

Pelacakan Ekspresi Antigen *Toxoplasma gondii* secara Imuno(sito)histokimia

(TRACKING EXPRESSION OF TOXOPLASMA GONDII ANTIGENS
USING IMMUNO(CYTO)HISTOCHEMISTRY METHOD)

Ida Ayu Pasti Apsari¹, Ida Bagus Oka Winaya²,
Tjokorda Sari Nindhia³, Ida Bagus Ngurah Swacita⁴

¹Laboratorium Parasitologi Veteriner, ²Laboratorium Patologi Veteriner,

³Laboratorium Epidemiologi Veteriner dan Biostatistika,

⁴Laboratorium Kesehatan Masyarakat Veteriner.

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana.

Jl. Sudirman, Denpasar, Bali, Indonesia

Telp/Fax: 0361 223791; Email: iapapsari@yahoo.co.id.

ABSTRAK

Tujuan penelitian untuk melacak ekspresi antigen *Toxoplasma gondii* pada jantung ayam kampung dengan teknik imuno(sito)histokimia. Dalam penelitian ini dikaji tiga metode pemeriksaan untuk melacak antigen *T. gondii*, yaitu pertama pemeriksaan langsung secara mikroskopis digesti jantung ayam kampung, metode kedua melacak antigen *T. gondii* dengan teknik imunositokimia dari digesti jantung ayam, dan yang ketiga pemeriksaan secara imunohistokimia dari jantung ayam kampung. Jumlah sampel yang diperiksa 100 jantung ayam kampung. Pemeriksaan langsung secara mikroskopis digesti jantung ayam kampung untuk melacak bentuk bradizoit (dalam sista) pada inokulat jantung ayam. Pemeriksaan dengan teknik imuno(sito)histokimia melacak ekspresi antigen *T. gondii* pada sel dan jaringan otot jantung ayam kampung. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemeriksaan langsung secara mikroskopis tidak terdeteksi sista dan pelacakan secara imunositokimia tidak terdeteksi ekspresi antigen *T. gondii* pada inokulat jantung ayam kampung. Pemeriksaan secara imunohistokimia berhasil mendeteksi ekspresi antigen *T. gondii* berupa bentuk yang terekspresi berwarna coklat kemerahan, sebanyak 2% (2/100). Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ekspresi antigen *T. gondii* pada jantung ayam kampung berhasil dilacak secara imunohistokimia.

Kata-kata kunci: *Toxoplasma gondii*; metode digesti; ekspresi antigen; imuno(sito) histokimia; ayam kampung

ABSTRACT

The research objective want to track the expression of *Toxoplasma gondii* antigenes in the heart of the free-range chicken with immuno(cyto)histochemistry technique. In the present study were examined three methods to track antigen *T.gondii*, first method direct microscopic examination of the heart digests, the second method to detect antigen of *T.gondii* with immunocytochemistry technique of the chicken heart digests and the third immunohistochemistry examination of the heart free-range chicken. The number of material samples examined were 100 heart free-range chicken. Direct microscopic examination of the heart digests free-range chicken to track the bradyzoite form (inside cyst). Examination by immuno(cyto)histochemistry technique keep track *T.gondii* an antigen expression on cells and heart muscle tissue. The results showed that the direct microscopic examination on the heart tissue unable to detect cyst and antigen *T.gondii*. Immunohistochemical examination successfully detected the expression of antigenes *T.gondii* and was found 2% (2/100) positive. It can be concluded that *T.gondii* antigen expression in the heart of range chicken could be detected by immunohistochemistry.

Keywords: *Toxoplasma gondii*; digestion method; antigene expression; immuno(cyto)histochemistry; free range-chicken

PENDAHULUAN

Toxoplasma gondii adalah parasit intra-seluler obligat. Parasit ini paling unik di antara famili *Apicomplexa*, karena parasit ini dapat masuk dan memperbanyak diri di dalam sel semua hewan berdarah panas termasuk unggas (Soulsby, 1982; Levine, 1995; Dubey *et al.*, 2005; Dubey *et al.*, 2006). *Toxoplasma gondii* menyebabkan penyakit toksoplasmosis yang sudah tersebar di seluruh dunia (Tenter *et al.*, 2000). Kasus toksoplasmosis pada hewan dan manusia, baik di dunia maupun di Indonesia sangat tinggi. Kasus pada manusia berkisar 40-85%, sedangkan pada hewan berkisar antara 5-80% (Subekti *et al.*, 2005). Beberapa peneliti yang meneliti prevalensi *T. gondii* pada unggas melaporkan prevalensi yang beragam dari 3-81%. (Sreekumar *et al.*, 2003; Dubey *et al.*, 2003; Dubey *et al.*, 2005) dan lebih banyak pada ayam kampung. Deteksi *T. gondii* pada ayam kampung merupakan indikator yang baik dari kemungkinan sebagai sumber penular bagi manusia (Mose *et al.*, 2016). Tingginya kasus toksoplasmosis pada hewan dan manusia, maka melacak *T. gondii* pada hewan maupun manusia merupakan hal yang sangat penting dilakukan.

Priyana (2000) berhasil mendeteksi antibodi *T. gondii* pada ayam kampung menggunakan metode Inhibitor haemagglutination (IHA) dengan hasil 52,5%. Mufasirin *et al.*, (2002) mendeteksi antigen *T. gondii* dengan metode Elisa *Dot Blot* terdeteksi 100% telur ayam kampung mengandung antigen *T. gondii*. Suwanti (2005) dengan metode digesti mendeteksi 30% jantung dan otak ayam mengandung kista *T. gondii*.

Imunohistokimia adalah metode pewarnaan jaringan yang menggunakan reaksi imunologik dan kimiawi. Keberadaan antigen dalam jaringan dapat ditentukan dengan mengikatkan antibodi monoklonal atau poliklonal pada antigen tersebut, dan menentukan lokasi ikatan-ikatan ini dengan sistem pelacakan yang mengenal imunoglobulin dari spesies asal antibodi. Kemudian membuat molekul pelapor dari sistem pelacakan untuk bereaksi dengan substratnya (Kiernan, 2001; Hastuti dan Lubis, 2011).

Afinitas sista lebih banyak pada jaringan neural dan muskuler (Weiss dan Kim, 2000). Lokasi sista dominan di otak, otot, dan jantung (Dubey *et al.*, 2006). Pelacakan antigen *T. gondii* pada jaringan ayam kampung dengan teknik imuno(sito)histokimia belum pernah

dilaporkan. Pada penelitian ini dilakukan pelacakan antigen *T. gondii* secara imunohistokimia dari hasil digesti jaringan organ jantung ayam kampung dan melacak ekspresi antigen *T. gondii* secara imunohistokimia dari preparat histologi jantung ayam kampung. Sebagai permasalahan yang ingin dijawab apakah dengan teknik imuno(sito)histokimia dapat melacak ekspresi antigen *T. gondii* pada jantung ayam kampung.

METODE PENELITIAN

Sejumlah 100 buah jantung ayam kampung diperoleh dari pasar tradisional. Sebanyak 20 organ jantung ayam kampung, kira-kira mencapai berat 50 g, dipotong kecil-kecil kemudian digerus memakai *blender* dengan kecepatan rendah selama 30 detik, kemudian ditambahkan 125 mL saline dan digerus kembali dengan kecepatan tinggi. Suspensi tersebut dituangkan ke dalam wadah dan ditaruh pada suhu kamar selama 1-3 jam. Hasil gerusan ditambahkan larutan pepsin HCl dalam keadaan hangat (Dubey, 1998), diinkubasikan pada suhu 37°C sambil diputar dengan *magnetic stirrer* selama satu jam. Ekstrak jantung ayam disaring, dan disentrifuge dengan kecepatan 1200 rpm selama 10 menit. Supernatan hasil sentrifuge dibuang, sedimennya ditambahkan dengan 20 mL PBS dan dimasukkan pada tabung *conical* 50 mL, ditambahkan 12-18 mL sodium bikarbonat. Dipusing kembali dengan kecepatan 1200 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang, sedimen yang tersisa diperiksa secara langsung untuk menemukan bradizoit (dalam sista). Hasil digesti tersebut digunakan sebagai inokulat jantung ayam.

Teknik Imuno(sito)histokimia

Pelacakan secara imunohistokimia, memanfaatkan sejumlah bahan antara lain, jantung ayam kampung, poliklonal *anti-Toxoplasma gondii-Antibody* (produksi *Thermo Fisher Scientific*), konjugat *Peroxidase* dan substrat DAB (*Diaminobenzinidine*). Terhadap organ jantung dilakukan proses untuk pembuatan preparat histologi. Deparafinasi preparat (blok antibodi) dilakukan dengan *xylene* sebanyak tiga kali masing-masing selama tiga menit. Rehidrasi preparat dilakukan dengan menggunakan etanol 100% selama dua menit, etanol 95% selama dua menit, dan etanol 70% selama satu menit, dan terakhir dengan air

selama satu menit. Preparat direndam dalam *peroxidase blocking solution* pada suhu kamar selama 10 menit. Preparat diinkubasi dalam *prediluted blocking serum* 25°C selama 10 menit. Preparat kemudian direndam dalam antibodi anti-*Toxoplasma gondii* 25°C selama 10 menit. Preparat kemudian dicuci dengan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) selama lima menit, selanjutnya diinkubasi dengan antibodi sekunder (*conjugated to horse radish peroxidase*) 25°C selama 10 menit, kemudian dicuci dengan PBS selama lima menit. Preparat kembali diinkubasi dengan peroksidase 25°C selama 10 menit dan dicuci dengan PBS selama lima menit. Langkah terakhir adalah preparat diinkubasi dengan kromogen *Diaminobenzidine* (DAB) 25°C selama 10 menit dan preparat diinkubasi juga dengan Hematoxylin Eosin selama tiga menit, kemudian dicuci dengan air mengalir. Preparat dibersihkan dan ditetesi *mounting media*, kemudian ditutup dengan *coverslip*. Ekspresi antigen *T. gondii* (warna coklat kemerahan) pada sel diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000 kali. Konjugat peroksidase dan substrat DAB dapat memberikan warna coklat kemerahan pada hasil reaksi.

Melacak secara imunositokimia, suspensi jantung ayam (hasil digesti jantung ayam kampung) dilakukan dengan mengulaskannya ke gelas objek. Preparat dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Setelah kering, selanjutnya diberi perlakuan seperti pelacakan secara imunohistokimia. Ekspresi antigen *T. gondii* pada preparat sel diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000 kali. Munculnya warna coklat kemerahan pada preparat sel merupakan hasil positif ekspresi antigen *T. gondii*.

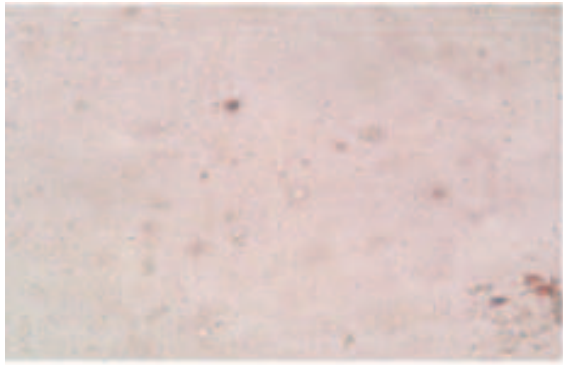
HASIL DAN PEMBAHASAN

Telah dilakukan penelitian melacak ekspresi antigen *T. gondii* secara imuno (sito) histokimia pada jantung ayam kampung, dengan hasil pemeriksaan langsung digesti jantung ayam kampung secara mikroskopis tidak berhasil menemukan bentukan bradizoit (dalam sista) *T. gondii* pada preparat. Pemeriksaan secara imunositokimia digesti jantung ayam kampung, tidak berhasil mendeteksi ekspresi antigen *T. gondii* pada sediaan preparat sitologi. Pemeriksaan jantung

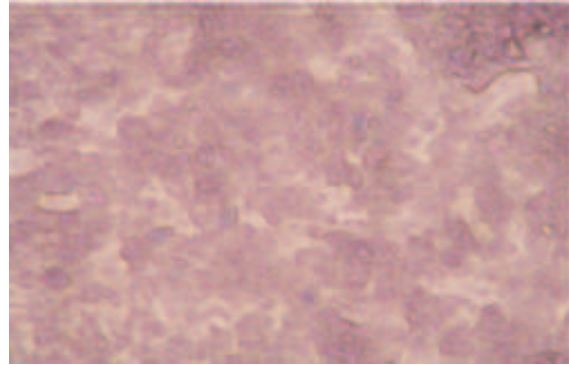
ayam kampung secara imunohistokimia, telah berhasil mendeteksi ekspresi antigen *T. gondii* dengan teramati bentukan warna coklat kemerahan pada sediaan preparat histologi jantung ayam kampung.

Pemeriksaan mikroskopik secara langsung dan imunositokimia pada digesti jantung ayam sulit untuk menemukan bentukan sista pada preparat, karena kendala kepekaan mata dalam membaca hasilnya dan juga kendala dalam pelekatan sel digesti jantung ayam pada gelas objek selama proses reaksi imunositokimia. Sesuai dengan laporan Sarkari *et al.* (2013) tidak berhasil menemukan sista dan takizoit secara imunohistokimia pada *human aborted fetus* walaupun dengan teknik *polymerase chain reaction* (PCR) positif. Laporan Silva *et al.* (2013) menyatakan bahwa dari tiga organ yaitu otak, jantung, dan hati domba yang terdeteksi positif secara *Modified Agglutination Test* (MAT), ternyata jantung paling tinggi kesesuaian hasil ujinya menggunakan imunohistokimia. Dilaporkan pada domba yang seroreaktif *T. gondii* secara MAT, sebanyak 46,2% (12/26) adalah positif dengan imunohistokimia

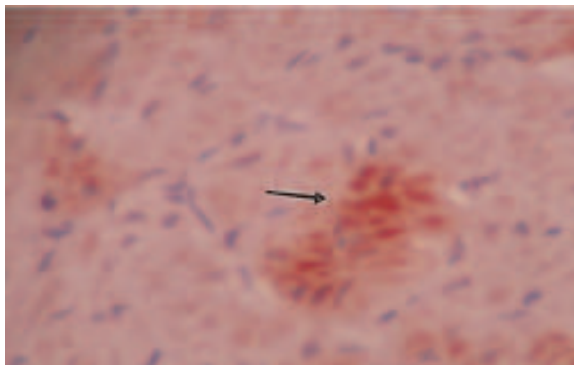
Pada penelitian ini, pemeriksaan secara imunohistokimia antigen *T. gondii* terekspresi pada jaringan jantung ayam, dua preparat jantung ayam dari 100 sampel jantung ayam yang diperiksa. Jadi 2% (2/100) jantung ayam kampung positif terdeteksi antigen *T. gondii*. Artinya pada pemeriksaan langsung sulit mendeteksi keberadaan toxoplasma pada jaringan, tapi setelah direaksikan secara imunohistokimia dengan antibodi yang dilabel enzim *peroxidase* dengan substrat DAB, maka antigen toxoplasma dapat mudah dilacak dengan terekspresi bentukan berwarna coklat kemerahan. Berbeda dengan hasil penelitian Alvarado-Esquivel *et al.* (2015) pada pasien yang harus diotopsi di Rumah Sakit Umum Durango, Mexico, bahwa kista *T. gondii* lebih banyak ditemukan pada otak dibanding pada otot jantung melalui pemeriksaan imunohistokimia. Hasil penelitian Cedillo-Pelaez *et al.* (2012) bahwa toksoplasmosis akut pada primata dapat menyebabkan terjadi lesi pada paru, hati, ginjal, limfonodus dengan ditemukannya bentuk *T. gondii* pada organ tersebut. Penemuan ini mengindikasikan bahwa distribusi *T. gondii* sudah meluas ke beberapa organ yang dapat dideteksi secara imunohistokimia. Dengan teknik imunohistokimia dapat mendeteksi bentuk takizoit pada glomeruli ginjal dan bentuk



Gambar 1. Pemeriksaan mikroskopis hasil digesti jantung ayam kampung tidak teramati bentuk bradizoit bebas atau sista pada preparat



Gambar 2. Pemeriksaan imunohistokimia hasil digesti jantung ayam kampung tidak teramati bentuk ekspresi antigen (warna coklat kemerahan) pada preparat



Gambar 3. Pemeriksaan imunohistokimia ayam kampung. Keterangan: tanda panah menunjukkan ekspresi antigen *T.gondii* terlihat bentuknya berwarna coklat kemerahan pada preparat

kista pada miokardium serta sistem saraf pusat, diagnosis infeksi *T. gondii* ini telah diteguhkan dengan pemeriksaan PCR.

Sementara itu Casartelli-Alves *et al.* (2014) melaporkan bahwa diagnosis serologis toksoplasmosis pada ayam dengan metode aglutinasi yang dimodifikasi (*Modified Agglutination Test*) merupakan metode paling efektif. Metode *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) juga merupakan uji sensitif dalam survei serologis toksoplasmosis pada ayam dan menjadi pilihan kedua untuk diagnosis. Pemeriksaan secara histopatologi dan imunohistokimia berguna sebagai alat diagnosis infeksi *T. gondii* menjadi penting dilakukan pada ayam karena mempunyai spesifitas yang tinggi, hingga mencapai 94,1% (Dubey *et al.*, 2005). Kelebihan pemeriksaan dengan imunohistokimia di samping cepat, sensitif, spesifik serta aman untuk memeriksa sampel infeksius. Seperti pemeriksaan jaringan otak anjing yang

positif rabies (Damayanti *et al.*, 2009). Imunohistokimia dapat mendeteksi antigen pada jaringan dengan akurat tanpa menggunakan mikroskop fluoresensi, hasil permanen dapat untuk studi retrospektif juga mempelajari pathogenesis penyakit. Teknik imunohistokimia ini efektif memeriksa jaringan untuk menentukan lokasi antigen tertentu karena munculnya warna yang dengan mudah dan cepat dideteksi. Dengan teknik ini menjadi mudah untuk memeriksa ekspresi antigen tertentu dalam struktur jaringan otak, jantung ataupun jaringan lainnya. Kekurangan teknik ini, diperlukan ketelitian dalam memilih antibodi terkonyugasi karena teknik ini sangat spesifik, dan perlu antibodi terkonyugasi yang spesifik untuk setiap antigen berbeda.

SIMPULAN

Teknik imunohistokimia berhasil melacak ekspresi antigen *T. gondii* pada jantung ayam kampung.

SARAN

Untuk mendiagnosis *T. gondii* pada hewan selain ayam perlu dilakukan uji dengan metode imunohistokimia untuk melengkapi metode diagnosis toksoplasmosis.

UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini kami ingin mengucapkan terima kasih pada DP2M atas hibah

penelitian fundamental yang mendanai penelitian ini serta pada semua yang ikut terlibat dalam penelitian ini. Semoga kerjasama dalam penelitian ini dapat terus berlanjut.

DAFTAR PUSTAKA

- Alvarado-Esquivel C, Sanches-Anguiano LF, Mendosa-Larios A, Hermindes-Tinoco J, Perez-Ochoa JF, Astuea-Salcido EI, Ribago-Sanchez E, Liesenfeld O. 2015. Prevalence of *Toxoplasma gondii* Infection in Brain and Heart by Immuno-histochemistry in a Hospital-Based Autopsy Series in Durango, Mexico. *European Journal of Microbiology and Immunology* 5(2): 143-149.
- Casartelli-Alves I, Boechat VC, Macedo-Couto R, Ferreira LC, Nicolau JI, Neves LB, Millar RT, Oliveira RVC, Muniz AG, Bonna ICF, Amendoeira MRR, Silva RC, Langoni H, Schubach TMP, Menezes RC. 2014. Sensitivity and Specificity of Serological test, histopathology and immunohistochemistry for detection of *Toxoplasma gondii* infection in domestic chickens. *Vet Parasitol* 204: 346-351.
- Cedillo-Pelaez C, Besnae-Merida A, Espinosa-Aviles D, Rico-Torres CP, Salas-Carrido G, Correa D. 2012. Distribution of lesion and Identification of parasite by Immuno-histochemistry in Cases of Acute Toxoplasmosis in New World Primates and Prosimians in captivity in Mexico. *International Journal of Infectious Diseases* 168: 317-473.
- Damayanti, Alfinus, Rahmadani I, Faisal. 2009. Deteksi Antigen Virus Rabies pada jaringan otak dengan metode Imunohistokimia. *Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner*. Hlm. 707-717
- Dubey JP. 1998. Refinement of Pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissue. *Vet Parasitol* 74: 75-77.
- Dubey JP, Linsay DS, Speer A. 1998. Structure of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradizoites and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev* 11(2): 267-299.
- Dubey JP, Graham DH, Dahl E, Sreekumar C, Lehmann T, Davis MF, Morishita TY. 2003. *Toxoplasma gondii* Isolates from Free Ranging Chickens from the United States. *J Parasitol* 89(5): 1060-1062.
- Dubey JP, Paula L, Lehmann T. 2005. Characterization of *Toxoplasma gondii* Isolates in free-ranging chickens from Argentina. *J Parasitol* 91(6): 1335-1339.
- Dubey JP, Su C, Oliviera J, Morales JA, Bolanos RV, Sundar N, Kwok OCH, Shen SK. 2006. Biologic and Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in free-ranging chickens from Costa Rica, Central America. *Vet Parasitol* 139: 29-36.
- Hastuti NW, Lubis HML. 2011. Manfaat Praktis Pemeriksaan Imunohisto(sito) kimia. *Cermin Dunia Kedokteran* edisi 38(5): 384-386
- Kiernan JA. 2001. *Histological and Histochemical Methods. Theory and Practice*. 2nd Edition. Pergamon Press. (KOTA TRBT & HALAMAN BRP?)
- Levine ND. 1994. *Buku Pelajaran Parasitologi Veteriner*. Edisi Indonesia. Yogyakarta. Gadjah Mada University Press. Hlm. 1-531
- Levine ND. 1995. *Protozoologi Veteriner*. Indonesia Edisi. Yogyakarta. Gadjah Mada University Press. :Hlm. 1-585.
- Mose JM, Kagira JM, Karanja SM, Ngotho M, Kamau DM, Njuguna AN, Maina NW. 2016. Detection of Natural *Toxoplasma gondii* Infection in Chicken in Thika Region of Kenya Using nested Polymerase Chain Reaction. *BioMed Research International* 1-6. Hindawi.
- Mufasirin, Suprihati E, Suwanti LT. 2003. Studi Toksoplasmosis pada Telur Ayam yang dijual sebagai campuran jamu di kota Surabaya dan Kabupaten Sidoarjo menggunakan uji Dot Blot. *Jurnal Penelitian Medika Eksakta* 4(2): 113-119.
- Priyana A. 2000. Antibodi Anti *Toxoplasma* pada Ayam Kampung (*Gallus domestica*) di Jakarta. *Majalah Kedokteran Indonesia* 50(11): 504-507.
- Sarkari B, Asgari, Mirzaee S. 2013. Evaluation of Immunohistochemistry and PCR in Diagnosis of *Toxoplasma* infection in tissue of Human Aborted Fetuses. *Zahedan J Res Med Sci* 15(12): 42.

- Silva AF, Oliveira FCR, Leite JS, Mello MFV, Brandao FZ, Leite RIJCK, Franzio-Teixeira E, Lilenbaum W, Fonseca ABM, Ferreira AMR. 2013. Immunohistochemical identification of *Toxoplasma gondii* in tissues from Modified Agglutination Test positive sheep. *Vet Parasitol* 191: 347-352.
- Soulsby EJJ. 1982. Protozoa. *Helminth, Arthropods and Protozoa of domesticated animals*. 7th Ed. London. Bailliere Tindall. Hlm. 507-759
- Sreekumar C, Grahan DH, Dahl E, Hilali M, Freire LB, Prudencio LB, Viana MCB, Lehman T, Dubey JP. 2003. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates from Chickens from India. *Vet Parasitol* 118: 186-194.
- Suwanti LST. 2005. Deteksi Kista Jaringan *Toxoplasma gondii* pada beberapa organ Ayam. *Laporan Penelitian*. Perpustakaan Airlangga University. Surabaya. Hlm. 1-22.
- Subekti DT, Artama WT, Iskandar T. 2005. Perkembangan kasus dan Teknologi diagnosis Toksoplasmosis. *Prosiding Lokakarya Nasional Penyakit Zoonosis*. Bogor-Indonesia. Hlm. 253-264
- Tenter AM, Heckerroth AR, Weiss LM. 2000. *Toxoplasma gondii*: From Animals to humans. *Int J of Parasitol* 30: 1217-1258.
- Weiss LM, Kim K. 2000. The development and Biology of Bradizoite of *Toxoplasma gondii*. *Frontiers in Bioscience* 6: 391-405.