PENGARUH SUHU DAN PEMBERIAN ZAT PELINDUNG PADA VIABILITAS DAN INFEKTIVITAS TAKHIZOIT *TOXOPLASMA GONDII*

(The Effect of Temperature and Additional Preservation Agents on the Viability and Infectivity of Tachyzoites *Toxoplasma gondii*)

TOLIBIN ISKANDAR, A. HUSEIN, dan S. WIDJAJANTI

Balai Penelitian Veteriner, 30, P.O. Box 151, Bogor 16114

ABSTRACT

Toxoplasmosis is a zoonotic disease caused by *Toxoplasma gondii*. Tachyzoites of *T. gondii* is one of the infective form which can be used as an antigen. The storage of tachyzoites as antigen is very important, especially for serological test. The viability and infectivity of tachyzoites from cat and sheep after storage were observed. Those isolates were stored at -70°C or -196°C and as preservative agents, Glycerol 10% and DMSO 10% was used. The results showed that the viability and infectivity of tachyzoites are longer and better after storage at -196°C with Glycerol 10%. However, as this observation is a preliminary study, further observations are still needed.

Key words : Tachyzoites, toxoplasmosis, temperature, preservation agents

PENDAHULUAN

Dengan makin majunya bidang peternakan di Indonesia, maka hubungan antara hewan dan manusia makin meningkat, terutama hewan ternak sebagai sumber protein hewani dan sebagai hewan kesayangan atau piaraan, sehingga peranan penyakit-penyakit zoonosis sebagai suatu kelompok penyakit pada manusia asal hewan (anthropozoonosis) makin penting. Salah satu penyakit yang dapat menjadi kendala untuk perkembangan ternak adalah toksoplasmosis yang disebabkan oleh *Toxoplasma gondii*.

Kejadian toksoplasmosis di Indonesia telah tersebar ke seluruh kepulauan nusantara. Survei yang dilakukan di berbagai daerah oleh para ahli menunjukkan prevalensi cukup tinggi (SASMITA *et al.*, 1988; KOESHARYONO, 1998; Iskandar, 1999). Protozoa ini merupakan parasit obligat intraselular yang menyerang semua hewan berdarah panas, burung dan manusia, dan selama infeksi berlangsung tidak memperlihatkan gejala klinis. Ketiga bentuk infeksi dari *T. gondii* adalah takhizoit atau tropozoit yang terdapat dalam cairan tubuh, bentuk kedua bradizoit atau kista terdapat dalam jaringan dan bentuk ketiga adalah sporozoit terdapat dalam ookista. Bentuk kista yang banyak ditemukan pada organ terutama otak, otot skelet dan jantung dari induk semang penderita. Kista dapat bertahan dalam tubuh selama perjalanan penyakit atau selama hidupnya, karena tidak dapat ditembus oleh kekebalan humoral maupun kekebalan selular (BEHNKE, 1990; KRAHENBUL dan REMINGTON, 1982).

Penyakit ini dapat menyebabkan abortus, kematian dan kelainan kongenital pada hewan penderitanya. Penularan dari hewan satu ke hewan lain dan juga dari

hewan ke manusia terjadi melalui konsumsi daging, susu maupun sayuran segar yang tidak dimasak dengan sempurna. Selain itu Toksoplasmosis dapat juga menyebabkan khorioenitis pada manusia karena infeksi kongenital, dan bersifat subklinis. Gejala klinis dapat timbul seperti demam, rasa tidak enak badan, sakit pada jaringan otot, pneumonia, radang selaput otak serta keguguran. Penyakit ini ditularkan melalui daging mentah atau daging setengah matang karena mengandung kista toksoplasma (GANDAHUSADA, 1995; KOESHARYONO, 1998; ISKANDAR, 1999; OKOLO, 1995). Infeksi toksoplasmosis selain melalui ookista dan kista di dalam jaringan yang tertelan, infeksi juga dapat terjadi pada janin di dalam kandungan induk yang menderita Toksoplasmosis (DUBEY, 1981). SASMITA *et al.* (1988) menyatakan bahwa daging kambing kemungkinan besar merupakan salah satu sumber infeksi *T. gondii* pada manusia.

Salah satu model hewan percobaan yang sangat peka toksoplasmosis adalah mencit (*Mus musculus*). Pada mencit bentuk takhizoit dapat membelah secara aktif, sehingga hewan ini dapat digunakan untuk memperbanyak takhizoit toksoplasma. Perbanyakannya takhizoit toksoplasma serta cara penyimpanannya sangat penting artinya dalam pembuatan antigen untuk uji serologi. Menurut DUBEY (1972), antigen kasar (*crude antigen*) maupun *stabilate* toksoplasma akan rusak dan mati, bila dibiarkan tanpa diberi zat pelindung selama 5 jam pada suhu 29°C .

Dalam tulisan ini akan diuraikan tentang cara penyimpanan takhizoit *T. gondii* pada berbagai suhu dan zat pelindung, sehingga dapat diketahui pengaruh suhu dan zat pelindung yang paling cocok dipakai, yang

mampu menjaga viabilitas dan infektifitas takhizoit toksoplasma tersebut.

METODOLOGI

Isolasi takhizoit Toksoplasma dari diafragma domba

Takhizoit toksoplasma diperoleh dari otot diafragma domba yang dipotong di rumah potong hewan (RPH). Sampel potongan otot diafragma dan sampel serum darah dikoleksi dari domba yang sama. Kemudian serum di uji dengan uji hemaglutinasi tidak langsung (IHA) untuk mengetahui titer antibodi terhadap *T. gondii* secara kualitatif. Jika titer antibodi $>1 : 2.048$, maka otot diafragma diproses dengan membebaskan fascia dari otot diafragma, kemudian dihancurkan dengan blender daging. Suspensi daging tersebut dicerna dengan larutan pepsin 2% pada suhu 37°C selama 30 menit (1:10). Suspensi hasil cerna dicuci dengan akuades, lalu diberi antibiotika penisilin 10.000 UI/ml dan streptomisin 10.000 $\mu\text{g/ml}$. Kemudian 1 ml. suspensi diinokulasikan pada mencit secara intra peritoneal (ip). Apabila setelah 30 hari pascainokulasi ditemukan kista pada otaknya, maka dilakukan pengambilan darah dari jantung. Menurut metode SOO *et al.* (1980) yang dimodifikasi, maka darah sebanyak 0,5 ml. diambil dengan menggunakan tabung suntik berheparin, lalu disuntikan pada mencit secara ip. setelah itu tingkah laku mencit diamati setiap hari untuk melihat kelainan yang mungkin terjadi. Empatbelas hari pasca inokulasi mencit tersebut disuntik dengan 1 ml. NaCl fisiologis secara ip., kemudian cairan tersebut disedot kembali. Beberapa tetes cairan tersebut dibuat preparat kemudian diamati di bawah mikroskop. Bila diketemukan parasit berbentuk seperti bulan sabit maka itulah bentuk takhizoit toksoplasma.

Isolasi takhizoit Toksoplasma dari tinja kucing

Sampel sebanyak 3 gram tinja kucing dicampur dengan air sebanyak 17 ml sehingga volume menjadi 20 ml. Sampel kemudian dihancurkan dengan alat pengaduk elektrik hingga homogen. Agar larutan sampel lebih jernih, tambahkan air secukupnya dan diamkan selama 15 menit, kemudian supernatannya dikoleksi secara perlahan menggunakan *vacum pump* sampai batas volume 20 ml. Tambahkan gula Sheather sebanyak 40 ml sehingga volume menjadi 60 ml. Dengan menggunakan pipet yang ujungnya dilengkapi saringan, cairan sampel diaduk supaya homogen, diambil 1 ml. dan dimasukkan ke dalam 2 kamar alat hitung Whitlock universal. Diamkan selama 2-5 menit agar ookista mengapung di permukaan, kemudian diperiksa dibawah mikroskop. Sesuai dengan metode yang digunakan DUBEY (1972), bila hasil pemeriksaan

uji apung ditemukan adanya ookista, maka sisa sampel sampel tinja yang positif tersebut diberi air, dibiarkan sampai lunak selama 1 hari, lalu disimpan pada suhu 4°C . Tinja diemulsikan menjadi pasta dan disuspensikan di dalam kira-kira 10 kali volume larutan gula Sheather (sukrosa 40% dalam air dengan 0,8% fenol sebagai pengawet). Suspensi disaring dengan saringan $710\ \mu\text{m}$ (Endecotts R) untuk menghilangkan partikel-partikel kasar. Filtratnya disentrifuse dengan kecepatan 3.000 rpm selama 10 menit. Supernatan di bagian permukaan dikoleksi sebanyak 2 ml dengan pipet Pasteur yang dilengkapi dengan bola karet, lalu dimasukkan ke dalam botol dan segera diberi 5 ml kalium bikromat 2%, kemudian disimpan pada suhu kamar selama 3-7 hari agar ookista bersporulasi, botol ditutup tidak rapat untuk mencegah penguapan. Larutan tersebut kemudian disaring melalui saringan berukuran $44\ \mu\text{m}$ dan bagian yang tertahan disemprot dengan akuabides. Selanjutnya, hasil penyaringan tersebut diatas diperiksa secara natif. Dinding ookista toksoplasma yang bersporulasi tersebut dipecah dengan vortek yang diberi glas bead sampai mengelupas dan diencerkan dengan NaCl fisiologis, kemudian disaring. Hasil saringan berupa takhizoit dengan NaCl fisiologis di campur dengan antibiotik. Kemudian disuntikan ke mencit secara ip dan diamati setiap hari sampai terjadi ascites atau mencit mati untuk diperiksa adanya takhizoit.

Penyimpanan takhizoit Toksoplasma

Larutan yang mengandung takhizoit dikoleksi pada botol *cryotube* 1,5 ml (Nunc) kemudian dicampur dengan DMSO 10%, atau gliserol 10% (Sigma) dan disimpan sebagai *stabilate*, secara langsung pada suhu -70°C dan -196°C . *Stabilate* juga bisa dibuat dari hasil passage pada mencit, cairan ascites dikoleksi (bila tidak ada ascites, suntik NaCl fisiologis intra peritoneal dan cairan dikoleksi lagi dengan spuit), periksa di bawah mikroskop, lalu ditambahkan DMSO ataupun glycerol dengan konsentrasi akhir 10%, homogenisir dan pindahkan ke dalam botol *cryotube* 1,5 ml. (Nunc) serta simpan langsung pada suhu -70°C dan -196°C . Hasil penyimpanan *stabilate* dicatat dalam berdasarkan isolat dan tanggal pembuatannya secara individual lalu diamati viabilitas dan infektifitasnya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampai saat ini Balitvet mempunyai 6 isolat *Toxoplasma gondii*, lima isolat diantaranya adalah isolat lokal sedangkan satu isolat lainnya asal import lewat UGM Yogyakarta. Tiap isolat diberi kode yang sesuai dengan asal hewan, yaitu Isolat D1 (asal domba 1), isolat D2 (asal domba 2), isolat D3 (asal domba 3), isolat K1 (asal kucing 1), isolat A1 (asal ayam 1) dan

isolat H1 (asal manusia). Setiap isolat tersebut di atas, diproses sesuai dengan tanggal pembuatannya, untuk kemudian disimpan beku dan diberi kode *stabilate* yang sedikit berbeda dengan kode isolat asalnya (Tabel 1). Isolat K1 asal kucing, dipasage pada mencit, dipanen, diproses dan disimpan dalam bentuk *stabilate* dengan beda tanggal pemrosesannya maka berbeda pula kode *stabilatenya*, yaitu Batox K1/1, Batox K1/2, Batox K1/3 dan Batox K1/4. Misalnya Batox K1/3 adalah isolat *Toxoplasma gondii* asal hewan kucing (K1) yang diproses pada pembuatan *stabilate* yang ketiga.

Dari Tabel 1 dapat dilihat bahwa beberapa batch stabilat telah habis, akan tetapi selalu ada sisa *batch stabilate* tersebut untuk mempertahankan isolatnya. Pengamatan ini masih berlangsung dan hasil pengamatan tentang viabilitas dan infektifitas takhizoit toksoplasma dapat dilihat pada Tabel 2. Pada awal pengamatan *stabilate* yang dipakai adalah isolat K1, yang dianggap sebagai kandidat bahan baku pembuatan antigen aglutinasi, ternyata isolat tersebut kurang

patogen sehingga pengamatan dilanjutkan dengan menggunakan isolat H1 dan D3.

Pada Tabel 2 terlihat bahwa bentuk takhizoit toksoplasma dengan glycerol 10% mampu menginfeksi mencit setelah disimpan selama 8 bulan 1 minggu pada -70°C atau 1 tahun pada -196°C . Sedangkan dengan DMSO 10% mampu menginfeksi mencit setelah disimpan selama 100 hari pada -70°C atau 168 hari pada -196°C . Hasil ini jauh lebih baik jika dibandingkan dengan hasil pengamatan sebelumnya. LIN *et al.*, (1995) menyatakan bahwa penyimpanan takhizoit dengan glycerol maupun DMSO pada suhu -20°C dan -60°C hanya mampu bertahan hidup dan infektif sampai dengan 8 minggu, sedangkan penyimpanan dengan DMSO pada -196°C mampu bertahan hidup dan infektif sampai dengan 8 tahun penyimpanan. Adanya perbedaan ini kemungkinan disebabkan oleh proses pendinginan *stabilate* yang berbeda, yaitu pendinginan cepat atau pendinginan bertahap.

Tabel 1. Daftar *stabilate* isolat *Toxoplasma gondii* yang dimiliki Balitvet

Identitas	Tanggal dibuat dan bentuk	Volume/Jumlah	Zat pelindung dan Suhu penyimpanan	Status
Isolat K1	25-5-2001	1,35 ml/ tube (1)	Glycerol 10%, - 70 °C	Habis
Batox K1/1	Takh+sp	1,35 ml/ tube (1)	DMSO 10%, - 196 °C	Habis
Isolat K1	28-5-2001	1,5 ml/tube (1)	DMSO 10%, - 196 °C	Habis
Batox K1/2	Sp.	1,5 ml/tube (1)	Glycerol 10%, - 70 °C	Habis
Isolat K1	21-9-2001	300µl/tube (4)	Glycerol 10%, - 70 °C	Habis
Batox K1/3	Takh+Sp			
Isolat K1	24-9-2001	300µl/tube (5)	DMSO 10%, - 70 °C	Habis
Batox K1/4	Takhizoit	300µl/tube (5)	Glycerol 10%, - 70 °C	3 tube
Isolat H1	20-6-2002	3 ml/tube (5)	Glycerol 10%, - 70 °C	5 tube
Batox H1/1	Sp			
Isolat D1	25-5-2001	0,6 ml/tube (1)	Glycerol 10%, - 70 °C	1 tube
Batox D1/1	Sp	0,6 ml/tube (1)	DMSO 10%, - 196 °C	1 tube
Isolat D2	28-5-2001	1,5 ml/tube (1)	DMSO 10%, - 196 °C	1 tube
Batox D2/1	Sp	1,5 ml/tube (1)	Glycerol 10%, - 70 °C	1 tube
Isolat D3	11-6-2002	300µl/tube (4)	DMSO 10%, - 196 °C	4 tube
Batox D3/1	Takh+Sp	300µl/tube (3)	Glycerol 10%, - 70 °C	3 tube
Isolat A1	25-5-2001	0,6 ml/tube (1)	Glycerol 10%, - 70 °C	1 tube
Batox A1/1	Takh+Sp			

Keterangan: Isolat K = asal kucing
 Isolat H = asal manusia (impor)
 Isolat D = asal domba
 Isolat A = asal ayam
 Takh = takhizoit toksoplasma
 Sp = sporosoit

Tabel 2. Hasil uji viabilitas dan infektifitas takhizoit *Toxoplasma gondii*

Zat pelindung, suhu penyimpanan dan bentuk parasit	Lama penyimpanan	Hasil pasage	Identifikasi
Glycerol 10% -70° C Takhizoit & Sporozoit	49 hari	Tumbuh	Batox K1/3
Glycerol 10% -70° C Takhizoit & Sporozoit	52 hari	Tumbuh	Batox K1/1
Glycerol 10% -70° C Takhizoit	8 bulan 1 minggu	Tumbuh	Batox K1/4
Glycerol 10% -196° C Sporozoit	1 tahun	Tumbuh	Batox K1/2
DMSO 10% -70° C Takhizoit	46 hari	Tumbuh	Batox K1/4
DMSO 10% -70° C Sporozoit	100 hari	Tumbuh	Batox K1/2
DMSO 10% -196° C Takhizoit & Sporozoit	168 hari	Tumbuh	Batox K1/1
Tanpa preservasi -70° C Tachyzoit	34 hari	Tumbuh	Batox D1/1a
Tanpa preservasi -70° C Tachyzoit	3 bulan	Tidak tumbuh	Batox D1/1a

Keterangan: K = isolat asal kucing
D = isolat asal domba

Dalam penelitian LIN *et al.* (1995), dikatakan bahwa DMSO lebih baik daripada glycerol. DUBEY (1972) menyatakan bahwa penyimpanan takhizoit tanpa zat pelindung mudah rusak dan mati pada suhu 29° C selama 5 jam, namun takhizoit tersebut masih mampu bertahan hidup dan infektif bila disimpan pada suhu 4° C selama 7 hari atau 34 hari pada suhu -70° C, meskipun tanpa zat pelindung. Pada dasarnya proses pembuatan dan penyimpanan *stabilate* sama dengan penyimpanan semen beku. Penambahan zat pelindung adalah untuk mencegah kematian karena perubahan suhu secara mendadak (*cold-shock*). Hal ini bisa dilihat dari Tabel 2 bahwasanya penambahan zat pelindung jauh lebih baik bila dibanding dengan tanpa zat pelindung.

KESIMPULAN DAN SARAN

Hasil penelitian ini menunjukkan pemberian zat pelindung dan suhu penyimpanan sangat berpengaruh terhadap viabilitas dan infektifitas takhizoit toksoplasma. Dalam hal ini Glycerol memberikan perlindungan yang lebih baik dibandingkan DMSO dan semakin dingin suhu penyimpanan maka takhizoit akan semakin lama bertahan hidup.

DAFTAR PUSTAKA

- BEHNKE, J.M. 1990. Parasites : Immunity and Pathology. The Consequences of Parasitic infection mammals. in Taylor and Francis, London, New York, Philadelphia. pp. 156-158.
- DUBEY, J. P. 1972. A simplified method for isolation of *Toxoplasma gondii* from the feces of cats. *J. Parasitol.* 58: 1005-1007.
- DUBEY, J.P. 1977. *Toxoplasma*, *Hammondia*, *Besnoitia* and *Sarcocystis*. Dalam *Parasitic Protozoa*, ed. J.P. KREIER, Academic Press, New York. 103-238.
- DUBEY, J.P. 1981. Isolation encysted *Toxoplasma gondii* from musculature of mouse and Pronghorn in Montana. *Am. J. Vet. Res.* 42: 126-127.
- GANDAHUSADA, S. 1995. Diagnosis dan Penatalaksanaan Toksoplasmosis. *Majalah Parasitol. Indonesia.* 5(1): 7-13.
- ISKANDAR, T. 1999. Tinjauan Tentang Toksoplasmosis pada Hewan dan Manusia. *Wartazoa.* 8(2):58-63.
- KOESHARYONO, C. 1998. Toksoplasmosis pada hewan piaraan. Kumpulan Makalah Seminar Sehari di Bandung.
- KRAHENBUHL, J.L. and J.S. REMINGTON. 1982. Immunology of Parasitic Infection. 2nd ed. Blackwell and Scientific Publication, Oxford.

- LIN, D.B., SU, K.E., and YU, J.C. 1995. Studies on Cryopreservation of *Toxoplasma gondii* and Its Antigenicity in Mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53(4): 392-396.
- SASMITA, R., R. ERNAWATI, dan M. SAMSUDDIN. 1988. Insiden Toksoplasmosis pada babi dan kambing di RPH Surabaya. *J. Parasitol. In.* 2:71-75.
- SOO, C.J., C.S. SOO, and C.T. SOH. 1980. Isolation of *Toxoplasma gondii* from congenital and acquired chorioretinitis cases. *J. Parasitol.* 11:39-42.
- OKOLO, M.I.O. 1995. Toxoplasmosis in Animal and The Public Health Aspect. *Int. J. Zoon.* 13:187-189.