

POTENSI ALERGI AKIBAT INFEKSI *Anisakis typica* PADA DAGING IKAN CAKALANG

[Allergic Potential of Skipjack Flesh Infected by *Anisakis typica*]

Lady Cindy Soewarlan

Fakultas Kelautan dan Perikanan, Universitas Nusa Cendana, Kupang

Diterima 28 Juni 2016 / Disetujui 15 Desember 2016

ABSTRACT

Anisakis larvae are zoonotic parasites that can cause allergy in human consuming infected raw fish. This research aims to identify the allergenic potential of skipjack flesh infected by *Anisakis typica* larvae stage 3 (L3). Identification was done through antigen detection in protein profile of the fillet. Samples from the white part of the skipjack flesh of both infected and non-infected flesh, as well as L3 *A. typica* were analysed using SDS PAGE. Furthermore, the molecular weights from the analysis were compared to the literature references of protein profile. The result showed that both samples have 8 similar bands of protein, but 4 bands were found only from the infected fish. The four bands of 212, 66, 59 and 44 kDa were antigens of L3 *A. typica*. The presence of antigen from L3 *A. typica* in the infected flesh may induce allergy when the fish is consumed.

Keywords: allergic, *A. typica*, fish flesh, infection

ABSTRAK

Larva anisakid (*A. typica*) merupakan parasit zoonoses yang dapat menyebabkan alergi akibat mengonsumsi ikan mentah yang terinfeksi. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi potensi alergi pada daging ikan cakalang yang terinfeksi larva *A. typica* stadia 3 (L3). Identifikasi dilakukan melalui deteksi antigen pada profil protein daging ikan. Sampel daging putih dari ikan yang terinfeksi dan tidak terinfeksi serta L3 *A. typica* dianalisis menggunakan SDS PAGE. Selanjutnya dilakukan studi literatur terhadap profil protein dari kedua sampel daging untuk mengetahui kehadiran alergen larva pada daging. Hasilnya, kedua sampel daging memiliki 8 pita protein yang sama kecuali 4 pita berbeda hanya ditemukan pada daging ikan yang terinfeksi. Empat pita tersebut adalah protein 212, 66, 59 dan 44 kDa yang merupakan antigen dari L3 *A. typica*. Keberadaan antigen dari L3 *A. typica* pada daging ikan berpotensi menyebabkan alergi jika ikan dikonsumsi.

Kata kunci: alergi, *A. typica*, daging ikan, infeksi

PENDAHULUAN

Anisakis didefinisikan secara luas merupakan ascaradoids dengan ikan, reptil, burung yang memakan ikan dan mamalia sebagai inang definitif di perairan, transmisi tergantung pada air, biasanya melibatkan invertebrata air dan ikan lainnya sebagai inang perantara. Cacing dewasa menetap di perut host mamalia laut, terutama ikan paus dan lumba-lumba. Telur dari cacing betina menetas dan dikeluarkan bersama tinja dalam bentuk embrio ke perairan laut. Setelah menetas dari telur, larva

memasuki perairan laut. Selanjutnya dikonsumsi oleh invertebrata seperti: krustase dari keluarga Euphausiidae dan berkembang pada tahap ke tiga (Cheah dan Lymbrey, 2007) dan melalui rantai makanan berpindah pada ikan-ikan karnivora. Selain hewan, manusia tanpa sengaja menjadi inang (*incidental/accidental host*) dari nematode parasit yang tidak dapat melengkap siklus hidupnya pada manusia tetapi dapat secara langsung menyebabkan penyakit yang melemahkan kesehatan atau memulai *immune hypersensitivity* (Moreno *et al.*, 2011), yang dikenal dengan penyakit anisakiasis. Transmisi ke manusia terjadi ketika tanpa sengaja mengonsumsi ikan mentah atau setengah masak yang terinfeksi.

Howgate dan dos Santos. (2011) menjelaskan lebih dari 500 kasus Anisakiasis telah dilaporkan dari beberapa negara. Beberapa parasit sangat

Naskah telah dipresentasi pada: Seminar Nasional Perikanan dan Kelautan V. 4-6 Mei 2015. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya. Malang.

*Penulis Korespondensi:

Email: cindysoewarlan@staf.undana.ac.id

patogen dan menyebabkan infeksi pada manusia karena mengonsumsi produk mentah atau yang setengah matang (*undercook*). Meningkatnya konsumsi ikan mentah di beberapa negara seperti *sushi* dan *sashimi* merupakan salah satu faktor penyebabnya. Lymbery dan Waters. (2014) menjelaskan anisakiasis terjadi di seluruh dunia dengan fokus di Asia Utara dan Eropa Barat. Lebih dari 90% kasus dilaporkan dari Jepang dan sebagian dari Belanda, Prancis dan Spanyol. Kasus anisakiasis juga dilaporkan dari beberapa negara lainnya termasuk Amerika Serikat, Meksiko, Kanada, Inggris, Belgia, Mesir, Korea, Philipina, Chili Australia dan New Zealand.

Kasus anisakiasis akibat mengonsumsi ikan mentah atau kurang masak (*sushi/sashimi*) di Sidoarjo Jawa Timur pertama kali dilaporkan oleh Uga *et al.* (1996), ini merupakan kasus pertama di Indonesia. Sampai saat penulisan artikel ini, penulis belum menemukan laporan kasus anisakiasis di Indonesia. Meskipun baru 1 kasus, tetapi ada kemungkinan kelompok risiko berkembang karena perubahan kebiasaan makan khususnya makanan mentah pada kalangan menengah ke atas. Selain itu di beberapa Wilayah Indonesia Bagian Timur dan Tengah masyarakatnya memiliki kebiasaan konsumsi ikan mentah. Wiwanitkit dan Wiwanitkit (2016) dalam review terhadap perkembangan anisakiasis menjelaskan bahwa anisakiasis akan menjadi fokus baru bagi kedokteran pada wilayah perairan tropis.

Beberapa peneliti menemukan infeksi larva nematoda pada ikan-ikan konsumsi dari perairan Indonesia, umumnya teridentifikasi sebagai *Anisakis* sp. Sebaran geografis larva anisakid meliputi perairan Pantai Selatan Kulon Progo-Jogjakarta (Setyobudi *et al.*, 2011), Perairan Laut Bali (Palm *et al.*, 2008), Laut Sabu-Nusa Tenggara Timur (Soewarlan *et al.*, 2014) dan Perairan Sulawesi Selatan (Anshary *et al.*, 2011). Genus ini juga terdeteksi pada beberapa ikan yang didaratkan pada Tempat Pelelangan dan Tempat Pendaratan Ikan di Tarakan-Kalimantan Timur (Abdiani, 2010). *Anisaksis* sp. termasuk dalam famili Anisakidae yang bersifat *zoonoses* dan dapat menyebabkan Anisakiasis atau Anisakidosis (WHO, 2008). Dengan ditemukannya infeksi anisakis pada ikan-ikan konsumsi maka Anisakiasis berpotensi untuk berkembang di Indonesia.

Potensi utama bahaya oleh tertelannya larva nematoda *zoonoses* ada dua; pertama, tanpa sengaja melalui konsumsi ikan mentah atau setengah matang dapat menyebabkan infeksi lambung dan usus (Audicana dan Kennedy, 2008). Kedua, larva nematoda dalam keadaan matipun masih dapat menyebabkan reaksi alergi (Moneo *et al.*, 2007). Perkembangan penelitian tentang alergi dari nematoda famili Anisakidae difokuskan pada jenis *Anisakis simplex*. Sekitar 12 alergen teridentifikasi

dari *A simplex* Ani s 1 sampai Ani s 9 (Nieuwenhuizen *et al.*, 2009), Ani s 10 (Caballero *et al.*, 2011), Ani s 11 dan Ani s 12 (Nieuwenhuizen dan Lopata, 2013). Sementara itu, *Anisakis* sp. sendiri terdiri dari kurang lebih 9 spesies berbeda (D'Amelio, 2010). Informasi dari 8 spesies lainnya sangat minim dan biasanya digeneralisasi berdasarkan studi patogenitas dari infeksi *A simplex*. Sebab itu, penting juga mengetahui potensi alergi dari spesies lain.

Identifikasi molekuler menemukan bahwa *A. typica* merupakan spesies pertama family Anisakidae yang terdeteksi pada perairan Indonesia meliputi: Perairan Bali, Perairan Selat Makassar dan Perairan Laut Sawu (Soewarlan *et al.*, 2014). Dari aspek keamanan pangan, penting untuk mengetahui kemampuan patogenitas berkaitan dengan potensi alergi dari spesies ini. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi alergi dari L3 *A. typica* yang menginfeksi daging ikan cakalang. Ikan cakalang adalah ikan yang biasanya dikonsumsi mentah dan memiliki tingkat prevalensi tinggi terhadap infeksi L3 *A. typica* (Soewarlan *et al.*, 2014). Sebab itu dapat digunakan untuk mempelajari potensi alergi dari L3 *A. typica* ketika mengonsumsi daging ikan yang terinfeksi. Hasil penelitian ini akan memberikan informasi tentang potensi bahaya alergi oleh infeksi L3 *A. typica* pada produk perikanan.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan utama yang digunakan adalah protein dari: daging putih ikan yang tidak terinfeksi dan daging putih ikan yang terinfeksi, masing-masing 2 kali ulangan. Sampel daging diambil dari otot daging putih yang terletak di bagian bawah antara sirip dorsal pertama dan sirip dorsal kedua, pertimbangannya bagian ini yang biasanya dikonsumsi mentah. Sampel diperoleh dari hasil tangkapan nelayan pada perairan NTT dari *trip* penangkapan dari kapal penangkap yang sama serta perlakuan penanganan di atas kapal relatif sama. Jika *trip* penangkapan dan penanganan relatif sama, maka rata-rata setiap jenis ikan memasuki dan melewati fase rigor mortis diperkirakan adalah sama. Sesaat setelah ikan tertangkap, sekitar 15-20 ekor ikan dengan ukuran rata-rata sama dan skor organoleptik 9 disimpan dalam *coolbox* untuk diperiksa intensitas infeksinya. Setelah didaratkan, dilakukan pembedahan untuk memilih sampel ikan yang terinfeksi dan tidak terinfeksi. Daging ikan yang terinfeksi dan tidak terinfeksi selanjutnya disimpan dalam larutan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) (Serva, Germany) secara terpisah kemudian dibekukan pada suhu -20°C. Hal yang sama juga dilakukan terhadap sejumlah larva *A. typica*. Larva *A. typica* dikoleksi dari daging ikan

yang terinfeksi. Selanjutnya, untuk memastikan jenis larva maka dilakukan identifikasi morfologi dan molekuler. Analisis menggunakan SDS PAGE merujuk pada Aulanni'am. (2004), yang keseluruhan prosesnya meliputi: isolasi protein, elektroforesis dan penentuan berat molekul sampel.

Isolasi protein

Masing-masing sampel daging ikan ditimbang seberat 1 g dan cacing 0,5 g berat basah. Sampel digerus dalam keadaan dingin menggunakan mortar ditambahkan *Phosphate Buffer Saline-Tween Phenil Methil Sulfoid Fluoride* (PBS TPMSF) (Serva, Germany) ditambahkan juga pasir kuarsa. Hasil gerusan dimasukkan ke dalam tabung falkon (Falcon BD, Singapore) dan disonivikasi (Handy Sonic U-21P Tomy, Japan) 10 menit, dilakukan dalam keadaan dingin. Supernatant dipindahkan ke mikro-tube, ditambahkan etanol absolut (1:1). Sentrifuge (Tomy, Japan) pada 4°C selama 15 menit pada 6000 g. Inkubasi pada -20°C semalam. Setrifuge pada 10.000 g, suhu 4°C selama 10-15 menit. Supernatan dibuang dan pelet diangin-anginkan sampai bau etanol hilang. Tambahkan Tris HCl (Nacalai, Japan) 0,02 M, pH 6,8 dengan perbandingan 1:1. Selanjutnya dilakukan pengukuran konsentrasi isolat protein menggunakan nanophotometer (Implen P-Class, Germany). Data ini untuk menyamakan konsentrasi yang akan digunakan saat *running*. Konsentrasi terendah akan dipakai sebagai patokan.

Persiapan gel

Plat gel dibuat dengan merangkai dua plat kaca dengan jarak antara plat 1 mm. Dua lapis gel dibuat sebagai tempat pengumpulan sampel (*stacking gel*) dan media untuk pemisahan protein (*separating gel*) selanjutnya masukan campuran *separating gel*. *Separating gel* dibuat dengan mencampurkan *Lower Gel Buffer* (LGB), T-Acryl, akuades steril, *Ammonium Persulphate* (APS) (Sigma Aldrich, Singapore) dan *N,N,N',N'-Tetramethyl Ethylene Diamine* (TEMED) (Nacalai, Japan), gel pengumpul sampel (*stacking gel*) dibuat dengan cara mencampurkan *Upper Gel Bufer* (UGB), T-Acryl, akuades steril APS dan TEMED menggunakan mikropipet ke dalam plate (tempat lapisan gel) dan biarkan 10-30 menit hingga terbentuk gel.

Stacking gel selanjutnya dituang di atas *separating gel* sambil dipasang sisir hingga terbentuk gel berikut sumurannya dan diamkan selama 30 menit. Setelah gel terbentuk, sisir diangkat dengan hati-hati. Kemudian plate dipasang pada alat elektroforesis, selanjutnya buffer dituangkan pada bejana elektroforesis (Min-PROTEAN Electrophoresis System-Bio-Rad, USA).

Injeksi sampel

Sejumlah 10 µL sampel isolat protein ditambah 10 µL Tris-cl + 20 µL *Reducing Sample Buffer* (RSB) (Serva, Germany), dan dimasukkan ke dalam mikro-tube, kemudian dipanaskan dalam pemanas air pada suhu 100°C selama 3 menit. Setelah didinginkan sampel dimasukkan ke dalam sumur-sumur gel dengan volume 20 µL untuk tiap sumur. Setelah itu anoda dihubungkan pada reservoir bawah dan katoda dihubungkan pada reservoir atas. *Power supply* dihidupkan dengan arus listrik sebesar 30 mA dan 130 V. Proses pemisahan (*running*) dihentikan setelah warna biru dari penanda mencapai ketinggian 0,5 cm dari batas bawah plat gel. Standar protein yang digunakan adalah protein ladder 9,3–200 kDa (Nacalai, Japan).

Pewarnaan dan pembersihan gel

Pewarnaan dilakukan dengan merendam gel dalam larutan *staining* selama 30-60 menit. Penghilangan warna dilakukan dengan merendam gel dalam larutan *destaining* sambil digoyangkan dengan penggoyang otomatis sampai gel menjadi jernih. Kemudian hasil elektroforesis discan.

Penentuan berat molekul

Dengan membandingkan hasil elektroforesis sampel dengan marker protein. Penentuan berat molekul dilakukan dengan menghitung nilai Rf (*Retardation factor*) dari masing-masing pita dimana:

$$Rf = \frac{\text{Jarak pergerakan protein dari tempat awal}}{\text{Jarak pergerakan warna dari tempat awal}}$$

Selanjutnya nilai berat molekul (BM) di log dan dibuat kurva regresi (persamaan 1). Persamaan pada kurva regresi menggunakan nilai Rf dan logaritma BM. Untuk mendapatkan persamaan regresi diolah menggunakan *software* dan hasilnya digunakan untuk menentukan BM dari sampel. BM sampel diketahui setelah penentuan Rf dari masing-masing pita sampel. Selanjutnya, nilai Rf dimasukkan ke persamaan 1. Kemudian dibuat kurva standar dengan harga Rf sebagai sumbu x dan harga logaritma BM sebagai sumbu y. Berat molekul sampel ditentukan dengan diinterpolasikan pada kurva standar dari protein marker.

Analisis data

Data konsentrasi isolat protein dari daging ikan yang terinfeksi dan tidak terinfeksi dianalisis menggunakan statistik deskriptif: rata-rata *mean*. Identifikasi protein dari berat molekul sampel merujuk kepada data sekunder.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Konsentrasi protein

Konsentrasi isolat protein dari setiap sampel disajikan pada Tabel 1. Konsentrasi protein daging ikan yang tidak terinfeksi lebih tinggi dari daging yang terinfeksi. Perbedaan ini diperkirakan disebabkan oleh: pertama, sejumlah protein pada ikan yang terinfeksi berkurang oleh efek parasitik pada ikan sebagai inang. Penelitian ini menemukan distribusi larva *A. typica* pada sampel ikan yang terinfeksi 96,04% pada organ dalam seperti lambung, hati, gonad dan empedu dengan intensitas 63,45 individu/ekor sedangkan pada ikan yang tidak terinfeksi, distribusinya 0,00%. Larva *A. typica* merupakan parasit saluran pencernaan, oleh Grabda (1991) dijelaskan parasit usus mengorbankan inangnya dengan memakan makanan inang atau darah atau cairan jaringan tubuh inang, sehingga menghilangkan sejumlah besar nutrisi dari inang.

Tabel 1. Konsentrasi protein daging ikan yang terinfeksi, tidak terinfeksi dan L3 *A. typica*

Kode Sampel	Kadar Protein(mg/mL) (Mean \pm Sd)
Daging ikan yang tidak terinfeksi	24,4 \pm 1,5
Daging ikan yang terinfeksi	15,9 \pm 1,8
L3 <i>A. typica</i>	12,9

Kedua perbedaan saat memasuki fase *rigor mortis* dari masing-masing individu yang dijadikan sampel. Pada kasus ini, faktor intrinsik dan ekstrinsik lainnya tidak dilibatkan karena diasumsikan

sama. Ikan cakalang salah satu dari pelagis besar yang hidup bergerombol dan biasanya ditangkap menggunakan jaring/pukat dan pancing. Penangkapan cakalang di perairan NTT semuanya menggunakan pancing (*pole and line*). Ikan ditangkap satu persatu dalam waktu yang berbeda, dengan demikian setiap ikan memiliki waktu yang berbeda untuk memasuki dan melewati fase *rigor mortis*. Meskipun dalam proses sampling telah diupayakan untuk mengambil sampel ikan dari waktu, ukuran dan *trip* penangkapan yang sama, tetapi proses memasuki *post mortem* masing-masing individu tetap berbeda. Kedua hal inilah yang menyebabkan adanya perbedaan konsentrasi protein dari daging ikan yang tidak terinfeksi dan yang terinfeksi.

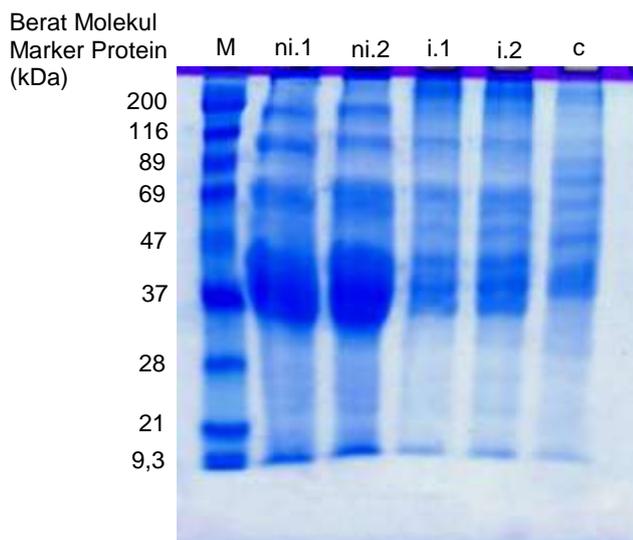
Berat molekul protein

Berdasarkan hasil elektroforesis (Gambar 1) maka dilakukan pengukuran berat molekul standar melalui pengukuran nilai RF dengan memplotkan dalam kurva standar. Mobilitas protein dapat dihitung menggunakan persamaan garis dari kurva standar tersebut. Persamaan garis yang diperoleh dari perhitungan tersebut adalah $y = -1,054x + 2,252$ dengan nilai $R^2 = 0,949$, hasilnya berat molekul sampel pada Tabel 2. Berdasarkan Tabel 2, daging ikan yang tidak terinfeksi memiliki 8 pita protein sedangkan yang terinfeksi 12 pita protein dan L3 *A. typica* 11 pita protein. Daging ikan yang tidak terinfeksi memiliki 8 pita protein yang sama dengan protein ikan terinfeksi kecuali 4 pita dengan berat molekul: 212, 66, 59 dan 44 kDa. Keempat berat molekul tersebut juga terdapat pada protein L3 *A. typica*.

Tabel 2. Profil berat molekul protein daging ikan yang terinfeksi, tidak terinfeksi dan L3 *A. typica*

Pita Ke-	BM (kDa)	Daging Non Infeksi (1)	Daging Non Infeksi (2)	Daging Terinfeksi (1)	Daging Terinfeksi (2)	L3 <i>A. typica</i>
1	212			■	■	■
2	110	√	√	√	√	√
3	92	√	√	√	√	√
4	82					√
5	76					√
6	71	√	√	√	√	
7	66			■	■	■
8	59			■	■	■
9	48	√	√	√	√	
10	44			■	■	■
11	38	√	√	√	√	
12	32	√	√	√	√	√
13	27	√	√	√	√	√
14	23	√	√	√	√	√

Keterangan: ■ adalah BM protein yang sama antara daging ikan terinfeksi dengan L3 *A. typica*, tapi tidak dijumpai pada daging ikan yang tidak terinfeksi



Gambar 1. Hasil elektroforesis SDS PAGE (M: Marker, ni: Daging ikan yang tidak terinfeksi (ulangan 1 dan 2), i: Daging ikan yang terinfeksi (ulangan 1 dan 2), c: Larva *A. typica*)

Protein ikan berdasarkan berat molekul

Protein dalam jaringan otot ikan diklasifikasi ke dalam: 1). Protein struktural terdiri dari: aktin, myosin, tropomyosin dan kompleks actomyosin. Protein ini memberikan kekuatan bagi otot untuk berkontraksi. 2). Protein yang mengandung enzim terdiri dari 2 kelompok miogen yang ditemukan dalam sarkoplasma dan globulin dalam mitokondria. Ada yang menyebut protein ini sebagai protein sarkoplasma (myoalbumin, globulin dan enzim). Sebagian protein sarkoplasma adalah enzim-enzim yang berperan dalam metabolisme sel, seperti konversi energi anaerobik dari glikogen ke ATP. 3). Stroma protein mengandung jaringan ikan terdiri dari kolagen (FAO, 2015).

Berdasarkan berat molekulnya maka profil protein dari otot ikan yang tidak terinfeksi dan terinfeksi, disajikan pada Tabel 3. Protein 23 kDa oleh Selvakumar *et al.* (2010) ditemukan sebagai enzim tripsin pada ikan cakalang, tongkol dan *yellow fin tuna*. Montowska *et al.* (2007) menjelaskan 23 kDa pada ikan sebagai Myosin Light Chain (MLC), adalah bagian dari protein struktural yang bertanggungjawab untuk kontraksi otot. Sampel pada penelitian ini diambil dari daging putih maka berat molekul tersebut diduga merupakan MLCI, sebab tripsin pada ikan mirip dengan tripsin mamalia adalah protein dari enzim pencernaan dengan berat molekul berkisar antara 23-30 kDa (Ahmad *et al.*, 2011). Berat molekul 38 kDa dilaporkan sebagai alergen dari krustase dan moluska, tapi pada ikan tropomyosin merupakan bagian dari protein struktural yang juga berfungsi dalam kontraksi otot.

Pada otot ikan salmon TM terdapat dalam 2 isoform yaitu α -TM dan β -TM (Helley *et al.*, 1995). Pada ikan blue fin tuna (*Thunnus thynnusorientalis*) juga ditemukan isoform yang sama dari TM (Ochiai *et al.*, 2010). Blue fin tuna dan *K pelamis* adalah kelompok tuna dari famili Scrombidae. Hal ini memperkuat dugaan bahwa berat molekul 38 kDa pada sampel adalah α -TM atau β -TM.

Tabel 3. Protein daging putih ikan Cakalang yang tidak terinfeksi dan terinfeksi oleh L3 *A. typica* berdasarkan berat molekul yang sama

Protein	Berat Molekul (kDa)	Nama Protein
Struktural	23	Myosin Light Chain (MLC)
	38	Tropomyosin
Sarkoplasma	27	Glyceraldehyde-3-phosphat dehidrogenase
	32	Kelompok enzim
	92	Sarkoplasmik
Antibodi	110	Antibodi pada otot myotomal
Tidak diketahui	48, 71	-

Protein dengan berat molekul 27, 32 dan 92 kDa dilaporkan merupakan bagian dari kelompok enzim pada protein sarkoplasma. Menurut Ladrat *et al.* (2003) Glyceraldehyde-3-phosphat dehidrogenasi (27 kDa) adalah enzim yang terdapat pada otot ikan. Demikian juga protein 32 kDa adalah enzim yang ditemukan pada otot ikan dan berfungsi untuk mengkatalisis unit proteolisis (Yongsawatdigul *et al.*, 2014). Protein 92 kDa adalah protein sarkoplasmik, protein jaringan otot yang umumnya terdiri dari kelompok enzim (Agebi *et al.*, 2014). Protein 110 kDa dilaporkan merupakan antibodi yang ditemukan pada otot myotomal yang diproduksi akibat respons terhadap perubahan suhu lingkungan pada ikan rainbow trout (*Orchrorhynchus mykiss*) dan *Allothunnus fallai* (Korajoki dan Vornanen, 2012; Sapulveda *et al.*, 2008). Pada kasus ini, sampel diambil dari bagian otot myotomal yaitu otot putih. Selain itu ada 4 berat molekul protein yang tidak ditemukan pada protein ikan yang tidak terinfeksi tetapi ada pada ikan yang terinfeksi. Keempat protein ini juga ditemukan pada sampel *A. typica*. Mereka adalah: 212, 66, 59 dan 44 kDa.

Protein 212 kDa oleh Faeste *et al.* (2014) teridentifikasi sebagai antigen Ani s 1 bernama *animal kunitz serine protease inhibitor*. Protein 66 kDa sebagai antigen *A simplex* (Rodero *et al.*, 2004) dan protein 59 kDa adalah myophilin yaitu protein struktural dan lokomotif otot dari *A simplex* (Faeste *et al.*, 2014). Berikutnya, protein 44 kDa adalah antigen yang terdeteksi menggunakan Western Blotting Kit pada sampel serum pasien anisakiasis (Yera *et al.*,

2003). Tiga dari keempat berat molekul pada protein otot ikan yang terinfeksi yaitu 212, 66 dan 44 kDa diketahui merupakan antigen dari *A simplex* dan serum pasien anisakiasis. Sampai saat ini perkembangan penelitian alergen dari genus anisakis difokuskan pada *A simplex* dan belum ada data dari spesies lainnya. Kami menduga ada kemiripan antara antigen yang dimiliki oleh *A simplex* dengan *A. typica* karena mereka berada dalam satu genus, memiliki karakter morfologi yang mirip dan siklus hidup yang sama. Faeste *et al.* (2014) menjelaskan bahwa antigen dari *A simplex* homolog dengan antigen dari nematoda lainnya. Dengan demikian kami berkesimpulan bahwa protein 212, 66 dan 44 kDa merupakan antigen yang dikeluarkan oleh *A. typica* ke jaringan otot ketika menginfeksi ikan.

Potensi alergi oleh *A. typica* pada daging ikan

Konsumsi ikan biasanya dilakukan dalam beberapa cara seperti: mentah dan dimasak. Ikan mentah sendiri biasanya dijumpai dalam bentuk segar, dingin dan beku. Memasak dan membekukan ikan yang terinfeksi L3 *A. typica* tidak dapat mencegah reaksi alergi karena alergen bersifat termotabil sangat tahan pada suhu pembekuan dan pemasakan (EFSA, 2010; Alonso *et al.*, 2007). Tejada *et al.* (2006) menjelaskan bahwa pelepasan alergen ke daging terjadi selama penyimpanan dingin. Paparan alergen juga dapat terjadi setelah larva-larva tidak ditemukan lagi pada daging (Audicana dan Kennedy, 2008).

Pada ikan yang terinfeksi diduga larva *A. typica* mengeluarkan metabolit berupa antigen ke jaringan otot ikan. Antigen ini kemudian akan menginduksi respon imun dari inang. Solas *et al.* (2008) menemukan antigen dari *Anisakis* 4 tersebar di sekitar jaringan otot ikan yang terinfeksi. Antigen tersebar ke dalam otot dan dapat menyebabkan gejala alergi seperti dyspnea, muntah, diare, urtikaria, angioedema atau anafilaksis pada beberapa individu yang sensitif terhadap *A simplex*. Rodriguez-Mahillo *et al.* (2010) juga menemukan 1 ppm antigen *Anisakis* 4 pada otot ikan beku yang disimpan pada suhu -20°C selama 11 bulan dan berpotensi menginduksi reaksi alergi.

Jadi meskipun larva telah keluar dari tubuh ikan melalui proses alamiah selama berada di perairan atau dibersihkan dari tubuh ikan pada saat proses penanganan, peluang alergi tetap ada. Meskipun demikian, spesifitas respons antibodi setiap individu bervariasi dan berbeda antara individu satu ke individu lain dan perbedaan ini disebabkan oleh kontrol genetik (Kennedy *et al.*, 1991). Jadi potensi alergi hanya dapat terjadi apabila individu yang mengonsumsi ikan sensitif terhadap antigen anisakis. Pembahasan dalam artikel ini didasarkan pada studi literatur dari penelitian-penelitian sebelumnya. Perkembangan penelitian berkaitan

dengan kemampuan patogenesis *A. typica* sampai saat artikel ini ditulis belum banyak dilakukan. Sebab itu untuk memperkaya dan mempertajam pembahasan sebaiknya hasil penelitian ini dilanjutkan lagi dengan metode bioinformatika atau metode biomolekuler lainnya yang dapat memberikan gambaran tentang potensi alergi *A. typica* pada daging ikan yang terinfeksi.

KESIMPULAN

Daging ikan cakalang yang terinfeksi memiliki 4 pita protein yang sama dengan L3 *A. typica*. Keempat protein dengan berat molekul 212, 66, 59 dan 44 kDa berpotensi menyebabkan alergi karena ketika menginfeksi daging ikan larva melepaskan antigennya ke jaringan daging ikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdiani IM. 2010. Infeksi larva anisakid pada ikan tongkol (*Euthynnus* sp.) yang didaratkan di Tarakan. *J Harpodon Borneo* 3: 70-74.
- Ahmad M, Benjakul S, Ovissipour M Prodpran T. 2011. Indigenous protease in the skin of unicorn leat herjacket (*Alutherus monoceros*) and their influence on characteristic and functional properties of gelatin. *Food Chem* 127: 508-515. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.01.032.
- Anshary H, Sriwulan, Freeman MA, Ogawa K. 2014. Occurrence and molecular identification of Anisakid Dujardin, 1984 from marine fish in Southern Makassar Strait, Indonesia. *Korean J Parasitol* 1: 9-19. DOI: 10.3347/kjp.2014.52.1.9.
- Agebi OT, Sofela SO, Adebambo AO, Awodiran MO. 2014. Evaluation of protein fraction of indigenous clariid fish species (*Clarias gariepinus* and *Heterobranchus bidorsalis*) and their other hibrids. *Biotechnol* 13: 289-294. DOI: 10.3923/biotech.2014.289.294.
- Alonso A, Daschner A, Moreno-Ancilo A. 2007. Anaphylaxis with *Anisakis simplex* in the gastric mucosa. *New Eng J Medi* 337: 350-351. DOI: 10.1056/NEJM199707313370518.
- Audicana MT, Kennedy M. 2008. *Anisakis simplex*: from obscure infectious worm to inducer of immune hypersensitivity. *Clin Microbiol Rev* 21: 360-379. DOI: 10.1128/CMR.00012-07.
- Aulanni'am. 2004. Prinsip dan Teknik Analisis Biomolekul. Fakultas Pertanian Universitas. 47-56. Brawijaya Press. Malang.
- Caballero ML, Umpierrez A, Moneo I, Rodriguez PR. 2011. *Anisakis* 10, a new *Anisakis simplex* alergen:

- cloning and heterologous expression. *Int* 60: 209-2012. DOI: 10.1016/j.parint.2011.01.003.
- [EFSA] European Food Safety Authority. 2010. Scientific Opinion. Scientific opinion on risk assesment of parasities in fishery product. *Eur Food Safety Authority J* 8:1-91.
- [FAO] Food and Agriculture Organization. 2015. Protein in fish and fish product. www.fao.org/fishery/topic/14869/en. [4 Maret 2015].
- Cheah FY, Lymbery AJ. 2007. Food Borne Parasitic Zoonoses: Anisakid Nematodes and Anisakiasis. Ed 1st 185-207. Springer, US. DOI: 10.1007/978-0-387-71358-8_5.
- D'Amelio S, Busi M, Ingrassio, S, Paggi L. 2010. Molecular Detection of Foodborn Pathogens: Anisakiasis. 757-768. CRC Press. Boca Raton, London, New York.
- Faeste CK, Jonscher KR, Dooper M MWB, Egge-Jacobsen W, Moen A, Daschner A, Egaas E, Cristian U. 2014. Characterization of potential novel alergens in fish parasites *A simplex*. *Eur Prot Assoc Open Proteomic* 4: 140-155. DOI: 10.1016/j.euprot.2014.06.006.
- Helley D, Bieger T, Waddeton DM, Hong C, Jackman DM, Mc Gowon, Davidson WS. 1995. Characterisation of fast, slow and cardiac muscles tropomyosin from salmoid fish. *Eur J Biochem* 232: 226-234.
- Howgate P, dos Santos CAML. 2011. Fishborne zoonotic parasities and aquaculture: A review. *Aquaculture* 318: 353-361. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2011.05.046.
- Kennedy MW, Wassom DL, McIntosh AE, Thomas JC. 1991. H-2 (I-A) control of the antibody repertoire in *Trichinella spiralis* infection and its relevance to resistance and susceptibility. *J Immunol* 73: 36-43.
- Korajoki H, Vornanen M. 2012. Expression of SERCA and phospholamban in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) heart: comparisson of atrial and ventricular tissue and effect of thermal acclimation. *J Exp Biol* 215: 1162-1169. DOI: 10.1242/jeb.065102.
- Ladrat C, Bagniz-Verrez V, Noel J, Fleurence J. 2003. In vitro proteolysis of myofibrillar and sacroplasmic proteins of white muscle of seabass (*Dicentrachus labrax* L): Effect of cathepsin B, D dan L. *Food Chem* 8: 517-525. DOI: 10.1016/S0308-8146(02)00481-8.
- Lymbery AJ, Waters JA. 2014. Encyclopedia of food savety. 1st Ed. Academic Press. Elsevier, Netherlands.
- Moneo I, Caballero ML, Perez RR, Mahillo AIR, Munoz MG. 2007. Sensitization to the fish parasite *Anisakis simplex*: clinical and laboratory aspects. *Parasitol Res* 101: 1051-1055. DOI: 10.1007/S00436-007-0587-7.
- Montowska M, Pospiech E. 2007. Specific identification of meat by electrophoretic methods. *Acta Sci Polo Technol Alimentaria* 6: 5-16.
- Moreno Y, Gros PP, Tam M, Segura M, Valanparambil R, Geary TG, Stevenson MM. 2011. Proteomic analysis of excretory secretory product of *Heligmosoimoides polygyrus* assesed with next-generation sequencing transcriptomic information. *Plos Negleted Tropical Diseases* 5: 1-11. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001370.
- Nieuwenhuizen N, Jeebhay, Lopata AL. 2009. Allergies in the workplace. ALLSA reseach awards report. *Cur Allergy Clin Immunol* 22: 132-138.
- Nieuwenhuizen NE, Lopata AI. 2013. Anisakis a foodborne parasite that triggers allergic host defences *Int J Parsitol* 43: 1047-1057. DOI: 10.1016/j.ijpara.2013.08.001.
- Ochiai Y, Ozawa H, Huang MC, Watabe S. 2010. Characterization of two tropomyosin isoform from the skletal muscle of blue fin tuna *Thunnus thynnusorientalis*. *Archive Biochem Biophys* 502: 96-103. DOI: 10.1016/j.abb.2010.07.015.
- Palm HW, Damriyasa IM, Linda, Oka BM. 2008. Molecular genotyping of Anisakis Dujardin, 1845 (Nematoda: Ascaridoidae: Anisakidae) larva from marine fish of Balinese and Javanese waters, Indonesia. *J Helmitologia* 45: 3-12. DOI: 10.2478/s11687-008-0001-8.
- Rodriguez-Mahillo A, Gonzales-Munoz M, de las Heras C, Tejada M, Moneo J. 2010. Quantification of *Anisakis simplex* alergens in fish, long-term frozen, and cook fish muscle. *J Foodborne Pathol* 7: 967-973. DOI: 10.1089/fpd.2009.0517.
- Sapulveda CA, Dicksons KA, Bernal D, Graham JB. 2008. Elevated red myotomal muscle temperatures in the most basal tuna species, *Allothunnus fallai*. *J Fish Biology* 73: 241-249. DOI: 10.1111/j.1095-8649.2008.01931.x.
- Selvakumar P, Ling TC, Walkers S, Lyddiatt A. 2010. A practical implementation and exploitation of ATPS for intensive processing of biological feedstock: a novel approach for heavily biological feedstock loaded ATPS. *Separation Purification Technol J* 75: 323-332. DOI: 10.1016/j.seppur.2010.08.022.
- Setyobudi E, Soeparno, Helmiati. 2011. Infection of *Anisakis* sp. Larva in some marine fishes from the southern coast of Kulon Progo, Yogyakarta. *Biodiv* 12: 34-37. DOI: 10.13057/biodiv/d120107.

- Soewarlan LC, Suprayitno E, Nursyam H, Hardoko. 2014. Identification of anisakid nematode infection of skipjack (*Katsuwonus pelamis* L.) from Savu Sea, East Nusa Tenggara, Indonesia. *Int J Biosci* 5: 423-432. DOI: 10.12 692/ijb/5.9.423-8.
- Solas MT, Rodriguez-Mahillo AL, Gonzales-Munoz M, de las Heras C, Tejada M. 2008. Anisakis antigen detected in fish muscle with *Anisakis simplex* L3. *J Food Protect* 71: 1273-1276.
- Tejada M, Solas MT, Alfonso N, Angel M. 2006. Scanning electron microscopy of *Anisakis* larvae following different treatments. *J Food Protect* 6: 1379-1387.
- Uga S, Oto K, Kataoka N, Hasan H. 1996. Sereoepidemilogy of five mahor zoonotic parasite infection in inhabitants of Sidoardjo East Java, Indonesia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 27: 556-561.
- Wiwanitkit S, Wiwanitkit V. 2016. Anisakiasis in Southeast Asia: A story of new tropical disease?. *Asian Pasific J Tropical Biomed* 6: 382-383. DOI: 10.1016/j.apjtb.2015.11.011.
- Yera H, Andiva S, Perret C, Limmone D, Boireau P, Camet DJ. 2003. Development and evaluation of a western blot kit for diagnosis of human trichinellosis. *Clin Diagnostic Lab Immunol* 10: 793-796. DOI: 10.1128/CDLI.10.5.793-796.2003.
- Yongsawatdigul J, Hemung BO, Choi YJ. 2014. *Proteolitic Enzymes and Control in Surimi. Surimi and Surimi Seafood. 3rd Edition.* 147. CRC Press. Boca Raton, London, New York.
- [WHO] World Health Organization. 2008. Soil transmited helmits. WHO Geneva, Switzerland. <http://www.who.int/intestinalworms/en>. [22 September 2015].