

## **Produksi dan Isolasi Protein Membran Stadium Bradizoit *Toxoplasma gondii* : Suatu Usaha untuk Mendapatkan Material Diagnostik dalam Mendiagnosa Toksoplasmosis**

(*PRODUCTION AND ISOLATION THE MEMBRANE PROTEIN OF TOXOPLASMA GONDII  
STADIUM BRADYZOITE : THE EFFORT TO ACQUIRE DIAGNOSTIC MATERIAL  
IN TOXOPLASMOSIS DIAGNOSE*)

**Muhammad Hanafiah<sup>1\*</sup>, Wisnu Nurcahyo<sup>2</sup>  
Mufti Kamaruddin<sup>1</sup>, dan Fadrial Karmil<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Bagian Parasitologi, Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Syiah Kuala, Darussalam Banda Aceh,  
Jln. Tgk H Hasan Kreung Kalee No. 4 Kampus Unsyiah  
Telp/Fax (0651) 54208, E- Mail : [hanafi2003@yahoo.com](mailto:hanafi2003@yahoo.com)

<sup>2</sup>Bagian Parasitologi FKH Universitas Gajah Mada,  
Sekip Unit II Yogyakarta 55281,  
Telp/Fax (0274)563083, E-Mail : [wisnu@gmx.de](mailto:wisnu@gmx.de)

### **ABSTARCT**

A study was conducted to isolate the membrane protein of *Toxoplasma gondii* at bradyzoid stage for the development of intradermal diagnostic test in livestock infected by the parasite. *Toxoplasma* was initially collected from meat of goat serologically positive to the parasite. The infected meat was then fed into uninfected cat to obtain oocyst. The oocyst was inoculated into the stomach of mice to produce tachyzoit which in turn produce cyst in tissue known as bradyzoit . The membrane protein was then isolated from the bradyzoit. The protein was analysed by sodium dodecyl sulfate electrophoresis (SDS-PAGE). The data obtained were presented descriptively. The protein concentration isolated from each mouse infected at the dose of  $1 \times 10^7$  oocysts was 11.91 mg. Two protein bands specific for bradyzoit were identified at 97.72 kDa and 67.60 kDa.

Key words : Isolation, protein, bradyzoit, *T. gondii*

### **PENDAHULUAN**

Protozoa *Toxoplasma gondii* merupakan salah satu parasit dari vertebrata yang sangat sukses menginfeksi induk semang yang berdarah panas dengan cakupan yang luas, termasuk manusia. Diperkirakan seperempat populasi manusia di dunia telah terinfeksi oleh *T.gondii* (Dubey, 2001). Toksoplasmosis disebabkan oleh *T. gondii*, dan hingga saat ini merupakan penyakit zoonosis yang sangat prevalen di seluruh dunia (Tenter *et al.*, 2000).

Manusia, hewan, dan unggas dapat menderita toksoplasmosis melalui tiga cara yaitu : (1) mengkonsumsi daging yang kurang masak yang terinfeksi takizoit (fase akut) atau menelan bentuk bradizoit (fase kronis), (2) mengkonsumsi makanan dan minuman yang tercemar ookista yang berasal dari tinja kucing yang terinfeksi, dan (3) secara transplasental dari Ibu yang terinfeksi selama masa kehamilan. Kasus toksoplasmosis umumnya tidak

menunjukkan gejala klinis, baik pada inang definitif mau pun inang perantara. Pada kucing misalnya, toksoplasmosis umumnya jarang disertai timbulnya gejala klinis meskipun kucing tersebut terinfeksi oleh ookista yang jumlahnya berjuta-juta. Data mengenai toksoplasmosis di Indonesia masih sangat kurang disebabkan penyakit tersebut secara klinis tidak menunjukkan gejala yang spesifik.

Kasus toksoplasmosis pada Ibu rumah tangga di Banda Aceh tinggi. Toksoplasmosis berdampak buruk pada bayi seperti *hydrocephalus*, retardasi mental, gangguan perkembangan organ (organ interna), selama masa kehamilan. Bayi penderita toksoplasmosis sulit disembuhkan dan menimbulkan dampak psikis bagi keluarga dan juga menurunkan kualitas suatu generasi. Pendeteksian dini terhadap toksoplasmosis sangat sulit dilakukan, karena Ibu yang diduga menderita tidak menampakkan gejala klinis. Hasil penelitian yang telah dilakukan Hanafiah *et al.*, (2006)

diperoleh angka prevalensi toksoplasmosis pada masyarakat di Banda Aceh sebesar 3,15% sedangkan pada ternak bervariasi berturut-turut berdasarkan tingkat prevalensi antara lain: kambing, 40%, ayam 25%, sapi 23%, itik 20%, kucing 16%, kerbau 15%, dan domba 10%.

Toksoplasmosis merupakan salah satu penyakit zoonosis, yaitu penyakit yang secara alami dapat menular dari hewan ke manusia. Berbagai upaya pencegahan terhadap toksoplasmosis telah diupayakan, tetapi selalu dihadapkan pada kesulitan penyediaan material antigen yang mencukupi dengan tingkat sensitivitas dan spesifitas yang baik untuk suatu diagnosis. Aplikasi metode diagnosis di lapangan yang ada pada saat ini dinilai kurang praktis dan masih relatif mahal. Untuk itu, melalui pendekatan aplikasi diagnosis *Intra Dermal Test* diupayakan dapat mengatasi permasalahan keterbatasan alat untuk diagnosis toksoplasmosis dengan menggunakan protein membran bradizoit

Diagnosis konvensional umumnya tidak sensitif atau dapat menimbulkan positif semu disebabkan penggunaan antigen dari luar negeri yang tidak sama dengan isolat Indonesia. Selain itu, uji serologis yang ada di pasaran masih mahal. Isolat lokal, diharapkan dapat dipakai sebagai material dasar untuk pembuatan antigen membran rekombinan yang dapat diproduksi untuk mendeteksi toksoplasmosis di Indonesia dengan spesifitas dan sensitivitas yang tinggi. Aplikasi ELISA merupakan teknik diagnosis yang handal, yang lebih unggul dibanding metode konvensional.

Tujuan dari penelitian ini adalah memproduksi stadium bradizoit/kista dari *T.gondii* dan untuk mengisolasi protein membran *T.gondii* dari stadium bradizoit. Hasil penelitian diharapkan akan didapatkan protein membran *T.gondii* dari stadium bradizoit yang akan digunakan material dasar untuk uji *intradermal test* untuk pencegahan dan pengendalian toksoplasmosis dari produk pangan/daging.

## METODE PENELITIAN

### Isolat *T.gondii*

*Toxoplasma* pertama-tama diperoleh dari daging kambing. Daging kambing tersebut selanjutnya diberikan ke kucing sehingga diperoleh ookista. Ookista yang didapat dari kucing kemudian dinokulasikan ke lambung mencit sehingga diperoleh *Toxoplasma* takhizoit.

### Produksi Takizoit *T.gondii*

Isolat lokal *T.gondii* diinokulasikan intraperitoneal pada mencit (*Strain Balb/c*) sebanyak  $10^7$  takizoit per ekor, kemudian dipanen setelah kurang lebih 96 jam. *Toxoplasma* dipanen dari cairan peritoneal mencit dengan menyuntikkan 4-5 ml NaCl dan selanjutnya cairan yang mengandung *Toxoplasma* ditampung dalam *conical tube* 50 ml. *Toxoplasma* dicuci 2 kali dengan *Phosphat Buffer Saline* (PBS) dan terakhir dilarutkan dalam PBS pH 7,4 sehingga akhirnya diperoleh konsentrasi  $10^9$ /ml.

### Infeksi Mencit dengan *T.gondii* untuk Memproduksi Kista

Sebanyak 84 ekor mencit dibagi secara acak menjadi empat kelompok (I-IV), masing-masing kelompok terdiri dari 21 ekor. Kelompok I diinjeksi  $10^1$  takizoit/ekor secara intraperitoneal, kelompok II dan III masing-masing diinjeksi  $10^2$  dan  $10^3$  takizoit/ekor. Kelompok IV sebagai kelompok kontrol (tidak diinjeksi takizoit). Mencit positif terinfeksi bila menampakkan gejala asites. Semua kelompok perlakuan setelah terinfeksi diberi sulfadiazine sebanyak 15 mg/ekor setiap hari selama 5 hari melalui air minum. Mulai hari ke satu sampai hari ke-21 setelah infeksi, masing-masing sebanyak 1 ekor mencit dari tiap kelompok dietanasi menggunakan chloroform dan organ hati, limpa, ginjal, paru, jantung, otak, dan otot diafragma diambil, dimasukkan ke dalam formalin 10% kemudian dibuat preparat histologi.

### Pembuatan Preparat Histologis

Sampel hati, limpa, ginjal, paru, jantung, otak, dan otot diafragma yang telah difiksasi dengan formalin 10% selama 24 jam, dibuat sediaan histologi dan diwarnai dengan hematoksin eosin (HE). Jaringan yang telah difiksasi dipotong melintang dengan ketebalan  $\pm 4$  mm dan difiksasi kembali dalam larutan formalin 10% selama 24 jam. Sediaan jaringan kemudian dimasukkan ke dalam etanol berturut-turut etanol 80% satu kali, etanol 95% dua kali, etanol 100% tiga kali, masing-masing selama dua jam. Setelah dipindahkan ke dalam larutan *xylene* tiga kali dan ke dalam parafin tiga kali masing-masing selama dua jam, kemudian jaringan dicetak dalam parafin. Sediaan yang telah dicetak dipotong dengan menggunakan mikrotom dengan ketebalan 5-7 mikron dan kemudian diletakkan di atas gelas objek yang diolesi dengan *Mayer's egg* albumin dan dibiarkan selama 24 jam. Selanjutnya, sediaan jaringan direndam dalam larutan *xylene*

dua kali masing-masing selama lima menit, etanol 100 % dua kali masing-masing selama satu menit, etanol 95 % dua kali masing-masing selama satu menit, etanol 70% selama satu menit, *Harris's* hematoksilin selama 10 menit, dibilas ke dalam air sebanyak empat celupan, serta dalam acid alkohol 3-10 celupan, dicuci dengan air mengalir selama 15 menit, larutan eosin selama 15 detik, dibilas ke dalam etanol 70% satu kali celupan, dua kali larutan etanol 95 % masing-masing satu kali celupan, dua kali celupan etanol 100 % masing-masing selama satu dua menit, tiga kali larutan xylene masing-masing selama dua menit, dan kemudian ditutup dengan gelas penutup menggunakan entelan (Direktorat Bina Kesehatan Hewan, 1999). Pengamatan sediaan histologi untuk melihat kista *Toxoplasma* dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala Banda Aceh.

#### **Pemisahan Bradizoit *T. gondii*.**

Untuk mendapatkan bradizoit di jaringan terlebih dahulu diinfeksi sebanyak 30 ekor mencit dengan takizoit  $10^7$  per ekor. Selanjutnya dipisahkan bradizoit dari jaringan inang yang sudah terbentuk dengan menambah 20% larutan dextran setelah dipanaskan dan sentrifuse dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit, ditambahkan tripsin atau cara menghancurkan jaringan menggunakan *grinder*. Dalam isolasi tersebut kemungkinan hanya sedikit kista yang diperoleh karena sulitnya mendapatkan hewan yang terinfeksi kronis *Toxoplasma*. Untuk itu digunakan cara dengan memberi obat anti *Toxoplasma* pada tikus yang terinfeksi secara akut (Sodium Sulfadiazine 15 mg/100 ml air minum dari hari ke 4 hingga 12 setelah infeksi). Suspensi jaringan sebanyak 2-3 ml kemudian ditambah 5-10% *Fetal calf serum* (FCS). Suspensi kemudian dituang ke dalam tabung dan disentrifus pada 250-300 g selama lima menit. Dihitung menggunakan mikroskop dihitung bradizoit yang diperoleh dari hasil sentrifus. Kista yang terkumpul kemudian diisolasi protein membrannya. Untuk kebutuhan protein membran bradizoit *T. gondii*, maka 30 ekor mencit diinjeksi i.p. dengan  $10^7$  takizoit.

#### **Isolasi Protein Membran Bradizoit sebagai Material Diagnostik**

Kista yang diperoleh kemudian siap diekstraksi protein membrannya (Santoro *et al.*, 1985). Pelet dicuci dengan PBS pH 7,4 dan disentrifus pada 11.000 rpm selama 4 menit

untuk menghilangkan lapisan protein solubel lainnya. Pelet kemudian diresuspensi dalam 1 ml 0,5% Nonidet-P 40 (Sigma Co.) dalam PBS pH 7,4. Suspensi selanjutnya ditempatkan dalam suhu 4°C selama satu jam dan digoyang. Campuran suspensi tersebut kemudian disentrifus pada 10000 x g (18.000 rpm) selama 20 menit dalam sentrifus dingin. Setelah itu, supernatan dipindahkan dan dilakukan dialisis selama semalam terhadap PBS pH 7,4. Setelah proses dialisis, protein membran dibagi dalam *aliquot* dan disimpan pada suhu -70°C untuk pengujian selanjutnya.

#### **Analisis Protein dengan *Sodium Dodecyl Sulphat Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS PAGE)**

Gel akrilamid 10% dituang pada plat dan diratakan permukaannya dengan butanol. Setelah gel polimerisasi, butanol dibuang dan gel dicuci dengan aquades. *Stacking gel* dituang di atas gel selanjutnya sisir dipasang untuk membuat sumuran. Setelah *Stacking gel* polimerisasi, plat dirangkai dengan aparatus elektroforesis. Bufer elektroda dituang ke dalam bak, dan sisir diangkat. Sampel ditambah bufer sampel (4 : 1), direbus dalam air mendidih selama dua menit. Sampel dan protein standar kemudian dimasukkan ke dalam sumuran *Stacking gel*. Aparatus, dihubungkan dengan *power supply* (150 volt selama 1 jam) untuk di *running*. Setelah sampel mencapai *front*, gel diambil dan diwarnai dengan *Coomasie brilliant blue* 0,2% selama 24 jam, kemudian gel diawarnakan dengan larutan *destaining* sampai gel menjadi transparan. Gel disimpan dalam asam asetat 10%.

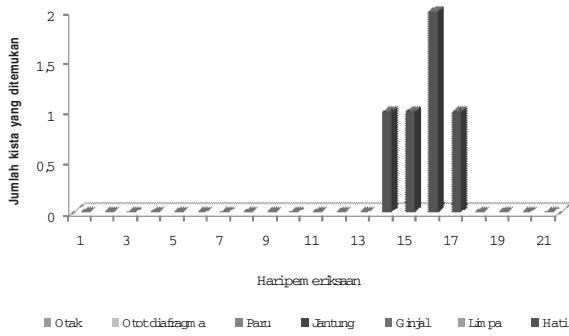
#### **Estimasi Kadar Protein**

Konsentrasi protein yang solubel dan non solubel dihitung dengan bantuan *BioRad Micro Assay system* dan keberadaan protein dikonfirmasi dengan elektroforesis protein SDS PAGE.

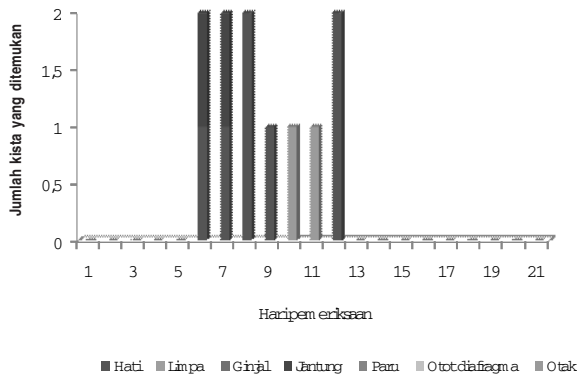
### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **Infeksi Mencit dengan *T.gondii* untuk Memproduksi Kista**

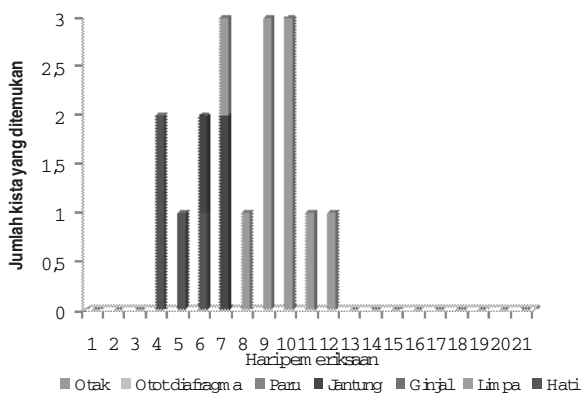
Pada pemeriksaan terhadap 84 ekor mencit diperoleh hasil seperti yang terlihat pada (Gambar 1-3). Kelompok 1 dengan dosis  $10^1$  takizoit/ekor ditemukan kista pada hati mulai hari ke-14 setelah infeksi (Gambar 1), Kelompok



Gambar 1. Jumlah kista berdasarkan hari pemeriksaan dengan dosis 10<sup>1</sup> takizoit/ekor pada beberapa organ



Gambar 2. Jumlah kista berdasarkan hari pemeriksaan dengan dosis 10<sup>2</sup> takizoit/ekor pada beberapa organ



Gambar 3. Jumlah kista berdasarkan hari pemeriksaan dengan dosis 10<sup>3</sup> takizoit/ekor pada beberapa organ

II dosis 10<sup>2</sup> takizoit/ekor ditemukan kista pada hati hari ke-6 setelah infeksi, jantung pada hari ke-7 setelah infeksi dan pada otak kista ditemukan pada hari ke-10 setelah infeksi (Gambar 2), kelompok III dosis 10<sup>3</sup> takizoit/ekor kista mulai ditemukan pada hati hari ke-4 setelah infeksi, jantung hari ke-6 setelah infeksi dan otak pada hari ke-7 setelah infeksi (Gambar 3), sedangkan pada kelompok kontrol tidak satu pun.

Kista jaringan pada penelitian ini mulai ditemukan berturut-turut pada hati, jantung kemudian diikuti otak. Hal ini sesuai seperti yang dikemukakan oleh (Dubey, 1994; Lappin, 1994) bahwa pada infeksi ekstraintestinal, setelah ookista, takizoit dan bradizoit tertelan akan terjadi infeksi enterik yang kemudian meluas ke limfonodus dan di sekitarnya, kemudian lewat vena porta menuju ke hati atau lewat duktus torasikus ke jantung setelah itu parasit tersebut secara sistemik ke jaringan lain. Takizoit tersebut kemungkinan akan masuk ke dalam otak, otot jantung dan hati membentuk kista yang kecil yang berisi bradizoit.

Kista jaringan yang paling awal ditemukan di hati pada pemberian dosis 10<sup>3</sup> takizoit yaitu pada hari ke-4 setelah infeksi. Hasil temuan ini hampir sama dengan yang dilaporkan oleh (Dubey, 1999; WHO, 2001; Smith dan Rebuck, 2001) bahwa kista dapat ditemukan 5-6 hari setelah infeksi. Bentuk kista jaringan yang ditemukan pada berbagai jaringan terutama otak dan otot, berbeda dengan yang ditemukan oleh Fayer (1981), kista jaringan terbentuk paling awal di jantung, memerlukan waktu 9-10 hari infeksi. Jika infeksi berlanjut, kista tersebut dapat dijumpai di otak ataupun organ-organ lain di dalam tubuh. Sementara menurut Dubey (1998) kista jaringan, baru mulai dapat terlihat pada hari ke-8 setelah infeksi.

Proses perubahan stadium takizoit menjadi bradizoit tergantung dari strain *T. gondii*. Ada strain yang cenderung berubah dari stadium takizoit menjadi bradizoit dan membentuk kista, yaitu strain yang tidak virulen. Selain itu ada juga strain virulen, dan stadium takizoitnya lambat berubah menjadi bradizoit.

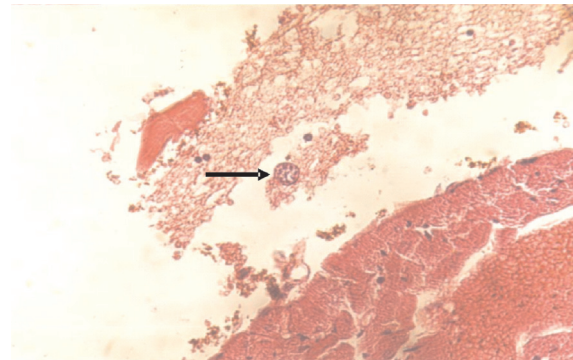
Perubahan stadium takizoit menjadi bradizoit juga tergantung dari kecepatan multiplikasi. Kecepatan perubahan takizoit menjadi bradizoit serta tergantung pada pH dan suhu lingkungan, obat antimitokondria serta nitric oxide. Gross et al., (1996) menambahkan, hasil penelitian *in vitro* yang dilakukannya

memperlihatkan bahwa perubahan takizoit menjadi bradizoit berlangsung kompleks karena harus ada ekspresi protein spesifik bradizoit dan perubahan bagian-bagian vakuola menjadi kista yaitu melalui proses pengendapan protein spesifik untuk dinding kista.

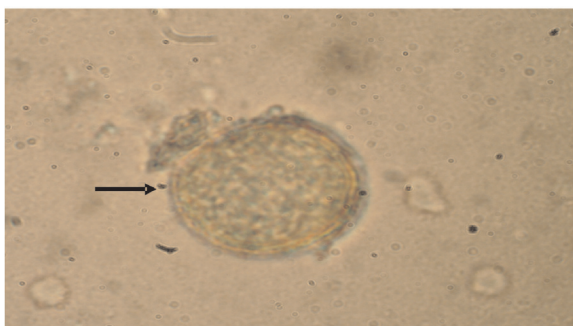
Pembentukan kista jaringan biasanya bersamaan dengan terbentuknya imunitas. Jika imunitas menyusut, bradizoit mampu memulai pembentukan takizoit yang baru dengan jalan proliferasi dan kemudian apabila timbul imunitas kembali terbentuklah kista baru yang berisi bradizoit dari takizoit-takizoit tersebut. Pembentukan kista jaringan dapat pula terjadi tanpa adanya pengaruh imunitas seperti yang terjadi di dalam kultur sel yang telah tua, karena multiplikasi dalam kultur sel tersebut terhambat, maka kista terbentuk (Soulsby, 1982).

Akibat perkembangan imunitas pada inang yang imunokompeten, maka multiplikasi takizoit akan berkembang menjadi kista jaringan yang mengandung bradizoit (Frenkel, 1990a; Lappin, 1994). Pada imunodefisiensi, replikasi takizoit dapat menimbulkan kerusakan jaringan yang parah dan menyebabkan kematian. Adanya bradizoit dalam jaringan, pada umumnya tidak menimbulkan reaksi peradangan dan dapat menetap di dalam jaringan selama rentang hidup inang. Bradizoit dalam kista jaringan dapat teraktivasi merusak sel atau jaringan sehingga menimbulkan parasitemia yang bersifat kronis. Hal tersebut terjadi pada manusia pada kondisi imunodefisiensi (AIDS/HIV) atau pemberian terapi immunodepresif seperti glukokortikoid (Lappin, 1994). Jika inang mengalami immunosupresif, maka dinding kista akan pecah dan proses pengeluaran bradizoit dari kista terjadi dan akan menginfeksi sel-sel baru (Tabbara, 1983; Frenkel, 1990b; Dubey, 1991; Neva dan Brown, 1994), selain itu juga karena multiplikasi parasit atau akibat zat lain seperti enzim yang berasal dari leukosit (Remington dan Desmotts, 1990).

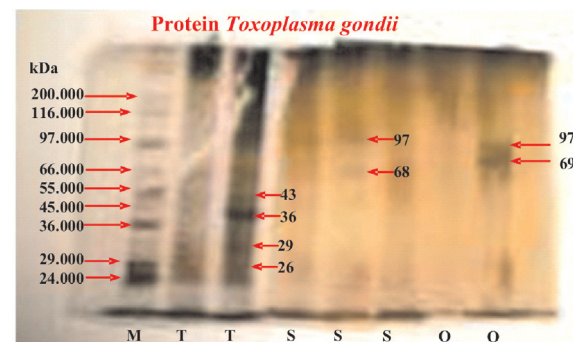
Bentuk kista dalam sel inang bervariasi, di dalam otak berbentuk bulat dan dalam serabut otot jantung (Gambar 4) atau otot kerangka mengalami konformasi (Krahenbuhl dan Remington, 1982; Remington dan Desmotts, 1990), sehingga bentuknya memanjang (Matsumura *et al.*, 1981; Frankel, 1990a). Pada penelitian ini ukuran kista jaringan matang berubah-ubah, tergantung pada usia kista, tipe sel inang dan dari strain *T. gondii* yang



Gambar 4. Kista jaringan yang ditemukan pada otot jantung mencit dengan pewarnaan HE (pembesaran 10 x 10) yang diinfeksi dosis 10<sup>3</sup> takizoit/ekor



Gambar 5. Kista yang diperoleh dari otak dengan menggunakan metode gerusan organ (Pembesaran 10x40)



Gambar 6. Analisis protein stadium ookista dan takziot dengan teknik SDS-PAGE. M= marker (sigma); T= protein stadium takizoit; S= protein stadium kista, O=protein stadium oosista

diinfeksi, tetapi rata-rata adalah 50-70 mm, dan masing-masing berisikan 1000-2000 bradizoit yang berbentuk bulan sabit.

**Pemisahan Bradizoit *T. gondii*.**

Untuk mendapatkan bradizoit sebagai bahan isolasi protein membran yang akan digunakan sebagai material diagnostik terlebih dahulu bradizoit dipisahkan dari jaringan inang

Tabel 1. Produksi protein membran stadium bradizoit *T.gondii* dari hasil inokulasi sebanyak  $10^7$  takiozot/ekor pada 30 ekor mencit

Sampel	Protein	Volume (ml)	Konsentrasi (mg/ml)	Total (mg)
Bradizoit	Membran	200	1,787	357,4

yang sudah terbentuk digunakan metode gerusan organ diperoleh hasil seperti terlihat pada Gambar 5.

Selama ini pemisahan bradizoit dari jaringan menggunakan bahan-bahan tertentu, seperti 5-10% FCS, namun pada penelitian ini cukup sederhana hanya dengan menggunakan metode gerusan organ. Hasil yang diperoleh dapat dihitung jumlahnya per satuan gram organ pemeriksaan.

### Isolasi Protein Membran Bradizoit sebagai Material Diagnostik

Menurut McLeod *et al.*, (1991) yang mensitasi Pfefferkam (1990) melaporkan bahwa *T.gondii* memiliki lebih dari 1000 macam protein dan beberapa dari protein tersebut bersifat imunogenik. Protein-protein tersebut di samping digunakan sebagai bahan alternatif vaksinasi juga dapat digunakan untuk keperluan diagnosis serologi terhadap keberadaan toksoplasmosis. Sensitivitas dan spesifisitas ELISA pada diagnosis toksoplasmosis terutama menggunakan protein rekombinan dilaporkan lebih tinggi dibanding IFA/FA. (Pietkiewicz *et al.*, 2004). Dewasa ini kebutuhan aplikasi di lapangan yang lebih sederhana juga telah dikembangkan uji cepat imunokromatografi dengan menggunakan protein natif maupun rekombinan (Huang *et al.*, 2004; Jin *et al.*, 2005).

Protein yang digunakan untuk diagnosis toksoplasmosis bervariasi mulai dari protein natif seperti protein membran, *soluble of tachyzoite antigen/lysate of tachyzoite antigen* (STAg/LTA), *excretory and secretory antigen* (ESA) dan fraksinasi dari protein natif tersebut (Giraldo *et al.*, 2000; Singh, 2003) sampai protein tunggal hasil teknologi rekombinan seperti SAG1, GRA7, MIC3, dan SAG2 (Harning *et al.*, 1996; Aubert *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2000; Marcolino *et al.*, 2000; Pfreper *et al.*, 2005). Penggunaan protein natif memiliki keunggulan dalam hal kemudahan preparasi, sensitivitas dan spesifisitas cukup tinggi dan dapat digunakan untuk uji aviditas dengan baik. Sebaliknya protein tunggal memiliki

keunggulan dalam hal spesifisitas dan sensitivitas yang lebih baik dibanding protein natif.

Dari 30 mencit yang diinfeksi dengan takiozot  $10^7$  dapat diperoleh sejumlah protein membran seperti tercantum dalam Tabel 1. Konsentrasi protein membran dihitung menggunakan bantuan *BioradMicro Assay System* dan untuk mengetahui protein-protein yang spesifik pada stadium bradizoit dikarakterisasi dengan teknik *Immunoblot/Westernblot*.

Dengan demikian dapat diperkirakan bahwa produksi protein membran stadium bradizoit dari 1 ekor mencit yang diinokulasi dengan dosis  $10^7$  takiozot adalah sebesar 11,91 mg. Namun, jumlah ini masih sangat bervariasi tergantung pada isolat *Toxoplasma*, jenis dan umur hewan percobaan yang digunakan. Pada penelitian ini mencit yang digunakan berumur dua bulan.

### Analisis Protein dengan *Sodium Dodecyl Sulphat Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS PAGE)

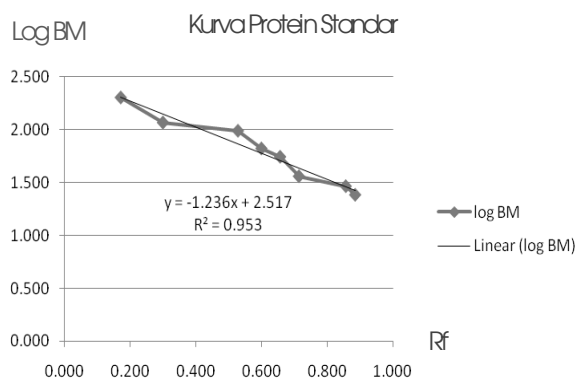
Berdasarkan hasil preparasi protein sampel stadium bradizoit dengan teknik SDS PAGE (Gambar 6) dan karakterisasi protein membran stadium bradizoit dengan *Immunoblot/Westernblot* dari penelitian terdahulu diperoleh beberapa protein spesifik antara lain mempunyai berat molekul (BM) 200 kDa, 70 kDa, 60 kDa, 52 kDa, 47 kDa, 38 kDa dan 27 kDa (Hartati *et al.*, 1997). Sedangkan untuk penentuan berat molekul pada penelitian dilakukan dengan bantuan protein standar. Untuk menentukan berat molekul protein dilakukan dengan menghitung *Rf* (*Retardation Factor*) dari masing-masing pita, dari protein standar yang sudah diketahui berat molekulnya dengan menggunakan rumus *Rf* (Gambar 7).

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

Dari persamaan regresi linear  $Y = a + bx$ ,  $a = 2,517$ ;  $b = 1,236$  maka  $Y = 2,517 - 1,236x$

Tabel 2. Penghitungan nilai Rf pada marker

Marker	b	a	Rf	log berat molekul (Y)
200	7	1.2	0.171	2.301
116	7	2.1	0.300	2.064
97	7	3.7	0.529	1.986
66	7	4.2	0.600	1.819
55	7	4.6	0.657	1.740
36	7	5.0	0.714	1.556
29	7	6.0	0.857	1.462
24	7	6.2	0.886	1.380



Gambar 7. Kurva Berat Molekul Protein Standar

Tabel 3. Penentuan Berat Molekul stadium bradizoit dengan mengkonversi nilai Rf ke dalam persamaan

a	b	Rf	log Berat Molekul	BM(kDa)
1.7	7	0.243	1.990	97,72
2.9	7	0.414	1.830	67,60

dimana R nya adalah 0,953. Untuk penentuan berat molekul stadium bradizoit dilakukan dengan mengkonversi nilai Rf ke persamaan regresi yang sudah diperoleh yaitu :  $Y = -1,236x + 2,517$ , maka diperoleh berat molekul masing-masing seperti pada Tabel 3.

Dari Tabel 3 terlihat bahwa protein yang diperoleh dari stadium bradizoit sebanyak 2 yaitu protein dengan berat molekul (BM) 97,72 kDa, dan 67,60 kDa.

## SIMPULAN DAN SARAN

### Simpulan

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa telah dapat diproduksi stadium bradizoit *T.gondii* pada mencit dengan berbagai dosis perlakuan antara lain  $10^1$ ,  $10^2$ , dan  $10^3$  takizoit/ekor. Di samping itu telah dapat dipisahkan bradizoit di jaringan dengan menggunakan metode gerusan organ. Protein membran stadium bradizoit dari setiap ekor mencit yang diinfeksi dengan dosis  $10^7$  adalah sebesar 11,91 mg. Protein yang diperoleh dari stadium bradizoit ada dua macam yaitu protein dengan berat molekul (BM) 97,72 kDa, dan 67,60 kDa.

### Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui tingkat imunogenik dari masing-masing protein membran dari stadium bradizoit *Toxoplasma gondii* isolat lokal.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Pendidikan Tinggi Melalui Program Hibah Bersaing Tahun 2008 yang telah memberikan kesempatan dan biaya sehingga penelitian ini dapat dilaksanakan dengan baik.

## DAFTAR PUSTAKA

- Direktorat Bina Kesehatan Hewan. 1999. *Manual Standar Metode Diagnosa Laboratorium Kesehatan Hewan*. Jakarta. Direktorat Jenderal Peternakan Departemen Pertanian.
- Aubert D, Maine GT, Villena I, Hunt JC, Howard L, Sheu M, Brojanac S, Chovan LE, Nowlan SF, Pinon JM. 2000. Recombinant Antigens to Detect *Toxoplasma gondii*-Specific Immunoglobulin G and Immunoglobulin M in Human Sera by Enzyme Immunoassay. *J Clin Microbiol* 38 (3) : 1114– 1150.
- Dubey JP. 1991. Toxoplasmosis an overview. In: Cross, J. H. *Emerging problem in food-borne parasitic zoonosis: Impact on agriculture and public health*. (ed). Proceeding of the 33<sup>rd</sup>. SEAMED-TROPED Regional Seminar, Bangkok.

- Dubey JP. 1994. Toxoplasmosis. Zoonosis update. *J Am Vet Med Ass* 20:1593-1598.
- Dubey JP, Beattie. 1998. Structure of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev* 11:267-299
- Dubey JP. 1999. *Toxoplasma gondii*. <http://medimicrochaooter84.html>
- Dubey JP. 2001. Oocyst shedding by cats fed isolated bradyzoites and comparison of infectivity of bradyzoites of the VEG strain *Toxoplasma gondii* to cats and mice. *Journal of Parasitology* 87: 215–219.
- Fayer R. 1981. Toxoplasmosis up date and public helath implication. *Can Vet J* 22:344-352
- Frenkel JK. 1990a. Toxoplasmosis in human being. *J Am Vet Med Ass* 196 (2) 240–248.
- Frenkel JK. 1990b. Transmission of toxoplasmosis and the role of immunity in limiting transmission and illness. *J Am Vet Med Ass* 196 (2) : 233-239.
- Giraldo M, Cannizzaro H, Ferguson MAJ, Almeida IC, Gazzinelli RT. 2000. Fractionation of Membrane Components from Tachyzoite Forms of *Toxoplasma gondii*: Differential Recognition by Immunoglobulin M (IgM) and IgG Present in Sera from Patients with Acute or Chronic Toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 38 (4) : 1453 – 1460.
- Gross O, Bohne W, Soete M, Dubremetz JF. 1996. Developmental differentiation between takhyzoites and bradizoites of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Today* 12: 30-33.
- Hanafiah M, Mufti K, Nurcahyo W, Winaruddin. 2006. Studi Infeksi Tokso-plasmosis pada Manusia Hubungannya dengan Ternak di Banda Aceh. *Laporan Penelitian Hibah BRR*. Darussalam Banda Aceh.
- Harning D, Spenter J, Metsis A, Vuust J, Petersen. 1996. Recombinant *Toxoplasma gondii* Surface Antigen 1 (P30) Expressed in Escherichia coli Is Recognized by Human Toxoplasma Specific Immunoglobulin M (IgM) and IgG Antibodies. *Clin Diag Lab Immunol* 3 (3): 355–357.
- Hartati S, Artama WT, Sumartono, Wuryastuti H. 1997. Identifikasi molekuler *Toxoplasma gondii* isolat lokal. *Laporan Penelitian Hibah Bersaing*. Fak. Kedokteran Hewan UGM. Yogyakarta.
- Huang X, Xuan X, Hirata H, Yokoyama N, Xu L, Suzuki N, Igarashi I. 2004. Rapid Immunochromatographic Test Using Recombinant SAG2 for Detection of Antibodies against *Toxoplasma gondii* in Cats. *J Clin Microbiol* 42 (1) : 351–353.
- Jin S, Chang ZY, Ming X, Min CL, Wei H, Sheng LY, Hong GX. 2005. Fast Dipstick Dye Immunoassay for Detection of Immunoglobulin G (IgG) and IgM Antibodies of Human Toxoplasmosis. *Clin Diag Lab Immunol* 12 (1): 198–201.
- Krahenbuhl JL, Remington JS. 1982. Immunology of *Toxoplasma* and toxoplasmosis. In : Cohen S, Warren KS. (Eds) *Immunology of parasitic infections*. 2nd Ed. Oxford. Blackwell.
- Lappin MR. 1994. Feline Toxoplasmosis. *WALTHAM Focus* 4 (4): 2-8.
- Li S, Galvan G, Araujo FG, Suzuki Y, Remington JS, Parmley S. 2000. Serodiagnosis of Recently Acquired *Toxoplasma gondii* Infection Using an Enzyme Linked Immunosorbent Assay with a Combination of Recombinant Antigens. *Clin Diag Lab Immunol* 7 (5) : 781–787.
- Marcolino PT, Silva DAO, Leser PG, Camargo ME, Mineo JR. 2000. Molecular Marker in Acute and Chronic Phase of Human Toxoplasmosis: Determination of Immunoglobulin G Avidity by Western Blotting. *Clin Diag Lab Immunol* 7 (3): 384–389.
- Matsumura, T., Ugas, S., Takahadi, J., Kawamoto, Y., Okada, S. and Hatta, S. 1981. Cyst-formation of *T. gondii* in mouse brain. *ICMR.ANNALS*, Kobe, Japan., 1:209-227
- McLeod R, Mack DD, Brown C. 1991. *Toxoplasma gondii*-New Advances in Cellular and Molecular Biology. *Exp Parasitol* 72: 109-121.
- Neva FA, Brown HW. 1994. *Basic Clinical Parasitology*. 6<sup>th</sup> Eds. New York. Prentice Hall International Inc. Pp 44-50
- Pfpreper K-I, Enders G, Gohl M, Krczal D, Hlobil H, Wassenberg D, Soutschek E. 2005. Seroreactivity to and Avidity for Recombinant Antigens in Toxoplasmosis. *Clin Diag Lab Microbiol* 12 (8): 977–982.



- Pietkiewietz H, Hiszeżyńska-Sawicka E, Kur J, Petersen E, Nielsen HV, Stankiewicz M, Andrzejewska I, Myjak P. 2004. Usefulness of *Toxoplasma gondii* Specific Recombinant Antigens in Serodiagnosis of Human Toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 42 (4) : 1779–1781.
- Remington JS, Desmonts G. 1990. Toxoplasmosis. In: *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. Remington JS, Klein JO (eds). 3<sup>rd</sup> Ed. Philadelphia. WB. Saunders Co.
- Santoro, Priyowidodo D. 1985. Prevalensi Toksoplasmosis pada Daging Kambing dengan Metode Polimerase Chain Reaction. *Laporan Penelitian FKH UGM*. Yogyakarta.
- Singh S. 2003. Mother to Child Transmissin and Diagnosis of *Toxoplasma gondii* Infection During Pregnancy. *Indian J Medic Microbiol* 21 (2): 69–76.
- Smith JE, Rebeck N. 2001. *Toxoplasma gondii* Strain Variation and Pathogenicity. In: Carry JW, Linz JE, Bhatnagar D. (Eds). *Microbial Foodborne disease*. Technomic Co. Inc, USA. Pp 404-431.
- Soulsby E.J.L. 1982. *Helminths, Arthropods and protozoa of Domesticated Animals*. 7<sup>th</sup>ed. London. Bailliere Tindall. Pp 507-645.
- Tabbara KF. 1983. Ocular Toxoplasmosis. In Kock DD, Parke II, Paton DW. (eds). *Current management in ophthalmology*. Melbourne. Churchill Livingstone.
- Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Intl J Parasitology* 30: 1217–1258.
- Werk R. 1988. How does *Toxoplasma gondii* enter host cells? *Rev Infect Dis* 7:449-450.
- WHO. 2001. Toxoplasmosis Public Health Education Information Sheet. March of Dimer. Ask NOAH About : Pregnancy Fact Sheet WHO. <http://www.noah.health.org.toxoplas.html>