

SKRIPSI

**DETEKSI DINI TOKSOPLASMOSIS PADA OTAK
MENCIT (*Mus musculus*) DENGAN TEKNIK
POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)**



Oleh :

IRTYA SOFHI ANGGIA

NIM 060911216

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2013**

**DETEKSI DINI TOKSOPLASMOSIS PADA OTAK MENCIT
(*Mus musculus*) DENGAN TEKNIK *POLYMERASE
CHAIN REACTION* (PCR)**

Skripsi
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan
pada
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

oleh
IRTYA SOFHI ANGGIA
NIM 060911216

Menyetujui,
Komisi Pembimbing,



Dr. Mufasirin, drh., M.Si.
Pembimbing Utama



Prof. Dr. Laba Mahaputra, drh., M.Sc.
Pembimbing Serta

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi berjudul :

Deteksi Dini Toksoplasmosis pada Otak Mencit (*Mus musculus*) dengan Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Surabaya, 10 Juli 2013



Irtya Sofhi Anggia
NIM. 060911216

Telah dinilai pada Seminar Hasil Penelitian.
Tanggal : 26 Juni 2013

KOMISI PENILAI SEMINAR HASIL PENELITIAN

Ketua : Dr. Lucia Tri Suwarti, drh., M.P.
Sekretaris : Dr. Kusnoto, drh., M.Si.
Anggota : Dr. E. Bimo Aksono H.P., drh., M.Kes.
Pembimbing Utama : Dr. Mufasirin, drh., M.Si.
Pembimbing Serta : Prof. Dr. Laba Mahaputra, drh., M.Sc.

Telah diuji pada
Tanggal : 10 Juli 2013

KOMISI PENGUJI SKRIPSI

Ketua : Dr. Lucia Tri Suwanti, drh., M.P.
Anggota : Dr. Kusnoto, drh., M.Si.
Dr. E. Bimo Aksono H.P., drh., M.Kes.
Dr. Mufasirin, drh., M.Si.
Prof. Dr. Laba Mahaputra, drh., M.Sc.

Surabaya, 10 Juli 2013
Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga
Dekan,



Prof. Hj. Romziah Sidik, drh., Ph.D.
NIP. 195312161978062001

**EARLY DETECTION ON BRAIN OF MICE (*Mus musculus*) BY
POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) TECHNIQUE**

Irtya Sofhi Anggia

ABSTRACT

Toxoplasmosis is a zoonotic disease caused by intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. Toxoplasmosis related to the presence of toxoplasmosis encephalitis that is often caused of death in people with AIDS. This research was aimed to determine the presence of beginning period *T. gondii* in the brain of mice by *Polymerase Chain Reaction* (PCR). *Polymerase chain reaction* has been extensively used for diagnosis recently because of its very high sensitivity and specificity. Eighteen of mice Balb/C were used in the research, each mouse was infected intraperitoneally with 1×10^3 RH strain of *T. gondii* tachyzoites. Brain of mice samples were collected once every 12 hour. Brain samples were kept in -20°C , extraced DNA and then examined by PCR. In the process used PCR primers of specific *T. gondii* SAG-1. The PCR products were analyzed by electrophoresis. The data of the PCR product was analyzed descriptively. The result of the research showed that PCR 806 bp for band length indicated of *T. gondii* in the brain of mice. The result show that the presence of takizoit detected in the brain of mice on day 9 after infection.

Key words : Toxoplasmosis, brain, *Polymerase Chain Reaction*, SAG-1, early detection

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas rahmat serta hidayah yang diberikan kepada penulis hingga tersusunnya skripsi dengan judul **DETEKSI DINI TOKSOPLASMOSIS PADA OTAK MENCIT (*Mus musculus*) DENGAN TEKNIK *POLYMERASE CHAIN REACTION* (PCR).**

Skripsi ini dapat diselesaikan tidak lepas dari dorongan, bimbingan, arahan, saran dan koreksi dari para pembimbing, oleh karena itu dengan segala kerendahan hati, perkenankan penulis menghaturkan terima kasih yang tulus serta penghargaan setinggi-tingginya kepada yang terhormat :

Prof. Dr. H. Fasich, Apt. selaku Rektor Universitas Airlangga atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada penulis untuk mengikuti dan menyelesaikan Program Sarjana pada Fakultas kedokteran Hewan, Universitas Airlangga.

Prof. Romziah Sidik, drh., Ph.D. selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga dan para Wakil Dekan Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, atas kesempatan yang diberikan untuk mengikuti pendidikan Program Sarjana di Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.

Dr. Mufasirin, drh., M. Si., selaku dosen pembimbing pertama sekaligus dosen pembimbing penelitian atas bimbingannya yang tiada henti membimbing penulis dengan penuh pengertian, perhatian dan kesabaran dalam pelaksanaan

penelitian dari awal hingga akhir dan selalu memberi masukan ide, diskusi dan metode dalam penelitian ini.

Prof. Dr. Laba Mahaputra, drh., M.Sc. sebagai pembimbing kedua yang telah dengan penuh pengertian, perhatian dan kesabaran memberikan bimbingan.

Tim penguji, Dr. Lucia Tri Suwanti, drh., M. P., Dr. Kusnoto, drh., M.Si., dan Dr. E. Bimo Aksono H.P., drh., M.Kes., atas masukan, saran, dan koreksinya untuk perbaikan skripsi ini.

Dr. Ngakan Made Rai Widjaja, drh., M.S. selaku dosen wali dari penulis yang selalu memberi masukan, nasehat, dan membimbing dengan penuh ketulusan dan kesabaran.

Staf pengajar Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas wawasan keilmuan selama mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Staf Laboratorium Parasitologi Veteriner dan Laboratorium Biologi Molekuler Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, serta seluruh Staf Laboratorium Gastroenteritis Salmonella, *Institute Tropical Disease Centre*, atas bantuan selama proses penelitian berlangsung.

Kepada kedua orang tua saya tercinta, Bapak Kastolan, S.E. dan Ibu Hartatik, S.Pt. yang dengan penuh kasih sayang telah mendidik dan selalu memberi semangat baik moral maupun spiritual sehingga penulis terpacu untuk segera menyelesaikan skripsi ini. Adik Bagus Fitriani dan Rahma Putri Yunia yang penulis sayangi, yang telah memberikan banyak dukungan semangat dan doa sehingga penulis bisa menyelesaikan skripsi ini dengan baik.

Teman satu tim penelitian, Rieska Nursita atas kerjasamanya yang baik dan memberi dukungan serta semangat selama penelitian berlangsung baik dalam keadaan suka maupun duka.

Sahabat-sahabat tercinta, Zulfa Aisyah, Elok Mei, Riezka Nura, Nadia Habibah, Khoiru Indana, Chory Puji atas dukungan dan doa yang selama ini diberikan dalam mengerjakan skripsi ini.

Saudara-saudara satu kos, Eliza Zihni Zatihulwani, Maria Arvinda, Aulia Hanum, Febtalia Eka Putri, Yosephin Nova, Dini Lestari, Anindia Resbiana Puri, Sharita Aulia, dan Gaby Gultom yang selalu membantu dan menemani selama mengerjakan skripsi ini. Dan orang-orang terdekat yang tidak bisa penulis sebutkan satu per satu namanya yang senantiasa membuat suasana menjadi nyaman dan tenang dalam pengerjaan skripsi ini.

Akhirnya penulis menyadari bahwa tulisan ini jauh dari sempurna. Semoga hasil penelitian ini bermanfaat dan dapat menjadi informasi yang berharga bagi dunia Kedokteran Hewan.

Surabaya, 10 Juli 2013

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
HALAMAN IDENTITAS	iv
ABSTRACT	vi
UCAPAN TERIMA KASIH	vii
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
DAFTAR SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG	xv
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang Penelitian	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Landasan Teori	3
1.4. Tujuan Penelitian	4
1.5. Manfaat Penelitian	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Tinjauan <i>Toxoplasma gondii</i>	5
2.1.1. Klasifikasi	5
2.1.2. Morfologi <i>Toxoplasma gondii</i>	5
2.1.3. Siklus hidup	7
2.1.4. Penularan	12
2.2. Kejadian <i>Encephalitis</i> pada Toksoplasmosis	13
2.2.1. Epidemiologi <i>encephalitis toxoplasmosis</i>	13
2.2.2. Gejala klinis <i>encephalitis toxoplasmosis</i>	15
2.2.3. Diagnosis <i>encephalitis toxoplasmosis</i>	15

2.3. Tinjauan <i>Surface Antigen-1</i> (SAG-1)	17
2.4. Tinjauan <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	17
2.5. Tinjauan Otak Mencit	20
2.5.1. Bagian-bagian otak mencit	20
2.5.2. <i>Blood-Brain Barrier</i> (BBB)	23
2.5.3. Peredaran darah pada otak mencit	24
BAB 3 METODE PENELITIAN	26
3.1. Jenis Penelitian	26
3.2. Waktu dan Tempat Penelitian	26
3.3. Materi Penelitian	26
3.3.1. Bahan penelitian	26
3.3.2. Alat penelitian	27
3.4. Definisi Operasional Variabel	27
3.5. Metode Penelitian	28
3.5.1. Pengambilan sampel	28
3.5.2. Persiapan reagen isolasi DNA	28
3.5.3. Persiapan sampel	29
3.5.4. Ekstraksi DNA	29
3.5.5. Teknik <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	30
3.5.6. Analisis hasil PCR dengan elektroforesis gel agarosa	30
3.6. Pemeriksaan Cairan Intraperitoneal	31
3.7. Analisa Data (Deskriptif)	32
3.8. Kerangka Operasional	33
BAB 4 HASIL	34
4.1. Hasil Teknik <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	34
4.2. Hasil Pemeriksaan Cairan Intraperitoneal	35
BAB 5 PEMBAHASAN	37
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN	43
6.1. Kesimpulan	43
6.2. Saran	43
RINGKASAN	44
DAFTAR PUSTAKA	46
LAMPIRAN	53

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
3.1 Susunan dan posisi nucleotida untuk <i>Primer</i> SAG-1	27
4.2 Hasil pemeriksaan stadium takizoit <i>T. gondii</i> dengan uji cairan intraperitoneal pada 18 sampel mencit (<i>Mus musculus</i>).....	35

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1. Siklus hidup <i>Toxoplasma gondii</i>	8
2.2. Siklus hidup <i>Toxoplasma gondii</i> pada tubuh hospes definitif.....	11
2.3. Bagian-bagian otak mencit	20
2.4. Penampang melintang otak	21
2.5. Lapisan pembentuk cortex cerebri secara skematis	22
2.6. Lapisan penyusun meningen	22
2.7. <i>Blood brain barrier</i> otak	24
2.8. Sirkulasi darah pada otak mencit	25
3.1. Skema rancangan penelitian	33
4.1. Hasil elektroforesis PCR pada otak mencit (<i>Mus musculus</i>)	34
4.2. Hasil pemeriksaan natif	36
4.3. Hasil pewarnaan Giemsa	36

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Kadar <i>Deoxyribonucleic Acid</i> (DNA) pada otak mencit (<i>Mus musculus</i>)	54
2. <i>Gen bank X14080.1 "Toxoplasma gondii gene for major surface antigen P30"</i>	55
3. Nomor urutan basa nukleotida dalam <i>gen bank X14080.1 "Toxoplasma gondii gene for major surface antigen P30"</i>	58
4. Pengambilan sampel otak mencit	61

SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG

DNA	=	<i>Deoxyribo Nucleic Acid</i>
EDTA	=	<i>Ethylen Diamine Tetra Acid</i>
PCR	=	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
SAG-1	=	<i>Surface Antigen-1</i>
dNTPs	=	<i>Deoxynucleotide triphospates</i>
dNTP	=	<i>Deoxynucleatide Triphospate</i>
dATP	=	<i>Deoxyadenine Triphospate</i>
dCTP	=	<i>Deoxynucitosine Triphospate</i>
dGTP	=	<i>Deoxynguanine Triphospate</i>
dTTP	=	<i>Deoxytimine Triphospate</i>
TAE	=	<i>Tris Acetate EDTA</i>
WHO	=	<i>World Health Organisation</i>
HIV	=	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
AIDS	=	<i>Aquired Immuno Deficiency Syndrome</i>
MRI	=	<i>Magnetic Resonance Imaging</i>
CT scan	=	<i>Computed Tomography Scanning</i>
UV	=	<i>Ultra Violet</i>
µl	=	<i>microliter</i>
µm	=	<i>micrometer</i>
BW	=	<i>Buffer Lysis</i>
GPI	=	<i>glikosilfosfatisilinositol</i>
BBB	=	<i>Blood-Brain Barrier</i>
F	=	<i>Forward</i>
R	=	<i>Reverse</i>
Nt	=	<i>Nucleotide</i>
°C	=	<i>Celcius</i>
bp	=	<i>Basepair</i>

BAB 1

PENDAHULUAN

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Toksoplasmosis merupakan penyakit zoonosis yang disebabkan oleh parasit intraseluler *Toxoplasma gondii* yang menginfeksi manusia dan semua hewan berdarah panas (Carruthers dan Boothroyd, 2007; Craeye *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2009; Sibley *et al.*, 2009) dan menginfeksi serta berkembang di dalam sel yang berinti (Black dan Boothroyd, 2000). Parasit ini mempunyai hospes definitif kucing. Infeksi *T. gondii* sering menyebabkan penyakit pada otak dan sumsum tulang belakang, meskipun bagian tubuh lain termasuk mata, jantung, paru-paru, kulit, hati, dan saluran gastrointestinal juga dapat terinfeksi. Individu yang memperoleh infeksi *T. gondii* tidak menunjukkan gejala yang spesifik (Bastien, 2002). Sampai sekarang ini belum pernah dilaporkan kapan pertama kali *T. gondii* pada otak setelah hewan atau manusia terinfeksi *T. gondii*.

Pada hewan, infeksi *T. gondii* dapat mengurangi produktivitas ternak dan menjadi sumber penularan infeksi pada manusia (Dubey, 2008). Dalam dekade terakhir, Toksoplasmosis banyak mendapat perhatian berkaitan dengan adanya *encephalitis toxoplasmosis* yang seringkali menjadi penyebab kematian pada penderita *Acquired Immuno Deficiency Syndrome* (AIDS) (Hoyaranda, 1996).

Infeksi *T. gondii* pada otak dapat menyebabkan *encephalitis toxoplasmosis*. Gejala klinis *encephalitis toxoplasmosis* dapat berupa perubahan status mental (62%), sakit kepala (59%), dan demam (41%). Infeksi yang berkembang cenderung menimbulkan sakit kepala, serangan jantung, *convulsi*, *hemiparesis*,

aphasia, ataxia, dan kelumpuhan saraf kranial (Gandahusada, 2000; Nissapatorn *et al.*, 2003). Prevalensi Toksoplasmosis pada anak dengan *hydrocephalus* sebesar 10,6%, keterlambatan mental sebesar 44,6%, lesi di mata sebesar 44,6%, dan dengan gejala penyakit sistemik sebesar 9,5% (Gandahusada, 2000). Seroprevalensi Toksoplasmosis pada penderita AIDS yang pernah dilaporkan dari berbagai negara cukup bervariasi, yaitu : 10-40% di Amerika Serikat (Luft dan Remington, 1988), 21-51,2% di Malaysia, dan 22,4% di Thailand (Nissapatorn *et al.*, 2002; Nissapatorn *et al.*, 2003).

Toxoplasma gondii mempunyai 3 bentuk di dalam siklus hidupnya yaitu takizoit, bradizoit, dan ookista. Stadium takizoit ditemukan pada infeksi akut dalam berbagai jaringan tubuh termasuk otak (Levine, 1990). Pada takizoit terdapat protein permukaan yang berperan dalam perlekatan antara takizoit dengan sel target dari hospes yang akan diinfeksi yaitu *Surface Antigen 1* (SAG-1), yang mengandung *glikosilfosfatidilinositol* (GPI) (Subekti dan Arrasyid, 2006). Takizoit akan memasuki sel target dan melakukan multiplikasi di dalam sel secara aseksual (endodiogeni), kemudian beredar memasuki sel-sel lain seperti makrofag (Da Gama *et al.*, 2004; Courret *et al.*, 2006) atau sel dendritik (Courret *et al.*, 2006; Lambert *et al.*, 2006). Takizoit akan menyebar ke seluruh tubuh melalui pembuluh darah dan limfe (Lappin, 1994). Takizoit melalui aliran darah akan menginfeksi otak (Halonen *et al.*, 1998; Carruthers dan Suzuki, 2007).

Tingginya kasus Toksoplasmosis dan dampak negatif yang berakibat kerugian ekonomi maupun penurunan produksi, maka diagnosis menjadi hal yang sangat penting. Diagnosis Toksoplasmosis dapat ditegakkan berdasarkan gejala

klinis, pemeriksaan serologis dan menemukan parasit dalam jaringan tubuh penderita. Salah satu pemeriksaan Toksoplasmosis adalah dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yang merupakan suatu teknik perbanyakan *Deoxyribo Nucleic Acid* (DNA) secara enzimatis tanpa menggunakan organisme. Dengan teknik ini, DNA dapat dihasilkan dalam jumlah besar dengan waktu relatif singkat dengan sampel sedikit. Dari uraian latar belakang di atas perlu dilakukan penelitian kapan keberadaan awal Toksoplasmosis otak dengan menggunakan PCR. Diharapkan setelah diketahui secara dini infeksi pada otak, pengendalian penyakit termasuk pengobatan segera dapat dilakukan.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah pada hari ke berapa Toksoplasmosis pada otak mencit dapat dideteksi dengan teknik PCR?

1.3 Landasan Teori

Toxoplasma gondii dapat menginfeksi dan mereplikasi dalam setiap sel mamalia atau unggas yang berinti (Black dan Boothroyd, 2000). Proliferasi takizoit *Toxoplasma gondii* dapat ditemukan pada organ hati, paru-paru, jantung, mata, dan otak (Dharmana, 2007). Takizoit yang menginfeksi hospes akan berreplikasi dengan cepat dan menyebar ke seluruh tubuh hospes. *Toxoplasma gondii* secara mudah melewati barrier darah retina, otak dan plasenta (Filiceti dan Candolfi, 2004). *Toxoplasma gondii* dapat menginfeksi semua sel di otak (Carruthers dan Suzuki, 2007). *Toxoplasma gondii* mempunyai antigen

permukaan SAG-1 yang merupakan gen spesifik untuk stadium takizoit (Weiss dan Kim, 2000; Ajioka *et al.*, 2001; Hartati *et al.*, 2003; Kazemi *et al.*, 2007)

Diagnosis Toksoplasmosis secara molekuler dengan menggunakan metode PCR sudah banyak dilakukan (Susanto *et al.*, 2002; Priowidodo, 2003) memberi hasil yang sangat spesifik dan sensitif. *Polymerase Chain Reaction* memanfaatkan enzim DNA polymerase yang secara alami memang berperan dalam perbanyakan DNA pada proses replikasi. Teknik PCR dapat mendeteksi parasit dalam jumlah sedikit atau bahkan satu parasit saja dengan spesifitas tinggi dari berbagai sampel jaringan, sputum, cairan serebrospinal, darah, urin, dan feses (Smits dan Hartskeerl, 1995). Siklus PCR terdiri dari tiga tahap, yaitu denaturasi, *annealing* dan *extention* (Gumilar *et al.*, 2008).

1.4 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui keberadaan awal Toksoplasmosis pada otak mencit dengan teknik PCR.

1.5 Manfaat

- 1) Manfaat teoritis, hasil penelitian ini dapat mendukung pengetahuan perkembangan siklus hidup *Toxoplasma gondii*.
- 2) Manfaat praktis, hasil penelitian deteksi PCR pada Toksoplasmosis otak dapat digunakan untuk diagnosis dini Toksoplasmosis otak.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan *Toxoplasma gondii*

2.1.1 Klasifikasi

Toxoplasma gondii pertama kali ditemukan oleh Nicole dan Manceaux tahun 1908 pada limfa dan hati hewan pengerat *Ctenodactylus gundi* di Tunisia, Afrika dan pada seekor kelinci di Brazil (Black dan Boothroyd, 2000). *Toxoplasma gondii* dalam klasifikasi termasuk kelas Sporozoasida, karena berkembang biak secara seksual dan aseksual yang terjadi secara bergantian (Levine, 1990). Menurut Dubey (2007), klasifikasi parasit sebagai berikut :

Kingdom	: Protista
Filum	: Apicomplexa
Kelas	: Sporozoa
Sub kelas	: Coccidia
Ordo	: Eucoccidia
Famili	: Toxoplasmatidae
Genus	: <i>Toxoplasma</i>
Spesies	: <i>Toxoplasma gondii</i>

2.1.2 Morfologi *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii merupakan protozoa obligat intraseluler, mempunyai tiga bentuk yaitu takizoit (bentuk proliferasif), kista (berisi bradizoit) dan ookista (berisi sporozoit) (Homan *et al.*, 2000).

Bentuk takizoit menyerupai bulan sabit dengan ujung yang runcing dan ujung lain agak membulat. Ukuran panjang 4-8 μm , lebar 2-4 μm dan mempunyai

selaput sel, satu inti yang terletak di tengah bulan sabit dan beberapa organel lain seperti mitokondria dan badan golgi. Takizoit tidak mempunyai kinetoplas dan sentrosom serta tidak berpigmen. Bentuk ini terdapat di dalam tubuh hospes perantara seperti burung dan mamalia termasuk manusia dan kucing sebagai hospes definitif. Takizoit ditemukan pada infeksi akut dalam berbagai jaringan tubuh. Takizoit dapat memasuki tiap sel yang berinti dan ditemukan dalam jaringan selama masa akut dari infeksi (Levine, 1990).

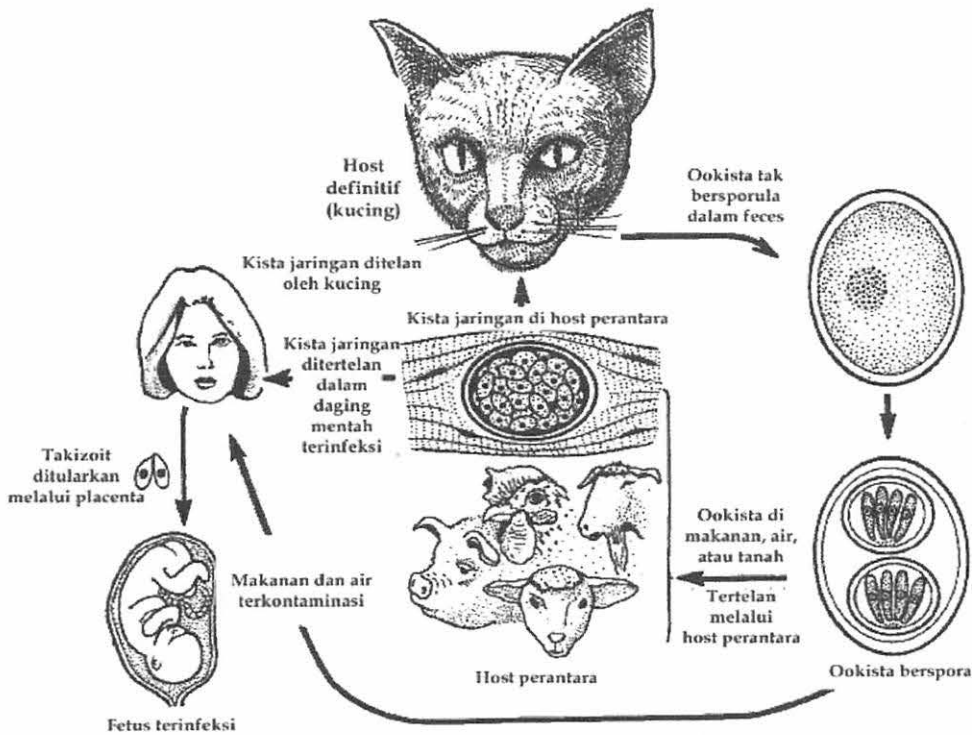
Kista *T. gondii* dibentuk di dalam sel hospes bila sistem pertahanan hospes terbentuk. Ukuran kista berbeda-beda, ada yang berukuran kecil dan hanya berisi beberapa bradizoit. Kista dalam tubuh hospes dapat ditemukan seumur hidup terutama di otak, otot jantung, dan otot bergaris (Krahenbuhl dan Remington, 1982). Kista terbentuk bila infeksi terjadi kronis, takizoit dalam jaringan akan membelah secara lambat dan disebut bradizoit. Bradizoit hidup pada suhu 36°C-37°C dalam jaringan hidup namun dapat bertahan sampai suhu -4°C selama 3 minggu. Kista tersebut akan mati, apabila dalam keadaan beku pada suhu -15°C selama 3 hari dan -20°C selama dua hari (Chahaya, 2003).

Ookista berbentuk lonjong, berukuran 11-14 x 9-11 µm. Ookista mempunyai dinding dan membelah menjadi dua sporoblas. Pada perkembangan selanjutnya kedua sporoblas membentuk dinding dan menjadi sporokista. Masing-masing sporokista tersebut berisi 4 sporozoit yang berukuran 8 x 2 µm. Ookista terbentuk di sel mukosa usus kucing dan dikeluarkan bersamaan dengan feses kucing. Di dalam epitel usus kucing, berlangsung siklus aseksual atau skizogoni dan siklus seksual atau gametogeni dengan hasil akhir ookista

yang dikeluarkan bersama feses kucing. Kucing yang terinfeksi *T. gondii* akan mengeluarkan jutaan ookista. Ookista akan bersporulasi di lingkungan dan bila ookista ini tertelan oleh hospes perantara seperti manusia, sapi, kambing termasuk kucing sebagai hospes definitif maka pada berbagai jaringan hospes perantara akan dibentuk kelompok tropozoit yang membelah secara aktif. Pada hospes perantara tidak dibentuk stadium seksual tetapi dibentuk stadium istirahat yaitu kista. Bila kucing makan tikus yang mengandung kista maka terbentuk kembali stadium seksual di dalam usus halus kucing tersebut (Levine, 1990).

2.1.3 Siklus Hidup

Siklus hidup dari *T. gondii* secara prinsip terbagi atas dua yaitu siklus seksual dan aseksual. Siklus hidup secara seksual dan aseksual terjadi pada hospes definitif, sedangkan pada hospes perantara hanya terjadi siklus aseksual. Siklus hidup seksual terjadi karena ada peleburan gamet yang masing-masing berisi kromosom haploid. Perkembangan aseksual terjadi karena pembelahan vegetatif yaitu organisme berkembang dengan membelah diri. Pada hospes definitif yaitu Felidae, terjadi perkembangan pada enteroepitelial dan ekstraintestinal. Pada mamalia atau hospes perantara lain, siklus hidup hanya ekstraintestinal. Siklus hidup enteroepitelial berarti terjadi siklus kehidupan dalam epitel usus, sedangkan siklus ekstraintestinal berarti terjadi siklus hidup di luar epitel usus (Robert dan Janovy, 2000).



Gambar 2.1 Siklus hidup *Toxoplasma gondii*. Sumber : Dubey *et al.* (1998).

Siklus hidup pada hospes definitif dimulai dengan tertelannya ookista yang telah bersporulasi dan di usus ookista akan terjadi ekskistasi. Ekskistasi merupakan proses terlepasnya sporozoit dari ookista karena efek mekanik dan enzimatik di dalam saluran pencernaan hospes. Hal serupa juga terjadi apabila yang tertelan adalah kista jaringan dari mangsa (untuk hospes definitif dan hospes perantara predator) ataupun pangan hewani (untuk manusia). Adanya proses mekanis dan enzimatik dalam saluran pencernaan mengakibatkan bradizoit keluar. Sporozoit ataupun bradizoit kemudian menginfeksi epitel usus dari hospes definitif ataupun hospes perantara dan berubah menjadi takizoit untuk mengawali perkembangan siklus seksual dan aseksual (Carruthers, 2002; Dzierszinski *et al.*, 2004).

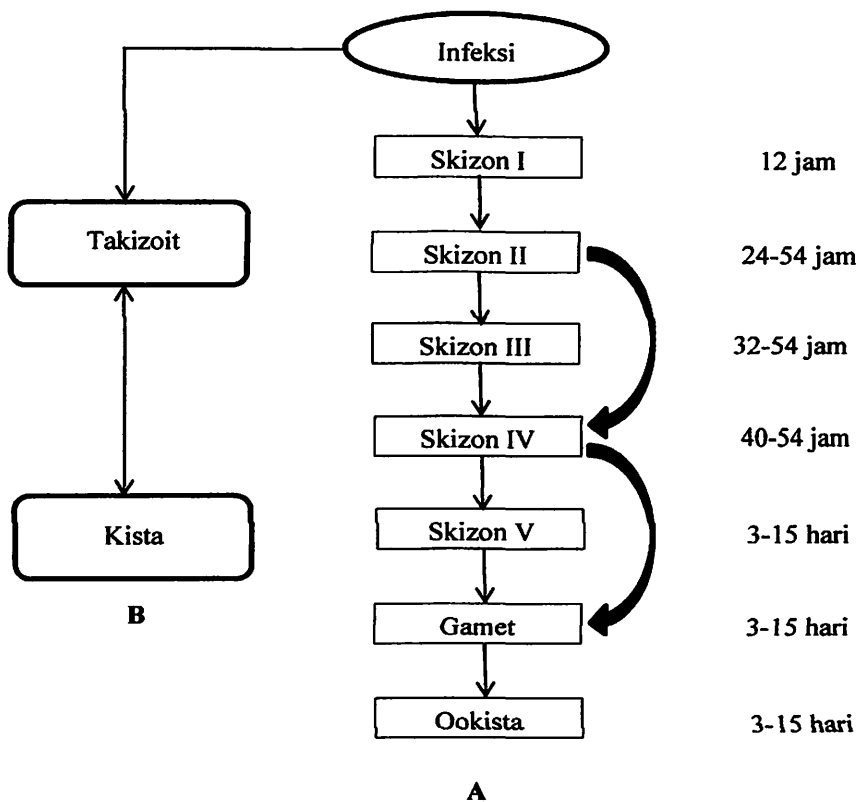
Pada epitel dari saluran usus hospes definitif tersebut, *T. gondii* mengalami perkembangan aseksual (skizogoni) maupun seksual (gametogoni) yang diakhiri dengan terbentuknya ookista. Interval waktu sejak terjadi infeksi secara oral sampai keluarnya ookista disebut periode prepaten. Apabila yang tertelan adalah ookista maka periode prepaten sekitar 18 hari atau lebih. Di sisi lain apabila yang tertelan adalah takizoit maka periode prepaten sekitar 13 hari atau lebih. Sebaliknya, jika yang tertelan adalah kista jaringan, maka periode prepaten sekitar 3-10 hari (Dubey, 2002).

Setelah sporozoit menginfeksi epitel usus kucing, maka dalam waktu 12 jam mulai terbentuk skizon generasi pertama. *Toxoplasma gondii* memiliki 5 generasi skizon selama siklus aseksual dalam tubuh hospes definitif. Generasi pertama skizon (skizon tipe A) terjadi 12 jam setelah infeksi, dimana sporozoit berkembang dalam suatu meron dan menghasilkan 2-3 merozoit. Merozoit tersebut kemudian akan keluar dari epitel dan menginfeksi epitel baru untuk berkembang menjadi skizon tipe B (skizon generasi kedua) yang berisi 2-30 merozoit. Skizon tipe B terbentuk kira-kira 24-54 jam setelah infeksi. Demikian seterusnya sampai terbentuk skizon tipe D dan E (skizon generasi keempat dan kelima). Skizon tipe D berisi sekitar 2-35 merozoit sedangkan skizon tipe E berisi 4-24 merozoit (Dubey *et al.*, 1998).

Setelah terbentuk skizon tipe D dan E, selanjutnya dimulai siklus seksual. Belum diketahui secara pasti merozoit dari skizon generasi berapa yang membentuk mikrogamet dan makrogamet. Namun demikian, diperkirakan merozoit dari skizon tipe D dan E yang menjadi awal pembentukan mikrogamet

dan makrogamet. Mikrogamet bergerak secara aktif dengan flagela menuju makrogamet dengan menembus epitel serta melakukan fertilisasi sehingga terbentuk zigot yang selanjutnya berkembang menjadi ookista. Ookista akan keluar bersama kotoran kucing dan mengalami sporulasi (pematangan) di lingkungan luar sekitar 1-5 hari setelah keluar bersama kotoran kucing. Secara umum, kucing dapat menghasilkan 360 juta ookista dalam satu hari. Ookista tersebut akan terus diproduksi dan dikeluarkan selama 4-6 hari (Dubey, 2002).

Siklus aseksual pada tubuh kucing juga terjadi pada sel berinti di luar epitel usus. Sporozoit yang menginfeksi sel berinti selain usus akan berkembang menjadi takizoit dalam kurun waktu 24 jam setelah infeksi. Selanjutnya, takizoit tersebut membelah diri secara endodiogeni (Black dan Boothroyd, 2000; Morissete dan Sibley, 2002; Dzierszinski *et al.*, 2004). Setelah takizoit memperbanyak diri, maka takizoit tersebut akan menghancurkan sel tempat berkembang untuk keluar dan menginfeksi sel lain di sekitar. Siklus aseksual dimulai lagi dengan pembelahan endodiogeni. Pada kucing maupun hospes perantara lain, kista jaringan mulai terbentuk setelah 10 hari pascainfeksi atau 2-3 minggu pascainfeksi. Kista jaringan tersebut akan bertahan lama dan akan pecah pada saat sistem kekebalan host menurun sehingga bradizoit terbebas dan mengalami reaktivasi menjadi takizoit (Black dan Boothroyd, 2000; Dubey, 2002).



Gambar 2.2 Siklus hidup *Toxoplasma gondii* pada tubuh hospes definitif. A = Siklus enteroepitelial pada usus kucing, B = Siklus Ekstraintestinal pada kucing. Sumber : Dubey *et al.* (1998).

Siklus hidup pada hospes perantara, *T. gondii* hanya mengalami perkembangan aseksual dengan dua bentuk parasit yang berbeda. Masing-masing adalah bentuk takizoit dan kista yang berisi bradizoit. Takizoit merupakan bentuk multiplikatif aktif dan cepat yang berkaitan dengan manifestasi klinis toksoplasmosis akut. Bradizoit merupakan stadium multiplikatif lambat dan relatif *non invasif* dengan membentuk kista yang berkaitan dengan infeksi kronis. Hospes perantara *T. gondii* tidak hanya terbatas pada mamalia darat tetapi juga mamalia air seperti ikan lumba-lumba dan ikan paus (Caruthers, 2002; Resendes *et al.*, 2002). Hospes perantara lain adalah bangsa unggas (*aves*) baik unggas

darat, unggas air dan unggas lain baik liar maupun yang terdomestikasi (Dubey, 2002; Dubey *et al.*, 2002).

Ookista yang dikeluarkan oleh hospes definitif akan mengalami sporulasi sehingga terbentuk dua sporokista yang masing-masing berisi empat sporozoit (Levine, 1985). Ookista yang telah bersporulasi tersebut merupakan salah satu stadium infeksi yang dapat menginfeksi hospes perantara seperti burung, mamalia dan juga manusia. Proses perkembangan dan siklus hidup takizoit dalam tubuh hospes perantara serupa dengan siklus hidup aseksual yang terjadi pada tubuh kucing. Perbedaan yang ada hanya terbatas pada lokasi kista yang umum dijumpai pada masing-masing hewan. Perbedaan lokasi jaringan yang dominan mengandung kista dipengaruhi beberapa faktor di antaranya adalah rute infeksi, sistem imun dan perbedaan struktur seluler dan molekuler masing-masing hewan dan manusia. Siklus aseksual yang terjadi pada usus hospes perantara berbeda dengan siklus aseksual pada usus kucing. Siklus aseksual pada usus hospes perantara serupa dengan siklus aseksual pada sel berinti selain epitel usus dalam tubuh kucing (Dubey *et al.*, 1998).

2.1.4 Penularan

Toxoplasma gondii ditransmisikan ke manusia melalui berbagai cara, seperti melalui plasenta dari ibu ke janin jika ibu menerima infeksi primer selama kehamilan, mengkonsumsi daging mentah atau kurang matang yang mengandung kista jaringan atau takizoit. Pada orang yang bekerja di laboratorium dan bekerja dengan hewan percobaan, infeksi *T. gondii* terjadi melalui jarum dan peralatan

laboratorium lain yang terkontaminasi. Penularan *T. gondii* dapat melalui transplantasi organ dari donor yang menderita toksoplasmosis laten, dan transfusi darah lengkap dari donor yang terinfeksi (Kasper, 2001; Hiswani, 2003; Sibley *et al.*, 2009). Penularan ke manusia dapat melalui ookista yang berspora yang terdapat pada feses kucing (Knapen dan overgaauw, 2008).

Bila ookista tertelan oleh mamalia seperti domba, babi, sapi dan tikus serta ayam atau burung, maka di dalam tubuh hospes perantara akan terjadi daur aseksual yang menghasilkan takizoit. Takizoit akan membelah, kecepatan membelah takizoit ini berkurang secara berangsur kemudian terbentuk kista yang mengandung bradizoit. Jika hospes perantara yang dimakan kucing mengandung kista *T. gondii*, maka masa prepaten 2-3 hari, tetapi bila ookista yang tertelan, maka masa prepaten 20-24 hari (Levine, 1990). Selanjutnya, parasit akan menyebar baik dalam organ pencernaan (saluran usus) maupun berbagai organ lain di seluruh tubuh melalui pembuluh limfe maupun pembuluh darah (Robert dan Janovy, 2000; Channon *et al.*, 2000).

2.2 Kejadian *Encephalitis* pada Toksoplasmosis

2.2.1 Epidemiologi *encephalitis toxoplasmosis*

Toksoplasmosis ditemukan hampir di seluruh dunia. Sumber penularan utama adalah kucing, yang mengeluarkan ookista bersama tinja. Ookista ini adalah bentuk yang infeksiif dan dapat menular pada manusia atau hewan (Tenter *et al.*, 2000; Dubey, 2004).

Prevalensi toksoplasmosis bervariasi dan dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu : kepekaan spesies, perbedaan jumlah sampel, distribusi geografis, metode diagnosis, dan faktor resiko (adanya ookista dari kucing terinfeksi) (Robert dan Janovy, 2000; Nissapatorn *et al.*, 2003). Dilaporkan bahwa prevalensi toksoplasmosis pada penduduk di Surabaya menunjukkan 8,9 %. Prevalensi toksoplasmosis di Rumah Sakit Dr. Cipto Mangunkusumo Jakarta, pada kasus abortus sebesar 67,8%, pada pasien dengan sejarah satu atau lebih abortus atau lahir mati, masing-masing adalah 21,5% dan 22,8%. Pada orang dewasa dan anak-anak yang menunjukkan *chorioretinitis*, prevalensi toksoplasmosis sebesar 60%. Prevalensi toksoplasmosis pada anak dengan *hydrocephalus* sebesar 10,6%, anak dengan keterlambatan mental sebesar 44,6%, pada anak dengan lesi di mata sebesar 44,6%, dan anak dengan gejala penyakit sistemik sebesar 9,5% (Gandahusada, 2000).

Penyebaran *T. gondii* sangat luas, hampir di seluruh dunia, baik pada manusia maupun pada hewan. Sekitar 30% dari penduduk Amerika Serikat positif terhadap pemeriksaan serologis, hal ini menunjukkan bahwa pernah terinfeksi pada suatu saat dalam masa hidupnya (Levine, 1990). Kista *T. gondii* akan mati jika daging dalam keadaan beku pada suhu -15°C selama tiga hari dan pada suhu -20°C selama dua hari. Daging yang dipanaskan dengan suhu 65°C selama empat sampai lima menit atau lebih maka secara keseluruhan daging tidak mengandung kista aktif, demikian juga hasil daging siap konsumsi yang diolah dengan garam dan nitrat (WHO, 1979).

2.2.2 Gejala klinis *encephalitis toxoplasmosis*

Gejala pada penderita *encephalitis toxoplasmosis* adalah nyeri kepala yang dapat menunjukkan adanya perkembangan *encephalitis* dan terbentuk abses sebagai akibat dari terjadi infeksi *T. gondii*. Keadaan ini hampir selalu merupakan suatu kekambuhan akibat kekebalan yang menurun pada penderita yang semasa muda telah terinfeksi dengan parasit ini. Gejala cepat sekali berkembang dan penderita mungkin akan mengalami kejang dan penurunan kesadaran. Gejala klinis *encephalitis toxoplasmosis* dapat berupa perubahan status mental (62%), sakit kepala (59%), dan demam (41%). Infeksi yang berkembang cenderung menimbulkan sakit kepala, serangan jantung, *convulsi*, *hemiparesis*, *aphasia*, *ataxia*, dan kelumpuhan saraf kranial (Gandahusada, 2000; Nissapatorn *et al.*, 2003).

2.2.3 Diagnosis *encephalitis toxoplasmosis*

Akurasi diagnosis toksoplasmosis mempunyai arti penting dalam penatalaksanaan pasien karena pengobatan memerlukan waktu lama, mahal dan kemungkinan efek toksik pada hospes (Gandahusada, 2000).

Diagnosis toksoplasmosis secara klinis sulit ditegakkan karena gejala tidak spesifik. Untuk meyakinkan diagnosis dapat dilakukan isolasi parasit dengan menginokulasi jaringan pada mencit atau hewan coba yang peka (Montoya dan Liesenfeld, 2004). Lesi *encephalitis toxoplasmosis* sulit dibedakan dengan lesi lain, meskipun demikian gambaran yang dianggap khas yaitu lesi otak tunggal atau *multiple* di bagian tepi menyerupai cincin, dengan lokasi tersering pada basal

ganglia sebesar 75%, thalamus, periventrikular, dan corticomedullary junction (subkortikal) disertai edema perifokal dan berdiameter sampai 3 cm. Pemeriksaan tinja pada kucing merupakan salah satu metode yang mudah untuk menentukan adanya ookista *T. gondii*, namun relatif tidak sensitif dan spesifik. Kucing yang seropositif biasanya tidak mengeluarkan ookista (Nelson dan Couto, 2003).

Diagnosis dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) untuk deteksi DNA, banyak digunakan pada tokoplasmosis kongenital dan individu *immunocompromised* karena cukup sensitif dan spesifik (Roberts dan Janovy, 2000; Montoya dan Liesenfeld, 2004). Salah satu gen *T. gondii* yang dapat digunakan sebagai target untuk pengembangan diagnosis adalah SAG-1, karena berperan dalam kehidupan parasit, bersifat imunogenik dan dominan (Sri Hartati, 2011).

Pemeriksaan pada pasien *encephalitis toxoplasmosis* memperlihatkan adanya lesi otak multipel dengan cincin dan disertai edema vasogenik pada jaringan disekitarnya (Josifal, 2004). *Encephalitis toxoplasmosis* jarang muncul dengan lesi tunggal atau tanpa lesi. *Magnetic Resonance Imaging* (MRI) lebih sensitif dibanding CT scan, sehingga teknik ini lebih disukai, khususnya pada pasien-pasien tanpa gangguan neurologik fokal. Pasien-pasien dengan hanya satu lesi atau tidak tampak pada CT scan harus dilakukan MRI untuk menentukan apakah lebih dari satu lesi muncul (Sze, 1999). Lesi ini harus didiagnosis banding dengan limfoma Sistem Saraf Pusat (SSP) dan *criptococcus* (Berger *et al.*, 2000).

2.3 Tinjauan *Surface Antigen-1* (SAG-1)

Isolasi dan karakterisasi protein permukaan *T. gondii* isolat lokal untuk produksi antigen rekombinan sangat penting untuk berbagai macam studi terutama untuk pengembangan metode diagnosa molekuler, bahkan sebagai kandidat vaksin. Antigen permukaan SAG-1 (P30) *T. gondii* merupakan protein membran takizoit yang diduga berperan dalam proses perlekatan dengan sel hospes yang diinfeksi (Mineo dan Kasper, 1994). Antigen SAG-1 merupakan protein yang penting sebagai dasar deteksi imunologis karena : 1) SAG-1 merupakan protein/ antigen permukaan *T. gondii* yang paling predominan dan memegang peran penting dalam proses adhesi pada sel inang/ infeksi. Serum binatang/ manusia yang terinfeksi *T. gondii* mengandung antibodi terhadap SAG-1, 2) SAG-1 memiliki potensial sebagai vaksin, 3) *sequence* gen SAG-1 sudah ditentukan sehingga dapat dibuat primer untuk amplifikasi *in vitro*, 4) Gen SAG-1 tidak mengandung intron sehingga amplifikasi dapat dilaksanakan menggunakan DNA genomik sebagai matriks dalam reaksi PCR. Protein SAG-1 rekombinan sangat cocok untuk pengembangan diagnosa sebagai deteksi antibodi IgG dan IgM karena SAG-1 dikenal oleh IgG dan IgM pada manusia yang menderita toksoplasmosis (Tomavo, 1996).

2.4 Tinjauan *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah suatu teknik sintesis dan amplifikasi asam deoksiribosnukleat (DNA) secara *in vitro*. *Polymerase Chain Reaction* pertama kali dikembangkan pada tahun 1985 oleh Karry Mullis

(Handoyo dan Rudiretna, 2000). Empat komponen utama dalam PCR adalah : 1) *template* untai ganda yang mengandung DNA target (DNA yang akan diamplifikasi), 2) enzim DNA polimerase yaitu enzim yang berfungsi sebagai katalis dalam reaksi sintesis rantai DNA, 3) deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP), yang terdiri atas dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 4) sepasang *primer* oligonukleotida yaitu suatu sekuen oligonukleotida pendek (15–25 basa nukleotida) yang digunakan untuk mengawali sintesis rantai DNA. Komponen lain yang juga berperan penting adalah *buffer* PCR (Yuwono, 2006).

Prosedur PCR meliputi tiga tahap yang berurutan, yaitu tahap denaturasi *template*, tahap *annealing* (pengikatan) pasangan *primer* pada masing-masing untai DNA target dan tahap *extention* (polimerase) yang dikatalis oleh enzim DNA polimerase yang tahan panas. *Template* DNA untai ganda didenaturasi dengan panas pada suhu 94°C selama 2 menit sehingga kedua untai DNA terpisah. Setelah itu, memasuki tahap *annealing* (pengikatan) pasangan *primer* pada suhu 60°C selama 1 menit, sehingga kedua *primer* berikatan dengan masing-masing untai DNA target. Jumlah *primer* lebih banyak dari *template* sehingga kemungkinan DNA *template* berikatan dengan *primer* lebih besar daripada DNA yang berikatan dengan DNA *template* satu sama lain. Setelah *primer* berikatan dengan DNA target, DNA polimerase akan mengkatalis penambahan nukleotida yang dilakukan pada tahap *extention* (polimerasi) pada suhu 72°C selama 7 menit. Setelah inkubasi selama waktu tertentu, suhu dinaikkan kembali untuk memisahkan untai ganda yang terbentuk. Suhu kemudian diturunkan kembali sehingga kedua *primer* berikatan dengan target DNA yang kini jumlahnya dua

kali lebih besar dari jumlah semula dan seluruh proses dilakukan berulang kali. Hasil sintesis akan berfungsi sebagai template untuk *primer* bebas dalam siklus selanjutnya, sehingga karena PCR dilakukan berulang-ulang hingga 35 siklus, maka fragmen DNA akan diamplifikasi secara eksponensial. Setiap siklus membutuhkan kurang lebih 5 menit, sehingga seluruh proses hanya memerlukan beberapa jam (Baxter *et al.*, 1993).

Setelah amplifikasi, produk PCR dielektroforesis menggunakan agarosa yang mengandung Ethidium Bromida (EtBr). Setelah elektroforesis, fragmen DNA dilihat di bawah sinar ultraviolet (Sambrook *et al.*, 1989).

Polymerase Chain Reaction untuk mendeteksi DNA *T. gondii* dapat berguna untuk diagnosis toksoplasmosis. Diagnosis secara molekuler dengan menggunakan metode PCR sebagai metode diagnosis toksoplasmosis ternyata memberikan akurasi yang tinggi (spesifisitas 100% dan sensitivitas 97,4%) (Chiabchalard *et al.*, 2005). *Polymerase Chain Reaction* dapat digunakan untuk mendeteksi *T. gondii* pada pasien HIV melalui cairan bronkoalveolar dan cairan vitreus atau *aqueous humor* dari penderita toksoplasmosis yang terinfeksi HIV (Sabauste, 2004).

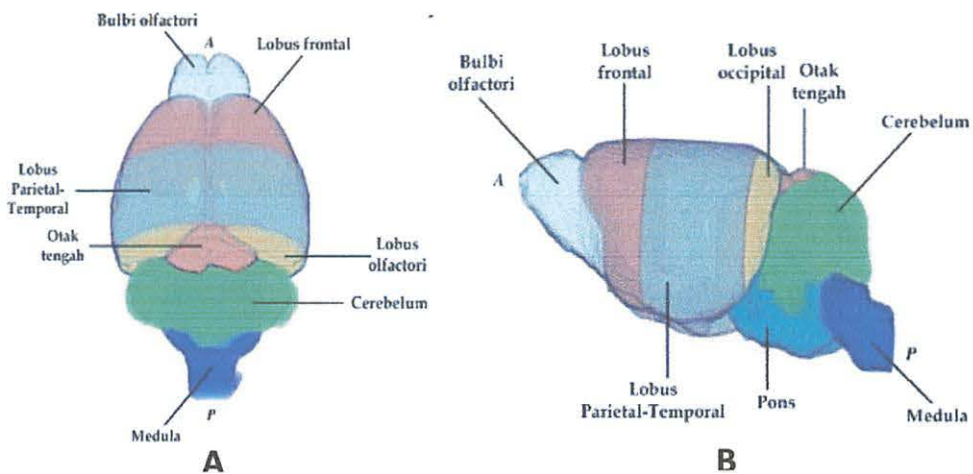
Diagnosis molekuler bertujuan untuk menentukan keberadaan parasit, sedangkan diagnosis serologis bertujuan untuk evaluasi respons imun dan penetapan status infeksi (Subekti dkk., 2005). *Polymerase Chain Reaction* sebagai metode diagnosis terutama untuk toksoplasmosis, keberhasilannya ditentukan oleh salah satu syarat yaitu *primer*. Sekuen oligonukleotida *primer* berupa urutan yang

dapat berhibridisasi secara spesifik dengan molekul DNA cetakan (Yuwono, 2006).

2.5 Tinjauan Otak Mencit

2.5.1 Bagian-bagian otak mencit

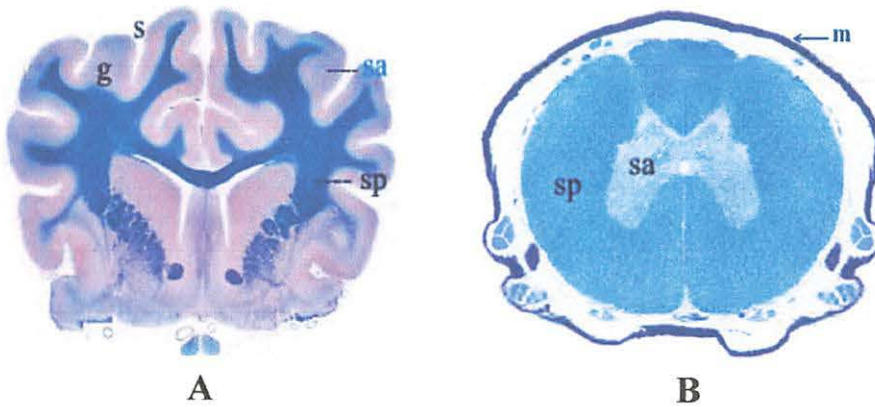
Sistem saraf dapat dibedakan menjadi sistem saraf pusat (otak dan medula spinalis) dan sistem saraf tepi (nervus cranialis, spinalis termasuk ganglia, dan serabut saraf) (Beitz dan Fletcher, 2006). Otak dapat dibagi menjadi batang otak, cerebellum (otak kecil) dan cerebrum (otak besar) (Aughey dan Frye, 2001; Beitz dan Fletcher, 2006).



Gambar 2.3 Bagian-bagian otak mencit. A. Penampang superior, B. Penampang sinister. Sumber : Door *et al.* (2007).

Apabila otak disayat, dapat dibedakan adanya bagian substansia putih, substansia abu-abu, dan campuran substansia putih dan abu-abu. Substansia putih mengandung banyak akson bermyelin, sedangkan substansia abu-abu mengandung badan sel saraf, neutrofil dan neuroglia. Neutrofil merupakan bagian

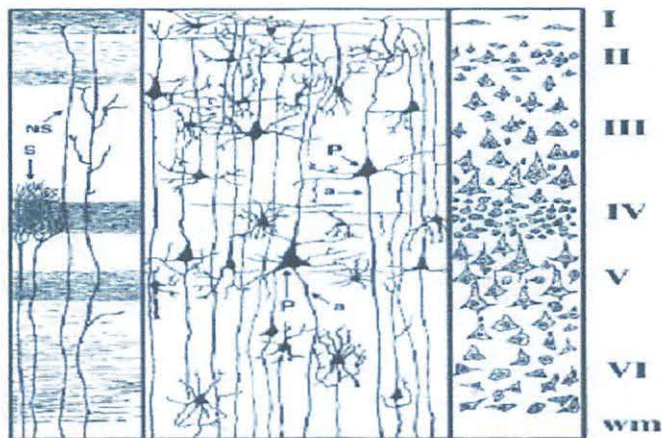
non-anatomik pada pewarnaan Hematoksin-Eosin (HE) yang mencakup bagian otak selain badan neuron dan inti sel-sel neuroglia (Beitz dan Fletcher, 2006).



Gambar 2.4 Penampang melintang otak. A. Cerebrum, B. Medula spinalis. (g) girus, (s) sulcus, (sp) substansia putih, (sa) substansia abu-abu, (m) meningen. Sumber : Eurell dan Frappier (2006).

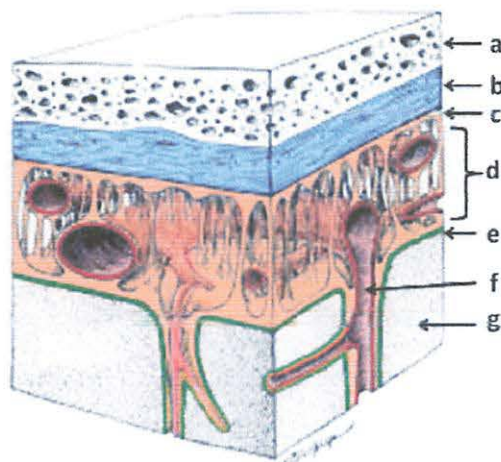
Permukaan cerebrum membentuk bukit ke arah meningen (girus) dan lekukan ke dalam (sulcus) (Radovsky dan Mahler, 1999). Lapisan superfisial cerebrum berupa substansia abu-abu, yang disebut juga cortex cerebri, sedangkan lapisan profunderal berupa substansia putih (Aughey dan Frye, 2001).

Adapun keenam lapisan pembentuk cortex cerebri berdasarkan morfologi dan sel neuron yang membentuknya dari lapisan superfisial sampai profunderal yaitu, (1) lapisan molekuler, (2) lapisan granuler eksternal, (3) lapisan piramidal eksternal, (4) lapisan granular internal, (5) lapisan piramidal internal, dan (6) lapisan multiform (Beitz dan Fletcher, 2006). Berbeda dengan cerebrum, lapisan superfisial medula spinalis berupa substansia putih, sedangkan lapisan profunderalnya berupa substansia abu-abu (Aughey dan Frey, 2001).



Gambar 2.5 Lapisan pembentuk cortex cerebri secara skematis. (I) lapisan molekuler, (II) lapisan granuler eksternal, (III) lapisan piramidal eksternal, (IV) lapisan granuler internal, (V) lapisan piramidal internal, (VI) lapisan multiform, (wm) substansia putih. Sumber : Eurell dan Frappier (2006).

Otak maupun medula spinalis dibungkus oleh meningen yang mengandung unsur kolagen dan fibril yang elastis (Radovsky dan Mahler, 1999) serta cairan cerebrospinal. Dari superfisial ke profundal terdapat tiga lapisan meningen, yaitu dura meter, arachnoid, dan pia mater (Beitz dan Fletcher, 2006).



Gambar 2.6 Lapisan penyusun meningen. (a) tulang, (b) dura meter, (c) arachnoid, (d) sub arachnoid, (e), pia mater, (f) pembuluh otak, (g) otak. Sumber : Eurell dan Frappier (2006).

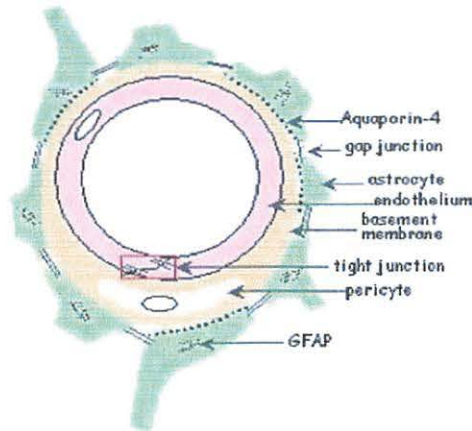
Dura mater kadangkala disebut pachimeningen karena tebal, kuat, dan mengandung serabut kolagen. Pada dura mater dapat diamati adanya serabut elastis, fibrosit, saraf, pembuluh darah, dan limfe. Lapisan dalam dura mater terdiri dari beberapa lapis fibrosit pipih dan sel-sel luar dari lapisan arachnoid. Lapisan arachnoid terdiri atas fibrosit berbentuk pipih dan serabut kolagen. Lapisan arachnoid mempunyai dua komponen, yaitu suatu lapisan yang berhubungan dengan dura mater dan suatu sistem trabekula yang menghubungkan lapisan tersebut pia mater. Pia mater mengandung sedikit serabut kolagen dan membungkus seluruh sistem saraf pusat dan vaskula besar yang menembus otak (Beitz dan Fletcher, 2006).

Toxoplasma gondii yang menginfeksi otak dapat menyebabkan terjadinya *encephalitis*. *Encephalitis* adalah peradangan substansi otak dengan ciri adanya infiltrasi sel-sel radang perivaskuler (*perivaskuler cuffing*) dan gliosis. Gliosis merupakan peningkatan jumlah sel glia yang biasanya mencakup respon astrosit yang mencolok. Gliosis dapat terfokus atau difus. Selain itu, bila terjadi infeksi SSP maka sel glia akan berkumpul di tempat terjadinya lesi atau mengubah bentuk dan fungsinya (Damjanov, 2000). Menurut Damjanov (2000), kerusakan SSP akibat infeksi mikroorganisme menyebabkan sel mikroglia memfagosit sel-sel mati atau rusak pada SSP melalui pembentukan nodulus glia.

2.5.2 Blood Brain Barrier (BBB) otak

Pembuluh darah dari SSP membentuk sebuah penghalang endotel yang tidak ditemukan di jaringan lain, yang membatasi aliran molekul dan ion antara

darah dan otak. BBB ini sangat penting untuk mempertahankan homeostasis otak dan untuk membatasi penetrasi racun yang patogen ke dalam otak (Zlokovic, 2008).



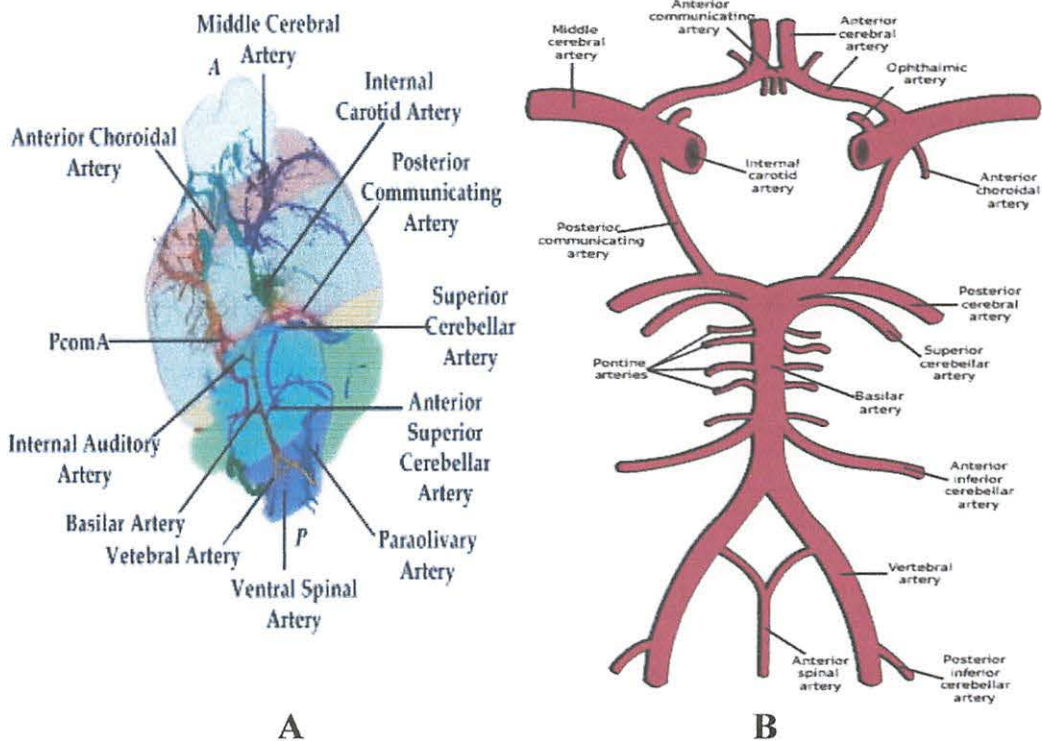
Gambar 2.7 *Blood brain barrier* otak. Sumber : Ballabh *et al.* (2004).

Sebagian besar bagian BBB dimanifestasi oleh endotel yang menyusun dinding pembuluh darah. Endotel dalam otak berbeda dengan endotel di jaringan lain karena endotel tersebut melindungi otak bersama dengan *tight junctions* dan mengandung beberapa *transcytotic vesicles*, yang membatasi aliran *paracellular* dan *transelular* molekul dari darah ke otak (Rubin dan Staddon, 1999).

2.5.3 Peredaran darah pada otak menci

Sirkulasi cerebral menunjukkan aliran darah melalui jaringan pembuluh darah yang mensuplai otak. Arteri memasok darah yang mengandung oksigen, glukosa dan nutrisi lainnya ke otak. Pembuluh darah membawa darah yang mengandung oksigen kembali ke jantung, melepaskan karbondioksida, asam laktat, dan produk metabolik lainnya. Otak sangat rentan dalam menyuplai darah sehingga sistem peredaran darah otak memiliki banyak perlindungan. Jumlah

aliran darah dalam sirkulasi cerebral dikenal sebagai *cerebral blood flow*. Adanya medan gravitasi atau percepatan juga menentukan variasi dalam aliran dan distribusi darah di otak (Livingstone, 2008).



Gambar 2.8 Sirkulasi darah pada otak mencit. A. Dilihat dari permukaan otak tikus, B. Peredaran darah. Sumber : Door *et al.* (2007).

Sirkulasi arteri cerebral biasanya dibagi ke dalam sirkulasi cerebral anterior dan sirkulasi cerebral posterior. Ada dua pasang arteri utama yang memasok darah de otak yaitu arteri carotis interna dan arteri vertebralis. Sirkulasi cerebral anterior dan posterior saling berhubungan melalui arteri posterior bilateral (Livingstone, 2008). Gambar sirkulasi darah pada otak mencit dapat dilihat pada Gambar 2.8.

BAB 3

MATERI DAN METODE

BAB 3 METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksplorasi laboratorik. Penelitian ini berupa eksplorasi di laboratorium yang hasilnya disajikan secara deskriptif.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan mulai bulan Desember 2012 sampai Mei 2013 di Laboratorium Protozoologi Departemen Parasitologi Veteriner dan Laboratorium Biologi Molekuler Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga serta Laboratorium Salmonellosis dan Gastroenteritis, Institute of Tropical Disease, Universitas Airlangga.

3.3 Materi Penelitian

3.3.1 Bahan penelitian

Hewan coba yang digunakan adalah 18 ekor mencit (*Mus musculus*) jantan Balb/C umur 3 bulan. *Strain Toxoplasma gondii* yang digunakan adalah *strain* RH (stadium takizoit), yang merupakan isolat koleksi Departemen Parasitologi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, Surabaya.

Bahan untuk isolasi DNA adalah Kit NucleoSpin[®] Tissue (Macherey-Nagel, Germany), yang meliputi larutan *lysis buffer*, ethanol absolut, larutan proteinase K, *Wash Buffer* (WB), *Elution Buffer*. Bahan untuk PCR adalah 2x PCR Master mix Solution (*i-Taq*[™]) (iNtRON BIOTECHNOLOGY), sepasang *primer* SAG-1

(oligonukleotida) (SIGMA-ALDRICH) dan *distilled water*. Bahan untuk elektroforesis gel adalah agarosa, *Tris acetate* EDTA (TAE), Marker DNA, *loading buffer*, dan Ethidium Bromida (EtBr). Susunan dan posisi nucleotida untuk *primer* SAG-1 dapat dilihat pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Susunan dan Posisi Nucleotida untuk *Primer* SAG-1

<i>Primer</i>	Sekuens	Posisi
<i>Forward</i>	5'-ATTAGGATCCATGTTCACTCTCAAGTGCCCT-3'	542-559
<i>Reverse</i>	5'-TTGAGAATTCAGCACAACGGTGATCACTC-3'	1320-1348

Sumber : Kusumawati *et al.* (2011)

3.3.2 Alat penelitian

Alat penelitian yang digunakan adalah mesin PCR (*Mastercycler Personal*), *microcentrifuge*, mikropipet, *gloves disposable*, *water bath* (Thermostat Water Bath HH-6), masker, Erlenmeyer 1000 ml, vortex, *disposable spuit* 1 ml, *disposable spuit* besar, UV-transluminator, agarose elektroforesis apparatus, tabung Eppendorf, microtip, microtube, timbangan digital, *cool box*, kamera digital.

3.4 Definisi Operasional Variabel

- 1) Infeksi *Toxoplasma gondii* adalah infeksi secara intraperitoneal pada mencit (*Mus musculus*) jantan Balb/C umur 3 bulan menggunakan 1×10^3 takizoit *T. gondii strain* RH .

- 2) Deteksi dini toksoplasmosis otak adalah diagnosis keberadaan dari takizoit *T. gondii* pertama kali pada jaringan otak mencit dengan menganalisa secara molekuler keberadaan SAG-1 pada sampel menggunakan PCR.
- 3) Otak mencit adalah sampel jaringan otak dari mencit yang telah diinfeksi dengan *T. gondii* secara intraperitoneal.

3.5 Metode Penelitian

3.5.1 Pengambilan sampel

Sebanyak 18 ekor mencit jantan Balb/C diinfeksi dengan 1×10^3 takizoit *Toxoplasma gondii strain* RH secara intraperitoneal. Mencit dipelihara dan diberi makan dan minum setiap hari.

Mencit dikorbankan tiap 12 jam/ ekor yang terdiri dari 12 jam pertama (a) dan 12 jam kedua (b) per hari. Jaringan otak mencit yang telah dikorbankan kemudian diambil. Mencit dikorbankan dengan cara *dislocatio capitis*. Sampel disimpan dalam vial plastik microfuge steril kemudian dibekukan pada suhu -20°C sampai ekstraksi DNA dilakukan (Majumder *et al*, 2011).

3.5.2 Persiapan reagen isolasi DNA

Larutan B1 dan B2 dicampur dan campuran larutan tersebut disebut larutan B3, merupakan larutan *lysis buffer*. Larutan B5 ditambahkan ethanol absolut 28 ml dan dicampur. Proteinase K dilarutkan dengan pelarut dengan cara

ditambahkan buffer pelarut sebanyak 1,35 ml dan disimpan dalam -20°C . (Machery-Nagel, 2010).

3.5.3 Persiapan sampel

Sampel yang akan diolah adalah sampel mulai hari ke-5 (12 jam kedua) sampai hari ke-9 (12 jam pertama). Apabila sampel pada hari ke-5 (12 jam kedua) sudah dapat diidentifikasi awal terdeteksi adanya infeksi takizoit pada otak, maka tidak dilakukan pengolahan pada sampel hari ke-1 (12 jam pertama) sampai hari ke-5 (12 jam pertama).

Jaringan otak mencit dipotong kecil-kecil sehingga berat total 25 mg tiap sampel, dilakukan homogenisasi dan dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf. Sebanyak 180 μl T1 (*buffer lysis*) dan 25 μl Proteinase K ditambahkan dan dicampur dengan baik. Larutan diinkubasi pada suhu 56°C selama 1-3 jam (Machery-Nagel, 2010).

3.5.4 Ekstraksi DNA

Sampel yang sudah diberikan *buffer lysis* dan proteinase K, kemudian di vortex dengan baik, dan ditambahkan 200 μl larutan B3 (campuran B1 dan B2). Larutan diinkubasi pada suhu 70°C selama 10 menit. Larutan ditambahkan 210 μl ethanol absolut dan divortex. *NucleoSpin Column* disiapkan dan diletakkan di atas tabung kolektor. Sampel dipindahkan ke dalam *NucleoSpin Column* dan disentrifugasi 11000 rpm selama 1 menit. Cairan dalam tabung kolektor dituang dan ditambahkan 500 μl larutan BW (*Wash Buffer*), dan disentrifugasi 11000 rpm

selama 1 menit. Larutan dalam tabung kolektor dibuang. *NucleoSpin Column* ditambahkan 600 µl larutan BW (*Wash Buffer*), sentrifugasi 11000 rpm selama 1 menit dan larutan dalam tabung kolektor dibuang. *NucleoSpin Column* disentrifugasi 11000 rpm kembali selama 1 menit sehingga sisa ethanol hilang. *NucleoSpin Column* dipindahkan dan diletakkan di atas tabung Eppendorf baru. Sebanyak 100 µl larutan *Elution Buffer* yang sudah dihangatkan dengan suhu 70°C ditambahkan pada *NucleoSpin Column* dan diinkubasi pada suhu kamar selama 1 menit. Tabung disentrifugasi 11000 rpm selama 1 menit. Larutan dalam tabung Eppendorf adalah larutan yang mengandung DNA, kemudian disimpan dalam suhu -20°C, dan siap digunakan (Machery-Nagel, 2010).

3.5.5 Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Campuran reaksi PCR dimasukkan dalam tabung Eppendorf, yang terdiri atas 10 µl *2x PCR Master mix Solution*, 1-2 µl *template DNA*, *primer* (F: 10 pmol/µl), *primer* (R: 10 pmol/µl) dan *distilled water* 6-7 µl sehingga total volume 20 µl. Campuran reaksi PCR dicampur sampai homogen, kemudian dispindown dengan kecepatan 12000 rpm beberapa detik agar larutan terkumpul di dasar tabung Eppendorf. Tabung Eppendorf selanjutnya dimasukkan ke dalam mesin PCR dengan menggunakan program persiapan dengan suhu 94°C selama 5 menit, denaturasi 94°C selama 2 menit, *annealing* dengan suhu 60°C selama 1 menit, pemanjangan rantai 72°C selama 30 detik, dan terminasi 72°C selama 7 menit. Proses PCR menggunakan reaksi 35 kali (Mufasirin, 2011).

3.5.6 Analisis hasil PCR dengan elektroforesis gel agarosa

Larutan agarose (1% agarose dalam buffer TAE) dipanaskan hingga mendidih. Setelah suhu larutan 60°C, ethidium bromide (*stock solution* 10 mg/ml) ditambahkan hingga konsentrasi akhir 0,5 mg/ml dan dicampur dengan menggoyang Erlenmeyer. Sisir (*comb*) dipasang pada kaca gel dengan pinggir telah diberi *isolasi tape*. Larutan agarose dituangkan dengan ketinggian 3–5 mm. Bila agarose telah mengeras, sisir diambil dan *isolasi tape* dilepas. Kaca gel dimasukkan ke dalam tangki elektroforesis yang telah diisi *buffer* TAE. Campuran DNA dengan *loading buffer* (5 µl DNA + 3 µl *loading buffer*) dimasukkan ke dalam sumuran gel, sampel otak yang telah di proses dengan *loading buffer* (6 µl sampel + 4 µl *loading buffer*) dimasukkan pada sumuran yang lain. Selanjutnya tangki elektroforesis ditutup dan power supply dinyalakan (diatur pada 100 V, 50 mA, 60 menit). Tahap terakhir, listrik power supply dimatikan lalu gel diambil dari tangki dan dibaca pada UV-transluminator.

Hasil elektroforesis diidentifikasi untuk mengetahui waktu pertama (dini) *T. gondii* ditemukan di otak. Hasil positif jika terdapat pita dengan panjang 806 bp.

3.6 Pemeriksaan Cairan Intraperitoneal

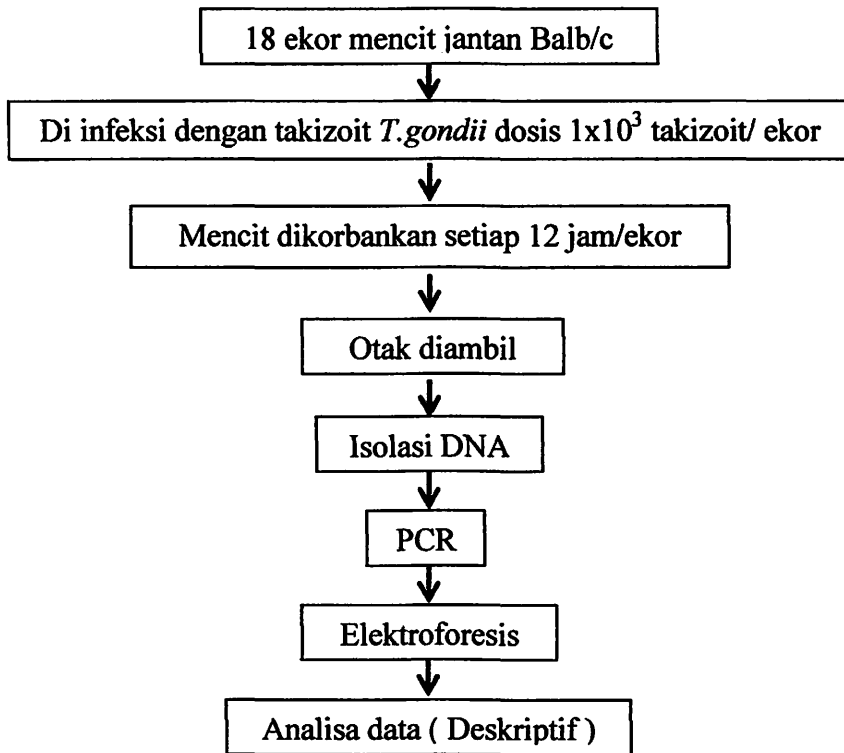
Dua belas jam setelah infeksi, satu ekor mencit dikorbankan dan dilakukan pembedahan pada bagian perut untuk mengetahui keberadaan takizoit *T. gondii*. Bahan pemeriksaan diambil dengan cara irigasi 0,5 ml NaCl fisiologis yang dimasukkan ke dalam rongga perut mencit dan hasil pencucian diperiksa di bawah

mikroskop dengan perbesaran 400X. Cairan intraperitoneal selain diperiksa secara natif juga dibuat ulas tebal pada gelas obyek dan dilakukan pewarnaan menggunakan Giemsa 20%. Hasil ulasan dibiarkan mengering pada suhu ruang dan selanjutnya dilakukan fiksasi dengan larutan metanol absolut selama 3 menit. Sampel kemudian diangkat dan dimasukkan ke dalam larutan Giemsa 20% selama 30 menit. Setelah 30 menit, sampel dicuci dengan air kran mengalir dan dikeringkan di suhu ruang. Pemeriksaan dilakukan di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000X menggunakan oil emersi, Apabila pemeriksaan ditemukan takizoit maka sampel dinyatakan positif (Mufasirin dan Suwanti, 2008).

3.7 Analisa Data (Deskriptif)

Data penelitian berupa hasil amplifikasi DNA sampel. Sampel dinyatakan positif apabila didapatkan panjang pita DNA 806 bp (*Toxoplasma gondii gene for major surface antigen P30, GenBank : X14080.1*). Data disajikan secara deskriptif.

3.8 Kerangka Operasional



Gambar 3.1 Skema rancangan penelitian

BAB 4

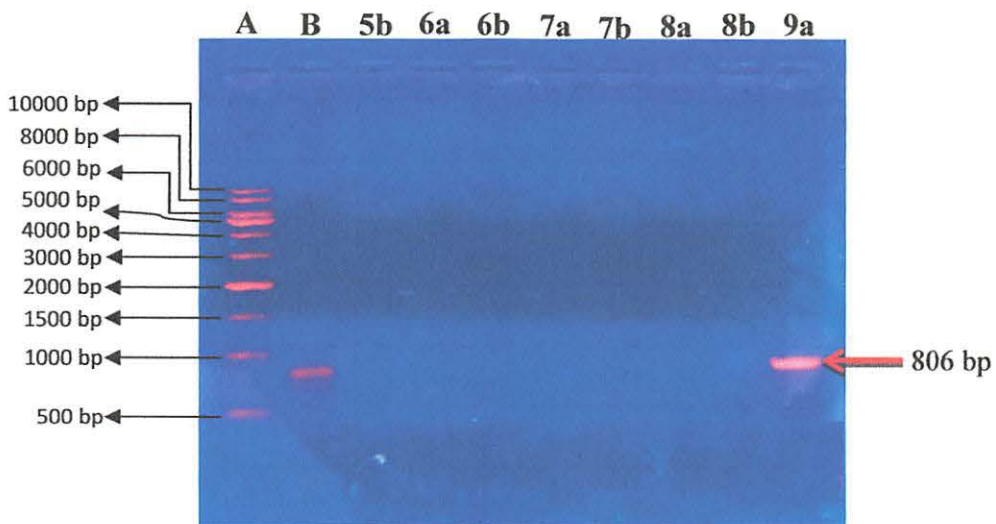
HASIL PENELITIAN

BAB 4 HASIL

4.1 Hasil Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Proses amplifikasi DNA pada otak mencit (*Mus musculus*) jantan Balb/C yang telah diinfeksi takizoit *T. gondii* menggunakan primer SAG-1 *forward* (nt 542-559) dan SAG-1 *reverse* (nt 1320-1348) menghasilkan pita gen dengan panjang 806 bp. Penggunaan primer tersebut dapat mengamplifikasi fragmen gen SAG-1 pada urutan 542-1348.

Hasil amplifikasi DNA dari otak mencit (*Mus musculus*) sebanyak 8 sampel yaitu hari ke-5 (12 jam kedua) sampai hari ke-9 (12 jam pertama) menggunakan primer SAG-1 menghasilkan pita dengan panjang 806 bp (positif) pada hari ke-9 (12 jam pertama) pascainfeksi. Hasil elektroforesis pada hasil PCR sampel otak mencit dapat dilihat pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1. Hasil elektroforesis PCR pada otak mencit (*Mus musculus*).
 A. marker DNA ; B. kontrol positif (takizoit) ; 5b-8b. Hari ke-5 sampai hari ke-8 (sampel otak mencit negatif) ; 9a. Hari ke-9 (sampel otak mencit positif) ; a. 12 jam pertama; b. 12 jam kedua.

Pada Gambar 4.1. dapat diketahui panjang fragmen gen SAG-1 takizoit *T. gondii* dengan menggunakan primer SAG-1 yaitu sebesar 806 bp yang tampak pada kolom 9a, yaitu sampel pada hari ke 9 (12 jam pertama) sama dengan kontrol (+) sedangkan pada kolom 5b hingga 8b tidak tampak panjang *amplicon*-nya yang berarti sampel dinyatakan negatif. Berdasarkan hasil elektroforesis dari sampel PCR pada hari ke-5 (12 jam kedua) sampai hari ke-9 (12 jam pertama) maka sampel otak pada hari ke-1 (12 jam pertama) sampai hari ke-5 (12 jam pertama) tidak diproses lebih lanjut karena dipastikan secara teori negatif.

4.2 Hasil Pemeriksaan Cairan Intraperitoneal

Hasil pemeriksaan pada 18 sampel otak mencit (*Mus musculus*) pada pemeriksaan cairan intraperitoneal didapatkan hasil positif mulai hari ke-2 setelah diinfeksi dengan *T. gondii*. Mencit pada hari ke-9 (12 jam kedua) mengalami kematian. Hasil pemeriksaan cairan intraperitoneal sampel mencit secara lengkap dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Hasil pemeriksaan stadium takizoit *T. gondii* dengan uji cairan intraperitoneal pada 18 sampel mencit (*Mus musculus*).

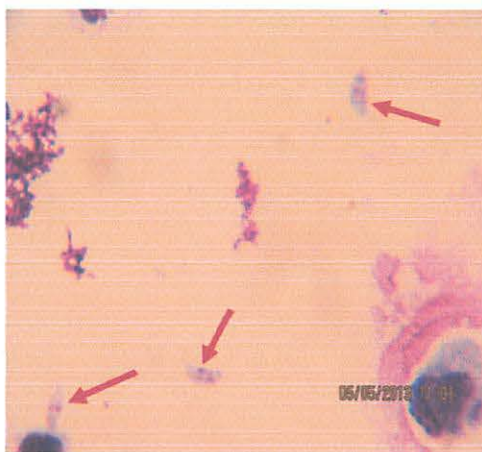
HARI KE-	PERIODE	
	12 Jam Pertama	12 Jam Kedua
1	Negatif	Negatif
2	Positif	Positif
3	Positif	Positif
4	Positif	Positif
5	Positif	Positif
6	Positif	Positif
7	Positif	Positif
8	Positif	Positif
9	Positif	Mencit mati

Keterangan : Positif = terdapat takizoit pada intrasel atau ekstrasel

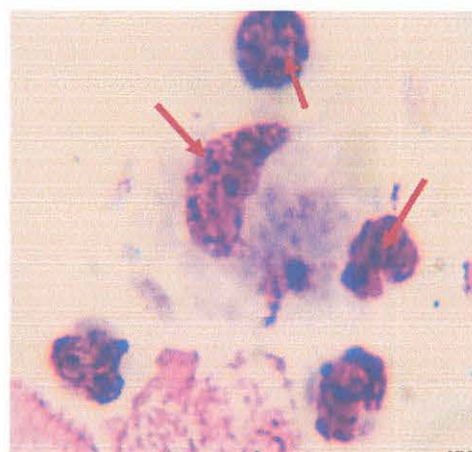
Hasil pemeriksaan preparat natif dan preparat Giemsa dari cairan intraperitoneal yang mengandung takizoit dapat dilihat pada Gambar 4.2 dan Gambar 4.3.



Gambar 4.2 Hasil pemeriksaan natif dari cairan intraperitoneal yang mengandung takizoit *T. gondii* (perbesaran 400x). Arah panah ↑ menunjukkan takizoit.



A



B

Gambar 4.3 Hasil pewarnaan Giemsa dari cairan intraperitoneal yang mengandung takizoit (perbesaran 1000x dengan oil emersi). Tanda panah merah ↑ menunjukkan takizoit *T. gondii*. A. ekstrasel ; B. intrasel.

BAB 5

PEMBAHASAN

BAB 5 PEMBAHASAN

Delapan belas ekor mencit diinfeksi dengan *Toxoplasma gondii strain RH* sebanyak 1×10^3 takizoit per ekor. Mencit dikorbankan setiap 12 jam dan kemudian dilakukan pemeriksaan pada cairan intraperitoneal. Cairan intraperitoneal diperiksa menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x dan 1000x. Otak dari mencit yang di korbankan diambil dan disimpan pada suhu -20°C untuk isolasi DNA dan diproses dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR), kemudian dibaca pada gel elektroforesis.

Pemeriksaan cairan intraperitoneal menunjukkan bahwa takizoit mulai terdeteksi pada hari ke-2 pascainfeksi. Dalam cairan intraperitoneal, proses penyebaran takizoit dimulai dengan menginfeksi organ yang ada pada peritoneum terutama limfonodula mesenterika. Takizoit akan menginvasi dengan cara melekatkan diri pada sel target. Proses perlekatan melibatkan ligan pada permukaan takizoit yang akan berikatan dengan reseptor pada sel target. Protein yang berperan dalam perlekatan tersebut adalah *Surface Antigen-1* (SAG-1), yang mengandung GPI (*glukosilfosfatidilinositol*) dan bermanfaat memberikan sinyal dalam proses perlekatan antara takizoit dengan sel target dari hewan yang diinfeksi (Ajioka *et al.*, 2001; Lekutis *et al.*, 2001; Carruthers, 2002). Takizoit akan melakukan multiplikasi di dalam sel secara aseksual (endodiogeni). Akibat multiplikasi takizoit, sel target akan ruptur karena akumulasi takizoit yang banyak. Dubey *et al.* (1998), menyebutkan bahwa sel yang ruptur akan mengeluarkan banyak takizoit kemudian tersebar dan menginvasi sel di sekitar

yang masih sehat. Penyebaran takizoit ini melalui sel makrofag yang kemudian beredar ke seluruh tubuh melalui peredaran darah (Sasmita, 2006).

Pemeriksaan cairan intraperitoneal pada hari ke-5 (12 jam kedua) menunjukkan bahwa takizoit sudah terlihat pada cairan intraperitoneal, sedangkan pada pemeriksaan dengan menggunakan teknik PCR pada hari ke-5 (12 jam kedua) tidak terbentuk pita gen dengan panjang 806 bp. Tidak terbentuknya pita gen 806 bp menunjukkan bahwa dengan teknik PCR belum terdeteksi adanya infeksi takizoit pada otak di hari ke-5. Hal ini kemungkinan dikarenakan takizoit belum sampai menginfeksi otak pada hari ke-5 dan dibutuhkan waktu yang lebih lama untuk dapat mencapai otak. Apabila takizoit telah menginfeksi otak walaupun hanya satu parasit, pasti akan terbentuk pita gen 806 bp dalam pemeriksaan dengan teknik PCR. Hal ini dikuatkan oleh penelitian Smits dan Hartskeerl (1995), bahwa teknik PCR dapat mendeteksi parasit dalam jumlah sedikit atau bahkan satu parasit saja dengan spesifitas tinggi dari berbagai sampel jaringan, sputum, cairan serebrospinal, darah, urin, dan feses.

Hasil penelitian deteksi dini *T. gondii* pada otak mencit dengan teknik PCR adalah positif pada hari ke-9 (12 jam pertama) pascainfeksi, berarti takizoit mulai mencapai otak pada hari ke-9 setelah diinfeksi secara intraperitoneal. Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Takashima *et al.* (2008), takizoit dapat mencapai otak pada hari ke-4 pascainfeksi intraperitoneal. Perbedaan hasil tersebut terjadi karena metode penelitian yaitu hewan coba dan *strain Toxoplasma gondii* yang digunakan berbeda. Metode penelitian dalam penelitian tersebut menggunakan hewan coba mencit C57BL/6J dan *strain* yang dipakai adalah *strain* PLK/RED,

sedangkan pada penelitian deteksi dini toksoplasmosis pada otak mencit dengan teknik PCR ini menggunakan hewan coba mencit Balb/C dan *strain* yang dipakai *strain* RH. Mencit C57BL/6J adalah mencit yang lebih peka terhadap *T. gondii* daripada mencit Balb/C sehingga takizoit dapat mencapai otak lebih cepat pada mencit C57BL/6J daripada mencit Balb/C. Pita gen dengan panjang 806 bp yang muncul pada sampel PCR organ otak mencit Balb/C pada hari ke-9 menunjukkan bahwa takizoit sudah menyebar hingga ke organ otak meskipun membutuhkan waktu yang lebih lama. Penyebaran ke arah otak dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu lokasi organ, *Blood-Brain Barrier* (BBB), dan imunitas hospes.

Menurut Dubey *et al.* (1998), *T. gondii* dapat menginfeksi dan berkembang di dalam sel yang berinti. Di dalam sistem sirkulasi, takizoit akan menginfeksi sel leukosit termasuk monosit (Channon *et al.*, 2000). Monosit yang berdiferensiasi menjadi makrofag di jaringan akan menyebabkan takizoit menyebar ke organ yang jauh seperti otak.

Pada penelitian sebelumnya disebutkan bahwa pada infeksi intraperitoneal, takizoit akan segera ditemukan dalam peredaran darah mencit (Mordue *et al.*, 2001; Sibley *et al.*, 2002). Takizoit *T. gondii* memanfaatkan sistem sirkulasi darah hospes untuk mencapai otak. Takizoit *T. gondii* dapat sampai ke otak memanfaatkan aliran darah melalui arteri carotis interna (anterior) dan arteri vertebralis (posterior). Arteri carotis interna, setelah memisahkan diri dari arteri carotis komunis, naik dan masuk ke rongga tengkorak melalui canalis caroticus yang berjalan dalam sinus cavernosus. Arteri carotis interna adalah arteri besar yang mensuplai darah dari leher ke otak. Menurut Radovsky dan Mahler (1999),

cabang dari arteri carotis interna akan menjadi *anterior cerebral artery* dan diteruskan ke *middle cerebral artery* yang mensuplai darah di otak bagian anterior, sedangkan arteri vertebralis dibentuk oleh arteri vertebralis kanan dan kiri yang berpangkal di arteri subclavia dan berakhir pada sepasang cabang arteri serebri posterior yang memasok darah pada otak bagian posterior (Livingstone, 2008).

Otak memiliki tiga buah ventrikel dan berisi cairan cerebrospinal yang berfungsi melindungi otak. Selain itu, otak juga memiliki suatu sistem pertahanan otak yang biasa disebut dengan *Blood-Brain Barrier (BBB)*. *Blood-Brain Barrier* merupakan suatu membran yang sangat resisten terhadap proses difusi dan membran yang memisahkan cairan interstisial darah otak. Menurut Japardi dan Iskandar (2002), BBB adalah lapisan seluler dan kontinyu dari endothel yang diikat oleh *tight junction*. Dengan adanya *tight junction*, molekul organik kecil tidak dapat menembus endothel kapiler, oleh karena itu *tight junction* sangat berperan di dalam BBB. Struktur BBB dengan endothelial kapilernya sangat rapat sehingga hanya sedikit atau tidak ada pori-pori di antara sel tersebut (Lu, 1995). Apabila terjadi gangguan fungsional pada BBB yang menyebabkan pemisahan kerapatan dari endothel yang diikat dengan *tight junction*, maka takizoit yang melewati peredaran darah dapat menembus BBB tersebut dan menginfeksi otak.

Peran imunitas terhadap penyebaran *T. gondii* ke otak sangat penting. Menurut Robert dan Janovy (2002), takizoit secara terus-menerus akan menginvasi sel sehingga menyebabkan kerusakan secara ekstensif pada otak yang

diperkirakan kerusakan terjadi pada Sistem Saraf Pusat (SSP) karena imunitas yang rendah pada jaringan dari hospes.

Pada penelitian ini, mencit mulai mati pada hari ke-9 (12 jam kedua). Kematian mencit tersebut terjadi setelah takizoit menyebar ke otak. Otak merupakan pusat dari seluruh aktivitas dalam tubuh. Menurut Robert dan Janovy (2002), takizoit melalui peredaran darah akan memasuki SSP dari jaringan otak dan akan berproliferasi secara aktif. Infeksi terhadap SSP sangat berbahaya karena *T. gondii* yang berhasil menembus pertahanan otak maka proliferasi *T. gondii* tersebut paling cepat terjadi di otak dibandingkan organ lain (Reid dan Fallon, 1992). Setelah memasuki sistem saraf pusat, takizoit akan menginfeksi astrosit, neuron, dan sel microglial. Infeksi takizoit *T. gondii* akan menyebabkan kerusakan pada SSP. Jika SSP telah rusak, maka akan menimbulkan kematian pada mencit yang terinfeksi takizoit dari *T. gondii*.

Toxoplasma gondii pada otak mencit bisa menyebabkan *encephalitis toxoplasmosis*. Kerusakan pada otak yang terkena *encephalitis toxoplasmosis* apabila dilihat secara histopatologi kemungkinan kerusakan (lesi) akan lebih jelas. Nelson dan Couto (2003), menyebutkan bahwa lesi *encephalitis toxoplasmosis* sulit dibedakan dengan lesi lain, lesi otak tunggal atau *multiple* di bagian tepi menyerupai cincin merupakan gambaran yang dianggap khas. Kerusakan dari jaringan otak yang terinfeksi takizoit dari *T. gondii* kemungkinan menimbulkan adanya nekrosis, apoptosis, dan peradangan dari sel tersebut, oleh karena itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk melihat gambaran histopatologi dan adanya kerusakan pada organ otak.

Penelitian ini menggunakan teknik pemeriksaan dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Keberhasilan dari teknik PCR dipengaruhi oleh beberapa hal yaitu konsentrasi *DNA template*, *primer*, dan suhu denaturasi, *annealing*, dan *extention*. Kadar DNA minimal yang dibutuhkan adalah 0,1-1 µg (100-1000 ng). Penelitian ini memakai 2 *primer* yaitu *primer forward* yang terletak pada urutan nukleotida 542-559 dan *primer reverse* yang terletak pada urutan nukleotida 1320-1348 yang mengenal hanya pada gen SAG-1 dengan panjang amplicon 806 bp. Pengaturan suhu denaturasi 94°C selama 2 menit, *annealing* dengan suhu 60°C selama 1 menit, pemanjangan rantai 72°C selama 30 detik, dan terminasi 72°C selama 7 menit. Proses PCR menggunakan reaksi 35 kali. Menurut Chiabchalard *et al.* (2005), diagnosis toksoplasmosis secara molekuler dengan menggunakan teknik PCR sudah banyak dilakukan dan memberikan akurasi yang tinggi (spesifisitas 100% dan sensitivitas 97,4%).

BAB 6

KESIMPULAN DAN SARAN

BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Toksoplasmosis pada otak mencit (*Mus musculus*) dapat dideteksi dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) pada hari ke-9 (12 jam pertama) pascainfeksi.

6.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian deteksi dini toksoplasmosis pada otak mencit (*Mus musculus*) dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR), perlu dilakukan penelitian gambaran histopatologi otak pada saat awal *Toxoplasma gondii* ditemukan.

RINGKASAN

RINGKASAN

Irtya Sofhi Anggia. Deteksi dini toksoplasmosis pada otak mencit dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Penelitian ini di bawah bimbingan Dr. Mufasirin, drh., M.Si. selaku pembimbing pertama dan Prof. Dr. Laba Mahaputra, drh, M.Sc. selaku pembimbing kedua.

Toksoplasmosis merupakan penyakit zoonosis yang disebabkan oleh parasit intraseluler *Toxoplasma gondii* yang menginfeksi manusia dan semua hewan berdarah panas dan menginfeksi serta berkembang dalam setiap sel yang berinti. Pada hewan, infeksi *T. gondii* dapat mengurangi produktivitas ternak dan menjadi sumber penularan infeksi pada manusia.

Polymerase Chain Reaction (PCR) yang merupakan suatu teknik atau metode perbanyakan (replikasi) DNA secara enzimatik tanpa menggunakan organisme. Dengan teknik ini, DNA dapat dihasilkan dalam jumlah besar dengan waktu relatif singkat dengan sampel sedikit. Proses replikasi DNA ini terjadi melalui tiga tahapan yaitu denaturasi, *annealing* dan *extention*.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keberadaan awal Toksoplasmosis pada otak mencit dengan teknik PCR. Penelitian ini dilakukan mulai pada bulan Desember 2012 sampai Mei 2013.

Penelitian ini menggunakan 18 ekor mencit yang telah diinfeksi dengan dosis 1×10^3 takizoit secara intraperitoneal. Setiap 12 jam, mengorbankan 1 mencit dan jaringan otak diambil. Otak mencit kemudian diekstraksi untuk memperoleh *Deoxyribonucleic Acid* (DNA). *Deoxyribonucleic Acid* hasil ekstraksi kemudian

diampifikasi melalui proses PCR. Proses PCR program persiapan dengan suhu 94°C selama 5 menit, denaturasi 94° C selama 2 menit, *annealing* dengan suhu 60°C selama 1 menit, pemanjangan rantai 72°C selama 30 detik, dan terminasi 72°C selama 7 menit. Proses PCR menggunakan reaksi 35 kali. Uji cairan intraperitoneal dilakukan untuk melihat adanya takizoit.

Hasil dari penelitian PCR didapatkan pita gen SAG-1 dengan panjang band 806 bp pada sampel otak mencit pada hari ke-9 (12 jam pertama). Hasil penelitian dapat disimpulkan toksoplasmosis otak pada mencit (*Mus musculus*) dapat dideteksi dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) pada hari ke-9. Disarankan perlu dilakukan penelitian lanjutan gambaran histopatologi atas kerusakan yang terjadi pada otak dan penelitian keberadaan *Toxoplasma gondii* pada organ lain selain otak.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Ajioka, J.W., J.M. Fitzpatrick and C.P. Reitter. 2001. *Toxoplasma gondii* Genomics: Shedding Light on Pathogenesis and Chemotherapy. *Exp. Rev. Mol. Med.* 1-19.
- Aughey, E. and F.L. Frye. 2001. *Comparative Veterinary Histology with Clinical Correlates.* Iowa State University Press. 215-251.
- Ballabh, P., A. Braun, M. Nedergaard. 2004. The Blood-Brain Barrier: an Overview: Structure, Regulation, and Clinical Implications. *Neurobiol. Dis.* 16: 1-13.
- Bastien, P. 2002. Diagnosis Molecular : Diagnosis of Toxoplasmosis. *Transactions of The Royal Society of Trop.Med.and Hyg.* 96(1): 205-215.
- Baxter, S.I.F., I. Pow, A. Bridgen and H.W. Reid. 1993. Polymerase Chain Reaction Detection of The Sheep Associated Agent of Malignant Catarrhal Fever. *Arch. Virol.* 132: 145-159.
- Beitz, A.J. and T.F. Fletcher. 2006. Nervous System. In J.A. Eurell and B.L. Frappier. *Dellmann's Textbook of Veterinary Histology.* 6: 91-116.
- Berger, J.P., N.G.A. Fayssal, B.A. Cohen, K. Conant, L.M. Deangelis, A. Dirocco. 2000. The Neurologic Complication of AIDS. *Continuum.* Pp.128-149.
- Black, M.W. and J.C. Boothroyd. 2000. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 607-623.
- Carruthers, V.B. 2002. Host Cell Invasion by The Opportunistic Pathogen *Toxoplasma gondii*. *Acta Trop.* 81: 111-122.
- Carruthers, V. and J. C. Boothroyd. 2007. Pulling Together: an Integrated Model of *Toxoplasma* Cell Invasion. *Curr. Op. Microbiol.* 10: 83-89.
- Carruthers, V.B. and Y. Suzuki. 2007. Effects of *Toxoplasma gondii* Infection on the Brain. *Schizophrenia Bulletin.* Vol. 33. No. 3. Pp. 745-751.
- Chahaya, I. 2003. *Epidemiologi Toxoplasma gondii.* USU digital library. Fakultas Kesehatan Masyarakat. Universitas Sumatera Utara.
- Channon, J.Y., R.M. Seguin and L.H. Kasper. 2000. Differential Infectivity and Division of *Toxoplasma gondii* in Human Peripheral Blood Leukocytes. *Infect. Immun.* 68: 4822-4826.

- Chiabchalard, R., J.T. Wiengchareon, Y. Sukthana. 2005. Sensitivity and Specificity of Polymerase Chain Reaction for Detection of *Toxoplasma gondii* DNA Added to Laboratory Samples. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 36 (2): 408-411.
- Courret, N., S. Darche, P. Sonigo, G. Milon, D. Buzoni-Gatel, I. Tardieux. 2006. CD11c⁺ and CD11b⁺ Expressing Mouse Leukocytes Transport Single *Toxoplasma gondii* Tachyzoites to The Brain and Blood. 107: 309–316.
- Craeye, S.D., A. Francart, J. Chabaulty, V.D. Vriendt, S.V. Gucht, I. Leroux, E. Jongert. 2008. Prevalence of *Toxoplasma gondii* Infection in Belgian House Cats. *Vet. Parasitol.* 157: 128-132.
- Da Gama, L.M., F.L. Ribeiro-Gomes, U.Jr. Guimaraes, A.C. Arnholdt. 2004. Reduction in Adhesiveness to Extracellular Matrix Components, Modulation of Adhesion Molecules and In vivo Migration of Murine Macrophages Infected with *Toxoplasma gondii*. *Microbes. Infect.* 6: 1287–1296.
- Damjanov, I. 2000. Buku Teks dan Atlas Berwarna Histopatologi. Pendit UB, penerjemah: Himawan, M. Jakarta: Widya Medika.
- Dharmana, E. 2007. *Toxoplasma gondii* : Musuh Dalam Selimut. Pidato Pengukuhan Guru Besar Parasitologi. Fakultas Kedokteran. Universitas Diponegoro.
- Dorr, A., J.G. Sled, N. Kabani. 2007. Three-dimensional Cerebral Vasculature of the CBA Mouse Brain: A Magnetic Resonance Imaging and Micro Computed Tomography Study. *Neuroimage.* 36: 1409-1423.
- Dubey, J.P., D.S. Lindsay and C.A. Speer. 1998. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites and Sporozoites and Biology and Development of Tissue. *Clin. Microbiol. Rev.* 11: 267-299.
- Dubey, J.P. 2002. A Review of Toxoplasmosis in Wild Birds. *Vet. Parasitol.* 106: 121-153.
- Dubey, J.P., D.H. Graham, C.R. Blackston, T. Lehmann, S.M. Gennari, A.M.A. Ragozo, S.M. Nishi, S.K. Shen, O.C.H. Kwok, D.E. Hill and P. Thulliez. 2002. Biological and Genetic Characterization of *Toxoplasma gondii* Isolates from Chicken (*Gallus domesticus*) from Sao Paulo, Brazil: Unexpected findings. *Int. J. Parasitol.* 32: 99-105.
- Dubey, J. P. 2004. Toxoplasmosis-A Waterborne Zoonosis. *Vet. Parasitol.* 126 (1-2): 57-72.

- Dubey, J.P. 2007. Life Cycle of *Toxoplasma gondii*. In: *Toxoplasma gondii* Molecular and Cellular Biology (James W. Ajioka and Dominique Soldasi). Horizon Bioscience. 1-6.
- Dubey, J. P. 2008. The History of *Toxoplasma gondii* – The First 100 Years. *J. Eukaryot. Microbiol.* 55 (6): 467-475.
- Dzierszinski, F., M. Nishi, L. Ouko and D.S. Roos. 2004. Dynamics of *Toxoplasma gondii* Differentiation. *Eukar. Cell.* 3: 992-1003.
- Eurell, J.A. and B.L. Frappier. 2006. *Dellman's Textbook of Veterinary Histology*. Oxford. 6: 91-115.
- Filliseti, D. and E. Candolfi. 2004. Immune Response to *Toxoplasma gondii*. *Ann.Ist. Super Sania.* 40(1): 71-80.
- Gandahusada, S. 2000. *Toxoplasma gondii*. Dalam *Parasitologi Kedokteran Edisi Ketiga*. Balai Penerbit FK UI, Jakarta: 153-161.
- Gumilar, G., F.M.T. Supriyanti dan H.H. Siti. (2008). *Bioteknologi*. Bandung: Pendidikan Kimia FPMIPA UPI.
- Halonen, S.K., F. Chiu and L.M. Weiss. 1998. Effect of Cytokines on Growth of *Toxoplasma gondii* in Murine Astrocytes. *Infect. Immun.* 66: 4989-4993.
- Handoyo, D. dan A. Rudiretna. 2000. *Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Pusat Studi Bioteknologi. Ubaya.
- Hartati, S., S.J. Widada, Sumartono dan A. Kusumawati. 2003. Cloning of Gene Encoding SAG1 of Lokal Isolate *Toxoplasma gondii* in *Escherichia coli* DH5 α . *J. Sain. Vet.* XX(2): 51-56.
- Hiswani. 2003. *Toxoplasmosis Penyakit Zoonosis yang Perlu di Waspadai oleh Ibu Hamil*. USU Digital Library.
- Homan, W.L., M. Vercammen, J. De Braekeleer, J. Verschueren. 2000. Identification of a 200 to 300 Fold Repetitive 529 bp DNA Fragment in *Toxoplasma gondii*, and Its Use for Diagnostic and Quantitative PCR. *Int. J. Parasitol.* 30: 69-75.
- Hoyaranda, E. 1996. *Toxoplasmosis*. Prodia Diagnostic Educational Service. 4 ISSN 0845-7173.
- Japardi dan Iskandar. 2002. *Sawar Darah Otak*. USU digital library.

- Jofisal, J. 2004. Komplikasi Neurologik HIV Aspek Patofisiologi. Diagnostik dan Terapi Neurona. 21 (4): 17-23.
- Kasper, L.H. 2001. *Toxoplasma* Infection. In: Braunwald, E., A.S. Fauci, D.L. Kasper, S.L. Hauser, D.L. Longo, J.L. Jameson. Harrison's Principles of Internal Medicine. 15 (eds). McGraw Hill. Pp. 1222.
- Kazemi, B. M. Bandepour, L. Maghen and G.H. Solgi. 2007. Gene Cloning of 30 kDa *Toxoplasma gondii* Tachyzoite Surface Antigen (SAG1). Iranian J.Parasitol. 2(2): 1-8.
- Knapen, V. and P.A.M. Overgaauw. 2008. Toxoplasmosis. EJCAP. Netherlands. Vol. 18.
- Krahenbuhl, J. L. and J.S. Remington. 1982. The Immunology of *Toxoplasma* and Toxoplasmosis. 2nd Edition. Blackwell Scientific Publications. Oxford. London. Edinburgh. Boston. Melbourne.
- Kusumawati, A., N. Septiana dan S. Hartati. 2011. DIGoxigen (DIG) Labeled Proba Candidate of Surface Antigen 1 (SAG1) for *Toxoplasma gondii* Detection. Indonesian J. Biotech. Vol. 16 (1): 17-23.
- Lambert, H., N. Hitziger, I. Dellacasa, M. Svensson, A. Barragan. 2006. Induction of Dendritic Cell Migration Upon *Toxoplasma gondii* Infection Potentiates Parasite Dissemination. Cell. Microbiol. 8: 1611–1623.
- Lappin, M.R. 1994. Feline Toxoplasmosis. Weltham Focus. 4(4): 2-8.
- Lekutis, C., D.J.P. Ferguson, M.E. Grigg, M. Camps and J.C. Boothroyd. 2001. Surface Antigens of *Toxoplasma gondii*: Variation on a Theme. Int. J. Parasitol. 31: 1285-1292.
- Levine, N. D. 1985. Protozoologi Veteriner. UGM Press. Yogyakarta.
- Levine, N. D. 1990. Buku Pelajaran Parasitologi Veteriner. Universitas Gajah Mada Press. Yogyakarta.
- Livingstone, C. 2008. Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice. 40.
- Lu, F.C. 1995. Toxicology: Fundamentals, Target Organ and Risk Assesment. Ed. 2: 230-235.
- Luft, B.J. and J.S. Remington. 1988. AIDS Commentary. Toxoplasmosis Encephalitis. J. Infect. Dis. 57. 1-6.

- Ma, G.Y., J.Z. Zhang, G.R. Yin, J.H. Zhang, X.L. Meng, F. Zhao. 2009. *Toxoplasma gondii*: Proteomic Analysis of Antigenicity of Soluble Tachyzoite Antigen. *J. Exp. Parasitol.* 122: 41-46.
- Macheri-Nagel. 2010. User Manual NucleoSpin® Tissue. Genomic DDA Tissue. Germany : 11-13.
- Majumder, P.D., S. Sudharshan, L. Therese and J. Biswas. 2011. Polymerase Chain Reaction in Ophthalmology. AIOS CME SERIES. 22.
- Mineo, J.R., and L.H. Kasper. 1994. Attachment of *Toxoplasma gondii* to Host Cells Involves Major Surface Protein, SAG-1 (P30). *Exp. Parasitol.* 79: 11-20.
- Montoya, J. G. and O. Liesenfeld. 2004. Toxoplasmosis. *Lancet.* 263: 1965-1975.
- Mordue, D.G., F. Monroy, M.L. Regina, C.A. Dinarello and L.D. Sibley. 2001. Acute Toxoplasmosis Leads to Lethal Overproduction of Th₁ Cytokines. *J. Immunol.* 167: 4574-4584.
- Morrisette, N. S. and L. D. Sibley. 2002. Cytoskeleton of apicomplexan Parasites. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66: 21-38.
- Mufasirin dan L. T. Suwanti. 2008. Deteksi *Toxoplasma gondii* pada Telur Ayam Buras yang Dijual sebagai Campuran Jamu di Kota Surabaya dengan Uji Biologis. *Media Kedokteran Hewan.* 24 (1): 9 – 14.
- Mufasirin. 2011. Workshop. Departemen Parasitologi Veteriner. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya.
- Nelson, R. W. and C.G. Couto. 2003. *Small Animal Medicine.* 3rd ed. Mosby Inc. St Louis, Missouri. 1296-1229.
- Nissapatorn, V., K. Adeeba, I. Init. 2002. Seroepidemiology of Toxoplasmosis Among HIV-Infected Patients and Healthy Blood Donors. *Med. J. Malaysia.* 57 (3): 304-310.
- Nissapatorn, V., C.K.C. Lee, A.A. Khairul. 2003. Seroprevalence of Toxoplasmosis among AIDS Patients and Healthy Blood Donors. *Med. J Malaysia.* 57 (3): 304-310.
- Priowidodo. 2003. Kajian Metode Diagnosis Toksoplasmosis secara Polymerase Chain Reaction (PCR) dan Pemeriksaan Histologis. Tesis. Yogyakarta. Universitas Gadjah Mada.

- Radovsky, A. and J.F. Mahler. 1999. Nervous System. In: R.R. Maronpot, G.A. Boorman, B.W. Gaul. Pathology of The Mouse Reference and Atlas. Cache River Press. 81-115.
- Reid, H. and R.J. Fallon. 1992. Bacterial Infections. In: J.H. Adams. Greenfield's Neuropathology. London. 5: 302-317.
- Resendes, A. R., S. Almeria, J. P. Dubey, E. Obon, C. Juan Salles, E. Degollada, F. Alegre, O. Cabezon, S. Pont and M. Domingo. 2002. Disseminated Toxoplasmosis in a Mediterranean Pregnant Risso's Dolphin (*Grampus griseus*) with Tranplacental Fetal Infection. J. Parasitol. 88: 1029-1032.
- Roberts, L.S. and Jr. Janovy. 2002. Gerald Schmidt dan Larry S. Robert's Foundations of Parasitology, 6th ed., Mc Graw Hill Book Co. Singapura: 127-132.
- Rubin, L.L. and J.M. Staddon. 1999. The Cell Biology of the Blood-Brain Barrier. Annu. Rev. Neurosci. 22: 11-28.
- Sabauste, C.S. 2004. Toxoplasmosis and HIV. In: HIV Insite Knowledge Base Chapter. University of Cincinnati College of Medicine.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning – A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sasmita, R. 2006. Toxoplasmosis Penyebab Keguguran dan Kelainan Bayi. Airlangga University Press. Surabaya.
- Sibley, L., G.M. Dana, S. Chunlei, M.R. Paul, K. Howe. 2002. Genetic Approaches to Studying Virulence and Pathogenesis in *Toxoplasma gondii*. Bio. Sci. 357: 81-88.
- Sibley, L., David, A. Khan, J.W. Ajioka, B.M. Rosenthal. 2009. Genetic Diversity of *Toxoplasma gondii* in Animals and Humans. J. Phil. Trans. R. Soc. B. 364: 2749-2761.
- Smith, H.L. and R.A. Hartskeerl. 1995. PCR Amplication Reactions in Parasitology. J. Microbiol. Vol. 23(1): 42-54.
- Sri Hartati, S. 2011. Toksoplasmosis pada Kucing Liar dan Amplikasinya Terhadap Kesehatan Masyarakat. Pidato Pengukuhan Jabatan Guru Besar. Universitas Gajah Mada, Yogyakarta.
- Subekti, D.T., W.T. Artama, T. Iskandar. 2005. Perkembangan Kasus dan Teknologi Diagnosis Toksoplasmosis. Lokakarya Nasional Penyakit Zoonosis. Balai Penelitian Veteriner. Bogor. Pp. 253-264.

- Susanto, L., T. Supali, S. Gandahusada. 2002. Penentuan Konsentrasi Minimal Gen B1 dan Gen P30 *Toxoplasma gondii* yang masih Terdeteksi dengan Reaksi Rantai *polymerase*. *Makara Kesehatan*. 6 (2): 64-70.
- Sze, G., and H.S. Lee. 1999. Cranial MRI and CT. In: H.S. Lee, K.C.V.G. Rao, R.A. Zimmerman, *Infectious Diseases*. 4th Ed. Philadelphia: McGraw-Hill. p. 453-516.
- Takashima, Y., K. Suzuki, X. Xuan, Y. Nishikawa, A. Unno and K. Kitoh. 2008. Detection of the initial site of *Toxoplasma gondii* reactivation in brain tissue. *Int. J. Parasitol.* 38(5): 601-607.
- Tenter, A.M., A.R. Heckerth, L.M. Weiss. 2000. *Toxoplasma gondii*: from Animals to Humans. *Int. J. Parasitol.* 30 (12-13): 1217-1258.
- Tomavo, S. 1996. The Major Surface Proteins of *Toxoplasma gondii*: Structure and Functions. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 219: 45-54.
- Weiss, L.M. and K. Kim. 2000. The Development and Biology of Bradizoite of *Toxoplasma gondii*. *Frontiers in Bioscience* 6: 391-405.
- W.H.O. 1979. Parasitic Zoonosis. Report of A WHO Expert Committee With The Participation of FAO. WHO Technical Report Series. 637: 35.
- Yuwono, T. 2006. Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction. Edisi Pertama. Yogyakarta. Penerbit Andi. Pp.1-237.
- Zlokovic, B.V. 2008. The Blood-Brain Barrier in Health and Chronic Neurodegenerative Disorders. *Neuron*. 57: 178-201.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Kadar Deoxyribonucleic Acid (DNA) pada otak mencit (*Mus musculus*)

HARI KE-	KADAR DNA PADA PERIODE	
	12 Jam Pertama	12 Jam Kedua
5	Tidak diperiksa	50,6 ng/ μ L
6	49,4 ng/ μ L	51,2 ng/ μ L
7	52,1 ng/ μ L	49,7 ng/ μ L
8	50 ng/ μ L	49,5 ng/ μ L
9	49,9 ng/ μ L	Mencit mati

Lampiran 2. *Toxoplasma gondii* gene for major surface antigen P30

GenBank: X14080.1

[FASTA Graphics](#)Go to:

LOCUS X14080 1634 bp DNA linear INV
09-SEP-2004

DEFINITION *Toxoplasma gondii* gene for major surface antigen P30.

ACCESSION X14080 M23658

VERSION X14080.1 GI:10722

KEYWORDS antigen; glycoprotein; membrane protein; P30 protein; surface

antigen.

SOURCE *Toxoplasma gondii*ORGANISM [Toxoplasma gondii](#)Eukaryota; Alveolata; Apicomplexa; Conoidasida; Coccidia; Eucoccidiorida; Eimeriorina; Sarcocystidae; *Toxoplasma*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1634)

AUTHORS Burg, J.L., Perelman, D., Kasper, L.H., Ware, P.L. and Boothroyd, J.C.

TITLE Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen

of *Toxoplasma gondii*

JOURNAL J. Immunol. 141 (10), 3584-3591 (1988)

PUBMED [3183382](#)COMMENT On Oct 1, 2004 this sequence version replaced gi:[161916](#).

There are two possible initiation codons for the P30

protein and

subsequently two possible precursor P30 proteins.

Data kindly reviewed (06-DEC-1989) by Burg J.L.

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1634
/organism="Toxoplasma gondii"
/mol_type="genomic DNA"
/db_xref="taxon:5811"
/clone="P30.5COS1 cosmid"
/clone_lib="genomic DNA in C2XB"
/dev_stage="tachyzoite"

[repeat region](#) 10..36
/note="27bp repeat"

[repeat region](#) 37..63
/note="27bp repeat"

[repeat region](#) 64..90
/note="27bp repeat"

[repeat region](#) 91..117
/note="27bp repeat"

[repeat region](#) 118..144
/note="27bp repeat"

[misc feature](#) 179..185
/note="minor transcription initiation site"

[misc feature](#) 214..217
/note="major transcription initiation site"

[CDS](#) 311..1321

```

/codon_start=1
/product="major surface antigen P30 precursor"
/protein_id="CAA32244.1"
/db_xref="GI:10723"
/db_xref="GOA:P13664"
/db_xref="InterPro:IPR007226"
/db_xref="PDB:1KZQ"
/db_xref="PDB:1YNT"
/db_xref="UniProtKB/Swiss-Prot:P13664"

```

```

/translation="MSVSLHHFIISSGFLTSMFPKAVRRAVTAGVFAAPTLMFLRCG
VMASDPPLVANQVVTCPDKKSTAAVILTPTENHFTLKCPKTALTEPPTLAYSQNRQIC
PAGTTSSCTSKAVTLSSLIPEAEDSWWTGDSASLDTAGIKLTVPIEKFPVTTQTFVVG
CIKGDDAQSCMVTVTVQARASSVNNVARCSYGADSTLGPVKLSAEGPTTMTLVCGKD
GVKVPQDNNQYCSGTTLTGCNEKSFKDILPKLTENPWQGNASSDKGATLTIKKEAFPA
ESKSVIIGCTGGSPKHHCTVKLEFAGAAGSAKSAAGTASHVSI FAMVIGLIGSIAAC
VA"

```

```

sig_peptide 311..541
CDS         362..1321
           /note="alternative"
           /codon_start=1
           /product="major surface antigen P30 precursor"
           /protein_id="CAA32245.1"
           /db_xref="GI:10725"
           /db_xref="GOA:P13664"
           /db_xref="InterPro:IPR007226"
           /db_xref="PDB:1KZQ"
           /db_xref="PDB:1YNT"
           /db_xref="UniProtKB/Swiss-Prot:P13664"

```

```

/translation="MFPKAVRRAVTAGVFAAPTLMFLRCGVMASDPPLVANQVVTCP
DKKSTAAVILTPTENHFTLKCPKTALTEPPTLAYSQNRQICPAGTTSSCTSKAVTLSS
LIPEAEDSWWTGDSASLDTAGIKLTVPIEKFPVTTQTFVVGCIKGDDAQSCMVTVTVQ
ARASSVNNVARCSYGADSTLGPVKLSAEGPTTMTLVCGKDGVKVPQDNNQYCSGTTL
TGCNEKSFKDILPKLTENPWQGNASSDKGATLTIKKEAFPAESKSVIIGCTGGSPKHH
HCTVKLEFAGAAGSAKSAAGTASHVSI FAMVIGLIGSIAACVA"

```

```

sig_peptide 362..541
mat_peptide 542..1318
           /product="major surface antigen P30"
polyA site 1471..1472
           /note="polyA addition site"

```

ORIGIN

```

1  cgcggtgttct aaccacaaac cttgagacgc ggtttccaac cacgcaccct gacacgcgtg
61  ttccaaccac gcaccctgag acgcggtgtc taaccacgca cctgagacg cgtggttctaa
121 ccacgcaccc tgagacgcgt gttctgccgc acaatgtgca cctgtaggaa gctgtagtca

```

181 ctgctgattc tcaactgttct cggcaagggc cgacgaccgg agtacagttt ttgtgggcag
 241 agccgttgty cagctttccg ttcttctcgg ttgtgtcaca tgtgtcattg tcgtgtaaac
 301 acacggttgt atgtcggttt cgctgcacca cttcattatt tcttctgggt ttttgacgag
 361 tatgtttccg aaggcagtga gacgcgccgt cacggcaggg gtgtttgccc cgcaccact
 421 gatgtcgttc ttgcgatgtg gcgttatggc atcggatccc cctcttgttg ccaatcaagt
 481 tgtcacctgc ccagataaaa aatcgacagc cgcggtcatt ctcacaccga cggagaacca
 541 cttcactctc aagtgccta aaacagcgct cacagagcct cccactcttg cgtactcacc
 601 caacaggcaa atctgccag cgggtactac aagtagctgt acatcaaagg ctgtaacatt
 661 gagctccttg attcctgaag cagaagatag ctggtggacg ggggattctg ctagtctcga
 721 cacggcaggg atcaaaactca cagttccaat cgagaagttc cccgtgacaa cgcagacggt
 781 tgtggtcggg tgcatacaagg gagacgacgc acagagttgt atggtcacgg tgacagtaca
 841 agccagagcc tcatcggctg tcaataatgt cgcaaggtgc tctacgggtg cagacagcac
 901 tcttggctct gtcaagttgt ctgcggaagg acccactaca atgaccctcg tgtgcgggaa
 961 agatggagtc aaagttcctc aagacaacaa tcagtactgt tccgggacga cgtgactgg
 1021 ttgcaacgag aaatcgttca aagatatttt gccaaaatta actgagaacc cgtggcaggg
 1081 taacgcttcg agtgataagg gtgccacgct aacgatcaag aaggaagcat tccagccga
 1141 gtcaaaaagc gtcattattg gatgcacagg gggatgcct gagaagcatc actgtaccgt
 1201 gaaactggag tttgccgggg ctgcagggtc agcaaatcg gctgcgggaa cagccagtca
 1261 cgtttccatt tttgccatgg tgatcggact tattggctct atcgcagctt gtgtcgcgtg
 1321 agtgatcacc gttgtgctca cttctcaaat cgacaaaagga aacacacttc gtgcagcatg
 1381 tgccccatta taaagaaact gagttgttcc gctgtggctt gcaggtgtca catccacaaa
 1441 aaccggccga ctctaaatag gagtgtttcc cagcaagcag cgaaagttta tgactgggtc
 1501 cgaatctctg aacggatgtg tggcggacct ggctgatgtt gatcgcctgc gacacacggc
 1561 ccacatgggt caatacaca gacagctatc agttgtttta gtcgaaccgg ttaacacaat
 1621 tcttgcccc ccga

Lampiran 2. Urutan basa nukleotida dalam *Plasmodium falciparum* *gene for major surface antigen P30*

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
full length 1634 CGCGTGTTCCTAACCACAAACCTTGAGACGCGTGTTCCTAACCCACGCACCCCTGACACGCGTGTTCCTAACCCACGCACCCCTGAGACGC
F
R

      110     120     130     140     150     160     170     180
full length 1634 CCCTGAGACGCGTGTTCCTAACCCACGCACCCCTGAGACGCGTGTTCCTGCGGCACAATGTGCACCTGTAGGAAGCTGTAGTCACTGC
F
R

      210     220     230     240     250     260     270     280
full length 1634 CGGCAAGGGCCGACGACCCGGAGTACAGTTTTTGTGGGCAGAGCCGTTGTGCAGCTTTCCGTTCTTCTCGGTTGTGTACATGTG
F
R

      310     320     330     340     350     360     370     380
full length 1634 ACACGGTTGTATGTCGGTTTCGCTGCACCACCTCATTATTTCTTCTGGTTTTTTGACGAGTATGTTTCCGAAGGCAGTGAGACG
F
R

      410     420     430     440     450     460     470     480
full length 1634 GTGTTTGCCTGCGCCACACTGATGTCGTTCTTGCATGTGGCGTTATGGCATCCGGATCCCCCTCTTGTTCGAATCAAGTTGTG
F
R

      510     520     530     540     550     560     570     580
full length 1634 AATCGACAGCCGCGGTCAATTCACACCCGACGGAGAACCACTTCACTCTCAAGTGCCCTAAAAACAGCGCTCACAGAGCCTCCCA
F
R
      TCACTCTCAAGTGCCCT
    
```

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

```

        610      620      630      640      650      660      670      680
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
full length 1634 CAACAGGC AAAATCTGCCAGCGGGTACTACAAGTAGCTGTACATCAAAGGCTGTAAACATTGAGCTCCTTGATTCTGAAGCAGA
F
R
-----

        710      720      730      740      750      760      770      780
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
full length 1634 GGGGATTCTGCTAGTCTCGACACGGCAGGCATCAAACCTCACAGTTCCAATCGAGAAGTTCCCGTGACAACGCAGACGTTTGTTG
F
R
-----

        810      820      830      840      850      860      870      880
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
full length 1634 GAGACGACGCACAGAGTTGTATGGTCACGGTGACAGTACAAGCCAGAGCCTCATCGGTCTGCAATAATGTCGCAAGGTGCTCCT
F
R
-----

        910      920      930      940      950      960      970      980
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
full length 1634 TCTTGGTCCTGTCAAGTTGTCTGCGGAAGGACCCACTACAATGACCCTCGTGTGCGGGAAAGATGGAGTCAAAGTTCCTCAAGA
F
R
-----

       1010     1020     1030     1040     1050     1060     1070     1080
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
full length 1634 TCCGGGACGACGCTGACTGGTTGCAACGAGAAAATCGTTCAAAGATATTTTGCCAAAATTAAC TGAGAACCCGTGGCAGGGTAAAC
F
R
-----

       1110     1120     1130     1140     1150     1160     1170     1180
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
full length 1634 GTGCCACGCTAACGATCAAGGAAGGAAGCATTTCAGCCGAGTCAAAAAGCGTCATTATTGGATGCACAGGGGGATCGCCTGAGA
F
R
-----

```

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

```
      1210      1220      1230      1240      1250      1260      1270      1280
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
full length 1634 GAAACTGGAGTTTGCCGGGGCTGCAGGGTCAGCAAAATCGGCTGCGGGAACAGCCAGTCACGTTTCCATTTTTGCCATGGTGAT
F
R
-----
      1310      1320      1330      1340      1350      1360      1370      1380
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
full length 1634 ATCGCAGCTTGTGTCGCGTGAGTGATCACCGTTGTGCTCACTTCTCAAATCGACAAAAGGAAACACACTTCGTGCAGCATGTGCC
F
R
      GAGTGATCACCGTTGTGCTGAATTCTCAA
-----
      1410      1420      1430      1440      1450      1460      1470      1480
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
full length 1634 GAGTTGTTCCGCTGTGGCTTGCAGGTGTACATCCACAAAAACGGCCGACTCTAAATAGGAGTGTTCGCAGCAAGCAGCGAA
F
R
-----
      1510      1520      1530      1540      1550      1560      1570      1580
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
full length 1634 CGAATCTCTGAACGGATGTGTGGCGGACCTGGCTGATGTTGATCGCCGTCGACACACGCGCCACATGGGTCAATACACAAGACA
F
R
-----
      1610      1620      1630
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
full length 1634 GTCGAACCGGTTAACACAATTCTTGCCCCCGA
F
R
-----
```

Lampiran 4. Pengambilan sampel otak mencit



Mencit dikorbankan dengan cara *Dislocatio capitis*



Mencit di preparasi dan disemprot dengan alkohol 70%



Membuka abdomen mencit dengan sayatan bentuk Y



Larutan NaCl fisiologis dimasukkan ke dalam abdomen mencit



Cairan intraperitoneal ditampung dalam tube



Kepala mencit dipisahkan dari tubuh mencit



Tempurung otak dibuka
kemudian diambil otaknya



Otak mencit dimasukkan ke
dalam tube dan disimpan di
suhu -20°C