

Ekstraksi dan Karakterisasi Alergenitas Protein Belut Sawah (*Monopterus javanensis* La Cepède, 1800) untuk Pembuatan Reagen Uji Tusuk Kulit

*Extraction and Characterization of Rice Eel (*Monopterus javanensis* La Cepède, 1800) Protein Allergenicity for the Production of Skin Prick Test Reagents*

Lusiana^{a*}, Fransiska Zakaria Rungkat^b, Endang Prangdimurti^b dan Hendra Wijaya^c

^aMahasiswa S3 Program Studi Ilmu Pangan, Fakultas Teknik dan Teknologi Pertanian IPB, Jurusan Kimia, FMIPA Universitas Bengkulu, Indonesia

^bProgram Studi Ilmu Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian IPB, Jl. Raya Dramaga Bogor Indonesia

^cBalai Besar Industri Agro, Jl. Ir. Juanda No. 11, Bogor, Jawa Barat, Indonesia

Riwayat Naskah:

Diterima 09 2021
Direvisi 11 2021
Disetujui 11 2021

ABSTRAK: Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi protein alergen belut segar (BS) dan belut rebus (BR) dengan buffer Tris Glisin (TG), Tris Glisin DTT (TGD) dan *Phosphat buffer saline* (PBS) serta mengkarakterisasi alergenitas isolat protein dengan uji elektroforesis SDS-PAGE, ELISA dan *immunoblotting*. Rendemen protein yang dihasilkan pada BSTG, BSTGD dan BSPBS sebesar 2166 mg/L, 2083 mg/L dan 2284 mg/L. Rendemen ekstrak protein BRTG, BRTGD, BRPBS adalah 1445 mg/L, 1805 mg/L dan 1207 mg/L. Hasil SDS-Page menunjukkan profil protein BSTG memiliki 16 pita protein dengan bobot molekul dari 22 kDa-233 kDa dan BSTGD sebanyak 6 pita dengan bobot molekul 22 kDa-112 kDa, BSPBS sebanyak 16 pita dengan bobot molekul 22 kDa-93 kDa, BRTG memiliki 7 pita dengan berat molekul 24 kDa-267 kDa, BRTGD terdeteksi sebanyak 10 pita dengan berat molekul 24 kDa-235 kDa, BRPBS memiliki 10 pita protein dengan berat molekul 24 kDa-297 kDa. Hasil *immunoblotting* dari 10 subjek yang positif alergi menunjukkan ada 3 subjek yang memberikan reaksi positif yaitu subjek 2 pada BSPBS, subjek 4 pada BSTG, BSTGD dan BSPBS serta subjek 8 pada BSTGD, BSPBS, BRTG dan BRTGD. Buffer PBS dapat meningkatkan rendemen ekstrak protein belut dan meningkatkan alergenitas reagen sehingga dapat digunakan sebagai buffer untuk pembuatan reagen uji tusuk kulit.

Kata kunci: alergen, belut sawah (*Monopterus Javanensis* La Cepède, 1800), *ELISA immunoblotting*, *SDS-page*

ABSTRACT: This study aims to isolate allergen protein from fresh and boiled eel using Tris Glisin (TG), Tris Glisin DTT (TGD) and *Phosphate buffer saline* (PBS) and characterize the allergenicity of the protein isolates by SDS-PAGE, ELISA and *immunoblotting*. The yield BSTG, BSTGD and BSPBS, were 2166 mg/L, 2083 mg/L and 2284 mg /L. BRTG, BRTGD, BRPBS were 1445 mg/L, 1805 mg/L and 1207 mg/L. The SDS PAGE results showed that BSTG have 16 bands of protein with a molecular weight (MW) of 22 kDa-233 kDa, 6 bands of BSTGD with MW of 22 kDa-112 kDa and 16 bands of BSPBS with MW 22 kDa-93 kDa. BRTG has 7 bands with MW of 24 kDa-267 kDa, BRTGD detected as many as 10 bands with MW of 24 kDa-235 kDa and BRPBS has 10 bands with MW of 24 kDa-297 kDa. The *immunoblotting* results of 10 positively allerged subjects showed that 3 subjects gave positive reactions to allergens, i.e. subjects 2 for BSPBS, subjects 4 for BSTG, BSTGD, BSPBS and subjects 8 for BSTGD, BSPBS, BRTG and BRTGD. The results showed that PBS increased the protein extract yield and its allergenicity and could be used as a buffer for skin prick test reagents

Keywords: alergen, *Monopterus Javanensis* La Cepède, 1800), *ELISA*, *immunoblotting* *SDS-page*

* Kontributor utama
Email : lusiana@unib.ac.id

1. Pendahuluan

Alergi pangan merupakan suatu kondisi yang disebabkan oleh respons imun yang tidak sesuai terhadap protein makanan yang mengakibatkan sintesis antibody IgE secara berlebihan (Zakaria *et al.* 1993 I). IgE merupakan antibodi yang berfungsi mengaktifkan sistem inflamasi sehingga sintesis IgE yang tidak terkontrol dapat menghasilkan inflamasi alergi. Alergi pangan merupakan jenis alergi yang mengkhawatirkan dengan prevalensi yang tertinggi pada masa bayi dan anak usia dini (Chapman *et al.* 2006, Zakaria *et al.* 1993 II). Salah satu respons karena alergi pangan adalah terjadinya reaksi sistem kekebalan tubuh atau imunitas (Yusnawan 2013). Reaksi ini ditimbulkan karena konsumsi sumber alergen, terutama berupa protein, yang dicirikan dengan terbentuknya antibodi IgE spesifik alergen tertentu (Van Hangel 2007).

Gejala yang timbul akibat mengkonsumsi protein alergen antara lain adalah kulit kemerahan, gatal-gatal pada mulut, bibir menebal, mual, muntah dan diare, hidung berair, bersin, organ pernafasan terasa menyempit, pembengkakan pada laring, sulit bernafas penurunan tekanan darah, pusing hingga pingsan, gerakan dan denyut nadi yang tidak teratur (Sampson 2002).

Untuk menghindari alergi, masyarakat cenderung menghindari makanan yang diduga menimbulkan alergi (Sampson 2002). Makanan tersebut merupakan sumber nutrisi yang sangat diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangan seseorang (Purbasari 2012). Oleh karena itu diperlukan suatu uji diagnosis alergi. Tes alergi yang dilakukan untuk mengetahui jenis pangan yang menyebabkan seseorang tersebut alergi adalah dengan *Skin Prick Test* atau uji tusuk kulit. Uji tusuk kulit adalah tes diagnostik *in vivo* terhadap alergen hisap dan makanan, untuk mendeteksi antigen yang terlibat dalam reaksi hipersensitifitas tipe-I yang dimediasi IgE (Ilyas dan Wasposito 2010).

Pereaksi yang digunakan untuk uji tusuk kulit adalah ekstrak protein pangan yang selama ini masih diimpor dari luar negeri sehingga harganya relatif mahal (Wijaya *et al.* 2014). Pada penelitian ini memanfaatkan bahan pangan asli Indonesia salah satunya adalah belut sawah yang jumlahnya cukup melimpah untuk dijadikan ekstrak alergen. Belut sawah (*Monopterus javanensis* La Cepède, 1800) memiliki sumber protein tinggi, lemak, vitamin, dan mineral yang sangat baik. Komposisi kimia yang paling banyak terdapat pada belut adalah protein (Astiana *et al.* 2016).

Menurut Vissers *et al.* (2011), pengolahan makanan dapat menurunkan atau meningkatkan alergenitas suatu bahan pangan karena proses termal suatu protein dapat menyebabkan perubahan pada struktur protein yang dapat

menyebabkan perubahan dalam alergenitasnya. Penelitian yang dilakukan Zakaria (1998) menunjukkan bahwa proses pengolahan bahan pangan dapat meningkatkan alergenitas. Alergenitas protein dapat diturunkan atau dinaikkan dengan pengolahan karena dapat mengubah struktur alergen dan membuat alergen lebih tidak dikenali antibodi (Suseno *et al.* 2016). Belut sawah yang digunakan dalam penelitian ini diolah dengan cara direbus karena menurut Sundari *et al.* (2015), retensi protein bahan pangan yang mengalami perebusan lebih tinggi dibandingkan bahan pangan yang diolah dengan cara lain.

Salah satu cara untuk mendapatkan isolat protein diperlukan pelarut buffer yang sesuai agar menghasilkan rendemen yang tinggi. Menurut Ma *et al.* (2017) penggunaan pelarut yang sesuai berperan penting dalam proses ekstraksi protein karena dapat meningkatkan rendemen dan meningkatkan aktivitas dari protein alergen yang dihasilkan. Pada penelitian ini, ekstraksi protein pada belut sawah menggunakan variasi 3 macam pelarut atau buffer yaitu Tris Glisin (TG), Tris Glisin DTT (TGD) dan *Phosphate buffer saline* (PBS). Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi protein belut sawah dan mengkarakterisasi alergenitas isolat protein yang dihasilkan dengan *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel* (SDS-PAGE), *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), *immunoblotting* dan menguji reaktivitas isolat protein belut sawah sebagai alergen untuk diagnosis alergi pangan dengan metode uji tusuk kulit.

2. Bahan dan Metode

2.1. Bahan

Belut sawah diperoleh dari persawahan masyarakat di kampung Cisalopa Kecamatan Caringin Kab. Bogor. Bahan kimia yang digunakan antara lain bufer fosfat pH 7, bufer tris pH 8,8 dan pH 6,8, etanol 95 %, NaOH, PBS (phosphate bufer saline), K₂SO₄, HgO, H₂SO₄, heksana, HCl, AgNO₃, AgCl, natrium fosfat, amonium persulfat (APS), metanol, gliserol, β-merkaptotanol, bromfenol blue, kalium sulfat, etanol 95%, asam fosfat, bufer fosfat, asam asetat glasial, akuades, NaCl, H₃BO₃, Na₂S₂O₃, indikator *metilen red-metilen blue*, tween-20, histamin, TEMED (N,N,N',N'-tetramethyl-ethane-1,2-diamine), tris base, SDS (*sodium dodecyl sulphate*), BSA (*bovine serum albumin*), akrilamid, glisin, bufer karbonat-karbonat 0,05 M pH 9,6, TBS (tris bufer saline), PBST (*phosphate bufer saline-Tween 20* 0,05%), DTT (*dithitotriol*), tris, glisin, akuabides, *coomasie brilliant blue G-250*, antibodi anti IgE manusia berlabel enzim HRP (*Horseradish peroksidase*), substrat DAB (3,3-Diaminobenzidine), , N,N-metilen-bisakrilamid, *low molecular weight*

protein (LMW) Fermentasi®, 50% Gliserol, Buffer bikarbonat pH 8. Serum darah diperoleh dari 10 responden yang alergi terhadap bahan makanan.

2.2. Alat

Peralatan yang digunakan adalah *SDS-PAGE Bio Rad Mini-Protean II, Immunoblotting Mini Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer, ELISA Reader spektrofotometer UV-VIS, nitrocellulose membranes for blotting pore size 0.45 µm, size 15 cm x 15 cm (Sigma N8267), jarum marrow brow, pH meter, vortex, mikropipet, mikrotube 5 µL hingga 1000 µL stirrer, vial, kertas filter 0,22µm, kertas saring Whatman No.1, kertas saring biasa, tabung reaksi, kaca arloji, gelas ukur, labu takar, gelas piala, erlenmeyer, cawan petri dan peralatan gelas lainnya.*

2.3. Metode

2.3.1. Ekstraksi protein belut sawah (Ma et al. 2017)

Daging segar belut sawah dipisahkan dari bagian-bagian tubuh yang lain yaitu kepala dan tulang dengan cara difillet dan dibersihkan kemudian dihaluskan dengan blender. Untuk perlakuan, daging segar belut sawah yang telah dipisahkan dan dibersihkan direbus selama 5 menit. Sampel daging belut sawah yang segar dan yang direbus masing-masing sebanyak 300 g dihomogenisasi sambil *dishaker* pada suhu konstan 40°C menggunakan 3 macam buffer. Buffer 1 yaitu campuran Tris, glisin (TG). Buffer 2 yaitu campuran Tris, glisin dan DTT (TGD). Buffer 3 yaitu *phosphate buffered saline* (PBS). Belut segar buffer Tris Glisin (BSTG), belut segar buffer Tris Glisin DTT (BSTGD), belut segar buffer PBS (BSPBS), belut rebus buffer Tris Glisin (BRTG), belut rebus buffer Tris Glisin DTT (BRTGD), belut rebus buffer PBS (BRPBS) dikocok dan diekstraksi pada 130 rpm selama 16 jam dan dilanjutkan dengan *disentrifuse* pada 4000 rpm selama 30 menit. Supernatan yang diperoleh dikumpulkan. Endapan yang dihasilkan diekstraksi kembali masing-masing dengan ketiga pelarut selama 5 jam pada suhu 40°C Setelah itu disentrifus pada 4000 rpm suhu 40°C selama 30 menit. Supernatan yang diperoleh disatukan dengan supernatan dari hasil sentrifus yang pertama dan didialisis menggunakan akuades selama 24 jam. Akuades diganti sebanyak 2 kali selama dialisis dan dianalisis proteinnya dengan metode Bradford (Bradford 1976). Supernatan yang telah didialisis kemudian dikeringkan dengan *freeze drier* dan bubuk protein ini harus disimpan pada suhu -20°C jika belum diberi perlakuan.

2.3.2. Analisis profil isolat protein dengan SDS-PAGE (Laemmli 1970; Wijaya et al. 2015)

Isolat protein belut sawah ditentukan karakteristiknya dengan elektroforesis SDS PAGE menggunakan gel akrilamid. Gel ini terdiri atas dua bagian, yaitu *stacking gel* dengan konsentrasi akrilamid 5% dan *separating gel* dengan konsentrasi akrilamid 12%. Sebanyak 0,1 g isolat protein yang diperoleh dilarutkan dengan masing-masing 2 ml buffer TG, TGD dan PBS. Sebanyak 40 µL masing-masing sampel yang sudah dilarutkan dimasukkan ke dalam *microtube* 0,5 mL dan ditambahkan 10 µL masing-masing buffer. Tabung kemudian dipanaskan selama 5 menit dalam air mendidih 100°C. Standar yang digunakan adalah *low molecular weight protein* (LMW) Fermentasi® Gel hasil *running* dipindahkan ke dalam wadah tertutup yang telah berisi pewarna *coomasie brilliant blue G-250*.

2.3.3. Preparasi serum penderita alergi (Wijaya et al. 2014, Astuti et al. 2016)

Sebanyak 10 penderita alergi pangan diambil serumnya oleh tenaga medis dari klinik Alergi dan Asma Indrajana Jakarta (Kode etik penelitian No.168/IT3.KEPMSM-IPB/SK/2019). Subjek penelitian ini berasal dari desa Cigombang dan desa Cijeruk Kab. Bogor yang alergi terhadap bahan makanan, berjenis kelamin laki-laki dan perempuan berumur 15-45 tahun. Darah ditempatkan dalam tabung tanpa mengandung EDTA dan disentrifus selama 20 menit pada kecepatan 2500 rpm (1250 g). Serum disimpan pada suhu -20 °C.

2.3.4. Analisis IgE spesifik serum dengan metode ELISA (Wijaya et al. 2014 dan Kumar et al. 2010)

Protein belut (10 µg/mL) sebanyak 100 µL yang terlarut dalam buffer karbonat-bikarbonat (0,05 M, pH 9,8) dimasukkan ke dalam setiap sumur pada lempeng mikrotiter, kemudian diinkubasi pada suhu 4°C selama 1 malam. Sisa sampel pada lempeng mikrotiter dibuang, kemudian lempeng dicuci 5 kali dengan PBST sebanyak 250 µL/sumur. Selanjutnya lempeng mikrotiter diblok dengan susu skim 5% dalam PBST sebanyak 200 µL/sumur, dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Lalu lempeng mikrotiter dicuci dengan PBST (250 µL/sumur) sebanyak 5 kali. Serum penderita alergi yang telah diencerkan 1:10 dalam PBST ditambahkan pada lempeng mikrotiter sebanyak 100 µL/sumur, selanjutnya diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Setelah inkubasi, lempeng dicuci dengan PBST (250 µL/sumur) sebanyak 5 kali, kemudian ditambah 100 µL/sumur antibodi

monoklonal mencit anti IgE manusia terkonyugasi HRP terencerkan 1:6000 dalam PBST, lalu diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Lempeng dicuci dengan PBST (250 µL/sumur) sebanyak 10 kali, dan ditambah substrat TMB sebanyak 100 µL/sumur. Hasil positif ditandai dengan timbulnya warna biru. Setelah 5 menit, reaksi dihentikan dengan menggunakan H₂SO₄ 2M sebanyak 100 µL/sumur. *Optical density* (OD) larutan yang telah berubah menjadi berwarna kuning cerah diukur dengan menggunakan ELISA reader pada panjang gelombang 450 nm.

2.3.5. Immunoblotting (Wijaya et al. 2014)

Gel hasil elektroforesis yang tidak diwarnai ditransfer ke membran nitroselulosa (0,45 µm) yang disusun dalam alat *transblotting*, lalu diisi dengan buffer transfer. *Blotting* dilakukan pada 90 V selama 90 menit. Setelah selesai *blotting*, membran dilepas dari rangkaian alat dan direndam atau difiksasi dengan metanol 50% selama 2 menit, lalu diblok dengan susu skim 5% dalam PBST selama 1 jam pada suhu kamar. Membran dicuci dengan PBST 3 kali, masing-masing selama 5 menit. Setelah dicuci, membran ditambah serum penderita alergi dengan pengenceran 1:10 dalam PBST, selanjutnya diinkubasi selama 2 jam pada suhu kamar. Pencucian dilakukan lagi dengan PBST sebanyak 3 kali, masing-masing selama 5 menit, lalu diberi antibodi dengan pengenceran 1:3000 dalam PBST dan diinkubasi selama 1 jam sambil digoyang pelan. Setelah itu, membran dicuci kembali dengan PBST sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit, dan ditambah substrat DAB. Satu tablet DAB dilarutkan dengan 10 mL *Tris Buffered Salin* (TBS) dengan pH 7,5. Hasil deteksi positif kompleks protein alergen dengan antibodi ditandai dengan terbentuknya pita berwarna coklat pada membran nitroselulosa dan diukur pitanya dengan *software Gelanalyzer 2010a*.

2.3.6. Persiapan ekstrak uji tusuk kulit

Isolat protein dari BSTG, BSTGD, BSPBS, BRTG, BRTGD dan BRPBS sebanyak 0,2 g dilarutkan dalam 2 mL masing-masing Buffer dionikasi setiap menit selama 5 menit dan disentrifus pada kecepatan 13000 rpm selama 15 menit. Supernatan disaring dengan kertas filter 0,22 µm dan ditentukan kadar proteinnya dengan metode Bradford. Isolat ini kemudian dilarutkan dalam 50 % gliserol yang mengandung 0,4% fenol sehingga konsentrasi menjadi 1µg/µL dalam vial 5 mL steril. Larutan yang diperoleh diuji sterilitas dan mikrobiologis sebelum digunakan untuk uji tusuk kulit.

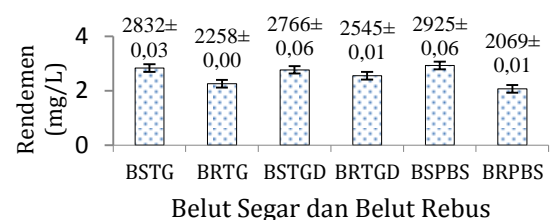
2.3.7. Uji tusuk kulit (Maleki et al. 2010, Jeong et al. 2013, Wijaya et al. 2014, Wijaya et al. 2015)

Uji Tusuk Kulit dilakukan oleh dokter alergolog pada Klinik Alergi dan Asma DR. Indrajana, Jakarta. Subyek penelitian untuk uji tusuk kulit ini adalah 10 orang penderita alergi yang dari hasil wawancara alergi terhadap makanan laut dan kacang-kacangan. Penelitian ini telah lolos kaji etik no. 168/IT3.KEPMSM-IPB/SK/2019. Uji tusuk kulit dilakukan pada lengan bawah bagian volar yang sebelumnya disinfeksi dengan alkohol dan ditandai dengan bolpoin. Sebagai kontrol positif digunakan histamin 1µg/µL dan sebagai kontrol negatif digunakan larutan *gliserol-saline* 50%. Tusukan dilakukan dengan kemiringan 45° menembus lapisan epidermis tanpa menimbulkan pendarahan. Setelah 15-20 menit hasil tes dibaca dengan mengukur bentol yang timbul.

3. Hasil dan Pembahasan

3.1. Ekstraksi protein

Rendemen ekstrak protein belut segar yaitu BSTG, BSTGD dan BSPBS masing-masingnya adalah sebesar 2832 mg/L, 2766 mg/L dan 2925 mg/L. Untuk rendemen ekstrak protein belut rebus yaitu BRTG, BRTGD, BRPBS masing-masingnya adalah 2258 mg/L, 2545 mg/L dan 2069 mg/L (Gambar 1). Dari hasil ini terlihat belut segar memiliki rendemen protein yang lebih tinggi dibandingkan dengan rendemen protein fillet yang direbus. Menurut Palupi *et al.* (2015), proses pemanasan menyebabkan terjadinya perubahan kelarutan protein sehingga mempengaruhi jumlah dan jenis protein yang dapat terekstrak dalam proses isolasi protein.



Keterangan: BSTG= Belut Segar Buffer Tris Glisin, BSTGD= Belut Segar Buffer Tris Glisin DTT, BSPBS= Belut Segar Buffer PBS, BRTG = Belut Rebus Buffer Tris Glisin, BRTGD= Belut Rebus Buffer Tris Glisin DTT, BRPBS= Belut Rebus Buffer PBS

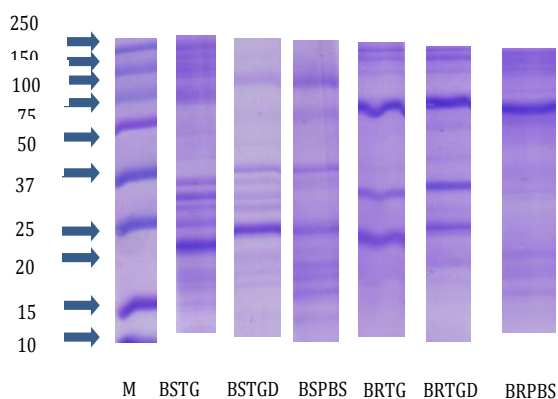
Gambar 1. Rendemen ekstrak protein belut sawah

3.2. Profil isolat protein dengan SDS-PAGE

Profil isolat protein yang dihasilkan dapat dilihat pada Gambar 2. Hasil SDS PAGE ini kemudian dianalisis dengan *software Gelanalyzer 2010a*. Hasil analisis menunjukkan bahwa pada BSTG muncul

pita protein sebanyak 16 pita protein dengan bobot molekul 233 kDa, 195 kDa, 157 kDa, 101 kDa, 60 kDa, 35 kDa, 32 kDa, 30 kDa, 28 kDa, 26 kDa, 24 kDa, 23 kDa dan 4 pita dengan bobot molekul 22 kDa. BSTGD memiliki 16 pita protein dengan bobot molekul 112 kDa, 67 kDa, 36 kDa, 22 kDa, 30 kDa, 28 kDa, 26 kDa, 2 pita dengan bobot molekul 24 kDa, 23 kDa dan 6 pita dengan bobot molekul 22 kDa. Ekstrak BSPBS memiliki 16 pita protein yaitu 93 kDa, 59 kDa, 34 kDa, 31 kDa, 25 kDa, 24 kDa, 2 pita pada bobot molekul 23 kDa dan 5 pita pada bobot molekul 22 kDa. Sampel BRTG memiliki 7 pita protein yang bobot molekulnya 267 kDa, 248 kDa, 178 kDa, 80 kDa, 30 kDa, 26 kDa dan 24 kDa. Pada sampel BRTGD terdeteksi 10 pita protein yaitu 235 kDa, 166 kDa, 77 kDa, 50 kDa, 38 kDa, 31 kDa, 26 kDa, 25 kDa, dan 2 pita protein yang bobot molekulnya 24 kDa. Sampel BRPBS memiliki 10 pita protein yaitu 297 kDa, 221 kDa, 152 kDa, 115 kDa, 75 kDa, 29 kDa, 3 pita protein yang bobot molekulnya 25 kDa dan 24 kDa.

Belut rebus memiliki jumlah pita protein yang lebih sedikit dibandingkan dengan belut segar. Perebusan dapat menurunkan kadar protein dalam bahan pangan karena dalam prosesnya menggunakan suhu tinggi yang menyebabkan denaturasi protein sehingga menurunkan daya larutnya. Hal ini menyebabkan sifat alergenitasnya juga mengalami perubahan karena proses termal suatu protein dapat menyebabkan perubahan pada struktur protein yang dapat menyebabkan perubahan dalam alergenitasnya (Visser *et al.* 2011, Nirbaya *et al.* 2021). Alergenitas protein dapat diturunkan atau dinaikkan dengan pengolahan karena dapat mengubah struktur alergen dan membuat alergen lebih tidak dikenali antibodi (Suseno *et al.* 2016, Zakaria 1998).



Keterangan: BSTG= Belut Segar Buffer Tris Glisin, BSTGD= Belut Segar Buffer Tris Glisin DTT, BSPBS= Belut Segar Buffer PBS, BRTG = Belut Rebus Buffer Tris Glisin, BRTGD= Belut Rebus Buffer Tris Glisin DTT, BRPBS= Belut Rebus Buffer PBS

Gambar 2. Profil SDS-PAGE Ekstrak protein belut sawah

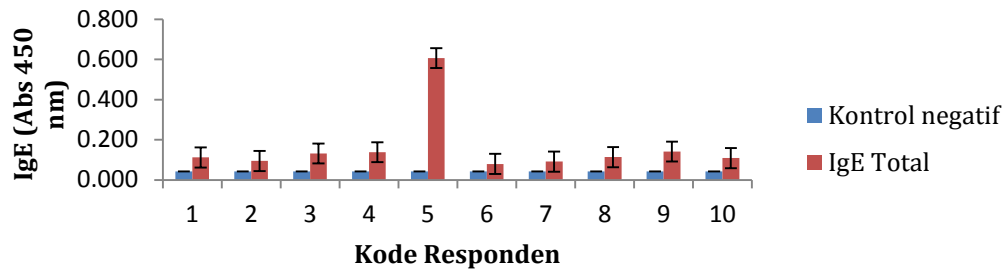
Intensitas pita protein terbesar pada BSTG adalah protein dengan BM 26 kDa sebesar 13,6 % , pada BSTGD 26 kDa sebesar 17%, BSPBS 25 kDa sebesar 12,6 %, BRTG 80 kDa sebesar 23,6%, BSTGD pada 26 kDa sebesar 13,5% dan BRPBS pada 75 kDa sebesar 14,8%. Berdasarkan penelusuran di database WHO/IUIS Alergen Nomenclatur, belut sawah belum memiliki data alergenya.

3.3. IgE total dan IgE spesifik

IgE total menunjukkan jumlah antibodi IgE yang ada dalam serum penderita alergi. Analisis IgE spesifik dari belut sawah pada 10 subjek ini menggunakan metode ELISA (Zakaria *et al.* 1993 I). Metode ini cukup baik digunakan karena dapat menunjukkan reaktivitas IgE spesifik dengan serum IgE pada konsentrasi yang rendah (Astuti *et al.* 2015, Astuti *et al.* 2018). Pada metode ini, isolat protein diikat pada lempeng mikrotiter ELISA dan diinkubasi dengan serum penderita alergi (Nirbaya *et al.* 2020). Hasil analisis IgE total dari 10 subjek positif alergi pangan dapat dilihat pada Gambar 3.

Dari hasil IgE total terlihat bahwa seluruh subjek menderita alergi yang ditunjukkan dengan nilai absorbansi yang lebih besar dari kontrol negatif. Semua hasil analisis IgE total subjek menunjukkan bahwa semua subjek merupakan penderita alergi dengan tingkat alergi yang berbeda-beda. Pada Gambar 6 terlihat bahwa responden yang memiliki tingkat alergi yang paling tinggi adalah subjek 5 dan responden yang memiliki tingkat alergi paling rendah adalah subjek 6. Semakin besar IgE total seseorang menunjukkan bahwa tingkat alerginya semakin tinggi (Zakaria 1998).

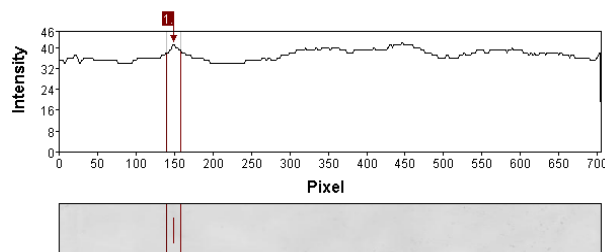
Antibodi IgE dalam serum yang dapat berikatan dengan isolat protein merupakan antibodi IgE spesifik terhadap protein isolat sebagai alergenya. Nilai IgE spesifik yang tinggi menunjukkan pengikatan yang kuat antara IgE subjek penderita alergi dengan protein alergen tertentu secara spesifik (Chalid *et al.* 2020). Hasil analisis IgE spesifik dari protein belut sawah terlihat bahwa 10 subjek positif alergi terhadap belut segar maupun belut rebus (Tabel 1).



Gambar 3. Analisis IgE total pada 10 serum responden penderita alergi

3.4. Immunoblotting

Penelitian ini menggunakan 10 subjek positif alergi yang diambil serumnya. Hasil *immunoblotting* menunjukkan berat molekul protein yang dapat menyebabkan alergi (Chalid et al. 2020). Dari hasil *imunoblotting* subjek 2, 4 dan 8 memberikan reaksi positif. Subjek 2 positif pada belut segar buffer PBS (BSPBS), subjek 4 pada sampel belut segar buffer Tris Glisin (BSTG), belut segar buffer TGD (BSTGD) dan belut segar buffer PBS (BSPBS) serta subjek 8 pada sampel BSTGD, BSPBS, belut rebus buffer TG (BRTG) dan belut rebus buffer TGD (BRTGD). Hasil *immunoblotting* yang dihasilkan dianalisis dengan *software Gelanalyzer 2010a*. Pada subjek 2, antibodi IgE yg terdapat dalam serum subjek mengikat belut segar buffer PBS (BSPBS) pada pita protein 101 kDa (Gambar 3).



Gambar 4. Hasil *Immunoblotting* isolat protein belut segar buffer PBS pada subjek 2 setelah dianalisis dengan *software analyzer 2010a*

Pada subjek 4, antibodi IgE yang berikatan dengan alergen pada belut segar buffer PBS (BSPBS) pada berat molekul 78 kDa, belut segar buffer TGD (BSTGD) pada berat molekul 25 kDa, dan belut segar buffer TG (BSTG) pada berat molekul 25 kDa (Gambar 4).

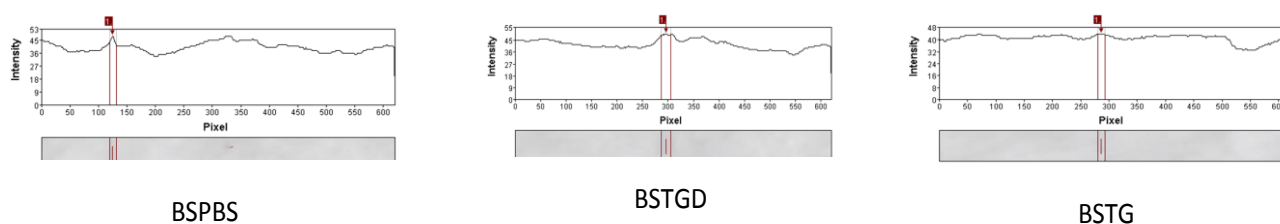
Pada subjek 8, antibodi IgE subjek bereaksi positif pada Belut segar buffer TGD (BSTGD) yaitu pada pita protein 29 kDa dan 3 pita protein 23 kDa, belut segar buffer PBS (BSPBS) pada pita protein 51 kDa belut rebus buffer TG (BRTG) pada pita protein 23 kDa, dan belut rebus buffer TGD (BRTGD) pada pita protein 23 kDa. Dari hasil *immunoblotting* ini dapat terlihat bahwa ekstrak protein belut bersifat alergenik pada subjek namun pengikatannya pada protein yang berbeda-beda.

3.5. Reaktivitas isolat protein pada uji tusuk kulit

Uji Tusuk Kulit dilakukan oleh tim dokter dari Klinik Alergi dan Asma DR. Indrajana Tanah Abang Jakarta. Reagen untuk uji tusuk kulit telah memenuhi syarat *European Pharmacopoeia 7.0 monograph on allergen product 01/2010:1063*, karena telah diuji sterilitasnya terhadap bakteri, kapang dan khamir dan tidak terdeteksi adanya bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus aureus*. Reagen yang berisi isolat protein belut sawah ini ditusukkan ke lapisan kulit subjek penderita alergi dan menimbulkan reaksi berupa bentol (Gambar 6).

Hasil uji tusuk kulit memperlihatkan timbulnya bentol kemerahan pada kulit, hal terjadi karena adanya *cross-linked* atau ikatan silang antara alergen belut sawah yang digunakan dengan IgE yang terikat pada sel mastosit dari subjek penderita alergi sehingga menyebabkan keluarnya histamin dan mediator lain dari sel mastosit yang menyebabkan vasodilatasi dan peningkatan permeabilitas pembuluh darah sehingga pada kulit timbul kemerahan dan bentol (Wijaya et al. 2015).

Tabel 1 menunjukkan bahwa terdapat variasi hasil antara IgE spesifik dengan hasil uji tusuk kulit. Ini terlihat dari hasil uji tusuk kulit yang negatif sedangkan hasil IgE spesifik yang positif. Pada subyek 5 misalnya, dari hasil IgE spesifik belut segar maupun belut rebus dengan metode ELISA menunjukkan hasil yang positif namun hasil uji tusuk kulit memperlihatkan hasil yang negatif. Perbedaan ini menunjukkan sensitivitas dari alergen yang dibuat. Ukuran bentol dinyatakan 0 bila ukuran bentol sama dengan kontrol negatif (tidak terbentuk bentol). Hasil dinyatakan +1 bila ukuran bentol 25-50% lebih besar dari kontrol negatif (<3 mm). Hasil +2 bila ukuran bentol 50-75% lebih besar dari kontrol negatif (3-5 mm), +3 bila ukuran bentol sama besar dengan kontrol positif (5-7 mm) dan +4 bila ukuran bentol 25-50% lebih besar dari kontrol positif dan >+4 bila ukuran bentol lebih dari 50% dari kontrol positif (Wijaya et al 2015).



Keterangan: BSTG= Belut Segar Buffer Tris Glisin, BSTGD= Belut Segar Buffer Tris Glisin DTT, BSPBS= Belut Segar Buffer Tris Glisin DTT
Gambar 5. Hasil *Immunoblotting* Belut segar buffer TG, TGD dan PBS pada Subjek 4 Setelah Dianalisis dengan *Software Gelanalyzer 2010a*



Keterangan: KN=Kontrol Negatif, KP=Kontrol Positif, BSTG= Belut Segar Buffer Tris Glisin, BSTGD= Belut Segar Buffer Tris Glisin DTT, BSPBS= Belut Segar Buffer PBS, BRTG = Belut Rebus Buffer Tris Glisin, BRTGD= Belut Rebus Buffer Tris Glisin DTT, BRPBS= Belut Rebus Buffer PBS

Gambar 6. Hasil uji tusuk kulit alergen belut segar dan belut rebus

Tabel 1 Hasil pengukuran IgE total, IgE spesifik dan uji tusuk kulit subyek alergi belut sawah

Responden	Hasil IgE total	Hasil IgE spesifik						Hasil Uji Tusuk Kulit (UTK)					
		BSTG	BSTGD	BSPBS	BRTG	BRTGD	BRPBS	BSTG	BSTGD	BSPBS	BRTG	BRTGD	BRPBS
1	+	+	+	+	+	+	+	+1	+1	+1	+1	+1	+1
2	+	+	+	+	+	+	+	+3	+2	+3	+2	+1	-
3	+	+	+	+	+	+	+	+4	+3	+1	+2	-	-
4	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+1	+1
5	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
6	+	+	+	+	+	+	+	+1	-	-	-	-	-
7	+	+	+	+	+	+	+	+1	-	-	-	-	-
8	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+1
9	+	+	+	+	+	+	+	-	+1	-	+1	+1	-
10	+	+	+	+	+	+	+	-	+1	-	-	+1	+1

Keterangan: BSTG= Belut Segar Buffer Tris Glisin, BSTGD= Belut Segar Buffer Tris Glisin DTT, BSPBS= Belut Segar Buffer PBS, BRTG = Belut Rebus Buffer Tris Glisin, BRTGD= Belut Rebus Buffer Tris Glisin DTT, BRPBS= Belut Rebus Buffer PBS

4. Kesimpulan

Hasil SDS PAGE belut rebus (BR) menunjukkan jumlah pita protein yang lebih sedikit dibandingkan dengan belut segar (BS). Pemilihan Buffer yang sesuai dalam mengekstraksi protein alergen belut sawah dapat meningkatkan rendemen sehingga semakin banyak ekstrak protein alergen yang didapatkan. Protein yang tinggi merupakan salah

satu faktor yang menentukan alergenisitas. Ekstrak protein yang diperoleh diuji alergenisitas proteinnya dengan metode ELISA dan memperlihatkan adanya alergenisitas. Ekstrak protein belut juga mempunyai kemampuan mengikat IgE pada serum subjek sehingga dapat digunakan untuk pembuatan alergen uji tusuk kulit. Hasil SPT menunjukkan bahwa proses perebusan dapat menurunkan alergenisitas.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terimakasih kepada tim komisi pembimbing yaitu Prof Dr. Fransiska Zakaria-Rungkat, MSc, Dr. Endang Prangdimurti M.Si, dan Dr. Hendra Wijaya M.Si atas bimbingannya sehingga penelitian ini bisa diselesaikan dengan baik. Terimakasih juga penulis ucapkan kepada LPDP BUDIDN yang telah memberikan beasiswa kepada penulis.

Daftar Pustaka

- [AOAC] Analysis of the Association of Official Agriculture Chemistry. 1998. *Nitrogen (Total) (crude protein) in plants, kjeldahl methods*. Methods 955.04. Ed ke-18. USA: AOAC International
- Astiana I, Nurjanah, Suwandi R, Suryani AA, Hidayat T. 2015. Pengaruh penggorengan belut sawah (*monopterus albus*) terhadap komposisi asam amino, asam lemak, kolesterol dan mineral. *Depik*. 4(1): 49-57 doi: [Http://Dx.Doi.Org/10.13170/Depik.1.1.2365](http://dx.doi.org/10.13170/Depik.1.1.2365)
- Astuti, R.M., Palupi, N.S., Zakaria-Rungkat F. 2016. Allergic reactivity of bambara groundnut (*Vigna subterranea*) proteins. *Food and Agricultural Immunology*. 27 (4):535-546.
- Astuti, R.M., Palupi, N.S., Zakaria-Rungkat F. 2018. Quality performance of protein allergen isolates for allergy diagnostic test (case: indonesian soybeans (*Glycine max*) and peanuts (*Arachis hypogaea*). *International Food Research Journal*. 25(1): 217-226.
- Chalid SY, Zakaria-Rungkat F, Syah D, Giriwono PE (2020) Sensitivitas ekstrak protein kacang tanah (*Arachis hypogaea* l.) sebagai larutan uji tusuk kulit. *Warta IHP*. 37(2):124-132.
- Chapman, Bernstein,. Lee R, Oppenheimer J. 2006. *Food Allergy: A Practice Parameter*. Annals Of Allergy, Asthma & Immunology.
- Ilyas FS dan Waspodo NN. 2010. *Panduan peserta uji tusuk kulit menggunakan alergen standar. Update in pathogenesis, diagnostic test and treatment simposium dan workshop*. Makasar: RS Akademis Jaury Jusuf Putra.
- Jeong KY, Choi SY, Han IS, Lee JH, Lee JS, Hong CS, Park JW. 2013. The effects of storage conditions on the stability of house dust mite extracts . *Allergy Asthma Immunol*. 5(6):397-401. [Http://Dx.Doi.Org/10.4168/Aair.2013.5.6.397](http://dx.doi.org/10.4168/Aair.2013.5.6.397).
- Kumar R, Kumari D, Srivastava P, Khare V, Fakhr H, Arora N, Gaur SN, SinghBP. 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(4):217-224.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Ma Jiayu, Pavase TR, Li Zhen Xing, Lin Hong. 2017. Optimisation of an extraction technique of fish allergens suitable for detection and diagnosis. *Czech J. Food Sci*. 35(1):24-31. Doi: 10.17221/578/2015-CJFS.
- Pawankar Holgate ST, Rosenwasser LJ, editor. 2009. *Allergy frontiers: classification and pathomechanisms*. Vol ke-2. Tokyo: Springer.
- 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. doi: 10.1016/j.anai.2010.09.025.
- Nirbaya A, Wijaya H, Zakaria-Rungkat F. 2020. Stability of bioactive compound and fatty acid composition after thermal processing of winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus*). *International Journal of Advanced Science and Technology*. 29(7) : 1602-1610.
- Nirbaya A, Zakaria-Rungkat F. 2021. Immunomodulatory potentials of winged Bean (*Psophocarpus tetragonolobus*) bioactive compounds on human lymphocyte proliferation. *International Journal on Advanced Science Engineering Information Technology*. 11(3):849-855. DOI: 10:18517/ijaseit.11.3.11527
- Palupi NS, Sitorus SR, Kusnandar F. 2015. Perubahan alergenitas protein kacang kedelai dan kacang bogor akibat pengolahan dengan panas. *J. Teknol dan Industri Pangan*. 26(2):222-231. DOI:10.6066/jtip.2015.26.2.222.
- Purbasari D. 2012. *Isolasi dan karakterisasi protein ikan tongkol (Auxis thazard), kerang hijau (Perna viridis) dan udang jerbung (Penaeus merguensis) untuk pembuatan isolat alergen* [Tesis]. Bogor: Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
- Sampson H.A. 2002. Peanut allergy. *The New England J. Med*. 346: 1294-1299.
- Sundari D, Almasyhuri, Lamid A. 2015. Pengaruh proses pemasakan terhadap komposisi zat gizi bahan pangan sumber protein. *Media Litbangkes*. 4(25): 235-242.
- Suseno R, Palupi NS, Prangdimurti E. 2016. Alergenitas sistem glikasi isolat protein kedelai-fruktooligosakarida. *AgriTech*. 36(4) 450-458. Doi:<http://dx.doi.org/10.22146/agritech.16770>.
- Van Hangel A. 2007. Food allergen detection methods and the challenge to protect food-

- allergic consumers. *Anal. Bioanal. Chem.* 389:111-118.
- Visser YM, Blanc F, Skov PS, Johnson PE, Rigby NM, Nicaise LP, Bernard H, Wal JM, Weber BB, Jongejan LZ, Sze ZP, Koerts JR, Jansen AP, Savelkoul HFJ, Wichers HJ, Mackie AR, Mills CEN, Patient KA. 2011. Effect of heating and glycation on the allergenicity of 2S albumins (Ara h 2/6) from peanut. *PloS One.* 6 (8): 1-9.
- Wijaya H, Zakaria-Rungkat F, Syah D, Prangdimurti E. 2014. Extraction of squid (*Photololigo Duvaucelii*) myofibrillar and sarcoplasmic proteins to create a skin prick test reagent in the diagnosis of food allergy. *Journal of Pharmacy.* 4(9): 06-14.
- Wijaya H, Zakaria-Rungkat F, Syah D, Prangdimurti E. 2015. Extraction of crab (*Scylla serrata*) myofibrillar and sarcoplasmic proteins to create a skin prick test reagent for crab allergy diagnosis. *Procedia Food Science.* 3: 52 - 68
- Yusnawan E, Marquis Cp, Lee Na. 2013. Isu global keamanan pangan kacang tanah ii: protein ara h sebagai alergen. *Buletin Palawija.* 26: 72-82.
- Zakaria-Rungkat F, 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.
- Zakaria-Rungkat F, Nabet P, Belleville F, Linden G. 1993. Allergenicity of bovine casein. I. Specific lymphocyte proliferation and antibody production as results of casein feeding in casein free mice. *Food Agriculture Immunology.* 4: 41-51.
- Zakaria-Rungkat F, Nabet P, Belleville F, Linden G. 1993. Allergenicity of bovine casein. II. Specific lymphocyte proliferation and histamine accumulation in the mastocyte as results of casein feeding in mice. *Food Agriculture Immunology.* 4: 52-67