pada manusia maupun hewan, dengan dikenalkannya antibodi monoklonal sebagai alat diagnosa dini, maka diharapkan melalui penelitian ini akan dihasilkan dan dikarakterisasi antibodi monoklonal terhadap protein membran *T. gondii* isolat lokal stadium takizoit. Selanjutnya dapat dikembangkan sebagai alat diagnostik yang cepat dan akurat.

Penelitian bertujuan untuk mengkarakterisasi antibodi monoklonal terhadap protein membran *T. gondii* isolat lokal stadium takizoit.

CARA PENELITIAN

Kultivasi *T. gondii* secara *in vivo*

Isolat *T. gondii* isolat lokal stadium takizoit dikembangkan pada mencit galur Swiss dengan disuntikkan secara intraperitoneal. Pemanenan takizoit dilakukan

3-4 hari setelah infeksi. Jumlah takizoit dalam cairan peritoneal dihitung dengan haemositometer.

Persiapan protein

Cairan intraperitoneal yang mengandung takizoit disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm, 4°C selama 10 menit. Isolasi protein membran dan protein solubel *T. gondii* dilakukan dengan cara sonikasi dan sentrifugasi dengan penambahan protease inhibitor (TLCK, TPCK, PMSF dan EDTA) dan Nonidet P40. Konsentrasi protein solubel dan membran diukur

dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm dan simpan pada 20°C sampai saat digunakan.

Identifikasi protein dengan SDS-PAGE

Protein yang diperoleh kemudian diidentifikasi pada SDS-PAGE 10%, tegangan 150 volt selama 1 jam dan kemudian diwarnai dengan *Coomassie brilliant blue* 0,2% selama semalam.

Karakterisasi antibodi monoklonal

Immunoblotting. Antigen direaksikan antibodi monoklonal dengan metode *Western blot* dan *dot blot*. Pada *Western blot*, SDS-PAGE ditransfer ke membran nitroselulosa dan pada *dot blot*, antigen diteteskan pada membran nitroselulosa sampai kering,

Analisis Data

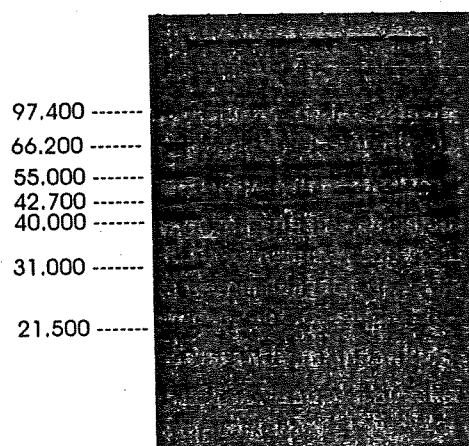
Data disajikan secara deskriptif. Berat molekul protein dihitung dengan persamaan regresi antara log berat molekul dan *Rf* (*Relative mobility*).

HASIL DAN PEMBAHASAN

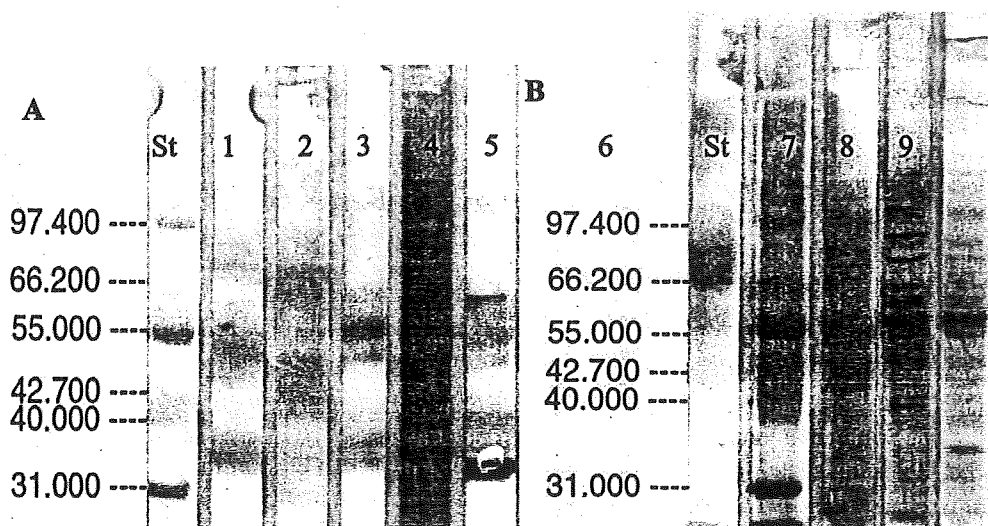
Protein

Profil protein membran dapat dilihat dengan SDS-PAGE pada Gambar 1, yang menunjukkan adanya kurang lebih 14 pita protein dengan 5 pita yang bersifat mayor yaitu protein 56 kDa, 51 kDa, 43 kDa, 36 kDa dan 33 kDa. Pita protein lain yang bukan merupakan pita protein mayor adalah protein 89 kDa, 85 kDa, 85 kDa, 80 kDa, 77 kDa, 72 kDa, 69 kDa, 64 kDa, 49 kDa, 45 kDa dan 40 kDa.

Protein solubel dapat dilihat pada Gambar 1. Kurang lebih ada 16 pita protein dengan 7 pita bersifat mayor yaitu protein 98 kDa, 73 kDa, 64 kDa, 56 kDa, 51 kDa, 43 kDa dan 34 kDa. Pita protein lain (yang tidak merupakan pita protein mayor) adalah 109 kDa, 88 kDa, 81 kDa, 59 kDa, 41 kDa, 40 kDa, 37 kDa dan 36 kDa. Pita protein membran 36 kDa, 43 kDa, 49 kDa, 56



Gambar 1. Profil protein membran dan protein solubel *T. gondii* menggunakan SDS-PAGE. Keterangan: 1 protein membran *T. gondii*, 2 protein solubel *T. gondii*



Gambar 2. *Immunoblotting* protein membran *T. gondii*(A) dan *Immunoblotting* protein solubel *T. gondii*(B) menggunakan antibodimonoklonal. Keterangan: St protein standar, 1, 2 protein membran *T. gondii* dengan pewarnaan amidoblack; 3,4,5 protein membran *T. gondii* dengan penambahan antibodi monoklonal masing-masing TL 88, TL 129, TL 106,6, albumin, 7, protein solubel dengan pewarnaan amidoblack; 8,9 protein solubel dengan penambahan antibodi monoklonal masing-masing TL 129, TL 106

kDa dan 69 kDa sesuai dengan penemuan Johnson *et al.*, (1983), sedang protein 45 kDa sama dengan hasil penelitian Kasper *et al.*, (1990) diperoleh dari serum mencit yang diimunisasi dengan 1×10^2 takizoit *T. gondii* isolat lokal. Protein 45 kDa, 49 kDa dan 69 kDa sama seperti hasil identifikasi Bonhomme *et al.*, (1990) dan dikatakan juga bahwa protein dengan BM 45-50 kDa dan 66-70 kDa selain terdapat pada permukaan membran juga ada pada rhoptri. Pita protein solubel 98 kDa, 56 kDa, 51 kDa dan 43 kDa sesuai dengan hasil penelitian Johnson (1983). Dikatakan juga bahwa protein 98 kDa hanya ditemukan pada protein solubel. Pita protein 73 kDa, 64 kDa dan 34 kDa berbeda dengan penemuan yang sudah ada, hal ini kemungkinan karena perbedaan galur *T. gondii* dan perbedaan prosedur pada pembuatan SDS-PAGE (Kasper *et al.*, 1990). Protein ekskretoris/sekretoris (E/S)

Karakterisasi Antibodi Monoklonal

Immunoblotting

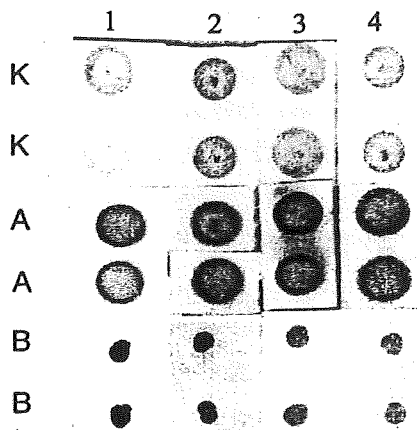
Immunoblotting dilakukan dengan menggunakan 3 antibodi monoklonal. Hasil *immunoblotting* protein membran *T. gondii* tampak terlihat pada gambar 2A. Semua antibodi monoklonal menunjukkan reaksi dengan protein membran *T. gondii*, tetapi hanya ada 2 asites yang menunjukkan reaksi yang menciri yaitu

ditunjukkan dengan terlihatnya pita reaksi yang jelas. Kedua asites tersebut adalah TL 106 yang mengenali epitop pada protein 33 kDa dan TL 129 yang mengenali epitop pada protein 43 kDa. Ke 2 antibodi monoklonal tersebut dan antibodi monoklonal lainnya juga mengenal beberapa protein tetapi tidak menciri an tidak jelas. Adanya reaksi antibodi monoklonal dengan protein yang menciri kemungkinan karena reseptor pada antibodi monoklonal mengenali semua *sequence* asam amino dari epitop, sedangkan reaksi yang tidak menciri dan tidak jelas disebabkan karena reseptor antibodi monoklonal mengenali tidak semua atau hanya beberapa *sequence* asam amino dari epitop tersebut. Berat molekul protein membran yang bereaksi dengan antibodi monoklonal dapat dilihat pada Tabel 1. Ketiga antibodi monoklonal tersebut mengenal epitop protein membran *T. gondii* stadium takizoit, baik protein mayor maupun protein minor. Beberapa antibodi monoklonal juga mengenal epitop dari fraksi protein yang sama. Hal ini kemungkinan karena fraksi-fraksi protein tersebut mempunyai epitop yang sama sehingga dikenal oleh antibodi monoklonal, atau fraksi protein tersebut mempunyai beberapa epitop sehingga bisa dikenali oleh antibodi monoklonal yang lain. Bagian dari protein yang menonjol keluar akan dikenali oleh antibodi sebagai determinan antigen (epitop).

Tabel 1. BM protein membran dan solubel *T. gondii* yang bereaksi dengan antibodi monoklonal

No.	Asites	BM protein membran (kDa)	BM protein solubel (kDa)
1	TL 88	56,51,36,33	
2	TL 106	64, 56, 51, 33*	32*,57,59*
3	TL 129	43*, 36	39*,57,59*,63,76,85*

* = protein yang reaksinya menciri



Gambar 3. Immunoblotting protein E/S dan protein solubel *T. gondii* dengan metoda dot blot. Keterangan: K kontrol protein serum mencit sehat; A protein E/S *T. gondii*; B protein solubel *T. gondii*, 1, antibodi polikolnal; 2, TL88; 3, TL 129; 4, TL 106

Kompleksitas dan susunan suatu protein akan mempengaruhi letak epitop dari protein tersebut.

Perbedaan pada letak asam amino penyusun protein akan menentukan konformasi dan letak epitop. Epitop suatu protein dapat tersusun mulai dari empat sampai enam asam amino dan protein mempunyai beberapa epitop yang dikenal oleh antibodi.

Immunoblotting protein solubel *T. gondii* dengan antibodi monoklonal terhadap protein membran *T. gondii* dapat dilihat pada Gambar 2B. Antibodi monoklonal TL 106 dan TL 129 masing-masing menunjukkan reaksi dengan protein solubel yaitu dengan terlihatnya pita berwarna ungu. BM protein solubel *T. gondii* yang bereaksi dengan antibodi monoklonal dapat dilihat pada Tabel 3. TL 106 mengenali epitop protein 32 kDa, 57 kDa dan 59 kDa, TL 129 mengenali epitop protein 39 kDa, 57 kDa, 59 kDa, 63 kDa, 76 kDa dan 85 kDa. Hal ini kemungkinan karena fraksi protein solubel ini mempunyai epitop yang sama seperti yang dimiliki protein membran *T. gondii*.

Immunoblotting protein E/S dan protein solubel *T. gondii* dapat dilihat pada Gambar 2B. Karakterisasi antibodi monoklonal terhadap protein membran *T. gondii* menggunakan protein E/S dilakukan dengan metoda dot blot oleh karena dengan metoda Western blot tidak memberikan hasil yang baik yaitu tidak tampak adanya pita-pita dari protein. Pada hasil dot blot (Gambar 3.) tampak bahwa pemberian antibodi monoklonal terhadap protein E/S dan antibodi monoklonal terhadap protein solubel *T. gondii* menunjukkan intensitas reaksi yang lebih kuat dibanding pada pemberian antibodi terhadap kontrol (serum mencit normal). Hasil ini juga didapat pada

pemberian antibodi poliklonal terhadap membran *T. gondii*. Intensitas yang kuat pada spot hasil dot blot disebabkan antibodi poliklonal dan ketiga antibodi monoklonal mengenali epitop yang terdapat pada protein solubel dan protein E/S, sedang intensitas yang lemah pada kontrol kemungkinan karena antibodi tidak mengenali epitop dari protein serum mencit tersebut.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa antigen *T. gondii* isolat lokal stadium takizoit mempunyai 5 fraksi protein membran yang bersifat mayor yaitu protein 56 kDa, 51 kDa, 43 kDa, 36 kDa dan 33 kDa serta 7 fraksi protein solubel yang bersifat mayor, yaitu protein 98 kDa, 73 kDa, 64 kDa, 56 kDa, 51 kDa, 43 kDa dan 34 kDa.

Antibodi monoklonal mengenali epitop pada protein E/S, antibodi TL 88 mengenali epitop pada protein 56 kDa, 51 kDa, 36 kDa, 33 kDa, TL 106 mengenali epitop pada protein 64 kDa, 59 kDa, 57 kDa, 56 kDa, 51 kDa, 33 kDa dan 32 kDa; TL 129 mengenali epitop pada protein 85 kDa, 76 kDa, 63 kDa, 59 kDa, 57 kDa, 43 kDa, 39 kDa dan 36 kDa.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kami ucapkan kepada drh. Sri Hartati, SU yang telah mengizinkan kami ikut dalam proyek penelitian yang dipimpinya.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, (1995). Toxoplasmosis in cats and man. The Feline Advisory Bureau Information Sheets. 1-5.
- Araujo, F.G., Handman, E. and Remington, J.S. (1980). Use of monoclonal antibody antigens of *Toxoplasma gondii* in serum and other body fluids. *Infect. Immun.* 30 (1), 12-16.
- Bonhomme, A., Boulanger, F., Bharadwaj, L.M., Puyguthir-Toubas, D., Bonhomme and Pinon, J.M. (1990). *Toxoplasma gondii*: Immunocytochemistry of immunodominant antigens with monoclonal antibodies. *Exp. Parasitol.*, 71, 439-451.
- Dubey, J.P. (1990). Status of toxoplasmosis in cattle in the United States. *JAVMA*, 196(2), 257-259.
- Frenkel, J.K. (1990). Toxoplasmosis in human being. *JAVMA*, 192 (2), 240-248.
- Gross, U. (1996). *Toxoplasma gondii*. Springer-Verlag, Berlin.
- Johnson, A.M., Mc Donald, P.J. and Neoh, S.H. (1983). Molecular weight analysis of solubel antigens from *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.*, 69 (8).
- Kasper, L.H., Boothroyd, J.C. (1990). *Toxoplasma gondii* and toxoplasmosis in Immunology and Molecular Biology of Parasitic Infections. 3rd ed., Mc Milan Inc, new York.