

POTENSI EKSTRAK PROTEIN *Candida albicans* SEBAGAI BIORESEPTOR PADA IMUNOSENSOR UNTUK DIAGNOSA KANDIDIASIS

Masfufatun¹, Akhmad Sudibya², Nur Kumala I¹

¹Bagian Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Wijaya Kusuma Surabaya

²Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Wijaya Kusuma Surabaya

¹Email : masfufah_habibah@yahoo.com; qulubuna@yahoo.com

²Email : A_Sudibya@yahoo.com

Abstrak

Selama ini diagnosa kandidiasis masih terbatas pada kultur darah standar. Metode konvensional dengan kultur mikrobiologi ini kurang sensitif, beberapa pasien kandidiasis mempunyai kultur darah negatif dan memerlukan waktu yang lama. Hal ini mendorong beberapa peneliti mencari metode alternatif diagnosa lainnya.

Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan potensi ekstrak protein *Candida albicans* sebagai bioreseptor pada immunosensor untuk mendeteksi *Candida albicans* dan biofilmnya dalam darah pasien kandidiasis.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode deskriptif dengan tahapan sebagai berikut: (1) isolasi enzim dari cairan pencernaan bekicot; (2) ekstraksi protein *Candida albicans* melalui metode enzimatik dan mekanik dan (3) analisis ekstrak protein sebagai bioreseptor melalui *immunodot assay*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa enzim bekicot memiliki kadar protein 1,35 mg/ml dan aktifitas spesifik 1,96 Unit/mg. Enzim ini mampu menghidrolisis dinding sel *C. albicans* dan dengan bantuan sonikasi menghasilkan ekstrak protein ekstrasel planktonik (PEP) dan biofilm (PEB), ekstrak protein intrasel planktonik (PIP) dan biofilm (PIB), dengan kadar protein masing-masing 1,44; 1,29; 1,29 dan 1,21 mg/ml. Ekstrak protein PIB bersifat antigenik terhadap *antibody anti-Candida* (kontrol positif) dengan memberikan spot berwarna merah pada *immunodot assay*. *Immunodot assay* dapat membedakan serum kontrol negatif (orang sehat) dan kontrol positif dengan menggunakan antigen 1 ng/nl dan 50 nl serum.

Kata Kunci : *Candida albicans*, kandidiasis, biofilm, pemeriksaan *immunodot*

THE POTENCY OF Candida albicans PROTEIN EXTRACT AS BIORESEPTOR ON IMMUNOCENCOR TO DIAGNOSE CANDIDIASIS

Abstract

So far, diagnosing on candidiasis has still been limited in standard blood culture. The traditional method of this microbiology culture is less sensitive, many patients with

candidiasis infection have negative blood culture, and need a long time. This case encourage many researchers to use another alternative methode to diagnose.

The purpose of this research is to examine the potency of *Candida albicans* protein extract as bioreseptor on immunocencor to detect *Candida albicans* and its biofilm in the blood of candidiasis patients.

The research method which is used is descriptive with the following steps : (1) isolating enzim from the liquid of digestive gland of snail (*Achatina fulica*); (2) extraction of protein candida albicans through enzimatis and mechanic methods and (3) Analyzing the protein extract as bioreseptor through immunodot assay.

The research result shows that the snail enzyme has the protein content 1.35 mg/ml and the specific activity 1.96 unit/mg. This snail enzyme can hydrolyze the cell wall of *Candidia albicans* and, with the help oh sonication, produce extract of planktonic extracel protein (PEP) and biofilm (PEB), extract of planktonic intracell protein (PIP), and biofilm (PIB), with each protein content 1.44; 1.29; 1.29 and 1.21 mg/ml. The characeristic of biofilm intracell protein (PIB) is antigenic on antibody anti-candida (positive control) with giving red spot on immunodot assay. Immunodot assay can distinguish negative control serum (health man) and positive Candidiasis control by using antigen 1 ng/nl and 50nl serum.

Keywords: *Candida albicans*, candidiasis, biofilm, immunodot assay

PENDAHULUAN

Candida spp dikenal sebagai fungi dimorfik yang secara normal ada pada saluran pencernaan, saluran pernafasan bagian atas dan mukosa genital pada mamalia¹. Populasi *Candida spp* yang meningkat (*over growth*) dapat menimbulkan masalah. Beberapa spesies *Candida* yang dikenal banyak menimbulkan penyakit baik pada manusia maupun hewan adalah *Candida albicans*. Penyakit yang timbul akibat infeksi *C. albicans* dikenal dengan istilah kandidiasis.

Kandidiasis diklasifikasikan menjadi kandidiasis superfisial (kandidiasis) dan kandidiasis sistemik (kandidemia). Kandidiasis superfisial adalah infeksi *Candida* pada permukaan

epidermal dan mukosa, misal pada rongga mulut, *pharynx*, *oesophagus*, intestin, *urinary bladder*, dan vagina. Di Amerika 75% wanita pada masa reproduksi pernah mengalami vulvovaginitis candidiasis. Antara 40-50% dari angka tersebut mengalami infeksi berulang dan 5-8% nya terkena infeksi candida kronis², sedangkan kandidemia merupakan kondisi diseminasi dari infeksi oleh *Candida*. Kandidemia biasanya diderita oleh penderita HIV, atau setelah menjalani perawatan medis yang menjadi pasien rumah sakit, terutama yang menjalani transplantasi organ. Di London, 40,5% terkena infeksi jamur pasca transplantasi hati dan 90% dari angka tersebut disebabkan oleh infeksi *Candida*

spp dan 66% oleh *Candida albicans*³. Di Jerman angka kematian akibat *necrosectomy* diikuti oleh infeksi jamur termasuk *Candida* mencapai 62%⁴.

Infeksi yang disebabkan oleh kandidiasis telah menambah masalah *therapeutical* di beberapa tahun terakhir. Deteksi terhadap kandidiasis sangat sulit dilakukan. Diagnosis laboratorium dan pengobatan terhadap penyakit ini belum memberikan hasil yang memuaskan⁵. Selama ini diagnosa kandidiasis masih terbatas pada kultur darah standar. Metode tradisional kultur mikrobiologi ini kurang sensitif, banyak pasien dengan infeksi *Candida* menunjukkan hasil kultur darah yang negatif dan membutuhkan waktu beberapa hari (1-3). Hal ini mendorong para peneliti untuk menghasilkan metode alternatif dalam mendiagnosis, seperti diagnosis serologi melalui deteksi antigen/antibodi.

Di dalam tubuh, sebagai respon terhadap adanya protein antigenik *C. albicans*, maka sistem imun tubuh akan memproduksi antibodi sebagai bentuk pertahanan terhadap keberadaan *C. albicans*. Keberadaan biofilm *C. albicans* tersebut di dalam saluran pencernaan inang akan memicu terbentuknya antibodi yang spesifik terhadap biofilm tersebut. Bentuk biofilm

dapat menyebabkan invasi, menembus sel epitel pada dinding usus. Pada penderita dengan sistem imun yang normal (*immunocompetent*) sel *C. albicans* akan dihadang oleh antibodi sehingga tidak dapat menyebar ke dalam darah. Antibodi adalah molekul protein yang dihasilkan oleh sel plasma sebagai akibat interaksi antara limfosit B yang peka antigen. Antibodi memiliki kemampuan berikatan secara khusus dengan antigen serta mempercepat penghancuran dan eliminasi sel asing. Antibodi dapat membedakan antara berbagai determinan antigen (epitop), walaupun hanya memiliki sedikit perbedaan dalam konfigurasi structural⁶.

Na dan Song (1999) melaporkan bahwa respon antibodi Sap (*secreted aspartyl proteinase*) terhadap *C. albicans* mampu dideteksi menggunakan metode ELISA (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*). Metode ELISA ini memiliki sensitivitas dan spesifitas masing-masing 70% dan 76%⁷. Selain antibodi, diagnosis invasi *Candida albicans* juga bisa dilakukan melalui deteksi antigen. Oliveri (2008) melakukan penelitian dengan menggunakan Platelia *Candida* ELISA untuk mendiagnosis invasi kandidiasis pada pasien bayi prematur. Deteksi antigen *Mannan Candida* (CM) telah menunjukkan

sensitivitas dan spesifitas lebih tinggi, yakni masing-masing 94,4% dan 94,2%⁸.

Salah satu format pemeriksaan deteksi antigen/antibodi yang baru adalah dengan imunokromatografi, yang merupakan sebuah biosensor⁹. Biosensor yang menggunakan antigen atau antibodi sebagai bioreseptor dikenal dengan imunosensor¹⁰.

Gold Immunochromatographic Assay (GICA) merupakan teknik imunokromatografi baru yang menggunakan membran nitroselulosa sebagai pembawa dan koloid emas berlabel antigen/antibodi sebagai tracer. Teknologi ini mempunyai banyak keuntungan dibandingkan dengan *Immunoassay* yang lain, yaitu prosedur yang sederhana, hasil cepat, harga murah, tidak membutuhkan teknisi dengan kemampuan khusus atau peralatan mahal dan dapat digunakan untuk mendeteksi antigen atau antibodi. Metode ini telah banyak digunakan untuk diagnosis beberapa penyakit dan mendeteksi molekul bioaktif, hormon, dan haptens¹¹.

Di Indonesia telah dikembangkan tes imunokromatografi untuk identifikasi berbagai macam antigen atau antibodi, diantaranya untuk identifikasi antibodi *Helicobacter pylori* di unit Biomedika Rumah Sakit Umum Daerah Mataram, Identifikasi *Plasmodium falciparum vivax*

di *Institute of Tropical Disease* (ITD) Universitas Airlangga. Pada tahun 2010, Dewi mengaplikasikan imunosensor untuk mendeteksi IgG terhadap *Toxoplasma gondii* dengan metode GICA menggunakan ekstrak ESA sebagai bioreseptor¹². Di Indonesia belum ada penelitian pengembangan uji imunokromatografi untuk identifikasi *C. albicans* dan biofilmnya. Metode uji yang ada selama ini kurang memuaskan karena pelaksanaannya sulit, karena membutuhkan peralatan yang mahal, analisis yang berpengalaman dan biayanya juga mahal. Oleh karena itu pada penelitian ini perlu dilakukan uji potensi ekstrak protein sebagai bioreseptor pada imunosensor melalui *immunodot assay* sebagai uji pendahuluan sebelum diaplikasikan dalam imunosensor dengan metode GICA (*Gold Immunochromatographic Assay*).

Tujuan penelitian adalah menguji kemampuan enzim bekicot (*Achatina fulica*) dalam melisis dinding sel *Candida albicans* untuk menghasilkan ekstrak protein baik ekstrasel maupun intrasel dan membuktikan potensi ekstrak protein *Candida albicans* sebagai bioreseptor pada imunosensor untuk mendeteksi *Candida albicans* dalam darah pasien kandidiasis.

BAHAN DAN METODA

Bahan Penelitian

Bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini diantaranya adalah bacto agar (Difco), dektrosa (Difco), pepton (Oxoid), *yeast extract* (Merck), NaCl (Merk), NaHCO₃ (Merck), Na₂HPO₄·7H₂O (Merck), NaH₂PO₄ (Merck), spiritus, aquades, L-Manitol (sigma), glukosa, reagen *Lowry*, reagen *DNS*.

Pembuatan Pellet sel *Candida albicans*

Pembuatan pellet sel planktonik Candida albicans

Setelah dikocok (*shaker*) 24 jam, 100 ml inokulum *C. albicans* dalam media cair YPD (*Yeast Peptone Dextrose*) disentrifus pada 10.000 rpm dan suhu kamar selama 15 menit. Pellet yang diperoleh dicuci dengan 0,1 M buffer fosfat salin (PBS) steril. Proses pencucian ini dilakukan dua kali. Endapan sel *C. albicans* yang diperoleh disebut sebagai pellet sel planktonik.

Pembuatan pellet biofilm Candida albicans

Pembuatan biofilm dilakukan sesuai dengan metode Samaranayake, *et al* (2005) dan Merrit, *et al* (2005) yang telah dimodifikasi¹³. Biofilm *C. albicans* ditumbuhkan pada membran filter selulosa

nitrat yang berdiameter 25 mm dengan ukuran pori 0,22 µm dengan media spider.

Membran selulosa yang sudah disterilkan diletakkan diatas media biofilm dengan menggunakan pinset steril. Selanjutnya 50 µl inokulum *C. albicans* dengan *Optical Density* (OD) 0,5 pada λ 469 nm diteteskan pada membran filter selulosa nitrat yang diletakkan diatas permukaan media spider dalam cawan petri dan diinkubasi pada 37⁰C selama 1 jam. Cawan petri selanjutnya dibalik dan inkubasi dilanjutkan selama 24 jam.

Biofilm yang terbentuk dipisahkan dari membran untuk diresuspensi dengan larutan PBS steril. Suspensi disentrifus pada kecepatan 1000 rpm selama 15 menit. Residu hasil sentrifus ini disebut pelet biofilm sel *Candida albicans* yang selanjutnya disimpan dalam kulkas untuk penelitian selanjutnya.

Isolasi Enzim dari bekicot

(Achatina fulica)

Panen enzim dari Achatina fulica

Bekicot, *Achatina fulica* yang telah dikarantina selama lebih dari 3 hari, maka akan siap untuk dipanen. Pengambilan cairan *digestive gland* dilakukan dengan cara aseptis. *Achatina fulica* dipotong bagian sutura, dan cairan yang didapat ditampung dalam *beaker glass* yang telah

direndam dengan es dengan suhu 2 – 5 °C. Cairan yang didapat kemudian disentrifus dengan kecepatan 4000 rpm selama 5-10 menit dengan suhu 2 – 5 °C. Setelah disentrifus didapat endapan dan supernatan terpisah. Supernatan tersebut merupakan ekstrak kasar enzim yang telah terpisah dari kotoran dan selanjutnya di uji aktivitas ¹⁴.

Penentuan aktivitas enzim *Achatina fulica*

Aktivitas enzim β -1,3-glukanase ditentukan dengan cara mengukur banyaknya gula pereduksi yang dihasilkan dari hidrolisis substrat laminarin (SIGMA). Sebanyak 750 μ l substrat laminarin 1% ditambah dengan 75 μ l enzim sampel (3%) kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Hasil inkubasi ditambah 450 μ l pereaksi DNS (3,5-dinitrosalisilic acid) kemudian dimasukkan dalam penangas air mendidih dan dipanaskan selama 15 menit. Setelah itu segera didinginkan dalam air es selama 20 menit. Aktivitas enzim diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 550 nm. Absorbansi yang diperoleh diplotkan pada persamaan regresi linier dari kurva standar larutan glukosa.

Penentuan kadar protein

Pengukuran kadar protein dari enzim bekicot dilakukan dengan menggunakan metode *Lowry*, dengan membuat 4 larutan

yaitu larutan A, B, C dan D terlebih dahulu. Selanjutnya mencampurkan 0,5 ml sampel enzim dan 2,5 ml larutan C. Pencampuran kedua larutan tersebut divortex selama 5-10 menit. Selanjutnya ditambah dengan 0,25 ml larutan D, setelah itu diinkubasi selama 20 menit, kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 750nm. Absorbansi yang diperoleh diplotkan pada persamaan regresi liner yang diperoleh dari kurva standar larutan standar protein BSA.

Ekstraksi Protein planktonik dan biofilm *C. albicans* secara enzimatis dan mekanik

Ekstraksi protein planktonik *C. albicans*

Ekstraksi protein dilakukan dengan menggunakan metode Casanova, yang dimodifikasi ¹⁵. Pelet sel hasil sentrifugasi inokulum *C. albicans* diresuspensi dengan KCl 0,6M dan disentrifuge pada kecepatan 1000 rpm selama 15 menit. Pelet yang dihasilkan diresuspensi dengan buffer posfat pH 7 dan ditambah dengan enzim *Achatina fulica*. Campuran diagitasi pelan pada suhu 28°C selama beberapa jam. Selanjutnya campuran disentrifuge dingin pada kecepatan 2600 rpm selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh disentrifuge ulang pada kecepatan 20000 rpm selama 30 menit. Supernatan yang dihasilkan merupakan ekstrak protein ekstrak

Planktonik (PEP) dan diuji kadar proteinnya. Pelet hasil sentrifus I dan II digabung diresuspensi dengan buffer posfat, selanjutnya disonikasi selama 10 menit (10 x 60 detik) pada suhu dingin. Suspensi hasil sonikasi disentrifus selama 30 menit dengan kecepatan 17.500 rpm. Supernatan yang dihasilkan disebut ekstrak protein intrasel planktonik (PIP) dan selanjutnya diuji kadar proteinnya. Baik PEP maupun PIP dipekatkan melalui liofilisasi dengan *freeze dryer* dan disimpan pada suhu -20°C untuk diuji sebagai bioreseptor pada *immunodot assay*.

Ekstraksi protein Biofilm C. albicans

Pelet sel hasil sentrifugasi suspensi biofilm *C. albicans* diresuspensi dengan 10 ml KCl 0,6M dingin dan disentrifuse pada kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit. Pelet yang dihasilkan diresuspensi dengan buffer posfat pH 7 dan ditambah dengan enzim *Achatina fulica*. Campuran diagitasi pelan pada suhu 28°C selama beberapa jam. Selanjutnya campuran disentrifus dingin pada kecepatan 2600 rpm selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh disentrifus ulang pada kecepatan 20000 rpm selama 30 menit. Supernatan yang dihasilkan merupakan ekstrak protein ekstrak Biofilm (PEB) dan diuji kadar proteinnya. Pelet hasil sentrifuse I dan II digabung

diresuspensi dengan buffer posfat, selanjutnya disonikasi selama 10 menit (10 x 60 detik) pada suhu dingin. Suspensi hasil sonikasi disentrifuge selama 30 menit dengan kecepatan 17.500 rpm. Supernatan yang dihasilkan disebut ekstrak protein intrasel Biofilm (PIB) dan selanjutnya diuji kadar proteinnya. Baik PEB maupun PIB dipekatkan melalui liofilisasi dengan *freeze dryer* dan disimpan pada suhu -20°C untuk uji selanjutnya sehingga dapat digunakan sebagai bioreseptor pada *immunodot assay*.

Persiapan/Preparasi Sampel Serum

Darah Pasien yang Terinfeksi *C. albicans*

Pasien yang menderita kandidiasis (pasien Diabetes Militus, atau ODHA) diambil sampel darahnya. Darah yang diperoleh dialirkan ke lereng media miring SDA secara aseptis dan sisanya ditampung dalam tabung *Vacutiner*. Darah yang melapisi permukaan SDA dibiarkan sampai tumbuh jamur dan selanjutnya dikultur. Sedangkan darah dalam *vacutiner* disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm, pada suhu 4°C selama 15 menit untuk mendapatkan serum dan disimpan pada suhu -20°C untuk dilakukan penelitian lebih lanjut sebagai antibodi anticandida pada *disptik Immunodot*. Sebagai kontrol negatif digunakan darah orang sehat (normal)

Immunodot Assay

Optimasi penempelan antigen

Larutan antigen diencerkan menggunakan buffer carbonat pH 9,6 sehingga diperoleh serial kadar protein 1,0; 1,5; 2,0 2,5; dan 3,0 ng/ul. Sebanyak 3 ul antigen diteteskan pada permukaan plastik polystirene menggunakan mikropipet yang akan membentuk spot tidak berwarna. Setelah dikering anginkan, antigen difiksasi dengan merendamnya dalam methanol selama 5 menit dan dikeringkan kembali. Stabilisasi bagian antigen ditutup dengan cara mencelup ke dalam larutan 10% sukrosa, dikeringkan anginkan, kemudian disimpan pada 2°C hingga digunakan.

Optimasi volume serum

Optimalisasi volume serum menggunakan serum kontrol positif sebanyak 2 sampel

Uji anti-candida dengan distick imunodot

Sebanyak 50 ul serum dimasukkan ke dalam sumuran *mikroplate flat-bottomed* yang telah terisi 150 ul Tris-HCl pH 7,2. Kemudian dimasukkan ujung dipstick ke dalam sumuran dan diinkubasi pada suhu

kamar selama 30 menit. Setelah dicuci 3 x menggunakan buffer Tris-Cl, ujung dipstick dimasukkan ke dalam sumuran yang berisi 200 ul larutan koloid emas yang diikat Protein A dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu kamar. Dipstick kemudian dicuci 3 kali dan diamati adanya spot berwarna merah. Hasil dikatakan positif bila timbul spot warna merah penuh. Hasil dikatakan negatif bila tidak terbentuk spot berwarna merah atau spot yang tidak utuh membentuk lingkaran.

Teknik Pengumpulan dan Analisis Data

Pengumpulan data dalam penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode observasi/pengamatan spot yang terbentuk selama dilakukan eksperimen laboratorik melalui uji *distick imunodot*. Pengolahan data hasil pengamatan dilakukan secara deskriptif dan disajikan dalam bentuk tabel.

HASIL

Isolasi Enzim bekicot, *Achatina fulica*

Dari 15 ekor bekicot diperoleh cairan bening kebiruan sebanyak 60 ml (Gambar 1). Ekstrak enzim ini memiliki kadar protein sebesar 1,35 mg/ml.



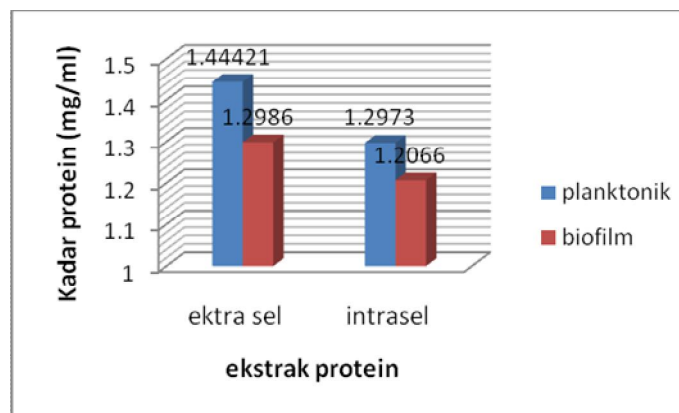
Gambar 1. Cairan *disgestive gland* bekicot

Hasil uji aktivitas glukonase menunjukkan bahwa ekstrak enzim bekicot pada penelitian ini memiliki aktivitas sebesar 2,649 unit/ml dan aktivitas spesifik sebesar 1,958 unit/mg. Unit aktivitas enzim diartikan Definisi 1U (unit) aktivitas adalah jumlah enzim β -1,3-glukanase dalam 1 ml ekstrak β -1,3-glukanase yang membebaskan 1 μ mol gula pereduksi yang

dihitung sebagai glukosa permenit permili pada kondisi percobaan.

Ekstraksi protein *C. albicans* secara enzimatis dan mekanik

Kadar protein PEP (protein ekstrasel planktonik), PEB (protein ekstrak Biofilm), PIB (protein Intraseluler biofilm), PIP (Protein Intraseluler Planktonik) ditentukan dengan menggunakan metode Lowry.



Gambar 2. Kadar protein hasil lisis matrik biofilm dan dinding sel *C. albicans*

Immunodot Assay

Tabel 1. Hasil optimasi konsentrasi antigen

Jumlah Ag ditempel ng/uL	Sampel kontrol C+ (100 uL)	Spot warna merah	Hasil
2,5	C+	Ada	+
2,0	C+	Ada	+
1,5	C+	Ada	+
1,0	C+	Ada	+
0,5	C+	Tidak ada	-

Tabel 2. Hasil Optimasi Volume Serum

No serum	Volume/Pengenceran Serum Kontrol positif	Bentuk Spot	Hasil
P ₅	50	Ada	+
	100	Ada	+
	150	Ada	+
	200	Ada	+
D ₁	50	Ada	+
	100	Ada	+
	150	Ada	+
	200	Ada	+
Blanko (0,8% NaCl)	50	Tidak ada	-
	100	Tidak ada	-
	150	Tidak ada	-
	200	Ada, tidak utuh	-

Tabel 3. Hasil Uji Anti-*Candida* dengan *distick imunodot*

No. sampel	Kode	Spot warna merah	Hasil	Keterangan klinis
1	P1	Ada	Pos(+)	ODHA
2	P2	Ada	Pos(+)	ODHA
3	P3	Ada	Pos(+)	ODHA
4	H1	Ada tapi tidak utuh	Neg(-)	Sehat
5	H2	Tidak ada	Neg (-)	Sehat
6	H3	Tidak ada	Neg(-)	Sehat

HASIL PEMBAHASAN

Isolasi Enzim bekicot, Achatina fulica

Menurut Weel, 1961 Enzim siput mengandung enzim β -1,3-glukanase, β -1,4-glukanase, β -1,4-glukanhidrolase, enzim kitinase, xilase, selulase, lichenase, inulase, hemiselulase, amilase, maltase, dan sukrase. Berhubung komponen utama dinding sel *Candida albicans* adalah glukana maka pada ekstrak enzim *Achatina fulica* ini diuji aktivitas glukana dengan menggunakan substrat laminarin (1,3- β -glukan). Uji aktivitas enzim β -1,3-glukanase diukur dari kadar gula reduksi hasil reaksi antara enzim dengan substrat. Gula pereduksi berhubungan erat dengan aktivitas enzim, semakin tinggi aktivitas enzim maka semakin tinggi pula gula pereduksi yang dihasilkan. Gula reduksi merupakan golongan gula (karbohidrat) yang memiliki kemampuan untuk mereduksi dikarenakan adanya gugus aldehid atau keto bebas.

Ekstraksi protein *C. albicans* secara enzimatis dan mekanik

Ekstrak protein *C. albicans* diperoleh melalui lisis matrik biofilm dan dinding sel *C. albicans* dengan menggunakan enzim *Achatina fulica* dan disempurnakan dengan cara sonikasi. Proses lisis enzimatis dengan enzim *Achatina fulica* berlangsung lebih lama

sekitar 20 jam dibandingkan dengan enzim *zymolease*, yang hanya berlangsung 2 jam¹⁵. Hal ini disebabkan enzim *zymoliase* memiliki aktivitas jauh lebih tinggi dibandingkan ekstrak enzim *Achatina fulica*.

Penelitian ini mengasilkan empat jenis ekstrak protein yaitu ekstrak protein PEP (protein ekstrasel planktonik), PEB (protein ekstrasel biofilm), PIP (proteirin ekstrasel planktonik), dan PIB (protein ekstrasel biofilm). Ekstrak protein PEP dan PEB memiliki kadar protein lebih tinggi dari pada PIP maupun PIB. Hal ini disebabkan pada proses sentrifugasi, enzim *Achatina fulica* ikut larut bercampur dengan ekstrak protein ekstrasel.

Immunodot Assay

Pada uji anti-*Candida* dipstick imunodot dilakukan optimasi pemilihan dan konsentrasi antigen dari ekstrak protein yang diperoleh dari penelitian ini. Pada optimasi penempelan antigen pada kertas polistyrena menunjukkan bahwa ekstrak protein PIP, PEP maupun PEB memberikan spot warna coklat kekuningan pada kertas polistyrena sedangkan ekstrak proteirin PIB tidak memberikan spot. Munculnya spot warna coklat dikhawatirkan dapat mengganggu warna spot yang ditimbulkan oleh *signal reagent* pada uji imunodot assay. Oleh karena itu ekstak protein yang dipilih sebagai antigen

pada uji anti-*Candida* dipstick imunodot adalah ekstrak protein PIB dan selanjutnya dilakukan optimasi konsentrasi antigen.

Berdasarkan hasil optimasi konsentrasi antigen, ekstrak protein PIB memberikan respon berupa spot merah terhadap serum pasien kandidiasis yang positif kultur sampai pada konsentrasi 1,0 µg/µl. Pada konsentrasi terkecil 0,5µg/µl tidak memberikan respon, dengan demikian konsentrasi antigen yang dipakai dalam penelitian ini adalah 1,0 µg/µl dengan volume serum 50ul atau pengenceran ¼.

Uji pendahuluan diagnosa kandidiasis dengan menggunakan *dipstick imunodot* telah berhasil dilakukan dengan menggunakan beberapa serum pasien ODHA (Orang dengan HIV-Aids) dan orang sehat. Pada penelitian ini, antigen direndam bersama serum pasien dalam sebuah sumuran dengan tujuan terjadi ikatan antigen-antibodi yang selanjutnya direaksikan dengan *signal reagent* (protein A yang dilabel dengan koloid emas). Protein A menyerupai antibodi sekunder dengan mengikat Fc antibodi primer sehingga pada uji diagnosa dengan *immunodot assay* ini tidak perlu menggunakan antibodi sekunder. Protein A berikatan dengan IgG yang berasal mamalia. Antigen berikatan dengan antibodi anti-*Candida* yang terdapat dalam

serum pasien membentuk kompleks dengan protein A sehingga memberikan signal berupa spot merah. Spot merah yang muncul menunjukkan bahwa serum pasien terinfeksi *Candida albicans*. Ekstrak protein PIB bisa diaplikasikan sebagai bioreseptor pada imunosensor GICA (*Gold Immunocromatography Assay*) pada penelitian selanjutnya. Keakuratan dan sensitivitas uji dipstick imunodot ini belum dilakukan pada penelitian ini, sehingga perlu juga dilakukan penelitian lanjutan dengan membandingkannya pada metode serologi lain seperti ELISA.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan bahwa

1. Ekstrak enzim bekicot, *Achatina fulica* memiliki potensi untuk melisis matriks biofilm maupun dinding sel *Candida albicans*
2. Ekstrak protein intrasel biofilm (PIB) memiliki potensi sebagai bioreseptor pada imunosensor
3. Pemeriksaan anti-*Candida* dengan uji *dipstick* immunedot dilakukan pada konsentrasi antigen 1,0µg/µL dengan volume serum 50 µL

SARAN

Berdasarkan hasil penelitian ini maka disarankan :

1. Mengaplikasikan ekstrak protein PIB sebagai bioreseptor pada imunosensor GICA (*Gold Immunocromatography Assay*) pada penelitian selanjutnya.
2. Menguji keakuratan dan sensitivitas uji *dipstick imunodot* membandingkannya dengan metode serologi lain seperti ELISA.
3. Mengidentifikasi profil protein antigenik spesifik biofilm *Candida albicans* sehingga bisa dijadikan sebagai kandidat biomarker kandidiasis

UCAPAN TERIMAKASIH

Kami ucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada Dijen DIKTI yang telah memberikan dana pada hibah penelitian pemula ini

DAFTAR PUSTAKA

1. Brown, M.R., C.A. Thomson, and F.M. Mohamed. Systemic candidiasis in an apparently immunocompetent dog. *J Vet Diagn Invest.* 2005. 17(3) : 272-276.
2. Wilson, C. Recurrent vulvovaginitis candidiasis; an overview of traditional and alternative therapies. *Adv Nurse Pract.* 2005. 13(5) : 24-29.
3. Verma, A., J.J. Wade, P. Cheeseman, B. Samaroo, M. Rela, N.D. Heaton, G. Mielivergani, and A. Dhawan. Risk factor for fungal infection in pediatric liver transplant recipient. *Pediatr transplant.* 2005. 9(2) : 220-225.
4. Ellepola, A.N. and C.J. Morrison. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *J Microbiol.* 2005. 43 : 65-84.
5. Baratawidjaja, K.G. *Imunologi Dasar.* Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. 2014. Edisi 11.
6. Na, B.K. and C.Y. Song. Use of monoclonal antibody in diagnosis of candidiasis caused by *Candida albicans*; detection of circulating aspartyl proteinase antigen. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1999. 6 : 924-929 .
7. Oliver, S. L. Trovato, P. Betta, M.G. Romeo, G. Nicoletti. Experience with the platelia candida ELISA for the diagnosis of invasive candidiasis in neonatal patients. *Clin. Microbiol. Infect.* 2008. 14 : 391-393.
8. Sacher dan Pherson. *Tinjauan Klinis Hasil Pemeriksaan Laboratorium.* Edisi 11. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta. 2004.
9. Parkison, G. and B. Pejcic. Using Biosensors to detect emerging infectious diseases. *Nanochemistry Research Institute, Perth, Western Australia.* 2005.

10. Peng, D.P., S.S. Hu, Y. Hua, Y.C. Xiao, Z.L. Li, X.L. Wang and D.R. Bi. Comparison of new gold-immunochromatographic assay for the detection of antibodies against avian influenza virus with hemagglutination inhibition and agar gel immunodiffusion assays. *Veter Immunol Immunop.* 2007. 17 : 17-25.
11. Dewi, L.S.K. Imunosensor untuk Mendeteksi Immunoglobulin G terhadap *Toxoplasma gondii* dengan Metode GICA menggunakan Ekstrak ESA sebagai Bioreseptor. Tesis. departemen Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Unair. 2010.
12. Samaranayake, LP, W.K. Leung, and L. Jin. Oral mucosal fungal infections. *Periodontol* 2000. 2009. 49 : L39-59.
13. Kholifah, Ayu. Pemurnian Parsial, Uji Aktivitas dan Stabilitas Enzim Kitinase dan β -glukanase. *Skripsi*. Departemen Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Unair. 2013.
14. Casanova, M. and W. Lajeun Chaffin, Cell wall glycoproteins of *Candida albicans* as released by different methods. *Journal of general Microbiology*. 1990. 137 : 1045-1051.
15. Wheel, B.P. Van. The Comparative Physiologi of Digestion in Molluscs, *AM. Zoologis*, Department of Zoology and Entomology, University of Hawaii, USA. 1961.

Reviewer

Dr. Dorta Simamora, dra., M.Si