

Bidang Ilmu  
PERTANIAN

**Laporan**  
**Penelitian Hibah Bersaing Tahun Anggaran 2010**



**POTENSI PROTEIN EKSKRESI-SEKRESI ANTIGEN (ESA)**  
***Toxoplasma gondii* YANG IMUNOGENIK HASIL PEMBIAKAN**  
***IN VIVO* PADA MENCIT SEBAGAI KANDIDAT**  
**VAKSIN TOKSOPLASMOSIS**

Ketua Peneliti  
MUFASIRIN, M.Si., Drh.  
Anggota  
ENDANG SUPRIHATI, M.S., Drh.

Dibiayai oleh DIPA Universitas Airlangga Tahun Anggaran 2010, sesuai dengan Surat Keputusan Rektos Universitas Airlangga Tentang Kegiatan Penelitian Strategi Nasional dan Penelitian Multi Tahun Universitas Airlangga Tahun Anggaran 2010 Nomor: 553/H3/KR/2010, Tanggal 11 Maret 2010

**UNIVERSITAS AIRLANGGA**

**2010**

Bidang Ilmu  
PERTANIAN

Laporan  
Penelitian Hibah Bersaing Tahun Anggaran 2010



FK  
KFC  
LP-157/11  
MUF  
P

MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA

**POTENSI PROTEIN EKSKRESI-SEKRESI ANTIGEN (ESA)  
*Toxoplasma gondii* YANG IMUNOGENIK HASIL PEMBIAKAN  
IN VIVO PADA MENCIT SEBAGAI KANDIDAT  
VAKSIN TOKSOPLASMOSIS**

Ketua Peneliti  
MUFASIRIN, M.Si., Drh.  
Anggota  
ENDANG SUPRIHATI, M.S., Drh.

Dibiayai oleh DIPA Universitas Airlangga Tahun Anggaran 2010, sesuai dengan Surat Keputusan Rektos Universitas Airlangga Tentang Kegiatan Penelitian Strategi Nasional dan Penelitian Multi Tahun Universitas Airlangga Tahun Anggaran 2010 Nomor: 553/H3/KR/2010, Tanggal 11 Maret 2010

**UNIVERSITAS AIRLANGGA**

**2010**





## HALAMAN PENGESAHAN

1. Judul : **POTENSI PROTEIN EKSKRESI-SEKRESI ANTIGEN (ESA) *Toxoplasma gondii* YANG IMUNOGENIK HASIL PEMBIAKAN *IN VIVO* PADA MENCIT SEBAGAI KANDIDAT VAKSIN TOKSOPLASMOSIS**

## 2. Ketua Peneliti

- a. Nama lengkap : MUFASIRIN, M.Si., drh.  
 b. Jenis Kelamin : Laki-laki  
 c. NIP : 196711071993031003  
 d. Pangkat/Golongan : Penata Tk I /IIID  
 e. Jabatan Fungsional : Lektor  
 f. Bidang keahlian : Parasitologi / Bioteknologi  
 g. Fakultas : Fakultas Kedokteran Hewan  
 h. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

## 3. Tim Peneliti

No.	NAMA PENELITI	BIDANG KEAHLIAN	FAKULTAS /JURUSAN	PERGURUAN TINGGI
1.	Mufasirin, M.Si., Drh.	Parasitologi/ Bioteknologi	FKH	Unair
2.	Endang Suprihati, M.S., Drh.	Parasitologi	FKH	Unair

## 6. Pendanaan dan jangka waktu penelitian

- a. Jangka waktu penelitian yang diusulkan : 2 tahun  
 b. Biaya yang diusulkan tahun 1 : Rp. 50.000.000,-  
 c. Biaya yang disetujui tahun 1 : Rp. 30.000.000,-

Surabaya, 10 Nopember 2010

Ketua Peneliti,

Mufasirin, M.Si., drh.  
 NIP. 196711071993031003

Mengetahui,

Dekan  
 Fakultas Kedokteran Hewan  
 Universitas Airlangga

Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph.D., drh.  
 NIP. 196312161978062001

Mengetahui

Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat



Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt., M.Si.  
 NIP. 195908051987011001

## RINGKASAN

*Toxoplasma gondii* adalah parasit obligat intraseluler yang menginfeksi semua sel berinti mamalia. Pada ibu hamil, parasit dapat menyebabkan keguguran, anak lahir cacat, atau kelainan perkembangan fetus seperti kebutaan atau gangguan perkembangan otak. Pada ternak, toksoplasmosis menyebabkan kerugian yang besar seperti keguguran, lahir prematur atau kematian anak yang dilahirkan khususnya pada domba dan kambing. Akibat yang ditimbulkan baik pada kesehatan masyarakat dan nilai ekonomi pada ternak maka diperlukan vaksin untuk mengendalikan penyakit seperti penggunaan protein ekskresi dan sekresi antigen (ESA). Protein Ekskresi-Sekresi Antigen (ESA) adalah protein yang dieksekresikan dan disekresikan *T. gondii* pada saat menembus dan mengalami multiplikasi dalam sel inang. Protein ESA hasil ekspresi secara *in vivo* secara alami mempunyai konformasi bentuk dan fungsi lebih baik dibandingkan dengan hasil isolasi pemecahan takizoit *T. gondii* secara *in vitro*. Protein ini sebagian dapat dikenal oleh sistem kebal inang dan dapat membangkitkan sistem kekebalan tubuh sehingga dapat digunakan sebagai kandidat vaksin subunit.

Tujuan jangka panjang penelitian ini adalah mendapatkan vaksin subunit toksoplasmosis. Tujuan jangka pendek adalah mendapatkan beberapa protein ESA *T. gondii* stadium takizoit dari pembiakan secara *in vivo* pada mencit dan protein ESA yang bersifat imunogenik dan protektif sebagai kandidat vaksin toksoplasmosis.

Metode penelitian yang digunakan meliputi (tahun pertama): kultivasi *in vivo* *T. gondii* dan pemanenan cairan intraperitoneal pada mencit, isolasi protein ESA dan fraksinasi protein ESA dengan SDS Page, pembuatan antibodi terhadap protein ESA, penentuan antigenitas dengan *western blot* dan fraksinasi protein ESA antigenik dengan kromatografi kolom dan

teknik elusi. Metode tahun kedua meliputi: imunisasi (vaksinasi) mencit dengan protein ESA imunogenik, pengukuran titer antibodi dengan cara ELISA dan ujiantang.

Hasil penelitian didapatkan 13 protein ESA yaitu 125,5; 100,9; 70,2; 56,7; 45,6; 40,4; 35,3; 34,1; 29,5; 27,4; 24,9; 20,7 dan 19,7 kDa. Protein ESA yang bersifat antigenik adalah protein dengan berat molekul 100,9; 56,7; 35,3; 34,1; 24,9; 20,7 dan 19,7 kDa, dan protein 100,9; 56,7; 24,9; 20,7 dan 19,7 kDa merupakan protein antigenik mayor. Didapatkan 3 protein ESA *T. gondii* tunggal yang bersifat antigenik yaitu protein 100,9; 35,3 dan 20,7 kDa.

(LP Universitas Airlangga Surabaya, No. Kontrak 553/H3/KR/2010 tanggal 11 Maret 2010)

## SUMMARY

*Toxoplasma gondii* is an obligate intracellular protozoan parasite that is capable of infecting most nucleated mammalian cells. In pregnant women, congenital infection can lead to miscarriage, neonatal malformations, or other defect occurring the development of the foetus, such as blindness or severa cognitive imparment. In animals, toxoplasmosis is of great economic importance worldwide because it causes abortion, stillbirth, and neonatal loss in all types of livestock, especially in sheep and goats. This great worldwide importance for public health and economics of *T. gondii* infection makes development of an effective vaccine for controlling this infection an important goal, such as excreted-secreted antigen proteins (ESA). Excreted-secreted antigen (ESA) proteins of *T. gondii* are expressed in vivo more than in vitro because it has form of naturally protein. Its capable stimulates immune response, so can be used vaccine candidate.

The aim of this research is get some ESA protein of *T. gondii* tachyzoite from cultivating by in vivo at mice and ESA protein having the character of immunogenic and protective as candidate of vaccine toxoplasmosis. The long-range target of this research is get subunit vaccine of toxoplasmosis.

The method used cover ( first year): in vivo cultivation of *T. gondii* at mice and cropping ESA protein at intraperitoneal fluid and fractination ESA protein by SDS Page, antibody making to ESA protein, determination antigenicity by western blot and fractination of antigenic ESA protein by coloum chromatography and elution technique. Second year method cover: vaccination with immunogenic ESA protein, measurement of antibody titer by ELISA and challange test.

The results of research founded 13 ESA proteins: 125,5; 100,9; 70,2; 56,7; 45,6; 40,4; 35,3; 34,1; 29,5; 27,4; 24,9; 20,7 and 19,7 kDa. ESA proteins having the character of antigenic

is molecule weighing 100,9; 56,7; 35,3; 34,1; 24,9; 20,7 and 19,7 kDa, and 100,9; 56,7; 24,9; 20,7 and 19,7 kDa represent major antigenic. We got single ESA protein of *T. gondii* having the character of antigenic that is 100,9; 35,3 and 20,7 kDa.

(LP, Airlangga University Surabaya, Contract no. 553/H3/KR/2010 March 11, 2010)



**ABSTRAK**

Tujuan penelitian ini adalah mendapatkan beberapa protein ESA *T. gondii* stadium takizoit dari pembiakan secara *in vivo* pada mencit dan protein ESA yang bersifat imunogenik dan protektif sebagai kandidat vaksin toksoplasmosis. Tujuan jangka panjang penelitian ini adalah mendapatkan vaksin subunit toksoplasmosis. Metode penelitian yang digunakan meliputi (tahun pertama): kultivasi *in vivo* *T. gondii* dan pemanenan cairan intraperitoneal pada mencit, isolasi protein ESA dan fraksinasi protein ESA dengan SDS Page, pembuatan antibodi terhadap protein ESA, penentuan antigenitas dengan *western blot* dan fraksinasi protein ESA antigenik dengan kromatografi kolum dan teknik elusi. Metode tahun kedua meliputi: imunisasi (vaksinasi) mencit dengan protein ESA imunogenik, pengukuran titer antibodi dengan cara ELISA dan ujiantang. Hasil penelitian didapatkan 13 protein ESA yaitu 125,5; 100,9; 70,2; 56,7; 45,6; 40,4; 35,3; 34,1; 29,5; 27,4; 24,9; 20,7 dan 19,7 kDa. Protein ESA yang bersifat antigenik adalah protein dengan berat molekul 100,9; 56,7; 35,3; 34,1; 24,9; 20,7 dan 19,7 kDa, dan protein 100,9; 56,7; 24,9; 20,7 dan 19,7 kDa merupakan protein antigenik mayor. Didapatkan 3 protein ESA *T. gondii* tunggal yang bersifat antigenik yaitu protein 100,9; 35,3 dan 20,7 kDa.

**Kata kunci:** *Toxoplasma gondii*, Ekskresi-Sekresi Antigen.

**ABSTRACT**

The aim of this research is get some ESA protein of *T. gondii* tachyzoite from cultivating by in vivo at mice and ESA protein having the character of immunogenic and protective as candidate of vaccine toxoplasmosis. The long-range target of this research is get subunit vaccine of toxoplasmosis. The method used cover ( first year): in vivo cultivation of *T. gondii* at mice and cropping ESA protein at intraperitoneal fluid and fractination ESA protein by SDS Page, antibody making to ESA protein, determination antigenicity by western blot and fractination of antigenic ESA protein by coloum chromatography and elution technique. Second year method cover: vaccination with immunogenic ESA protein, measurement of antibody titer by ELISA and challange test. The results of research founded 13 ESA proteins: 125,5; 100,9; 70,2; 56,7; 45,6; 40,4; 35,3; 34,1; 29,5; 27,4; 24,9; 20,7 and 19,7 kDa. ESA proteins having the character of antigenic is molecule weighing 100,9; 56,7; 35,3; 34,1; 24,9; 20,7 and 19,7 kDa, and 100,9; 56,7; 24,9; 20,7 and 19,7 kDa represent major antigenic. We got single ESA protein of *T. gondii* having the character of antigenic that is 100,9; 35,3 and 20,7 kDa.

**Key words:** *Toxoplasma gondii*, Excreted-Secreted Antigen.

## PRAKATA

Puji syukur kami panjatkan kepada Allah SWT bahwa penelitian telah berjalan dengan baik sampai laporan kemajuan penelitian tahun pertama ini dibuat. Penelitian ini merupakan rangkaian penelitian untuk pengembangan kandidat vaksin yang berjudul: **Potensi Protein Ekskresi-Sekresi Antigen (ESA) *Toxoplasma gondii* yang Imunogenik Hasil Pemiakan *In Vivo* pada Mencit sebagai Kandidat Vaksin Toksoplasmosis.** Penelitian ini dilaksanakan selama 2 tahun dan laporan penelitian ini merupakan laporan tahun pertama dengan hasil akhir protein ESA yang antigenik.

Penelitian ini dapat terlaksana karena bantuan berbagai pihak, oleh karena itu tidak lupa kami sampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Prof. Dr. H. Fasich, Apt. selaku Rektor Universitas Airlangga.
2. Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt., M.Si., selaku Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat Universitas Airlangga dan Prof.Dr. Bambang Sektiari L., DEA. drh., Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat Universitas Airlangga tahun 2009-2010 yang telah memberikan kesempatan peneliti untuk melaksanakan penelitian.
3. Prof. Dr. Hj. Romziah Sidik, Ph.D, drh. yang telah memberikan kesempatan untuk melaksanakan penelitian.
4. Prof. Dr. H. Setiawan Koesdarto, M.Sc., selaku Ketua Departemen Parasitologi Veteriner FKH Unair yang telah memberikan dukungan dan kesempatan peneliti untuk melakukan penelitian di lab. Protozoologi Bagian Parasitologi.
5. Penanggung Jawab lab. Biologi Molekuler FKH Unair yang telah memberikan fasilitas untuk pelaksanaan penelitian.

6. Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Unair yang telah memberikan ijin pemeriksaan fraksinasi protein.
7. Semua pihak yang telah membantu pelaksanaan penelitian hingga selesai.

Kami menyadari bahwa laporan kemajuan penelitian ini masih banyak kekurangannya, oleh karena itu kritik dan saran kami harapkan demi sempurnanya laporan ini.

Suabaya, 10 Nopember 2010

Penyusun

## DAFTAR ISI

MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA

	Halaman
A.	HALAMAN PENGESAHAN ..... i
	LAPORAN HASIL PENELITIAN ..... ii
	RINGKASAN DAN SUMMARY ..... vi
	ABSTRAK ..... viii
	PRAKATA ..... x
	DAFTAR ISI ..... Xii
	DAFTAR GAMBAR ..... xiii
	DAFTAR LAMPIRAN ..... 1
BAB I.	PENDAHULUAN ..... 3
BAB II.	STUDI PUSTAKA ..... 3
	2.1 Tinjauan Penelitian ..... 3
	Epidemiologi Toksoplasmosis ..... 4
	2.2 Siklus Hidup <i>T. gondii</i> ..... 6
	2.3 Protein ESA <i>T. gondii</i> ..... 7
	2.4 Respons Imun terhadap Infeksi <i>T. gondii</i> ..... 8
	2.5 Kultur <i>T. gondii</i> pada Mencit ..... 10
BAB III.	TUJUAN DAN MANFAAT ..... 10
	3.1 Tujuan ..... 10
	3.2 Manfaat ..... 10
BAB IV.	METODE PENELITIAN ..... 11
	4.1 Kultivasi <i>In vivo</i> Takizoit dan Pemanenan Cairan Intraperitoneal ..... 11
	4.2 Isolasi Protein ESA ..... 11
	4.3 Fraksinasi Protein ESA dengan SDS Page ..... 12
	4.4 Pembuatan Antibodi terhadap Protein ESA ..... 13
	4.5 Penentuan Protein ESA Antigenik dengan <i>Western Blot</i> ..... 14
	4.6 Pemurnian Protein ESA Antigenik dengan Kromatografi Kolum ..... 15
	4.7 Pemurnian Protein ESA Antigenik dengan Teknik Elusi ..... 15
	4.8 Rancangan Penelitian dan Analisis Data ..... 16
BAB V.	HASIL DAN PEMBAHASAN ..... 16
	5.1 Kultivasi <i>In vivo</i> Takizoit dan Pemanenan Cairan Intraperitoneal ..... 18
	5.2 Isolasi Protein ESA dan Fraksinasi Protein ESA dengan SDS Page ..... 20
	5.3 Pembuatan Antibodi terhadap Protein ESA





5.4 Penentuan Protein ESA Antigenik dengan <i>Western Blot</i>	.....	22
5.5 Pemurnian Protein ESA Antigenik dengan Kromatografi Kolum dan Teknik Elusi	.....	23
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN	.....	26
6.1 Kesimpulan	.....	26
6.2 Saran	.....	26
DAFTAR PUSTAKA	.....	27
LAMPIRAN	.....	31
B. SINOPSIS PENELITIAN LANJUTAN	.....	33

## DAFTAR GAMBAR

		Halaman
Gambar 5.1.1	Mencit sakit setelah infeksi <i>T.gondii</i>	16
Gambar 5.1.2	Takizoit <i>T. gondii</i> dalam cairan peritoneal mencit (100x)	17
Gambar 5.1.3	Takizoit <i>T. gondii</i> dalam cairan peritoneal mencit (100x)	17
Gambar 5.2.2.1	Hasil fraksinasi protein ESA dengan SDS Page	18
Gambar 5.3.1	Titer antibodi tertinggi terhadap protein ESA <i>T. gondii</i>	20
Gambar 5.4.1	Hasil Immunobloting protein ESA <i>T. gondii</i>	22
Gambar 5.5.1	Hasil SDS Page fraksi protein ESA <i>T. gondii</i> setelah pemisahan dengan kromatografi kolum	24
Gambar 5.5.2	Hasil SDS Page protein ESA <i>T. gondii</i> setelah pemisahan dengan teknik elusi	24

## DAFTAR LAMPIRAN

		Halaman
Lampiran 1.	Hasil perhitungan statistik hubungan Berat Molekul (MR) dan Rf Protein Standard .....	31
Lampiran 2.	Tabel berat molekul sampel protein ESA setelah dimasukkan persamaan BM .....	32

**BAB I. PENDAHULUAN**

Toksoplasmosis adalah penyakit yang dapat menyerang hewan berdarah panas termasuk manusia. Pada manusia, manifestasi yang ditakuti akibat infeksi *T. gondii* adalah kecacatan pada anak yang dilahirkan. Salah usaha untuk mengendalikan toksoplasmosis antara lain dengan cara pemberian vaksin sehingga inang mampu bertahan terhadap infeksi. Beberapa teknik untuk mendapatkan vaksin untuk pencegahan penyakit sudah dilakukan tetapi belum mendapatkan hasil maksimal.

Beberapa peneliti telah mencoba menggunakan vaksin DNA untuk mencegah infeksi *T. gondii* pada mencit dan menggunakan beberapa antigen seperti antigen membran permukaan (SAG1) (Angus *et al.*, 2000), protein ekskresi-sekresi dari dense granule (GRA1) (Scorza *et al.*, 2003), GRA7 (Vercammen *et al.*, 2000), GRA4 (Desolme, *et al.*, 2000), protein rhoptri ROP2 (Vercammen *et al.*, 2000; Leyva dan Saavedra, 2001) dan ROP1 (Chen *et al.*, 2001). Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa proteksi yang berbeda terhadap toksoplasmosis pada mencit. Diantara kandidat vaksin yang ada, protein mikronema MIC3 (90 kDa) yang merupakan bagian protein ESA menunjukkan potensi yang tinggi karena mempunyai sifat melekat kuat pada sel inang baik pada stadium takizoit, bradizoit dan sporozoit dari *T. gondii* (Garcia-Reguet *et al.*, 2000; Cerede *et al.*, 2002).

Kendala penggunaan vaksin sub unit adalah sumber protein yang digunakan. Protein tersebut didapatkan dengan cara mengolah stadium takizoit *T. gondii* yang memerlukan bahan dan biaya yang tidak sedikit, disamping jumlah protein yang dihasilkan sedikit. Di lain pihak, stadium takizoit *T. gondii* dapat dibiakkan secara *in vivo* dalam rongga intraperitoneal mencit dalam waktu yang relatif pendek. *Toxoplasma gondii* dalam rongga intraperitoneal akan berkembang dan akan diekresikan dan disekresikan beberapa protein yang dibutuhkan untuk perkembangan parasit yang dikenal dengan Ekskresi-Sekresi Antigen (ESA). Protein tersebut



dihasilkan oleh organel rhoptri, mikronema dan granula padat (dense granule) dan protein tersebut sebagian dapat membangkitkan sistem kebal inang sebagai respon terhadap infeksi.

Protein ESA yang didapatkan dari perkembangbiakan secara *in vivo* mempunyai konformasi protein dan fungsi yang lebih baik dibandingkan dengan protein ESA hasil isolasi *T. gondii* dengan cara pemecahan stadium takizoit (secara *in vitro*). Beberapa protein ESA dapat merangsang timbulnya kekebalan pada inang yang terinfeksi, sehingga protein tersebut dapat digunakan sebagai kandidat vaksin sub unit. Laporan tentang profil protein ESA hasil kultivasi *in vivo* dan penggunaeran sebagai bahan untuk merangsang kekebalan banyak dilaporkan.

Penelitian ini terbagi menjadi dua tahun. Tahun pertama meliputi kultivasi *in vivo* takizoit *T. gondii* dan pemanenan cairan intraperitoneal, isolasi protein ESA, fraksisasi protein ESA dengan SDS Page, pembuatan antibodi terhadap protein ESA, penentuan protein ESA antigenik dengan *western blot* dan pemurnian protein ESA antigenik dengan kromatografi. Tahun kedua meliputi imunisasi (vaksinasi) mencit dengan protein ESA imunogenik, pengukuran titer antibodi dengan cara ELISA dan ujiantang.



## BAB II. STUDI PUSTAKA

### 2.1 Tinjauan Penelitian Epidemiologis toksoplasmosis

Kejadian toksoplasmosis pada manusia sudah banyak dilaporkan. Di Victoria, Canada lebih dari 110 orang termasuk bayi telah terinfeksi *T. gondii* (Mullens, 1996). Di Norwegia, Jenum *et al.* (1998) melaporkan kejadian toksoplasmosis pada ibu hamil antara tahun 1992-1994 yang mencapai 35.940 orang. Di Amerika Serikat 30-60% orang dewasa menunjukkan seropositif terhadap *Toxoplasma* (Frenkel, 1990). Di Thailand dan Austria, kejadian toksoplasmosis pada ibu hamil masing-masing sebesar 21,7% dan 36,3% (Sukthana, 1999). Di Singapura, kasus toksoplasmosis pada ibu hamil antara tahun 1997-1998 sebesar 17,2% (Wong *et al.*, 2000). Kasus toksoplasmosis pada ternak dan hewan lain telah banyak dilaporkan oleh beberapa peneliti. Di Amerika Serikat, kambing yang terkena toksoplasmosis sebesar 23-60%, domba 8-74% dan pada sapi bervariasi di beberapa negara bagian (Dubey, 1990). Zimmerman *et al.* (1990) melaporkan 50,96% babi di Iowa menunjukkan seropositif terhadap *Toxoplasma* sedang di Bandar Lampung dan Ujung Pandang (Indonesia) masing-masing sebesar 3,6% dan 9,2% (Inoue *et al.*, 2001). Di daerah timur laut Amerika Serikat, domba menunjukkan seropositif terhadap *Toxoplasma* sebesar 61% (Malik *et al.*, 1990). Sasmita (1993) melaporkan kasus toksoplasmosis pada kambing di daerah Tuban dan Kediri, Jawa Timur berturut-turut sebesar 20,6% dan 20%, sedang Sasmita dan Suprihati (1993) melaporkan keberadaan toksoplasmosis pada kucing liar di pasar dan rumah sakit Kotamadya Surabaya berturut-turut sebesar 73,3% dan 46,7%. Kasus toksoplasmosis pada hewan selain ternak telah dilaporkan pada kelinci (Dubey *et al.*, 1992). Pada hewan pengerat *Apodemus agrarius* di Korea sebesar 1,49% (Jeon and Yong, 2000) dan pada anjing laut (*Phoca vitulina*) di Washington sebesar 7,6% (Lambourn *et al.*, 2001).

## 2.2 Siklus Hidup *T. gondii*

Siklus hidup *T. gondii* dimulai pada saat ookista yang sudah bersporulasi tertelan induk semang yang peka. Sporozoit yang dibebaskan segera menembus jaringan usus melalui lamina propria (Lappin, 1994) dan masuk ke jaringan parenteral melalui darah dan cairan limfe. Parasit segera menginfeksi beberapa tipe sel tubuh. Sporozoit berkembang secara endodiogeni dan akhirnya membentuk pseudokista. Pseudokista berisi merozoit dalam jumlah yang banyak. Merozoit dalam pseudokista ini merupakan takizoit yang dapat memperbanyak diri secara endodiogeni. Takizoit dapat ditemukan di dalam makrofag di dalam eksudat rongga perut tetapi juga dapat dijumpai pada jaringan parenteral lain seperti hati, paru dan jaringan submukosa. Ada sejumlah generasi takizoit setelah masuk ke dalam sel akan menginduksi pembentukan pseudokista dengan dinding tebal (*meront* atau *cyst*). Kista berisi banyak bradizoit yang resisten terhadap tripsin dan pepsin dibandingkan dengan bentuk takizoit. Kista di dalam jaringan tubuh dapat bertahan selama bertahun-tahun. Stadium ini sering didapatkan di jaringan otak dan otot pada infeksi *T. gondii* yang bersifat kronik (Levine, 1985). kista di jaringan terbentuk akibat respon kekebalan humoral dan seluler inang terhadap parasit. Pada keadaan tertentu kista dapat pecah dan terjadi parasitemia dan parasit akan menginfeksi sel lain (Lappin, 1994).

*Toxoplasma gondii* dapat ditularkan antara lain melalui ookista yang sudah bersporulasi, takizoit, bradizoit dan kista. Merozoit berukuran  $5 - 8 \times 1 - 2 \mu\text{m}$  dan mempunyai membran yang kompleks pada bagian permukaan. Merozoit mempunyai kompleks apikal yang berisi dua cincin polar pada ujung anterior dan satu cincin pada bagian posterior. Inti merozoit berbentuk seperti bola atau oval dengan anak inti besar dan jelas (Levine, 1985).

Pada kucing dan sebangsa kucing, sporozoit menuju epitel usus dan berkembang dengan pembelahan. Ada 5 tipe sel yang diketahui pada stadium hasil perkembangan ini yaitu

tipe A, B, C, D dan E. Tipe A terjadi 12 – 18 jam setelah infeksi. Tipe ini membelah secara endodiogeni yang merupakan tipe yang paling kecil yang berisi 2 atau 3 organisme dan berada pada jejenum. Tipe B terbentuk 12 – 15 jam setelah infeksi, mempunyai inti pada bagian tengah dengan anak inti yang jelas. Tipe B membelah dengan endodiogeni dan polidiogeni. Tipe C terbentuk 24 – 54 jam setelah infeksi dan membelah secara skizogoni (merogoni). Tipe ini berbentuk panjang dan mempunyai inti di dekat ujung sel parasit. Tipe D terbentuk pada jam ke-12 sampai 15 hari setelah infeksi dan merupakan 90% total *T. gondii* yang didapatkan pada usus halus. Bentuk tipe D lebih kecil dari pada tipe C dan membelah secara endodiogeni, skizogoni dan pelepasan merozoit tunggal dari inti. Tipe E terjadi 3 – 15 hari setelah infeksi (Levine, 1985; Soulsby, 1986).

Setelah terbentuk merozoit, sebagian merozoit akan membentuk gametosit jantan (mikrogametosit) dan gametosit betina (makrogametosit). Proses pembentukan gametosit disebut gametogoni dan proses ini terjadi di ileum 3 – 15 hari setelah infeksi. Mikrogametosit mengandung 12 - 32 mikrogamet. Mikrogamet berbentuk langsing, berukuran 3  $\mu\text{m}$  dan mempunyai 2 flagela. Fertilisasi terjadi apabila makrogamet dibuahi mikrogamet dan membentuk zigot. Zigot yang terbentuk segera membuat dinding dan terbentuk ookista. Ookista dikeluarkan bersama dengan pengeluaran feses ke lingkungan. Pada kucing periode prepaten adalah 2 – 7 hari setelah kista tertelan, 7 – 8 hari setelah merozoit tertelan dan 1 – 3 minggu setelah ookista yang sudah bersporulasi tertelan, sedangkan periode paten 1 – 2 minggu (Levine, 1985)

Ookista yang dikeluarkan bersama dengan feses kucing ke lingkungan berbentuk bulat, berukuran rata-rata 12 x 10  $\mu\text{m}$ . Waktu yang dibutuhkan untuk sporulasi pada temperatur 24°C adalah 2 – 3 hari. Ookista yang sudah bersporulasi berukuran rata-rata 13 x 12  $\mu\text{m}$  dan berbentuk agak bulat. Ookista yang telah bersporulasi mengandung 2 sporokista yang

berbentuk lonjong dan berukuran 8,5 x 6  $\mu\text{m}$ . Sporokista berisi 4 sporozoit yang berukuran 8 x 2  $\mu\text{m}$  (Levine, 1985). Ookista dapat bertahan dalam lingkungan basah dan hangat selama lebih dari satu tahun (Sciammarella, 2002).

Proses skizogoni dan gametogoni akan berulang apabila ookista yang sudah bersporulasi tertelan induk semang utama. Apabila ookista yang sudah bersporulasi tertelan tikus atau induk semang antara yang lain, *T. gondii* akan berkembang dan terbentuk kista yang banyak mengandung bradizoit tetapi tidak terbentuk ookista seperti yang terjadi pada induk semang utama. Manusia dan induk semang antara yang lain terinfeksi akibat menelan ookista yang telah bersporulasi atau kista yang terdapat pada daging hewan yang terinfeksi. Toksoplasmosis dapat ditularkan secara kongenital pada bayi yang dikandung ibu hamil yang terinfeksi (Cox, 1994) dan pada ibu hamil yang tidak diobati penularan ke anak sebesar 55% dan yang diobati 25% (Sciammarella, 2002). Penularan toksoplasmosis dapat melalui produk susu yang mengandung kista yang mengandung bradizoit (Despoimner *et al.*, 1995). Penularan toksoplasmosis disamping melalui cara tersebut di atas dapat melalui transplantasi organ yang terinfeksi, transfusi darah dan akibat kecelakaan di laboratorium (Sciammarella, 2002).

### 2.3 Protein ESA *T. gondii*

Sel vertebrata (inang) dapat terinfeksi oleh agen parasit seperti *T. gondii*, tetapi bagaimana mekanisme masuknya parasit belum banyak dipahami. *Toxoplasma gondii* pada saat menembus sel inang secara aktif mensekresikan protein adhesiv (MIC2) yang dikeluarkan oleh mikronema yang berhubungan dengan M2AP. Parasit dengan kehilangan M2AP menyebabkan daya infektifitas terhadap sel inang menurun 80%. Disimpulkan bahwa sekresi

protein kompleks MIC2-M2AP *T. gondii* dibutuhkan untuk invasi ke sel inang (My-Hang Huynh *et al.*, 2003)

Stadium takizoit *T. gondii* paling sedikit mempunyai 3 organel penting sebagai organel sekretoris yaitu mikronema, rhoptri dan granula padat. Mikronema dan rhoptri terdapat pada bagian anterior sel sedang granula padat tersebar rata dalam sitoplasma. Secara morfologi, granula padat tidak dapat dibedakan dengan granula sudah masak. Mikronema sebagai eksositosis sampai perlekatan pada sel inang, sekresi rhoptri untuk invasi dan sekresi granula padat lebih berperan setelah parasit masuk ke sel inang. Protein mikronema dan rhoptri merupakan protein yang penting dalam invasi ke sel inang sedang protein granula padat dibutuhkan untuk replikasi intraseluler termasuk mempertahankan vakuola parasitoporus dimana parasit berada sampai terjadi lisis sel inang (Joiner dan Roos, 2002).

Soluble protein rekombinan dilepaskan ke granula matrik padat. Protein granula padat secara kuantitatif disekresikan dalam bentuk yang tergantung kalsium (Joiner dan Roos, 2002). Rhoptri seperti badan multivesikuler dan endosoma lanjut, diperkaya dengan kolesterol. Sekresi rhoptri berkontribusi pada pembentukan vakuola parasitoporous yang memisahkan dengan bagian dari sel inang dimana parasit berada. Biogenesis rhoptri belum diketahui, tetapi rhoptri tampak pada pembelahan sel (endodiogeni)(Joiner dan Roos, 2002).

#### **2.4 Respons Imun terhadap Infeksi *T. gondii***

Infeksi *T. gondii* dapat membangkitkan respon imun induk semang terinfeksi baik secara humoral dan seluler (Ghaffar, 2001). Respons humoral imun ditunjukkan dengan pembentukan beberapa kelas antibodi spesifik dalam serum. Seperti parasit intraseluler yang lain, respons imun seluler lebih dominan dibandingkan dengan respons imun humoral (Johnson, 1990; Denkers dan Gazzinelli, 1998 ). Kemampuan *T. gondii* membangkitkan

respons imun seluler dicirikan dengan respon yang kuat ke arah sel Th1 yang ditandai dengan dilepaskan IFN- $\gamma$  dan IFN- $\alpha$  (Denkers dan Gazzinelli, 1998; Lee *et al.*, 1999). Menurut Denkers dan Gazzinelli (1998), induk semang mampu bertahan terhadap infeksi *T. gondii* melalui dua fase. Pertama adalah fase awal (akut), pertumbuhan stadium takizoit dihambat IFN- $\gamma$ . Parasit menginduksi IFN- $\gamma$  dalam jumlah yang tinggi pada awal infeksi. Sitokin tersebut diproduksi oleh sel Natural Killer (NK) dan sel T yang teraktivasi. Pada fase ini melibatkan sistem imun alami, sel NK dan makrofag. Sel NK merupakan sel utama penghasil IFN- $\gamma$ . Makrofag memproduksi IL-12 yang akan mendorong sintesis IFN- $\gamma$  oleh sel NK. Selanjutnya IFN- $\gamma$  mengaktivasi makrofag menghasilkan TNF $\alpha$  dan NO sebagai mikrobisida. Kedua adalah fase kronis (adaptif), limfosit T memproduksi kadar IFN- $\gamma$  dalam jumlah banyak, yang ditujukan untuk mencegah reaktivasi kista dan membersihkan takizoit jaringan. IL-12 yang dihasilkan makrofag mendorong diferensiasi sel Th0 dan reaksi secara kuat ke arah sel Th 1 yang memproduksi IFN- $\gamma$ . Bukti bahwa IFN- $\gamma$  berperan melawan infeksi ditunjukkan dengan penelitian pada mencit terinfeksi yang diobati anti-IFN- $\gamma$  dan mencit yang kekurangan gene IFN- $\gamma$  bila diinfeksi dengan *T. gondii* akan mati (Sher *et al.*, 1995).

## 2.5 Kultur *T. gondii* pada Mencit

Kultur *T. gondii* dapat dilakukan secara *invivo* atau *invitro*. Penggunaan mencit untuk mengembangbiakkan *T. gondii* secara *invivo* sudah banyak dilakukan peneliti antara lain Mufasirin (1999), Halonen dan Weiss (2000), Hanafiah dkk (2003), Mufasirin *et al.* (2005), Suwanti (2005) dengan cara menyuntikkan stadium takizoit *T. gondii* secara intraperitoneal. Dalam waktu 3-4 hari, pemanenan takizoit dilakukan dengan cara mencuci rongga intraperitoneal dengan PBS. Selain secara *invivo*, *T. gondii* dapat dibiakkan secara *invitro*



dalam human foreskin fibroblast (HFF) seperti yang dilakukan oleh Brecht *et al.*, (2001), Fux *et al.* (2003) dan Dziarszinski *et al.* (2004).

## **BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN**

### **3.1 Tujuan**

#### **3.1.1 Tujuan jangka panjang**

Tujuan jangka panjang penelitian ini adalah mendapatkan vaksin sub unit toksoplasmosis.

#### **3.1.2 Tujuan jangka pendek**

1. Mengetahui profil protein ESA yang diekspresikan *T. gondii* stadium takizoit secara *in vivo*.
2. Mendapatkan protein ESA yang bersifat antigenik
3. Mendapatkan protein ESA yang bersifat imunogenik dan bersifat protektif sebagai kandidat vaksin sub unit.

### **3.2 Manfaat**

Diharapkan dengan pemberian vaksin, terjadi peningkatan kekebalan sehingga kejadian toksoplasmosis pada manusia dan ternak dapat ditekan.

## BAB IV. METODE PENELITIAN

### 4.1 Kultivasi *In Vivo* Takizoit *T. gondii* dan Pemanenan Cairan Intraperitoneal

Sebanyak  $1 \times 10^7$  takizoit *T. gondii strain* RH diinfeksi pada mencit Balb/C secara intraperitoneal. Mencit dipelihara 48 sampai 72 jam, dan setelah menunjukkan sakit, mencit dikorbankan dan rongga peritoneum dicuci dengan 5 ml PBS sehingga takizoit dapat dikumpulkan. Cairan hasil pencucian, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil dan dimasukkan ke dalam tabung dan siap untuk proses isolasi protein ESA (Mufasirin, 1999).

### 4.2 Isolasi Protein ESA

Supernatan hasil kultivasi ditambahkan amonium sulfat jenuh dengan perbandingan 1:1, dicampur dan diinkubasi dalam suhu 4°C semalam, selanjutnya disentrifugasi dengan 1000 rpm selama 1 jam. Supernatan dibuang dan pellet dicuci dengan PBS dan disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 2 jam. Pencucian dilakukan 3 kali dengan cara yang sama. Pellet dilarutkan dengan PBS dan kadar protein diukur dengan spektrofotometer (Mufasirin, 1999).

### 4.3 Fraksinasi Protein ESA dengan 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 Acrylamid, Tris, SDS 0,8%, Temed, APS dan aquades dalam beker gelas. Sebanyak 10 µg sampel TAg yang ditambahkan *laemly buffers* 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* pada *chamber* yang telah diisi *Electrode Buffers* 1x dengan 100 volt, 40 mA. Sebagai *standard marker* digunakan *Prestained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas, Lot. 00024549) Setelah *running*, gel dimasukkan ke dalam larutan pencuci yang terdiri dari methanol 25 ml, asam asetat 3,7 ml, dan Aquades ad 100 ml. Digoyang di atas sackher selama 30 menit. Dilakukan pencucian ulang dengan larutan yang sama dengan pengurangan komposisi ethanol dan penambahan asam asetat setengah dari sebelumnya selama 30 menit. Pencucian selanjutnya dengan larutan glutaraldehid 10% dan Aquades selama 30 menit. Setelah dicuci gel diwarnai dengan AgNO<sub>3</sub> selama 15 menit, kemudian dilakukan pencucian dengan aquades dua kali masing-masing selama 2 menit. Diberikan larutan pengembangan warna yang terdiri dari formaldehid 3,7%, zitronsauce 5% dan aquades. Setelah pita-pita protein terlihat maka reaksi dihentikan dengan menambahkan asam asetat 10%. Hasil gel yang telah tampak pita-pita protein disimpan dalam larutan gliserol 10% dan siap untuk didokumentasikan. Penghitungan berat molekul dilakukan dengan membandingkan standard (Mufasirin, 1999)

#### **4.4 Pembuatan Antibodi terhadap Protein ESA**

##### **4.4.1 Imunisasi pada kelinci**

Kelinci jantan dewasa sehat diinjeksi dengan protein dengan dosis 50-100 µg yang sebelumnya sudah ditambahkan adjuvant *complete* (Sigma) dengan perbandingan yang sama sehingga volume akhir sebanyak 500 µl. Penyuntikan dilakukan di bawah kulit pada empat lokasi tubuh yang mempunyai kulit longgar. Injeksi diulang dengan protein yang sama dengan penambahan adjuvant *incomplete* (Sigma) pada 2 minggu setelah penyuntikan pertama. Penyuntikan ulang berikutnya menggunakan protein yang sama dengan adjuvat

*incomplete* dengan cara yang sama sampai seterusnya hingga didapatkan titer antibodi yang tinggi. Sebelum dilakukan penyuntikan pertama dilakukan pengambilan serum sebagai kontrol negatif dalam uji ELISA. Pengambilan serum selanjutnya dilakukan sebelum dilakukan booster untuk melihat respon antibodi setiap setelah penyuntikan dengan uji yang sama.

#### 4.4.2 Pengukuran titer antibodi dengan *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)

Setiap sumuran plat mikro diisi sebanyak 100  $\mu$ l larutan protein ESA dengan konsentrasi 1  $\mu$ g/ml dalam bufer karbonat dan diinkubasi pada suhu 37°C semalam. Plat mikro dicuci 3 kali dengan bufer pencuci dan kemudian tiap sumuran ditambahkan 200  $\mu$ l *blocking solution*. Setelah diinkubasikan pada suhu 37°C selama 1-2 jam, dilakukan 3 kali pencucian. Setiap sumuran kemudian diisi dengan 100  $\mu$ l serum sampel yang telah diencerkan dan diinkubasikan pada 37°C selama 1 jam, serta diikuti dengan 3 kali pencucian. Selanjutnya setiap sumuran diisi dengan 100  $\mu$ l konjugat (Santa Cruz, USA) dan diinkubasikan selama 1 jam, diikuti 3-4 kali pencucian. Sebanyak 100  $\mu$ l substrat 4 nitrophenil (1mg/ml) (Sigma, USA) dimasukkan ke dalam tiap sumuran, diinkubasikan pada 37°C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 50  $\mu$ l larutan 1N NaOH. Titer antibodi dibaca pada *ELISA reader* (Mufasirin, 1999).

#### 4.5 Penentuan Protein ESA Antigenik dengan *Western Blot*

Untuk mengidentifikasi protein ESA *T. gondii* yang antigenik dengan menggunakan metode *western blot*. Hasil *SDS-Page* ditransfer ke membran niroselulose, selanjutnya membran dibloking dengan BSA 1% selama semalam pada suhu 4°C dan dilanjutkan pencucian dengan 0,05% Tween 100 dalam TBS selama 10 menit, dan pencucian diulang



3 kali. Membran selanjutnya dimasukkan ke dalam larutan antibodi terhadap ESA dalam PBS (1:50) dan diinkubasikan 1 jam pada temperatur ruang dengan *shacker* dan dilakukan pencucian dengan 0,05% Tween 100 dalam TBS selama 10 menit. Pencucian diulang 4 kali dengan cara yang sama. Selanjutnya membran diinkubasikan dalam larutan konjugat (1:3000) (Santa Cruz, USA) selama 1 jam pada temperatur kamar dengan *sacker* dan diikuti dengan pencucian 5 kali dengan 0,05% Tween dalam TBS dan 1 kali tanpa Tween. Membran diwarnai dengan substrat *Western Blue Ready*. Reaksi dihentikan apabila sudah terlihat pita protein dengan cara menambahkan aquades. Membran dikeringkan pada kertas Whatman dan siap untuk didokumentasikan. Penghitungan berat molekul yang imunogenik dilakukan dengan membandingkan pita protein yang tampak dengan standard marker yang diwarnai dengan perak nitrat (Mufasirin, 1999).

#### **4.6 Pemurnian Protein ESA Antigenik dengan Kromatografi Kolum**

Sebanyak 1 gram Sephadex dilarutkan dalam Aquades deionized, dicampur dengan baik dan dibiarkan semalam. Larutan kemudian dimasukkan ke dalam kolum dan dibiarkan semalam sehingga matrik memadat dan siap digunakan. Sampel dimasukkan ke kolum dan dialiri PBS yang sebanding dengan cairan yang keluar. Cairan ditampung dalam tabung eppendorf dengan kecepatan yang sudah ditentukan yaitu 2 tetes tiap menit. Hasil cairan elusi kemudian ditambahkan ethanol absolut dingin sama banyak, dicampur sampai homogen dan dibiarkan pada suhu 4° C selama semalam. Pelet protein didapatkan dengan cara disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm, 4° C selama 1 jam. Pelet yang telah dicuci diresuspensi dengan PBS. Untuk mengetahui kemurnian protein hasil kromatografi kemudian dielektroforesis sehingga didapatkan beberapa macam kelompok protein yang berbeda (Sudjadi, 1988).

#### **4.7 Pemurnian Protein ESA Antigenik dengan Teknik Elusi**

Teknik elusi digunakan apabila pemisahan protein ESA antigenik menggunakan kromatografi kolom tidak dapat memisahkan protein tunggal dengan baik. Teknik protein dengan elusi dimulai dengan fraksinasi protein ESA dengan SDS page seperti pada cara 4.3. Hasil fraksinasi tidak dilakukan proses pewarnaan. Gel dilakukan pemotongan di daerah yang dituju (protein antigenik) dan dimasukkan ke dalam membran selopan dan ditambahkan bufer running. Selopan yang mengandung potongan gel yang diharapkan dielektroforesis dengan 100 Volt, 40mA selama 2 jam. Cairan pelarut dalam membran selopan yang mengandung protein target diambil dan dilakukan pemekatan dengan amonium jenuh. Protein yang didapatkan kemudian dicek kembali dengan SDS Page kembali untuk membuktikan bahwa protein yang diisolasi tidak tercampur dengan protein lain.

#### **4.8 Rancangan Penelitian dan Analisis Data**

Rancangan penelitian ini adalah eksperimental laboratoris. Data analisis protein ESA yang meliputi fraksi protein, titer antibodi terhadap protein ESA, protein yang bersifat antigenik dan hasil pemisahan protein dengan kromatografi disajikan secara deskriptif.



## BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1 Kultivasi *In Vivo* Takizoit *T. gondii* dan Pemanenan Cairan Intraperitoneal

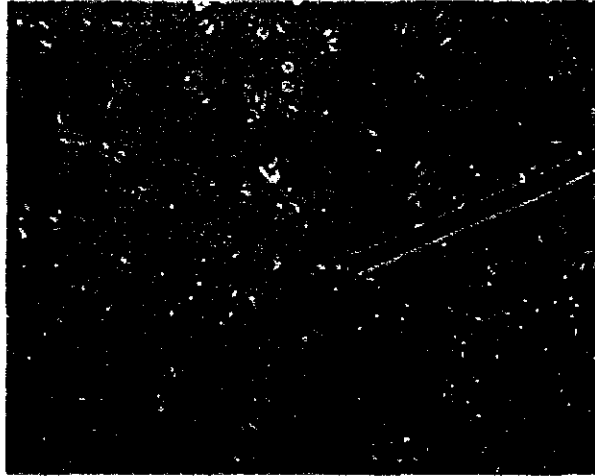
Kultivasi *In Vivo* Takizoit *T. gondii* pada mencit merupakan teknik perbanyakan yang sudah sering dilakukan. Mencit setelah diinfeksi secara peritoneal dengan takizoit *T. gondii* dalam waktu 3 x 24 jam akan menunjukkan gejala sakit seperti bulu kusut dan berdiri, pergerakan lambat, nafsu makan dan minum berkurang dan pernapasan cepat dan tersengal-sengal yang dapat dilihat pada Gambar 5.1.1



Gambar 5.1.1 Mencit sakit setelah diinfeksi *T. gondii*

Segera setelah takizoit masuk rongga peritoneal, parasit masuk ke dalam sel induk semang termasuk limfosit dan mengalami perbanyakan dengan cara endodiogeni. Sel yang terinfeksi (banyak mengandung takizoit) kemudian pecah dan takizoit yang dibebaskan akan menginfeksi sel lain yang sehat dan akan menyebar ke seluruh tubuh. Parasit dalam darah meningkat sehingga terjadi parasitemia yang ditandai bulu berdiri kusut dan berdiri, pergerakan lambat, nafsu makan minum berkurang dan pernapasan cepat dan tersengal-sengal.

Setelah dikorbakan, cairan peritoneal dicuci dengan NaCl fisiologis dan keberadaan takizoit dilihat di bawah mikroskop, yang dapat dilihat pada Gambar 5.1.2 dan 5.1.3.



Gambar 5.1.2 Takizoit *T. gondii* dalam cairan peritoneal mencit (perbesaran 100X, tanpa pewarnaan)



Gambar 5.1.3 Takizoit *T. gondii* dalam cairan peritoneal mencit (perbesaran 1000X, pewarnaan Giemsa)

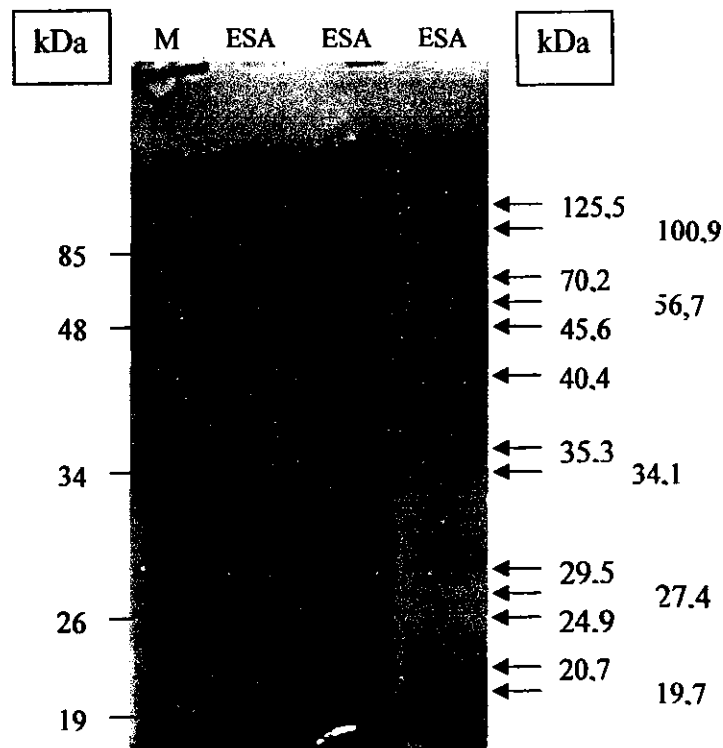
## 5.2 Isolasi Protein ESA dan Fraksinasi protein ESA dengan SDS Page

### 5.2.1 Isolasi Protein ESA

Larutan hasil cucian cairan intraperitoneal yang mengandung takizoit, kemudian dilakukan isolasi protein ESA. Hasil isolasi dengan penambahan amonium sulfat jenuh dan setelah dilakukan pencucian didapatkan protein ESA dengan kadar 0,5 mikrogram per mililiter sebanyak 15 ml.

### 5.2.2 Fraksinasi protein ESA dengan SDS Page

Hasil fraksinasi protein ESA dengan SDS Page dapat dilihat pada Gambar 5.2.2.1



Gambar 5.2.2.1 Hasil fraksinasi protein ESA dengan SDS Page  
M= marker

Dari perhitungan menggunakan rumus regresi dengan *standard marker* yang ada  $Y = -3,93X^3 + 7,19X^2 - 4,63X + 2,53$  (Lampiran 1) didapatkan 13 protein dengan berat

molekul 125,5; 100,9; 70,2; 56,7; 45,6; 40,4; 35,3; 34,1; 29,5; 27,4; 24,9; 20,7 dan 19,7 kDa (Lampiran 2).

Protein ESA adalah protein yang dilepaskan pada saat perkembangan *T. gondii* baik yang disekresikan (digunakan untuk perkembangan) maupun yang diekresikan keluar sel. Protein tersebut digunakan untuk proses penempelan, penembusan dan multiplikasi. Joiner dan Roos (2002) mengatakan bahwa stadium takizoit *T. gondii* paling sedikit mempunyai 3 organel penting sebagai organel sekretoris yaitu mikronema, rhoptri dan granula padat. Mikronema dan rhoptri terdapat pada bagian anterior sel sedang granula padat tersebar rata dalam sitoplasma. Mikronema sebagai eksositosis sampai perlekatan pada sel inang, sekresi rhoptri untuk invasi dan sekresi granula padat lebih berperan setelah parasit masuk ke sel inang. Protein mikronema dan rhoptri merupakan protein yang penting dalam invasi ke sel inang sedang protein granula padat dibutuhkan untuk replikasi intraseluler termasuk mempertahankan vakuola parasitoporus dimana parasit berada sampai terjadi lisis sel inang. Donahue *et al.* (2000) dan Miller *et al.* (2001) melaporkan 15 protein yang diekspresikan mikronema yaitu TgMIC1 sampai TgMIC12, TgAMA1, TgM2AP dan TgSUB1. Harper *et al.* (2004) dan Barragan *et al.* (2005) mengatakan bahwa sebagian besar protein tersebut berfungsi sebagai *adhesive protein* (protein untuk perlekatan), yang merupakan protein yang penting untuk proses invasi siklus lisis sel induk semang. Ikatan yang kuat dibutuhkan sehingga parasit masuk ke sel dan terjadi invaginasi (pelekukan) membentuk vakuola parasitoporus. Protein ESA selain protein mikronema adalah protein yang diekspresikan rhoptri. Ajioka dan Soldati (2007) melaporkan 24 protein yang diekspresikan rhoptri. Fungsi protein rhoptri adalah protein saat penembusan ke sel induk semang seperti protein dengan berat molekul 43 kD (ROP1), disamping ada beberapa fungsi yang belum diketahui. Protein Granule (GRA) adalah protein yang penting dalam modifikasi dan fungsi

vakuola parasitoporus. Kurang lebih 11 protein GRA yang diekspresikan takizoit *T. gondii* dan sebagian besar berhubungan dengan membran vakuola parasitoporus.

### **5.3 Pembuatan Antibodi terhadap protein ESA**

Kelinci merupakan hewan coba yang umum digunakan untuk pembuatan antibodi terhadap antigen tertentu. Setelah imunisasi dan dilanjutkan dengan booster, hasil pengukuran antibodi dengan ELISA menunjukkan peningkatan titer setelah sampai titer tertinggi, kelinci dikorbankan dan serum dipanen. Hasil pengukuran titer antibodi dengan ELISA setelah booster ke-4 didapatkan titer 3.104 (dengan titer awal sebelum imunisasi 1.127). Pengenceran tertinggi yang dapat digunakan *western blot* dapat dilihat pada Gambar 5.3.1



Gambar 5.3.1 Titer antibodi tertinggi terhadap protein ESA *T. gondii*

Kolum 1,2= PBS

Kolom 3,5,7,9,11= serum sebelum imunisasi,

kolom 4,6,8,10,12=serum sampel booster 4

A,B=pengenceran antigen 10  $\mu\text{g/ml}$

C,D=pengenceran antigen 5  $\mu\text{g/ml}$

E,F=pengenceran antigen 2,5  $\mu\text{g/ml}$

G,H= pengenceran antigen 1,25  $\mu\text{g/ml}$

3,4=pengenceran 100x, 5,6=pengenceran 300x

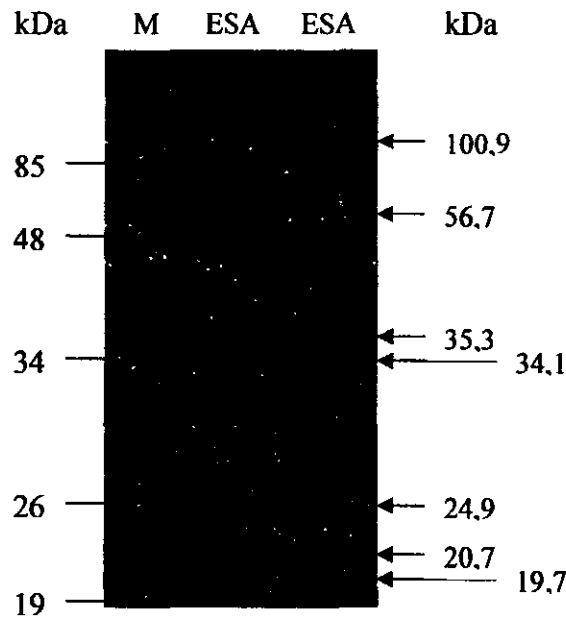
7,8=pengenceran 600x, 9,10=pengenceran 1200x

11,12=pengenceran 2400x

Dari Gambar 5.3.1 didapatkan bahwa konsentrasi protein ESA 1,25  $\mu\text{g/ml}$  mikrogram per ml dengan pengenceran 2400x masih menghasilkan titer tinggi sebesar 2.451. Hasil uji titer pengenceran tertinggi ini memungkinkan antibodi dalam serum dengan pengenceran 1:2400x dapat digunakan untuk proses *western blot* untuk mendeteksi protein ESA yang antigenik.

#### 5.4 Penentuan Protein ESA dengan *Western blot*

Hasil penentuan protein ESA yang antigenik menggunakan *western blot* dapat dilihat pada Gambar 5.4.1.



Gambar 5.4.1 Hasil Immunoblotting protein ESA *T. gondii*

M = Marker

← = Protein antigenik minor

← = Protein antigenik mayor

Dari Gambar 5.4.1 didapatkan 7 protein yang antigenik yaitu protein 100,9; 56,7; 35,3; 34,1; 24,9; 20,7 dan 19,7 kDa, dan protein 100,9; 56,7; 24,9; 20,7 dan 19,7 kDa merupakan protein antigenik mayor dengan hasil pita yang lebih tebal dibandingkan dengan yang lain. *Immunoblotting* adalah teknik deteksi protein menggunakan reaksi imunologi dengan menggunakan antibodi terhadap protein tertentu. Hasil protein mayor yang bersifat antigenik diharapkan dapat digunakan untuk proses pengebalan sehingga diharapkan bisa memproteksi infeksi *T. gondii* dari lingkungan.

Golkar *et al.* (2005) melaporkan penggunaan protein GRA2 pada mencit dan protein tersebut bersifat imunogenik. Bivas-Benita melaporkan bahwa protein GRA1 mampu

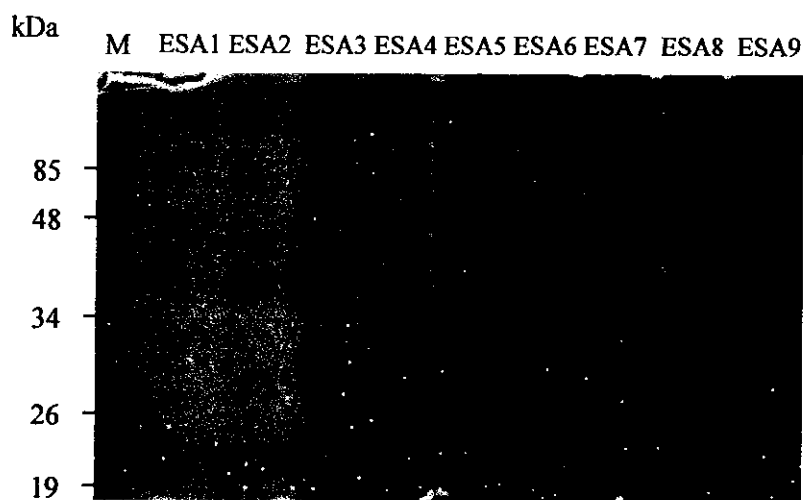
menginduksi respon imun yang mampu melawan infeksi *T. gondii* pada hewan coba karena mampu membangkitkan imun seluler dan humoral. Vercammen *et al.* (2000) melaporkan protein GRA1 yang disekresikan takizoit dan bradizoit mampu membangkitkan respon imun humoral pada mencit dan manusia. Menurut Scorza *et al.* (2003), vaksin DNA gra-1 dapat membangkitkan sel T CD8<sup>+</sup> yang sangat berperan mengendalikan infeksi akut terhadap *T. gondii*. Daryani *et al.* 2006 melaporkan penggunaan ESA dari mencit mampu memproteksi terhadap tantangan infeksi *T. gondii*.

Vercammen *et al.* (2000) melaporkan bahwa protein GRA1, GRA7 dan ROP2 mampu membangkitkan respon imun seluler dan humoral pada mencit. Vaksinasi dengan protein tersebut mampu mengurangi mortalitas pada fase akut tetapi juga mampu menghambat pertumbuhan parasit fase kronis. Beberapa peneliti sudah mencoba melihat potensi protein ekskresi-sekresi dari dense-granule (GRA1) (Scorza *et al.*, 2003), GRA4 (Desolme, *et al.*, 2000), protein ROP2 (Leyva dan Saavedra, 2001) dan ROP1 (Chen *et al.*, 2001). Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa proteksi yang berbeda terhadap toksoplasmosis pada mencit. Diantara kandidat vaksin yang ada, protein mikronema MIC3 (90 kDa) yang merupakan bagian protein ESA menunjukkan potensi yang tinggi karena mempunyai sifat melekat kuat pada sel inang baik pada stadium takizoit, bradizoit dan sporozoit dari *T. gondii* (Garcia-Reguet *et al.*, 2000; Cerede *et al.*, 2002).

### **5.5 Pemurnian Protein ESA Antigenik dengan Kromatografi Kolum dan Teknik Elusi**

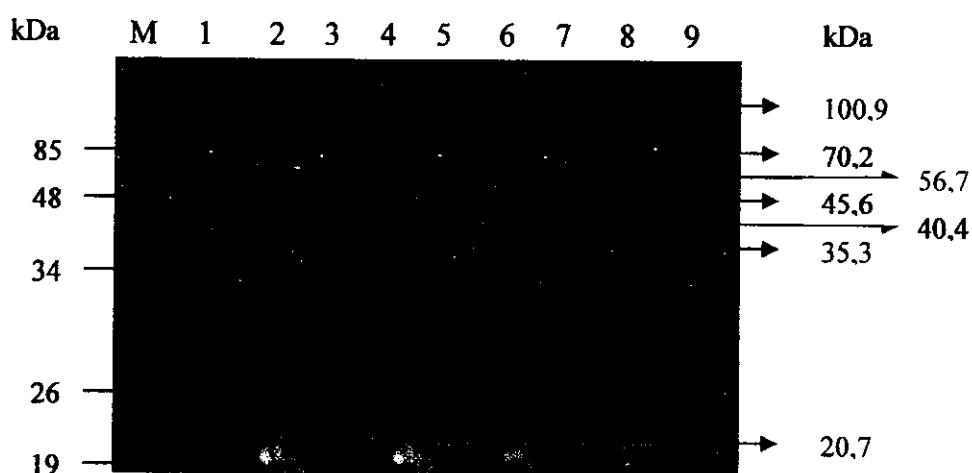
Protein ESA kemudian dipisahkan dengan kromatografi kolum menggunakan Sephadex G75 dengan harapan protein terpisah tunggal sehingga dapat digunakan untuk proses imunisasi. Hasil kromatografi kolum menggunakan Sephadex G75 dapat dilihat pada Gambar 5.5.1.





Gambar 5.5.1 Hasil SDS Page fraksi protein ESA *T. gondii* setelah pemisahan dengan kromatografi kolom  
M= Marker, ESA1-9 = Protein ESA hasil fraksi 1-9

Dari Gambar 5.5.1 terlihat masing-masing fraksi masih mengandung lebih dari 1 protein sehingga belum bisa digunakan untuk proses selanjutnya. Untuk mendapatkan protein tunggal, diperlukan perbaikan dalam proses kromatografi kolom yang meliputi panjang dan lebar kolom serta kecepatan alir. Sebagai alternatif pemisahan protein dilakukan dengan teknik elusi. Hasil pemisahan protein dengan teknik elusi dapat dilihat pada Gambar 5.5.2.



Gambar 5.5.2 Hasil SDS Page protein ESA *T. gondii* setelah pemisahan dengan teknik elusi  
M= Marker, ESA1-9 = Protein ESA hasil fraksi 1-9

Hasil pemisahan dengan teknik elusi (elektroelusi) didapatkan 3 protein antigenik tunggal yaitu (100,9; 35,3 dan 20,7 kDa), sedang protein 56,7 kDa masih bercampur dengan protein lain yang tidak antigenik (45,6 kDa). Pemisahan dengan elektroelusi merupakan teknik pemisahan yang mudah tetapi konsentrasi protein yang didapatkan rendah. Protein tersebut sebelum digunakan untuk imunisasi pada hewan harus melalui tahap pencucian berulang sehingga tidak toksik.

## BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN

### 6.1 Kesimpulan

1. Protein ESA yang diekspresikan *T. gondii* stadium takizoit secara *in vivo* adalah protein dengan berat molekul 125,5; 100,9; 70,2; 56,7; 45,6; 40,4; 35,3; 34,1; 29,5; 27,4; 24,9; 20,7 dan 19,7 kDa.
2. Protein ESA yang bersifat antigenik adalah protein dengan berat molekul 100,9; 56,7; 35,3; 34,1; 24,9; 20,7 dan 19,7 kDa, dan protein 100,9; 56,7; 24,9; 20,7 dan 19,7 kDa merupakan protein antigenik mayor.
3. Didapatkan 3 protein ESA *T. gondii* tunggal yang bersifat antigenik yaitu protein 100,9; 35,3 dan 20,7 kDa.

### 6.2 Saran

Pemisahan protein ESA *T. gondii* kromatografi kolom menggunakan Sephadex G75 perlu dilakukan modifikasi panjang dan lebar kolom serta kecepatan alir sehingga diharapkan dapat memisahkan protein tunggal dengan baik.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ajioka, J.W. and D. Soldati. 2007. *Toxoplasma, Molecular and Cellular Biology*. Horizon Bioscience. United Kingdom. 462-463, 479-480.
- Angus, C.W., D. Klivington-Evans, J.P. Dubey and J.A. Kovacs. 2000. Immunization with a DNA plasmid encoding the SAG1 (P30) protein of *Toxoplasma gondii* is immunogenic and protective in rodents. *J. Infect. Dis.* 181: 317-324.
- Barragan, A. F. Brossier and L.D Sibley. 2005. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* involves an interaction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) with the parasite adhesin MIC2. *Cell Microbiol.* 7. 561-568.
- Bivas-Benita, M., M. Laloup, S. Versteheyhe, J. Dewit, J. De Braekeleer, E. Jongert and G. Borchard. 2003. Generation of *Toxoplasma gondii* GRA1 protein and DNA vaccine loaded chitosan particles: preparation, characterization, and preliminary in vivo studies. *Int. J. Pharm.* 266. 17-27.
- Cerede, O., J.F. Dubremetz, D. Bout and M. Lebrun. 2002. The *Toxoplasma gondii* protein MIC3 requires pro peptide cleavage and dimerization to function as adhesin. *EMBO J.* 2:1-11.
- Chen, G., H. Guo, F. Lu and H. Zheng. 2001. Construction of a recombinant plasmid harbouring the rhostry protein 1 gen of *Toxoplasma gondii* and preliminary observation on DNA immunity. *Chin. Med. J.* 114:837-840.
- Cox, F.E.G. 1994. *Modern Parasitology*. A Textbook of Parasitology. 2<sup>nd</sup> ed. Blackwell Scientific Publications. Oxford.
- Denkers, E.Y and R.T. Gazzinelli. 1998. Regulation and function of T-cell mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin. Microbiol Rev.* 11 (4): 569-588.
- Desolme, B., M.N. Mevelec, D. Buzoni-Gatel and D. Bout. 2000. Induction of protective immunity against toxoplasmosis in mice by DNA immunization with a plasmid encoding *Toxoplasma gondii* GRA4 gene. *Vaccine.* 18: 2512-2521.
- Despoimmer, D.D., R.W. Gwadz and P.J. Hotez. 1995. *Parasitic Diseases*. 3<sup>rd</sup> ed. Springer-Verlag. New York.
- Donahue, C.G., V.B. Carruthers, S.D.Gilk and G.E. Ward. 2000. The *Toxoplasma* homolog of *Plasmodium* apical membrane antigen-1(AMA1) is a micronema secreted in response to elevated intracellular calcium levels. *Mol. Biochem. Parasitol.* 111. 15-30.
- Dubey, J.P. 1990. Status toxoplasmosis in sheps and goats in The United States. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 196: 259-262.
- Dubey, J.P., C.A. Brown, J.L. Carpenter and J.J. More III. 1992. Fatal toxoplasmosis in domestic rabbits in USA. *Vet. Parasitol.* 44:304-309.
- Dzierszynski, F., M. Nishi, L. Ouko and D.S. Roos. 2004. Dynamics of *Toxoplasma gondii* differentiation. *Eucaryotic cell*, 3 (4). 992-1003.
- Frenkel, J.K. 1990. Toxoplasmosis in human being. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 196:240-248.

- Fux, B., C.V.Rodrigues, R.W. Portela, N.M. Silva, C. Su, D. Sibley, R.W.A. Vitor and R.T. Gazzinelli. 2003. Role of cytokines and major histocompatibility complex restriction in mouse resistance to infection with a natural recombinant strain (Type I-III) of *Toxoplasma gondii*. *Infection and Immunity*. 71 (11). 6369-6401.
- Garcia-Reguet, N., M. Lebrun, M.N. Fourmaux, O. Mercereau-Puijalon, T. mann, C.J. Beckers, B. Samyn, J. Van Beeumen, D. Bout and J.F. Dubremetz. 2000. The microneme protein MIC3 of *Toxoplasma gondii* is a secretory adhesin that binds to both the surface of the host cells and the surface of the parasite. *Cell Microbiol*. 2:353-364.
- Ghaffar, A. 2001. Blood and tissue protozoa, MBIM 650/750 Medical Microbiology. URL: <http://www.med.sc.edu:85/parasitology/blood-proto.htm>
- Golkar, M., M.A. Shokrgozar, S. Rafati, M.R. Sadai and M. Assmar. Construction, expression and preliminary immunological evaluation of a DNA plasmid encoding the GRA2 protein of *Toxoplasma gondii*. *Iran Biomed. J*. 9. 1-8.
- Halonen, S.K. and L.M. Weiss. 2000. Investigation into the mechanism of gamma interferon-mediated inhibition of *Toxoplasma gondii* in murine astrocytes. *Infection and Immunity*, 68 (6). 3426-3430.
- Hanafiah, M., W. Nurcahyo dan Sumartono. 2003. Studi eksperimental sista jaringan *Toxoplasma gondii* secara in vivo. *J. Sains Vet*. XXI (2). 27-32.
- Harper, J.M., E.F. Hoff and V.B. Carruthers. 2004. Multimerization of the *Toxoplasma gondii* MIC2 integrin like A domain is required for binding to heparin and human cells. *Mol. Biochem. Parasitol*. 134. 201-212.
- Inoue, I., C.S. Leow, D. Husin, K. Matsuo and P. Darmani. 2001. A Survey of *toxoplasma gondii* in pigs in Indonesia. *Shoutheast Asian J. Trop. Med. Public Health*. 32(1): 38-40.
- Jenum, P.A., B. Stray-Pedersen, K.K. Melby, G. Kapperud, A. Whitelaw, A. Eskil and J. Eng. 1998. Incidence of *Toxoplasma gondii* infection in 35,940 pregnant women in Norway and pregnancy outcome for infected women. *J. Clin and Microbiol*. 36(10): 2900-2906.
- Jeon, S.H., and T.S. Yong. 2000. Serological observation of *Toxoplasma gondii* prevalence in *Apodemus agrarius*, a dominant species of field rodents in Korea. *Yonsei Med. J*. 41: 491-496.
- Johnson, A.M. 1990. *Toxoplasma*: Biology, pathology, immunology and treatment. In Long PL. Coccidiosis of man and domestic animals. CRC Press. United States.
- Joiner, K.A., and D.S. Roos. 2002. Secretory traffic the eucaryotic parasite *Toxoplasma gondii*: less is more. *J. Of Cell Biol*. 57 (4): 557-563.
- Lambourn, D.M., S.J. Jeffries and J.P. Dubey. 2001. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Harbour seals (*Phoca vitulina*) in Southern Puget Sound, Washington. *J. Parasitol*. 87(5);1197-1198.
- Lappin, M.R. 1994. Feline toxoplasmosis. *Whitham Focus*. 4(4): 2-8.

- Lee, Y.H., J.Y. Channon, T. matsuura, J.D. Schwartzman, D.W. Shin and L.H. kasper. 1999. Functional and quantitative analysis of splenic T cell immune responses following oral *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Exp. Parsitol.* 91: 212-221.
- Levine, N.D. 1985. *Veterinary Protozoology*. 1<sup>st</sup> ed. Iowa State University Press. Iowa.
- Leyva, R., P. Herion and R. Saavedra. 2001. Genetic immunization with plasmide DNA coding for the ROP2 protein of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Res.* 87:70-79.
- Malik, M.A., D.W. Dressen and A. Cruzz. 1990. Toxoplasmosis in shepp in Northeastern United States. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 196:263-265.
- Miller, S.A., E.M. Binder, M.J. Blackman, V.B. Carruthers and K. Kim. 2001. A conserved subtilisin-like protein TgSUB1 in microneme organelles of *Toxoplasma gondii*. *J. Biomol. Chem.* 276. 45341-45348.
- Mufasirin. 1999. Kloning dan ekspresi cDNA gen yang menyandi protein membran *Toxoplasma gondii* isolat Bogor. Tesis. Universitas gadjah Mada. Yogyakarta.
- Mullens, A. 1996. I think we have a problem in Victoria: MDs respond quickly to toxoplasmosis outbreak in BC. *Canadian Med. Assoc. J.* 154: 1721-1724.
- My-Hang Huynh, K.E. rabenau, J.M. Harper, W.L. Beatty, L.D. Sibley and V.B. Carruthers. 2003. Rapid invasion of host cells by *Toxoplasma* requires secretion of the MIC2-M2AP adhesive protein complex.
- Sasmita, R. 1993. Sigi prevalensi antibodi *Toxoplasma* pada kambing di Tuban dan Kediri, Jawa Timur. *Bulletin IPKHI.* 3:11-20.
- Sasmita, R. Dan E. Suprihati. 1993. Isolasi kista *Toxoplasma gondii* dari otak kucing di pasar dan rumah sakit Kotamadya Surabaya. *Bulletin IPKHI.* 3:2-10.
- Sciammarella, J. 2002. Toxoplasmosis. *Medicine J.* 3(7): 1-6.
- Scorza, T., S.Dsouza, M. Laloup, J. Dewit, J. De Braekeleer, H. Verschuere, M. Vercammen, K. Huygen and E. Jongert. 2003. A GRA1 DNA vaccine primes cytolytic CD8+ T cells to control acute *Toxoplasma gondii* infection. *Infect. Immun.* 71: 309-316.
- Sher, A., EY. Denkers and RT. Gazzinelli. 1995. Induction and regulation of host cell-mediated immunity by *Toxoplasma gondii*. *Ciba Found Symp.* 195: 95-109.
- Soulsby, E.J.L. 1986. *Helminths, Artropods and Protozoa of Domesticated Animals.* 7<sup>th</sup> ed. Bailliere Tindall. London.
- Sudjadi, 1988. Metode Pemisahan. Penerbit Kanisius. Yogyakarta.
- Sukthana, Y. 1999. Difference of *Toxoplasma gondii* antibodies between Thai and Australian pregnant women. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 30(1): 38-41
- Suwanti. 2005 Mekanisme peningkatan apoptosis trofoblas mencit terinfeksi *Toxoplasma gondii* melalui peningkatan sel desidua penghasil IFN- $\gamma$  dan TNF- $\alpha$  serta trofoblas penghasil FAS dan TNFR-1. Disertasi, Program Pasca Sarjana Unair. Surabaya.
- Vercammen, M., T. Scorza, K. Huygen, J. De Braekeleer, R. Diet, D. Jacobs, S. Saman and H. Verschuere. 2000. DNA vaccination with genes encoding *Toxoplasma gondii* antigens GRA1, GRA7 and ROP2 induces partially protective immunity against lethal challenge in mice. *Infect. Immun.* 68: 38-45.

- Wong, A., K.H. Tan, C.S. Tee and G.S.H. Yeo. 2000. Seroprevalence of cytomegalovirus, *Toxoplasma* and parvovirus in pregnancy. *Med. J.* 41(14): 151-155.
- Zimmerman, J.J., D.W. Dressen, W.J. Owen and G.W. Beran. 1990. Prevalence toxoplasmosis in swine from Iowa. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 196: 266-270.

**Lampiran 1. Hasil perhitungan statistik hubungan Berat Molekul (MR) dan Rf Protein Standard**

MODEL: MOD\_4.

Dependent variable.. MR Method.. CUBIC

Listwise Deletion of Missing Data

Multiple R .99768  
 R Square .99537  
 Adjusted R Square .98147  
 Standard Error .03412

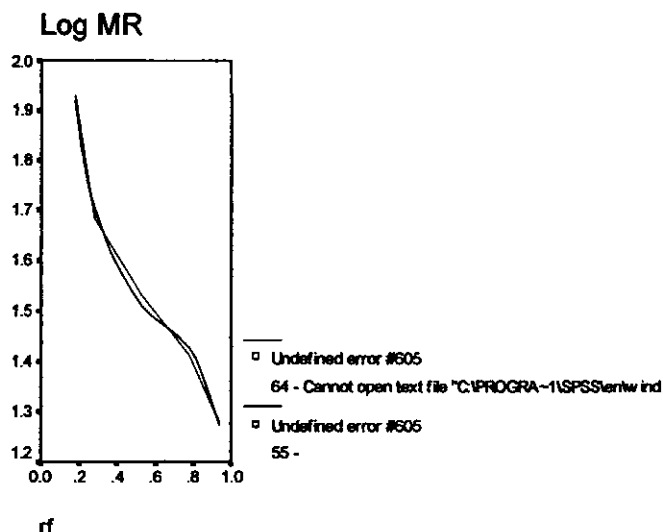
Analysis of Variance:

	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	3	.25014884	.08338295
Residuals	1	.00116396	.00116396

F = 71.63717 Signif F = .0866

----- Variables in the Equation -----

Variable	B	SE B	Beta	T	Sig T
RF	-4.632795	1.166614	-5.933273	-3.971	.1570
RF**2	7.191489	2.335641	10.342620	3.079	.1999
RF**3	-3.926128	1.387062	-5.473465	-2.831	.2162
(Constant)	2.529757	.162263		15.590	.0408



Dari hasil analisis didapatkan persamaan  $Y = -3,93X^3 + 7,19X^2 - 4,63X + 2,53$   
 (Y = Log BM, X = rf)



**Lampiran 2. Tabel berat molekul sampel protein ESA setelah dimasukkan persamaan BM**

<b>Protein</b>	<b>Rf</b>	<b>Y (Log BM)</b>	<b>Antilog Y (BM) dalam kDa</b>
<b>1</b>	0,1111	2,0987	<b>125,5</b>
<b>2</b>	0,1429	2,0037	<b>100,9</b>
<b>3</b>	0,2063	1,8463	<b>70,2</b>
<b>4</b>	0,2540	1,7533	<b>56,7</b>
<b>5</b>	0,3175	1,6587	<b>45,6</b>
<b>6</b>	0,3651	1,6067	<b>40,4</b>
<b>7</b>	0,4444	1,5475	<b>35,3</b>
<b>8</b>	0,4762	1,5318	<b>34,1</b>
<b>9</b>	0,6825	1,4698	<b>29,5</b>
<b>10</b>	0,7619	1,4379	<b>27,4</b>
<b>11</b>	0,8254	1,3968	<b>24,9</b>
<b>12</b>	0,9048	1,3159	<b>20,7</b>
<b>13</b>	0,9206	1,2950	<b>19,7</b>

Dari hasil perhitungan dengan persamaan  $Y = -3,93X^3 + 7,19X^2 - 4,63X + 2,53$  didapatkan 13 protein ESA yaitu 125,5; 100,9; 70,2; 56,7; 45,6; 40,4; 35,3; 34,1; 29,5; 27,4; 24,9; 20,7 dan 19,7 kDa.

## B. SINOPSIS PENELITIAN LANJUTAN

Penelitian tahun ke-2 merupakan kelanjutan penelitian tahun ke-1. Hasil penelitian tahun ke-1 berupa 3 protein tunggal yang bersifat antigenik (100,9 kDa, 35,2 kDa dan 20,7 kDa) adalah bahan untuk penelitian tahun ke-2.

### TUJUAN PENELITIAN

Mendapatkan protein ESA yang bersifat imunogenik dan bersifat protektif sebagai kandidat vaksin sub unit toksoplasmosis.

### METODE PENELITIAN

#### **Imunisasi dengan Protein ESA Antigenik**

Sejumlah 20 ekor mencit jantan umur 10 minggu dibagi menjadi 4 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor mencit. Kelompok 1 adalah kelompok yang diinjeksi dengan protein 100,9 kDa, kelompok 2 diinjeksi dengan protein 35,2 kDa, kelompok 3 diinjeksi dengan protein 20,7 kDa. Kelompok 4 adalah kelompok kontrol yang diinjeksi dengan NaCl fisiologis. Konsentrasi protein yang diinjeksikan adalah 1 µg protein ESA secara intramuskuler, dan 2 minggu setelah injeksi pertama dilakukan booster dengan dosis dan cara penyuntikan yang sama. Penyuntikan pertama menggunakan adjuvant komplit dan pada booster menggunakan adjuvant tidak komplit.

#### **Pengukuran Titer Antibodi dengan *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)**

Penentuan respons humoral (titer antibodi) dilakukan dengan metode *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Darah mencit yang telah dimunisasi kemudian diambil serumnya untuk pengukuran titer antibodi. Setiap sumuran plat mikro diisi sebanyak 100 µl

larutan Tag (protein ESA) dengan konsentrasi 10 µg/ml dalam bufer karbonat dan diinkubasi pada suhu 37°C semalam. Plat mikro dicuci 3 kali dengan bufer pencuci dan kemudian tiap sumuran ditambahkan 200 µl *blocking solution*. Setelah diinkubasikan pada suhu 37°C selama 1-2 jam, dilakukan 3 kali pencucian. Setiap sumuran kemudian diisi dengan 100 µl serum mencit yang telah diencerkan (pengenceran berseri), dan diinkubasikan pada 37°C selama 1 jam, serta diikuti dengan 3 kali pencucian. Selanjutnya setiap sumuran diisi dengan 100 µl konjugat (Santa Cruz, USA) dan diinkubasikan selama 1 jam, diikuti 3-4 kali pencucian. Sebanyak 150 µl substrat 4 nitrophenil (Sigma, USA) (dimasukkan ke dalam tiap sumuran, diinkubasikan pada 37°C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 50 µl larutan asam oksalat 2%. Titer antibodi dibaca pada *ELISA reader* (Mufasirin, 1999)

### **Uji Tantang**

Mencit yang telah diimunisasi dengan protein ESA kemudian diinjeksi dengan 10 takizoit secara intraperitoneal. Mencit kemudian dipelihara selama 2 minggu pasca imunisasi, daya hidup mencit dihitung dan mencit dikorbankan untuk dianalisis keberadaan takizoit dalam intraperitoneal. Takizoit dihitung dan hasil yang didapat dianalisis dengan statistik.

### **Rancangan Penelitian dan Analisis Data**

Rancangan penelitian ini adalah eksperimental laboratoris. Hasil imunisasi dan uji tantang dianalisis dengan ANOVA.