



UNIVERSITAS INDONESIA

**IDENTIFIKASI PROTEIN ALERGEN SERBUK SARI  
TANAMAN AKASIA (*Acacia auriculiformis* dan *Acacia  
mangium*) DAN KELAPA SAWIT (*Elaeis guineensis* Jacq.)**

**SKRIPSI**

**WINNA SOLEHA  
0806327641**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM STUDI BIOLOGI  
DEPOK  
JUNI 2012**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**IDENTIFIKASI PROTEIN ALERGEN SERBUK SARI  
TANAMAN AKASIA (*Acacia auriculiformis* dan *Acacia  
mangium*) DAN KELAPA SAWIT (*Elaeis guineensis* Jacq.)**

**SKRIPSI**

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains**

**WINNA SOLEHA  
0806327641**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM STUDI BIOLOGI  
DEPOK  
JUNI 2012**

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri,  
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk  
telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Winna Soleha

NPM : 0806327641

Tanda Tangan : 

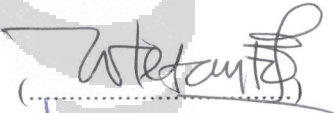



Tanggal : 18 Juni 2012

## HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :  
Nama : Winna Soleha  
NPM : 0806327641  
Program Studi : Biologi S1 Reguler  
Judul Skripsi : Identifikasi Identifikasi Protein Alergen Serbuk  
Sari Tanaman Akasia (*Acacia auriculiformis* dan  
*Acacia mangium*) dan Kelapa Sawit (*Elaeis  
guineensis* Jacq.)

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi S1 Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia

### DEWAN PENGUJI

Pembimbing I	: Dr. Arief Budi Witarto	(.....  )
Pembimbing II	: Dr. Anom Bowolaksono	(.....  )
Penguji I	: Dra. Setiorini, M.Kes.	(.....  )
Penguji II	: Dr. Andi Salamah	(.....  )

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 18 Juni 2012

## KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan menyusun skripsi ini. Shalawat dan salam senantiasa tercurah kepada suri tauladan Nabi Muhammad SAW.

Penelitian dan penyusunan skripsi ini tak lepas dari berbagai pihak yang telah banyak memberikan bantuan dan dukungan, baik moral maupun material. Oleh karena itu, penulis ingin mengucapkan rasa terima kasih kepada:

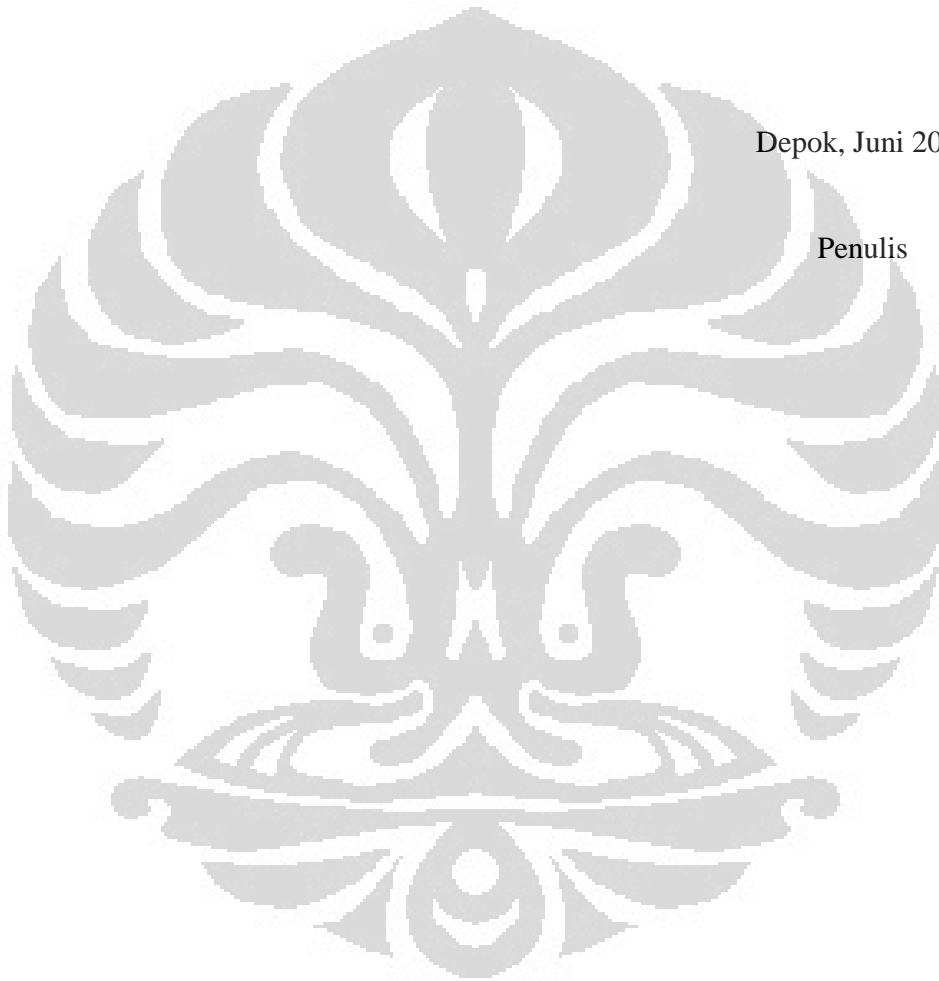
1. Dr. Arief Budi Witarto dan Dr. Anom Bowolaksono selaku Pembimbing I dan II yang telah membimbing dan membantu penulis dalam penelitian dan penyusunan skripsi ini.
2. Dra. Setiorini, M.Kes. dan Dr. Andi Salamah selaku Penguji I dan II yang telah memberikan saran dan perbaikan-perbaikan dalam penyusunan skripsi ini.
3. Dra. Titi Soedjiarti, S.U. selaku Pembimbing Akademik yang telah memberikan bimbingan, perhatian, dan semangat selama menjadi mahasiswa di Biologi.
4. Dr.rer.nat. Mufti P. Patria, M.Sc. selaku Ketua Departemen Biologi FMIPA UI, Dr. Abinawanto, Dra. Nining B. Prihantini, M.Sc., dan segenap staf pengajar yang telah mengajarkan dan memberikan ilmu pengetahuan kepada penulis selama berada di Biologi. Terima kasih kepada Mba Asri, Pak Taryana, Bu Rusmalina, Mba Tati, dan segenap staf karyawan yang telah banyak membantu penulis dalam penelitian.
5. Dr. Tomohiko Yamazaki selaku *senior researcher* Biomaterials Unit, Biosystem Control Group di National Institute for Material Science (NIMS) yang telah memberikan bimbingan selama penelitian di Jepang. Terima kasih kepada Mba Atie yang telah banyak mengajarkan teknik molekular di laboratorium.
6. Dr. Iris Rengganis, SpPD-KAI, selaku dosen Divisi Alergi dan Immunologi Klinik, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, yang telah memberikan masukan, bimbingan, dan bantuan terutama dalam persiapan dan preparasi sampel.
7. Keluarga tercinta, teristimewa untuk Papa dan Mama, kakak dan adik tersayang, Widia dan Wenni, serta segenap kerabat yang selalu memberikan doa, dukungan moral dan material, serta memberikan segala yang terbaik kepada penulis.

8. Sahabat dan rekan terbaik penulis, tempat saling berbagi, memberi arti, dan telah membantu penulis, Dewi, Mita, sobat GEN (Icha, Nisa, Anas, Sinto, Maya, Ami, Puji, Refvi, Atif), Ka Rika, Ka Bhe, Ka Gitaw, Sisil, Pute, Lena, Akbar, CT-BPH Himbio 2010, asisten genetika 2010--2012, sahabat Bi08entris, Felix, Blossom, Zygomorphic, dan Biologi 2010.

Akhir kata, penulis memohon maaf apabila terdapat kesalahan dan kekeliruan dalam penulisan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat dalam perkembangan ilmu pengetahuan. Aamiin.

Depok, Juni 2012

Penulis



## HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

---

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Winna Soleha  
NPM : 0806327641  
Program Studi : Biologi S1 Reguler  
Departemen : Biologi  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Jenis karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul:


Identifikasi Protein Alergen Serbuk Sari Tanaman Akasia (*Acacia auriculiformis* dan *Acacia mangium*) dan Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.)

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok  
Pada tanggal : 18 Juni 2012

Yang menyatakan



(Winna Soleha)

## ABSTRAK

Nama : Winna Soleha  
Program Studi : Biologi S1 Reguler  
Judul : Identifikasi Protein Alergen Serbuk Sari Tanaman Akasia (*Acacia auriculiformis* dan *Acacia mangium*) dan Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.)

Telah dilakukan penelitian mengenai identifikasi protein alergen serbuk sari akasia (*Acacia auriculiformis* dan *Acacia mangium*) dan kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.). Tujuan penelitian adalah mengidentifikasi protein alergen serbuk sari tanaman *Acacia auriculiformis*, *Acacia mangium*, dan kelapa sawit. Ekstrak protein sampel serbuk sari menunjukkan hasil negatif pada uji *dot blotting* karena konsentrasi protein sampel rendah. Protein serbuk sari kelapa sawit dengan berat molekul (BM) 31 kDa diduga sebagai alergen utama karena bereaksi positif terhadap > 80% serum individu alergi maupun individu normal. Individu normal bereaksi positif terhadap protein tersebut diduga karena faktor atopi.

Kata kunci : akasia, alergi, asma, atopi, dermatitis, ekstraksi protein, kelapa sawit, rinitis alergi, serbuk sari, SDS-PAGE, *western blotting*  
xiii + 80 halaman : 24 gambar ; 5 tabel  
Daftar Acuan : 80 (1975--2012)



## ABSTRACT

Name : Winna Soleha  
Program Study : Biology S1 Regular  
Title : Identification of Allergenic Pollen Protein from Acacia (*Acacia auriculiformis* and *Acacia mangium*) and Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.)

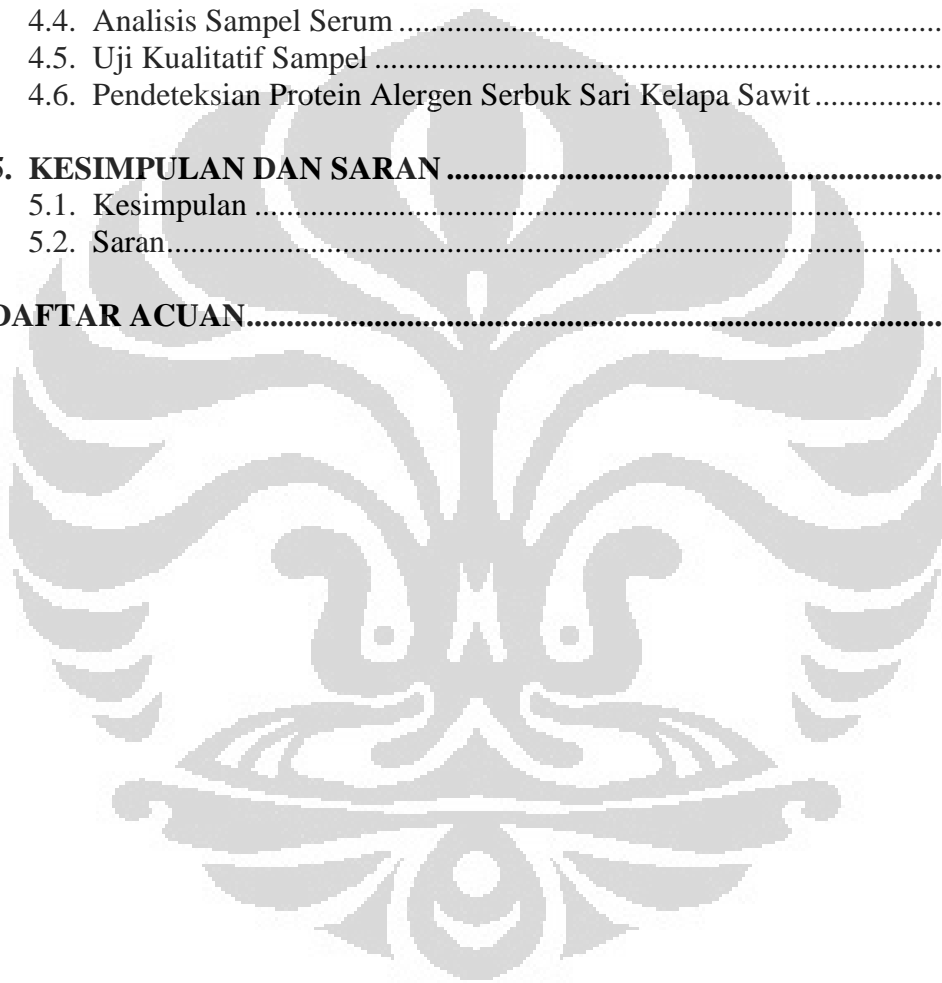
The research was about identification of allergenic pollen protein from acacia (*Acacia auriculiformis* and *Acacia mangium*) and oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). The aim of the research was to identify allergenic pollen protein from *Acacia auriculiformis*, *Acacia mangium*, and oil palm. Protein extract of pollen sample which was extracted by *phenol extract* method showed negative result in dot blotting assay because protein concentration of sample was low. Oil palm pollen protein with 31 kDa molecular weight was suspected as major allergen because it showed positive reaction to >80% of serum either allergy or normal individual. Normal individual which showed positive reaction to the protein was suspected cause of atopy.

Keywords : acacia, allergic rhinitis, allergy, asthma, atopy, dermatitis, oil palm, pollen, protein extraction, SDS-PAGE, western blotting  
xiii + 80 pages : 24 pictures ; 5 tables  
Bibliography : 80 (1975--2012)

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iv
KATA PENGANTAR .....	v
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH .....	vii
ABSTRAK .....	viii
ABSTRACT .....	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR GAMBAR .....	xii
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
<b>1. PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>4</b>
2.1. Alergi .....	4
2.1.1. Mekanisme Alergi.....	5
2.1.2. Penyakit Alergi Pernapasan .....	8
2.1.3. Penyakit Alergi Kulit .....	11
2.1.4. Penyakit Alergi Lainnya .....	11
2.1.5. Faktor Genetika Penyebab Alergi Atopi.....	12
2.2. Tanaman Akasia.....	13
2.3. Tanaman Kelapa Sawit .....	16
2.4. Serbuk Sari .....	17
2.5. <i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis</i> (SDS- PAGE).....	19
2.6. <i>Western Blotting</i> .....	21
2.7. <i>Mass Spectrometry</i> .....	23
<b>3. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>24</b>
3.1. Lokasi dan Waktu Penelitian .....	24
3.2. Alat.....	24
3.3. Bahan .....	25
3.3.1. Sampel Serbuk Sari .....	25
3.3.2. Sampel Serum .....	25
3.3.3. Bahan dan Larutan Kimia .....	27
3.4. Cara Kerja .....	27
3.4.1. Preparasi Sampel Serbuk Sari .....	27
3.4.2. Identifikasi Serbuk Sari.....	29
3.4.3. Ekstraksi Protein Serbuk Sari.....	30
3.4.3.1. Ekstraksi Protein Sampel .....	30
3.4.3.2. Pemurnian Ekstrak Protein Penelitian Sebelumnya.....	33
3.4.3.3. Penentuan Konsentrasi Protein Serbuk Sari.....	34

3.4.4. <i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis (SDS- PAGE)</i> .....	34
3.4.5. <i>Dot Blotting</i> .....	35
3.4.6. <i>Western Blotting</i> .....	36
<b>4. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	<b>40</b>
4.1. Identifikasi Serbuk Sari .....	40
4.2. Ekstrak Protein Serbuk Sari .....	43
4.3. Analisis Berat Molekul Protein Serbuk Sari .....	44
4.3.1. Analisis Berat Molekul Protein Sampel Serbuk Sari .....	44
4.3.2. Analisis Berat Molekul Ekstrak Protein Penelitian Sebelumnya .....	45
4.4. Analisis Sampel Serum .....	50
4.5. Uji Kualitatif Sampel .....	52
4.6. Pendeteksian Protein Alergen Serbuk Sari Kelapa Sawit .....	53
<b>5. KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....	<b>62</b>
5.1. Kesimpulan .....	62
5.2. Saran .....	62
<b>DAFTAR ACUAN</b> .....	<b>63</b>



## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.1. Mekanisme reaksi hipersensitivitas tipe cepat .....	7
Gambar 2.1.2. Mekanisme penyakit asma .....	10
Gambar 2.2.1. Morfologi <i>Acacia auriculiformis</i> .....	14
Gambar 2.2.2. Morfologi <i>Acacia mangium</i> .....	15
Gambar 2.3. Tanaman kelapa sawit .....	17
Gambar 2.6.1. Prinsip kerja <i>western blotting</i> .....	21
Gambar 2.6.2. Perbandingan pendeteksian protein <i>direct</i> dan <i>indirect</i> .....	22
Gambar 2.7. Skema identifikasi protein menggunakan <i>mass spectrometry</i> ..	23
Gambar 3.4.1. Saringan bertingkat untuk serbuk sari.....	28
Gambar 3.4.2. Prosedur <i>western blotting</i> .....	37
Gambar 3.4.3. <i>Semi dry blotting</i> .....	38
Gambar 3.4.4. Skema kerja penelitian .....	39
Gambar 4.1.1. Identifikasi serbuk sari <i>Acacia auriculiformis</i> .....	41
Gambar 4.1.2. Identifikasi serbuk sari <i>Acacia mangium</i> .....	41
Gambar 4.1.3. Morfologi serbuk sari akasia .....	42
Gambar 4.1.4. Identifikasi serbuk sari kelapa sawit .....	42
Gambar 4.1.5. Morfologi serbuk sari kelapa sawit .....	43
Gambar 4.3.1. Visualisasi SDS-PAGE ekstrak protein sampel (konsentrasi gel 10--20%) .....	44
Gambar 4.3.2. Visualisasi SDS-PAGE ekstrak protein (konsentrasi gel 10--20%) .....	46
Gambar 4.3.3. Visualisasi SDS-PAGE ekstrak protein (konsentrasi gel 15%) .....	47
Gambar 4.3.4. Ekstrak protein sampel serbuk sari .....	49
Gambar 4.5. <i>Dot blotting</i> protein sampel serbuk sari akasia dan kelapa sawit.....	52
Gambar 4.6.1. <i>Western blotting</i> ekstrak protein serbuk sari kelapa sawit .....	53
Gambar 4.6.2. <i>Western blotting</i> ekstrak protein serbuk sari kelapa sawit terhadap beberapa serum dengan konsentrasi disetarakan.....	56

## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1.1.	Kelas-kelas immunoglobulin .....	4
Tabel 2.1.2.	Jenis hipersensitivitas menurut Gell dan Combs (Platt-Mills 2006) .....	6
Tabel 2.1.3.	Beberapa lokasi kromosom dan gen-gen yang berhubungan dengan atopi .....	13
Tabel 2.5.	Persentase akrilamid yang digunakan dalam SDS-PAGE untuk <i>resolving</i> protein dengan berat molekul berbeda .....	20
Tabel 3.3.	Daftar serum manusia untuk studi alergen serbuk sari Indonesia.	26

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Perhitungan BCA <i>assay</i> terhadap konsentrasi protein sampel yang diekstrak menggunakan metode <i>phenol extract</i> .....	70
Lampiran 2	Perhitungan BCA <i>assay</i> terhadap konsentrasi ekstrak protein dari penelitian sebelumnya (Rengganis, 2009).....	71
Lampiran 3	Perhitungan berat molekul dan kurva standar protein sampel yang diekstrak menggunakan metode <i>phenol extract</i> berdasarkan visualisasi hasil SDS-PAGE (konsentrasi gel 10--20%) .....	72
Lampiran 4	Perhitungan berat molekul dan kurva standar ekstrak protein dari penelitian sebelumnya (Rengganis, 2009) berdasarkan visualisasi hasil SDS-PAGE (konsentrasi gel 10--20%).....	74
Lampiran 5	Perhitungan berat molekul dan kurva standar ekstrak protein dari penelitian sebelumnya (Rengganis, 2009) berdasarkan visualisasi hasil SDS-PAGE (konsentrasi gel 15%) .....	77
Lampiran 6	Perhitungan BCA <i>assay</i> terhadap konsentrasi protein serum.....	79

## BAB 1 PENDAHULUAN

Alergi adalah bentuk hipersensitivitas patologik yang dihasilkan sistem imunitas tubuh manusia sebagai respon terhadap substansi asing dari faktor eksternal tubuh yang disebut antigen (alergen) (Campbell *dkk.* 2004: 92; RCP 2003: 3). Penyakit alergi antara lain berupa asma, rinitis alergi, anafilaksis, alergi obat, alergi makanan, eksim, urtikaria, dan angioedema. Prevalensi penyakit alergi di seluruh dunia mengalami peningkatan, terutama dialami oleh anak-anak selama lebih dari dua dekade terakhir. Sekitar lebih dari 20% populasi penduduk dunia terkena penyakit alergi. Berdasarkan fakta tersebut, alergi menjadi salah satu masalah utama penanganan kesehatan di seluruh dunia (Pawankar *dkk.* 2011: 1; WHO 2003: 3).

Rinitis alergi dan asma merupakan penyakit imunologi yang paling sering ditemukan. Berdasarkan statistik *World Health Organization* (WHO), sekitar ratusan dari jutaan penduduk dunia menderita rinitis dan diperkirakan 300 juta penduduk menderita asma (Pawankar *dkk.* 2011: 1). Studi epidemiologi yang dilakukan oleh Ciprandi *dkk.* (2005) menunjukkan bahwa prevalensi rinitis alergi diperkirakan sebesar 10--20% dan meningkat secara konstan dalam dekade terakhir. Prevalensi asma bronkial alergik juga cenderung meningkat, seperti di Amerika Serikat sekitar 5--8% penduduk menderita asma (Oemiati *dkk.* 2010: 41).

Prevalensi penyakit asma di berbagai negara belahan dunia mengalami peningkatan, termasuk Indonesia. Penelitian *International Study on Asthma and Allergies in Childhood* menunjukkan bahwa prevalensi penyakit asma di Indonesia meningkat dari 4,2% pada tahun 1995 menjadi 5,4% pada tahun 2003. Bahkan, prevalensi asma di DKI Jakarta mencapai 7,5% pada tahun 2007. Angka kejadian asma lebih tinggi pada anak dan bayi yaitu sekitar 10--85% dibandingkan pada orang dewasa (10--45%). Kementerian Kesehatan Republik Indonesia memperkirakan penyakit asma termasuk sepuluh besar penyakit penyebab kematian dan diperkirakan 10% dari 25 juta penduduk Indonesia menderita asma (Oemiati *dkk.* 2010: 41).

Alergi memiliki dampak yang sangat besar terhadap kualitas hidup penderita dan keluarganya. Penanganan alergi yang kurang baik dapat meningkatkan morbiditas (keadaan tidak sehat) dan mortalitas penduduk. Secara negatif, alergi juga berpengaruh tidak langsung terhadap pendapatan sosial ekonomi suatu bangsa (Pawankar *dkk.* 2011: 1). Oleh karena itu, penanganan masalah alergi perlu mendapat perhatian khusus guna menghindari kerugian yang ditimbulkannya.

Beberapa negara di dunia telah mengupayakan penanganan masalah alergi dalam skala nasional, namun masih belum sempurna (Pawankar *dkk.* 2011: 2). Langkah awal penanganan masalah alergi yaitu mengenali penyakit alergi dan faktor penyebabnya. Alergen merupakan substansi asing penyebab timbulnya alergi, bentuknya dapat berupa bahan makanan, debu, tungau, serbuk sari, spora jamur, produk hewani, maupun berbagai zat kimia yang dihasilkan di rumah maupun tempat bekerja (RCP 2003: 3). Identifikasi alergen penyebab penyakit alergi tertentu sangat penting agar penderita dapat menghindari alergen tersebut dan selanjutnya dapat ditentukan obat yang cocok, serta pengobatan yang sesuai. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mengetahui faktor resiko lingkungan yang berkontribusi dalam meningkatkan pajanan alergen terhadap manusia (Pawankar *dkk.* 2011: 1 & 7).

Serbuk sari merupakan salah satu alergen yang berasal dari lingkungan penyebab utama rinitis alergi dan asma (Gunawan 2010: 1). Alergi pernapasan akibat serbuk sari di negara empat musim, seperti Amerika dan Eropa, sering terjadi musiman sesuai dengan musim di wilayah tersebut (Mahmudi 2008: 33--34). Prevalensi rinitis alergi dan asma yang cukup tinggi menunjukkan perlu dilakukannya penelitian mengenai serbuk sari sebagai agen utama penyebab penyakit tersebut. Meskipun telah banyak dilakukan penelitian mengenai alergi serbuk sari di negara empat musim, penelitian serupa masih perlu dilakukan pada tanaman lokal di Indonesia. Penelitian yang sudah ada belum sepenuhnya dapat diaplikasikan di Indonesia karena negara empat musim memiliki perbedaan iklim dengan Indonesia yang beriklim tropis. Perbedaan iklim menyebabkan perbedaan musim berbunga sehingga jumlah serbuk sari yang tertiuap angin juga berbeda. (Rengganis & Ramadian 2011: 1).

Penelitian mengenai kealergenikan serbuk sari tanaman di Indonesia belum banyak dilakukan dan informasi yang ada sejauh ini yaitu hanya beberapa jenis tumbuhan pencetus alergi dan sensitivitas serbuk sari yang dihasilkannya terhadap manusia. Penelitian Baratawidjaja *dkk.* pada tahun 1999 menunjukkan adanya sensitivitas pasien alergi pernapasan terhadap alergen regional asal Singapura, di antaranya kelapa sawit (*Elaeis guineensis*) 22,43% dan akasia (*Acacia auriculiformis*) 12,15% (lihat Rengganis 2009: 3--4). Rengganis (2009) melakukan penelitian mengenai sensitivitas manusia terhadap serbuk sari tanaman di Indonesia melalui uji tusuk kulit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa protein serbuk sari tanaman lokal di Indonesia, antara lain alang-alang, akasia, jagung, kelapa genjah, kelapa sawit, padi dan pinus bersifat alergenik pada manusia (Rengganis 2009: 52).

Penelitian selanjutnya diperlukan untuk mengetahui adanya protein alergen serbuk sari dari beberapa tanaman di Indonesia. Tanaman akasia dan kelapa sawit memiliki serbuk sari berpotensi alergenik (Rengganis 2009: 52). Protein alergen serbuk sari tanaman Indonesia tersebut perlu diidentifikasi karena berpotensi aplikatif sebagai langkahantisipasi dan pencegahan alergi serbuk sari. Aplikasi yang dimaksud yaitu pembuatan alat pendeteksi ada tidaknya alergi berupa panel uji tusuk kulit yang telah dimasukkan ekstrak protein alergen lokal yang telah teridentifikasi (Rengganis & Ramadian 2011: 1). Dengan demikian, perlu dilakukan penelitian awal untuk mengidentifikasi protein alergen serbuk sari tanaman Indonesia, antara lain pohon akasia dan kelapa sawit.

Berdasarkan latar belakang, penelitian dilakukan untuk mengetahui kealergenikan protein serbuk sari tanaman akasia dan kelapa sawit yang banyak ditanam di Indonesia. Tujuan penelitian adalah mengidentifikasi protein alergen serbuk sari tanaman akasia dan kelapa sawit. Protein serbuk sari dari tanaman tersebut dianalisis dengan pendekatan genetika molekular sehingga diketahui asam amino penyusunnya. Karakteristik susunan asam amino yang diperoleh kemudian dapat dibandingkan dengan sekuens *database* sehingga protein serbuk sari tanaman yang berpotensi menyebabkan alergi dapat teridentifikasi. Hipotesis penelitian adalah terdapat protein alergen pada serbuk sari tanaman akasia dan kelapa sawit.



## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Alergi

Alergi adalah respons berlebihan (hipersensitif) terhadap antigen tertentu, yang disebut sebagai alergen (Campbell *dkk.* 2004: 92). Hipersensitivitas merupakan reaksi imun yang patologik karena dapat menimbulkan kerusakan jaringan tubuh (Baratawidjaja 2006: 155). Alergen merupakan protein asing pemicu timbulnya reaksi alergi, dapat terlarut secara cepat, dan berukuran kecil ( $\leq 60$  kD) sehingga dapat menembus membran basal manusia. Alergen di alam dapat berupa serbuk sari (polen), debu, tungau, spora jamur (kapang), obat, racun serangga, dan bahan makanan. Penderita alergi seringkali memiliki sensitivitas terhadap lebih dari satu macam alergen (Denburg 1998: 42; Gunawan 2010: 1; Hopkins Technology 2011: 1).

Antibodi termasuk kelompok protein yang secara kolektif dikenal sebagai Immunoglobulin (Ig) dan terdiri dari lima kelas yaitu IgA, IgD, IgE, IgG, dan IgM (Tabel 2.1.1). Antibodi IgE diproduksi oleh limfosit B dalam jumlah sedikit yaitu sekitar 0.001--0.002% dari total immunoglobulin dalam serum. Peranan IgE yaitu sebagai perantara respon alergi. Reaksi alergi terjadi jika seseorang yang telah memproduksi antibodi IgE akibat terpapar suatu antigen (alergen) kemudian terpapar kembali oleh antigen yang sama (Anupama *dkk.* 2001: 35; Bintang 2012: 212; Rifa'i 2011: 1).

Tabel 2.1.1. Kelas-kelas Immunoglobulin

Immunoglobulin	Jumlah 4 unit rantai dasar	Rantai berat	Valensi antigen	Persentase dalam serum normal
IgA	1 atau 2	$\alpha$	2	13
IgD	1	$\delta$	?	1
IgE	1	$\epsilon$	2	0.002
IgG	1	$\gamma$	2	80
IgM	5	$\mu$	5 (10)	6

[Sumber: Bintang 2012: 212.]

Alergi atau reaksi hipersensitif merupakan salah satu respon sistem imun berbahaya karena dapat menimbulkan kerusakan jaringan maupun penyakit yang serius. Alergi dapat bersifat lokal atau sistemik. Apabila alergen berasal dari udara lalu terhirup, maka reaksi alergi dapat terjadi pada hidung, mata, dan/atau paru-paru. Sedangkan apabila alergen berupa bahan makanan lalu termakan, reaksi alergi akan terjadi pada mulut, lambung, dan usus. Kulit dan saluran pernapasan adalah organ yang paling sering terpajan alergen dan terlibat dalam penyakit alergi. Reaksi alergi yang lebih parah dapat terjadi pada seluruh tubuh (sistemik), meliputi urtikaria, tekanan darah menurun, terkejut (*shock*), atau dapat pula hilang kesadaran. Reaksi tersebut dikenal dengan istilah *anaphylaxis*. (Cleveland Clinic 2011: 1; Rengganis 2004: 5).

### 2.1.1. Mekanisme Alergi

Reaksi hipersensitivitas (alergi) oleh Robert Coombs dan Philip HH Gell (1963) dibagi dalam empat tipe reaksi berdasarkan kecepatan dan mekanisme imun yang terjadi, yaitu tipe I, II, III, dan IV (Tabel 2.1.2). Reaksi tipe I yang disebut juga reaksi cepat atau reaksi anafilaksis atau reaksi alergi, timbul segera sesudah tubuh terpajan dengan alergen. Istilah alergi yang pertama kali digunakan Von Pirquet pada tahun 1906, diartikan sebagai “reaksi penjamu yang berubah” bila terpajan dengan bahan yang sama untuk kedua kalinya atau lebih. Istilah anafilaksis berasal dari bahasa Yunani yaitu *ana* yang berarti “jauh dari” dan *phylaxis* yang berarti “perlindungan” (Baratawidjaja 2006: 157).

Pada reaksi tipe I, alergen yang masuk ke dalam tubuh menimbulkan respons imun berupa produksi IgE dan penyakit alergi seperti rinitis alergi (*hay fever*), asma, dan dermatitis atopi. Urutan kejadian reaksi tipe I adalah sebagai berikut:

1. Fase sensitisasi yaitu waktu yang dibutuhkan untuk pembentukan IgE hingga diikat oleh reseptor spesifik (Fcε-R) pada permukaan sel *mast* dan basofil.
2. Fase aktivasi yaitu waktu yang diperlukan antara pajanan ulang dengan antigen spesifik dan sel mast melepas isi berupa granul yang menimbulkan reaksi.

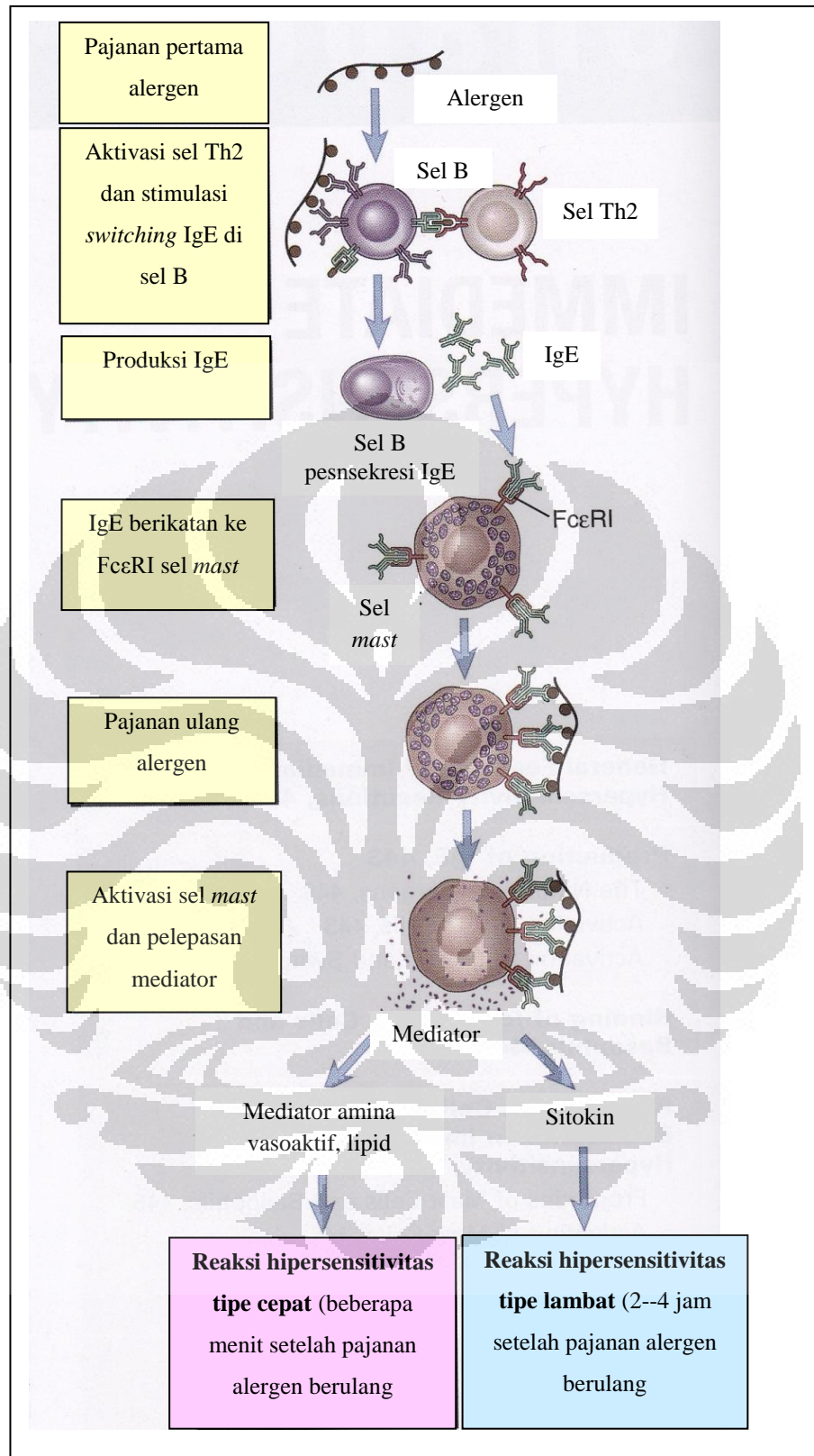
3. Fase efektor yaitu waktu terjadi respons yang kompleks (anafilaksis) sebagai efek mediator-mediator yang dilepas sel *mast* dengan aktivitas farmakologik.

Tabel 2.1.2. Jenis hipersensitivitas menurut Gell dan Coombs (Platt-Mills 2006)

Tipe	Nama reaksi	Perantara	Contoh penyakit
I	Alergi/cepat/anafilaksis	IgE	Asma, rinitis alergi, dermatitis atopi
II	Sitotoksik	IgG, IgM	Anemia hemolitik autoimun
III	Kompleks imun	IgG, IgM	Lupus eritematosus sistemik
IV	Lambat	Sel T	Dermatitis kontak

[Sumber: Rengganis 2009: 6.]

Mekanisme reaksi hipersensitivitas tipe I (cepat) diawali dengan pajanan pertama alergen (antigen). Antigen merangsang sel B untuk membentuk IgE dengan bantuan sel T *helper* (Th). Immunoglobulin E diikat oleh sel *mast*/basofil melalui reseptor Fcε-R. Ikatan tersebut dinamakan sensitisasi karena sel *mast* yang dilapisi IgE dipersiapkan untuk diaktivasi pada pajanan ulang antigen. Apabila tubuh terpajan ulang dengan antigen yang sama maka antigen tersebut akan diikat oleh IgE yang sudah ada pada permukaan sel *mast*/basofil. Akibat ikatan antigen-IgE, sel *mast*/basofil mengalami degranulasi dan melepas mediator yang *preformed* (telah terbentuk sebelumnya) antara lain histamin yang menimbulkan gejala reaksi hipersensitivitas tipe cepat (Gambar 2.1.1) (Abbas *dkk.* 2010: 442 & 454; Baratawidjaja 2006: 158).



Gambar 2.1.1. Mekanisme reaksi hipersensitivitas tipe cepat  
[Sumber: Abbas *dkk.* 2010: 442, diterjemahkan sesuai aslinya.]

Ikatan antigen dengan IgE yang berada pada sel *mast* juga memicu sel plasma memproduksi IgE lebih banyak. Immunoglobulin E yang diproduksi sel plasma akan berikatan dengan reseptornya yang berada pada sel *mast* dan basofil. Ketika IgE yang ada pada permukaan sel *mast* mengadakan ikatan silang yang dihubungkan oleh antigen, sel *mast* teraktivasi dan mengekspresikan ligan CD4<sup>+</sup> dan mensekresikan interleukin 4 (IL-4). Interleukin 4 adalah isotop penghubung antara antigen dengan IgE dan pada akhirnya berikatan dengan reseptornya yang terdapat pada sel B yang teraktivasi. Ikatan IL-4 dengan reseptor yang terdapat pada sel B menimbulkan *class switching* yang mengarah pada pembentukan antibodi IgE lebih banyak. Mekanisme tersebut terjadi secara *in vivo* pada daerah yang mengalami inflamasi akibat adanya alergen (Abbas *dkk.* 1994: 283; Rifa'i 2011: 10).

Sekitar 50--70% populasi manusia membentuk IgE terhadap pajanan antigen yang masuk tubuh melalui mukosa seperti selaput lendir hidung, paru-paru, dan konjungtiva. Sekitar 10--20% dari populasi tersebut menderita rinitis alergi dan sekitar 3--10% menderita asma bronkial. Beberapa penyakit alergi pernapasan dapat diindikasikan dengan peningkatan kadar IgE dalam serum. Pemajanan (sensitisasi) dapat pula terjadi secara pasif bila serum (darah) orang yang alergi dimasukkan ke dalam kulit/sirkulasi orang normal (Anupama *dkk.* 2001: 35; Baratawidjaja 2006: 158).

### 2.1.2. Penyakit Alergi Pernapasan

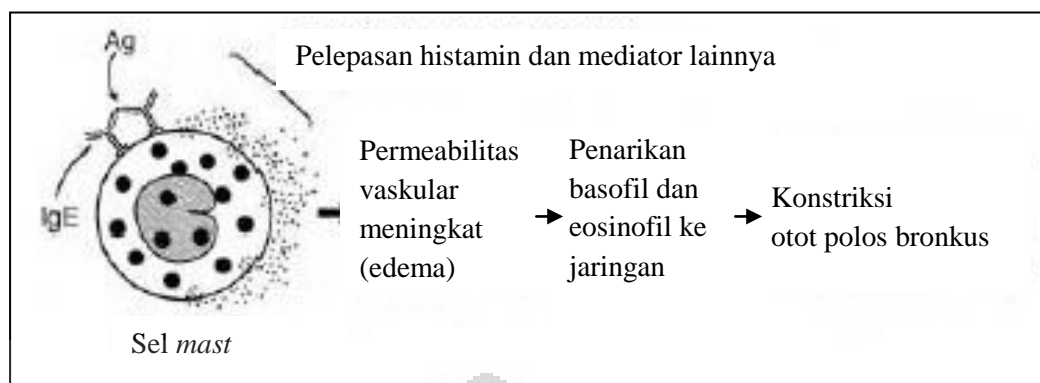
Penyakit alergi pernapasan pada manusia, antara lain rinitis alergi dan asma. Rinitis alergi dihasilkan dari inflamasi mukosa nasal yang diperantarai IgE (Pawankar *dkk.* 2011: 3). Rinitis alergi adalah inflamasi mukosa saluran hidung dan sinus yang disebabkan alergi terhadap partikel yang terhirup, seperti debu, asap, dan serbuk sari yang terdapat di udara. Gejala utama rinitis alergi pada hidung yaitu hidung gatal, tersumbat, bersin-bersin, keluar ingus cair seperti air bening. Selain itu, seringkali rinitis alergi diikuti gejala pada mata, yaitu berair, kemerahan dan gatal. Selama ini dikenal dua jenis rinitis alergi, yaitu alergi musiman (*hay fever*) dan alergi abadi, yang terjadi sepanjang tahun. Rinitis alergi

disebabkan oleh alergen dari lingkungan luar, sedangkan rinitis alergi tahunan disebabkan oleh alergen dari dalam ruangan seperti tungau, debu, dan bulu hewan peliharaan. Gejala rinitis alergi biasanya disertai dengan penyakit asma (Kurniawan & Israr 2010: 3; Gunawan 2010: 1).

Gejala rinitis alergi (*hay fever*) dihasilkan oleh serbuk sari atau spora kapang yang terdapat di udara kemudian kontak dengan membran atas respiratori. Serbuk sari dapat berasal dari pohon maupun rerumputan. *Ragweed* (sejenis rerumputan) menghasilkan serbuk sari dalam jumlah banyak dan tumbuhan tersebut juga cukup tersebar sehingga gejala rinitis alergi juga ikut meningkat. Rinitis alergi musiman biasanya disebabkan oleh serbuk sari. Diagnosis penyakit tersebut dapat dilakukan berdasarkan insidensi penyakit musiman. Gejala penyakit dapat dikorelasikan dengan periode penyerbukan tumbuhan dalam suatu daerah (Boyd 1966: 450; Carpenter 1975: 274). Prevalensi rinitis alergi dilaporkan dalam penelitian Zainuddin (1999) berkisar antara 10% di Jepang, 20% di Thailand, 10--15% di Eropa, 10--20% di Amerika Utara dan Korea, serta 25% di New Zealand (Lumbanraja 2007: 1).

Penyakit asma berasal dari bahasa Yunani "*asthma*" yang berarti "sukar bernapas". Menurut Scadding dan Godfrey, asma merupakan penyakit yang disebabkan terhambatnya aliran udara dalam saluran napas paru yang bermanifestasi sebagai serangan batuk berulang atau mengi (*bengek/wheezing*) dan sesak napas yang biasa terjadi di malam hari (Oemiati *dkk.* 2010: 41). Asma dapat timbul pada berbagai usia dengan derajat berbeda dan dapat terjadi pada laki-laki maupun perempuan (Barus *dkk.* 2003: 39; Pawankar *dkk.* 2011: 3).

Penyakit asma ditandai dengan gejala kesulitan benafas dan disertai dengan mengi atau bunyi nafas seperti siulan yang dihasilkan dari adanya gangguan yang menghalangi perjalanan udara dalam bronkiolus. Gangguan pernapasan tersebut bersifat kronis dan disebabkan oleh penyempitan saluran pernapasan yang berhubungan dengan hiperreaktivitas otot polos dan inflamasi yaitu hipersekresi mukus, edema dinding saluran pernapasan, deskuamasi epitel, dan infiltrasi sel inflamasi (Anupama *dkk.* 2001: 35; Barus *dkk.* 2003: 39). Mekanisme penyakit asma dapat dilihat pada gambar 2.1.2.



Gambar 2.1.2. Mekanisme penyakit asma

[Sumber: Cruse & Lewis 2003: 363, diterjemahkan sesuai aslinya.]

Asma dapat dibedakan menjadi asma alergik dan non-alergik. Tipe asma non-alergik (asma intrinsik) dihasilkan oleh faktor asing di dalam saluran pernapasan penderita. Sedangkan tipe asma alergik disebabkan oleh antigen inhalan atau berasal dari hirupan udara yang juga merupakan agen penyebab rinitis alergi, bersama-sama dengan obat tertentu dan bahan biologis yang terhirup oleh pekerja laboratorium. Beragam makanan juga berpotensi memicu serangan asma, misalnya telur, tepung terigu, dan susu (Carpenter 1975: 275; Cruse & Lewin 2003: 24 & 98).

Asma adalah penyakit inflamatori kronik jangka panjang dari saluran pernapasan, berhubungan dengan respon berlebihan oleh saluran pernapasan dan aliran udara yang terganggu dan seringkali kambuh, baik spontan maupun dengan pengobatan. Saat tidak terkontrol, asma dapat menyebabkan kematian dan sangat mengganggu aktivitas normal sehingga sangat memengaruhi kualitas kehidupan seseorang (Pawankar *dkk.* 2011: 3).

Studi epidemiologi secara konsisten menunjukkan bahwa asma dan rinitis alergi sering ditemukan bersamaan pada satu penderita sehingga dianggap merupakan satu penyakit saluran pernapasan. Inflamasi mukosa nasal dan bronkus berperan dalam patogenesis asma dan rinitis. Studi patofisiologi menyokong adanya hubungan erat antara rinitis dan asma, meskipun ada perbedaannya. Saluran pernapasan atas dan bawah diduga dipengaruhi oleh suatu proses inflamasi yang serupa, yang mungkin dapat menetap dan diperberat oleh mekanisme yang saling berhubungan tersebut (Rengganis 2004: 5).

### 2.1.3. Penyakit Alergi Kulit

Penyakit alergi pada kulit dapat berupa dermatitis dan urtikaria. Dermatitis atopi adalah reaksi eksim kronik pada kulit yang ditandai oleh *hyperkeratosis* dan *spongiosis* terutama pada anak-anak dengan kecenderungan genetik menjadi alergi. Dermatitis seringkali diikuti oleh kenaikan level serum IgE yang tidak terbukti menghasilkan lesi pada kulit (Cruse & Lewis 2003: 69).

Urtikaria (biduran) ditandai dengan timbulnya bulatan seperti bercak pada kulit berwarna merah, terasa sangat gatal, terdapat pada area kulit yang meluas, dan seringkali terlihat berwarna pucat pada pusat bercak (Rockoff & Cole 2011:1). Urtikaria dapat terjadi akibat kontak dengan bahan dalam lingkungan kerja yang menimbulkan urtikaria alergi Tipe I (lateks) atau urtikaria non-alergi. Faktor fisik lingkungan kerja seperti tekanan, panas, dingin, dan lain-lain dapat juga menimbulkan urtikaria fisik atau urtikaria non-alergi (Baratawidjaja 2004: 9).

### 2.1.4. Penyakit Alergi Lainnya

Beberapa obat dapat menimbulkan efek samping yang merugikan dan obat tertentu dapat memicu reaksi alergi. Pada reaksi alergi, sistem imunitas tubuh salah bereaksi terhadap obat sehingga menimbulkan respons untuk melawannya. Sistem imun mengenali obat sebagai substansi asing dan tubuh menghasilkan zat kimia berupa sejumlah besar histamin untuk mengeluarkan obat dari dalam tubuh (Rockoff & Cole 2011: 1).

Alergi obat merupakan reaksi hipersensitif terhadap suatu obat, seperti *penicillin*. Beberapa obat dikenal berperan sebagai haptens yang berikatan dengan protein *carrier* pada kulit atau jaringan lainnya melalui ikatan kovalen untuk menginduksi sintesis IgE. Hapten adalah molekul berukuran relatif kecil sehingga tidak dapat menghasilkan respons imun saat diinjeksi ke tubuh hewan tetapi dapat bereaksi dengan antibodi spesifik apabila diberikan secara *in vitro*. Respons imun dapat terjadi saat hapten berikatan dengan protein *carrier*. Ikatan antara hapten dan *carrier* menimbulkan respons imun, baik oleh antibodi maupun limfosit T (Cruse & Lewis 2003: 206 & 266; Roitt & Delves 2001: 327).



### 2.1.5. Faktor Genetika Penyebab Alergi Atopi

Alergi ditimbulkan oleh interaksi antara faktor genetik dan lingkungan. Terdapat kecenderungan genetik tinggi terhadap perkembangan hipersensitivitas tipe cepat. Beberapa kerentanan gen dikaitkan dengan atopi. Atopi adalah peningkatan sensitivitas sebagai hasil peningkatan antibodi IgE spesifik terhadap alergen lingkungan yang umum seperti tungau, serbuk sari, dan bulu hewan, yang dipengaruhi oleh kekerabatan dan banyak lokus gen. Gen-gen tersebut memengaruhi langkah berbeda pada perkembangan dan reaksi hipersensitivitas tipe cepat (Abbas *dkk.*, 2010: 442; Rengganis *dkk.* 2008: 328).

Organ target atopi dapat berbeda-beda, bahkan pada individu atopi dalam satu keluarga yang sama. Beberapa region kromosom teridentifikasi penting pada penyakit alergi atopi, antara lain kromosom 5q dan 11q (Tabel 2.1.3). Gen yang mengkode kerentanan terhadap asma dan dermatitis atopi berada pada kromosom 11q12-13. Gen tersebut mengkode pembentukan reseptor subunit  $\beta$  IgE (Fc $\epsilon$ RI) (Abbas *dkk.*, 2010: 442; Rifa'i 2011: 11).

Kromosom 5q31-33 membawa gen-gen yang menyebabkan terjadinya kerentanan pada penyakit dermatitis dan asma atopi. Pertama, terdapat bagian *cluster* gen berpautan kuat yang mengkode sitokin yang diperlukan untuk meningkatkan respon Th2, yaitu gen yang diperlukan untuk melakukan *class switching* pada pembentukan IgE, pertahanan hidup eosinofil, dan proliferasi sel *mast*. Kelompok gen tersebut meliputi gen yang mengkode pembentukan IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, dan GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*). Dalam hal tertentu, variasi genetik pada bagian promotor gen pengkode IL-4 berasosiasi dengan peningkatan IgE pada suatu individu. Gen lain yang diduga menyebabkan kerentanan terhadap asma dan dermatitis adalah gen penyandi reseptor  $\beta$ 2-adrenergik. Reseptor  $\beta$ 2-adrenergik meregulasi perubahan kontraksi otot polos terhadap ligan endogen maupun ligan dari obat-obatan (Abbas *dkk.*, 2010: 456; Rifa'i 2011: 11--12).

Tabel 2.1.3. Beberapa lokasi kromosom dan gen-gen berhubungan dengan atopi

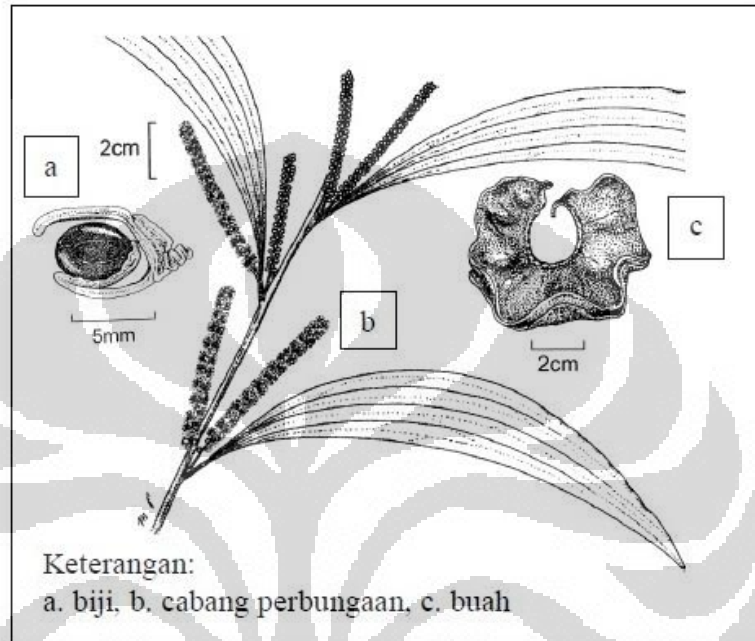
Lokasi kromosom	Gen kandidat	Dugaan peranan produk gen terhadap timbulnya penyakit
5q	<i>Cluster</i> gen sitokin (IL-4, IL-5, IL-13), CD14, reseptor $\beta$ 2-adrenergik	IL-3 dan IL-4 mempromotori <i>switching</i> IgE, IL-5 mempromotori pertumbuhan dan aktivasi eosinofil; CD14 merupakan komponen reseptor lipopolisakarida yang memengaruhi keseimbangan Th1 dan Th2 dalam merespon antigen; reseptor $\beta$ 2-adrenergik meregulasi kontraksi otot polos
6p	Kelas II MHC ( <i>Major Histocompatibility Complex</i> )	Beberapa alel meregulasi respon sel T terhadap alergen
11q	Rantai Fc $\epsilon$ RI $\beta$	Perantara aktivasi sel <i>mast</i>
12q	Faktor sel punca ( <i>stem cell</i> ), interferon- $\gamma$ , STAT6	Faktor sel punca meregulasi pertumbuhan dan diferensiasi sel <i>mast</i> ; interferon- $\gamma$ melawan kerja IL-4; STAT6 memerantarai transduksi sinyal IL-4
16	Rantai $\alpha$ reseptor IL-4	Subunit reseptor IL-4 dan IL-13
20p	<i>ADAM33</i>	Metalloproteinase yang terlibat dalam pembentukan kembali jalur udara
2q	<i>DPP10</i>	Peptidase yang meregulasi aktivitas kemokin dan sitokin
13q	<i>PHF11</i>	Regulator transkripsi yang terlibat dalam ekspansi klonal sel B dan ekspresi Ig

[Sumber: Abbas *dkk.* 2010: 456, diterjemahkan sesuai aslinya.]

## 2.2. Tanaman Akasia

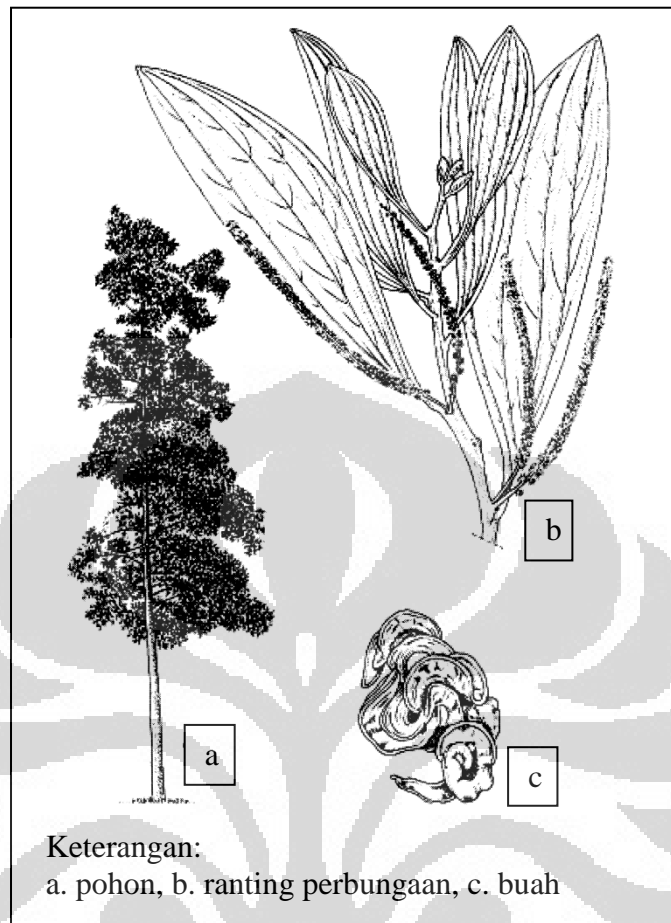
Tanaman akasia memiliki beberapa spesies, antara lain *Acacia auriculiformis* (A. Cunn. ex Benth, 1999) dan *Acacia mangium* (Willd, 1999). *Acacia auriculiformis* merupakan tumbuhan asli Australia Utara, Papua Nugini,

dan Indonesia Timur. Pohon akasia tersebut dapat ditanam di berbagai tempat di dunia sebagai pepohonan hutan dan telah ditanam di berbagai tempat, termasuk Florida (PIER, 2002). Serbuk sari *Acacia auriculiformis* dapat menyebabkan alergi dengan potensi sebesar 5,9% (Rengganis & Ramadian 2011: 1).



Gambar 2.2.1. Morfologi *Acacia auriculiformis*  
[Sumber: Joker 2000: 1, diterjemahkan sesuai aslinya.]

*Acacia auriculiformis* memiliki tinggi mencapai 15 meter (50 kaki) dan memiliki persebaran yang rapat. Pohon tersebut memiliki bentuk daun sederhana seperti sabit dan hijau sepanjang tahun (*evergreen*). Morfologi *A. auriculiformis* dapat dilihat pada gambar 2.2.1. Daun *A. auriculiformis* sederhana dan tereduksi hingga terbentuk filodia, yaitu tangkai yang menyerupai daun yang pipih. Bunga *A. auriculiformis* ringan, tumbuh pada aksil daun berupa *spike* warna kuning hingga oranye atau dalam suatu tandan pada ujung batang (Starr *dkk.* 2003: 1--2). *Acacia auriculiformis* dapat hidup pada kondisi lingkungan yang sulit di daerah tropis. Tingkat pertumbuhan awal yang cepat, kemampuan untuk fiksasi nitrogen, toleransi terhadap infertilitas, tanah asam dan basa, dan adaptif terhadap lingkungan yang kering, membuat tanaman tersebut cocok untuk rehabilitasi tanah yang rusak (Joker 2000: 1).



Keterangan:  
a. pohon, b. ranting perbungaan, c. buah

Gambar 2.2.2. Morfologi *Acacia mangium*  
[Sumber: Joker 2000: 1, diterjemahkan sesuai aslinya.]

*Acacia mangium* merupakan tumbuhan asli Queensland Utara di Australia, melalui Papua Nugini menuju Indonesia, yaitu propinsi Irian Jaya dan Maluku. Pohon mangium dapat tumbuh cepat, memiliki masa hidup yang singkat (30--50 tahun), dan adaptif terhadap kondisi tanah asam (pH 4,5--6,5) pada dataran rendah daerah tropis yang lembab. Pohon tersebut hijau sepanjang tahun (*evergreen*) dan tinggi mencapai 30 meter. Morfologi *A. mangium* dapat dilihat pada gambar 2.2.2. Filodia *A. mangium* berukuran besar dengan panjang mencapai 25 cm dan lebar 3--10 cm, berwarna hijau gelap, dan memiliki empat saraf longitudinal (*Acacia auriculiformis* memiliki tiga saraf longitudinal). Saat juvenile, memiliki daun majemuk. Bunga biseksual berwarna putih atau krem dalam *spike* yang memiliki panjang 10 cm, dapat tunggal atau berpasangan pada ujung sudut daun. *Acacia mangium* memiliki sruktur polong yang terbentuk setelah masa berbunga.

Masa berbunga *A. mangium* di Australia selama bulan Februari hingga Mei dan pematangan biji bulan Oktober hingga Desember, sedangkan di Indonesia buah masak dari bulan Juli (Joker 2000; 1--2).

Akasia perlu dipertimbangkan kembali sebagai pohon peneduh karena ternyata serbuk sari tanaman tersebut berpotensi menyebabkan reaksi sensitivitas pada manusia. Serbuk sari akasia berpotensi sebagai bahan alergen untuk uji tusuk kulit di Indonesia (Rengganis 2009: iii). Penelitian Baratawidjaja *dkk.* menemukan bahwa ekstrak protein serbuk sari akasia asal Singapura menimbulkan reaksi positif pada uji tusuk kulit sebanyak 12,15% penderita alergi di Jakarta (*lihat Rengganis dkk.* 2008: 328--329).

### 2.3. Tanaman Kelapa Sawit

Tanaman kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) (Gambar 2.3) merupakan tumbuhan perenial (sepanjang tahun) dari jenis palma yang dapat tumbuh hingga 8 meter. Antara daun-daun kelapa sawit terkumpul banyak bahan organik yang merupakan tempat yang cocok bagi pertumbuhan tanaman paku-pakuan dan epifit sehingga tanaman kelapa sawit muda yang dibiarkan liar terlihat dikelilingi oleh jaringan tangkai dan daun-daun hijau. Masa berbunga kelapa sawit yaitu sepanjang musim semi hingga musim panas. Buah kelapa sawit yang telah masak mulai dari berwarna hijau, kuning, hingga merah atau hitam. Reproduksi kelapa sawit menggunakan biji. Buah pertama dapat dipanen saat usia pohon 3--4 tahun setelah ditanam. Satu tandan buah kelapa sawit masak selama 5--6 hari setelah polinasi (Stang 2009: 1; van Heurn 1985: 1).

Perbungaan kelapa sawit berkembang pada ketiak-ketiak daun. Bunga-bunga kelapa sawit berbentuk bulir majemuk dan tidak bertangkai. Bulir-bulir tandan betina berakhir pada suatu duri. Tandan bunga jantan terlihat kurang padat (kompak) jika dibandingkan dengan tandan bunga betina. Kepala sari dan benang sari pada bunga jantan menghasilkan serbuk sari kekuning-kuningan. Serbuk sari dalam udara lembab akan segera mati. Penyerbukan bunga betina oleh serbuk sari dapat terjadi dengan perantaraan angin ataupun serangga. Aroma kuat bunga menarik serangga-serangga kecil, seperti lebah. Kunjungan serangga pada bunga

betina agak kurang dibandingkan pada bunga jantan kelapa sawit di Indonesia. Berdasarkan fakta tersebut, penyerbukan dan pembentukan buah kelapa sawit juga dapat dibantu angin. Hal tersebut dibuktikan dengan adanya serbuk sari di udara selama periode pembungaan (van Heurn 1985: 10--13).



Gambar 2.3. Tanaman kelapa sawit  
[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Penelitian Chew (2000) menunjukkan bahwa serbuk sari kelapa sawit merupakan alergen luar rumah tertinggi di Singapura dan sensitivitas manusia terhadap serbuk sari tanaman tersebut dilaporkan sebesar 39,8%. Kelapa sawit banyak ditanam di Jakarta sebagai pohon peneduh dan bagian dari pertamanan kota sehingga ada kemungkinan pajanan serbuk sari kelapa sawit sudah terjadi pada penduduk Jakarta. Adapun areal perkebunan kelapa sawit sangat luas di Indonesia, terutama di Pulau Sumatera dan Kalimantan (Rengganis 2009: 40). Serbuk sari kelapa sawit mengandung glikoprotein yang merupakan alergen kuat penyebab rinitis alergi di Malaysia dan Singapura (Kimura *dkk.* 2002: 820).

#### 2.4. Serbuk Sari

Serbuk sari merupakan gametofit jantan pada kelompok tumbuhan tingkat tinggi yaitu Gymnospermae dan Angiospermae. Struktur jantan atau stamen

berada di sekitar putik dan terdiri atas *anther* (kepala sari) yang bertengger pada filamen (tangkai sari). Kepala sari mengandung sejumlah besar sel-sel induk mikrospora. Masing-masing sel induk mikrospora melakukan pembelahan meiosis untuk membentuk uninukleat yaitu mikrospora bersel tunggal. Mikrospora selanjutnya menjadi terbungkus dalam suatu dinding yang tebal dan kuat, dan nukleus membelah secara mitosis membentuk dua sel, yaitu sel pembuluh (*tube cell*) dan sel generatif, di dalam dinding spora. Serbuk sari yang telah matang memiliki sel pembuluh dan sel generatif. Serbuk sari yang telah matang dilepaskan dari *anther* dan dibawa ke permukaan stigma (kepala putik) oleh serangga, angin, atau vektor lainnya (Hopkins & Huner 2009: 279--280; Mahmoudi *dkk.* 2011: 32).

Serbuk sari merupakan badan yang amat lembut, jika terpisah-pisah mudah sekali beterbangan karena tiupan angin, namun ada pula yang bergumpal-gumpal. Butir-butir serbuk sari seringkali juga berperekat sehingga mudah melekat pada tubuh hewan, misalnya serangga yang datang mengunjungi bunga tersebut dan membantu penyerbukan bunga. Serbuk sari tersusun atas dinding luar dengan lapisan eksternal (eksin) dan lapisan dalam (intin) yang berbatasan dengan sitoplasma. Eksin terdiri atas bahan yang sangat resisten disebut *sporopollenin*, berkembang sebagian dari tapetum dan sebagian dari mikrospora. Intin terdiri atas bahan selulosa dan pektin. Serbuk sari memiliki diameter berkisar antara 20--250  $\mu\text{m}$ . Karakteristik serbuk sari yaitu ukuran, jumlah lubang, dan *sculpture* (ukiran), dapat digunakan untuk identifikasi taksonomi tumbuhan berbunga (Mahmoudi *dkk.* 2011: 32; Raven *dkk.* 1992: 388 & 390; Tjitrosoepomo 1985: 177).

Serbuk sari merupakan salah satu alergen utama yang telah diketahui secara umum. Reaksi hipersensitivitas tipe cepat dapat terjadi saat serbuk sari kontak dengan permukaan mukosa sehingga memicu protein yang tersimpan dalam eksin dan intin dilepaskan melalui aperture (semacam celah atau liang) pada dinding luar serbuk sari. Kapasitas serbuk sari dalam menyebabkan sensitivitas pada manusia adalah universal, tetapi dampak alergen tersebut juga dipengaruhi oleh kondisi geografis, suhu, dan iklim. Konsentrasi serbuk sari di atmosfer bergantung pada vegetasi dan iklim yang sesuai dengan zona

geografisnya. Serbuk sari penyebab alergi dapat ditemukan pada jenis rumput-rumputan (*grass*); rumput liar (*weed*) seperti Famili Compositae (*Ambrossia*) dan Urticaeae; pepohonan seperti pohon *birch* dan Famili Betulaceae lainnya, Oleaceae (pohon *ash* yang berkayu keras dan pohon zaitun); Fagaceae (pohon ek); dan pohon cedar. Pepohonan umumnya melakukan penyerbukan (polinasi) pada akhir musim dingin dan permulaan musim semi. Durasi dan intensitas periode penyerbukan seringkali berubah dari tahun ke tahun sehingga terkadang menyulitkan diagnosis. Rata-rata ukuran serbuk sari bervariasi dari 10--100  $\mu\text{m}$ . Penumpukan (deposisi) serbuk sari di dalam nostril menyebabkan penyakit rinitis alergi (Bousquet 2001: S163--S164).

## 2.5. *Sodium Dodecyl Sulfate Poliacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE)

*Sodium Dodecyl Sulfate Poliacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) merupakan elektroforesis gel poliakrilamid untuk memisahkan molekul protein berdasarkan berat molekulnya. Poliakrilamid terbentuk dari hasil polimerisasi monomer akrilamid  $(\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2)_2 - \text{CH}_2$  menjadi poliakrilamid dan memiliki ikatan silang N' N' *methylene bisacrylamide*  $(\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2)_2 - \text{CH}_2$ . Medium penyangga (*buffer*) dibuat dari reaksi polimerisasi akrilamida dan bis-akrilamida yang dikatalisis oleh amonium persulfat (APS) dan tetrametiletildiamin (TEMED). Gel yang digunakan pada SDS-PAGE adalah *running (resolving) gel* dan *stacking gel*. Persentase akrilamid yang digunakan untuk *resolving* protein bergantung pada berat molekul protein yang akan dipisahkan (Tabel 2.5). Elektrisitas dari gel poliakrilamid tersebut digunakan untuk pergerakan protein pada gel. Proses tersebut dinamakan *polyacrylamide gel electrophoresis* (PAGE) (Alberts dkk. 2002: 485; Bintang 2010: 40; Fairbanks & Andersen 1999: 282).

*Sodium dodecyl sulfate* (SDS),  $[\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{SO}_3^-]\text{Na}^+$ , yang digunakan pada teknik tersebut merupakan deterjen yang bersifat amfifatik sehingga mampu menghambat interaksi hidrofobik antarmolekul serta melarutkan molekul yang hidrofobik tersebut. *Sodium dodecyl sulfate* (SDS) berfungsi untuk mendenaturasi protein dalam bentuk protein kompleks (kuarterner, tersier, dan



sekunder) menjadi bentuk yang lebih sederhana (primer atau linear). Denaturasi protein dengan cara merusak struktur tiga dimensi protein terjadi melalui reduksi ikatan disulfida membentuk gugus sulfidril yang dapat mengikat SDS sehingga protein bermuatan sangat negatif dan bergerak ke arah kutub positif. Muatan negatif pada protein menyebabkan pergerakan molekul protein sepanjang gel poliakrilamid selama elektroforesis (Bintang 2010: 40; De Angelis *dkk.* 2010: 2129; Seidman & Moore 2000: 583; Voet & Voet 1990: 98).

Tabel 2.5. Persentase akrilamid yang digunakan dalam SDS-PAGE untuk *resolving* protein dengan berat molekul berbeda

Berat molekul protein	Poliakrilamid yang digunakan (%)
200.000-60.000	5,0%
120.000-30.000	7,5%
75.000-18.000	10,0%
60.000-15.000	12,5%
45.000-12.000	15,0%

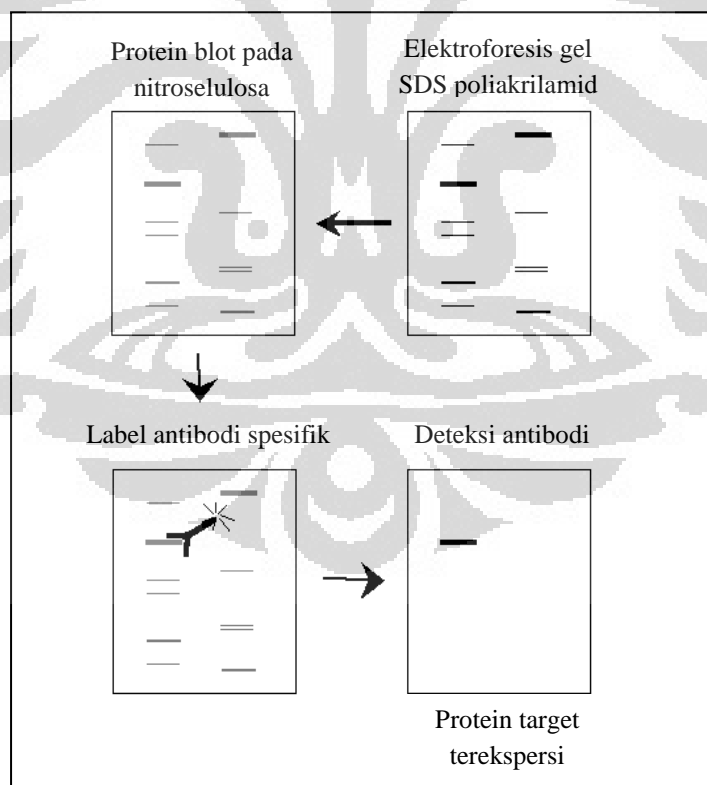
[Sumber: Copeland 1994: 60.]

Visualisasi pita (*band*) protein dilakukan menggunakan pewarnaan gel dengan zat pewarna yang dapat berikatan dengan molekul protein. *Coomassie brilliant blue* (CBB) adalah pewarna yang paling banyak digunakan karena memiliki beberapa kelebihan, antara lain prosesnya cepat, mudah digunakan, dapat mengikat protein secara spesifik dengan ikatan kovalen, dan biayanya relatif murah. Pewarnaan dengan CBB dilakukan dengan cara merendam gel dalam larutan asam alkoholik sehingga gel SDS terwarnai menjadi biru. Pewarna tersebut mengikat protein dalam gel melalui denaturasi protein tersebut dan membentuk kompleks antara pewarna dan protein. Kelebihan pewarna dapat dibuang dengan pencucian gel dalam larutan asam atau *destaining* elektroforesis. Protein dalam jumlah mikrogram dapat terdeteksi. Selain pewarnaan CBB, terdapat pewarnaan *silver stain* (perak nitrat). Pita-pita dengan kandungan protein yang lebih rendah dapat divisualisasikan dengan pewarnaan perak nitrat karena sensitivitas pewarna tersebut lebih tinggi yaitu sekitar hampir 50 kali lebih sensitif dibandingkan pewarnaan CBB, tetapi lebih sulit untuk dikerjakan. Pengukuran

berat molekul polipeptida protein serbuk sari dapat dipakai untuk mengetahui apakah protein tersebut termasuk protein alergenik. Analisis SDS-PAGE dapat menduga berat molekul polipeptida suatu protein (Boyer 1993: 139; Copeland 1994: 68; Rengganis 2009: 34; Voet & Voet 1990: 90).

## 2.6. Western Blotting

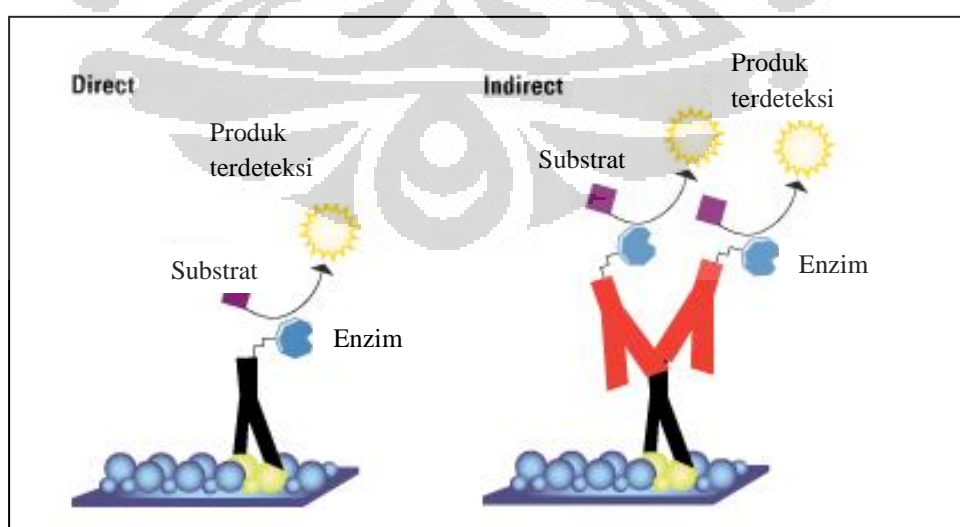
*Western blotting (immunoblotting)* merupakan teknik imunologik untuk analisis penentuan protein dalam sampel biologik, diperkenalkan pertama kali oleh Towbin *dkk.* pada tahun 1979. *Western blotting* digunakan untuk memeriksa molekul dalam campuran biokimiawi yang kompleks. Uji tersebut sering digunakan untuk menentukan adanya antibodi dalam serum pasien dan menganalisa susunan DNA (*deoxyribonucleic acid*) pada gen tertentu. Prinsip kerja *western blotting* dapat dilihat pada gambar 2.6.1.



Gambar 2.6.1. Prinsip kerja *western blotting*  
[Sumber: Davidson 2001: 1, diterjemahkan sesuai aslinya.]

Cara tersebut meliputi pemisahan protein dengan elektroforesis, transfer protein dari gel elektroforesis ke membran dengan *blotting* (secara kapiler) dan akhirnya terdeteksi protein target yang terikat secara enzimatik atau dengan antibodi yang dilabel radioaktif protein spesifik (Baratawidjaja 2006: xx, 506--507; Thermo Scientific 2011: 1).

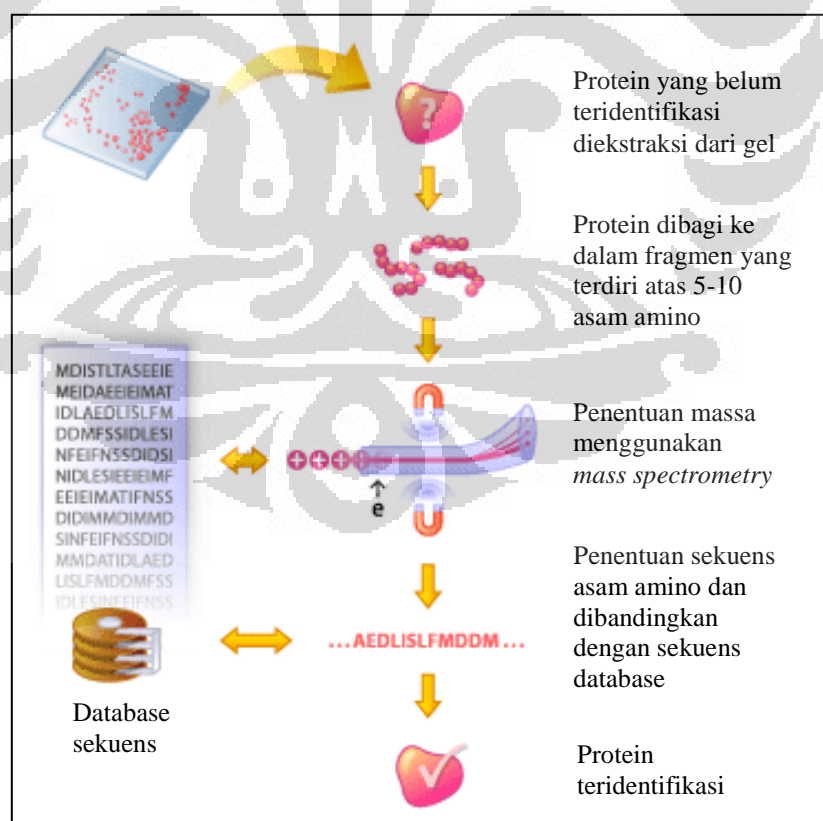
Prosedur pendeteksian protein target dapat dilakukan secara *direct* dan *indirect*. Pendeteksian secara *direct* (langsung) tidak membutuhkan antibodi sekunder karena antibodi primer sudah langsung dilabeli oleh enzim maupun pewarna *fluorescent*. Pendeteksian protein alergen dalam penelitian dilakukan secara *indirect* (tidak langsung) yaitu antibodi primer ditambahkan lebih dahulu supaya berikatan dengan protein antigen dalam sampel, lalu diikuti penambahan antibodi sekunder sehingga antibodi sekunder dapat langsung berikatan dengan antibodi primer. Label yang digunakan adalah konjugat enzim (substrat) *chemiluminescent horseradish peroxidase* (HRP). Perbandingan prosedur pendeteksian protein antara *direct* dan *indirect* dapat dilihat pada gambar 2.6.2. Pendeteksian protein target secara *indirect* lebih banyak digunakan karena memiliki kelebihan, antara lain antibodi sekunder dapat memperkuat sinyal pendeteksi, pelabelan tidak memengaruhi imunoreaktivitas antibodi primer, dan satu antibodi sekunder dapat digunakan untuk beberapa antibodi primer (Thermo Scientific 2011: 1).



Gambar 2.6.2. Perbandingan pendeteksian protein *direct* dan *indirect* [Sumber: Thermo Scientific 2011: 1.]

## 2.7. Mass Spectrometry

*Mass spectrometry* digunakan untuk karakterisasi protein yang melibatkan ionisasi molekul target dalam suatu ruang hampa udara dan ukuran massa ion-ion yang akurat. Skema identifikasi protein menggunakan *mass spectrometry* dapat dilihat pada Gambar 2.7. *Mass spectrometer* terdiri atas tiga komponen utama, yaitu *ionizer*, *mass analyzer*, dan *ion detector*. Komponen *ionizer* berperan dalam mengubah anilat menjadi ion fase gas dan *mass analyzer* berperan dalam pemisahan ion-ion berdasarkan rasio massa dengan muatan ( $m/z$ ). Secara umum, molekul berukuran besar seperti protein dan asam amino didegradasi melalui prosedur ionisasi, tetapi saat ini telah dikembangkan instrumen sensitif yang dapat mengionisasi molekul-molekul besar tanpa degradasi signifikan atau disebut *soft ionization*. Hal tersebut memungkinkan pengukuran massa dari keseluruhan protein dan fragmen peptida sehingga *database* protein yang dihasilkan dapat ditelusuri untuk identifikasi protein tertentu (Primrose & Twyman 2006: 431).



Gambar 2.7. Skema identifikasi protein menggunakan *mass spectrometry* [Sumber: Antler 2011: 1, diterjemahkan sesuai aslinya.]

## BAB 3 METODE PENELITIAN

### 3.1. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Genetika, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia (FMIPA UI) dan Laboratorium Nanotechnology Innovation Centre, Biomaterials Unit, Biosystem Control Group, National Institute for Material Science (NIMS), Sengen 1-2-1, Tsukuba, Jepang. Penelitian dilaksanakan selama enam bulan, mulai dari bulan Agustus 2011 hingga Januari 2012.

### 3.2. Alat

Peralatan yang digunakan selama penelitian berlangsung adalah gunting besar; saringan santan; mikroskop cahaya [BOECO], alat pemanas listrik, kaca objek (*object glass*), kaca penutup (*cover glass*), kaca arloji, sonde, pipet tetes, Corning *cryotube* (kapasitas volume 15 ml dan 30 ml) [Greiner Bio-One], Cryofab *tube* [Thermos]; pistil; mortar; *digital homogenizer* [Iuchi]; *tube* Eppendorf (kapasitas volume 1.5 ml dan 5 ml), *centrifuge tubes mini with triple seal cap* (kapasitas volume 25 ml dan 100 ml) [IWAKI], *double alumi bath* ALB-301 [IWAKI], TVN480DA *Incubator* 37°C [ADVANTEC], *refrigerated microcentrifuge* AR050-12 [TOMY], lemari pendingin bersuhu 4°C dan -30°C [SANYO]; lemari pendingin bersuhu -80°C [HITACHI]; botol gelas (kapasitas volume 250 ml, 500 ml, dan 1000 ml) [PYREX], *tube mixer* TM-2000 [Ecan], *capsulefuge* PMC-060 [TOMY], mikropipet (kapasitas volume 10 µl, 20 µl, 200 µl, dan 1000 µl) [GILSON], filter tip [Greiner Bio-One], *GEL tip round* (kapasitas 1-200 µl); *analytical weight machine* CP2202S [Sartorius], pH meter F-51 [HORIBA], 5 ml *syringes* dengan ujung jarum berukuran 0.50 x 25 mm [TERUMO], *magnetic stirrer* REXIM RS-4DR [AS ONE], *microplate reader* MTP-880 [CORONA], *laptop* [Dell], mikroskop [Leica], *pump piston* [FALCON], *test sieve* (125 µ/m, 63 µ/m, dan 45 µ/m) [SANPO], mortar dan pistil

[RNase/DNase & PYROGEN SAFE], SDS-PAGE apparatus AE-6531 mini PAGE systems [ATTO], *in vitro shaker wave* SI [TAITEC], alat rotasi MTR-103 [AS-ONE]; sonikator *ultraS homogenizer* VP-5<sup>S</sup> [TAITEC]; *vacuum dry machine* [Freezer Dyer VARTIS FREEZMOBILE 125L], *semi-dry blotting Horiz Blot* 2M/4M Powered BLOTmini [ATTO], *cutting map* (berukuran 32 x 10 cm); mistar; *cutter*; kamera digital 12.1 MP [Canon], *Ultrafree-MC centrifugal filter devices* (kapasitas 0.5 ml) [MILLIPORE]; 96 well cell culture plat [Greiner Bio-One]; alat *exposure* PL-B berukuran 20 x 25 cm [OKAMOTO]; sudip; wadah kaca; wadah plastik; batang penjepit plastik; batang penjepit logam; rak pengering kertas film; *ice box* sterofoam; rak *tube* (kapasitas *tube* 1.5 ml dan 5.0 ml); rak Corning *cryotube* (kapasitas *tube* 15 ml dan 30 ml); *stop watch* [SEIKO].

### 3.3. Bahan

#### 3.3.1. Sampel Serbuk Sari

Sampel serbuk sari yang digunakan sebagai objek penelitian terdiri atas sampel serbuk sari yang dikumpulkan langsung dari serbuk sari dalam penelitian ini dan ekstrak protein serbuk sari sisa hasil penelitian sebelumnya (Renggans, 2009). Sampel serbuk sari dikumpulkan dari tanaman akasia (*Acacia auriculiformis* dan *Acacia mangium*) dan kelapa sawit (*Elaeis guineensis*). Ekstrak protein sisa hasil penelitian sebelumnya adalah ekstrak protein serbuk sari kelapa genjah (*Cocos nucifera*), jagung (*Zea mays*), pinus (*Pinus merkusii*), dan kelapa sawit (*Elaeis guineensis*).

#### 3.3.2. Sampel Serum

Sampel serum yang digunakan sebagai objek penelitian terdiri atas serum individu normal dan individu penderita alergi. Pengkoleksian serum dilakukan oleh Dr. Iris Renggans, SpPD-KAI dari Divisi Alergi dan Imunologi Klinik, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia (2011). Penanganan sampel dan

daftar serum dilakukan oleh Dr. Arief Budi Witarto. Daftar serum manusia yang digunakan dalam penelitian dapat dilihat pada tabel 3.3.

Tabel 3.3. Daftar serum manusia untuk studi alergen serbuk sari Indonesia

Kode	Inisial	Seks	Usia	Kondisi klinis
N1	I	P	43	Individu normal
N2	N	L	31	Individu normal
N3	S	P	60	Individu normal
1	AM	L	59	Dermatitis / Rinitis alergi
2	MZ	L	29	Dermatitis / Rinitis alergi
3	MK	P	42	Dermatitis / Rinitis alergi
4	PS	P	43	Dermatitis / Asma bronkial / Urtikaria / Rinitis alergi
5	AW	P	49	Dermatitis / Rinitis alergi / Alergi obat
6	RRJ	L	56	Dermatitis / Rinitis alergi / Sinusitis
7	M	P	36	Dermatitis / Rinitis alergi
8	A	P	27	Dermatitis / Rinitis alergi
9	UMY	P	23	Dermatitis / Rinitis alergi
10	SY	P	23	Dermatitis / Rinitis alergi
11	WH	L	38	Dermatitis / Rinitis alergi
12	MD	P	33	Dermatitis / Rinitis alergi
13	DI	P	54	Dermatitis / Rinitis alergi
14	ZD	P	78	Dermatitis / Urtikaria
15	DHR	L	44	Dermatitis / Alergi obat / Alergi suplemen
16	JH	P	27	Dermatitis / Urtikaria / Mikosis
17	CF	P	27	Dermatitis / Urtikaria / Rinitis alergi / Mikosis
18	FA	P	30	Dermatitis / Urtikaria
19	OL	P	48	Dermatitis / Urtikaria
20	EC	P	41	Dermatitis / Urtikaria
21	JS	L	40	Dermatitis / Rinitis alergi
22	ML	P	40	Dermatitis / Rinitis alergi
23	MAK	P	26	Dermatitis / Rinitis alergi

Keterangan: L = Laki-laki; P = Perempuan

Alergi kulit : Dermatitis, Mikosis, Urtikaria

Alergi pernapasan : Rinitis alergi, Sinusitis

Alergi lain : Alergi obat, Alergi suplemen

### 3.3.3. Bahan dan Larutan Kimia

Bahan dan larutan kimia yang digunakan selama penelitian adalah kertas koran, plastik bersegel [Zip Lock]; sarung tangan [Kimberly-Clark]; akuades, larutan asetolisis, alkohol 95%, pewarna safranin, kertas saring/tisu, air miliQ, nitrogen cair; etanol 96%; NaCl 0.5 M; *absorbent paper* berukuran 85 x 90 mm [ATTO]; larutan penyangga PBS (*Phosphate Buffered Saline*) [Wako]; kaset dialisis Slide-A-Lyzer 2,000 MWCO (kapasitas volume 0.5--3.0 ml) [Thermo scientific]; larutan fenol Tris pH 8.8 *buffered* (TE *saturated phenol*); *extraction buffer* (0.1 M Tris-HCl pH 8.8, 5 mM EDTA, 20 mM DTT, 30% sukrosa); 0.1 M sodium asetat dalam methanol; 80% aseton; 10 mM DTT dalam 80% aseton; 2% SDS dalam 20 mM Tris-HCl; standar BSA (*Bovine Serum Albumin*) [Thermo Scientific]; standar berat molekul protein; 2X SDS/*sample buffer*; 1X SDS/*electrophoresis buffer*; gel elektroforesis e-PAGEL 10--20% dan 15% (18 wells) [ATTO]; *BlueStar Prestained Protein Marker* [NIPPON GENETICS EUROPE]; pewarna *Rapid stain CBB (Coomassie Brilliant Blue)* kit [Nacalai Tesque]; pewarna *Ez stain silver* [ATTO]; antibodi primer: Serum manusia sejumlah 3 serum individu normal dan 23 serum individu alergi masing-masing 1.5 ml; antibodi sekunder: Anti IgE-human IgEx ( $\epsilon$ -*chain specific*) *peroxidase antibody produce in goat* [SIGMA-ALDRICH]; membran nitroselulosa; Tween 20 [MP Biomedicals]; *Immunoblot blocking Reagent (non-fat dry milk)* [MILLIPORE]; *Clear blot membrane- $\rho$*  berukuran 85 x 90 mm [ATTO]; *Immobilon<sup>TM</sup> Western Chemiluminescent HRP substrate* [MILLIPORE]; kertas film X-ray [FUJIFILM]; kertas *seal* [PARAFILM]; *aluminium foil* [ASAHI]; plastik *wrap* [ASAHI].

## 3.4. Cara Kerja

### 3.4.1. Preparasi Sampel Serbuk Sari

Preparasi sampel serbuk sari dilakukan di Indonesia dan Jepang. Preparasi sampel serbuk sari yang dilakukan di Indonesia adalah pengumpulan sampel serbuk sari di lapangan. Pengumpulan sampel serbuk sari tanaman akasia



dilakukan di sekitar Universitas Indonesia, Depok, Jawa Barat. Sedangkan pengumpulan sampel serbuk sari tanaman kelapa sawit dilakukan di sekitar Universitas Indonesia, Depok, Jawa Barat (kelapa sawit I) dan areal pertamanan kompleks perumahan Permata Sentul, Bogor, Jawa Barat (kelapa sawit II).

Pengumpulan serbuk sari tanaman akasia dan kelapa sawit dilakukan berdasarkan metode Ching, yaitu serbuk sari diambil dari infloresens antesis yang dikumpulkan langsung dari bunga tanaman tersebut (*lihat Rengganis dkk. 2008: 329*). Infloresens tanaman tersebut dikeringkan di ruang terpisah bersuhu kamar (sekitar 25°C) sesuai jenis tanaman agar serbuk sari dari jenis tanaman berbeda tidak saling bercampur. Semua sampel serbuk sari disaring menggunakan saringan santan berukuran 225 lubang/cm<sup>2</sup> sehingga serbuk sari terpisah dari bagian bunga lainnya. Hasil penyaringan disimpan pada suhu -30°C dalam kemasan plastik bersegel [*zip lock*]. Sampel serbuk sari selanjutnya diamati di bawah mikroskop cahaya untuk diidentifikasi.

Preparasi sampel serbuk sari yang dilakukan di Jepang adalah penyaringan kembali sampel serbuk sari menggunakan saringan bertingkat dengan ukuran lubang lebih kecil yaitu 125 µm dan 63 µm (Gambar 3.4.1). Serbuk sari diayak dengan saringan bertingkat sehingga serbuk sari terpisah dari bagian bunga lainnya (Rengganis *dkk.* 2008: 329). Sampel serbuk sari selanjutnya diamati kembali di bawah mikroskop cahaya untuk diidentifikasi.



Gambar 3.4.1. Saringan bertingkat untuk serbuk sari [Sumber: Dokumentasi pribadi.]

### 3.4.2. Identifikasi Serbuk Sari

Sampel serbuk sari yang telah dikumpulkan diamati di bawah mikroskop cahaya untuk identifikasi morfologi serbuk sari dari masing-masing jenis tanaman. Pengamatan serbuk sari dapat dilakukan dengan membuat pembuatan preparat langsung menggunakan akuades atau pembuatan preparat menggunakan pewarnaan safranin. Pembuatan preparat langsung dilakukan dengan cara meneteskan 1--2 tetes akuades ke atas kaca objek kemudian dibubuhkan beberapa serbuk sari. Setelah itu ditutup dengan kaca penutup sambil ditekan-tekan, lalu diamati di bawah mikroskop.

Pembuatan preparat serbuk sari menggunakan pewarnaan safranin membutuhkan proses yang lebih lama dibandingkan pembuatan preparat langsung tanpa pewarnaan. Caranya yaitu sampel serbuk sari dipanaskan di dalam kaca arloji yang telah diberi akuades, di atas pemanas bersuhu 95°C--100°C. Sampel dipanaskan sampai air menguap, lalu ditambahkan 3--5 tetes larutan asetolisis sambil terus diaduk menggunakan sonde hingga pengotor terpisah. Kaca arloji dipindahkan dari pemanas dan campuran tersebut ditetesi ± 4 tetes alkohol. Hasilnya akan terlihat adanya pemisahan berupa batas lingkaran di tepi kaca arloji yang merupakan pengotor, sedangkan yang tersisa di tengah kaca arloji merupakan serbuk sari. Batas lingkaran tersebut dihisap dengan kertas saring/tisu. Setelah semua pengotor dibersihkan, serbuk sari tersebut ditambahkan satu tetes pewarna safranin, lalu diaduk, dan dibiarkan meresap. Serbuk sari dipindahkan ke atas kaca objek dan ditutup dengan kaca penutup, lalu gelembung air disisihkan dari serbuk sari dengan meratakannya menggunakan ibu jari. Pengamatan morfologi serbuk sari dilakukan di bawah mikroskop cahaya mulai dari perbesaran terkecil sampai perbesaran maksimum, yaitu 1000x. Morfologi serbuk sari yang diamati, antara lain jumlah, bentuk apertura, ketebalan eksin, dan bentuk tampilan dinding selnya (Mahmoudi *dkk.* 2011: 32; Stites *dkk.* 1997: 391).

### 3.4.3. Ekstraksi Protein Serbuk Sari

#### 3.4.3.1. Ekstraksi Protein Sampel

Sampel serbuk sari yang diekstraksi berupa serbuk sari akasia (*Acacia auriculiformis* dan *Acacia mangium*) dan kelapa sawit (*Elaeis guineensis*) yang sebelumnya sudah dipreparasi. Kualitas sampel, metode ekstraksi protein, dan kondisi umum ekstraksi protein merupakan faktor penting sebagai penentu keberhasilan analisis proteomik. Metode ekstraksi terbaik bukan hanya memperoleh jumlah protein yang besar dari sampel, tetapi juga dapat diaplikasikan pada tahapan analisis protein berikutnya yaitu *mass spectrometry* dan identifikasi protein. Secara umum, kondisi terbaik dalam mengisolasi protein adalah kadar protein yang tinggi, suhu rendah, dan pH mendekati netral. Kondisi tersebut penting diperhatikan untuk menghindari denaturasi protein (Bintang 2010: 233; Sheoran *dkk.* 2008: 99).

Metode *phenol extraction* merupakan salah satu metode ekstraksi dan pemisahan protein yang baik. Penelitian Sheoran *dkk.* (2008) membuktikan bahwa metode tersebut lebih baik dibandingkan metode *Iso-Electric Focusing (IEF) buffer* dan *Tris-HCl buffer* pada analisis proteomik serbuk sari tanaman tomat. Keunggulan metode *phenol extract* yaitu dalam hal pemisahan *two dimensional gel electrophoresis (2-DE)*, analisis *mass spectrometry*, dan identifikasi protein oleh *peptide mass fingerprinting (PMF)*. Materi non-protein berukuran besar yang berpotensi menurunkan kemurnian protein dapat terbuang melalui metode tersebut. Metode tersebut efisien untuk mencapai kondisi optimal dalam pemisahan dan identifikasi protein menggunakan 2-DE dan *mass spectrometry* (Sheoran *dkk.* 2008: 103--104).

Sampel serbuk sari diekstraksi menggunakan metode *phenol extract* (Sheoran *dkk.*, 2008) yang dimodifikasi. Beberapa modifikasi tersebut di antaranya jumlah sampel serbuk sari yang digunakan dalam penelitian sepuluh kali lebih banyak yaitu 0.25 gram sampel. Pelarut yang digunakan untuk presipitasi protein dari ekstrak fenol adalah metanol yang mengandung sodium asetat. Fungsi sodium asetat yaitu secara selektif melarutkan molekul polisakarida

non-ionik dan ionik berukuran kecil sehingga pelet yang terpresipitasi adalah protein yang bebas dari molekul lainnya (Clark, Jr & Switzer 1977: 74 & 219). Pada tahapan akhir, protein diekstraksi dengan larutan *buffer* Tris-HCl pH 8 yang mengandung 2% SDS (*sodium dodecyl sulfate*). Metode ekstraksi protein Tris-HCl *buffer* menggunakan Tris-HCl untuk ekstraksi protein dari sampel serbuk sari (Sheoran *dkk.* 2008: 100) sehingga fungsi *iso-electric focusing* (IEF) *buffer* dapat digantikan oleh Tris-HCl *buffer*.

Larutan *extraction buffer* dibuat terlebih dahulu sebelum dilakukan ekstraksi protein dengan komposisi 0.1 M Tris-HCl pH 8.8; 5 mM EDTA; 20 mM DTT, dan 30% sukrosa. Sampel serbuk sari *Acacia auriculiformis*, *Acacia mangium*, kelapa sawit I, dan kelapa sawit II masing-masing sebanyak 0.25 g direndam dalam nitrogen cair. Setelah nitrogen cair kering, serbuk sari dihaluskan menggunakan pistil dan mortar selama 5 menit dengan pengulangan tiga kali untuk tiap sampel. Sampel diekstraksi lebih lanjut menggunakan *grinding machine* dalam 1 ml larutan fenol selama 5 menit, lalu dalam 1 ml *extraction buffer* selama 5 menit. Selanjutnya, campuran tersebut dirotasikan selama 30 menit pada suhu 4°C dan disentrifugasi 20,000 x g selama 10 menit. Sentrifugasi adalah teknik pemisahan suatu bahan berdasarkan berat molekul dengan kecepatan tertentu. Prinsip sentrifugasi adalah memisahkan partikel yang berbeda massa atau densitas dalam suatu suspensi menjadi dua fase, yaitu pelet dan supernatan (Bintang 2010: 21).

Sentrifugasi emulsi ekstrak fenol dari sampel yang mengandung fenol, air, dan sisa sel menghasilkan suspensi yang terdiri atas dua fase, yaitu fase cair atas (lapisan fenol) dan fase cair bawah. Fase cair atas yang merupakan lapisan fenol dipindahkan ke dalam tabung lain, sedangkan lapisan cair bagian bawah diekstrak kembali dengan masing-masing 1 ml fenol dan *extraction buffer* lalu divortex dan disentrifugasi kembali hingga diperoleh supernatan dan pelet. Supernatan yang merupakan lapisan fenol dituang ke dalam tabung berisi fenol yang telah dikumpulkan sebelumnya.

Lapisan fenol mengandung fenol jenuh air dan koagulasi protein terdenaturasi. Ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik dari senyawa fenol secara cepat merusak membran sel dan mendenaturasi protein seluler. Fase cair bawah

mengandung DNA, RNAs terlarut air, polisakarida terlarut air, molekul polar berukuran kecil (seperti asam amino, nukleotida, dan sebagainya), dan beberapa residu suspensi protein terdenaturasi. Fenol dapat melarutkan protein dengan membentuk kompleks melalui ikatan hidrogen (Clark, Jr & Switzer 1977: 219; Harborne 1987: 48; Nick 2008: 1; Rastegari *dkk.* 2011: 3722).

Protein dari ekstrak fenol dipresipitasi dengan menambahkan 5 (v/v) 0.1 M sodium asetat dalam 100% etanol, kemudian divortex dan disimpan pada suhu  $-30^{\circ}\text{C}$  semalam. Ekstrak fenol disentrifugasi  $20,000 \times g$  pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$  selama 20 menit pada hari berikutnya. Supernatan dibuang dan pelet dicuci dua kali dengan cara menambahkan 0.1 M sodium asetat dalam etanol, divortex, disimpan selama 30 menit pada suhu  $-30^{\circ}\text{C}$ , disentrifugasi  $20,000 \times g$  pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$  selama 20 menit, dan supernatan dibuang. Pelet dicuci kembali sebanyak dua kali dengan cara menambahkan 80% aseton, divortex, disimpan pada suhu  $-30^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit, disentrifugasi  $20,000 \times g$  pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$  selama 20 menit, dan supernatan dibuang. Pelet dicuci kembali dengan 80% aseton yang mengandung 10 mM DTT, divortex, disentrifugasi  $20,000 \times g$  pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$  selama 20 menit, dan supernatan dibuang. Pelet yang telah dicuci disimpan pada suhu  $-80^{\circ}\text{C}$ . Pelarut metanol dan aseton menyebabkan protein mengendap dengan cara menurunkan konstanta dielektrik sehingga interaksi antara protein dengan protein mengalami peningkatan. Pemisahan protein-protein tertentu menggunakan pelarut organik merupakan metode terbaik karena pelarut organik tidak memecah ikatan gugus prostetik dari molekul protein seperti pada garam (Bintang 2010: 235; Clark, Jr & Switzer 1977: 74 & 219).

Pelet yang telah dicuci selanjutnya dikeringkan dengan *vacuum dry* pada suhu  $-10^{\circ}\text{C}$  selama 2 jam. Pelet dilarutkan dalam Tris-HCl *buffer* yang mengandung 2% SDS menggunakan sonikator. Suspensi disentrifugasi  $15,000 \times g$  pada suhu ruang selama 10 menit. Konsentrasi ekstrak protein sampel serbuk sari diukur dengan metode BCA (*bicinchoninic acid*) assay.

### 3.4.3.2. Pemurnian Ekstrak Protein Penelitian Sebelumnya

Ekstrak protein sisa hasil penelitian sebelumnya (Rengganis, 2009) berasal dari serbuk sari tanaman kelapa genjah, jagung, pinus, dan kelapa sawit. Ekstrak protein tersebut diperoleh dari serangkaian tahapan ekstraksi protein yang dilakukan oleh Rengganis pada tahun 2009. Sampel serbuk sari yang akan diekstrak dimasukkan dalam Corning *cryotube*, lalu direndam semalam dalam tabung *cryofab* yang berisi nitrogen cair. Pada hari berikutnya, massa serbuk sari ditimbang dan ditumbuk halus dengan mortar, lalu disuspensi dalam 10% (w/v) etanol 96%, dikocok menggunakan *stirrer* selama 30 menit pada suhu ruang. Suspensi serbuk sari dipindahkan ke dalam eppendorf 1,5 ml, disentrifugasi 14.000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C. Supernatan berisi etanol 96% dengan kandungan lemak terlarut dibuang, endapan dikeringkan di atas tisu lalu disuspensi dalam 5% (w/v) NaCl 0,5 M, dengan menggunakan *vortex* pada suhu ruang selama 30 menit untuk melarutkan protein.

Ekstrak protein selanjutnya didialisis dalam *phosphat buffer saline* (PBS) menggunakan membran dialisis semalam pada suhu 4°C untuk menghilangkan mikromolekul non-protein (Rengganis 2009: 26--27). Dialisis adalah proses pemisahan molekul berdasarkan ukuran menggunakan membran semipermeabel dengan pori-pori yang lebih kecil dibandingkan ukuran mikromolekul. Metode dialisis digunakan untuk memisahkan molekul-molekul berukuran besar dari molekul-molekul berukuran kecil. Pori-pori pada membran semipermeabel memungkinkan molekul berukuran kecil, seperti pelarut, garam, dan metabolit kecil untuk berdifusi melewati membran tetapi molekul berukuran lebih besar terhalang untuk melewatinya. Dialisis ekstrak protein dilakukan untuk mendukung pengendapan dengan pelarut organik pada kekuatan ionik yang rendah ( $I = \leq 0.03$ ) (Bintang 2010: 14 & 235; Voet & Voet 1990: 89).

Ekstrak protein dimurnikan kembali dengan cara disaring menggunakan filter berukuran 0.45  $\mu\text{m}$ . Filter yang digunakan berupa *centrifugal tube* dengan pori terbuat dari *polyvinylidene difluoride* (PVDF). Suspensi ekstrak protein disentrifugasi 12.000 x g selama 5 menit pada suhu 4°C. Konsentrasi ekstrak protein diukur dengan metode BCA (*bicinchoninic acid*) assay.

#### 3.4.3.3. Penentuan Konsentrasi Protein Serbuk Sari

Penentuan konsentrasi protein sampel dan ekstrak protein dari penelitian sebelumnya (Rengganis, 2009) diukur menggunakan metode *bicinchoninic acid* (BCA) *assay*. Metode *BCA protein assay* menggabungkan reduksi  $\text{Cu}^{2+}$  menjadi  $\text{Cu}^{1+}$  oleh protein dalam medium alkalin dengan sensitivitas tinggi dan deteksi kolorimetrik selektif dari kation tembaga ( $\text{Cu}^{1+}$ ) oleh BCA. Pembentukan warna BCA sangat dipengaruhi oleh empat residu asam amino (sistein atau sistin, tirosin, dan triptofan) pada sekuens asam amino suatu protein. Kelebihan metode *BCA assay* adalah waktu pengerjaan yang relatif singkat sekitar 32 menit, jauh lebih singkat dibandingkan metode Lowry yang memakan waktu 122 menit dalam pengerjaannya. Metode *BCA assay* juga dapat meminimalkan interferensi agen pereduksi disulfida, seperti *dithiothreitol* (DTT) dan 2-merkaptotanol, pada sampel protein yang dikuantifikasi. Metode *BCA assay* digunakan dalam penelitian untuk menentukan konsentrasi protein secara akurat, cepat, dan ekonomis (Kapoor *dkk.* 2009: 138; Pierce 2007: 1; Thermo Scientific 2012: 1).

Larutan standar yang digunakan adalah *bovine serum albumin* (BSA) dengan pengenceran berseri, 2 mg/ml, 1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml, dan 0.125 mg/ml. Pengukuran absorbansi sampel protein menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 570 nm setelah inkubasi campuran sampel dan standar *BCA working reagent* (WR) selama 30 menit pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  (Kapoor *dkk.* 2009: 138). Penentuan konsentrasi ekstrak protein serbuk sari dilakukan dengan analisis kurva standar BSA.

#### 3.4.4. *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE)

Ekstrak protein serbuk sari sebanyak 10  $\mu\text{l}$  ditambahkan 2x *sample buffer* yang mengandung *sodium dodecyl sulfate* (SDS) dan 5%  $\beta$ -merkaptotanol sebanyak 10  $\mu\text{l}$ , kemudian dipanaskan pada suhu  $96^{\circ}\text{C}$  selama 5 menit. Tujuannya untuk mereduksi protein sampel sehingga bermuatan negatif. Ekstrak protein yang mengandung 0,1% SDS tersebut kemudian dipipet ke dalam *well-well* pada gel poliakrilamid dengan konsentrasi 10--20% atau 15%. Elektroforesis

gel dilakukan pada kuat arus 30 mA selama sekitar 50 menit. Pita-pita protein yang telah terpisah pada gel diberi pewarnaan *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) dan perak nitrat (*silver staining*) (Bintang 2010: 44; Kumar *dkk.* 1998: 175; Rengganis *dkk.* 2008: 329).

#### 3.4.5. *Dot Blotting*

Antibodi primer yang digunakan dalam *dot blotting* yaitu sampel serum individu normal dan individu penderita alergi (Tabel 3.3), sedangkan antibodi sekunder yang digunakan yaitu antiserum anti-IgE manusia. Antiserum adalah sampel serum yang terdeteksi mengandung molekul antibodi yang berikatan dengan antigen tertentu (Abbas *dkk.* 2010: 76). Antiserum yang digunakan dalam penelitian adalah anti-IgE manusia (spesifik rantai  $\epsilon$ ) yang dapat berkonjugasi dengan peroksidase. Anti-IgE manusia tersebut merupakan antibodi kambing dan spesifik terhadap antibodi IgE manusia.

Membran nitroselulosa dipersiapkan terlebih dahulu dengan merendamnya dalam metanol agar sampel dapat berpenetrasi dalam membran. Membran nitroselulosa dapat berikatan dengan protein melalui ikatan hidrofobik dan tidak dipengaruhi oleh muatan protein (De Angelis *dkk.* 2012: 2129). Ekstrak protein sampel serbuk sari dipipet di satu titik pada permukaan membran sebanyak 10  $\mu$ l. Setelah sampel berpenetrasi dalam membran, membran direndam dalam larutan *blocking* yaitu larutan PBST yang mengandung 3% susu skim (*nonfat dry milk*) pada *in vitro shaker* selama 1 jam. Setelah membran dibilas dengan larutan PBST, membran diinkubasi dalam antibodi primer selama 1 jam pada suhu kamar. Setelah membran dibilas dengan larutan PBST, membran diinkubasi dalam antibodi sekunder selama 1 jam pada suhu kamar. Inkubasi antibodi sekunder bertujuan untuk mendeteksi keberadaan kompleks alergen-antibodi. Membran kemudian dibilas untuk membersihkan antibodi sekunder yang tidak berikatan dengan antibodi primer. Antibodi sekunder akan bereaksi dengan IgE dalam serum dan akan berkonjugasi dengan enzim *horseradish peroxidase* (HRP) yang menghasilkan produk *visible* (dapat terlihat) saat substrat yang sesuai ditambahkan (De Angelis *dkk.* 2012: 2129; Snustad *dkk.* 1997: 488).

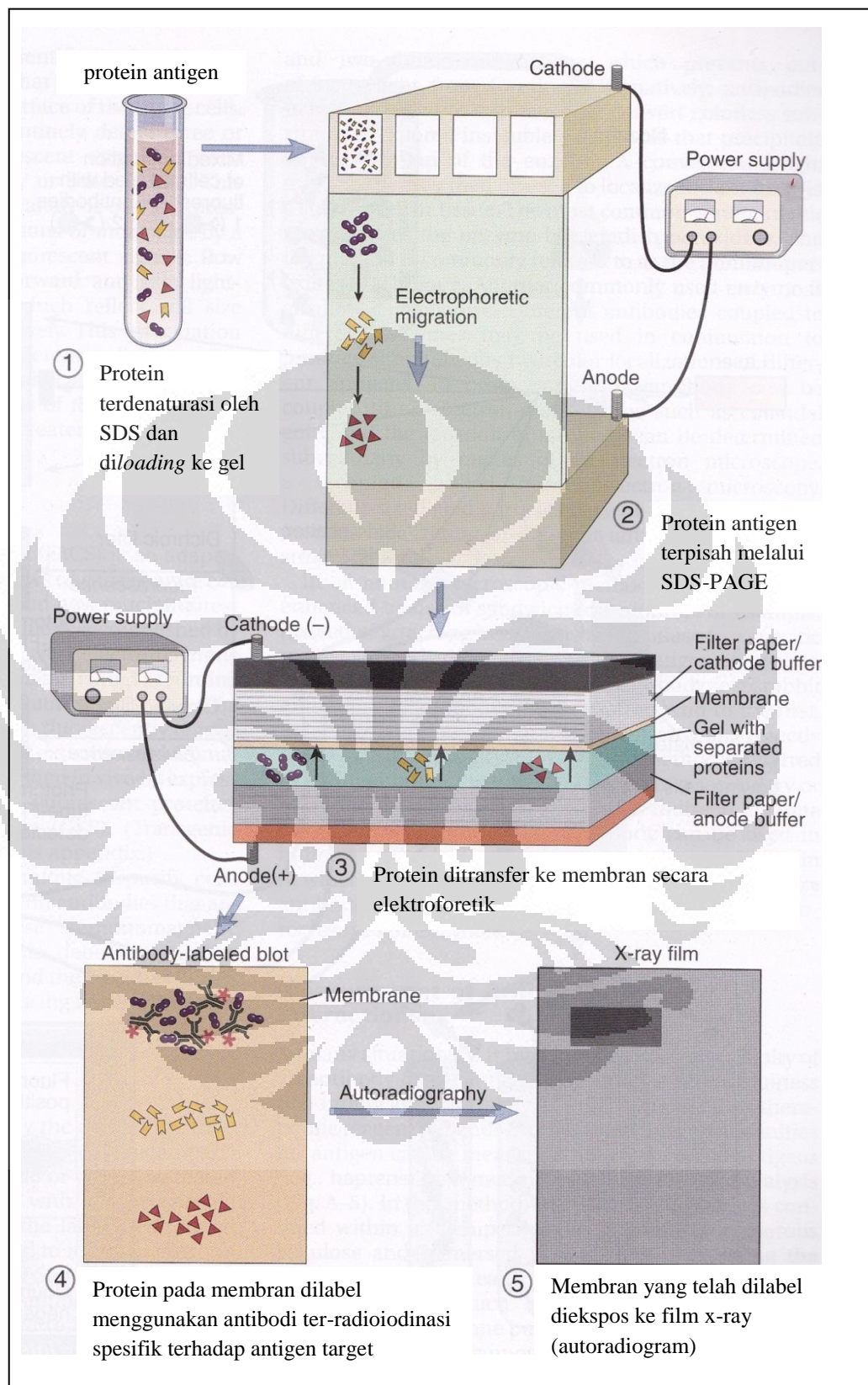


Membran dibilas kembali dengan larutan PBST kemudian membran diberikan larutan substrat HRP (*horseradish peroxidase*) *chemiluminescent* hingga area sampel tertutupi dan dibiarkan selama 5 menit. Membran selanjutnya dipapar pada kertas film X-ray dalam kondisi gelap selama 30 detik--5 menit. Kertas film dibilas dalam larutan *developer* dan larutan *fixer* sehingga pita-pita protein (*bands*) tampak dan terikat pada kertas film. Pembilasan dilakukan untuk menghilangkan radioaktif yang tidak terikat dan meningkatkan laju hibridisasi. Autoradiografi yang mengikuti masing-masing tahap pencucian akan menampakkan semua pita protein yang berikatan (Bintang 2010: 243--244).

#### 3.4.6. *Western Blotting*

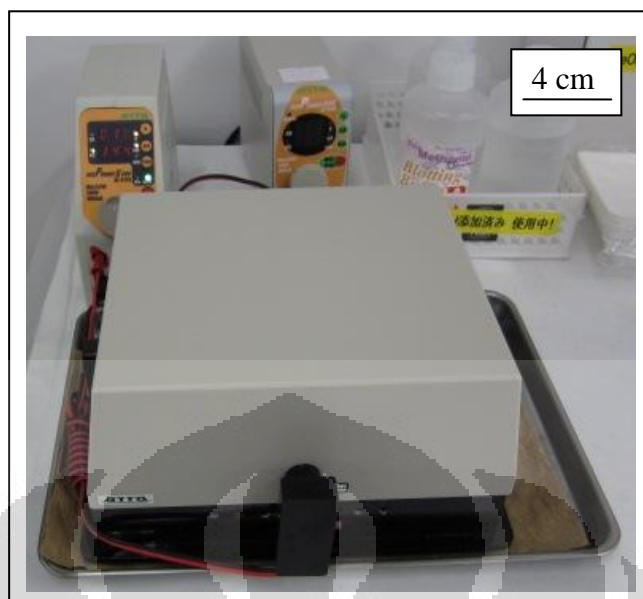
Antibodi primer yang digunakan dalam *western blotting* yaitu sampel serum individu normal dan individu penderita alergi (Tabel 3.3), sedangkan antibodi sekunder yang digunakan yaitu antiserum anti-IgE manusia (spesifik rantai  $\epsilon$ ). Prosedur *western blotting* dapat dilihat pada gambar 3.4.2. Protein yang telah dipisahkan pada SDS-PAGE ditransfer ke dalam membran nitroselulosa dengan menempatkan gel hasil SDS-PAGE yang mengandung pita-pita protein pada selembar membran nitroselulosa yang terendam dalam larutan *buffer* yang mengandung metanol. Kandungan metanol dalam *buffer* membantu membuang SDS dari kompleks protein-detergen dan meningkatkan afinitas antara protein dan membran. Gel dan membran diapit di antara lembaran kertas filter. Selanjutnya arus listrik yang melewati lempengan menyebabkan protein bergerak dari gel menuju membran nitroselulosa sehingga menghasilkan *blot* atau pola pita. Proses tersebut dikenal dengan *electroblotting* (Davey & Lord 2003: 4).

Proses *electroblotting* berjalan selama 60 menit (30 volt; 144 mA). Alat *electroblotting* yang digunakan adalah *semi-dry blotting* (Gambar 3.4.3). Setelah dilakukan *electroblotting*, membran direndam dalam larutan *blocking* berupa larutan PBST yang mengandung 3% susu skim (*nonfat dry milk*) selama 1 jam. Susu skim dapat mencegah ikatan non-spesifik antibodi pada membran karena kandungan proteinnya dapat berikatan pada daerah membran yang tidak berikatan dengan protein sampel (Davidson 2001: 1; Thermo Scientific 2011: 1).



Gambar 3.4.2. Prosedur *western blotting*

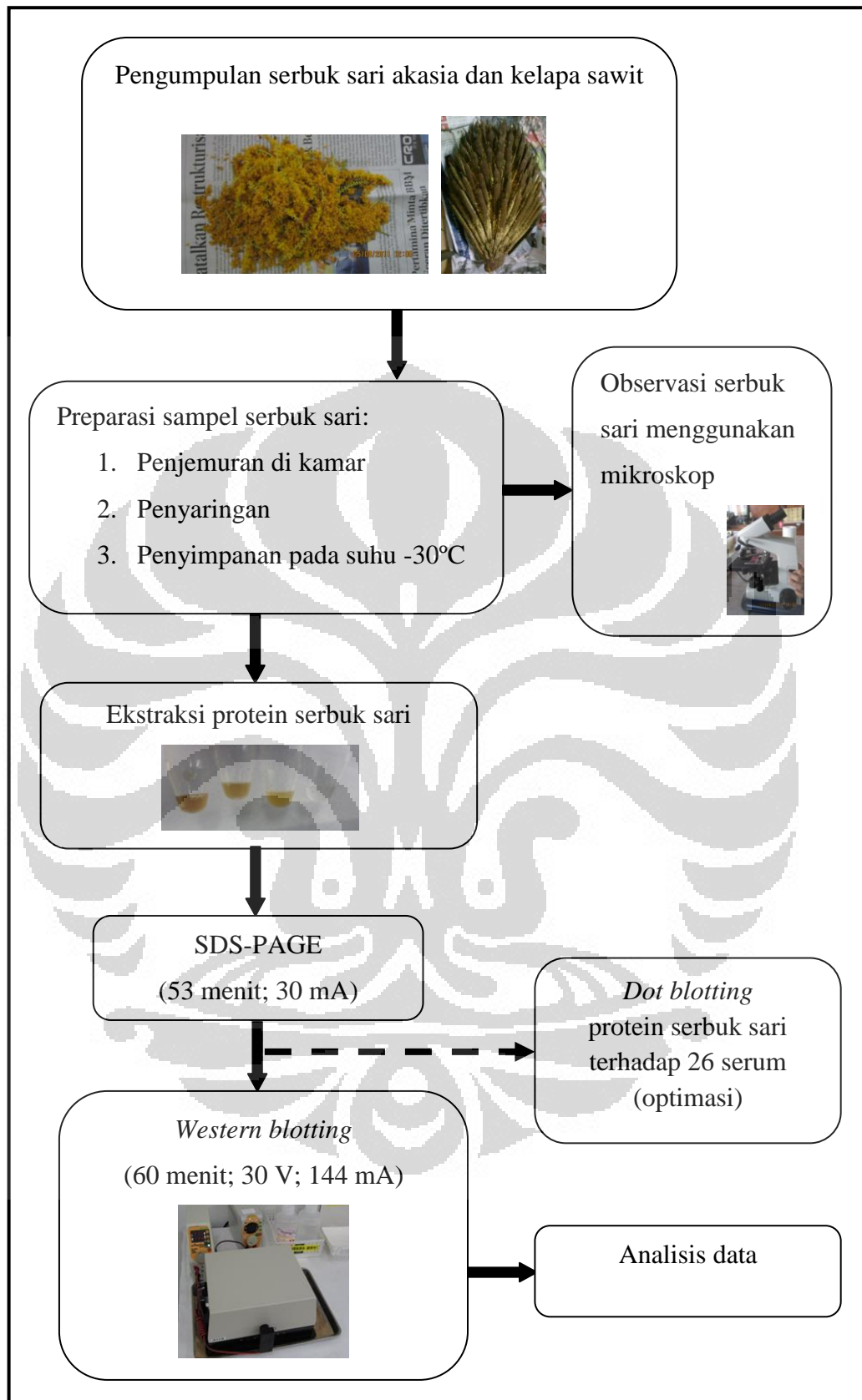
[Sumber: Abbas *dkk.*, 2010: 529, diterjemahkan sesuai aslinya.]



Gambar 3.4.3. *Semi dry blotting*  
[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Setelah dibilas dengan larutan PBST, membran diinkubasi selama 1 jam dengan antibodi primer pada suhu kamar. Larutan PBST mengandung 1% Tween 20 dalam PBS. Tween 20 merupakan detergen yang berperan sebagai pembawa (*carrier*) antibodi yang digunakan untuk menandai membran (*probe*). Membran kemudian dibilas kembali dengan PBST dan diinkubasi selama 1 jam dengan antibodi sekunder. Setelah membran dibilas, membran diberikan larutan substrat *chemiluminescent HRP* selama 5 menit. *Horseradish peroxidase* (HRP) adalah salah satu enzim yang umum digunakan sebagai imunodetektor. Substrat *chemiluminescent HRP* berbahan dasar oksidasi luminol. Substrat luminol memiliki sinyal yang paling sensitif pada substrat *blotting* tetapi membutuhkan pemajanan (ekspos) fotografik (Davey & Lord 2003: 4).

Membran selanjutnya dipapar dengan kertas X-ray film dalam kondisi gelap selama 30 detik--5 menit. Kertas film dibilas dalam larutan *developer* dan larutan *fixer* sehingga pita-pita protein (*bands*) tampak dan terikat pada kertas film. Hasil pita-pita protein yang terdeteksi pada *western blotting* selanjutnya dianalisis untuk mengetahui protein alergen serbuk sari tanaman akasia dan kelapa sawit. Berat molekul protein target dapat diketahui dari hasil visualisasi SDS-PAGE. Skema kerja penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.4.4.



Gambar 3.4.4. Skema kerja penelitian

## BAB 4

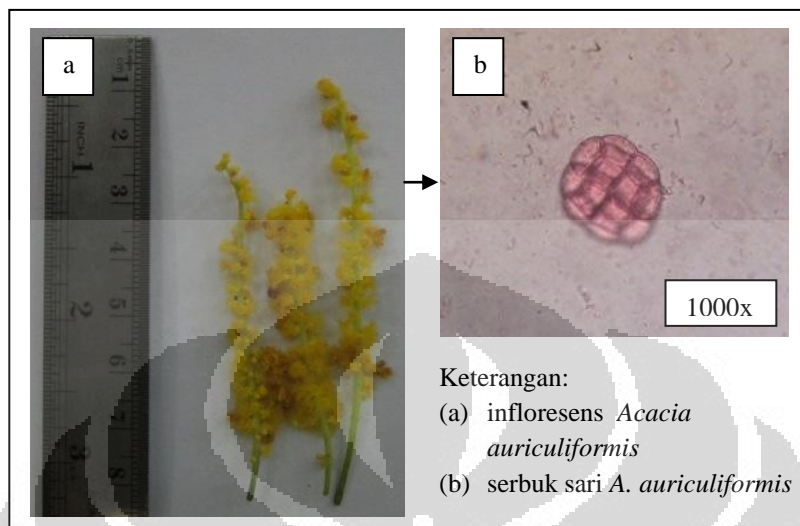
### HASIL DAN PEMBAHASAN

Telah dilakukan penelitian mengenai identifikasi protein alergen serbuk sari tanaman akasia (*Acacia auriculiformis* dan *Acacia mangium*) dan kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.). Sampel serbuk sari yang digunakan dalam penelitian berasal dari dua sumber yaitu sampel serbuk sari yang dikumpulkan langsung dari serbuk sari tanaman dan sampel ekstrak protein serbuk sari tanaman kelapa sawit sisa hasil penelitian sebelumnya (Rengganis, 2009). Tahapan identifikasi protein alergen yang dilakukan adalah identifikasi morfologi serbuk sari, ekstraksi protein, perhitungan berat molekul protein, dan pendeteksian protein alergen. Identifikasi protein alergen serbuk sari tanaman akasia (*Acacia auriculiformis* dan *Acacia mangium*) belum berhasil dilakukan karena konsentrasi protein sampel serbuk sari rendah. Identifikasi protein alergen serbuk sari tanaman kelapa sawit menunjukkan adanya kandidat protein alergen. Protein serbuk sari kelapa sawit dengan berat molekul 31 kDa diduga sebagai alergen utama karena bereaksi positif terhadap > 80% serum, baik serum individu penderita alergi maupun individu normal. Reaksi positif pada individu normal diduga karena faktor atopi. Berikut adalah pembahasan secara rinci hasil penelitian yang telah dilakukan:

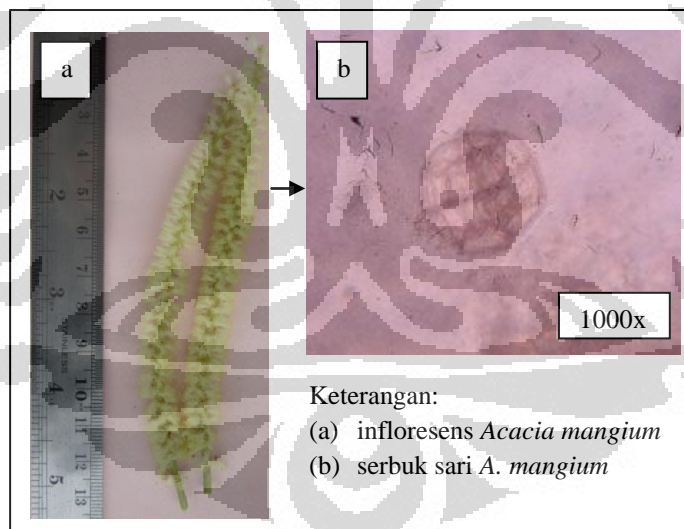
#### 4.1. Identifikasi Serbuk Sari

Pengumpulan sampel serbuk sari akasia (*Acacia auriculiformis* dan *Acacia mangium*) dan kelapa sawit dilakukan dari bulan Maret--September 2011. Sampel serbuk sari akasia dikumpulkan dari pepohonan akasia yang banyak tumbuh di sekitar Universitas Indonesia, Depok, Jawa Barat. Bunga akasia berukuran sangat kecil dan tergabung dalam infloresens (perbungaan) berbentuk bola atau silindris (Sedgley & Harbard 1993: 602). Sampel serbuk sari kelapa sawit dikumpulkan dari dua lokasi yaitu kelapa sawit I berasal dari sekitar Universitas Indonesia, Depok, Jawa Barat, dan kelapa sawit II berasal dari areal pertamanan komplek perumahan Permata Sentul, Bogor, Jawa Barat. Massa sampel serbuk sari *Acacia*

*auriculiformis*, *Acacia mangium*, dan kelapa sawit yang berhasil dikumpulkan berturut-turut yaitu 15,40 gram; 28,14 gram; dan 80,96 gram.



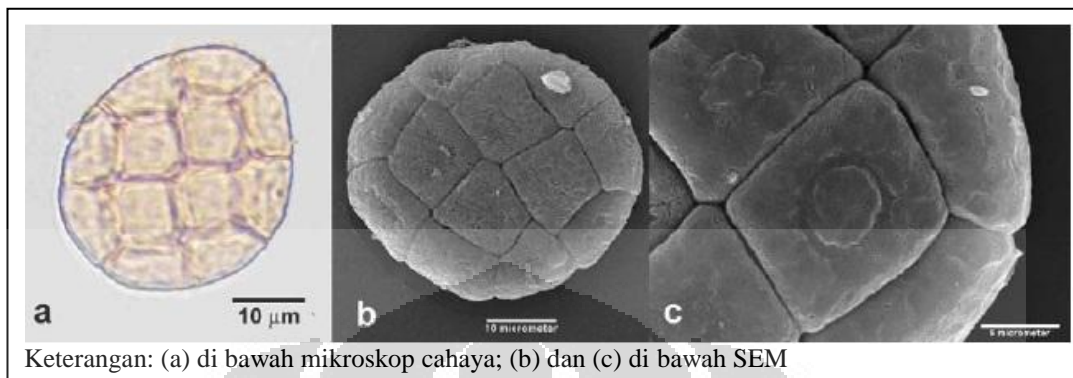
Gambar 4.1.1. Identifikasi serbuk sari *Acacia auriculiformis*  
 [Sumber: Dokumentasi pribadi.]



Gambar 4.1.2. Identifikasi serbuk sari *Acacia mangium*  
 [Sumber: Dokumentasi pribadi.]

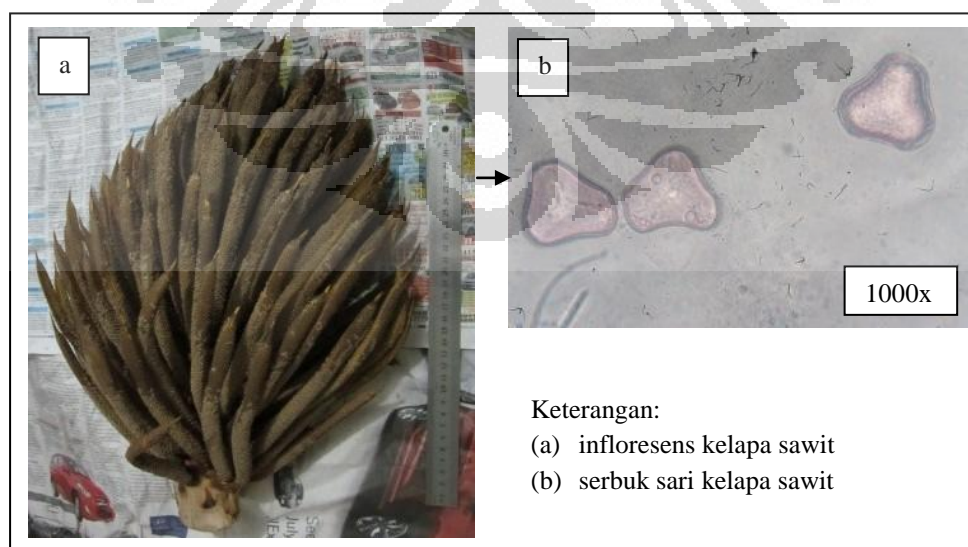
Sampel serbuk sari akasia dan kelapa sawit yang terkumpul diidentifikasi dengan pengamatan serbuk sari di bawah mikroskop cahaya. Struktur morfologi serbuk sari yang diamati, antara lain ukuran, jumlah, bentuk aperture, ketebalan eksin, dan bentuk tampilan dinding selnya (Mahmoudi *dkk.* 2011: 32; Stites *dkk.*

1997: 391). Hasil identifikasi serbuk sari akasia (*Acacia auriculiformis* dan *Acacia mangium*) dapat dilihat pada gambar 4.1.1 dan 4.1.2.

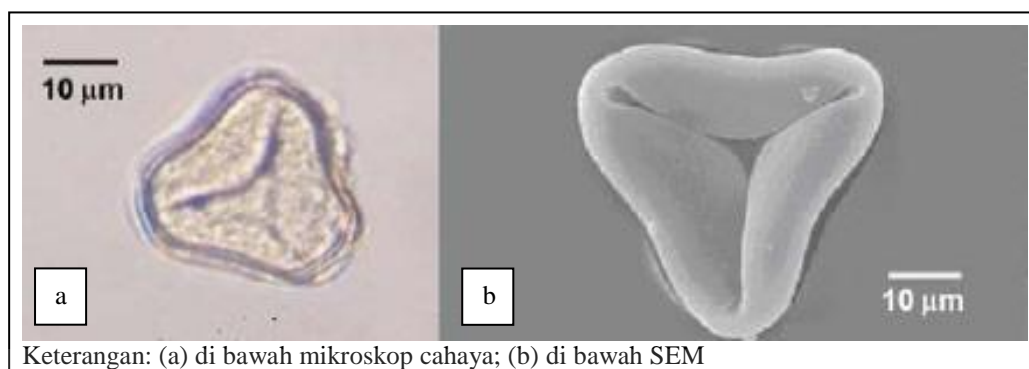


Gambar 4.1.3. Morfologi serbuk sari akasia  
[Sumber: Rengganis 2009: 32.]

Serbuk sari akasia yang teramati sesuai dengan struktur morfologi berdasarkan literatur (Gambar 4.1.3). Serbuk sari akasia, baik *A. auriculiformis* maupun *A. mangium* memiliki struktur morfologi yang sama karena masih termasuk dalam satu genus *Acacia*. Serbuk sari akasia berukuran 20--70 µm, berbentuk *polyad* yaitu terdiri atas 4, 8, 12, 16, 32 atau 64 butir yang tersusun dalam cakram bikonveks dan dilepaskan dari kepala sari sebagai unit tunggal, serta berdinding tektad dengan ornamentasi skabrat yaitu pada permukaan eksin terdapat duri-duri kecil (*lihat* Sedgley & Harbard 1993: 602; Rengganis 2009: 32).



Gambar 4.1.4. Identifikasi serbuk sari kelapa sawit  
[Sumber: Dokumentasi pribadi.]



Gambar 4.1.5. Morfologi serbuk sari kelapa sawit  
[Sumber: Rengganis 2009: 32.]

Hasil identifikasi serbuk sari kelapa sawit dapat dilihat pada gambar 4.1.4. Serbuk sari kelapa sawit yang teramati sesuai dengan struktur morfologi berdasarkan literatur (Gambar 4.1.5). Serbuk sari kelapa sawit berukuran sekitar 30 µm, bersifat monad, trikolpat (apertura berupa tiga *colpus* atau saluran panjang), dan memiliki ornamentasi psilat (lapisan eksin halus). Ukuran serbuk sari akasia dan kelapa sawit termasuk dalam kisaran 10--100 µm sehingga berpotensi besar bersifat alergen (Rengganis *dkk.* 2008: 328; Rengganis 2009: 32).

#### 4.2. Ekstrak Protein Serbuk Sari

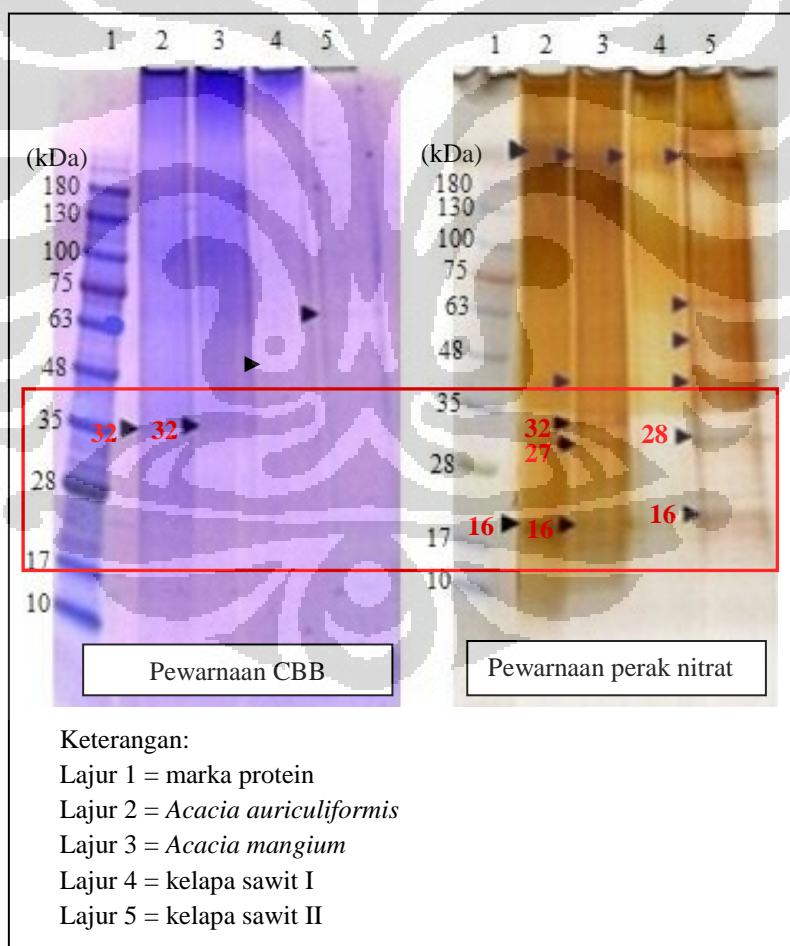
Ekstrak protein sampel serbuk sari yang diekstraksi menggunakan metode *phenol extract* (Sheoran *dkk.* 2008) yang dimodifikasi dan ekstrak protein dari penelitian sebelumnya (Rengganis, 2009) diukur konsentrasinya menggunakan metode *bicinchoninic acid* (BCA) *assay*. Berdasarkan analisis kurva standar BSA, ekstrak protein serbuk sari tanaman akasia (*Acacia auriculiformis* dan *Acacia mangium*) memiliki konsentrasi protein masing-masing sebesar 9.13 mg/ml dan 9.91 mg/ml, sedangkan ekstrak protein serbuk sari kelapa sawit I dan II masing-masing memiliki konsentrasi protein sebesar 6.87 mg/ml dan 1.87 mg/ml. Ekstrak protein serbuk sari tanaman kelapa sawit dari penelitian Rengganis (2009) memiliki konsentrasi sebesar 6.22 mg/ml. Perhitungan konsentrasi ekstrak protein serbuk sari dapat dilihat pada lampiran 1 dan 2.



### 4.3. Analisis Berat Molekul Protein Serbuk Sari

#### 4.3.1. Analisis Berat Molekul Protein Sampel Serbuk Sari

Ekstrak protein serbuk sari *Acacia auriculiformis*, *Acacia mangium*, kelapa sawit I, dan kelapa sawit II hasil ekstraksi dengan metode *phenol extract* (Sheoran *dkk.* 2008) yang dimodifikasi, dilakukan SDS-PAGE untuk mengetahui berat molekul protein. Analisis perhitungan berat molekul protein dilakukan dengan menggunakan kurva standar yang ditentukan dari nilai migrasi relatif protein dan nilai logaritmik berat molekul marka protein yang telah diketahui (Mondal *dkk.* 1997: 302). Visualisasi hasil SDS-PAGE ekstrak protein sampel serbuk sari dapat dilihat pada gambar 4.3.1.



Gambar 4.3.1. Visualisasi SDS-PAGE ekstrak protein sampel (konsentrasi gel 10--20%)

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Protein dengan berat molekul (BM) antara 15--40 kDa berpotensi alergenik (Elgert 1996: 296). Berdasarkan hasil perhitungan, ekstrak protein serbuk sari *Acacia auriculiformis* dan *A. mangium* memiliki beberapa pita protein yang berpotensi alergenik. Pita-pita protein yang berpotensi alergenik pada serbuk sari *A. auriculiformis* memiliki BM 16 kDa dan 32 kDa, sedangkan pada serbuk sari *A. mangium* memiliki BM 16 kDa, 27 kDa, dan 32 kDa. Protein serbuk sari akasia dengan BM sekitar 16 kDa dan 30 kDa merupakan pita protein dominan dan memperlihatkan derajat sensitivitas berupa reaksi positif terhadap alergen serbuk sari pada kelompok individu dengan riwayat alergi dan tanpa riwayat alergi (Rengganis 2009: 36). Perhitungan BM protein dapat dilihat pada lampiran 3.

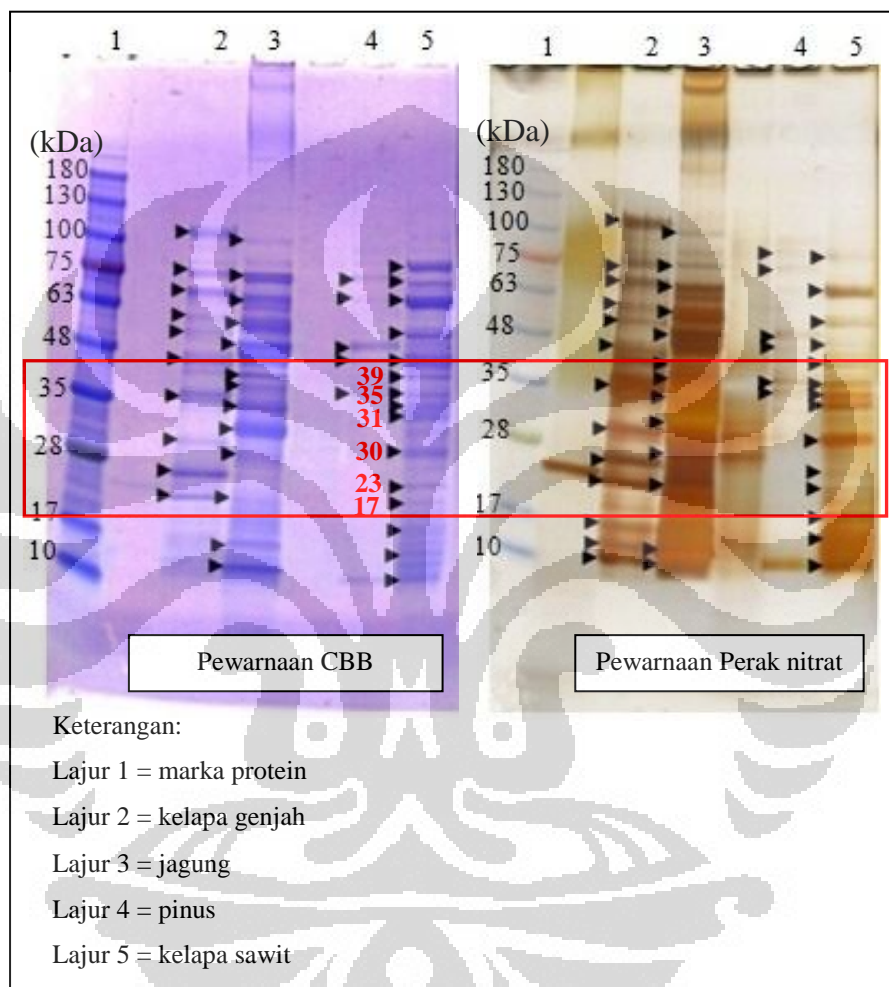
Ekstrak protein serbuk sari kelapa sawit I dan kelapa sawit II memiliki visualisasi hasil SDS-PAGE yang berbeda. Visualisasi hasil SDS-PAGE sampel serbuk sari kelapa sawit II (lajur 5) menunjukkan lebih banyak pita protein dibandingkan kelapa sawit I (lajur 4). Pita-pita protein serbuk sari kelapa sawit II yang berpotensi alergenik memiliki BM 16 kDa dan 28 kDa karena berada dalam kisaran 15--40 kDa (Elgert 1996: 296).

#### 4.3.2. Analisis Berat Molekul Ekstrak Protein Penelitian Sebelumnya

Ekstrak protein serbuk sari kelapa sawit (*Elaeis guineensis*) dari penelitian sebelumnya (Rengganis, 2009) dilakukan SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) untuk mengetahui berat molekul protein. Ekstrak protein serbuk sari kelapa gajah (*Cocos nucifera*), jagung (*Zea mays*), pinus (*Pinus merkusii*) digunakan sebagai sampel kontrol positif. Alergen serbuk sari kelapa gajah yang telah diketahui adalah Cn 2 dan Cn 7 (Karmakar & Chatterjee 1992: 441). Alergen serbuk sari tanaman jagung telah teridentifikasi pada penelitian Petersen *dkk.* 2006 yaitu Zea m 1 dan Zea m 13 (*lihat Zhu dkk.* 2010: 1472).

Berdasarkan hasil perhitungan, terdapat beberapa pita protein serbuk sari kelapa sawit yang berpotensi alergenik dengan BM 17 kDa, 23 kDa, 30 kDa, 31 kDa, 35 kDa, dan 39 kDa karena termasuk dalam kisaran 15--40 kDa (Elgert

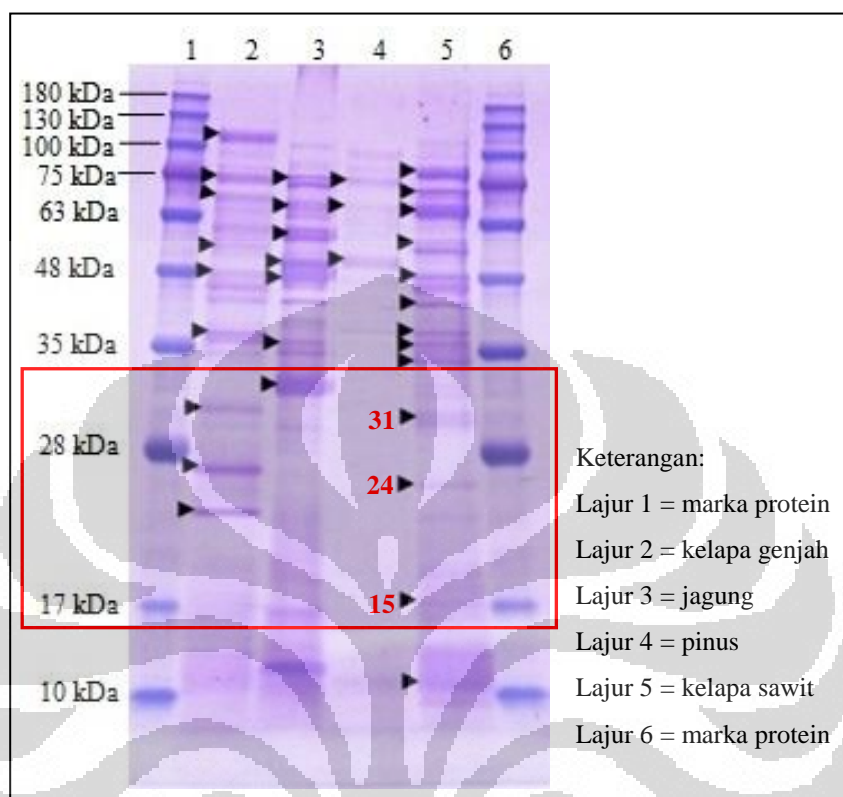
1996: 296). Kontrol positif ekstrak protein serbuk sari tanaman kelapa genjah, jagung, dan pinus juga menunjukkan beberapa pita protein yang berpotensi alergenis. Perhitungan BM protein dapat dilihat pada lampiran 4. Visualisasi hasil SDS-PAGE ekstrak protein serbuk sari kelapa sawit menggunakan konsentrasi gel 10--20% dapat dilihat pada gambar 4.3.2.



Gambar 4.3.2. Visualisasi SDS-PAGE ekstrak protein (konsentrasi gel 10--20%) [Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Setelah dilakukan SDS-PAGE menggunakan konsentrasi gel 10--20%, dilakukan SDS-PAGE kembali menggunakan konsentrasi gel 15%. Konsentrasi gel 15% dapat memisahkan protein dengan kisaran berat molekul antara 12--45 kDa (Copeland 1994: 60) sehingga diharapkan pemisahan pita-pita protein yang berpotensi alergenis dapat terpisahkan lebih baik dan lebih akurat pada

konsentrasi gel tersebut. Visualisasi hasil SDS-PAGE ekstrak protein serbuk sari kelapa sawit menggunakan konsentrasi gel 15% dapat dilihat pada gambar 4.3.3.



Gambar 4.3.3. Visualisasi SDS-PAGE ekstrak protein (konsentrasi gel 15%)  
 [Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Visualisasi hasil SDS-PAGE dengan konsentrasi gel 15% menunjukkan pita-pita protein berpotensi alergenik dengan BM antara 15--40 kDa (Elgert 1996: 296) terpisahkan lebih baik dan lebih spesifik. Berdasarkan hasil perhitungan, beberapa pita protein ekstrak serbuk sari kelapa sawit yang berpotensi alergenik memiliki BM 15 kDa, 24 kDa, dan 31 kDa. Perhitungan BM protein dapat dilihat pada lampiran 5.

Pita-pita protein hasil ekstraksi sampel serbuk sari tanaman akasia dan kelapa sawit hasil visualisasi SDS-PAGE terlihat tipis, baik pada pewarnaan CBB maupun perak nitrat, sedangkan pita-pita protein ekstrak protein dari penelitian sebelumnya (Rengganis, 2009) terlihat cukup jelas. Berdasarkan pengukuran konsentrasi protein menggunakan metode *BCA assay*, konsentrasi ekstrak protein serbuk sari kelapa sawit sampel yang diekstraksi menggunakan metode *phenol extract* dan ekstrak protein serbuk sari kelapa sawit dari penelitian sebelumnya

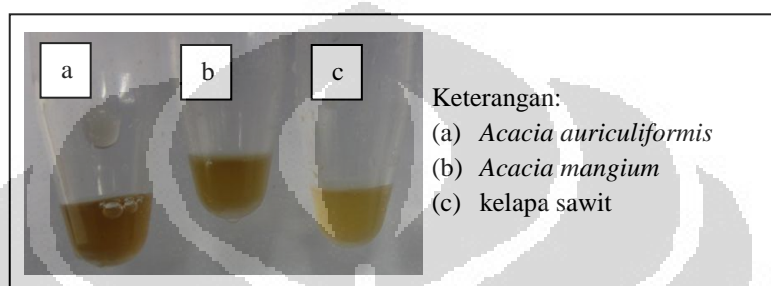
tidak jauh berbeda yaitu masing-masing sebesar 6.87 mg/ml dan 6.22 mg/ml. Konsentrasi kedua protein tersebut hampir sama tetapi menunjukkan visualisasi ketebalan pita protein yang berbeda. Pita yang tipis pada ekstrak protein sampel serbuk sari menunjukkan konsentrasi protein yang rendah.

Perbedaan konsentrasi protein antara ekstrak protein sampel serbuk sari yang dikumpulkan langsung dan ekstrak protein dari penelitian sebelumnya (Rengganis, 2009) disebabkan perbedaan metode ekstraksi protein dan jumlah sampel serbuk sari yang digunakan. Ekstrak protein sampel serbuk sari diekstraksi menggunakan metode *phenol extract* (Sheoran *dkk.*, 2008) yang dimodifikasi. Pada metode *phenol extract*, terdapat tahapan sentrifugasi terlebih dahulu sebelum presipitasi protein. Sentrifugasi tersebut dapat membuang reruntuhan molekul-molekul protein, seperti eksoskeleton dan nuklei (Cilia *dkk.* 2009: 209). Oleh karena itu, ekstrak protein sampel serbuk sari yang dihasilkan menggunakan metode tersebut memiliki konsentrasi protein yang rendah.

Metode *extract phenol* digunakan untuk ekstraksi protein biasanya menggunakan jumlah sampel yang sedikit apabila dibandingkan metode ekstraksi protein lainnya, antara lain dapat dilihat pada penelitian Sheoran *dkk.* (2009) dan Rastegari *dkk.* (2011). Sheoran *dkk.* (2008) menggunakan 0.025 gram sampel serbuk sari untuk analisis proteomik, sedangkan Rastegari *dkk.* (2011) menggunakan 0.200 gram sampel serbuk buah untuk *two-dimensional profiling* (Rastegari *dkk.* 2011: 3720; Sheoran *dkk.* 2008: 100). Penelitian serupa lainnya menggunakan metode ekstraksi protein yang berbeda dan jumlah sampel serbuk sari yang digunakan jauh lebih banyak dibandingkan pada metode *phenol extract*, di antaranya penelitian Kimura *dkk.* (2002) mengenai karakterisasi protein serbuk sari menggunakan sampel serbuk sari sebanyak 9.5 gram dan Tris-HCl *buffer* sebagai larutan ekstraksi. Kawamoto *dkk.* (2002) menggunakan sampel serbuk sari sebanyak 80 gram untuk ekstraksi protein dengan metode yang berbeda pula (Kawamoto *dkk.* 2002: 1065; Kimura *dkk.* 2002: 821).

Peningkatan konsentrasi ekstrak protein serbuk sari sampel diduga karena terdapat senyawa lain yang berinterferensi dengan protein sampel sehingga menimbulkan kekeliruan dalam pengukuran absorbansi sampel. Senyawa kontaminan yang dapat berinterferensi dengan protein adalah *dithiothreitol* (DTT)

(Pierce 2007: 1). *Dithiothreitol* (DTT) 10 mM digunakan saat ekstraksi protein menggunakan metode *phenol extract* (modifikasi Sheoran *dkk.*, 2008). Senyawa tersebut berfungsi untuk mereduksi ikatan sulfida pada protein dan melindungi protein dari kerusakan oksidatif (Thermo Scientific 2011: 1). Protein hasil ekstraksi sampel diduga berinterferensi dengan DTT yang tidak terbuang saat pencucian pelet terakhir sehingga senyawa tersebut terus berinterferensi dengan protein sampel hingga akhir tahapan ekstraksi protein.



Gambar 4.3.4. Ekstrak protein sampel serbuk sari  
 [Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Metode *phenol extract* menggunakan fenol untuk mengisolasi protein dari suatu sampel. Ekstrak protein sampel serbuk sari yang diperoleh terlihat berwarna gelap kekuningan (Gambar 4.3.4). Hal tersebut mengindikasikan adanya senyawa fenolik dan kontaminan yang ikut terpresipitasi (Rastegari *dkk.* 2011: 3722). Senyawa fenol mengandung pigmen fenolik berwarna dan dapat berinterferensi membentuk kompleks dengan protein sampel saat proses ekstraksi protein. Warna pigmen terlihat dalam proses isolasi dan pemurnian protein. Semua senyawa fenol berupa senyawa aromatik yaitu memiliki cincin benzena sehingga semuanya menunjukkan serapan kuat di daerah spektrum ultraviolet. Jika semua gugus fenol direaksikan menjadi ester atau eter, cincin benzena teroksidasi dapat dikenali berdasarkan zat warna azo berwarna yang terbentuk jika direaksikan dengan asam sulfanilat atau p-nitroanilina yang diazotasi beramonia (Harborne 1987: 49; Robinson 1995: 57 & 76). Oleh karena itu, besar kemungkinan pigmen fenolik dalam sampel ikut terserap sehingga ikut meningkatkan nilai absorbansi sampel dan mengakibatkan kekeliruan penentuan konsentrasi protein sampel.

#### 4.4. Analisis Sampel Serum

Sampel serum manusia yang digunakan dalam penelitian berasal dari total 26 individu yaitu 3 individu normal tanpa riwayat alergi dan 23 individu penderita alergi. Serum individu normal tanpa riwayat alergi digunakan sebagai kontrol negatif dalam *western blotting* (Wang *dkk.* 2010: 94). Daftar serum dapat dilihat pada Tabel 3.3. Pengkoleksian serum berdasarkan atas penelusuran riwayat bahwa individu tersebut pernah mengalami penyakit alergi, antara lain dermatitis, rinitis alergi, asma bronkial, urtikaria, mikosis, atau penyakit alergi lainnya. Riwayat penyakit alergi terhadap paparan antigen penting dalam menentukan jumlah antibodi IgE spesifik yang dihasilkan (Abbas *dkk.*, 2010: 443).

Kondisi klinis individu penderita alergi menunjukkan bahwa mereka seluruhnya dengan total 23 individu memiliki gejala dermatitis. Dermatitis (eksim) berhubungan dengan penyakit alergi lainnya yaitu penyakit tersebut meningkat disebabkan oleh berbagai alergen meliputi makanan, inhalan, fungi, dan infeksi bakteri kulit. Dermatitis diketahui berhubungan dengan alergi pernapasan sehingga penyakit alergi tersebut lebih dikenal sebagai dermatitis atopi sejak tahun 1933. Atopi pada penyakit dermatitis dapat didefinisikan sebagai hipersensitivitas bersifat familial pada kulit dan membran mukosa terhadap alergen yang dapat meningkatkan produksi IgE. Konsentrasi IgE penderita dermatitis seringkali meningkat kadarnya dalam serum. Dermatitis dapat terjadi pada berbagai usia yaitu serangan awal dapat dimulai sejak usia 3--6 bulan, kanak-kanak, remaja, dan umumnya selama usia dewasa (Mahmoudi *dkk.* 2008: 95--96; Stites *dkk.* 1997: 404). Rinitis alergi juga banyak terkena pada individu penderita alergi yaitu sekitar 70% dari total 23 individu. Rinitis alergi termasuk alergi pernapasan akibat inflamasi mukosa nasal yang diperantarai IgE. Rinitis alergi merupakan faktor resiko penyakit asma (Pawankar *dkk.* 2011: 3).

Protein merupakan komponen yang mendominasi serum manusia dan berperan penting dalam menjaga menjaga asam basa darah. Protein serum terdiri atas albumin dan globulin. Albumin dalam plasma menghasilkan kekuatan osmotik yang menjaga volume cairan dalam rongga vaskular. Globulin terdiri dari gamma globulin/immunoglobulin (antibodi) dan berbagai macam enzim dan

protein transport (*carrier*). Antibodi adalah protein sirkulasi yang dihasilkan oleh hewan vertebrata sebagai respon terhadap paparan struktur asing yang disebut antigen. Oleh karena itu, serum dapat juga didefinisikan sebagai antibodi yang tertinggal dalam cairan residu saat darah mengalami pembekuan (Abbas *dkk.*, 2010: 76; Kaslow 2011: 1).

Serum manusia mengandung antibodi IgE dengan konsentrasi sangat rendah dan hanya sebagian kecil sel plasma dalam tubuh yang mensintesis immunoglobulin tersebut (Roitt & Delves 2001: 55). Kadar konsentrasi protein serum memiliki kisaran optimal sebesar 7.2--8.0 g/100 ml atau 72--80 mg/ml. Pengukuran konsentrasi protein serum dapat dilihat pada Lampiran 6. Serum normal N1 dan N2 memiliki konsentrasi protein yaitu masing-masing sebesar 81.24 mg/ml dan 84.13 mg/ml. Konsentrasi protein serum tersebut lebih tinggi dari kisaran normal ( $> 80$  mg/ml). Peningkatan kadar protein dapat terjadi karena berbagai faktor, antara lain infeksi kronis (TBC), hipofungsi adrenal korteks, disfungsi hati, penyakit kolagen vaskular (*rheumatoid arthritis*, lupus sistemik, dan skleroderma), hipersensitivitas, dehidrasi, leukemia, dan hemolisis. Konsentrasi protein sampel serum normal N3 yaitu 48.47 mg/ml. Konsentrasi protein serum tersebut jauh lebih rendah dari kisaran normal ( $< 72$  mg/ml). Penurunan kadar protein dapat terjadi karena malnutrisi dan malabsorpsi, penyakit hati, diare, luka bakar yang parah, ketidakseimbangan hormon, dan proteinuria (Kaslow 2011: 1). Berdasarkan perhitungan konsentrasi protein, individu normal (tanpa riwayat alergi) memiliki kadar serum protein di luar kisaran normal.



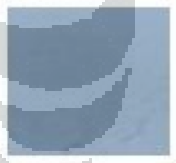



Serum individu alergi memiliki kisaran konsentrasi protein yang bervariasi. Hampir semua sampel serum individu alergi memiliki konsentrasi protein serum di luar kisaran normal, kecuali serum 1, 3, 12, dan 22. Serum 14, 15, dan 20 memiliki konsentrasi protein serum di atas kisaran normal dan diduga kuat akibat hipersensitivitas (penyakit alergi), sedangkan serum lainnya memiliki konsentrasi protein serum di bawah kisaran normal.



#### 4.5. Uji Kualitatif Sampel

*Dot blotting* dilakukan sebagai uji kualitatif efektivitas sampel ekstrak protein serbuk sari dan sampel serum. *Dot blotting* juga dilakukan sebagai uji pendahuluan *western blotting* untuk mengoptimasikan konsentrasi serum sebagai antibodi primer dan antiserum sebagai antibodi sekunder. Konsentrasi optimal antibodi primer yaitu dengan pengenceran 50x dan antibodi sekunder dengan pengenceran 20.000x.

Berdasarkan hasil *dot blotting* ekstrak protein sampel serbuk sari akasia dan kelapa sawit, tidak terdeteksi adanya sinyal yang menunjukkan reaksi antara protein antigen serbuk sari tanaman tersebut dengan antibodi dalam serum individu alergi (hasil negatif) (Gambar 4.5). Oleh karena itu, *western blotting* hanya dilakukan terhadap ekstrak protein serbuk sari tanaman kelapa sawit dari penelitian sebelumnya (Rengganis, 2009).

	Serum N1	Serum 7	Serum 17
Ekstrak protein serbuk sari akasia ( <i>Acacia auriculiformis</i> )			
Ekstrak protein serbuk sari kelapa sawit ( <i>Elaeis guineensis</i> )			

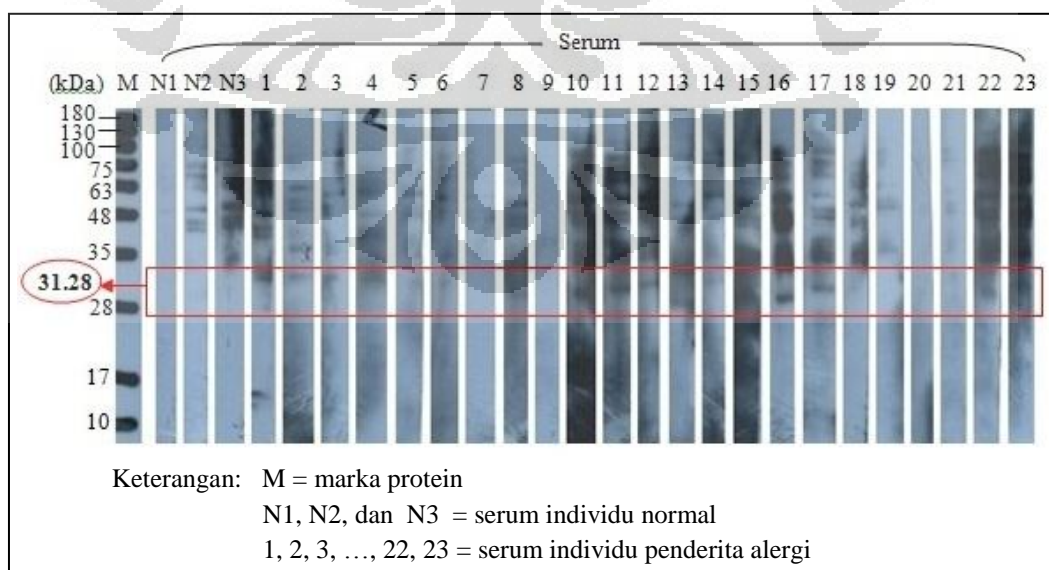
Gambar 4.5. *Dot blotting* protein sampel serbuk sari akasia dan kelapa sawit [Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Hasil negatif *dot blotting* pada ekstrak protein sampel serbuk sari akasia dan kelapa sawit dengan metode *phenol extract* (Sheoran *dkk.*, 2008) yang dimodifikasi, kemungkinan disebabkan karena konsentrasi protein sampel yang rendah. Hal tersebut dibuktikan dengan pita-pita protein hasil pemisahan SDS-PAGE yang tipis, bahkan hasil serupa juga terlihat pada pewarnaan perak nitrat yang memiliki akurasi dan sensitivitas tinggi (Gambar 4.4.1).

Protein memiliki perbedaan struktur individual sehingga protein juga memiliki sensitivitas yang tidak sama terhadap perubahan oksidasi maupun reduksi kelompok sulfur. Oleh karena itu, tidak ada satu cara pasti maupun cara sederhana untuk mempurifikasi semua protein (Clark, Jr & Switzer 1977: 73). Pemilihan metode purifikasi dan ekstraksi protein yang tepat merupakan salah satu penentu penting keberhasilan identifikasi protein.

#### 4.6. Pendeteksian Protein Alergen Serbuk Sari Kelapa Sawit

Teknik *western blotting* merupakan metode untuk mendeteksi protein tertentu dalam suatu campuran kompleks dengan mengkombinasikan tahapan elektroforesis gel, spesifisitas antibodi, dan sensitivitas uji enzim (Lodish *dkk.* 1995: 97). Ekstrak protein didenaturasi dan dielektroforesis menggunakan gel poliakrilamid. Protein yang telah terpisah pada gel ditransfer ke membran nitroselulosa menggunakan arus listrik (*electroblotting*) untuk menggerakkan protein dari gel ke permukaan membran. Metode *electroblotting* sering digunakan dalam penyusunan komponen *blotting* semi-kering (*semi-dry*) karena tingkat efisiensi transfer tinggi (Snustad *dkk.* 1997: 488). Hasil *western blotting* ekstrak protein serbuk sari kelapa sawit dapat dilihat pada gambar 4.6.1.



Gambar 4.6.1. *Western blotting* ekstrak protein serbuk sari kelapa sawit [Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Berdasarkan hasil *western blotting*, terlihat adanya perbedaan antara individu normal dan individu penderita alergi pada pita protein dengan berat molekul (BM) 31 kDa. Sebagian besar serum individu penderita alergi bereaksi positif terhadap pita protein tersebut, sedangkan serum individu normal tidak menunjukkan adanya reaksi positif. Potensi pita protein serbuk sari kelapa sawit dengan BM 31 kDa sebagai kandidat protein alergen diteliti lebih lanjut dengan melakukan *western blotting* terhadap beberapa serum individu normal dan individu penderita alergi. Reaktivitas serum normal dan individu alergi dibandingkan untuk membuktikan kealergenikan kandidat protein tersebut. Oleh karena itu, masing-masing konsentrasi protein serum disetarakan menjadi 54 mg/ml, sesuai dengan konsentrasi protein serum terkecil (Lampiran 6).

Serum individu normal N1 dan N2 digunakan sebagai kontrol negatif dan kedua serum tersebut menunjukkan kisaran konsentrasi protein hampir sama (81 mg/ml dan 84 mg/ml) jika dibandingkan dengan serum N3 (48 mg/ml). Serum individu penderita alergi 4, 11, 13, 15, 16, dan 17 digunakan untuk menguji reaktivitas kandidat protein alergen serbuk sari kelapa sawit dengan BM 31 kDa. Serum-serum individu penderita alergi tersebut mewakili serum individu alergi dengan kondisi klinis bervariasi, antara lain dermatitis, rinitis alergi, asma bronkial, urtikaria, mikosis, alergi obat, dan alergi suplemen. Visualisasi reaktivitas serum-serum tersebut cukup kuat pada *western blotting* dibandingkan serum individu penderita alergi lainnya.

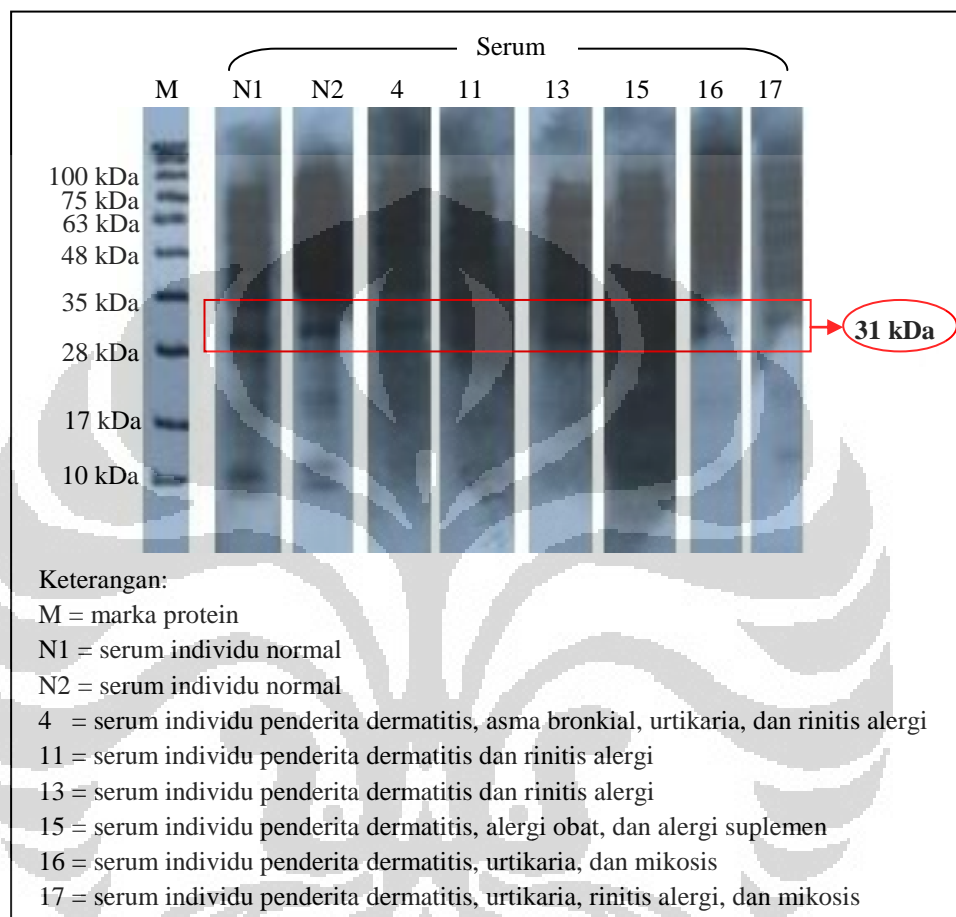
Berdasarkan visualisasi hasil *western blotting*, serum 16 dan 17 menunjukkan pita-pita protein yang cukup tebal dibandingkan dengan serum lainnya. Kedua serum tersebut berasal dari individu alergi perempuan. Perbedaan jenis kelamin secara tidak langsung memengaruhi tingkat reaktivitas pada penyakit alergi karena perbedaan hormon seks. Fluktuasi hormon estrogen dan progesteron pada perempuan memengaruhi perubahan-perubahan yang terjadi di hidung selama siklus menstruasi, pubertas, dan kehamilan sehingga secara tidak langsung berhubungan dengan gejala-gejala rinitis alergi musiman (Rengganis 2009: 46). Selain perbedaan jenis kelamin, penyakit alergi juga berbeda pada kelompok usia dan ras tertentu. Prevalensi sensitivitas alergen spesifik ditentukan

oleh kecenderungan genetik dan faktor geografi dan kultural yang bertanggung jawab terhadap pajanan alergen (Stites *dkk.* 1997: 376).

Serum individu penderita alergi yang memiliki pita cukup tebal juga terdapat pada serum 15. Individu tersebut merupakan satu-satunya individu yang memiliki alergi terhadap obat dan suplemen di antara semua individu penderita alergi pada sampel serum yang digunakan dalam penelitian. Kondisi klinis lainnya yaitu mikosis. Angka kejadian mikosis, alergi obat, dan alergi suplemen lebih rendah. Mikosis adalah penyakit infeksi yang disebabkan oleh fungi (kapang). Alergi obat dapat terjadi karena obat tersebut bersifat imunogenik. Umumnya obat memiliki berat molekul rendah sehingga bersifat non-imunogenik, tetapi jika obat tersebut dapat berinteraksi dengan protein jaringan dan berperan sebagai haptan maka obat tersebut dapat memicu respon imun. Beberapa obat merupakan protein atau polipeptida berukuran besar dan bersifat imunogenik pada kondisi aslinya, antara lain insulin, antisera dan antivenin heterolog, serta sejumlah vaksin. Alergi juga dapat terjadi terhadap suplemen dalam bentuk vitamin, mineral, enzim, dan herba. Beberapa suplemen dapat memicu respon imun pada pasien alergi tertentu, antara lain glukosamin, probiotik (mengandung mikroorganisme, seperti *Lactobacilli* dan *Bifidobacteria*), madu, sorbitol, dan minyak ikan omega-3 (Mahmoudi *dkk.* 2008: 95 & 311--313; Pawankar *dkk.* 2011: 3; Stites *dkk.* 1997: 433--434 & 706).

Reaktivitas antara kandidat protein alergen serbuk sari kelapa sawit dengan BM 31 kDa dengan serum 4 cukup kuat apabila dilihat dari ketebalan pitanya. Serum 4 berasal dari individu penderita alergi dengan kondisi klinis dermatitis, rinitis alergi, urtikaria, dan asma bronkial. Individu penderita asma tersebut berusia 43 tahun dan berjenis kelamin perempuan. Fakta tersebut sesuai dengan literatur bahwa serangan asma pada orang dewasa dapat terjadi pada segala usia dan lebih banyak terjadi pada usia sekitar 50 tahun. Pada usia dewasa, jenis kelamin perempuan lebih banyak terserang asma dibandingkan laki-laki akibat pengaruh hormon seks (rasio 3:2), sedangkan serangan asma pada usia kanak-kanak lebih banyak terjadi pada anak laki-laki dibandingkan anak perempuan (rasio 3:2), terutama pada usia di bawah 5 tahun. Namun, jenis kelamin memiliki tingkat reaktivitas yang sama pada penderita rinitis alergi

(Rengganis 2009: 46; Stites *dkk.* 1997: 395 & 398). Hasil *western blotting* ekstrak protein serbuk sari kelapa sawit terhadap beberapa serum dengan konsentrasi disetarakan dapat dilihat pada gambar 4.6.2.



Gambar 4.6.2. *Western blotting* ekstrak protein serbuk sari kelapa sawit terhadap beberapa serum dengan konsentrasi disetarakan [Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Berdasarkan analisis *western blotting* (Gambar 4.6.2), kandidat protein alergen serbuk sari kelapa sawit dengan BM 31 kDa bereaksi positif terhadap semua serum yang diujikan, baik serum yang berasal dari individu normal maupun pada individu alergi. Reaksi positif pada serum individu normal yang merupakan kontrol negatif seharusnya tidak terjadi (Wang *dkk.* 2010: 95). Timbulnya reaksi positif pada individu normal diduga karena faktor atopi. Atopi adalah kecenderungan genetik individu untuk memproduksi IgE dalam jumlah besar sebagai respon imunologis terhadap alergen lingkungan, termasuk serbuk

sari, debu, tungau, kapang, dan makanan. Alergen penyebab atopi dapat masuk ke tubuh melalui jalur inhalasi maupun ingesti (IOA 2012: 1; Stites *dkk.* 1997: 389).

Berdasarkan analisis kurva standar BSA, serum individu normal N1 dan N2 memiliki konsentrasi protein masing-masing sebesar 81.24 mg/ml dan 84.13 mg/ml (Lampiran 6). Konsentrasi protein kedua serum tersebut sedikit lebih tinggi dari konsentrasi protein serum normal yang berkisar antara 72--80 mg/ml. Hal tersebut memperkuat dugaan bahwa peningkatan konsentrasi protein serum N1 dan N2 terjadi akibat hipersensitivitas (atopi). Individu atopi mengalami peningkatan sensitivitas terhadap protein alergen lingkungan akibat kenaikan kadar IgE dalam serum (Barus *dkk.* 2003: 39; Kaslow 2011: 1; Rocken *dkk.* 1998: 97; Stites *dkk.* 1997: 389).

Atopi merupakan suatu kondisi yang dapat berkembang menjadi alergi, tetapi atopi berbeda dengan alergi. Atopi dapat terjadi tanpa menimbulkan gejala saat terpajan alergen atau disebut asimtomatik, sedangkan individu alergi mengembangkan gejala saat terpajan dengan alergen setelah sebelumnya tersensitisasi. Atopi ditemukan pada  $\geq 25\%$  populasi manusia (IOA 2012: 1; Stites *dkk.* 1997: 389; lihat Rengganis *dkk.* 2008: 333). Individu atopi dengan serum yang reaktif terhadap kandidat protein alergen serbuk sari kelapa sawit dengan BM 31 kDa dapat menjadi suatu indikasi bahwa individu tersebut memiliki sensitivitas terhadap serbuk sari kelapa sawit. Atopi tersebut berpotensi untuk berkembang menjadi penyakit alergi apabila individu atopi tersebut terpajan alergen serbuk sari kelapa sawit dengan intensitas pajanan yang lebih kuat dan pajanan berulang meskipun individu atopi tersebut tidak memiliki riwayat penyakit alergi.

Individu atopi dengan kondisi klinis tergolong normal dapat digolongkan sebagai atopi asimtomatik atau atopi yang tidak berkembang menjadi penyakit alergi. Mereka diduga pernah terpajan alergen serbuk sari kelapa sawit tetapi tidak cukup memberikan gejala penyakit alergi. Kemungkinan pajanan alergen serbuk sari kelapa sawit cukup besar karena tanaman tersebut banyak ditanam di Jakarta sebagai pohon peneduh dan elemen pertamanan kota, serta *real estate* besar. Kemungkinan lainnya adalah bahwa alergen tersebut telah menyebabkan hipersensitivitas yang tidak disadari oleh mereka yang tidak memiliki riwayat alergi tersebut karena gejala klinisnya yang ringan, seperti bersin-bersin sehingga

dianggap sebagai flu biasa. Penyakit yang ditimbulkan umumnya berupa rinitis alergi dan asma alergik, sedangkan dermatitis atopik lebih jarang (Kaslow 2011: 1; Rengganis *dkk.* 2008: 333; Rengganis 2009: 36 & 40; Stites *dkk.* 1997: 389).

Faktor genetik dan lingkungan masing-masing berkontribusi 50% pada kejadian penyakit alergi. Kecenderungan genetik untuk menyebabkan terjadinya alergi ditentukan oleh faktor atopi. Individu atopi mempunyai jumlah IgE dan level eosinofil yang lebih banyak pada sirkulasi darah jika dibandingkan individu normal dan rentan terhadap penyakit alergi seperti halnya asma dan alergi, seperti asma. Individu berpotensi 15% menderita alergi jika orang tua menderita alergi. Resiko alergi meningkat hingga 60% jika ibu menderita alergi, bahkan resiko dapat mencapai hingga 80% jika kedua orang tua menderita alergi. Namun, terkadang resiko kemunculan alergi dapat melompati satu generasi di bawahnya. Umumnya setiap etnik mempunyai ketahanan yang berbeda terhadap suatu alergi. Masyarakat di negara-negara empat musim (subtropis) mempunyai kecenderungan atopi atau memproduksi IgE dalam jumlah besar terhadap paparan alergen. Penyebaran alergen seperti serbuk sari sangat bergantung pada faktor geografi, iklim, dan vegetasi (Barus *dkk.* 2003: 39; IOA 2012: 1; Rengganis *dkk.* 2008: 328).

Serum individu alergi yang digunakan belum diketahui sensitivitasnya terhadap protein serbuk sari akasia dan kelapa sawit. Penelitian mengenai identifikasi protein alergen serbuk sari sebaiknya menggunakan serum individu yang memiliki sensitivitas terhadap serbuk sari tanaman yang akan diteliti. Diagnosis mengenai sensitivitas serum terhadap serbuk sari tanaman perlu dilakukan agar data yang diperoleh lebih efektif. Alergen yang digunakan dalam diagnosis tersebut disesuaikan dengan alergen yang akan diidentifikasi sehingga diketahui keberadaan antibodi IgE spesifik terhadap protein alergen tersebut. Pemilihan alergen dilakukan melalui uji tusuk kulit (*skin prick test*) secara *in vitro* berdasarkan pada riwayat pasien dan alergen lingkungan yang telah diketahui (Stites *dkk.* 1997: 395).

Sebagaimana penelitian Asturias *dkk.* (2004), yang bertujuan untuk mengidentifikasi dan mengkarakterisasi Pho d 2 yaitu alergen utama serbuk sari tanaman kurma. Serum yang digunakan berasal dari 25 pasien alergi yang telah

terdiagnosis menunjukkan gejala setelah menghirup serbuk sari kurma dan memiliki hasil positif uji tusuk kulit ekstrak serbuk sari kurma (Asturias *dkk.* 2004: 374 & 375). Spesifikasi serum yang digunakan pada penelitian Postigo *dkk.* (2009) mengenai karakterisasi alergen serbuk sari tanaman kurma lebih signifikan yaitu serum berasal dari individu yang hanya mengalami monosensitisasi terhadap serbuk sari tanaman kurma (Postigo *dkk.* 2009: 504).

Berdasarkan hasil *western blotting* ekstrak protein serbuk sari kelapa sawit terhadap serum individu alergi, kandidat protein alergen dengan BM 31 kDa bereaksi positif terhadap hampir 70% serum yaitu 18 serum dari total 23 serum. Persentase reaksi positif kandidat protein alergen mencapai > 80% apabila semua sampel serum diperhitungkan, baik serum individu alergi maupun individu normal (terdapat dugaan atopi). Protein serbuk sari kelapa sawit dengan BM 31 kDa berpotensi menimbulkan penyakit alergi pernapasan (Kimura *dkk.* 2002: 820). Menurut Wang *dkk.* (2010), protein alergen yang dapat memicu reaksi alergi pada > 50% pasien alergi dianggap sebagai alergen utama, sedangkan protein yang memicu reaksi alergi pada < 50% pasien alergi dianggap sebagai alergen lemah. Berdasarkan analisis tersebut, protein serbuk sari kelapa sawit dengan BM 31 kDa diduga kuat merupakan protein alergen utama serbuk sari pada tanaman tersebut.

Berdasarkan penelusuran literatur, Ela g Profilin adalah alergen serbuk sari kelapa sawit yang telah berhasil dikarakterisasi (*lihat* Steinman 2011: 1). Alergen serbuk sari kelapa genjah (*Cocos nucifera*) dan kurma (*Phoenix dactylifera*) yang telah dikarakterisasi juga teridentifikasi sebagai profilin, masing-masing yaitu Coc n Profilin dan Pho d 2 Profilin. Tanaman kelapa sawit, kelapa genjah, dan kurma termasuk tanaman Famili Arecaceae. Para peneliti telah menunjukkan adanya reaksi silang antarspesies dari Famili Asteraceae, Poaceae, Oleaceae, dan Leguminosae, termasuk Famili Arecaceae (Asturias *dkk.* 2005: 374--380; Mandal *dkk.* 2011: 11). Serbuk sari tanaman Famili Arecaeae (palem-paleman) merupakan aeroalergen utama di daerah tropis dan subtropis. Sensitisasi terhadap serbuk sari tanaman-tanaman tersebut terbukti menjadi penyebab penting terjadinya polinosis di daerah tersebut (*lihat* Steinman 2011: 1).

Reaksi silang (*cross reactivity*) profilin antara serbuk sari tanaman kelapa sawit dengan serbuk sari tanaman lain dari Famili Arecaceae dapat terjadi diduga



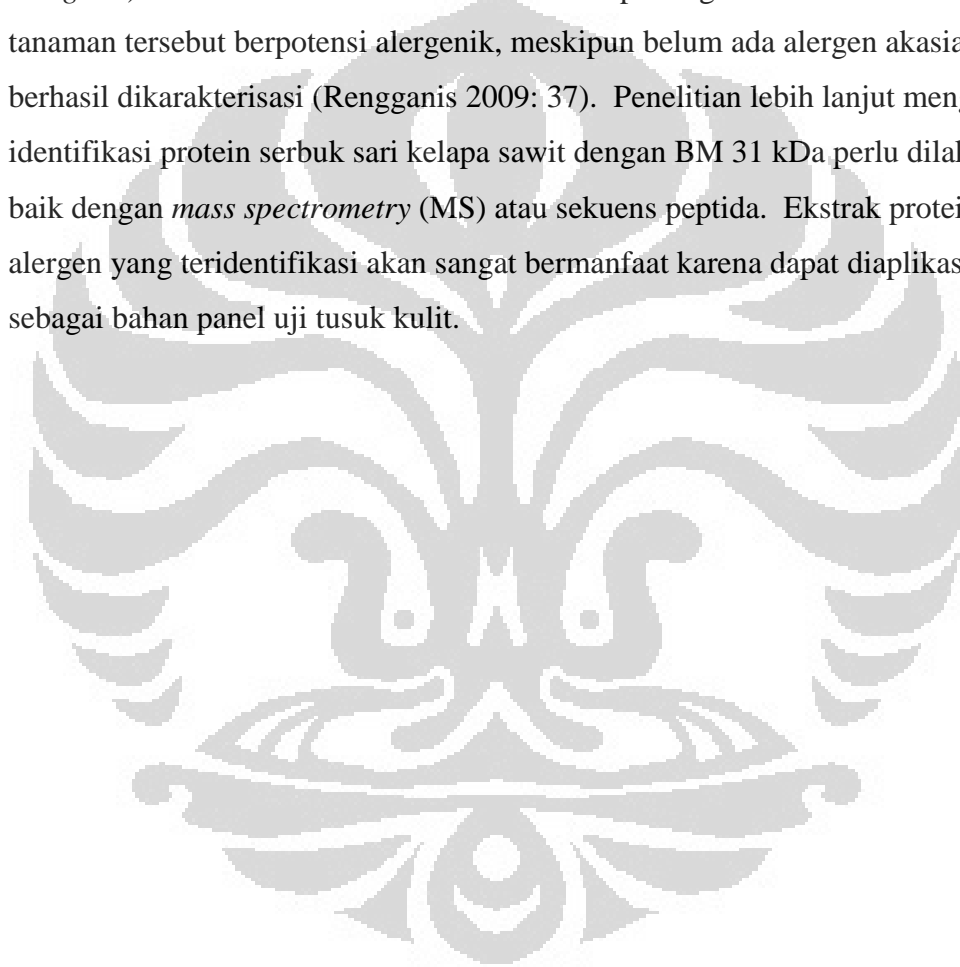
karena profilin tanaman-tanaman tersebut berbagi epitope yang sama. Perbandingan sekuens DNA profilin dari beberapa tanaman menunjukkan similiaritas yang tinggi yaitu minimal 75%. Serbuk sari memproduksi profilin dalam jumlah besar sehingga keberadaan protein tersebut melimpah. Profilin berperan penting dalam regulasi aktivitas sistem mikrofilamen dan kadar kalsium intraselular. Berat molekul profilin berkisar antara 12--15 kDa. Berdasarkan visualisasi hasil SDS-PAGE (Gambar 4.4.3), serbuk sari kelapa sawit memiliki pita protein dengan BM 14 kDa dan kemungkinan protein tersebut adalah profilin. Alergen utama pada serbuk sari tanaman kurma yang teridentifikasi sebagai profilin juga memiliki sebesar BM 14 kDa (Asturias *dkk.* 2005: 374 & 380). Namun, serum individu alergi tidak menunjukkan reaksi positif terhadap protein dengan BM 14 kDa. Profilin telah teridentifikasi sebagai alergen lemah pada serbuk sari dari beberapa jenis tanaman pepohonan, rumput, dan semak-semak, juga banyak terdapat pada buah-buahan dan sayuran (Asturias *dkk.* 2005: 380; lihat Steinman 2011: 1).

Perbedaan faktor geografi, iklim, dan vegetasi memengaruhi penyebaran alergen serbuk sari di suatu wilayah. Penyebaran alergen merupakan salah satu faktor yang menentukan tingkat sensitivitas populasi suatu daerah. Oleh karena itu, sensitivitas terhadap serbuk sari pada populasi di setiap negara sangat bervariasi karena perbedaan musim antarnegara. Sensitivitas serbuk sari di daerah tropis seperti Indonesia umumnya lebih rendah dibandingkan negara empat musim. Penelitian di Malaysia menunjukkan persentase serbuk sari rumput-rumputan dan kelapa sawit yang tertangkap lebih tinggi dibandingkan serbuk sari lainnya. Hasil uji tusuk kulit di Singapura menunjukkan sensitivitas yang cukup tinggi terhadap serbuk sari tanaman kelapa sawit 39.8% dan akasia 27.7% (lihat Rengganis *dkk.* 2008: 328 & 333).

Sensitivitas terhadap alergen tertentu dapat diketahui melalui uji fisik, seperti uji tusuk kulit (*skin prick test*). Meskipun diujikan pada kulit, tingkat keberhasilan uji tersebut sangat tinggi pada reaksi positif yang berhubungan dengan alergi pernapasan yaitu > 95%. Signifikansi tinggi hasil uji tusuk kulit berguna sebagai informasi penting bagi individu penderita alergi untuk menghindari alergen tersebut, bahkan secara tidak langsung berguna dalam

memformulasikan program imunoterapi spesifik alergen. Namun, beberapa panel uji diagnosis penyakit alergi yang ada saat ini belum dapat menyediakan alergen lingkungan target yang spesifik terhadap individu alergi tertentu. Dengan demikian, penelitian mengenai identifikasi protein alergen diperlukan dalam penanganan masalah penyakit alergi (Mahmoudi *dkk.* 2011: 53, 264, & 315; Pawankar *dkk.* 2011: 7).

Protein alergen serbuk sari akasia (*Acacia auriculiformis* dan *Acacia mangium*) belum berhasil teridentifikasi. Terdapat dugaan kuat bahwa serbuk sari tanaman tersebut berpotensi alergenik, meskipun belum ada alergen akasia yang berhasil dikarakterisasi (Rengganis 2009: 37). Penelitian lebih lanjut mengenai identifikasi protein serbuk sari kelapa sawit dengan BM 31 kDa perlu dilakukan, baik dengan *mass spectrometry* (MS) atau sekuens peptida. Ekstrak protein alergen yang teridentifikasi akan sangat bermanfaat karena dapat diaplikasikan sebagai bahan panel uji tusuk kulit.



## **BAB 5**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **5.1. Kesimpulan**

1. Protein alergen serbuk sari akasia belum berhasil teridentifikasi karena konsentrasi protein sampel serbuk sari rendah.
2. Protein serbuk sari kelapa sawit dengan berat molekul 31 kDa diduga sebagai alergen utama karena bereaksi positif terhadap > 80% serum yang berasal dari individu alergi maupun individu normal.
3. Reaksi positif pada serum individu normal diduga karena faktor atopi. Atopi dapat terjadi tanpa menimbulkan gejala alergi (asimtomatik) dan kondisi tersebut tidak selalu berkembang menjadi alergi.

#### **5.2. Saran**

1. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mengidentifikasi protein serbuk sari tanaman kelapa sawit dengan berat molekul 31 kDa.
2. Penelitian mengenai identifikasi protein alergen serbuk sari akasia perlu dilakukan kembali dengan konsentrasi protein yang lebih tinggi.
3. Penelitian mengenai identifikasi alergen serbuk sari sebaiknya dilakukan menggunakan serum manusia yang tersensitisasi terhadap serbuk sari tanaman serupa sehingga alergen dapat terdeteksi lebih spesifik.

## DAFTAR ACUAN

- Abbas, A.K., A.H. Lichtman, & J.S. Pober. 1994. *Cellular and molecular immunology*. W.B. Saunders Company, Philadelphia: xiii + 457 hlm.
- Abbas, A.K., A.H. Lichtman, & S. Pillai. 2010. *Cellular and molecular immunology*. 6th ed. Saunders Elsevier Inc., Philadelphia: viii + 566 hlm.
- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, & P. Walier. 2002. *Molecular biology of the cell*. Garland science, New york: xxxiv + 1463 hlm.
- Antler, C. 2011. Investigating the cellular machinery: Protein identification.1 hlm. <http://www.scq.ubc.ca/investigating-the-cellular-machinery-protein-identification/>. 25 April 2011, pk 21.09.
- Anupama, N., M.V. Sharma, H.S. Nagaraja, & M.R. Bhat. 2001. The serum immunoglobulin level reflects that severity of bronchial asthma. *The Journal of Physiological Sciences* **18**(3): 35-40.
- Asturias, J.A., I. Ibarrola, J. Fernandez, M.C. Arilla, R. Gonzalez-Rioza, A. Martinez. 2005. Pho d 2, a major allergen from date palm pollen, is a profilin: cloning, sequencing, and immunoglobulin E cross-reactivity with other profilins. *Clinical and Experimental Allergy* **35**: 374-381.
- Baratawidjaja, K. 2004. Alergi dan imunologi pada penyakit akibat kerja. *Cermin Dunia Kedokteran* **142**: 8-10.
- Baratawidjaja, K.G. 2006. *Imunologi dasar*. Ed ke-7. Balai Penerbit FK-UI, Jakarta: xxxviii + 572 hlm.
- Barus, F.A., W.H. Wiyono, & F. Yunus. 2003. Imunoterapi pada asma alergi. Grup PT Kalbe Farma. *Cermin Dunia Kedokteran* 141: 39--45.
- Bintang, M. 2010. *Biokimia: Teknik Penelitian*. Penerbit Erlangga, Jakarta: xvi + 256 hlm.
- Bousquet, J. 2001. From Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) in collaboration with the World Health Organization (WHO). *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **108**: S147--336.
- Boyd, W.C. 1966. *Fundamentals of Immunology*. 4th ed. John Wiley & Sons, Inc., New York: xvii + 773 hlm.

- Boyer, R. F. 1993. *Modern experimental biochemistry*. 2nd ed. The Benjamin Cummings Publishing Company Inc., California: xix + 555 hlm.
- Campbell, N.A., J.B. Reece, & L.G. Mitchell. 2004. Biologi. Jilid 3. Terj.dari *Biology*. 5th ed., oleh Manalu, W. Erlangga, Jakarta: xxi + 436 hlm.
- Carpenter, P.L. 1975. *Immunology and Serology*. 3th ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia: vii + 346 hlm.
- Cilia, M., T. Fish, X. Yang, M. Mclaughlin, T.W. Thannhauser, & S. Gray. 2009. A comparison of protein extraction methods suitable for gel-based proteomic studies of aphid proteins. *Journal of Biomolecular Techniques* **20**: 201-215.
- Clark, Jr., J.M. & R.L. Switzer. 1977. *Experimental biochemistry*. 2nd ed. W.H. Freeman and Company, San Fransisco: xii + 335.
- Cleveland Clinic. 2011. Allergy overview. (?): 1 hlm.  
<http://www.clevelandclinic.org/health/health-info/docs/1900/1948.asp?index=8610>. 16 Desember 2011, pk 16.08.
- Copeland, R.A. 1994. *Methods for protein analysis*. Chapman and Hall, New York: xi + 228 hlm.
- Cruse, J.M. & R.E. Lewis. 2003. *Illustrated dictionary of immunology*. 2nd ed. CRC Press LLC, Florida: 675 hlm.
- Davey, J. & M. Lord. 2003. *Western blotting*. AES Application Focus, UK: 7 hlm.
- Davidson. 2000. Western blot procedure. (?): 1 hlm.  
<http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/method/Westernblot.html>. 23 April 2011, pk 20.57.
- De Angelis, M., R. Di Cagno, F. Minervini, C.G. Rizzello, M. Gobbetti. 2010. Two-dimensional electrophoresis and IgE-mediated food allergy. *Electrophoresis* **31**: 2126-2136.
- Denburg, J.A. 1998. *Allergy and allergic diseases: The new mechanisms and therapeutics*. Humana Press, Inc., New Jersey: 603 hlm.
- Elgert, K.D. 1996. *Immunology: Understanding the immune system*. Wiley-Liss, Inc., New York: x+ 468 hlm.
- Fairbanks, D.J. & W.R. Andersen. 1999. *Genetics: The continuity of life*. 4th ed. Wadsworth Publishing Company, London: xix + 820 hlm.

- Gunawan, D. 2010. *Pengobatan cara medis, herbal, alternatif untuk alergi rhinitis*. University of Maryland Medical Centre, Baltimore: 8 hlm.
- Harborne, J.B. 1987. *Metode fitokimia: Penuntun cara modern menganalisis tumbuhan*. Terj dari *Phytochemical methods* oleh Padmawinata, K. & I. Soediro. Penerbit ITB, Bandung: 10a + 354 hlm.
- Hopkins Technology. 2011. Pollen allergy. (?): 1 hlm. <http://www.avoid-nasal-allergies.com/pollen-allergy.html>. 22 April 2011, pk 14.31.
- Hopkins, W.G. & N.P.A. Huner. 2009. *Introduction to plant physiology*. 4th ed. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey: xviii + 503 hlm.
- IOA (=Institute of Allergy). 2012. Atopy versus allergy. 12 September 2011: 1 hlm. <http://www.theucbinstituteofallergy.com/patient-and-public/What-is-Allergy/How-does-allergy-develop/Atopy-versus-allergy>. 18 Mei 2012, pk 13.47.
- Joker, D. 2000. *Acacia auriculiformis* Cunn.ex Benth. Danida Forest Seed Centre. *Seed Leaflet 2:1-2*.
- Joker, D. 2000. *Acacia mangium* Willd.. Danida Forest Seed Centre. *Seed Leaflet 3:1-2*.
- Kapoor, K.N., D.T. Barry, R.C. Rees, I.A. Dodi, S.E.B. McArdle, C.S. Creaser, & P.L.R. Bonner. 2009. Estimation of peptide concentration by a modified bicinchoninic acid assay. *Analytical Biochemistry* **393**: 138–140.
- Karmakar, P.R. & B.P. Chatterjee. 1992. Chemical modification studies on *Cocos nucifera* pollen allergens. *Journal of Biosciences* **17**: 441-452.
- Kaslow, J.E. 2011. Serum proteins. (?): 1 hlm. <http://www.drkaslow.com/html/proteins - albumin globulins .html>. 28 Maret 2012, pk 13.46.
- Kawamoto, S., T. Fujimura, M. Nishida, T. Tanaka, T. Aki, M. Masubuchi, T. Hayashi, O. Suzuki, S. Shigeta, & K. Ono. 2002. Molecular cloning and characterization of a new Japanese cedar pollen allergen homologous to plant isoflavone reductase family. *Clinical and Experimental Allergy* **32**: 1064-1070.
- Kimura, Y., M. Maeda, M. Kimura, O.M. Lai, S.H. Tan, S.M. Hon, & F.T. Chew. 2002. Purification and characterization of 31-kDa palm pollen

- glycoprotein (Ela g Bd 31 K), which is recognized by IgE from palm pollinosis patients. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **66**(4): 820-827.
- Kumar, L., S. Sridhara, B.P. Singh & S.V. Gangal. 1998. Characterization of cogon grass (*Imperata cylindrica*) pollen extract and preliminary analysis of grass group 1, 4 and 5 homologues using monoclonal antibodies to *Phleum pretense*. *International Archives of Allergy and Immunology* **117**: 174--179.
- Kurniawan, L. & Y.A. Israr. 2010. *Pengaruh lingkungan terhadap rinitis alergi*. Fakultas Farmasi-UnRi, Pekanbaru: 14 hlm.
- Lodish, H., D. Baltimore, A. Berk, S.L. Zipursky, P. Matsudaira, & J. Darnell. 1995. *Molecular cell biology*. 3rd ed. Scientific American Books, Inc., New York: xIvii + 1344 hlm.
- Lumbanraja, P.L.H. 2007. Distribusi alergen pada penderita rinitis alergi di Departemen THT-KL FK USU/RSUP H. Adam Malik Medan. Tesis S2-FK-USU, Medan: x + 82 hlm.
- Mahmoudi, M., dkk. 2008. *Allergy and asthma: Practical diagnosis and management*. The McGraw-Hill Companies Inc., New York: xxii + 385 hlm.
- Mahmudi, M. 2008. *Allergy & asthma: Practical diagnosis and management*. McGraw-Hill Companies, Inc., USA: xxii + 385 hlm.
- Mandal, J., P. Chakraborty, I. Roy, & S. Gupta-Bhattacharya. 2011. Aerobiological, clinical and immunobiochemical studies on *Lantana camara* pollen and cross-reactivity with other Verbenaceae pollen species. Springer Science+Business Media: 1-13.
- Mondal, A.K., S. Parui, S.R. Biswas, & S. Mandal. 1997. Identification of the allergenic proteins of *Ipomoea fistulosa* pollen: Partial characterization and sensitivity test. *Grana* **36**: 301-305.
- Oemiati, R., M. Sihombing, & Qomariah. 2010. Faktor-faktor yang berhubungan dengan penyakit asma di Indonesia. *Media Litbang Kesehatan* **20**(1): 41--49.

- Pawankar, R., G.W. Canonica, S.T. Holgate, & R.F. Lockey. 2011. *WAO white book on allergy 2011-2012: Executive summary*. World Allergy Organization: 13 hlm.
- PIER (=Pacific Islands Ecosystems at Risk). 2002. *Invasive Plant Species: *Acacia auriculiformis**. Available: <http://www.hear.org/pier> (Accessed: July 25, 2002).
- Pierce. 2007. *Instructions BCA<sup>TM</sup> protein assay kit-reducing agent compatible*. Pierce Biotechnology, Inc., Rockford: 4 hlm.
- Postigo, I., J.A. Guisantes, J.M. Negro, R. Rodriguez-Pacheco, D. David-Garcia, & J. Martinez. 2009. Identification of 2 new allergens of *Phoenix dactylifera* using an immunoproteomics approach. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* **19**(6): 504-507.
- Primrose, S.B. & R.M. Twyman. 2006. *Principles of gene manipulation and genomics*. 7th ed. Blackwell Publishing, Molden: xxii + 644 hlm.
- Raven, P.H., R.F. Evert, & S.E. Eichhorn. 1992. *Biology of plants*. 5th ed. Worth Publishers, Inc., New York: xvii + 791 hlm.
- Rengganis, I. 2004. Alergi merupakan penyakit sistemik. Grup PT Kalbe Farma. *Cermin Dunia Kedokteran* **142**: 5--7.
- Rengganis, I. 2009. Kealergenikan serbuk sari Indonesia pada manusia. Disertasi S3 - Biologi IPB, Bogor: xix + 70 hlm.
- Rengganis, I., A. Hartana, E. Guhardja, S. Djauzi, & S. Budiarti. 2008. Sensitivitas terhadap serbuk sari pada pasien alergi pernapasan. *Majalah Kedokteran Indonesia* **58**(9): 327--334.
- Rengganis, I. & O. Ramadian. 2011. Fakta: Serbuk sari, deret baru pencetus alergi. 14 April 2010: 1 hlm.  
[http://www.jacinetnetwork.org/index.php?option=com\\_content&view=article&id=71:fakta-serbuk-sari-deret-baru-pencetus-alergi&catid=1:latest-news&Itemid=50](http://www.jacinetnetwork.org/index.php?option=com_content&view=article&id=71:fakta-serbuk-sari-deret-baru-pencetus-alergi&catid=1:latest-news&Itemid=50). 28 Mei 2011, pk 20.26.
- Rifa'i, M. 2011. *Alergi dan hipersensitif*. FMIPA-Universitas Brawijaya, Malang: 68 hlm.

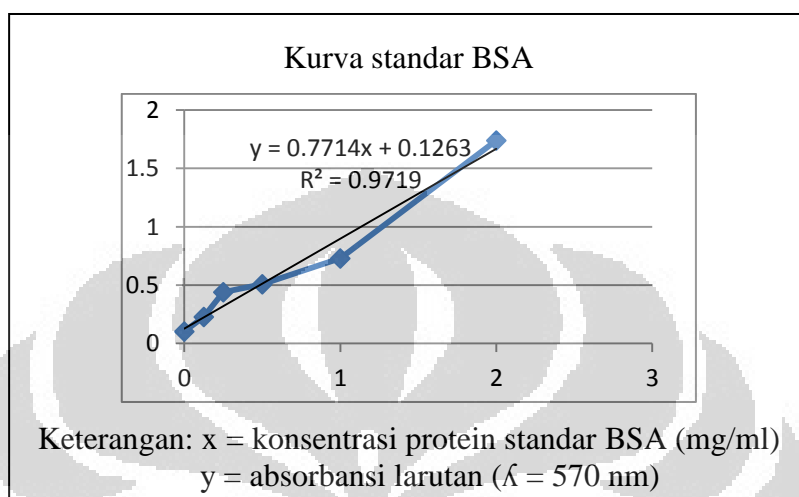


- Robinson, T. 1995. *Kandungan organik tumbuhan tinggi*. Terj dari *The organic constituents of higher plants* oleh Padmawinata, K. Penerbit ITB, Bandung: 11a + 367 hlm.
- Rocken, M., K. Schallreuter, H. Renz, & A. Szentivanyi. 1998. What exactly is “atopy”? *Experimental Dermatology* **7**: 97-104.
- Rockoff, A. & G.W. Cole. 2011. Hives (urticaria & angioedema). 16 Desember 2011: 1 hlm. <http://www.medicinenet.com/hives/article.htm>. 16 Desember 2011, pk 15.53.
- Roitt, I.M. & P.J. Delves. 2001. *Roitt's essential immunology*. 10th ed. Blackwell Science Ltd, Oxford: xi + 481 hlm.
- RCP (=Royal College of Physicians). 2003. *Allergy: The unmet need*. The Lavenham Press Ltd, Sudbury, Suffolk, London: xviii + 93 hlm.
- Sheoran, I.S., A.R.S. Ross, D.J.H. Olson, V.K. Sawhney. 2008. Compatibility of plant protein extraction methods with mass spectrometry for proteome analysis. *Plant Science* **176**(2009): 99-104.
- Sedgley, M & J. Harbard. 1993. Pollen storage and breeding system in relation to controlled pollination of four species of *Acacia* (Leguminosae: Mimosoideae). *Australian Journal of Botany* **41**: 601-609.
- Seidman, L. A. & C. J. Moore. 2002. *Basic laboratory for biotechnology: Textbook & laboratory reference*. Prentice Hall Inc., New Jersey: 751 hlm.
- Snustad, D.P., M.J. Simmons, & J.B. Jenkins. 1997. *Principles of genetics*. John Wiley & Sons, Inc., New York: xviii + 738 hlm.
- Stang, D. 2009. *Elaeis guineensis* (African oil palm). 1 Juli 2009: 1 hlm. [http://zipcodezoo.com/Plants/E/Elaeis\\_guineensis/](http://zipcodezoo.com/Plants/E/Elaeis_guineensis/). 6 Mei 2011, pk 20.19.
- Starr, F., K. Starr, & L. Loope. 2003. *Acacia auriculiformis*. United States Geological Survey, Hawai'i: 4 hlm.
- Steinman, H. 2011. Oil Palm. (?): 1 hlm. <http://www.phadia.com/en/Allergen-information/ImmunoCAP-Allergens/Tree-Pollens/Allergens/Oil-Palm-/>. 2 Maret 2012, pk 10.25.
- Stites, D.P., A.I. Terr, & T.G. Parslow. 1997. *Medical immunology*. 9th ed. Prentice-Hall International Inc., London: xii + 900 hlm.

- Thermo Scientific. 2011. DTT (Dithiothreitol). 2011: 1 hlm.  
<http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=77C3E5B3-5AD9-4A02-B1D8-39AC19495D10>. 21 Oktober 2011, pk 06.55.
- Thermo Scientific. 2011. Overview of Western Blotting. 2011: 1 hlm.  
<http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=8259A7B6-7DA6-41CF-9D55-AA6C14F31193>. 28 Mei 2011, pk 19.06
- Thermo Scientific. 2012. BCA Protein Assay Reagent (bicinchoninic acid). (?): 1 hlm. <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=02020101>. 16 Februari 2012, pk 21.50.
- Tjitrosoepomo, G. 1985. *Morfologi tumbuhan*. Gajah Mada University Press, Yogyakarta: x + 266 hlm.
- Van Heurn, F.C. 1985. *Kelapa sawit*. Terj dari *De oliepalm* oleh Semangun, H. & A. Lahija. Penerbit Acasana Karya Bhakti, Yogyakarta: vi + 138 hlm.
- Voet, D. & J.G. Voet. 1990. *Biochemistry*. John Wiley & Sons, Inc., New York: xvii + 1221 hlm.
- Wang, B., Li Z., Zheng L., Liu Y., & Lin H. 2010. Identification and Characterization of a New IgE-binding Protein in Mackerel (*Scomber japonicus*) by MALDI-TOF-MS. *The Journal of Ocean University of China (Oceanic and Coastal Sea Research)* **10**(1): 93-98
- WHO (=World Health Organization). 2003. *Prevention of allergy and allergic asthma*. WHO Document Production Services, Geneva: 14 hlm.
- Zhu, Y., P. Zhao, X. Wu, W. Wang, M. Scali, & M. Cresti. 2010. Proteomic identification of differentially expressed proteins in mature and germinated maize pollen. *Acta Physiologiae Plantarum* **33**: 1467-1474.

## Lampiran 1

Perhitungan BCA *assay* terhadap konsentrasi protein sampel yang diekstrak menggunakan metode *phenol extract*

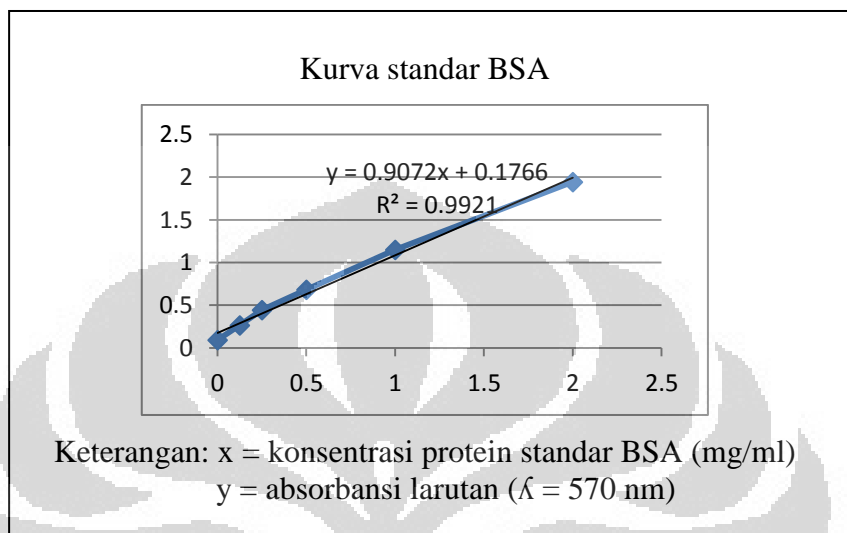


Ekstrak protein serbuk sari	Absorbansi <sup>*)</sup>	Konsentrasi protein (mg/ml)
<i>Acacia auriculiformis</i>	1.434	9.131
<i>Acacia mangium</i>	1.555	9.915
Kelapa sawit I	1.085	6.869
Kelapa sawit II	0.314	1.871

<sup>\*)</sup> Sampel didilusi 5x

## Lampiran 2

Perhitungan BCA *assay* terhadap konsentrasi ekstrak protein dari penelitian sebelumnya (Rengganis, 2009)



Ekstrak protein serbuk sari	Absorbansi <sup>*)</sup>	Konsentrasi protein (mg/ml)
Kelapa genjah	0.196	4.126
Jagung	0.251	5.339
Pinus	0.221	4.677
Kelapa sawit	0.291	6.221

<sup>\*)</sup>Sampel didilusi 20x

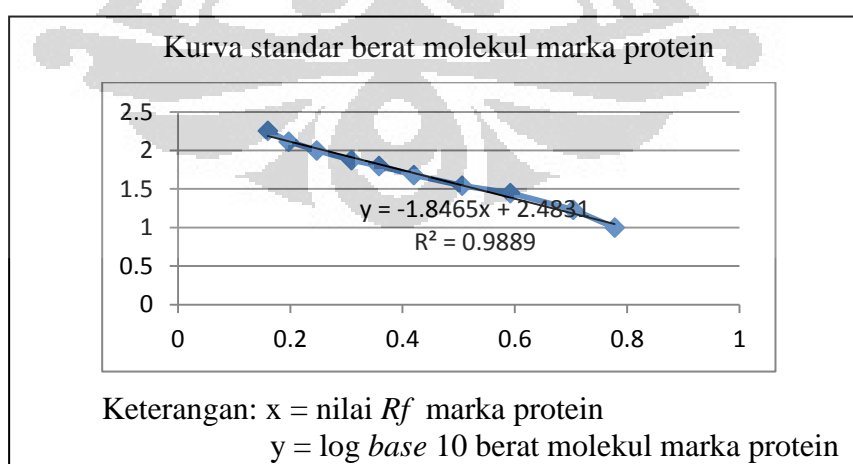
## Lampiran 3

Perhitungan berat molekul dan kurva standar protein sampel yang diekstrak menggunakan metode *phenol extract* berdasarkan visualisasi hasil SDS PAGE (konsentrasi gel 10--20%)

Berat Molekul (BM) marka protein (kDa)	Jarak migrasi pita protein (cm)	$R_f$	Log BM
180	1.3	0.160	2.255
130	1.6	0.197	2.114
100	2.0	0.247	2.000
75	2.5	0.309	1.875
63	2.9	0.358	1.799
48	3.4	0.420	1.681
35	4.1	0.506	1.544
28	4.8	0.592	1.447
17	5.7	0.704	1.230
10	6.3	0.778	1.000

Jarak migrasi larutan = 8.1 cm

Perhitungan nilai  $R_f$  (*Retention factor*) =  $\frac{\text{jarak migrasi pita protein}}{\text{jarak migrasi larutan}}$



Sampel protein serbuk sari	Jarak migrasi pita protein (cm)	$R_f$	Log BM	Berat Molekul (kDa)
<i>Acacia auriculiformis</i>	0.8	0.099	2.301	199.86
	5.6	0.691	1.206	16.09
<i>Acacia mangium</i>	1.0	0.123	2.255	179.94
	3.8	0.469	1.617	41.38
	4.3	0.531	1.503	31.83
	4.6	0.568	1.434	27.19
	5.6	0.691	1.206	16.09
Kelapa sawit I	1.0	0.123	2.255	179.94
Kelapa sawit II	1.0	0.123	2.255	179.94
	2.8	0.346	1.845	69.95
	3.7	0.457	1.640	43.61
	4.5	0.556	1.457	28.66
	5.6	0.691	1.206	16.09

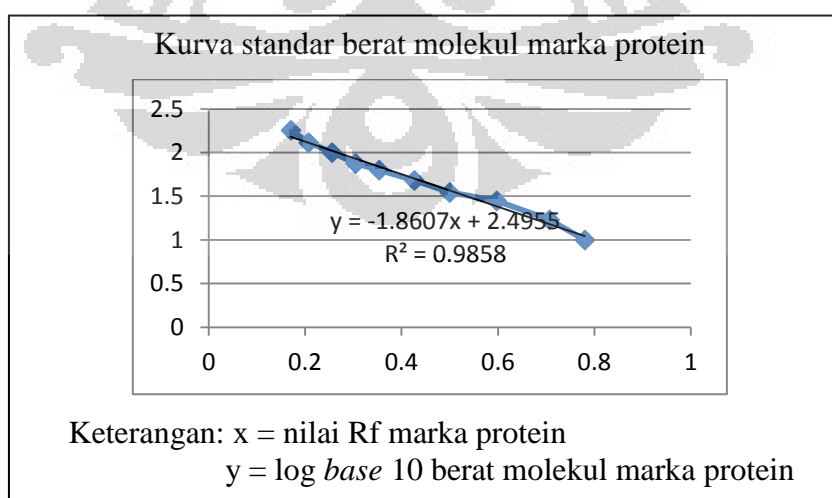
## Lampiran 4

Perhitungan berat molekul dan kurva standar ekstrak protein dari penelitian sebelumnya (Rengganis, 2009) berdasarkan visualisasi hasil SDS-PAGE (konsentrasi gel 10--20%)

Berat Molekul (BM) marka protein (kDa)	Jarak migrasi pita protein (cm)	$R_f$	Log BM
180	1.4	0.171	2.255
130	1.7	0.207	2.114
100	2.1	0.256	2.000
75	2.5	0.305	1.875
63	2.9	0.354	1.799
48	3.5	0.427	1.681
35	4.1	0.500	1.544
28	4.9	0.597	1.447
17	5.8	0.707	1.230
10	6.4	0.780	1.000

Jarak migrasi larutan = 8.2 cm

Perhitungan nilai  $R_f$  (*Retention factor*) =  $\frac{\text{jarak migrasi pita protein}}{\text{jarak migrasi larutan}}$



Sampel protein serbuk sari	Jarak migrasi pita protein (cm)	$R_f$	Log BM	Berat Molekul (kDa)
Kelapa genjah	2.1	0.256	2.019	104.47
	2.7	0.329	1.883	76.38
	2.9	0.354	1.837	68.71
	3.2	0.390	1.769	58.75
	3.4	0.415	1.724	52.97
	3.9	0.476	1.610	40.78
	4.2	0.512	1.542	34.83
	4.8	0.585	1.406	25.47
	5.2	0.634	1.315	20.68
	5.5	0.671	1.247	17.66
	5.8	0.707	1.179	15.10
	6.0	0.732	1.134	13.61
	6.3	0.768	1.066	11.64
	6.4	0.780	1.043	11.04
Jagung	2.3	0.280	1.973	94.10
	2.8	0.341	1.860	72.44
	3.1	0.378	1.792	61.94
	3.4	0.414	1.724	52.97
	3.6	0.439	1.679	47.71
	4.0	0.488	1.588	38.72
	4.1	0.500	1.565	36.73
	4.4	0.536	1.497	31.40
	4.7	0.573	1.429	26.85
	5.0	0.610	1.361	22.96
	5.6	0.683	1.225	16.79
	6.2	0.756	1.089	12.26
	6.5	0.793	1.020	10.47



Sampel protein serbuk sari	Jarak migrasi pita protein (cm)	$R_f$	Log BM	Berat Molekul (kDa)
Pinus	2.7	0.329	1.883	76.38
	3.0	0.366	1.815	65.31
	3.6	0.439	1.679	48.71
	3.8	0.463	1.633	42.98
	4.2	0.512	1.542	34.83
	6.5	0.793	1.020	10.48
Kelapa sawit	2.6	0.317	1.905	80.44
	2.8	0.341	1.860	72.44
	3.0	0.366	1.815	65.31
	3.5	0.427	1.701	50.23
	3.8	0.463	1.633	42.95
	4.0	0.488	1.588	38.72
	4.2	0.512	1.542	34.83
	4.4	0.536	1.497	31.40
	4.5	0.549	1.474	29.78
	5.0	0.610	1.361	22.96
	5.4	0.658	1.270	18.62
	5.6	0.683	1.225	16.79
	5.9	0.719	1.157	14.35
	6.3	0.768	1.066	11.64
6.6	0.805	0.998	9.95	

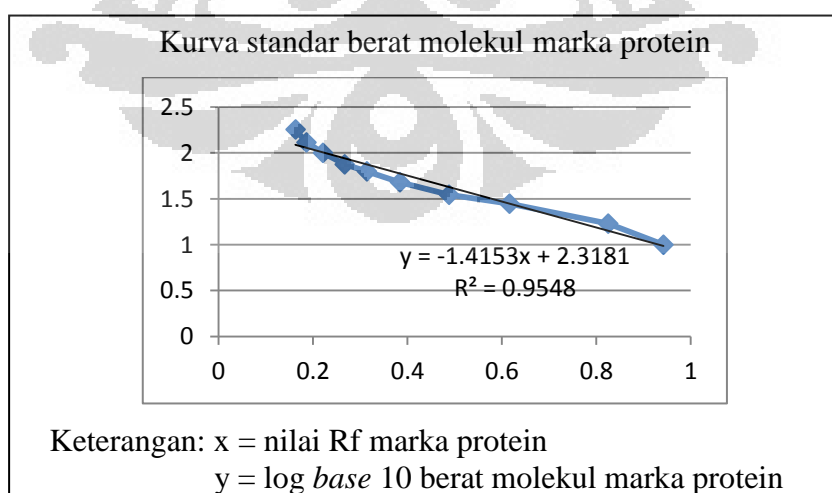
## Lampiran 5

Perhitungan berat molekul dan kurva standar ekstrak protein dari penelitian sebelumnya (Rengganis, 2009) berdasarkan visualisasi hasil SDS-PAGE (konsentrasi gel 15%)

Berat Molekul (BM) marka protein (kDa)	Jarak migrasi pita protein (cm)	$R_f$	Log BM
180	1.4	0.163	2.255
130	1.6	0.186	2.114
100	1.9	0.221	2.000
75	2.3	0.267	1.875
63	2.7	0.314	1.799
48	3.3	0.384	1.681
35	4.2	0.488	1.544
28	5.3	0.616	1.447
17	7.1	0.825	1.230
10	8.1	0.942	1.000

Jarak migrasi larutan = 8.6 cm

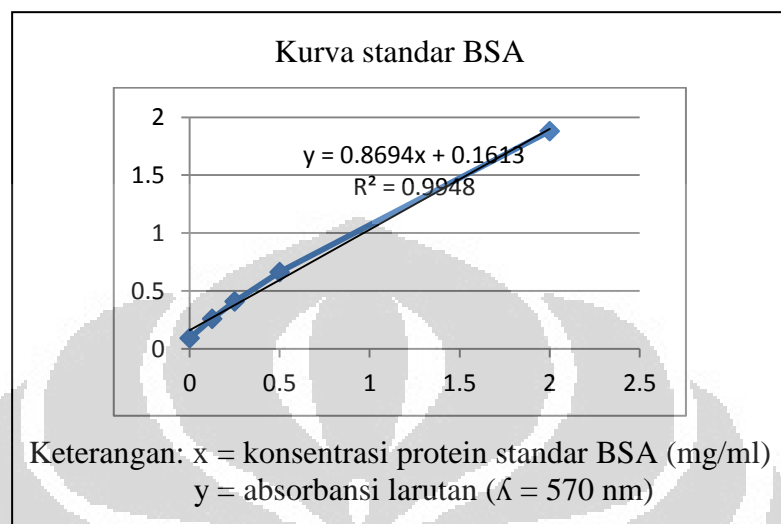
Perhitungan nilai  $R_f$  (*Retention factor*) =  $\frac{\text{jarak migrasi pita protein}}{\text{jarak migrasi larutan}}$



Sampel protein serbuk sari	Jarak migrasi pita protein (cm)	$R_f$	Log BM	Berat Molekul (kDa)
Kelapa genjah	1.8	0.209	2.022	105.16
	2.2	0.256	1.956	90.37
	2.4	0.279	1.923	83.78
	3.0	0.349	1.824	66.74
	3.3	0.383	1.775	59.57
	4.1	0.477	1.643	44.00
	5.0	0.581	1.495	31.28
	5.6	0.651	1.396	24.92
	6.2	0.721	1.298	19.85
Jagung	2.2	0.256	1.956	90.37
	2.5	0.291	1.907	80.66
	2.8	0.325	1.857	71.99
	3.2	0.372	1.791	61.87
	3.3	0.383	1.775	59.57
	4.2	0.488	1.627	42.35
	4.7	0.546	1.545	35.04
	7.2	0.837	1.133	13.59
	7.9	0.919	1.018	10.42
Pinus	1.9	0.221	2.005	101.25
	2.2	0.256	1.956	90.37
	3.1	0.360	1.808	64.26
Kelapa sawit	2.1	0.244	1.972	93.86
	2.3	0.267	1.939	87.01
	2.5	0.291	1.907	80.66
	3.0	0.349	1.824	66.74
	3.4	0.395	1.758	57.35
	3.6	0.419	1.726	53.17
	3.9	0.453	1.676	47.45
	4.1	0.477	1.643	44.00
	4.3	0.500	1.610	40.78
	5.0	0.581	1.495	31.28
	5.7	0.663	1.380	23.99
	7.0	0.814	1.166	14.66
	8.0	0.930	1.001	10.03

## Lampiran 6

## Perhitungan BCA assay terhadap konsentrasi protein serum



- Serum individu normal

Serum	Absorbansi*)	Konsentrasi protein (mg/ml)
N1	0.964	81.24
N2	0.991	84.13
N3	0.658	48.47

\*Sampel didilusi 100x

- Serum individu alergi

Serum	Absorbansi <sup>*)</sup>	Konsentrasi protein (mg/ml)
1	0.930	77.60
2	0.703	53.29
3	0.937	78.35
4	0.800	63.67
5	0.678	50.61
6	0.851	69.14
7	0.763	59.71
8	0.832	67.10
9	0.828	66.67
10	0.788	62.39
11	0.716	54.68
12	0.940	78.67
13	0.797	63.35
14	0.956	80.38
15	1.027	87.98
16	0.833	67.21
17	0.816	65.39
18	0.801	63.78
19	0.557	37.56
20	0.999	85.00
21	0.694	52.32
22	0.875	71.71
23	0.639	46.43

<sup>\*)</sup>Sampel didilusi 100x