Sensitivitas Ekstrak Protein Kacang Tanah (*Arachis hypogaea* L.) sebagai Larutan Uji Tusuk Kulit

*Sensitivity of Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Protein Extract as Skin Prick Test Reagent*

Sri Yadi Chalid^{a*}, Fransiska R. Zakaria^b, Dahrul Syah^b dan Puspo Edi Giriwono^b

^aStudy programe of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Syarif Hidayatullah State Islamic University Jakarta
Jl. Ir. H. Djuanda No. 95. Ciputat, Tangerang Selatan 15412.

^bDepartemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian
Jl. Lingkar Akademik, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

Riwayat Naskah:

Diterima Mei 2020
Direvisi Oktober 2020
Disetujui November 2020

ABSTRAK: Kacang tanah merupakan jenis kacang-kacangan penyebab utama alergi makanan baik pada anak-anak ataupun orang dewasa dan kasus alergi kacang tanah tiap tahun terus meningkat. Tidak mengonsumsi semua makanan pencetus alergi merupakan cara terbaik untuk pengobatan alergi. Tidak mengonsumsi makanan tertentu harus berdasarkan uji alergi seperti Uji Tusuk Kulit (UTK). Larutan untuk UTK adalah ekstrak protein dalam bentuk larutan. Penelitian ini bertujuan menggunakan ekstrak protein kacang tanah yang dibudidayakan di Indonesia sebagai larutan untuk UTK, menentukan sensitivitas dan spesifitas ekstrak protein kacang tanah. Protein kacang tanah diekstrak pada titik isoelektrik, dikarakterisasi dengan SDS-PAGE dan *immunoblotting*. Formulasi larutan UTK mengacu pada *European Pharmacopoeia Monograph on Allergen Products 7* (2010:1063). Sebanyak sepuluh orang yang menyatakan diri alergi makanan dan sembilan orang tidak alergi dijadikan subjek lalu dikonfirmasi dengan cara mencukitkan ekstrak protein kacang tanah pada kulit tangan bagian bawah. Serum subjek dikumpulkan untuk pengujian IgE total, IgE spesifik, *immunoblotting*, sensitivitas dan spesifitas ekstrak. Sensitivitas ekstrak protein kacang tanah didapatkan sebesar 90,9% dengan kesalahan negatif sebesar 9,1% dan spesifitas sebesar 100%. Larutan UTK mengandung protein alergen dengan kisaran berat molekul 10 sampai 49 kDa. Ekstrak protein kacang tanah yang dibudidayakan di Indonesia berpotensi dikembangkan menjadi larutan untuk uji tusuk kulit.

Kata kunci: alergi, *immunoblotting*, kacang tanah, sensitivitas

ABSTRACT: Peanuts are the main cause of allergies in children and adults. Annually, people with peanut allergies continues to rise. The best way to prevent allergies is avoiding foods that cause allergies, not consuming certain foods should be enforced based on allergy testing such as SPT (skin prick test). The solution for the skin prick test is a protein extract in solution form. The study aims to use the peanut protein extract cultivated in Indonesia as a solution for skin prick testing, to determine the sensitivity and specificity of the peanut protein extract. The peanut protein was extracted at the isoelectric point, characterized by SDS-PAGE and *immunoblotting*. The formulation of SPT reagent refers to the European Pharmacopoeia Monograph on Allergen Products 7 (2010: 1063). Ten people who stated that they were allergic to food and nine people who were not allergic were subjected to it and confirmed by pinching the peanut protein extract on the skin of the lower hand. Serum of the subjects was collected for test of total IgE, specific IgE, and *immunoblotting*, sensitivity and specificity of reagent for SPT. The sensitivity of peanut protein extract in this study was 90.9% with a negative error of 9.1% and specificity of 100%. SPT results showed that all subjects who tested positive and *immunoblotting* test is also positive that bind peanut protein with a molecular weight 10-49 kDa. The peanut protein extract cultivated in Indonesia has the potential to be developed into a solution for skin prick testing.

Keywords: allergies, *immunoblotting*, peanuts, sensitivity

* Kontributor utama
Email : sri.yadi@uinjkt.ac.id

1. Pendahuluan

Kacang tanah merupakan jenis alergen penyebab utama reaksi alergi yang berat atau syok anafilaksis (Sampson 2003). Prevalensi alergi kacang tanah di seluruh dunia berkisar antara 1 sampai dengan 2% (Al-muhsen *et al.* 2003). Alergi kacang tanah berawal dari usia dini dan berlanjut sepanjang hidup, tidak seperti alergi susu dan telur yang dapat hilang dengan bertambahnya usia anak (Burks *et al.* 1998). Batas aman konsumsi (NOEL) kacang tanah pada anak-anak yang sensitif adalah 2mg (Flinterman *et al.* 2006). Alergen utama kacang tanah adalah Ara h 1 (globulin 7S atau *vicilin*), Ara h 2 (albumin 2S), Ara h 3 dan Ara h 4 (Koppelman *et al.* 2005), sedangkan Ara h 5, Ara h 6 dan Ara h 7 sebagai alergen minor (Sue *et al.* 2000). Ara h 1 dan Ara h 2 adalah alergen yang potensial, dimana 90% serum penderita alergi kacang tanah dapat berikatan dengan alergen ini (Burks *et al.* 1998). Hasil uji immunoglobulin E spesifik (sIgE) secara *in vivo* menyatakan bahwa Ara h 2 lebih kuat merangsang pelepasan histamin dari sel mastosit dan basofil pada penderita alergi kacang tanah dibandingkan dengan Ara h 1 (Koppelman *et al.* 2004; Palmer *et al.* 2005). Sampai saat ini cara terbaik untuk mencegah alergi adalah menghindari semua pencetus dan penyebab alergi. Menghindari pencetus alergi harus ditegakkan berdasarkan cara uji alergi.

Uji Tusuk Kulit (UTK) merupakan salah satu uji alergi yang cukup akurat untuk mengetahui alergen penyebab alergi yang dimediasi oleh IgE (Heinzerling *et al.* 2013). Kelebihan UTK adalah sederhana, cepat dan hanya perlu waktu 20 menit untuk uji, pada pasien yang memiliki alergi terhadap banyak alergen dapat dilakukan secara simultan, resiko terjadinya alergi sistemik sangat kecil karena volume reagen yang masuk ke dalam kulit sangat kecil (Krouse and Marbry 2003). Bahan utama UTK adalah ekstrak protein yang disebut dengan istilah *reagent* UTK. *Reagent* UTK dibuat berdasarkan standar *European Pharmacopoeia Monograph on Allergen Products (2010:1063)*. Standar ini meliputi kadar air, sterilitas, bebas kontaminasi mikroorganisme, kadar protein yang konsisten dan profil protein dengan *Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE), potensi alergenitas dengan *immunoblotting* dan IgE spesifik dengan *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA).

Indonesia masih mengandalkan larutan UTK impor komersial dari luar negeri karena ketersediaan *reagent* impor masih terbatas dan mahal maka klinik kesehatan dan rumah sakit di Indonesia masih jarang yang mempunyai fasilitas uji tusuk kulit (UTK). Saat ini sudah waktunya Indonesia mengembangkan *reagent* UTK dari

tanaman kacang tanah yang dibudidayakan di Indonesia. *Reagent* UTK ini ditusukkan pada kulit subjek yang diduga alergi dan non alergi kacang-kacangan untuk menentukan nilai sensitivitas dan spesifitas ekstrak protein kacang tanah sebagai *larutan* UTK. Protokol penelitian ini telah disetujui oleh Komisi Etik Penelitian Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Diponegoro No. 190/EC/FKM/2014.

2. Bahan dan Metode

2.1. Bahan

Kacang tanah (*Arachis hypogaea* (L.) Verdc.) didapatkan dari Pasar Tradisional di daerah Bogor Jawa Barat. *Bovine serum albumin* (BSA), *acrylamide*, *glycine*, *2-Mercaptoethanol*, *carbonate-bicarbonate buffer* pH 9.6, *coomasie brilliant blue R-250*, *coomasie brilliant blue G-250*, *IgE antibody anti-IgE human antibody* dilabel dengan *Horseradish Peroxidase* (HRP) enzyme, DAB (3,3'-*Diaminobenzidine*) *substrate*, TMB (3,3',5,5'-*Tetramethylbenzidine*) *substrate*, *N,N'*-methylene bisacrylamide, protein marker untuk SDS-PAGE dari BioRad (9 jenis protein, yaitu *myosin* ((BM:200 kDa), *β-galactosidase* (BM:116 kDa), *phosphorylase b* (MW:97 kDa) *serum albumin* (BM:66.2 kDa), *ovalbumin* (BM:45 kDa), *carbonic anhydrase* (BM: 31 kDa), *trypsin inhibitor* (BM:21 kDa), *lysozyme* (BM: 14.4 kDa), dan *aprotinin* (BM: 6.5 kDa).

2.2. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain : *blender*, sentrifuse, *SDS-PAGE Bio-Rad Mini-Protean II*, *immunoblotting Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer*, perangkat ELISA, Costar® 96-sumur ELISA *microplates*, *LabSystem Multiskan EX ELISA reader*, spektrofotometer UV-VIS (Parkin Elmer, tipe Lamda 25), *water bath*, *freeze drier*, inkubator, evaporator, *polyvinylidene fluoride membrane for protein blotting pore size 0,2 μm, size 7 cm x 8,5 cm* (BioRad 162-0174), timbangan analitik, pH meter, *vortex*, *stirrer*, sonikator, termometer merkuri, tabung Eppendorf, mikropipet 5 μL hingga 1000 μL, kertas saring *Whatman* No.1, kertas saring biasa, dan peralatan gelas lainnya.

2.3. Metode

Uji proksimat dan ekstraksi protein kacang tanah merupakan langkah pertama yang dilakukan sebelum uji sterilisasi, uji tusuk kulit, penentuan IgE total dan IgE spesifik serta *immunoblotting*. Pengujian sensitivitas dan spesifitas larutan ekstrak kacang tanah didapatkan dari pengolahan data UTK, IgE total dan IgE spesifik serum subjek. Uji kadar

protein, kadar air, sterilitas dan uji mikrobiologi bertujuan untuk menyatakan bahwa larutan UTK yang diproduksi bebas dari kontaminan bakteri, jamur dan kapang. Kadar air dan kadar protein larutan UTK harus pada *range* yang ditetapkan oleh *European Pharmacopoeia 7 Monograph on Allergen Product*.

2.3.1. Ekstraksi Protein Kacang Tanah dengan Metode Pengendapan Titik Isoelektrik

Tepung kacang tanah dibuat dengan cara menggiling kacang tanah tanpa kulit ari dengan mesin penggiling, kemudian diayak dengan ayakan 60 mesh. Penghilangan lipid kacang tanah mengacu pada metode Liu *et al.* 2007 yaitu merendam sampel dalam larutan heksan (p.a) dengan perbandingan 1: 5 selama 1 jam pada suhu 25 °C sambil diaduk. Sampel disentrifugasi selama 15 menit pada suhu 4 °C dengan kecepatan 8000 x g. Supernatan dibuang dan endapan diambil lalu diulangi proses penambahan heksan sebanyak dua kali dengan perbandingan yang sama untuk menghilangkan lemak yang tersisa. Tepung bebas lemak dikumpulkan dan dikering anginkan untuk membebaskan heksan.

Sampel tepung kacang tanah bebas lemak dicampur dengan air (1:10 b/v), pH 8,5 dengan penambahan NaOH 1N. Suspensi diaduk dengan *stirer* pada suhu 25 °C selama 1 jam, kemudian disentrifuse selama 20 menit pada suhu 4 °C dengan kecepatan 3500 x g. Supernatan dikumpulkan lalu diatur pH $\pm 4,5$ dengan penambahan larutan HCl 1N. Suspensi disentrifuse selama 20 menit pada suhu 4 °C dengan kecepatan 3500 x g. Endapan disuspensikan kembali dalam air dengan perbandingan 1:10 (b/v), diaduk pada suhu 25 °C selama 1 jam untuk membebaskan asam, kemudian disentrifuse pada 3500 x g selama 20 menit. Supernatan dibuang dan endapan dikeringkan dengan *freeze dryer*. Hasil *freeze drying* disimpan dalam *freezer* -20 °C (Wu *et al.* 2009).

2.3.2. Uji profil protein dengan Sodium Dodecylsulfate Polyacrilamine Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

Sebanyak 0,1 g ekstrak protein kacang tanah dilarutkan dengan 10 mL larutan *phospat buffer saline* (PBS) pH 8,0 dengan bantuan sonikator, dengan kecepatan 20 kHz dan 220 V selama 1 menit, selanjutnya disentrifuse selama 20 menit, pada suhu 4 °C dengan kecepatan 13.000 x g. Kadar protein terlarut diukur dengan metode (Bradford 1979). Sebanyak 40 μ L ekstrak protein (1 μ g/ μ L) ditambah 10 μ L *buffer* sampel yang mengandung *sodium dodecyl sulfat*, *tris-base* pH 6.8 dan β -merkaptotanol kemudian dipanaskan pada air dengan suhu 100 °C

selama 5 menit. Sebanyak 10 μ L sampel diinjeksikan ke dalam sumur gel akrilamida yang terdiri atas *stacking gel* 5% dan *separating gel* 12%. Sampel diinjeksikan ke dalam sumur menggunakan mikropipet sebanyak 10 μ L dan sebanyak 5 μ L protein *marker low molecular weight* (LMW) Fermentos® yaitu protein β -galaktosidase (116 kDa), *bovine serum albumin* (66.2 kDa), ovalbumin (45 kDa), laktase dehidrogenase (35 kDa), Rease BSP 981 (25 kDa), β -laktoglobulin (18.4 kDa) dan lisozim (14.4 kDa). *Running* SDS-PAGE pada sumber listrik 90 volt selama 150 menit. Gel diwarnai dengan *coomasie brilliant blue* G-250 (Bio-Rad) dan ditambahkan *destaining solution* sampai muncul pita berwarna biru pada gel (Laemmli 1970; Bollag dan Edelstein 1991). Berat molekul pita protein dianalisis dengan *software GelAnalyzer* 2010a (<http://www.gelanalyzer.com>)

2.3.3. Persiapan subjek penelitian

Sebanyak 19 subjek menjadi relawan pada penelitian ini, 10 subjek menyatakan diri alergi kacang-kacangan dan 9 lagi mengaku tidak alergi. Subjek berusia 18 sampai 22 tahun diminta kesediaannya untuk berpartisipasi sebagai subjek. Kepada subjek dijelaskan manfaat dan kemungkinan resiko yang akan dialami serta manfaat material yang didapatkan dari penelitian ini. Keikutsertaan subjek bersifat sukarela dan subjek diperbolehkan mengundurkan diri sewaktu-waktu bila subjek merasa tidak nyaman untuk melanjutkan keikutsertaannya. Subjek wajib mengisi formulir kesediaan (*inform consent*). Subjek juga tidak diperbolehkan minum obat yang mengandung anti histamin tiga hari sebelum dan selama penelitian berlangsung. Keputusan ikut atau keluar dari penelitian ini merupakan hak subjek.

2.3.4. Persiapan Larutan UTK

Sebanyak 0,2 g ekstrak protein kacang tanah dilarutkan dengan 2 mL *phosphate buffer saline* (PBS) pH 7,5 kemudian disonikasi setiap 1 menit selama 5 menit dengan kecepatan 20 kHz dan 220 Volt, disentrifuse pada kecepatan 13.000 g selama 20 menit dan 4 °C. Supernatan disaring dengan kertas filter 0,45 μ m dan dilanjutkan dengan filter 0,22 μ m, lalu ditentukan kadar protein dengan metode Bradford. Ekstrak protein kacang tanah diencerkan dengan 50% gliserol-salin sehingga konsentrasi menjadi 1 mg/mL (Maleki *et al.* 2010). Pengerjaan ini dilakukan pada ruang steril *laminary flow*.

2.3.5. Uji Tusuk Kulit (UTK)

UTK dilakukan oleh dokter alergolog Klinik Alergi dan Asma Jakarta terhadap 19 orang subjek relawan. Kulit lengan bawah bagian volar dibersihkan dengan menggunakan alkohol 70%, kemudian bagian yang akan ditetesi dengan ekstrak protein kacang tanah, kontrol negatif dan kontrol positif ditandai dengan bolpoin. Larutan histamin 1 µg/µL digunakan sebagai kontrol positif dan larutan *saline* 0,9% sebagai kontrol negatif. Jarak tetes antara kontrol positif, kontrol negatif dan sampel minimal 2 cm supaya larutan tidak saling bercampur. Bagian kulit yang telah ditetesi dengan kontrol positif, kontrol negatif dan sampel ditusuk dengan jarum *marrow brown* 1 mm dengan pelan dan kemiringan 45 derajat menembus lapisan epidermis tanpa menimbulkan pendarahan. Setelah 15 sampai 20 menit, dibuat garis mengelilingi bentol (*wheal*) yang muncul dengan bolpoin sesuai bentuk bentol.

Bentuk bentol ini dipindahkan ke kertas milimeter blok dengan cara menempelkan selotip pada bentol dan diukur diameter setiap bentol dengan *marrow brown needle*. Nilai pengukuran dinyatakan sebagai berikut: 0 bila ukuran *wheal* sama dengan kontrol negatif (tidak terbentuk *wheal*), +1 bila ukuran *wheal* 25% sampai 50% lebih besar dari kontrol negatif (<3 mm), +2 bila ukuran *wheal* 50% sampai 75% lebih besar dari kontrol negatif (3-5 mm), +3 bila ukuran *wheal* sama besar dengan histamin (5-7 mm), +4 bila ukuran *wheal* 25% sampai 50% lebih besar dari histamin dan >+4 bila ukuran bentol lebih dari 50% lebih besar dari histamin (Moriss and Burnham 2006). Sebanyak 10 mL darah subjek diambil dari pembuluh arteri *brachialis* dan dimasukkan ke dalam 2 tabung *glass tube plain* ukuran 5 mL. Darah ini didiamkan selama 1 jam, dan disentrifuse selama 20 menit pada suhu 4 °C dengan kecepatan 1250 x g (Zakaria *et al.* 1998). Supernatan digunakan untuk uji IgE total, IgE spesifik dan *immunoblotting*.

2.3.6. Penentuan IgE total dan IgE Spesifik

2.3.6.1. IgE Total

Pengujian IgE total dan Ig spesifik mengikuti metode Kumar *et al.* (2010), namun untuk uji IgE spesifik ada sedikit modifikasi, yaitu inkubasi pertama pada lempeng *microplate* adalah ekstrak protein kacang tanah.

Serum sebanyak 100 µL yang telah dilarutkan dengan bufer karbonat-bikarbonat 0,05 M, pH 9,6, dimasukkan pada sumur *microplate* 96 well, diinkubasi selama 1 malam pada suhu 4 °C. Sebagai kontrol negatif digunakan serum normal. Sisa sampel dibuang dan lempeng mikrotiter dicuci

sebanyak 5 kali dengan *phosphat buffer saline-tween* (PBST) sebanyak 300 µL/sumur). Selanjutnya sebanyak 200 µL susu skim 5% dalam PBST ditambahkan ke dalam lempeng mikrotiter dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37 °C. Setelah dicuci sebanyak 5 kali dengan PBST (300 µL/sumur), dilakukan penambahan antibodi *HRP conjugated monoclonal mouse anti-human IgE* 1:6000 dalam PBST sebanyak 100 µL/sumur, inkubasi dilanjutkan pada suhu 37 °C selama 1 jam.

Lempeng mikrotiter dicuci dengan PBST (300 µL/sumur) sebanyak 5 kali, lalu ditambahkan substrat *3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine* (TMB) sebanyak 100 µL/sumur. Hasil positif ditandai dengan timbulnya warna biru. Setelah 5 menit, reaksi dihentikan dengan menambahkan H₂SO₄ 2M sebanyak 25 µL/sumur, dan warna larutan akan berubah menjadi kuning cerah. *Optical density* (OD) diukur dengan menggunakan *ELISA reader* pada panjang gelombang 450 nm (Kumar *et al.* 2010). Nilai rata-rata OD ± 2SD dari kontrol normal diambil sebagai batas untuk hasil IgE positif.

2.3.6.2. IgE Spesifik

Sebanyak 100 µL ekstrak protein kacang dimasukkan pada lempeng *microplate* 96 well, diinkubasi selama 1 malam pada suhu 4 °C. Pencucian dilakukan dengan larutan PBST sebanyak 250 µL/sumur sebanyak 5 kali. Sebanyak 200 µL susu skim 5% dalam PBST ditambahkan dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C, dilanjutkan pencucian sebanyak 5 kali dengan 250 µL PBST.

Antibodi *HRP conjugated monoclonal mouse anti-human IgE* (1:6000) dalam PBST ditambahkan sebanyak 100 µL/sumur, berikutnya diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 jam. *Microplate* dicuci dengan PBST (250 µL/sumur) sebanyak 5 kali, lalu ditambahkan substrat TMB sebanyak 100 µL/sumur. Hasil positif ditandai dengan timbulnya warna biru. Reaksi dihentikan setelah 5 menit dengan cara menambahkan H₂SO₄ 2M sebanyak 25 µL/sumur dan larutan akan berubah warna menjadi kuning cerah. *Optical density* (OD) diukur dengan menggunakan *ELISA reader* pada panjang gelombang 450 nm (Kumar *et al.* 2010; Di Felice *et al.* 1994).

2.3.7. Analisis protein alergen spesifik (Immunoblotting)

Gel hasil elektroforesis SDS-PAGE yang tidak diwarnai ditransfer ke membran *polyvinylidene difluoride* (PVDF) selama 1,5 jam dan 90 V menggunakan peralatan *transblotting*. Membran *diblocking* dengan susu skim 5% dalam PBST selama 1 jam sambil digoyang pada suhu kamar, dilanjutkan dengan pencucian sebanyak 3 kali dengan PBST

masing-masing selama 5 menit. Serum penderita alergi diencerkan dengan PBST (1:10 v/v) dan diinkubasi selama satu malam pada suhu 4 °C kemudian dicuci dengan PBST sebanyak 3 kali. Antibodi *HRP conjugated monoclonal mouse anti-human IgE* yang telah diencerkan 1:3000 (v/v) dengan PBST ditambahkan sebanyak 100 µL/sumur dan diinkubasi selama 1 jam sambil digoyang menggunakan *shaker*. Membran dicuci dengan PBST sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit, dan ditambahkan substrat 3,3'-*Diaminobenzidine* (DAB) Satu tablet DAB dilarutkan dengan 10 ml larutan *tris-buffered saline* (TBS, pH 7.5). Hasil positif, bila mata dapat melihat kompleks protein dengan serum berupa pita berwarna coklat atau merah.

3. Hasil dan Pembahasan

3.1. Hasil proksimat dan sterilitas

Hasil uji proksimat kacang tanah didapatkan kadar protein sebesar 33,99%, lemak 45,97%, air 4,25% dan abu sebesar 2.63%. Rendemen ekstraksi protein kacang tanah dengan metode *isoelectric precipitation* didapatkan sebesar 74,98% dengan rekovery 30,43 g/100 g kacang tanah. Menurut Wu *et al.* 2009 ekstraksi protein kacang tanah dengan metode pengendapan pada titik isoelektrik menggunakan asam klorida menghasilkan kadar protein lebih tinggi dibandingkan dengan menggunakan alkohol dan larutan alkali dengan metode yang sama.

Hasil uji sterilitas dan profil larutan UKT merupakan syarat yang harus dipenuhi (Tabel 1).

Table 1

Hasil uji sterilitas dan profil larutan UTK kacang tanah (Standar *European Pharmacopoeia 7 Monograph on Allergen Product* 2010: 1063)

No	European Pharmacopoeia 7		Hasil analisis larutan UTK
	Parameter	Requirements	
1	Kadar air (%)	Maksimum 5% untuk produk <i>freeze-dried</i> dan boleh lebih dari 5% untuk produk cair	76,20±0,28
2	Kadar protein (µg/µl)	80-120% dari konsentrasi bahan (1 µg/µl)	1 µg/µL
3	Sterilitas	Steril, jika tidak steril kemudian merujuk pada chapter 5.1.4. on <i>European Pharmacopoeia 701/2011:50104</i>	steril
4	<i>Total plate count</i> *	Maksimum 10 ² CFU/g atau CFU/mL	0.00 ± 0.00
5	<i>Staphylococcus aureus</i> *	Tidak terdeteksi dalam 1g atau 1 mL	0.00 ± 0.00
6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> *	Tidak terdeteksi dalam 1g atau 1 mL	0.00 ± 0.00
7	<i>Fungy</i> *	Mak 10 ¹ CFU/g atau CFU/mL	0.00 ± 0.00
8	<i>Yeast</i> *		0.00 ± 0.00

*According to *European Pharmacopoeia* 01/2011:50104

Hasil analisis yang dicantumkan pada Tabel 1 merupakan data pengujian ekstrak kacang tanah untuk UTK, sehingga dapat disimpulkan bahwa larutan ekstrak kacang tanah memenuhi persyaratan yang ditetapkan *Standar European Pharmacopoeia 7 Monograph on Allergen Product* (2010:1063). Pengujian kadar air dan kadar protein mengacu pada AOAC 2005 sedangkan uji sterilitas mengacu pada Farmakope IV 1995.

Uji mikrobiologis produk farmasi non-steril meliputi *total plate count*, kapang, khamir dan untuk produk yang diberikan melalui kulit tidak boleh tercemar oleh *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Hasil uji sterilitas ekstrak UTK terhadap bakteri dikonfirmasi dengan mendeteksi bakteri menggunakan media selektif, di antaranya deteksi *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus aureus*

3.2. Profil protein larutan UTK

Analisis profil protein larutan UTK ekstrak kacang tanah dengan metode SDS-PAGE menghasilkan sebanyak empat belas pita protein (Gambar 1) dan data berat berat molekul disajikan pada Tabel 2.

Gambar 1. Hasil SDS-PAGE ekstrak protein kacang tanah
Lane 1: 3 µg/sumur, lane 2: 10 µg/sumur, lane 3: 30 µg/sumur dan M adalah marker

Lane 1,2 dan 3 adalah profil protein ekstrak kacang tanah dengan volume injeksi berturut-turut 3, 10 dan 30 µg/sumur sedangkan M adalah protein marker. Berat molekul protein ekstrak kacang tanah ditentukan menggunakan *software GelAnalyzer 2010a* dan didapatkan sebanyak 14 pita protein dengan kisaran berat molekul antara 10 sampai 122 kDa. Berat molekul lebih rinci dinyatakan pada Tabel 2.

Tabel 2

Hasil analisis berat molekul ekstrak protein kacang tanah dengan software *GelAnalyzer 2010a*

No	Protein Marker	BM (kDa)	Ekstrak protein kacang tanah	
			Pita ke-	BM (kDa)
1	β -galaktosidase	116	1	122
2	BSA	66	2	70
3	Ovalbumin	45	3	57
4	Lactate dehydrogenase	35	4	41
5	Rease Bsp981	25	5	37
6	β -galaktoglobulin	18	6	34
7	Lysozyme	14	7	30
8			8	23
9			9	21
10			10	20
11			11	17
12			12	14
13			13	13
14			14	10

BM; berat molekul

Hasil analisis pita protein *lane 3* (Gambar 1) kacang tanah 30 μ g/sumur didapatkan sebanyak 14 pita protein dengan berat molekul 10, 13, 14, 17, 20, 21, 23, 30, 34, 37, 41, 57, 70 dan 122 kDa. Gong *et al.* 2007 menyatakan bahwa berat molekul protein kacang tanah pada SDS-PAGE umumnya berkisar antara 14 sampai 66 kDa.

Hasil analisis SDS-PAGE ekstrak kacang tanah mentah dari Korea dengan konsentrasi akrilamid 20% pada *separating gel* dan 4% *stacking gel* didapatkan pita protein dengan berat molekul antara 60-65 kDa dan kacang tanah yang disangrai antara 38-48 kDa (Park *et al.* 2000; Cong *et al.* 2007 mengkarakterisasi ekstrak protein kacang tanah varietas China dengan SDS-PAGE, *separating gel* dan *stacking gel* dibuat dengan konsentrasi akrilamida sebesar 12,5% dan 4,5%, didapatkan pita protein dengan berat molekul 14,4: 20,0: 28,5: 35: 45: 66,2 dan 94,0 kDa. Hasil yang tidak jauh berbeda juga didapatkan oleh Wook-Park *et al.* 2000 yang membandingkan pola pita protein pada gel SDS-PAGE antara ekstrak protein kacang tanah Korea dengan kacang tanah Amerika, hasil yang didapatkan menunjukkan bahwa intensitas dan berat molekul pita protein kedua kacang tanah ini hampir sama yaitu 15-60 kDa.

3.3. Reaktivitas Uji Tusuk Kulit

Sebanyak 19 orang subjek relawan yang menyatakan menderita alergi makanan ketika diwawancarai pada saat seleksi subjek penelitian kemudian dikonfirmasi pernyataan ini dengan UTK. Hasil UTK menunjukkan bahwa sebanyak 10 subjek positif alergi kacang tanah dan 9 subjek negatif atau tidak alergi terhadap protein kacang tanah. Ukuran diameter *wheel* (bentol) berkisar antara 3 sampai 7 mm dan nilai UTK paling tinggi >+4. Ukuran bentol untuk subjek yang negatif dinyatakan berukuran 2

sampai 4 mm. Hasil pengukuran diameter *wheel* terhadap sembilan belas subjek ditampilkan pada Tabel 3 dan Tabel 4.

Tabel 3

Ukuran diameter *wheel* (bentol) pada kulit subjek penderita alergi ekstrak protein kacang tanah dengan teknik UTK

Kode subjek/ Jenis Kelamin/ Umur	Diameter bentol kontrol negatif (mm)	Diameter bentol kontrol positif (mm)	Diameter bentol ekstrak kacang tanah (mm)	Hasil UTK
02/P/20 th	3	5	7	+4
15/P/20 th	2	5	3	+2
18/P/21 th	4	7	5	+1
19/P/21 th	3	5	5	+3
21/P/21 th	3	6	4	+1
24/P/21 th	4	6	5	+1
45/L/20 th	3	6	5	+2
52/L/20 th	3	6	4	+1
54/P/18 th	3	8	4	+1
55/P/22 th	3	7	5	+2

P = perempuan, L = laki-laki

Uji UTK menggunakan ekstrak protein kacang tanah pada semua subjek alergi menghasilkan nilai UTK > 0, ini menunjukkan bahwa ekstrak protein kacang tanah yang diekstrak dengan metode titik isoelektrik dapat digunakan untuk mengkonfirmasi kejadian alergi kacang tanah.

Hasil UTK juga menunjukkan bahwa subjek yang dinyatakan sensitif terhadap alergen kacang tanah ditemukan satu subjek dengan kode 02 (hasil wawancara subjek menyatakan alergi) dengan nilai UTK sama dengan +4 dan ukuran bentol 7 mm. Ukuran bentol ini paling tinggi didapatkan pada penelitian ini. Hasil yang hampir sama juga didapatkan oleh Roberts *et al.* 2005 ukuran bentol minimal 8 mm sebanyak 94,4% dari 161 subjek yang diuji namun subjek diuji setelah *challenges* dengan kacang tanah sebelum UTK.

Tabel 4

Ukuran diameter *wheel* (bentol) pada kulit subjek penderita non alergi ekstrak protein kacang tanah dengan teknik UTK

Kode subjek/Jenis Kelamin/ Umur	Diameter bentol kontrol negatif (mm)	Diameter bentol kontrol positif (mm)	Diameter bentol ekstrak protein kacang tanah	Hasil UTK
01/P/20 th	2	5	2	0
	4	8	3	0
03/L/21th				
04/P/19 th	3	6	3	0
05/P/21 th	4	5	4	0
06/P/20 th	3	7	3	0
07/L/20 th	3	6	3	0
08/P/18 th	3	6	3	0
17/P/21 th	5	7	4	0
21/P/21 th	3	6	3	0

P = perempuan L = laki-laki

Hasil wawancara semua subjek pada Tabel 4 menyatakan tidak alergi kacang tanah, setelah dikonfirmasi dengan uji UTK terbukti tidak alergi terhadap ekstrak protein kacang tanah. Nilai UTK didapatkan sama dengan nol, namun beberapa subjek alergi terhadap makanan laut seperti subjek 03 dan 05.

3.4. IgE Total, IgE Spesifik dan Sensitivitas Reagen UTK

Pengujian IgE total, IgE spesifik dan *immunoblotting* merupakan uji balik (konfirmasi) hasil UTK. Uji IgE total dan IgE spesifik merupakan uji *in vitro* menggunakan serum subjek dengan teknik ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), dimana konsentrasi IgE total dan IgE spesifik sebanding dengan absorbansi yang terukur oleh ELISA reader. Hasil yang didapat dinyatakan sebagai perbandingan antara absorbansi serum subjek alergi ekstrak protein kacang tanah terhadap kontrol negatif. Nilai positif dinyatakan apabila nilai absorbansi serum subjek alergi ekstrak protein kacang tanah lebih besar dari absorbansi kontrol negatif ditambah dua kali standar deviasi (*standard deviation*) dan apabila absorbansi serum subjek lebih kecil dari absorbansi kontrol negatif ditambah dua kali standar deviasi dinyatakan negatif (Tabel 5).

Data pada Tabel 5 dapat kita dilihat bahwa IgE total semua subjek adalah positif, ini menunjukkan bahwa semua subjek adalah penderita alergi namun tidak alergi terhadap kacang tanah. Nilai IgE total tidak bisa digunakan untuk menyatakan alergi atau tidaknya seseorang terhadap alergen yang kita uji, sehingga perlu diuji lebih lanjut dengan menguji IgE spesifik. Nilai IgE spesifik yang tinggi menunjukkan pengikatan yang kuat antara IgE serum dengan protein alergen tertentu secara spesifik.

Secara umum hasil UTK dan hasil uji IgE spesifik *in vitro* bersifat sejalan yaitu sama-sama positif atau sebaliknya. Hasil analisis IgE spesifik dijadikan standar untuk menghitung nilai sensitivitas dan spesifitas ekstrak alergen kacang tanah, dimana subjek-subjek yang dinyatakan positif IgE spesifik dikonfirmasi dengan UTK.

Sensitivitas ekstrak protein kacang tanah didapatkan sebesar 100%, nilai ini menunjukkan bahwa ekstrak protein kacang tanah sangat peka untuk mendiagnosis penyakit alergi kacang tanah atau keakuratan ekstrak kacang tanah dalam mendiagnosis alergi kacang tanah sebesar 100% dengan kata lain uji UTK dengan ekstrak protein kacang tanah dapat mengkonfirmasi semua penderita alergi kacang tanah. Spesifitas ekstrak protein kacang tanah juga didapatkan 100%, nilai ini menunjukkan bahwa ekstrak protein kacang tanah mampu mengklarifikasi bahwa semua subjek yang

tidak alergi kacang tanah benar-benar tidak alergi kacang tanah. Nilai sensitivitas dan spesifitas ekstrak protein alergen kacang tanah pada penelitian ini didapatkan sebesar 100%.

Tabel 5

Hasil analisis IgE total, IgE spesifik (ELISA) dan UTK ekstrak protein kacang tanah pada subjek alergi dan non-alergi kacang tanah

Kode subjek	Kacang tanah		
	IgE total	IgE spesifik	Hasil UTK
02	+	+	+
15	+	+	+
18	+	+	+
19	+	+	+
21	+	+	+
24	+	+	+
45	+	+	+
52	+	+	+
54	+	+	+
55	+	+	+
01	+	-	-
03	+	-	-
04	+	-	-
05	+	-	-
06	+	-	-
17	+	-	-
07	+	-	-
08	+	-	-
17	+	-	-
Jumlah positif (negatif)	19(0)	10(9)	10(9)

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa *reagent* uji UTK ekstrak protein kacang tanah didapat 100% yaitu mampu mengkonfirmasi subjek yang menyatakan alergi kacang tanah adalah benar alergi dan mengklarifikasikan bahwa subjek yang tidak alergi kacang tanah benar-benar tidak alergi kacang tanah. Al-muhsen *et al.* 2003 menyatakan bahwa sensitivitas ekstrak protein kacang tanah dengan metode UTK adalah $\geq 95\%$ dan spesifitas berkisar 30-60%. Nilai sensitivitas ekstrak protein kacang tanah komersial beberapa merek berkisar antara 67-100% sedangkan sensitivitas ekstrak kacang (*crude extract*) sebesar 81% (Maleki *et al.* 2010).

Penelitian Maleki *et al.* 2010 terhadap sebelas peserta penelitian yang dianggap alergi kacang tanah berdasarkan riwayat alergi kacang tanah yang kuat atau hasil uji *challenge* kemudian ditusuk dengan ekstrak protein kacang tanah yang direbus dibuat dan beberapa ekstrak protein komersial. Hasil yang didapatkan menunjukkan bahwa ekstrak protein kacang tanah yang direbus memiliki spesifitas tertinggi yaitu 67% sedangkan untuk beberapa reagen UTK komersial didapatkan 42-63%.

3.5. Analisis Protein Alergenik dengan Immunoblotting

Uji selanjutnya adalah *immunoblotting* yaitu pengikatan IgE serum dengan protein alergen secara spesifik pada kertas membran PVDF. Hasil *immunoblotting* menggambarkan berat molekul protein yang bersifat alergenik (Gambar 2)

Gambar 2. Hasil *immunoblotting* ekstrak protein kacang tanah dengan serum subjek alergi 02, 15, 18, 19, 21, 24, 45, 52, 54, 55 dan M adalah protein marker, Angka 1,2,3,4, menunjukkan pita protein ke-

Sebanyak sepuluh serum subjek terbukti mampu berikatan secara spesifik dengan ekstrak protein kacang tanah pada kisaran berat molekul 10 sampai 49 kDa (*software GelAnalyzer 2010a*), sehingga dapat dikatakan protein dengan berat molekul 49, 47, 42, 28, 25, 23, 19, 17, 14, 12 dan 10 kDa adalah protein ekstrak kacang tanah yang bersifat alergenik (Tabel 6).

Tabel 6

Berat molekul pita protein alergen ekstrak kacang tanah hasil analisis dengan *software GelAnalyzer 2010a*

Kode subjek	Berat molekul protein alergen (kDa)			
	Pita ke-			
02	1	2	3	4
15	47	23	19	12
18	42	-	-	-
19	49	19	17	-
21	28	18	12	-
24	18	-	-	-
45	19	18	12	-
52	47	19	14	-
54	42	25	14	10
55	47	23	-	-
	18	-	-	-

Pada Tabel 6 dapat dilihat bahwa pita protein 18 kDa berikatan dengan IgE serum kode subjek 19, 21, 24 dan 55, demikian juga dengan pita 19 kDa mampu mengikat IgE serum kode subjek 02, 18, 24 dan 45. Hal ini menunjukkan bahwa pita protein alergen yang dominan muncul pada ekstrak protein kacang tanah pada penelitian ini adalah pita protein dengan berat molekul (BM) 18 dan 19 kDa, namun

kami belum bisa mengklaim bahwa ini adalah molekul alergen spesifik kacang tanah. Menurut Mari *et al.* (2006) protein dengan BM 18 kDa merupakan alergen yang baru diketahui dari kacang tanah dan dikenal dengan oleosin.

Protein kacang tanah dengan BM 17 kDa merupakan alergen yang dikenal sebagai Ara h 2 (Burks *et al.* 1998 ; Pele 2010). Ara h 5 merupakan alergen kacang tanah 14 kDa (Szymkiewicz 2010). IgE serum subjek 45 dan 52 dapat mengikat pita protein 14 kDa yang diperkirakan sebagai alergen Ara h 5.

4. Kesimpulan

Ekstrak protein yang diekstraksi dari kacang tanah yang dibudidayakan di Indonesia berpotensi dikembangkan sebagai *reagent* UTK untuk mendiagnosis penyakit alergi kacang tanah dengan nilai sensitivitas dan spesifitas 100%, *Reagent* UTK yang dikembangkan mengandung protein alergen yang dominan adalah pita protein dengan berat molekul 18 dan 19 kDa.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Pusat Penelitian dan Penerbitan Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah Jakarta yang telah membiayai penelitian ini melalui dana bantuan penelitian berbasis publikasi Nasional tahun 2014. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Balai Besar Penelitian Veteriner Bogor yang telah membantu penelitian ini dengan mengizinkan kami menggunakan fasilitas laboratorium Parasitologi.

Daftar Pustaka

- Association Official Analytical Chemist's Technical Standard. (2005). *Official Methods of Analysis of the AOAC (16th ed)*. Washington.
- Al-Muhsen S, Clarke AN and Kagan RS. (2003). Peanut Allergy: An Overview 168,10, 26-28.
- Bollag DM, Edelstein SJ. (1991). Protein Method. New York: Willey-Liss.
- Bradford M. (1976). A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-54.
- Burks W, Sampson H and Bannon G. (1998). Review Article Series II Peanut Allergens. *Clin Immunology*. 725-30.
- Cabrera, M., Lundquist, S., & Cooray, V. (1993). On the physical properties of discharges in sand under lightning impulses. *Journal of Electrostatics*, 30, 17-28.
- Cong Y.J., Lou F., Li L F., Xue W.T., Wang J., Zhang H., and Fan J. F (2008). Identification and

- quantification of major peanut allergens in China with IgE binding property. *J. Food Biochemistry*, 32, 353-367.
- Di Felice G, Caiaffa MF, Bariletto G, Afferni C, Di Paola R, Mari A, Palumbo S, Tinghino R, Sallusto F, Tursi A, et al. (1994). Allergens of Arizona cypress (*Cupressus arizonica*) pollen: characterization of the pollen extract and identification of the allergenic components. *J Allergy Clin Immunol*, 94(3 Pt 1), 547-55.
- Flinterman AE, Pasmans SG, Hoekstra MO, Meijer Y, Van Hoffen E, Knol EF, Hefle SL, Bruijnzeel-Koomen CA, Knulst AC. (2006). Determination of no-observed-adverse-effect levels and eliciting doses in a representative group of peanut-sensitized children. *J Allergy Clin Immunol*. 117(2),448-54.
- Heinzerling L, Mari A, Bergmann KC, Bresciani M, Burbach G, Darsow U, Durham S, Fokkens W, Gjomarkaj M, Haahtela T, Bom AT, Wöhrl S, Maibach H, Lockey R. (2013). The skin prick test-European standards. *Clin Trans Allergy*, 3(3),1-10.
- Kam-lun EH, Leung AKC. 2008. Food Allergies and Atopies: What is the Evidence? In *Food Allergies New Research*. Chessterton Nova Science Publishers, Inc
- Koppelman SJ, Knol EF, Vlooswijk RA, Wensing M, Knulst AC, Hefle SL, GruppenH, Piersma S. (2005). Peanut allergen Ara h 3 isolation from peanuts and biochemical characterization. *Allergy*, 58(11),1144-51
- Kumar R, Kumari D, Srivastava P, Khare V, Fakhr H, Arora N, Gaur SN, Singh BP. (2010). Identification of IgE-mediated food allergy and allergens in older children and adults with asthma and allergic rhinitis. *Indian J Chest Dis Allied Sci*, 52, 217-224.
- Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259), 680-5.
- Liu C, Wang H, Cui Z, He X, Wang X, Zeng and Ma H. (2007). Optimization of Extraction and Isolation for 11S and 7S Globulins of Soybean Seed Storage Protein. *Food Chemistry* 102: 1310-16
- Maleki SJ, Casillas AM, Kaza U, Wilson BA, Nesbit JB, Reimoneqneue C, Cheng H, Bahna SL. (2010). Differences among heat-treated, raw, and commercial peanut extracts by skin testing and immunoblotting. *Ann. Allergy Asthma Immunol*, 105(6), 451-457
- Morris A. (2006). ALLSA Position Statement Allergen Skin-Prick Testing. *Current Allergy & Clin Immunol*, 19(1), 18-21.
- Onesimo, Roberta, Monica Greco, and Carlo Caffarelli. (2013). Predictive Value of MP4 (Milk Prick Four), A Panel of Skin Prick Test for the Diagnosis of Pediatric Immediate Cow' S Milk Allergy. 201-8.
- Palmer GW, Dibbern DA Jr, Burks AW, Bannon GA, Bock SA, Porterfield HS, McDermott RA, Dreskin SC. (2005). Comparative potency of Ara h 1 and Ara h 2 in immunochemical and functional assays of allergenicity. *Clin Immunol*, 115(3), 302-12.
- Pele M. (2010). Review of Peanut Allergen. *Romanian Biotechnological Letters*, 15 (2), 5205-5212.
- Roberts G and Lac G. (2005). Diagnosing peanut allergy with skin prick and specific IgE testing. *J. Allergy Clin. Immunol*.
- Sampson HA. (2003). Anaphylaxis and Emergency Treatment. *Pediatrics*, 111 (63), 1601-8.
- Szymkiewicz A. (2010). Peanut (*Arachis hypogaea*) Allergens. Di dalam Jędrychowski L and. Wichers HJ, editor. *Chemical and Biological Properties of Food Allergens*. CRC Press. United States of America, 267-274.
- Sue L, Jonathan OB and Scott, H. (2000). Allergen Data Collection: Peanut (*Arachis hypogaea*). Internet symposium on food allergen, 2(2), 87-122
- Szymkiewicz A. (2010). Peanut (*Arachis hypogaea*) Allergens. Di dalam Jędrychowski L and. Wichers HJ, editor. *Chemical and Biological Properties of Food Allergens*. CRC Press. United States of America, 267-274.
- Wu H, Wang Q, Ma T, Ren J. (2009). Comparative studies on the functional properties of various protein concentrate preparations of peanut protein. *Food Research International*, 42, 343-348
- Wook-Park C, Kim GI and Lee CH. (2000). A Comparison Study on Allergen Component between Korean (*Arachis fastigiata* Shinpung) and American Peanut (*Arachis hypogaea* Runner). *J Korean Med Sci*, 15, 387-92.
- Pawarti. (2004). Tes Kulit dalam Diagnosis Rinitis Alergi. *Media Perhati*. 10, (3) 18-23.
- Zakaria FR, Khatib A, Ispurwanto, Rahman A. (1998). Telaah sifat alergenitas udang putih (*Penaeus marginatus*) untuk produksi isolat alergen. *Bul Teknol dan Industri Pangan*, 9, 54-59.