

**SENSITIVITY AND SPECIFICITY OF ELISA TEST USING 30 KDA  
RECOMBINANT ANTIGEN TO DETECT *Toxoplasma gondii* INFECTION IN  
PIG WITH MICE BIOASSAY AS A GOLD STANDARD**

Nyoman Adi Suratma<sup>1✉</sup>, I Made Bakta<sup>2</sup>, I Made Damriyasa<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Program Study of Medical Science, School for Graduate Study, Udayana University

<sup>2</sup>Dept. of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Udayana University

<sup>3</sup>Faculty of Veterinary Medicine, Udayana University

**Email:**

**ABSTRACT**

Toxoplasmosis is a zoonotic disease caused by the protozoa *Toxoplasma gondii*. Primary infection in pregnant women can cause abortion, neonatal death or abnormality of fetus. Accurate diagnosis is needed to prevent infection especially related to the presence of cyst in the tissues

The aim of this research was to study sensitivity and specificity of ELISA method with 30 kDa protein antigen to detect *T.gondii* infection in pig with mice bioassay as gold standard.. Samples were 171 pigs slaughtered at pig slaughter house in Darmasaba Badung

The result showed that sensitivity of ELISA method was 100% and 90,7% in specificity.

Research about sensitivity using ELISA test to predict cysts presence in tissue were needed in the future.

Keyword : *Toxoplasma gondii* , protein antigen 30 kDa, ELISA , bioassay.

## 1. INTRODUCTION

Toxoplasmosis is a zoonotic disease caused by *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) protozoa. Primary infection in pregnant women can cause abortus, neonatal death or abnormality of fetus (Dubey, 1994; Tenter dkk.2000) An accurate diagnosis is necessary for prevention or treatment. ELISA method has high sensitivity for diagnosis of this infection but sensitivity and specificity are dependent on the type of antigen used. Currently, crude antigen is more often used, but in the production of this antigen a lot of tachyzoites and laboratory animals are needed, so alternative antigen should be developed. Antigen 30 kDa protein is a recombinant antigen, with specific expression of bradizoite called p-30. In the experiment on mice, this antigen can excite IgG that is produced with high antibody titer (Schaes dkk., 2001). In other animals, especially in pig this antigen has never been evaluated yet about its sensitivity and specificity comparable with direct *bioassay* method.

The aims of this research were to study the sensitivity and specificity of ELISA method with 30 kDa protein antigen to detect *T.gondii* infection in pig with *bioassay* as *gold standard*.

## 2. RESEARCH METHOD

### 2.1 Research Design

Two research designs were used: first, *cross sectional study* to study prevalence of *T.gondii*. Second, diagnostic test to compare sensitivity and specificity of ELISA method using p-30 antigen to detect *T.gondii* infection in pigs with *bioassay* methods.

### 2.2. Location and Duration of Research

This research was carried out at pig slaughters house in Darmasaba, Badung for collection of serum, heart and diaphragm samples. Examinations were done at the *Center Study of Animal Disease* (CSAD) Laboratory FKH Unud. The study was carried out for 16 months.

### 2.3 Population

Target population was pigs in Bali, but coverable population was slaughtered pigs at the pig slaughters in Darmasaba, Badung

### 2.4 Sample

Research sample was pigs between 6 – 8 months of age, *Landrace* breed. Sample was taken randomly from slaughtered pigs at pigs slaughters in Darmasaba, Badung

### 2.5 Sample Size

Sample size included 171 pigs from 12 pig slaughters (Thrusfield, 1986).

### 2.6 Procedures of The Research

#### 2.6.1 Research Flow

The research was a cross sectional study, continued with tissue inoculation in mice. The first step was observation research to collect blood and tissue in the slaughter

houses. Collected blood samples were centrifuged to collect serum. ELISA test was done to screen *T. gondii* antibody. Collected tissues were digested to find *T. gondii* cysts, which then inoculated into mice (*bioassay*)

### 2.6.2 Determination of presentation and titers of *T.gondii*

Presentation of *T. gondii* antibody and its titers were determined by ELISA Test (Lind *et al.*,1997).

### 2.6.3 ELISA Optimalization

Optimalisation method was done before antibody examination consisting of antigen titration, conjugate titration and serum titration.

### 2.6.4 Determination of cut-off value

Cut off value was determined with *two graph receiver operating characteristics* (TG-ROC) (Greiner,1996)

### 2.6.5 Bioassay in mice

Heart and diafragma sample were digestion with Pepsin HCl(Dubey,1998) before inoculation in mice. After that inoculation was done in 3 mice about 1 sample. Examination was done until the 28th day after inoculation.

## 2.7. Data Analysis

Sensitivity and specificity of ELISA method with *Bioassay* as *gold standard* was analysed by *Crosstab analysis* (Thrusfield, 1986).

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1 Bioassay

Examination by bioassay in mice showed that 21 (12,3 %) from 171 pigs having c a heart and its diaphragm checks and inoculated to mice show the existence of growth in mice, and the findings of cyst mice organs.

Based on pig origin, the result of bioassay test showed the variation of percentage of infection *T. gondii* in pigs, and the highest percentage of *T. gondii* infection were pigs coming from Jembrana, next Gianyar and Badung. While pigs coming from Tabanan dont showed the positive result in inspection bioassay. Difference of prevalence were not significant (  $p > 0,05$ ) ( Table 1)

Table 1  
Chi Square Test of *Bioassay* Pursuant of Pig Origins

Origin	Amount	Positive	Percentage (%)	P
Jembrana	48	9	18,8	0,31 <sup>ns</sup>
Badung	52	4	7,7	
Gianyar	66	8	12,1	
Tabanan	5	0	0	

Amount	171	21	12,3	
--------	-----	----	------	--

Based on the differences of pig sex, the difference of prevalence infection of *T. gondii* in pig was found. Pursuant of bioassay test, the prevalence infection of *T. gondii* on boar was 16,3%, while at female pig 6,8%, hence, statistically, the difference was not significant (  $P > 0,05$ ) (table 2)

Table 2  
Chi Square Test of Bioassay pursuant of Pig Sexs

Sex	Amount	Positive	Percentage (%)	P
Male	98	16	16,3	0,097 <sup>ns</sup>
Female	73	5	6,8	
Amount	171	21	12,3	

This result was lower compared to the previous report by Jacobs et al. (1957) that 8 (16%) from 50 sample show the positive result at bioassay test by heart inoculums. While Boch et al. (1964) reported 45 (9%) out of 500 sample were proven positive infected by *T. gondii*. Dubey et al.. (1995) reported that 108 ( 10,8%) from 1000 pigs were infected by *T. gondii* with the bioassay test at mice by heart inoculums. Research to determine the prevalence of infection toxoplasmosis in animal is seldom done with the bioassay method. In addition to cost and time reasons, not all animal had infection of *T.gondii* cyst at heart or diaphragm. So that if the location of *T.gondii* infection outside heart and diaphragm, hence the result of the bioassay test is negative. This research and also other researches have chosen heart as inoculums in bioassay test. Experimentally, 75% pig infection by oral by cyst *T. gondii* could be isolated parasite in the heart by bioassay test (Dubey et al. 1995). Research of toxoplasmosis prevalence more frequently use immunologic method to detect the existence of toxoplasmosis in animal. This Bioassay research and also previous research represented the definitive verification that the sample network or proven to contain the *T. gondii*, in order to learning or checking the other aspect. At this research was done bioassay test as gold of definitive test or standard to evaluate the method ELISA using antigen recombinant p-30 kDa to detect the existence of *T. gondii* infection in pig.



Figure 1 Cyst of *T. gondii* in mice tissue (40 x 10, Giemsa)

### 3.2 ELISA

To know the existence of *T. gondii* antibody response to pig, screening ELISA was done. Procedure of Screening ELISA was preceded early by ELISA optimization to know the optimal thinning or concentration of conjugate, antigen and serum to be examined, and followed by a determination of cut off value. Result of ELISA examination is considered to be positive if index of serum sample was above the value of cut off. Index of ELISA is determined by comparison between OD from sample serum and control serum. The distribution of OD obtained in this research could be seen in figure 2.

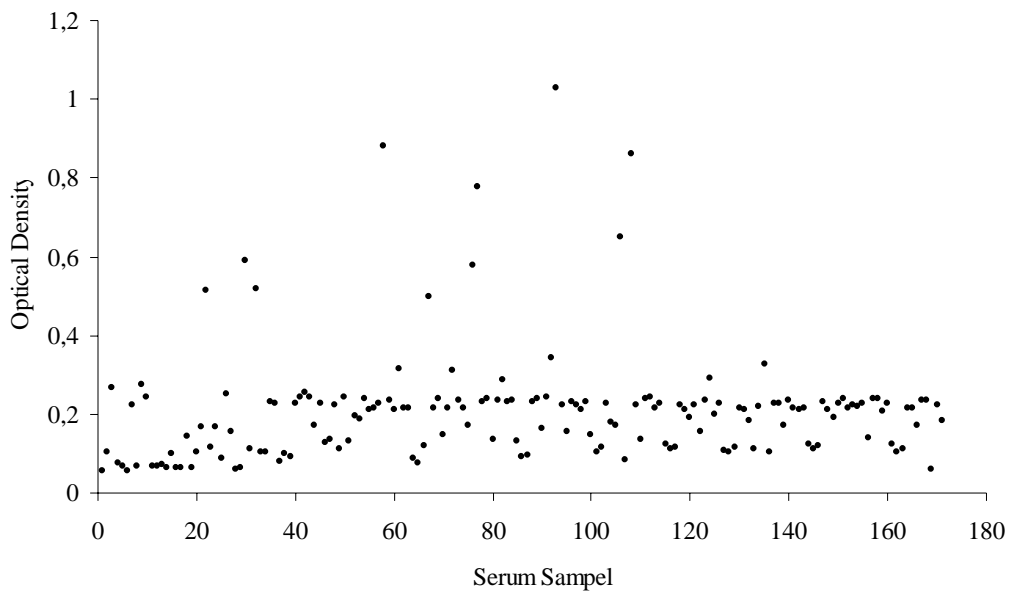


Figure 2. Optical Density Distribution of Sample Serum (n =171)

After the determination of ELISA index distribution of sample serum was obtained as reflected in figure 3.

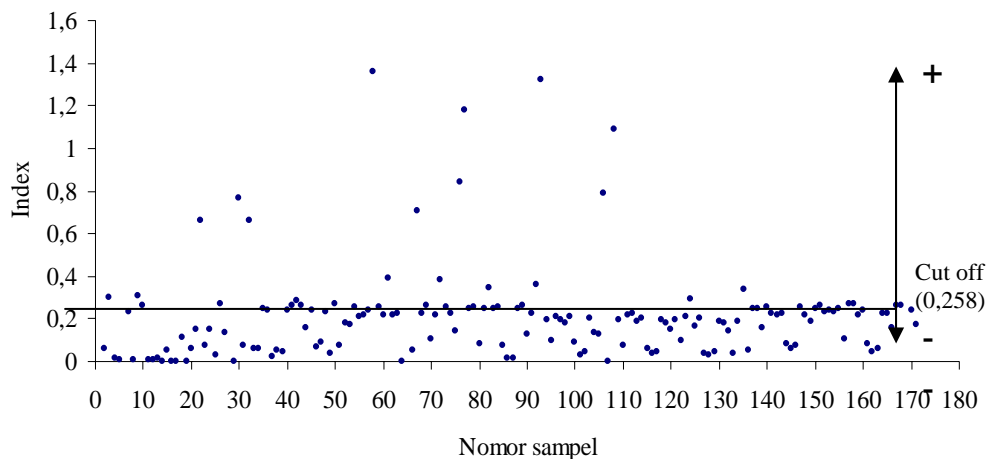


Figure 3. ELISA Index Distribution of Sample Serum (n =171)

The above figure showed that from 171 sample of pig serum checked , 35 sample ( 20,5%) were residing in for value of cut off ( 0,258). This result indicates that the pig serum taken from some traditional slaughter house in Badung shows the reaction of antibody response to *T. gondii* or seroprevalence was 20,5 %

Based on the pig origin there were variation of seroprevalence. Highest Seroprevalence was found on pigs coming from Jembrana (22,9%), from Gianyar (22,7%) and Badung (17,3%), while pigs coming from Tabanan (0%), but the difference was not significant (  $p > 0,05$ ) (Table 3)

Tabel.3  
Chi Square Test of ELISA of *T.gondii* Infection in Pig  
Pursuant of Pig Origins

Origin	Amount	Positive	Percentage %	P
Jembrana	48	11	22,9	0,31 <sup>ns</sup>
Badung	52	9	17,3	
Gianyar	66	15	22,7	
Tabanan	5	0	0	
Amount	171	35	20,5	

Based on pig sex difference, the male showed positive response of antibody to *T. gondii* (26,5%) higher than female pig (12,3%) and statistically the difference was significant (  $p < 0,05$ ) (Table 4).

Table 4.  
Chi Square Test of ELISA of *T.gondii* Infection in Pig  
Based on Pig Sexes

Sex	Amount	Positive	Percentage (%)	P
Male	98	26	26,5	0,035 *
Female	73	9	12,3	
Total	171	35	20,5	

#### 4.3 Sensitivity and Specificity ELISA by p-30 As Antigen

From 171 sample to detect the existence of *T. gondii* infection using the method of bioassay and serology (ELISA), it turned out that serum test with the ELISA method found 35 positive, while with the bioassay method through inoculation of diaphragm and heart tissue in mice showed 21 positive. From two inspection methods the result showed that 14 sample were negative at bioassay but at ELISA showed positive result (Tables 5). The result difference was caused by difference method and examined sample. But the two methods have the same purpose that is to determine whether pig was infected by *T. gondii*. The bioassay test was the definitive indicator to determine that the animal was infected by *T. gondii*, so that it can serve as the gold standard to determine test accuracy. Meanwhile, ELISA test was to detect the existence of antibody to *T. gondii* that indicated that the animal was infected by *T. gondii*

Table 5  
Sensitivity and Specificity of ELISA by p-30 As Antigen (n=171)

		<i>Bioassay</i>		Amount
		Negative	Positive	
ELISA	Negative	136	0	136
	Positive	14	21	35
Total		150	21	171

Statistically, the result of two methods have positive result corresponding to the kappa value 0,72. If sensitivity and specificity test of ELISA method is conducted using bioassay method as gold standard, the sensitivity and specificity ELISA by p-30 as antigen were 100% and 90,7%

According to Landi and Koch ( 1977), the result of one method or the other method was substantial if kappa value exceed 0,6. This means that, minimally, 72% showed the same result between ELISA and bioassay in determining the existence of infection *T. gondii* in pig in this research. Some previous researchers report that ELISA also have positive correspondence with the other serologic tests. Damriyasa et al. ( 2004) reported that ELISA have positive correspondence to IFAT with the kappa value of 0,624. Dubey et al. ( 1995) reported that ELISA have positive correspondence to the MAT test with the kappa value of 0,621. The corresponding result of ELISA with

bioassay and the other serologic test urged some researchers to develop the ELISA test for detecting the existence of toxoplasmosis infection in animal

Sensitivity and specificity of ELISA test using p-30 kDa recombinant antigen were 100% and 90,7%. This sensitivity and specificity were higher than sensitivity and specificity ELISA evaluated by Dubey et al. (1995). They reported the sensitivity and specificity of ELISA were 73,4% and 85,9% if using bioassay in mice and cats as gold standard. Meanwhile using bioassay in mice, sensitivity and specificity were 73,5% and 81,6 and if bioassay in cats used as gold standard, the sensitivity and specificity ELISA obtained were 79,2% and 82,5%. From an evaluation of ELISA reported by Dubey et al. (1995) it was clearly indicated that sensitivity and specificity of ELISA in this research by using p-30 recombinant antigen was much higher.

#### 4. CONCLUSION AND SUGGESTION

##### 4.1 Conclusion

Based on the above result and discussion, it could be concluded that:

1. Prevalence of *T. gondii* infection in pig in some traditional pig slaughter houses in Badung with bioassay was equal to 12,3%.
2. Seroprevalence of *T. gondii* infection in pig in some traditional pig slaughter houses in Badung with ELISA by using p-30 recombinant antigen was equal to 20,5%
3. Sensitivity and specificity of the ELISA test using p-30 recombinant antigen to detect the infection of *T. gondii* in pig, by using test bioassay as gold of standard were equal to 100 % and 90,7%

##### 4.2 Suggestion

Referring to the result and discussion, conducting further research is suggested about sensitivity of ELISA test in predicting *T.gondii* cyst in animal tissues

#### BIBLIOGRAPHY

- Damriyasa, I.M., Suratma N.A., Dwinata, I.M., Tenter, A., Nockler, K., Bauer, C. 2001. Fecal and Serological Survey on Endoparasite Infections of Sows in Bali Indonesia. 18<sup>th</sup> Conference of The World for Advancement of Veterinary Parasitology., Stressa-Italy 26 –31 August 2001
- Damriyasa, I.M., Bauer,C., Edelhofer, R., Failing, K., Lind, P., Petersen, E., Schares, G., Tenter A.M., Volmer, R., Zahner, H. 2004. Cross-sectional survey in pig breeding farms in Hesse, Germany: seroprevalence and risk factor of infection with *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis spp.* and *Neospora caninum* in sows. Veterinary Parasitology, 126: 271 - 286



- Dubey, J.P., Thulliez., P., Weigel, R.M., Andrews,C.D., Lind, P., Powell, E.C.1995. Sensitivity of Various serologic test for detection of *Toxoplasma gondii* infection in naturally infected sows. American Veterinary Medical Association, 5 : 1030-1036.
- Dubey, J.P. 1998b. Refinement of Pepsin Digestion Method for Isolation of *Toxoplasma gondii* from Infected Tissues.Veterinary Parasitology, 74.:75- 77
- Ghozali, I dan Castellan Jr, N.J. 2002. Statistik Non Parametrik Teori dan Aplikasi dengan Program SPSS. Semarang: Badan Penerbit Universitas Diponegoro. p. 171 – 184.
- Lind, P., Haugegaard, J., Wingstrand, A., Hendriksen, S.A. 1997. The time course of spesific antibody respon by various ELISA in pigs experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. Veterinary Parasitology, 71 : 1-15
- Omata,Y., Dilorenzo,C., Venturini, C., Venturini,L., Igarashi,I., Saito,A., Suzuki, N.. 1994. Correlation between Antibody Level in *Toxoplasma gondii* Infected Pigs and
- Sugiyono. 2000. Statistik Untuk Penelitian. Cetakan ke 3. Bandung: Penerbit CV Alfabeta. p. 212 -218
- Tenter, A.M., Heckerorth, A.R., Weiss, L.M. 2000. *Toxoplasma gondii* : from animal to Human. International Journal for Parasitology, 30 : 1217-125

**SENSITIFITAS DAN SPESIFISITAS UJI ELISA MENGGUNAKAN  
ANTIGEN REKOMBINAN 30 KDA UNTUK MENDETEKSI INFEKSI  
*Toxoplasma gondii* PADA BABI DENGAN BIOASSAY PADA MENCIT  
SEBAGAI GOLD STANDARD**

N Adi Suratma, I M Bakta, I M Damriyasa  
Program Studi Ilmu Kedokteran, Program Pascasarjana  
Universitas Udayana

**ABSTRAK**

Toxoplasmosis adalah penyakit zoonosis yang disebabkan oleh protozoa *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*). Infeksi primer pada wanita hamil dapat mengakibatkan abortus, kematian neonatal atau abnormalitas pada fetus. Untuk mencegah terjadinya infeksi *T. gondii* diperlukan diagnosis yang akurat terutama adanya kista pada jaringannya, namun sampai saat ini belum ada suatu metode untuk dapat memprediksi adanya kista dalam jaringan.

Penelitian yang dilakukan bertujuan untuk mengetahui sensitifitas dan spesifisitas uji ELISA dengan menggunakan antigen rekombinan 30 kDa untuk mendeteksi infeksi *T. gondii* pada babi.dengan menggunakan bioassay pada mencit sebagai *gold standard*. Penelitian ini merupakan penelitian *cross sectional study*, dan dilanjutkan dengan uji diagnostik untuk membandingkan sensitifitas dan spesifisitas uji serologis dengan ELISA dengan menggunakan antigen p-30 terhadap uji *bioassay* dalam mendeteksi infeksi *T. gondii* pada babi. Jumlah sampel yang dipergunakan adalah 171 ekor babi yang dipotong di rumah potong hewan tradisional di desa Darmasaba Badung.

Prevalensi infeksi *T. gondii* pada babi yang dipotong di beberapa tempat pemotongan babi tradisional di kabupaten Badung dengan uji *bioassay* adalah sebesar 12,3 %, sedangkan seroprevalensi dengan uji ELISA dengan menggunakan antigen protein 30 kDa. adalah sebesar 20,5 %. Selain itu juga diperoleh bahwa sensitifitas dan spesifisitas uji ELISA dengan menggunakan antigen protein 30 kDa untuk mendeteksi infeksi *T. gondii* pada babi masing-masing adalah sebesar 100 % dan 90,7 %.

Disarankan untuk melakukan penelitian lebih lanjut tentang kepekaan uji ELISA dalam memprediksi adana kista *T.gondii* pada jaringan..

Kata kunci : *Toxoplasma gondii* , antigen rekombinan 30 kDa, ELISA , bioassay..

**1.PENDAHULUAN**

Toxoplasmosis adalah penyakit zoonosis yang disebabkan oleh protozoa *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) yang tersebar luas di seluruh dunia (Dubey, 1994; Tenter dkk., 2000). Akibat yang ditimbulkan parasit ini pada manusia cukup fatal, apabila terjadi infeksi primer pada wanita hamil dapat mengakibatkan abortus, kematian neonatal atau abnormalitas pada fetus (Tenter dkk., 2000).

Untuk tindakan pencegahan atau pengobatan terhadap terjadinya infeksi *T. gondii* diperlukan diagnosis yang akurat baik pada manusia maupun hewan. Salah satu uji imunologis yang dinyatakan mempunyai tingkat sensitifitas yang tinggi adalah uji ELISA. Sensitifitas dan spesifisitas dari uji ini sangat tergantung dari antigen yang digunakan. Selama ini kebanyakan dipergunakan *crude antigen*, namun dalam pembuatannya diperlukan banyak takzoid dan hewan coba untuk memproduksi takzoid tersebut. Pada perkembangan selanjutnya dikembangkan antigen alternatif, yaitu antigen rekombinan yang merupakan antigen protein pada 30 kDa sebagai ekspresi spesifik selama perkembangan bradizoid, dan disebut dengan p-30. Antigen ini telah diuji coba pada mencit dan ternyata dapat merangsang pembentukan IgG dengan titer cukup tinggi (Schaes dkk., 2001) Pada hewan lain terutama babi antigen ini belum pernah dievaluasi sensitifitas dan spesifisitasnya, dibandingkan dengan metoda *bioassay*.

Penelitian ini bertujuan, mengetahui sensitifitas dan spesifisitas uji ELISA dengan menggunakan antigen rekombinan p-30 untuk mendeteksi infeksi *T. gondii* pada babi, dengan menggunakan uji *bioassay* sebagai *gold standard*.

## 2. METODE PENELITIAN

### 2.1 Rancangan Penelitian

Dalam penelitian ini terdapat dua rancangan penelitian. Rancangan pertama merupakan penelitian *cross sectional study*, untuk menghitung prevalensi dan seroprevalensi *T. gondii* pada babi

Rancangan kedua adalah uji diagnostik untuk membandingkan sensitifitas dan spesifisitas uji serologis dengan ELISA dengan menggunakan antigen p-30 terhadap uji *bioassay* dalam mendeteksi infeksi *T. gondii* pada babi.

### 2.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Pengambilan sampel jantung dan otot diafragma dilakukan di tempat pemotongan babi di desa Darmasaba kabupaten Badung, sedangkan pemeriksaan laboratorium dilakukan di laboratorium *Center Study of Animal Disease* (CSAD) Unud. Penelitian dilakukan selama 16 bulan.

### 2.3 Populasi

Populasi target dari penelitian ini adalah babi yang ada di Bali, sedangkan populasi terjangkau adalah babi-babi yang dipotong di tempat pemotongan hewan di desa Darmasaba, Kabupaten Badung.

## **2.4 Sampel**

Sampel penelitian adalah babi berumur 6 – 8 bulan dari breed/ras *Landrace*. Sampel babi yang diambil secara acak sederhana dari babi yang dipotong ditempat pemotongan hewan di desa Darmasaba, kabupaten Badung.

## **2.5 Besar sampel**

Jumlah sampel adalah 171 ekor babi yang berasal dari 12 RPH ( Thrusfield, 1986 ).

## **2.6 Prosedur Penelitian**

### **2.6.1 Alur penelitian**

Penelitian yang dilakukan merupakan *cross sectional study* dan dilanjutkan dengan inokulasi pada hewan coba mencit. Tahap pertama adalah melaksanakan penelitian observasi, yaitu melakukan koleksi sampel, baik darah maupun jaringan. Untuk koleksi darah, setelah dikoleksi dari tempat babi dipotong kemudian dilakukan sentrifugasi untuk mendapatkan serumnya, selanjutnya dilakukan uji penjarangan (*screening*) terhadap adanya antibodi *T. gondii* dengan metode ELISA. Koleksi jaringan yang diperoleh sebagian didigesti untuk melihat keberadaan kista *T. gondii* dan dilanjutkan dengan melakukan inokulasi pada mencit untuk melihat adanya infeksi (*bioassay*)

### **2.6.2 Penentuan adanya antibodi terhadap *T. gondii* serta titernya**

Adanya antibodi terhadap *T. gondii* dikerjakan dengan metode ELISA (Lind *et al.*,1997).

### **2.6.3 Optimalisasi ELISA**

Sebelum dilakukan pemeriksaan antibodi spesifik terhadap *Toxoplasma gondii*, dilakukan optimalisasi metode yang akan digunakan. Ini bertujuan untuk mencari konsentrasi optimal dari antigen, pengenceran optimal sampel serum maupun pengenceran konjugat yang akan digunakan dalam penelitian ini. Optimalisasi tersebut meliputi : titrasi antigen, titrasi konjugat, titrasi serum

### **2.6.4 Penentuan nilai cut-off**

Untuk menentukan batas antara index yang diperoleh menunjukkan nilai positif maupun negatif maka perlu ditentukan adanya nilai *cut off*. Dari hasil pemeriksaan serum dengan metoda ELISA pada kontrol positif dan kontrol negatif maka nilai *cut off* dapat ditentukan dengan *two graph receiver operating characteristics* (TG-ROC) menurut Greiner (1996)

### **2.6.5 Bioassay pada mencit**

Pertama-tama dilakukan digesti dengan Pepin HCl menurut Dubey (1998), Selanjutnya inokulum asal diafragma dan jantung babi diinokulasikan masing-masing pada 3 ekor mencit sebanyak 1 ml secara *sub cutan*... Kandang mencit diberi penanda tanggal inokulasi dan nomor inokulum dan pengamatan pada mencit dilakukan sampai hari ke 28 setelah inokulasi

## 2.7 Analisis Data

Sensitivitas dan spesifisitas metoda ELISA dengan metode bioassay sebagai *gold standard* dianalisis dengan uji tabulasi silang (Thrusfield, 1986).

:

## 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 3.1 Hasil Bioassay

Hasil bioassay pada mencit menunjukkan bahwa 21 (12,3 %) dari 171 babi yang diperiksa jantung dan diafragmanya dan diinokulasikan ke mencit menunjukkan adanya perkembangan pada mencit, dengan ditemukannya kista pada organ mencit.

Berdasarkan asal babi hasil pemeriksaan bioassay menunjukkan variasi persentase babi yang terinfeksi *T. gondii* dan tampak persentase babi yang terinfeksi *T. gondii* tertinggi pada babi yang berasal dari Kabupaten Jembrana, berikutnya Kabupaten Gianyar dan Badung. Sedangkan babi yang berasal dari Kabupaten Tabanan tidak menunjukkan hasil positif dalam pemeriksaan *bioassay*. Perbedaan prevalensi tersebut setelah dilakukan uji statistik menunjukkan perbedaan yang tidak bermakna ( $p > 0,05$ ) (Tabel 1).

Tabel 1  
Hasil Uji Chi Square Pemeriksaan *Bioassay* Berdasarkan Asal Babi

Asal	Jumlah	Positif	Persentase (%)	P
Jembrana	48	9	18,8	0,31 <sup>ns</sup>
Badung	52	4	7,7	
Gianyar	66	8	12,1	
Tabanan	5	0	0	
Jumlah	171	21	12,3	

Berdasarkan perbedaan jenis kelamin babi ditemukan perbedaan prevalensi babi yang dinyatakan terinfeksi *T. gondii* berdasarkan pemeriksaan *bioassay*. Berdasarkan uji *bioassay* prevalensi infeksi *T. gondii* pada babi jantan 16,3%, sedangkan pada babi betina 6,8%, secara statistik menunjukkan perbedaan yang tidak bermakna. ( $P > 0,05$ ) (tabel 2).

Tabel 2  
Hasil Uji Chi Square Pemeriksaan Bioassay Infeksi *T.gondii* pada Babi Berdasarkan Jenis Kelamin

Jenis Kelamin	Jumlah	Positif	Persentase (%)	P
Jantan	98	16	16,3	0,097 <sup>ns</sup>
Betina	73	5	6,8	
Jumlah	171	21	12,3	

Hasil penelitian ini lebih rendah dibandingkan dengan yang dilaporkan sebelumnya oleh Jacobs dkk. (1957) bahwa 8 (16%) dari 50 sampel menunjukkan hasil positif pada uji *bioassay* dengan inokulum jantung. Sedangkan Boch dkk. (1964) melaporkan 45 (9%) dari 500 sampel yang diperiksa terbukti positif mengandung *T. gondii*. Dubey dkk. (1995) melaporkan 108 (10,8%) dari 1000 babi yang diperiksa terinfeksi *T. gondii* dengan uji *bioassay* pada mencit dengan inokulum jantung. Penelitian-penelitian untuk menentukan prevalensi infeksi toxoplasmosis pada hewan jarang dilakukan dengan metoda *bioassay*. Disamping alasan biaya dan waktu, tidak setiap hewan yang terinfeksi *T. gondii* kistanya berlokasi pada jantung atau diafragma. Sehingga apabila hewan terinfeksi *T. gondii* yang kistanya berlokasi pada organ di luar jantung dan diafragma, maka hasil uji *bioassay* hasilnya negatif. Pada penelitian ini maupun penelitian-penelitian lainnya yang pernah dilaporkan memilih jantung sebagai inokulum dalam uji *bioassay*. Secara experimental terbukti bahwa 75% babi yang diinfeksi secara oral dengan oosit *T. gondii* pada jantungnya dapat diisolasi parasit tersebut pada uji *bioassay* (Dubey dkk. 1995). Penelitian-penelitian terhadap prevalensi toxoplasmosis lebih banyak menggunakan metoda-metoda berbasis imunologis dalam mendeteksi keberadaan toxoplasmosis pada hewan. Penelitian-penelitian *bioassay* yang dilakukan pada penelitian ini maupun penelitian-penelitian sebelumnya adalah merupakan pembuktian definitif bahwa sampel atau jaringan tersebut terbukti mengandung *T. gondii*, dalam rangka mempelajari atau meneliti aspek lainnya. Pada penelitian ini dilakukan uji *bioassay* sebagai gold standard atau uji definitif untuk mengevaluasi metoda ELISA yang menggunakan antigen rekombinan p-30 kDa dalam mendeteksi adanya infeksi *T. gondii* pada babi.

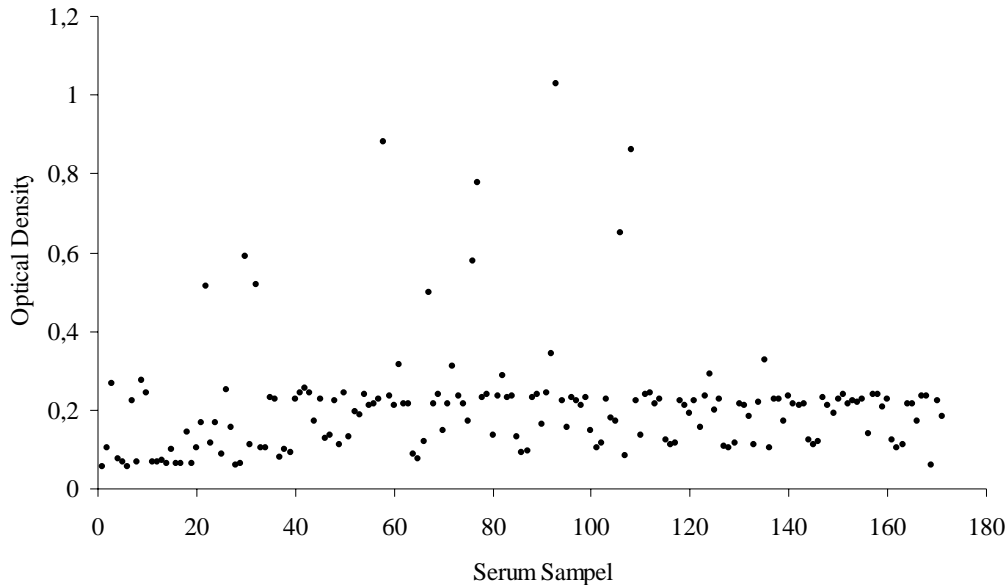


Gambar 1 Kista *T. gondii* pada jaringan mencit (Pembesaran 40 x 10, pewarnaan Giemsa)

### 3.2 Hasil ELISA

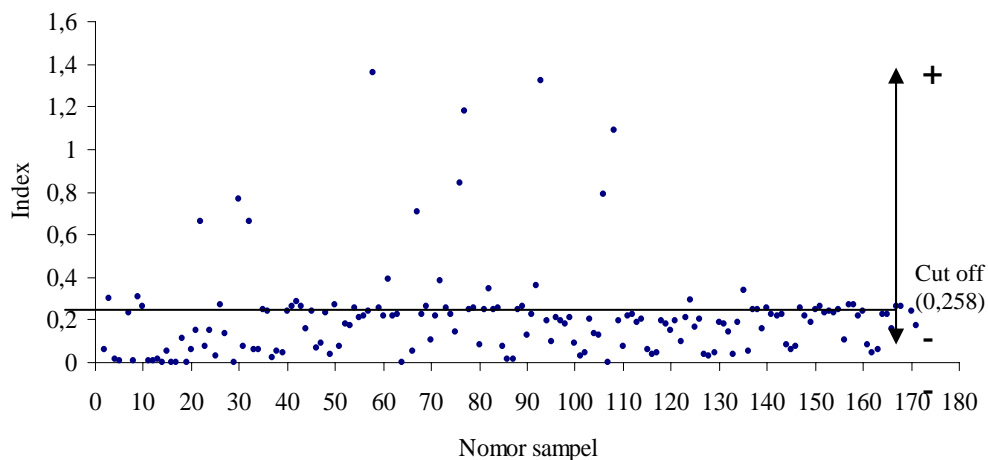
Untuk mengetahui adanya respon antibodi terhadap *T. gondii* pada babi dilakukan *screening* ELISA. Prosedur *screening* ELISA diawali dengan optimalisasi

ELISA untuk mengetahui konsentrasi atau pengenceran optimal dari konjugat, antigen serta serum yang akan diperiksa, selanjutnya ditentukan nilai *cutt off*. Hasil pemeriksaan ELISA dinyatakan positif apabila index serum sampel diatas nilai *cut off*. Index ELISA ditentukan berdasarkan perbandingan antara OD dari serum sampel dan serum kontrol. Sebaran OD yang diperoleh dalam penelitian ini seperti tampak pada gambar 2.



Gambar 2 Sebaran Optical Density Serum Sampel (n =171)

Setelah dilakukan penentuan index ELISA diperoleh sebaran index serum sampel yang diperiksa seperti tampak pada gambar 3.



Gambar 3 Sebaran Index ELISA Serum Sampel (n =171)

Dari gambar diatas tampak bahwa dari 171 sampel serum babi yang diperiksa 35 sampel (20,5%) berada di atas nilai *cut off* (0,258). Hasil pemeriksaan tersebut menunjukkan bahwa serum babi yang diambil dari beberapa tempat pemotongan

tradisional di Kabupaten Badung menunjukkan reaksi adanya respon antibodi terhadap *T. gondii* atau seroprevalensi sebesar 20,5 %.

Berdasarkan asal babi yang dipotong di tempat pemotongan tersebut terdapat variasi seroprevalensi. Seroprevalensi tertinggi ditemukan pada babi yang berasal dari Jembrana (22,9%), selanjutnya dari Gianyar (22,7%) dan Badung (17,3%), sedangkan babi yang berasal dari Tabanan (0%), namun secara statistik perbedaan daerah tersebut tidak berpengaruh secara bermakna terhadap seroprevalensi ( $p > 0,05$ ) (Tabel 3).

Tabel.3  
Hasil Uji Chi Square Pemeriksaan ELISA Infeksi *T.gondii*  
pada Babi Berdasarkan Asal Babi

Asal	Jumlah	Positif	Persentase %	P
Jembrana	48	11	22,9	0,31 <sup>ns</sup>
Badung	52	9	17,3	
Gianyar	66	15	22,7	
Tabanan	5	0	0	
Jumlah	171	35	20,5	

Berdasarkan perbedaan jenis kelamin babi yang diperiksa, babi jantan menunjukkan respon antibodi positif terhadap *T. gondii* (26,5%) lebih tinggi bila dibandingkan dengan babi betina (12,3%) dan secara statistik menunjukkan perbedaan yang bermakna ( $p < 0,05$ ) (Tabel 4).

Tabel 4  
Hasil Uji Chi Square Pemeriksaan ELISA Infeksi *T.gondii*  
pada Babi Berdasarkan Jenis Kelamin

Jenis Kelamin	Jumlah	Positif	Persentase (%)	P
Jantan	98	26	26,5	0,035 *
Betina	73	9	12,3	
Jumlah	171	35	20,5	

#### 4.3 Sensitivitas dan Spesifisitas ELISA dengan p-30 Sebagai Antigen

Dari 171 sampel yang diperiksa untuk mendeteksi adanya infeksi *T. gondii* dengan metoda *bioassay* dan serologi (ELISA), menunjukkan bahwa pada pemeriksaan serum dengan metoda ELISA ditemukan 35 positif, sedangkan pada pemeriksaan dengan metoda *bioassay* melalui inokulasi jaringan diafragma dan jantung pada mencit menunjukkan 21 positif. Dari hasil pemeriksaan kedua metoda tersebut tampak bahwa 14



sampel hasilnya negatif pada pemeriksaan *bioassay* namun pada pemeriksaan dengan metoda ELISA menunjukkan hasil positif (Tabel 5).

. Perbedaan dari kedua hasil tersebut adalah akibat dari perbedaan metoda serta sampel yang diuji. Namun demikian kedua cara tersebut mempunyai tujuan yang sama yaitu untuk menyatakan apakah babi yang diperiksa terinfeksi oleh *T. gondii*. Uji *bioassay* merupakan indikator definitif untuk menyatakan bahwa hewan tersebut terinfeksi oleh *T. gondii*, sehingga dapat digunakan sebagai *gold standard* dalam penentuan akurasi uji yang lain. Sedangkan uji serologi ELISA adalah mendeteksi adanya antibodi terhadap *T. gondii* yang dapat mengindikasikan bahwa hewan tersebut terinfeksi oleh *T. gondii*.

Tabel 5  
Sensitivitas dan Spesifisitas ELISA dengan p-30 Sebagai Antigen (n=171)

		<i>Bioassay</i>		Jumlah
		Negatif	Positif	
ELISA	Negatif	136	0	136
	Positif	14	21	35
Jumlah		150	21	171

Hasil pemeriksaan kedua metoda diatas secara statistik mempunyai kesesuaian positif dengan nilai kappa 0,72. Apabila dilakukan uji sensitifitas dan spesifisitas metoda ELISA dengan menggunakan metoda *bioassay* sebagai *gold standard*, maka uji ELISA dengan p-30 sebagai antigen memiliki sensitifitas 100% dan spesifisitas 90,7%.

. Menurut Landi and Koch (1977), hasil antara satu metoda dengan metoda lainnya dikatakan substansial apabila nilai kappa melebihi 0,6. Ini berarti minimal 72% menunjukkan hasil yang sama antara uji serologi ELISA dan uji *bioassay* dalam menentukan adanya infeksi *T. gondii* pada babi yang diperiksa pada penelitian ini. Sebelumnya beberapa peneliti melaporkan bahwa uji ELISA juga mempunyai kesesuaian positif dengan uji-uji serologis lainnya. Damriyasa dkk. (2004) melaporkan bahwa ELISA mempunyai kesesuaian positif dengan IFAT dengan nilai kappa 0,624. Dubey dkk. (1995) melaporkan bahwa uji ELISA mempunyai kesesuaian positif dengan uji MAT dengan nilai kappa 0,621. Kesesuaian hasil uji ELISA dengan uji *bioassay* dan uji serologis lainnya mendorong beberapa peneliti untuk mengembangkan uji ELISA dalam mendeteksi adanya infeksi toxoplasmosis pada hewan.

Sensitifitas dan spesifisitas uji serologis ELISA dengan menggunakan antigen rekombinan p-30 kDa berturut-turut 100% dan 90,7%. Sensitifitas dan spesifisitas ELISA pada penelitian ini lebih tinggi dibandingkan dengan sensitifitas dan spesifisitas ELISA yang dievaluasi oleh Dubey dkk. (1995). Mereka melaporkan sensitifitas dan spesifisitas ELISA berturut-turut 73,4% dan 85,9% apabila menggunakan *bioassay* pada mencit dan kucing sebagai gold standard. Sedangkan yang menggunakan *bioassay* pada mencit, sensitifitas dan spesifisitasnya berturut-turut 73,5% dan 81,6. Dan bila *bioassay* pada kucing digunakan sebagai gold standard, diperoleh sensitifitas dan spesifisitas ELISA berturut-turut 79,2% dan 82,5%. Dari hasil evaluasi ELISA yang dilaporkan oleh Dubey dkk. (1995) jelas bahwa sensitifitas dan spesifisitas uji ELISA pada penelitian ini dengan menggunakan antigen rekombinan p-30 jauh lebih tinggi.

## 4. SIMPULAN DAN SARAN

### 4.1 Simpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan, dapat disimpulkan :

1. Prevalensi infeksi *T. gondii* pada babi yang dipotong di beberapa tempat pemotongan babi tradisional di kabupaten Badung dengan uji *bioassay* adalah sebesar 12,3 %..
2. Seroprevalensi infeksi *T. gondii* pada babi yang dipotong di beberapa tempat pemotongan babi tradisional di kabupaten Badung dengan uji ELISA dengan menggunakan antigen rekombinan p-30. adalah sebesar 20,5 %
3. Akurasi (sensitifitas dan spesifisitas) uji ELISA dengan menggunakan antigen rekombinan p-30 untuk mendeteksi infeksi *T. gondii* pada babi, dengan menggunakan uji *bioassay* sebagai *gold standard* masing-masing adalah sebesar 100 % dan 90,7 %.

### 4.2 Saran

Berdasarkan hasil dan pembahasan, Disarankan untuk melakukan penelitian lebih lanjut tentang kepekaan uji ELISA dalam memprediksi adanya kista *T.gondii* pada jaringan hewan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Damriyasa, I.M., Suratma N.A., Dwinata, I.M., Tenter, A., Nockler, K., Bauer, C. 2001. Fecal and Serological Survey on Endoparasite Infections of Sows in Bali Indonesia. 18<sup>th</sup> Conference of The World for Advancement of Veterinary Parasitology., Stressa-Italy 26 –31 August 2001
- Damriyasa, I.M., Bauer,C., Edelhofer, R., Failing, K., Lind, P., Petersen, E., Schares, G., Tenter A.M., Volmer, R., Zahner, H. 2004. Cross-sectional survey in pig breeding farms in Hesse, Germany: seroprevalence and risk factor of infection with *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis spp.* and *Neospora caninum* in sows. Veterinary Parasitology, 126: 271 - 286
- Dubey, J.P., Thulliez., P., Weigel, R.M., Andrews,C.D., Lind, P., Powell, E.C.1995. Sensitivity of Various serologic test for detection of *Toxoplasma gondii* infection in naturally infected sows. American Veterinary Medical Association, 5 : 1030-1036.
- Dubey, J.P. 1998b. Refinement of Pepsin Digestion Method for Isolation of *Toxoplasma gondii* from Infected Tissues.Veterinary Parasitology, 74.:75- 77
- Ghozali, I dan Castellan Jr, N.J. 2002. Statistik Non Parametrik Teori dan Aplikasi dengan Program SPSS. Semarang: Badan Penerbit Universitas Diponegoro. p. 171 – 184.

- Lind, P., Haugegaard, J., Wingstrand, A., Hendriksen, S.A. 1997. The time course of specific antibody respon by various ELISA in pigs experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. *Veterinary Parasitology*, 71 : 1-15
- Omata,Y., Dilorenzo,C., Venturini, C., Venturini,L., Igarashi,I., Saito,A., Suzuki, N.. 1994. Correlation between Antibody Level in *Toxoplasma gondii* Infected Pigs and
- Sugiyono. 2000. *Statistik Untuk Penelitian*. Cetakan ke 3. Bandung: Penerbit CV Alfabeta. p. 212 -218
- Tenter, A.M., Heckerroth, A.R., Weiss, L.M. 2000. *Toxoplasma gondii* : from animal to Human. *International Journal for Parasitology*, 30 : 1217-1258