

Pengembangan Ekstrak Protein Udang Jerbung (*Penaeus merquiensis*) Lokal Indonesia sebagai Reagent Uji Alergi dengan Metode *Skin Prick Test* (SPT)

(The Development of Protein Extract from Local Indonesian Shrimp (*Penaeus merquiensis*) for Food Allergies Reagent Using Skin Prick Test Method)

SRI YADIAL CHALID^{1*}, DAHRUL SYAH², PUSPO EDI GIRIWONO²,
FRANSISKA RUNGKAT ZAKARIA²

¹Program Studi Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Syarif
Hidayatullah Jakarta, Jl. Ir. H Djuanda No. 95 Ciputat, Tangerang Selatan, 15412.

²Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian
Jl. Lingkar Akademik, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680.

Diterima 17 Maret 2015, Disetujui 25 Juli 2015

Abstrak: Jerbung merupakan jenis udang yang tersebar luas pada perairan Indonesia dan merupakan alergen utama penyebab alergi *seafood*. Sampai saat ini, menghindari semua penyebab dan pencetus alergi merupakan cara terbaik untuk pengobatan penyakit alergi. Menghindari makanan tertentu layaknya ditegakkan berdasarkan uji alergi seperti *skin prick test* (SPT). *Skin prick test* merupakan uji alergi yang umum digunakan untuk menentukan alergen penyebab alergi yang dimediasi oleh IgE. Bahan utama SPT adalah ekstrak protein yang disebut dengan *reagent*. Protein jerbung diekstrak dari dagingnya menggunakan *phospate buffer saline* (PBS), kemudian dianalisis menggunakan SDS-PAGE dan konsentrasi proteinnya ditentukan dengan uji Bradford. Ekstrak protein diformulasi sebagai reagen SPT dengan mengikuti standarisasi *European Pharmacopoeia Monograph on Allergen Products 7* (2010:1063). Sebanyak 24 subyek alergi makanan dan 16 subyek non alergi makanan dicukitkan ekstrak protein udang jerbung pada kulit tangan bagian bawah. Serum subyek dikumpulkan untuk pengujian IgE total, IgE spesifik dan *immunoblotting* secara *in vitro*. Sensitivitas ekstrak protein udang jerbung pada penelitian ini adalah 95% dengan kesalahan negatif sebesar 5%, spesifitas sebesar 94% dengan kesalahan positif 6%. Hasil *immunoblotting* menunjukkan bahwa 9 di antara 10 serum subyek alergi udang jerbung yang diuji mampu berikatan secara spesifik (90%) dengan protein *reagent* udang jerbung pada kisaran berat molekul 28-63 kDa.

Kata Kunci: Udang jerbung, *Penaeus merquiensis*, *skin prick test*, IgE, alergen.

Abstract: Jerbung is a kind of shrimp which widely spread in Indonesian marine that is a major allergen from seafood origin. Until now, the best treatment for food allergies is avoid from all kinds of food allergens. Avoiding certain foods should be established based on allergy tests such as skin prick test (SPT) and double-blind placebo-controlled food challenges. SPT is the most widely used test for detecting IgE-mediated food allergies. The main ingredient of SPT are protein extract which is called the reagent. Jerbung protein was extracted from part of meat by buffer phosphat saline (PBS) then analyzed by using SDS-PAGE and protein concentration was analyzed by Bradford assay. Protein extract was formulated to SPT reagent based on standarization of the *European Pharmacopoeia Monograph on Allergen Products 7* (2010:1063). Skin prick test reagent was applied on 24 adult participants who were food allergies and 16 adults individuals of non food allergies. Sera of subjects were collected to measure

* Penulis korespondensi: Hp: 081380142169
e-mail: sri_yadial@yahoo.com, fransiska_Z@hotmail.com

total IgE and specific IgE-binding. The sensitivity of protein extract was 95% and negative error of 5%. Whereas specificity was 94% with a positive error was 6%. Immunoblotting was also performed on 10 sera subjects. Nine sera subjects of these shrimp allergic participants showed the specific binding to allergen of jerbung shrimp with the range of molecular weight of 28-63 kDa.

Keywords: Jerbung shrimp, *Penaeus merquiensis*, skin prick test, allergen.

PENDAHULUAN

UDANG jerbung atau udang putih (*Banana prawn* atau *white shrimp*), *Penaeus merquiensis* merupakan salah satu jenis udang yang tersebar luas pada perairan Indonesia. Jenis udang ini paling banyak dikonsumsi karena kandungan protein yang tinggi (28%) dan rasanya yang gurih. Namun demikian, udang ini diduga sebagai penyebab utama alergi di antara *seafood*. Peningkatan kasus alergi ikan laut dan udang sejalan dengan meningkat konsumsi produk laut (0,5-2,5%) dari jumlah penduduk⁽¹⁾.

Indonesia belum mempunyai data alergi udang. Dari hasil penelitian Chandra dkk.⁽²⁾ pada Bagian Penyakit Dalam, Rumah Sakit Cipto Mangunkusomo (RSCM), Jakarta, diperoleh informasi terbatas bahwa udang merupakan jenis makanan laut penyebab utama alergi pada anak-anak (8,8%) dan orang dewasa (24,3%). Berdasarkan hal tersebut, maka untuk sementara kasus alergi udang diduga cukup tinggi.

Skin prick test (SPT) merupakan salah satu uji alergi yang cukup akurat untuk mengetahui alergen penyebab alergi yang dimediasi oleh IgE⁽³⁾. Keunggulan metode SPT adalah sederhana, cepat (\pm 20 menit), dapat dilakukan secara simultan pada pasien yang memiliki alergi terhadap banyak alergen, resiko terjadinya alergi sistemik sangat kecil karena volume *reagent* yang masuk ke dalam kulit sangat sedikit⁽⁴⁾.

Bahan utama pada SPT adalah ekstrak protein yang disebut dengan istilah *reagent* SPT. *Reagent* SPT 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 *reagent* SPT impor komersial. Karena ketersediaan *reagent* impor masih terbatas dan mahal, maka klinik kesehatan dan rumah sakit Indonesia masih jarang yang mempunyai fasilitas uji tusuk kulit. Saat ini, sudah waktunya Indonesia mengembangkan *reagent* SPT dari produk lokal Indonesia terutama untuk alergi

makanan dan inhalasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengesktrak protein udang jerbung dari laut Indonesia dan mengaplikasikannya sebagai *reagent* uji tusuk kulit pada subyek relawan yang menderita alergi makanan dan non alergi, serta menentukan sensitivitas dan spesifitas reagen SPT yang diproduksi. Protokol penelitian ini telah disetujui oleh Komisi Etik Penelitian Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Diponegoro No. 190/EC/FKM/2014.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Udang jerbung (*Penaeus merquiensis*), amonium persulfat (APS), metanol, asam fosfat, asam asetat glasial, tween[®]-20 (Sigma-Aldrich), *N,N,N',N'-tetramethyl-ethane-1,2-diamine* (TEMED, Sigma-Aldrich), tris (MP Biomedical LLC), *sodium dodecyl sulphate* (SDS, Sigma-Aldrich), *bovine serum albumin* (BSA, Sigma-Aldrich), akrilamid (MP Biomedical LLC), glisin (MP Biomedical LLC), *tris- buffer saline* (TBS, Sigma-Aldrich), *phosphate buffer saline* (PBS), *coomasie brilliant blue G-250* (MP Biomedical LLC), antibodi anti IgE manusia berlabel enzim HRP (HRP *conjugated monoclonal mouse anti-human IgE*, *horseradish peroxydase* ICL), substrat *3,3',5,5'-tetramethylbenzidine* (TMB, Sigma-Aldrich), membran *polyvinylidene difluoride* (PVDF, Biorad), aprotinin (inhibitor protease, Sigma-Aldrich), *N,N*-metilen-bisakrilamid (Vivantis), *low molecular weight protein marker (LMW)*, Fermentas[®] dan *3,3'-diaminobenzidin* (DAB, BioRad, USA), *baird-parjer agar* (BPA), *brain heart infusion broth* (BHIB), plasma koagulasi kelinci, agar *dichloran rose bengal chloramphenicol* (DRBC), agar *dichloran* 18% gliserol (DG 18), digesti pankreas kasein P dan digesti papaik tepung kedelai.

Alat. Sentrifuse *ependorf* 5417C, elektroforesis mini protean II Biorad USA, ELISA *reader* Multiskan EX LabSystem, *micro-plate* (Nunc-Immuno Plate, Maxisorp, Inter Med, Denmark), spektrofotometer UV-VIS (Parkin Elmer, tipe Lamda 25), *mini transblot system* (BioRad, USA), sonikator (*sonic vibra-cell*),

METODE. Ekstraksi Protein Udang Jerbung Udang jerbung diperoleh langsung dari nelayan pada Tempat Pelelangan Ikan (TPI), Pelabuhan Ratu, Sukabumi, Jawa Barat, kemudian disimpan di dalam *cool box* berisi es. Uji proksimat bahan baku meliputi

kadar protein, lemak, air dan abu. Sebanyak 1 g daging udang bersih dihomogenisasi selama 3 menit dengan 10 mL larutan PBS pH 7,5 dengan kekuatan ion I = 0,5 dan 0,02 mL aprotinin (inhibitor protease). Suspensi disentrifugasi pada kecepatan 5000 x g, 4 °C selama 15 menit. Endapan dilarutkan lagi dengan 10 mL dapar fosfat pH 7,5, kekuatan ion 0,5, selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 5000 x g, 4 °C, selama 15 menit. Supernatan dari dua kali ekstraksi digabungkan^(5,6) dan dikeringkan dengan *freeze dryer*. Kadar protein diukur dengan metode Bradford⁽⁷⁾.

Analisis Bobot Molekul dengan SDS-PAGE.

Sebanyak 0.1 g ekstrak protein udang jerbung dilarutkan dengan 10 mL PBS pH 8,0 dengan bantuan sonikator sebanyak 5 kali, masing-masing 1 menit, dengan kecepatan 20 kHz dan 220 V. Selanjutnya disentrifugasi selama 20 menit, 4 °C dan 13.000 x g. Sebanyak 40 µL ekstrak protein udang (1 µg/µL) ditambah 10 µL dapar sampel yang mengandung natrium dodesil sulfat (SDS, deterjen anionik), basa tris pH 6,8 dan β-merkaptotanol, kemudian dipanaskan pada air mendidih selama 5 menit untuk mendenaturasi protein. Sebanyak 10 µL sampel diinjeksikan ke dalam sumur gel akrilamida yang terdiri atas *stacking gel* 5% dan *separating gel* 12%. Sebanyak 5 µL protein *marker* LMW Fermentos[®] yang mengandung 7 jenis protein digunakan sebagai standar. Marker LMW terdiri atas protein β-galaktosidase (116 kDa), BSA (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). Peralatan SDS-PAGE dijalankan pada sumber listrik 90 V selama 150 menit. Gel diangkat dan diwarnai dengan pewarna *coomasie brilliant blue* G-250 kemudian dibilas dengan air suling. Ditambahkan penghilang warna (*destaining solution*) sampai muncul pita berwarna biru pada gel^(8,9). Berat molekul protein pada gel dianalisis dengan *software GelAnalyzer* 2010a.

Persiapan Responden untuk Uji Tusuk Kulit.

Sebanyak 24 responden (subyek) relawan yang menderita alergi makanan dan 16 subyek non alergi makanan, umur 18-40 tahun diminta kesediaannya untuk berpartisipasi pada penelitian ini. Setiap subyek wajib mengisi formulir kesediaan (*inform consent*) dan lembaran kuesioner yang telah disediakan. Semua subyek mendapatkan penjelasan tentang manfaat dan kemungkinan resiko yang mungkin terjadi saat penelitian serta solusi yang ditawarkan. Keputusan ikut atau keluar dari penelitian ini merupakan hak subyek.

Persiapan Reagen untuk Uji Tusuk Kulit (SPT).

Sebanyak 0,2 g ekstrak protein udang dilarutkan dengan 2 mL PBS pH 7,5, kemudian disonikasi setiap

1 menit selama 5 menit dengan kecepatan 20 kHz dan 220 V, disentrifugasi pada kecepatan 13.000 g selama 20 menit. Supernatan disaring dengan *filter* 0.22 µm, kemudian dianalisis kadar proteinnya dengan metode Bradford dan profil proteinnya dengan SDS-PAGE.

Ekstrak protein udang diencerkan dengan 50% gliserol-salin sehingga konsentrasi menjadi 1 mg/mL sebanyak 1 mL dalam vial steril 5 mL⁽¹⁰⁾. Pengerjaan ini dilakukan pada ruang steril *laminar air flow*, kemudian dilakukan uji mikrobiologis, kadar air sesuai dengan *Standardization of Allergen Extracts European Pharmacopoeia Monograph on Allergen Products* (2010:1063) dan kadar histamin dengan HPLC (*High-performance liquid chromatography*). Uji sterilitas menggunakan media SCDA, uji mikrobiologi atau kontaminasi mikroba meliputi: angka lempeng total, uji cemaran *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, kapang dan khamir.

Pengambilan Darah Responden. Pengambilan darah dilakukan oleh tenaga medis pada Klinik Alergi dan Asma DR. Indrajana, Jakarta, dengan mengikuti prosedur standar klinis. Darah diambil dari pembuluh arteri *brachialis* sebanyak 10 mL, dimasukkan ke dalam tabung *glass tube plain* 5 mL selanjutnya didiamkan selama 1 jam, lalu disentrifugasi pada kecepatan 1250 g, 4 °C selama 20 menit. Supernatan merupakan serum (±5 mL) yang akan digunakan untuk uji IgE total, IgE spesifik dan *immunoblotting*. Serum disimpan pada suhu -20 °C⁽¹¹⁾.

Pemeriksaan Uji Tusuk Kulit (SPT). SPT dilakukan oleh dokter alergolog Klinik Alergi dan Asma DR. Indrajana Jakarta terhadap 40 orang subyek atau responden. Pertama kulit lengan bawah bagian volar dibersihkan dengan menggunakan alkohol 70%, kemudian bagian yang akan ditetesi dengan ekstrak protein udang, 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 ° menembus lapisan epidermis tanpa menimbulkan pendarahan. Setelah 15-20 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. Ukur diameter setiap bentol (*wheal*) dengan *morrow brown needle*. Nilai pengukuran dinyatakan sebagai berikut: 0 bila ukuran *wheal* sama dengan kontrol negatif (tidak terbentuk *wheal*), +1 bila ukuran *wheal* 25-50%

lebih besar dari kontrol negatif (<3 mm), +2 bila ukuran *wheal* 50-75% lebih besar dari kontrol negatif (3-5 mm), +3 bila ukuran *wheal* sama besar dengan histamine (5-7 mm), +4 bila ukuran *wheal* 25-50% lebih besar dari histamin dan >+4 bila ukuran bentol lebih dari 50% lebih besar dari histamine⁽¹²⁾.

Penentuan IgE Total dan IgE Spesifik Serum Responden. Untuk penentuan IgE total, sebanyak 100 μ L serum yang telah diencerkan (1:10) dengan dapar karbonat-bikarbonat 0,05 M, pH 9,6, ditambahkan pada lempeng *microplate* 96 sumur, kemudian diinkubasi selama 1 malam pada suhu 4 °C. Pencucian dilakukan dengan larutan *phosphat buffer saline-tween* (PBST) 250 μ L/sumur sebanyak 5 kali. Sebanyak 200 μ L susu skim 5% dalam PBST ditambahkan dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37 °C, dilanjutkan pencucian sebanyak 5 kali dengan 250 μ L PBST. Antibodi HRP *conjugated monoclonal mouse anti-human IgE* (1:6.000) dalam PBST ditambahkan sebanyak 100 μ L/sumur, berikutnya diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 jam. *Microplate* dicuci dengan PBST (250 μ L/sumur) sebanyak 5 kali, lalu ditambahkan substrat TMB sebanyak 100 μ L/sumur. Hasil positif ditandai dengan timbulnya warna biru. Reaksi dihentikan setelah 5 menit dengan menambahkan H₂SO₄ 2 M sebanyak 25 μ L/sumur dan larutan akan berubah warna menjadi kuning cerah. *Optical density* (OD) diukur dengan menggunakan ELISA *reader* pada panjang gelombang 450 nm^(11,13).

Hal yang sama dilakukan untuk menentukan IgE spesifik dengan sedikit modifikasi yaitu, inkubasi pertama pada lempeng *microplate* adalah ekstrak protein udang jerbung sebanyak 100 μ L (10 μ L/mL). Prosedur selanjutnya sama dengan penentuan IgE total^(11, 13).

Immunoblotting untuk Mendeteksi Protein Alergen. 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 diblok 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. Selanjutnya, ditambahkan serum penderita alergi yang telah diencerkan 1:10 dengan PBST. Inkubasi dilanjutkan selama satu malam pada suhu 4 °C, kemudian dicuci dengan PBST sebanyak 3 kali, masing-masing selama 5 menit. Selanjutnya, antibodi HRP *conjugated monoclonal mouse anti-human IgE* yang telah diencerkan 1:3.000 dicampurkan dengan PBST dan diinkubasi selama 1 jam sambil digoyang. Membran dicuci dengan PBST sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit dan ditambah substrat DAB. Satu tablet DAB dilarutkan dengan 10 mL larutan TBS pH 7,5. Hasil positif, bila mata dapat melihat kompleks protein dengan serum berupa pita berwarna coklat⁽⁹⁾.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Proksimat Bahan Baku Udang Jerbung. Hasil uji proksimat bahan baku udang jerbung adalah sebagai berikut: protein 28%, lemak 4%, air 41% dan abu 4%. Perolehan kembali protein hasil *freeze dryer* sebesar 31,27g/100 g sampel. Ekstrak protein diformulasi menjadi *reagent* SPT dengan larutan gliserol salin mengandung fenol dan dikemas dalam vial 5 mL steril. *Standardization of Allergen Extracts European Pharmacopoeia Monograph on Allergen Products* (2010:1063) mensyaratkan uji sterilitas dan

Tabel 1. Standar *European Pharmacopoeia 7 Monograph on Allergen Product* (2010: 1063) dan hasil analisis ekstrak alergen atau *reagent* SPT udang jerbung.

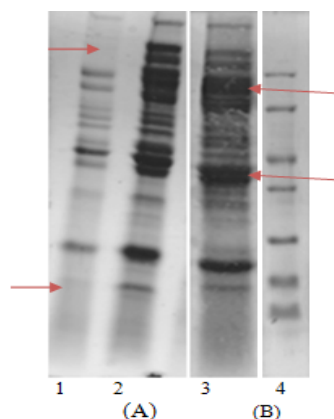
No.	<i>European Pharmacopoeia 7</i>		Hasil analisis <i>reagent</i> SPT
	Parameter	Persyaratan	
1.	Kadar air (%)	Maksimum 5% untuk produk <i>freeze-dried</i> dan boleh lebih dari 5% untuk produk cair	67,33
2.	Kadar protein (μ g/ μ l)	80-120% dari konsentrasi bahan (1 μ g/ μ L)	1 μ g/ μ l
3.	Sterilitas	Steril, jika tidak steril kemudian merujuk pada <i>chapter 5.1.4. on European Pharmacopoeia 7 01/2011:50104</i>	Steril
4.	<i>Total plate count</i> *	Maksimal 10 ² CFU/g atau CFU/mL	0,00 \pm 0,00
5.	<i>Staphylococcus aureus</i> *	Tidak terdeteksi dalam 1g atau 1 mL	0,00 \pm 0,00
6.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> *	Tidak terdeteksi dalam 1g atau 1 mL	0,00 \pm 0,00
7.	Fungi*	Mak 10 ¹ CFU/g atau CFU/mL	0,00 \pm 0,00
8.	<i>Yeast</i> *		0,00 \pm 0,00

*Berdasarkan *European Pharmacopoeia 7 01/2011:50104*.

mikrobiologis *reagent* SPT sebelum digunakan pada manusia. Hasil analisis sterilitas dan uji mikrobiologis disajikan pada Tabel 1.

Hasil uji sterilitas dan mikrobiologis menunjukkan bahwa *reagent* SPT udang jerbung steril, bebas dari kontaminasi bakteri, jamur dan kapang.

Kadar protein dengan metode Bradford sebesar 1,99 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ kemudian diencerkan menjadi 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ dengan larutan PBS pH 7,5. Pola protein SDS-PAGE dengan volume injeksi yang berbeda disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil SDS-PAGE ekstrak protein udang jerbung (A:1=5 $\mu\text{g}/\text{sumur}$, 2=10 $\mu\text{g}/\text{sumur}$, 3 = 15 $\mu\text{g}/\text{sumur}$), (B: 4 = 5 μL merupakan protein *marker*).

Pemisahan pita protein pada lajur (*lane*) 2 terbatas lebih jelas dibandingkan dengan lajur 1 dan 3. Beberapa pita pada lajur 1 bagian atas dan bawah (tanda panah) tidak muncul sedangkan lajur 3 terjadi penumpukan beberapa pita (warna hitam yang tebal, tanda panah). Volume injeksi 10 μL pada lajur 2 memberikan pola pemisahan protein yang terbaik sehingga digunakan untuk menentukan berat molekul masing-masing pita dengan menggunakan *software GelAnalyzer 2010a*. dan hasilnya disajikan pada Gambar 2.

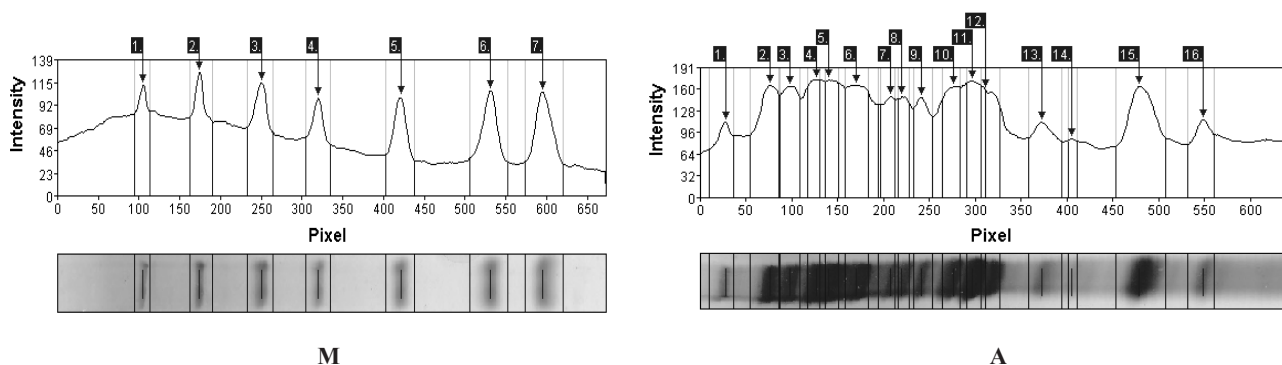
Sebanyak 16 pita protein terdeteksi pada ekstrak protein udang jerbung dengan berat molekul: 146, 101, 86, 70, 65, 53, 43, 40, 36, 31, 28, 27, 22, 21, 18 dan 17 kDa. Profil protein udang *black tiger* (*Penaeus*

monodon) yang diisolasi dengan dapar karbonat mengandung fenol tanpa inhibitor protease muncul pada kisaran berat molekul 30-80 kDa⁽¹⁴⁾. Hasil ini menunjukkan bahwa jenis udang dan metode ekstraksi dengan dapar yang berbeda memberikan pola pita yang bervariasi. Metode ekstraksi protein merupakan titik yang sangat penting pada *reagent* SPT karena konsentrasi baik alergen mayor ataupun alergen minor harus terwakilkan di dalam *reagent*⁽³⁾.

Reaktivitas SPT. Sebanyak 40 orang subyek yang menyatakan menderita alergi makanan ketika diwawancara pada saat seleksi subyek penelitian kemudian dikonfirmasi pernyataan ini dengan SPT. Hasil SPT menunjukkan bahwa sebanyak 24 subyek positif alergi udang jerbung dan 16 subyek negatif atau tidak alergi terhadap protein udang jerbung. Ukuran diameter *wheel* (bentol) berkisar antara 5 sampai 22.5 mm dan nilai SPT paling tinggi $\square+4$. Hasil pengukuran diameter *wheel* terhadap kedua puluh empat subyek dinyatakan pada Tabel 2.

Umumnya subyek menyatakan menderita alergi terhadap produk laut (70.8%) kacang-kacangan (16.7%) dan lain-lain 12.5% (debu, dingin dan telur). Hasil konfirmasi menunjukkan bahwa terdapat ketidakselarasan antara hasil SPT dengan praduga subyek. Selain alergi udang jerbung, besar kemungkinan subyek juga alergi terhadap makanan lain seperti pernyataan mereka sehingga perlu dilakukan SPT dengan reagen lain.

Jika seseorang memiliki riwayat alergi terhadap udang, tes alergi biasanya juga menunjukkan positif terhadap kepiting, lobster, udang jenis lain, polen dan beberapa serbuk sari tanaman⁽¹⁵⁾. Molekul protein suatu alergen mempunyai kemiripan atau homologi asam amino penyusun dengan alergen lain yang disebut dengan reaktivitas silang (*cross-reactivity*). Reaktivitas silang pada subyek alergi serbuk sari tanaman juga terbukti alergi terhadap protein apel, melon, kentang dan wortel⁽¹⁶⁾. Ayuso *et al.*⁽¹⁷⁾ juga menyatakan bahwa hasil skuensing asam amino alergen udang bersifat homolog dengan



Gambar 2. Hasil SDS-PAGE protein *marker* (M) dan ekstrak protein udang (A) setelah dianalisis dengan *software GelAnalyzer 2010a*.

Tabel 2. Hasil pengukuran diameter wheal (bentol) pada kulit subyek penderita alergi makanan dengan reagent SPT protein udang jerbung.

No.	Kode subyek/ jeniskelamin/ umur	Jenis alergen praduga subyek (wawancara)	Ukuran diameter wheal (mm)	Kesim- pulan SPT
1.	01/P/20 th	Ikan tongkol	10	>+4
2.	03/L/21 th	Sea food	7	+4
3.	04/P/19 th	Udang	6	+4
4.	05/P/21 th	Rajungan	6	+2
5.	06/P/20 th	Ikan peda	5	+2
6.	07/P/20 th	Ikan tongkol, ikan peda	6	+2
7.	09/P/21 th	Kepiting	10	>+4
8.	15/P/20 th	Kepiting, markisa	7	>+4
9.	17/P/22 th	Udang	7	+1
10.	19/P/21 th	Kacang- kacangan	5	+2
11.	23/L/20 th	Seafood	8	+2
12.	27/P/20 th	Udara	6	+3
13.	28/L/21 th	Seafood	7	>+4
14.	29/P/18 th	Debu	22.5	>+4
15.	31/P/17 th	Telur	4	+1
16.	34/L/17 th	Udang	8	>+4
17.	35/P/19 th	Seafood	5	+2
18.	39/P/18 th	Kerang, kacang tanah	5	+2
19.	45/L/20 th	Kacang- kacangan	5	+2
20.	48/P/19 th	Cumi-cumi	10	>+4
21.	52/L/20 th	Ikan tongkol	5	+2
22.	54/P/18 th	Seafood	5	+2
23.	55/P/22 th	Dingin	7.5	>+4
24.	59/L/20 th	Kacang tanah	5	+2

epitop Pen a1 dari tungau, kecoa dan tropomiosin dari lobster, diduga sebagai reaktivitas silang pada subyek alergi udang, sehingga pada uji SPT dengan alergen udang dinyatakan positif tetapi subyek tidak merasa alergi udang. Sama halnya dengan tropomiosin kelompok seafood, kelompok moluska dan krustasea bersifat reaktivitas silang dengan arthropoda seperti tungau debu atau kecoa⁽¹⁸⁾.

Besarnya ukuran diameter wheal tidak menunjukkan tingkat keparahan alergi seseorang. Seseorang mengalami anafilaksis dengan alergen hirup (inhalasi), padahal ukuran diameter bentol hanya 3 mm. Tetapi, sebaliknya, subyek alergi makanan

dengan ukuran diameter wheal lebih besar dari 10 mm hanya mengalami reaksi alergi ringan dan bahkan tidak menunjukkan reaksi alergi sama sekali^(19, 12). Ini terbukti pada subyek No. 29 dengan diameter bentol sebesar 22,5 mm tidak menunjukkan gejala reaksi alergi, apalagi anafilaksis. Hasil wawancara menunjukkan bahwa subyek No. 29 menderita alergi terhadap debu, bukan alergi udang. Hasil penelitian Ta et al.⁽²⁰⁾ juga menunjukkan bahwa tidak ada korelasi positif antara tingkat keparahan alergi dengan nilai SPT. Nilai SPT udang jerbung bersifat relatif terhadap kontrol negatif dan kontrol positif masing-masing subyek, sehingga ukuran diameter wheal yang sama belum tentu nilai positifnya sama.

IgE Total, IgE Spesifik dan Sensitivitas Reagen SPT. Pengujian IgE total, IgE spesifik dan immunoblotting merupakan uji balik (konfirmasi) hasil SPT. Uji IgE total dan IgE spesifik merupakan uji *in vitro* menggunakan serum subyek. Analisis IgE total dan IgE spesifik dikerjakan dengan teknik ELISA. Konsentrasi IgE total dan IgE spesifik sebanding dengan serapan yang terukur oleh ELISA reader, dinyatakan sebagai perbandingan antara serapan serum subyek alergi terhadap kontrol negatif. Nilai positif dinyatakan apabila nilai serapan serum subyek alergi lebih besar daripada serapan kontrol negatif, ditambah dua kali standar deviasi. Apabila serapan serum subyek lebih kecil daripada serapan kontrol negatif ditambah dua kali standar deviasi, maka dinyatakan negatif⁽¹³⁾. Subyek yang positif SPT dan positif IgE spesifik merupakan subyek yang peka terhadap alergen udang⁽²¹⁾. Hasil pengukuran IgE total dan IgE spesifik dinyatakan pada Tabel 3.

Immunoglobulin E (IgE) total dihasilkan tubuh sebagai respon terhadap alergen dan parasit^(22,23). Jumlah IgE di dalam serum sangat sedikit, yaitu lebih kurang 200 ng/mL pada orang dewasa non alergi dan 600 ng/mL atau lebih pada penderita alergi. Nilai yang sangat kecil ini memerlukan teknik analisis yang sensitif⁽²²⁾. Nilai IgE total tidak bisa digunakan untuk menyatakan alergi atau tidaknya seseorang, perlu uji lebih lanjut, yaitu menguji IgE spesifik. Nilai IgE spesifik yang tinggi menunjukkan pengikatan yang kuat antara IgE serum dengan protein alergen tertentu secara spesifik. Hasil uji IgE spesifik bersifat semikuantitatif, dimana sensitivitas metode tergantung pada kualitas ekstrak alergen dan serum⁽²⁴⁾. Hasil pengukuran IgE spesifik subyek No.16 dinyatakan positif, artinya serum subyek berikatan secara spesifik dengan ekstrak protein udang jerbung, namun hasil SPT negatif.

Umumnya, penelitian tentang alergen menunjukkan hasil yang sejalan antara IgE spesifik dengan SPT. Namun, ada beberapa penelitian yang

Tabel 3. Hasil pengukuran IgE total, IgE spesifik dan SPT subyek alergi udang jerbung.

No.	Kode subyek	IgE total	IgE spesifik udang jerbung	Kesimpulan SPT
1.	01	+	+	+
2.	03	+	+	+
3.	04	+	+	+
4.	05	+	+	+
5.	06	+	+	+
6.	07	+	+	+
7.	09	+	+	+
8.	15	+	+	+
9.	16	+	+	0
10.	17	+	+	+
11.	19	+	+	+
12.	23	+	+	+
13.	27	+	+	+
14.	28	+	+	+
15.	29	+	+	+
16.	34	+	+	+
17.	35	+	+	+
18.	39	+	+	+
19.	45	+	+	+
20.	48	+	+	+
21.	52	+	+	+
22.	54	+	+	+
23.	55	+	+	+
24.	59	+	+	+

Keterangan: +: positif, - dan 0: negatif, IgE: immunoglobulin E, SPT: *skin prick test*.

menemukan hal yang tidak sama. Desjardins *et al.*⁽²⁵⁾ menyatakan bahwa terjadi peningkatan IgE spesifik udang dan kerang tanpa adanya reaksi yang nyata pada kulit. Yang dkk.⁽²¹⁾ menyebutkan bahwa 2 di antara 7 subyek yang diprovokasi dengan udang menunjukkan gejala alergi seperti angiodema, mual, gatal di sekitar mulut, bersin dan kesulitan menelan, akan tetapi ketika uji SPT hasilnya negatif dan IgE spesifik positif.

Korelasi positif antara SPT dengan IgE spesifik menunjukkan sensitivitas dan akurasi dugaan negatif *reagent* SPT yang tinggi (>90%), hanya saja spesifitas dan dugaan positifnya rendah⁽²⁴⁾. Perbaikan teknik ekstraksi, pemurnian dan rekombinan protein alergen makanan banyak dilakukan untuk meningkatkan sensitivitas, spesifitas dan reproduksibilitas uji

alergi⁽²⁶⁾. Dari 24 subyek yang positif IgE spesifik, 23 subyek di antaranya positif SPT dan 1 subyek negatif SPT. Sensitivitas reagen SPT didapatkan sebesar 95%, dengan kesalahan negatif (*negative error*) sebesar 5%. Ini menunjukkan bahwa *reagent* udang jerbung hasil ekstraksi mempunyai sensitivitas yang tinggi. Tidak ada perbedaan sensitivitas *reagent* udang hasil ekstraksi laboratorium dengan *reagent* komersial⁽²²⁾.

IgE Total, IgE Spesifik dan Spesifitas Reagen SPT. Hasil pengukuran IgE total, IgE spesifik pada subyek non alergi udang jerbung dinyatakan pada Tabel 4.

Uji IgE total terhadap 16 subyek non alergi udang jerbung dinyatakan positif karena IgE total subyek lebih tinggi dari kontrol negatif. Selain udang jerbung, peningkatan IgE total serum juga disebabkan oleh alergen lain, sebagai respon imun oleh parasit malaria, amoeba usus^(27, 23).

Dari Tabel 4 terlihat bahwa semua IgE spesifik sera subyek lebih rendah dari kontrol sehingga dinyatakan tidak alergi terhadap udang jerbung, namun subyek dengan No. kode 31 dinyatakan negatif IgE spesifik tetapi hasil SPT positif atau sebaliknya untuk subyek No. kode 08. Ketidakselarasan antara hasil SPT dengan IgE spesifik biasa terjadi. Hal yang sama juga

Tabel 4. IgE total, IgE spesifik dan SPT pada subyek tidak alergi udang jerbung.

No.	Kode subyek	IgE total	IgE spesifik udang jerbung	SPT udang jerbung	Kesimpulan SPT
1.	02	+	-	0	-
2.	08	+	+	0	-
3.	18	+	-	0	-
4.	21	+	-	0	-
5.	24	+	-	0	-
6.	25	+	-	0	-
7.	30	+	-	0	-
8.	31	+	-	+1	+
9.	36	+	-	0	-
10.	37	+	-	0	-
11.	38	+	-	0	-
12.	46	+	-	0	-
13.	47	+	-	0	-
14.	56	+	-	0	-
15.	57	+	-	0	-
16.	66	+	-	0	-

Keterangan: +: positif, - dan 0: negatif, IgE: immunoglobulin E, SPT: *skin prick test*.

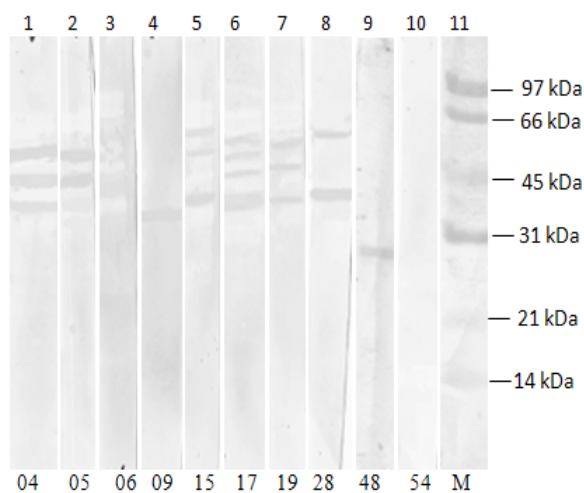
Tabel 5. Sensitivitas dan spesifitas reagent ekstrak udang jerbung untuk skin prick test (SPT).

Ekstrak	Alergi, positif SPT, Jumlah (% sensitivitas)	Alergi, negatif SPT, Jumlah (% kesalahan negatif)	Non alergi, positif SPT, Jumlah (% kesalahan positif)	Non-alergi, negatif SPT, Jumlah (% spesifitas)
Udang jerbung	23/ 24 (96)	1/24 (4)	1/16 (6)	15/16 (94)

ditemukan oleh Maleki *et al.*⁽¹⁰⁾ dimana subyek yang mengalami anafilaksis terhadap udang ketika diuji IgE spesifik dinyatakan negatif terhadap alergen kacang tanah, akan tetapi uji SPT positif terhadap ekstrak kacang tanah komersial maupun protein kacang tanah hasil ekstraksi laboratorium.

Hasil perhitungan spesifitas reagen udang jerbung didapatkan sebesar 94% dengan kesalahan positif (*positive error*) 6%. Nilai ini menunjukkan bahwa reagent SPT udang jerbung mempunyai spesifitas tinggi dan dapat digunakan sebagai alternatif pengganti reagent komersial. Sensitivitas ekstrak alergen udang *Solenocera melantho* pada 18 subyek alergi udang bernilai 100% tetapi spesifitasnya 61%⁽²⁸⁾. Hasil perhitungan sensitivitas dan spesifitas ekstrak alergen udang jerbung pada uji SPT dinyatakan pada Tabel 5.

Protein Alergenik dengan Westernblotting (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 3).



Gambar 3. Profil molekul alergenik ekstrak udang jerbung dari 10 serum subyek alergi (A) yang ditunjukkan oleh lane (lajur) 1-10, lajur 11 adalah marker (M).

Sebanyak sepuluh serum yang diuji, sembilan diantaranya mampu berikatan secara spesifik (90%) dengan ekstrak protein udang jerbung pada kisaran berat molekul 28 sampai 63 kDa (*software GelAnalyzer 2010a*), sehingga dapat dikatakan molekul ini bersifat alergenik.

Secara rinci, berat molekul alergenik ekstrak udang jerbung dan perkiraan jenis proteinnya ditampilkan pada Tabel 6. Protein dengan berat molekul 35 kDa dan 51 kDa merupakan alergen utama.

Tabel 6. Berat molekul protein alergenik ekstrak protein udang jerbung dengan immunoblotting setelah dianalisis dengan software GelAnalyzer 2010a.

Kode serum	Berat molekul protein alergenik (kDa)				Protein dugaan
	1	2	3	4	
04	54	45	38	-	Tropomiosin
05	53	43	38	-	Tropomiosin
06	38	-	-	-	Tropomiosin (35-38) kDa
09	37	-	-	-	Tropomiosin (35-38) kDa
15	64	54	39	-	Tropomiosin (39 kDa)
17	51	45	40	33	
19	52	44	35	-	
28	54	36	-	-	
48	26	-	-	-	
54	-	-	-	-	

Purbasari⁽²⁹⁾ menyatakan bahwa protein alergen sarkoplasma udang jerbung berkisar antara 27-84 kDa, sedangkan untuk miofibril udang jerbung 15-107 kDa. Shabudin *et al.*⁽³⁰⁾ menyebutkan bahwa alergen utama pada ekstrak udang windu (*Penaeus monodon*) adalah protein dengan berat molekul 36, 42, 49 dan 75 kDa dan alergen utama udang *king prawn* adalah 36, 42 dan 49 kDa. Beberapa literatur menyebutkan alergen utama udang adalah protein tropomiosin yang juga merupakan molekul utama penyebab reaktivitas silang (*cross-reactive*) pada kelompok krustasea dan moluska^(31, 32). Tropomiosin dari udang memiliki titik isoelektrik sedikit asam, mengandung glikan dan tidak memiliki residu sistein, larut air dan merupakan protein yang tahan panas dengan berat molekul berkisar 34-39 kDa⁽³³⁾.

SIMPULAN

Protein udang jerbung lokal dari perairan laut Indonesia berpotensi dikembangkan sebagai reagent

SPT untuk mendiagnosis penyakit alergi udang, sehingga peluang menggunakan produk lokal Indonesia menjadi lebih luas. Dengan demikian, diharapkan semakin banyak penderita alergi yang melakukan uji SPT dengan harga yang terjangkau. *Reagent* SPT dari udang jerbung lokal diekstrak secara sederhana dan hasil standardisasi dengan mengikuti aturan European Pharmacopeia menghasilkan *reagent* SPT dengan sensitivitas dan spesifitas yang tinggi. Potensi sebagai protein alergen diketahui pada protein dengan berat molekul 28-63 kDa.

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 fasilitas laboratorium Parasitologi.

DAFTAR PUSTAKA

1. Woo CK, Bana SL. Not all shellfish "allergy" is allergy. *Clinical and Translational Allergy*. 2011. 1(3):1-7.
2. Candra Y, Setiarini A, Rengganis I. Gambaran sensitivitas terhadap alergen makanan. *Makara Kesehatan*. 2011. 15(1):44-50.
3. Heinzerling L, Mari A, Bergmann K-C, Bresciani M, Burbach G, Darsow U, *et al*. The skin prick test - European standards. *Clin Transl Allergy*. 2013. 3:3.
4. Krouse JH, Marbry RL. Skin testing for inhalant allergy: current strategies. *Otolaryngology Head and Neck Surgery*. 2003. 129:34-9.
5. Hashimoto K, Watabe S, Kono M, Shiro K. Muscle protein composition of sardine and mackerel. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. 1979. 45:1435-44.
6. Diaz-Tenorio LM, Fernando L, Garcia C, Pacheco-aguil AR. Comparison of freezing and thawing treatment on muscle properties of whole shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Food Biochemistry*. 2007. 31:563-76.
7. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Journal Analytical Biochemistry*. 1976. 72:248-58.
8. Laemmli UK. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970. 227:680-5.
9. Bollag DM, Edelman SJ. *Protein Method*. New York: Wiley-Liss; 1991.
10. Maleki SJ, Casillas AM, Kaza U, Wilson BA, Nesbit JB, Reimoneqne C, *et al*. Differences among heat-treated, raw and commercial peanut extracts by skin testing and immunoblotting. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2010. 105(6):451-7.
11. Zakaria FR, Khatib A, Ispurwanto, Rahman A. Telaah sifat alergenitas udang putih (*Penaeus marguensis*) untuk produksi isolat alergen. *Buletin Teknologi dan Industri Pangan*. 1998. 9:54-9.
12. Moriss A, Burnham ALLS. A position statement: Allergen skin-prick testing. *Current Allergy and Clin Immunol*. 2006. 19(1):22-5.
13. Kumar R, Kumari D, Srivastava P, Khare V, Fakhr H, Arora N, *et al*. Identification of IgE-mediated food allergy and allergens in older children and adults with asthma and allergic rhinitis. *Indian J Chest Dis Allied Sci*. 2010. 52:217-24.
14. Piboonpocanun S, Boonchoo S, Pariyaprasert W, Visitsunthorn N, Jirapongsananuruk O. Determination of storage conditions for shrimp extracts: Analysis of specific IgE-allergen profiles. *Asian Pacific J Allergy Immunol*. 2010. 28:47-52.
15. Van Do T, Elsayed S, Florvaag E, Hordvik I, Endresen C. Allergy to fish parvalbumins, studies on the cross-reactivity of allergens from 9 commonly consumed fish. *J Allergy Clin Immunol*. 2005. 116: 1314-20.
16. Bircher AJ, Van-Melle G, Haller E, Curty B, Frei PC. IgE to food allergens are highly prevalent in patients allergic to pollens, with and without symptoms of food allergy. *Clinical Experimental Allergy*. 1994. 24(4):367-74.
17. Ayuso R, Reese G, Leong-Kee S, Plante M dan Lehrer SB. Molecular basis of arthropod cross-reactivity: IgE-binding cross-reactive epitopes of shrimp, house dust mite and cockroach tropomyosins. *Int Arch of Allerg and Immuno*. 2002. 129(1):38-48.
18. Untersmayr E, Szalai K, Riemer AB, Hemmer W, Swoboda I, Hantusch, *et al*. Mimotopes identify conformational epitopes on parvalbumin, the major fish allergen. *Mol Immunol*. 2003. 43(9):1454-61.
19. Sporik R, Hill DJ, Hosking CS. Specificity of allergen skin prick testing in predicting positive open food challenges to milk, egg and peanut in children. *Clin Expt Allergy*. 2000. 30:1540-46.
20. Ta V, Weldon B, Yu G, Humblet O, May SN, Nadeau K. Use of specific IgE and skin prick test to determine clinical reaction severity. *J of Medical Research*. 2011. 1(4):410-29.

21. Yang AC, Arruda LK, Santos ABR, Barbosa MCR, Chapman MD, Galvão CES, *et al.* Measurement of IgE antibodies to shrimp tropomyosin is superior to skin prick testing with commercial extract and measurement of IgE to shrimp for predicting clinically relevant allergic reactions after shrimp ingestion. *J Allergy Clin Immunol.* 2010. 125:872–8.
22. Durham SR, Church MK. Principles of allergy diagnosis. 3rd ed. Philadelphia: Mosby Elsevier Ltd.; 2006.
23. Duarte J, Deshpande P, Guiyedi V, Mécheri S, Fesel C, Cazenave P-A, *et al.* Total and functional parasite specific IgE responses in *Plasmodium falciparum*-infected patients exhibiting different clinical status. *Malar J.* 2007. 6:1.
24. Fernandes J, Reshef A, Patton L, Ayuso R, Reese G, Lehrer SB. Immunoglobulin E antibody reactivity to the major shrimp allergen, tropomyosin, in unexposed Orthodox Jews. *Clin Expt Allergy.* 2003. 33(7):956-61.
25. Desjardins A, Malo JL, L'Archevêque J, Cartier A, McCants M, Lehrer SB. Occupational IgE-mediated sensitization and asthma caused by clam and shrimp. *J Allergy Clin Immunol.* 1995. 96:608–17.
26. Grier TJ. Laboratory methods for allergen extract analysis and quality control. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology.* 2001. 21:111-40.
27. Jalalian M, Rezaiian M, Kia EB, Massoud J, Mahdavi M, Rokni MB. Relationship between serum IgE and intestinal parasites. 2004. 33(1):18–21.
28. Gamez C, Sanchez-Garc S, Ibanez MD, Lopez R, Aguado E, Lopez E, *et al.* Tropomyosin IgE-positive results are a good predictor of shrimp allergy. *Allergy.* 2011. 66:1375–83.
29. Purbasari D. Isolasi dan karakterisasi protein ikan tongkol (*Auxis thazard*), kerang hijau (*Perna viridis*) dan udang jerbung (*Penaeus merguensis*) untuk pembuatan isolat alergen [thesis]. Bogor: Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor; 2012.
30. Sahabudin S, Misnan R, Hani Z, Yadzid M, Mohamad J, Abdullah N, *et al.* Identification of major and minor allergens of black tiger prawn (*Penaeus monodon*) and king prawn (*Penaeus latisulcatus*). *Malaysian J of Medical Sciences.* 2012. 18(3):27-32.
31. Shanti KN, Martin BM, Nagpal S, Metcalfe DD and Rao PV. Identification of tropomyosin as the major shrimp allergen and characterization of its IgE-binding epitopes. *J of Immunol.* 1993. 151:5354–63.
32. Daul CB, Slattery M, Reese G, Lehrer SB. Identification of the major brown shrimp (*Penaeus aztecus*) allergen as the muscle protein tropomyosin. *Int Arch Allergy Immunol.* 1994. 105:49–55.
33. Lopata A, Lehrer S. Seafood allergen overview: Focus on crustacea. In: Chemical and biological properties of food allergens. Netherlands: CRC Press; 2010.
34. [EDQM] European Directorate for the Quality of Medicine. Monograph allergen product producta allergenica 01/2010:1063. European Pharmacopoeia. 7th Ed. Strasbourg: EDQM; 2010. 671-3.
35. [EMA] European Medicine Agency. The guideline on allergen products: Production and quality issues (EMA/CHMP)BWP/304831/2007). EMA; 2007.