

IDENTIFIKASI PROTEIN IMUNOGENIK TAKIZOIT DAN BRADIZOIT *TOXOPLASMA GONDII* STRAIN LOKAL UNTUK PENGEMBANGAN KIT DIAGNOSTIK

Identification of Immunogenic Protein of Tachyzoite and Bradyzoite of Toxoplasma gondii to Develop Toxoplasma Diagnostic Kit

Muhammad Hanafiah¹ dan Dwinna Aliza²

¹Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

²Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

E-mail: hanafi2003@yahoo.com

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian untuk mengisolasi dan mengidentifikasi protein 28 kDa (GRA2) dari stadium takizoit dan bradizoit *Toxoplasma gondii* strain lokal. Cairan asites mencit galur *Balb/c* digunakan sebagai protein sampel melalui elektroforesis (SDS-PAGE), serum kambing untuk uji antigenitas protein 28 kDa (GRA2) dan serum darah kucing untuk melihat tingkat sensitivitas dan spesifisitas protein 28 kDa (GRA2). Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa protein 28 kDa (GRA2) telah dapat diisolasi dari stadium takizoit dan bradizoit *Toxoplasma* sp. Nilai OD₄₀₅ antigenesis ES adalah sebesar 0,578 sedangkan pada antigen GRA2 (28 kDa) diperoleh nilai OD₄₀₅ adalah sebesar 0,178. Tingkat sensitivitas protein 28 kDa (GRA2) terhadap antibodi dalam serum darah kucing terinfeksi adalah sebesar 61,53% dan nilai spesifisitasnya adalah 33,33%. Tingkat sensitivitas protein ES terhadap antibodi dalam serum darah kucing terinfeksi adalah 76,92% dan tingkat spesifisitasnya adalah 33,33%.

Kata kunci: protein, imunogenik, takizoit, bradizoit, kit diagnostik

ABSTRACT

The study has been done to isolate and identify 28 Kda (GRA2) protein of tachyzoite and bradyzoite of local strain *T. gondii*. Ascites liquid of *Balb/c* was used as protein sample get from electrophoresis (SDS-PAGE), goat blood serum was used for antigen test of 28 KDa (GRA2) and cat blood serum was used for sensitivity and specification level of 28 KDa (GRA2) protein. The data were analysed descriptively. The result showed that 28 KDa (GRA2) protein have been successfully isolated from tachyzoite and bradizoite phase of *Toxoplasma* sp. The OD₄₀₅ value of ES and GRA2 antigen were 0.578 and 0.178, respectively. Sensitivity level of 28 KDa (GRA2) protein and ES protein to antibody of infected cat serum were 61.53% and 76.92%, respectively. The specificity value between ES and GRA2 was the same 33.33%.

Key words: protein, immunogenic, tachyzoite, bradyzoite, diagnostic kit

PENDAHULUAN

Toksoplasmosis merupakan penyakit yang disebabkan protozoa *Toxoplasma gondii*. Protozoa ini hidup secara intraseluler dan ekstraseluler yang tersebar di seluruh dunia dan merupakan salah satu penyebab penyakit yang banyak ditemukan di daerah tropis. Beberapa di antara protein *Toxoplasma gondii* merupakan protein solubel yang dapat bertindak sebagai imunogen dan dapat menginduksi respons imun, karena terdiri atas komponen-komponen yang bersifat imunogenik seperti granular (GRA) protein yang berperan memodifikasi membran vakuola parasitoforus dan membran plasma sel hospes sehingga menguntungkan perkembangan parasit. Vakuola parasitoforus yang dibentuk dengan protein GRA ini tahan asam dan dapat mencegah fusi dengan lisosom (Fayer, 1981).

Davidson (1992) menyatakan bahwa protein solubel memiliki berat molekul sekitar 14-133 kDa dan di antara protein solubel tersebut memiliki berat molekul 28 kDa. Cha *et al.* (2004) menyatakan bahwa salah satu protein solubel adalah protein 28 kDa yang tidak

lain adalah protein GRA2. Cesbron-Delauw (1994) menyatakan bahwa protein 28 kDa adalah protein GRA2 dan di antara protein GRA yang paling imunogenik adalah protein GRA2. Mercierlo *et al.* (1998) menyatakan bahwa tidak adanya lokus gen yang menyandi protein GRA2 akan menurunkan virulensi *T. Gondii* akut pada mencit, sehingga protein ini berperan mencegah infeksi akut *T. gondii*. Protein antigen ini dapat menjadi salah satu kandidat vaksin yang efektif pada penderita imunodefisiensi seperti *acquired immunodeficiency syndrome* (AIDS). Singh (2003) menyatakan perlu mencegah infeksi parasit intraseluler seperti *T. gondii* ini dengan vaksin efektif dari protein granula padat seperti protein GRA2.

Tujuan penelitian ini adalah mengisolasi dan mengidentifikasi protein imunogenik takizoit dan bradizoit *T. gondii* strain lokal untuk pengembangan kit diagnostik yang dapat diterapkan pada beberapa hospes dalam usaha pemberantasan penyakit toksoplasmosis. Hasil penelitian diharapkan diperoleh protein imunogenik dari stadium takizoit dan bradizoit yang akan digunakan untuk pengembangan kit diagnostik toksoplasmosis pada ternak.

MATERI DAN METODE

Isolasi Organ yang Mengandung Bradizoit dari Ternak yang Terinfeksi Toksoplasmosis

Sebanyak 100 g jaringan paru, hati, dan limpa yang mengandung bradizoit *Toxoplasma gondii* dilakukan pencucian dengan *phosphate buffer saline* (PBS) sebanyak 3-5 kali hingga bersih kemudian diinkubasikan dalam PBS sebanyak 10 ml pada cawan Petri dengan suhu selama satu malam.

Isolasi Whole Protein dari Jaringan

Ekstraksi protein dilakukan dengan teknik sonikasi. Jaringan yang mengandung bradizoit tersebut dicuci dengan PBS dengan cara disentrifugasi kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit. Pelet dicuci dengan PBS sebanyak 2 kali dengan cara yang sama. Pelet jaringan dilarutkan dengan PBS 1 ml kemudian disonikasi pada 30 Hz selama 30 detik, diulang sebanyak 5 kali. Larutan hasil sonikasi kemudian disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit. Protein bradizoit yang terdapat di dalam PBS diisolasi dengan penambahan amonium jenuh sama banyak dan dicampur serta diinkubasi dalam suhu 4° C selama semalam kemudian dilakukan sentrifugasi 6.000 rpm selama 10 menit. Pelet yang didapatkan kemudian dicuci dengan PBS 3-5 kali sampai bersih dengan cara yang sama seperti di atas. Pelet yang didapatkan dilarutkan dengan PBS sebanyak 1-2 ml. Untuk mendapatkan protein didialisis semalam sehingga didapatkan protein yang bebas dari garam-garam lain. Konsentrasi protein diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 460 nm.

Preparasi Protein dengan Elektroforesis (SDS-PAGE)

Running gel dibuat dan dimasukkan ke dalam *plate* kaca, setelah mengeras pada bagian atasnya dimasukkan *stacking gel* yang telah dipersiapkan. Susunan *running gel* dan *stacking gel* dibuat dengan mencampurkan *acrylamide*, *Tris*, *sodium dodecyl sulfate* (SDS) 0,8 %. *Tetramethylethylenediamine* (Temed), Amonium peroksodisulfat (APS) dan akuades dalam gelas beker. Sebanyak 10 µg sampel yang ditambahkan *Laemli buffer* dengan perbandingan 2:1 dilakukan perebusan pada 100° C selama 5 menit, setelah itu dimasukkan ke dalam kolom cetakan yang terletak pada *stacking gel* dan dilakukan *running gel* pada *chamber* yang telah diisi *Electrode Buffer* 1 kali dengan 100 volt, 40 mA. Setelah *running*, gel dimasukkan ke dalam larutan pencuci yang terdiri atas metanol 25 ml, asam asetat 3,7 ml dan akuades sampai dengan 100 ml. Digoyang di atas *shaker* selama 30 menit. Pencucian berikutnya dengan larutan glutaraldehid 10% dan akuades selama 30 menit. Setelah dicuci, gel diwarnai dengan *comasie blue* selama 15 menit, kemudian dilakukan pencucian dengan akuades 2 kali masing-masing selama 2 menit. Diberikan larutan warna yang terdiri atas formaldehid 3,7%, *Sitronsouce* 5% dan akuades. Setelah pita-pita

protein terlihat maka reaksi dihentikan dengan menambahkan asam asetat 10%. Hasil gel yang telah tampak dari pita-pita proteinnya disimpan dalam larutan gliserol 10% dan siap untuk didokumentasikan. Penghitungan berat molekul dilakukan dengan membandingkan *standart marker* (Axelesen *et al.*, 1983).

Uji Antigenesitas Protein 28 kDa (GRA2) terhadap Serum Kambing dengan Teknik indirect –ELISA

Protein 28 kDa (GRA2) hasil isolasi dari tahap sebelumnya diuji antigenesitasnya sebagai antigen terhadap antibodi (anti *T. gondii*) dari sampel serum darah mencit. Pengujian dilakukan dengan teknik ELISA dan serum diperoleh dari kambing tersangka dan penderita toksoplasmosis yang sebelumnya dilakukan skrining dengan pemeriksaan serologis.

Uji Sensivitas dan Spesifitas Protein 28 kDa (GRA2) terhadap Serum Darah Kucing Tersangka dan Penderita Toksoplasmosis

Serum darah yang diuji dipastikan berasal dari kucing penderita toksoplasmosis dengan infeksi tunggal. Untuk memastikan keberadaan infeksi tersebut diambil serum darah kucing, disamping itu juga dilakukan pengambilan sampel feses untuk diperiksa keberadaan ookista *Toxoplasma* dengan mikroskop pembesaran 1000 x. Sebanyak 22 ekor kucing penderita toksoplasmosis dan 8 serum kontrol positif dari kucing yang terinfeksi toksoplasmosis digunakan sebagai sampel. Serum tersebut kemudian diperiksa dengan teknik *indirect* ELISA. Antigen yang digunakan adalah protein 28 kDa (GRA2) toksoplasmosis hasil isolasi dari tahap sebelumnya. Sensivitas dan spesifisitas dihitung dengan tabulasi silang seperti terlihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Tabel kontingensia (2x2) perhitungan pingkat sensitivitas dan spesifisitas

	Hasil ELISA		Total
	OD +	OD -	
Toksoplasmosis +	a	b	a + b
Toksoplasmosis -	c	d	c + d
Total	a + c	b + d	a + b + c + d

$$\text{Sensivitas} = \frac{a}{a + b} \times 100 \%$$

$$\text{Spesifisitas} = \frac{d}{c + d} \times 100 \%$$

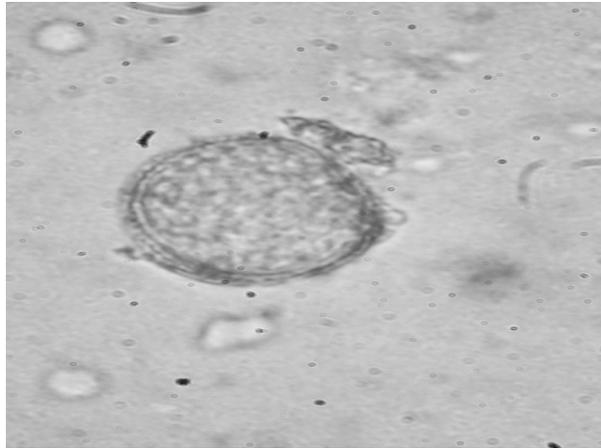
$$\text{Sensitivitas} = \frac{a}{a + b} \times 100\% \quad \text{Spesifivitas} = \frac{d}{c + d} \times 100\%$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Organ yang Mengandung Bradizoit dari Ternak yang Terinfeksi Toksoplasmosis

Berdasarkan hasil pemeriksaan organ paru, hati, dan limpa yang mengandung bradizoit/sista jaringan *gondii*

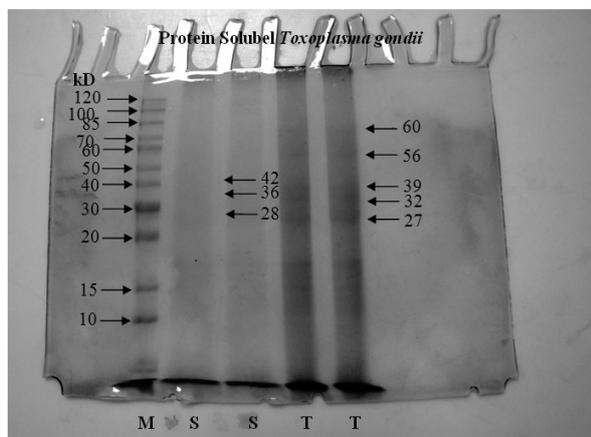
dari masing-masing sebanyak 100 g jaringan dilakukan pencucian dengan PBS sebanyak 3-5 kali hingga bersih kemudian diinkubasikan dalam PBS sebanyak 10 ml pada cawan petri dengan suhu selama satu malam, diperoleh hasil seperti pada Gambar 1.



Gambar 1. Bradizoit/sista jaringan *Toxoplasma gondii* dari organ hati kambing (pembesaran 10x100)

Isolasi Whole Protein dari Jaringan dan Preparasi Protein dengan Elektroforesis (SDS-PAGE)

Berdasarkan hasil preparasi protein solubel sampel stadium takizoit dan bradizoit dengan teknik SDS PAGE (Gambar 2) dan karakterisasi protein dengan *Immunoblot/Westernblot* dari penelitian terdahulu diperoleh beberapa protein spesifik antara lain mempunyai berat molekul (BM) 200, 70, 60, 52, 47, 38, dan 27 kDa (Rommel *et al.*, 1987). Sedangkan pada penelitian ini untuk penentuan berat molekul 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 (Tabel 2).

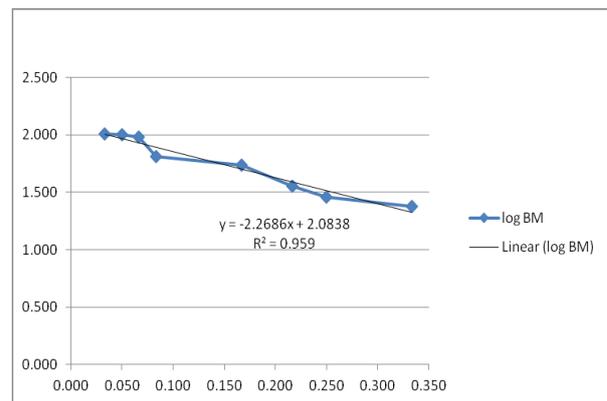


Gambar 2. Analisis protein solubel stadium bradizoit dan takizoit dengan teknik SDS-PAGE. M = marker (sigma); S = protein stadium sista, T = protein stadium takizoit

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

Tabel 2. Penghitungan nilai Rf pada marker

Marker	B	A	Rf	log berat molekul (Y)
120	6	0,2	0,033	2,011
100	6	0,3	0,050	2,001
85	6	0,4	0,067	1,984
70	6	0,5	0,083	1,814
60	6	1	0,167	1,740
50	6	1,3	0,217	1,556
40	6	1,5	0,250	1,462
30	6	2	0,333	1,380
20	6	2,6	0,433	1,370
15	6	3,5	0,583	1,270
10	6	4,2	0,700	1,233



Gambar 3. Kurva berat molekul protein standar

Dari persamaan regresi linear $Y = a + bx$, $a = 2,083$; $b = 2,268$ maka $Y = 2,083 - 2,268x$ dimana nilai R adalah 0,959 (Gambar 3). Untuk penentuan berat molekul stadium ookista dan takizoit dilakukan dengan mengonversi nilai Rf ke persamaan regresi yang sudah diperoleh yaitu: $Y = -2,268x + 2,083$, maka diperoleh berat molekul masing-masing seperti pada Tabel 3.

Tabel 3. Penentuan berat molekul stadium bradizoit dengan mengonversi nilai Rf ke dalam persamaan

A	B	Rf	log Berat Molekul	BM(kDa)
3,8	6	0,633	1,625	42,16
4,2	6	0,700	1,563	36,55
4,9	6	0,817	1,453	28,37

Dari Tabel 4 terlihat bahwa ada beberapa protein solubel yang diperoleh dari stadium takizoit sebanyak 5 yaitu protein dengan berat molekul (BM) 60,39; 56,23; 39,26; 32,80; dan 27,41 kDa, sedangkan untuk stadium bradizoit protein solubel yang terlihat adalah sebanyak 3 protein dengan berat molekul (BM) 42,16; 36,55; dan 28,37 kDa. Hasil penelitian ini sedikit berbeda dengan penelitian yang telah dilakukan terdahulu oleh Hanafiah *et al.* (2008) pada penelitian tersebut berat molekul (BM) protein solubel takizoit dan bradizoit berturut-turut sebagai berikut (BM) 89,12; 65,46; 51,16; 34,35; dan 26,85 kDa, sedangkan untuk stadium bradizoit protein solubel yang terlihat adalah sebanyak 2 protein dengan berat molekul 86,49 dan 65,46 kDa. Hal ini kemungkinan karena takizoit yang digunakan pada penelitian ini adalah berasal dari ternak yang positif terinfeksi oleh toksoplasmosis

sedangkan pada penelitian terdahulu menggunakan takizoit *strain* RH asal sampel manusia yang positif terinfeksi.

Tabel 4. Penentuan berat molekul stadium takizoit dengan mengonversi nilai Rf ke dalam persamaan

A	B	Rf	log Berat Molekul	BM(kDa)
2,8	6	0,467	1,781	60,39
3	6	0,500	1,750	56,23
4	6	0,667	1,594	39,26
4,5	6	0,750	1,516	32,80
5	6	0,833	1,438	27,41

Uji Antigenesitas Protein 28 kDa (GRA2) terhadap Serum Kambing dengan Teknik *indirect*-ELISA

Rerata nilai *optical density* (OD) yang diperoleh dari hasil serum darah kambing tersangka maupun yang terinfeksi toksoplasmosis dengan teknik *indirect*-ELISA baik menggunakan antigen 28 kDa (GRA2) maupun protein ES seperti terlihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Rerata nilai *Optical Density* (OD) hasil pengujian antigenesitas protein 28 kDa dan ES *Toxoplasma gondii* terhadap antibodi dengan teknik *indirect*-ELISA

Antigen coating	Nilai OD ₄₀₅
Protein 28	0,178 ^b
Protein ES	0,578 ^a
Kontrol (-) serum	0,094
Kontrol (-) PBS	0,009

^{a,b} superskrip berbeda pada kolom sama menunjukkan perbedaan sangat nyata (p<0,01)

Pada Tabel 5 terlihat bahwa hasil pembacaan nilai OD₄₀₅ untuk antigen ES adalah sebesar 0,578, sedangkan pada antigen GRA2 (28 kDa) diperoleh nilai OD₄₀₅ adalah sebesar 0,178. Berdasarkan hasil analisis statistik dengan uji t tak berpasangan (*independent t-test*) dapat diketahui bahwa, hasil pembacaan nilai OD untuk antigen ES (0,578) secara sangat nyata menunjukkan hasil lebih tinggi dibandingkan dengan antigen GRA2. Hasil tersebut menunjukkan bahwa nilai antigenesitas ES terhadap antibodi (anti-*Toxoplasma* sp) dalam serum darah kambing lebih tinggi bila dibandingkan dengan GRA2. Tingginya nilai tersebut kemungkinan dapat terjadi karena di dalam protein ES terkandung banyak macam protein (*crude protein*), masing-masing protein dapat berikatan secara spesifik dengan antibodi (anti-*Toxoplasma* sp) yang juga beragam baik kelas maupun subkelasnya, sehingga pada pembacaan dengan ELISA-reader menunjukkan nilai OD yang lebih tinggi.

Uji Sensivitas dan Spesifitas Protein 28 kDa (GRA2) terhadap Serum Darah Kucing Tersangka dan Penderita Toksoplasmosis

Dari pemeriksaan serum darah kucing dengan protein 28 kDa (GRA2) dan teknik *indirect* ELISA diperoleh hasil penghitungan tingkat sensitivitas dan spesifisitas diagnosis toksoplasmosis pada kucing dengan menggunakan tabel kontingensia (2x2) disajikan pada Tabel 6.

Tabel 6. Tabel kontingensia hasil penghitungan tingkat sensitivitas dan spesifisitas protein 28 kDa (GRA2) pada diagnosis toksoplasmosis pada serum darah kucing

	Hasil ELISA		Total
	OD +	OD -	
Toksoplasmosis +	8	5	13
Toksoplasmosis -	6	3	9
Total	14	8	22

Tabel 7. Tabel kontingensia hasil penghitungan tingkat sensitivitas dan spesifisitas protein ES pada diagnosis toksoplasmosis pada serum darah kucing

	Hasil ELISA		Total
	OD +	OD -	
Toksoplasmosis +	10	3	13
Toksoplasmosis -	6	3	9
Total	16	6	22

Pada Tabel 6 terlihat bahwa tingkat sensitivitas protein 28 kDa (GRA2) terhadap antibodi dalam serum darah kucing terinfeksi adalah sebesar $8/13 \times 100\% = 61,53\%$ dan nilai spesifisitasnya adalah $3/9 \times 100\% = 33,33\%$. Pada Tabel 7 terlihat bahwa tingkat sensitivitas protein ES terhadap antibodi dalam serum darah kucing terinfeksi adalah $10/13 \times 100\% = 76,92\%$ dan tingkat spesifisitasnya adalah $3/9 \times 100\% = 33,33\%$.

Tingkat sensitivitas dan spesifisitas protein 28 kDa (GRA2) sebagai antigen pada penelitian ini relatif rendah, hal ini kemungkinan karena serum kontrol positif (terinfeksi tidak hanya oleh *Toxoplasma* sp) yang digunakan. *Toxoplasma* mempunyai kemiripan dengan parasit yang lain seperti *Plasmodium*, *Cryptosporidium*, *Sarcocystis*, *Eimeria*, *Iso spora*, *Hammondia*, dan *Besnoitia* yang merupakan *phylum* Apicomplexa (Johnson, 1990).

Singh (2003) menyatakan perlu mencegah infeksi parasit intraselular seperti *T. gondii* ini dengan vaksin efektif dari protein granula padat seperti protein GRA2. Untuk penentuan positif atau negatif kucing terhadap toksoplasmosis digunakan standar yang sudah ada. Dibaca absorbansinya pada panjang gelombang OD₄₀₅ nm dalam waktu 15 menit menggunakan mikrowell reader/ELISA reader. Pemeriksaan kucing dikatakan hasilnya negatif bila nilai indeks Toxo $\leq 0,90$ atau < 32 IU/ml, mengindikasikan tidak adanya infeksi *Toxoplasma*. Meragukan bila nilai indeks Toxo 0.91-0.99 atau 32 IU/ml, sampel harus dites ulang. Kucing dinyatakan positif bila nilai indeks Toxo $\geq 1,0$ atau > 32 IU/ml, hal ini mengindikasikan bahwa ada infeksi terhadap *Toxoplasma*.

KESIMPULAN

Protein 28 kDa (GRA2) telah diisolasi dari stadium takizoit dan bradizoit *Toxoplasma* sp. Nilai OD₄₀₅ antigen ES adalah sebesar 0,578, sedangkan pada antigen GRA2 (28 kDa) diperoleh nilai OD₄₀₅ sebesar 0,178.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih penulis ucapkan kepada Kementerian Pendidikan Nasional, yang telah mendanai penelitian

ini melalui skim Riset Unggulan Strategis Nasional (Rusnas) Batch I. Nomor: 259/H11/A.01/APBN-P2T/2010 tanggal 6 Mei 2010.

DAFTAR PUSTAKA

- Axelelsen, B., D.M. Bollag, M.D. Rozycki, and S.J. Edelman. 1983. **Gel Electrophoresis Under Denaturing Conditions, Protein Methods**. 2nd ed., A. John Wiley & Sons Inc., New York.
- Cha, E., L. Lachaud, L. Crobu, and P. Bastien. 2004. Comparison of two widely used PCR primer systems for detection of *Toxoplasma* in amniotic fluid, blood, and tissues. **J. Clin. Microbiol.** 42(4):1719-1722.
- Cesbron-Delauw, M.F. 1994. Dense granule organelles of *Toxoplasma gondii*: Their role in the host-parasite relationship. **Parasitol Today** 10:8:293-296.
- Davidson, M.M. 1992. **New Techniques, Human Toxoplasmosis**. Oxford University Press, Oxford.
- Fayer, R. 1981. Toxoplasmosis up date and public health implication. **Can. Vet. J.** 22:344-352
- Hanafiah, M., N. Wisnu, K. Mufti, dan K. Fadrial. 2009. Produksi dan isolasi protein membran bradizoit *Toxoplasma gondii*: Suatu usaha untuk mendapatkan material diagnostik dalam mendiagnosa toksoplasmosis. **Jurnal Veteriner** 10(3):156-164.
- Mercierlo, L.D., A. Hehl, S. Parmley, L.D. Sibley, M. Marra, L. Hillier, R. Waterston, and J.C. Boothroyd. 1998. Expressed sequence tag analysis of the bradyzoite stage of *Toxoplasma gondii*: Identification of developmentally regulated genes. **Infect. Immun.** 42(4):1632-1637.
- Rommel, M., Schnieder, H.D. Krause, and Westerhoff. 1987. Trials to suppress the formation of oocysts and cysts of *Toxoplasma gondii* in cats by medication of feed with Tetrazuril. **Vet. Med. Rev.** 58:141-153.
- Singh, S. 2003. Mother to child transmission and diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. **Indian J. Med. Microbiol.** 21(2):69-76.