

Buletin

VETERINER FARMA

Volume XVIII Nomor 1 Tahun 2022

**PEMBUATAN KIT TOKSOPLASMOSIS
TOMAT ALIH TEKNOLOGI
DARI BVET LAMPUNG KE PUSVETMA**

Evy Indah Setyorinie, Haris Firmansyah,
Putriani Endah Wijayanti, Ismail Budi
Wahyuri

**PENGAJIAN STABILITAS VAKSIN ANTHRASET[®]
PADA BERBAGAI SUHU (BERDASARKAN
JUMLAH KANDUNGAN SPORA DALAM VAKSIN)**

Dina Ristiana, Yanita Anjar Puspitasari, Edi Susanto

**PUSVETMA DAN PENYAKIT MULUT
DAN KUKU TAHUN 2022**

Sapto Rini Budi P



PUSAT VETERINER FARMA
DIREKTORAT JENDERAL PETERNAKAN DAN KESEHATAN HEWAN
KEMENTERIAN PERTANIAN

Pembuatan Kit Toksoplasmosis ToMAT Alih Teknologi dari BVet Lampung ke Pusvetma

Evy Indah Setyorinie¹, Haris Firmansyah¹, Putriani Endah Wijayanti¹ dan Ismail Budi Wahyuri¹

¹Pusat Veteriner Farma

Abstrak

Toksoplasmosis adalah penyakit yang bisa menular ke manusia yang disebabkan oleh *Toxoplasma gondii*. Kit diagnostik diperlukan untuk mendeteksi Toksoplasmosis. Teknik pengujian serologis dengan metode aglutinasi merupakan pilihan yang sesuai dan tepat. BVet Lampung berhasil membuat kit toksoplasmosis dengan dasar metode aglutinasi yang dinamakan Kit ToMAT. Pemanfaatan Kit ToMAT secara luas belum bisa dilaksanakan karena ada keterbatasan tupoksi BVet Lampung. Kegiatan alih teknologi dari BVet Lampung ke Pusvetma akan dilakukan agar Kit ToMAT dapat dimanfaatkan secara luas. Kegiatan alih teknologi Kit ToMAT dilakukan dengan mengikuti prinsip produksi dan pengujian yang telah dikembangkan oleh BVet Lampung. Prinsip produksi dan pengujian tersebut diverifikasi dan disesuaikan dengan kemampuan Pusvetma. Kegiatan alih teknologi Kit ToMAT juga dijalankan dengan mengikuti saran dari tim ahli dan bantuan BVet Lampung. Kit ToMAT telah berhasil diproduksi oleh Pusvetma. Namun, Kit ToMAT tersebut masih memerlukan uji validasi.

Kata Kunci: *Aglutinasi, Kit ToMAT, Toxoplasma gondii, Toksoplasmosis*

PENDAHULUAN

LATAR BELAKANG

Toksoplasmosis adalah penyakit yang bisa menular ke manusia yang disebabkan oleh *Toxoplasma gondii*. Penyakit Toksoplasma atau Toksoplasmosis telah ditetapkan melalui Keputusan Menteri Pertanian Nomor 4026/Kpts/OT.140/4/2013 sebagai salah satu jenis penyakit hewan menular strategis (PHMS) dan endemis di Indonesia. Toksoplasmosis bisa menyerang hewan berdarah panas, termasuk burung, ikan, kelinci, anjing, babi, kambing dan domba. Penularan ke manusia bisa disebabkan karena memakan daging dari hewan terinfeksi (mengandung kista) dalam keadaan setengah matang atau belum masak sempurna (Iskandar, 2008).

Infeksi parasit *T. gondii* pada kambing dan domba secara klinis sukar diketahui, dan hanya dapat dideteksi secara serologic (Halimatunisa, 2018). Teknik pengujian serologis dengan metode aglutinasi merupakan pilihan yang sesuai dan tepat ditinjau dari berbagai sisi. Pertama, *Office International des Epizooties* (OIE) merekomendasikan uji serologi aglutinasi, ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) dan IFA (*immunofluorescence assay*) untuk mengetahui prevalensi kasus dengan surveilans (OIE, 2017). Kedua, aglutinasi merupakan uji yang sederhana, akurat dan berbiaya lebih murah. Ketiga, dalam penerapannya, uji aglutinasi tidak memerlukan dukungan peralatan yang kompleks maupun sumberdaya manusia yang berkemampuan khusus sehingga dapat diterapkan pada berbagai jenjang laboratorium kesehatan hewan dan manusia (Valinata, 2020).

Balai Veteriner Lampung berhasil mengembangkan alat diagnostik terhadap Toksoplasmosis dengan basis aglutinasi yang diberi nama *Toxoplasmosis Modified Agglutination Test* atau yang dikenal dengan sebutan ToMAT. Pemanfaatan Kit ToMAT secara luas belum bisa dilaksanakan karena ada keterbatasan tupoksi BVet Lampung, oleh karena itu dengan dikoordinasi tim dari Direktorat Kesehatan Hewan diadakan kerjasama produksi Kit ToMAT antara BVet Lampung dengan PUSVETMA sebagai produsen vaksin dan kit diagnostik, dengan pendampingan pakar drh. Didik Tulus Subekti, M.Sc. dari Balai Besar Penelitian Veteriner (BBLitvet).

Tahapan awal yang dilakukan dalam produksi massal Kit ToMAT ini adalah alih teknologi dari BVet Lampung ke Pusvetma. Kegiatan pendampingan alih teknologi ini dilaksanakan di Pusvetma dengan mengundang tim narasumber dari BVet Lampung. Tahapan berikutnya adalah pembuatan antigen *Toxoplasma gondii* beserta formulasi

menjadi Kit ToMAT, kemudian proses validasi Kit ToMAT. Tahapan selanjutnya adalah registrasi dan kemudian *launching* produk Kit ToMAT serta harmonisasi penggunaan Kit ToMAT yang akan diikuti oleh BBVet, BVet dan Lab. Pengujian daerah sebagai pengguna Kit Tomat.

TINJAUAN PUSTAKA

Takizoit merupakan stadium dari *Toxoplasma gondii* yang bereplikasi dengan cepat. Takizoit ini dapat terdeteksi pada leukosit dari *host* atau bersirkulasi secara bebas di dalam peredaran darah. Takizoit memiliki bentuk berupa bulan sabit dengan ujung anterior yang lancip dan ujung posterior membulat serta berukuran sekitar 6-7 μm (Dubey *et al*, 1998).

Takizoit memiliki struktur antigenik yang dapat dikenali oleh antibodi. Struktur tersebut adalah protein P30 atau disebut juga sebagai *Surface Antigen 1* (SAG-1) (Kasper dan Khan, 1993). Protein ini spesifik hanya terdapat pada takizoit *Toxoplasma gondii* (Kasper *et al*, 1984), sehingga antibodi terhadap SAG-1 hanya dapat berikatan dengan takizoit. Spesifitas tersebut dan kemampuannya untuk bereplikasi dengan cepat membuat stadium takizoit dipilih untuk dikembangkan sebagai antigen pada uji serologi berbasis uji aglutinasi.

TUJUAN

Penelitian ini bertujuan untuk alih teknologi pembuatan Kit ToMAT dengan dasar kultur sel menggunakan sel Vero dari BVet Lampung ke Pusvetma.

MATERI DAN METODE

Propagasi Sel

Flask yang digunakan flask 25 ml cuci sel dengan PBS (2 ml), kemudian diberi *triple express*TM sebanyak 2 ml, inkubasi 10 menit di dalam inkubator 37°C, lalu masukkan suspensi sel ke dalam 2 flask dengan volume setiap flask 1 ml. Inkubasi di inkubator dengan suhu 37 °C setelah 24 jam ganti media agar tidak ada tripsin yang tertinggal.

Inokulasi Takizoit

Sel kultur yang sudah konfluen diinokulasi 1 ml takizoit (dengan kisaran jumlah $10^8 - 10^9$). Pada hari ke-1 sampai ke -3 sesudah inokulasi, media sel diganti dan media buangan ditampung

Panen Takizoit

Panen dilakukan setelah melalui pengamatan mikroskop terlihat takizoit yang cukup banyak (biasanya mulai hari ke-4). Panen dilakukan pada hari ke-4 sampai dengan ke-7 (atau sampai sel habis). Hasil panen ditampung, kemudian disaring menggunakan saringan sel, sesudah disaring, hasil panen disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit dengan suhu 4°C, buang supernatan, ganti dengan PBS, sentrifugasi lagi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit dengan suhu 4°C. Buang supernatan lalu jumlah takizoit kemudian dihitung dengan hemositometer.

Proses Inaktivasi

- Pembuatan Larutan Bufer Formalin (15%)

Formalin 36% sebanyak 15 ml dilarutkan dalam 85 ml PBS (*Phosphate Buffer Saline*) pH 7. Larutan difilter menggunakan filter 25 mikron, kemudian dihomogenisasi. Simpan larutan dalam suhu ruang.

- Pembuatan larutan Bufer Aseton (30%)

Aseton sebanyak 30 ml dilarutkan dalam 70 ml PBS dengan pH 7. Larutan difilter menggunakan filter 25 mikron, kemudian dihomogenisasi. Simpan dalam suhu ruang.

- Inaktivasi

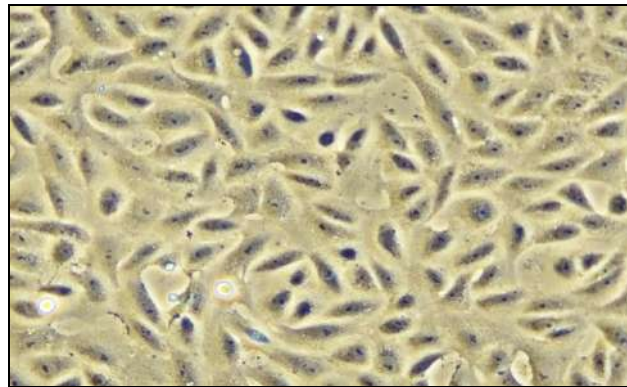
Endapan takizoit murni diresuspensi dengan inaktivasi bufer, dengan perbandingan antara takizoit dengan inaktifan 1:2. Inaktivasi menggunakan bufer formalin digunakan untuk deteksi IgG, endapan diresuspensi secara perlahan sampai semuanya terlarut dan membentuk suspensi yang baik. Suspensi disimpan pada refrigerator pada suhu 4°C selama minimal 24 jam. Inaktifasi menggunakan bufer aseton digunakan untuk deteksi IgM, endapan diresuspensi secara perlahan sampai semuanya terlarut dan membentuk suspensi yang baik. Suspensi disimpan pada refrigerator pada suhu 4°C selama minimal 72 jam. Suspensi takizoit yang sudah inaktif bisa disimpan pada refrigerator pada suhu 4°C sambil menunggu proses berikutnya.

Proses Formulasi

Pewarnaan dilakukan dengan dua jenis larutan pewarna dalam bufer borat yang telah ditambahkan *Bovine Serum Albumin* (BSA) dan sodium azid. Pewarna dengan Eosin (merah) digunakan untuk mewarnai kit untuk IgG, sedangkan pewarna *Methylene Blue* (biru) digunakan untuk mewarnai kit untuk IgM. Ruahan (*bulk*) takizoit diresuspensi dengan larutan bufer kit ToMAT secara perlahan dan sempurna agar tidak terjadi penggumpalan. Konsentrasi akhir dari ruahan takizoit pada larutan ToMAT adalah $10^6 - 10^7$ takizoit/ml. Evaluasi dispersi takizoit pada larutan ToMAT di bawah mikroskop. Kit yang sudah siap disimpan pada suhu 4°C.

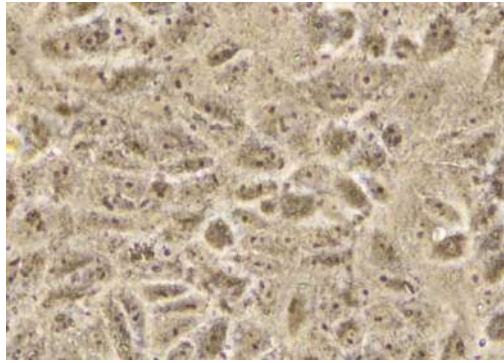
HASIL DAN PEMBAHASAN

Pembuatan kit ToMAT menggunakan sel vero yang telah konfluen untuk kultur takizoit yang akan digunakan sebagai antigen coating pada kit elisa tersebut. Sel vero digunakan untuk propagasi takizoit yang menghasilkan jumlah yang stabil dan minim kontaminasi dengan sel hospes. **Gambar 1** menunjukkan kondisi sel vero sebelum diinokulasi takizoit.

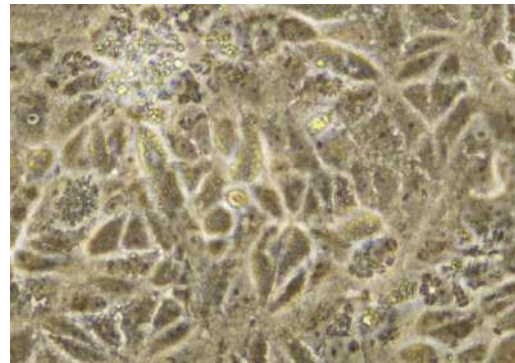


Gambar 1. Sel sebelum diinokulasi takizoit

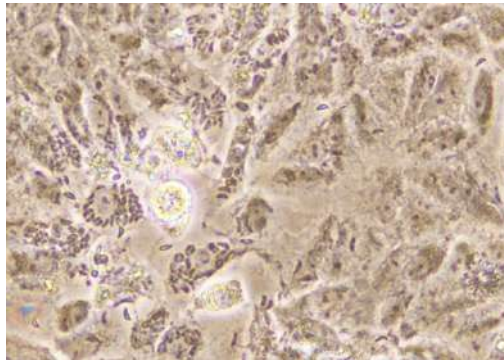
Setelah sel vero konfluen sekitar 3-4 hari, sel vero di inokulasi 1 ml suspensi takizoit. Sel kemudian diobservasi selama 5-7 hari. **Gambar 2** menunjukkan gambaran sel yang diinokulasi takizoit.



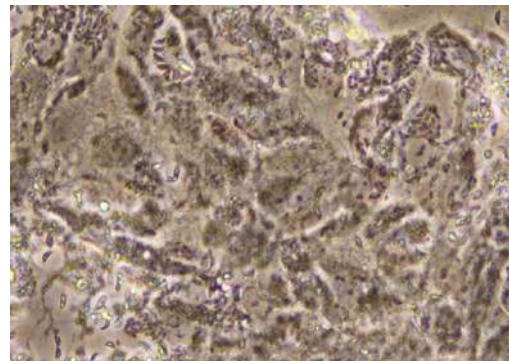
a. Hari pertama (400x)



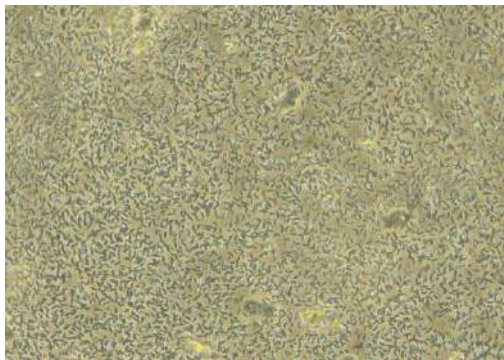
b. Hari kedua (400x)



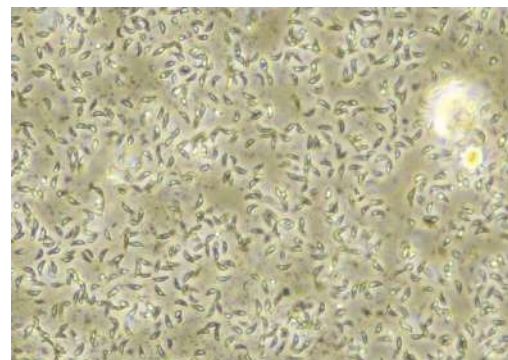
c. Hari ketiga (400x)



d. Hari keempat (400x)



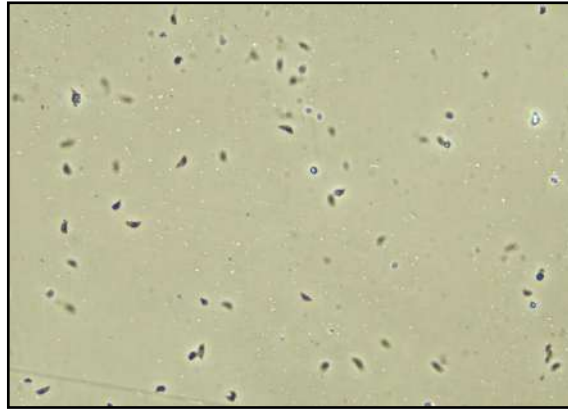
e. Hari kelima (200x)



f. Hari keenam (400x)

Gambar 2. Sel Vero sesudah diinokulasi takizoit dari hari ke-1 hingga ke-5

Proses penyaringan dilakukan untuk memperoleh takizoit murni tanpa debris-debris. Inaktivasi yang digunakan adalah formaldehid dan aseton, untuk formaldehid proses inaktivasi dilakukan selama 24 jam, sedangkan aseton dilakukan selama 72 jam. **Gambar 3** dibawah ini memperlihatkan gambaran takizoit yang sudah melalui proses purifikasi dan inaktivasi.



Gambar 3. Takizoit yang telah dipurifikasi dan inaktivasi

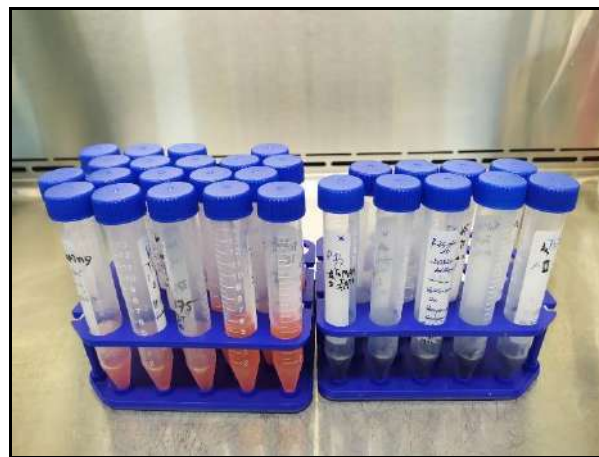
Formulasi dilakukan segera sesudah proses inaktivasi berakhir. Pewarnaan dilakukan dengan dua jenis pewarna. Pewarna dengan Eosin (merah) digunakan untuk mewarnai kit untuk IgG, sedangkan pewarna *Methylene Blue* (Biru) digunakan untuk mewarnai kit untuk IgM. **Gambar 4** menunjukkan suspensi ToMAT yang dihasilkan. Sebelum diwarnai hasil panen takizoit dihitung menggunakan hemositometer untuk menentukan konsentrasi takizoit.

Tabel 1. Hasil Formulasi Kit ToMAT Merah dan Kit ToMAT Biru

HASIL FORMULASI KIT ToMAT MERAH				HASIL FORMULASI KIT ToMAT BIRU			
No.	Tgl Panen	Jumlah (ml)	Jumlah Takizoit	No.	Tgl Panen	Jumlah (ml)	Jumlah Takizoit
1	21/06/2021	5	10^7	1	12/06/2021	5	10^7
2	21/06/2021	5	10^7	2	12/06/2021	5	10^7
3	22/06/2021	5	10^7	3	24/06/2021	1	10^7
4	18/06/2021	5	10^7	4	25/06/2021	1	10^7
5	27/06/2021	1	10^7	5	29/06/2021	1	10^7
6	18/06/2021	5	10^7	6	08/07/2021	1	10^7
7	29/06/2021	1	10^7	7	08/07/2021	1	10^7
8	29/06/2021	1	10^7	8	08/07/2021	1	10^7
9	24/06/2021	1	10^7	9	09/07/2021	1	10^7
10	07/07/2021	1	10^7	10	09/07/2021	1	10^7
11	08/07/2021	1	10^7	11	26/07/2021	8	2×10^7
12	24/06/2021	1	10^7	12	19/07/2021	0,4	$1,13 \times 10^7$
13	07/07/2021	1	10^7	13	29/07/2021	1	6×10^6
14	08/07/2021	1	10^7	14	16/08/2021	1	$3,9 \times 10^7$
15	19/06/2021	1	10^7	15	16/08/2021	2	$2,6 \times 10^7$
16	06/07/2021	1	10^7	16	17/08/2021	8	$1,6 \times 10^7$
17	20/06/2021	1	10^7	17	19/08/2021	2	$1,8 \times 10^7$
18	29/06/2021	1	10^7	18	21/08/2021	1	$4,25 \times 10^7$
19	30/06/2021	1	10^7	19	21/08/2021	1	4×10^6

20	21/06/2021	1	10^7
21	22/06/2021	5	10^7
22	21/07/2021	2	2×10^7
23	16/07/2021	2	10^7
24	21/07/2021	2	$1,5 \times 10^7$
25	01/07/2021	4	10^7
26	12/07/2021	2	$2,2 \times 10^7$
27	23/07/2021	8	$1,25 \times 10^7$
28	23/07/2021	8	$1,25 \times 10^7$

20	24/08/2021	1	5×10^5
21	05/08/2021	1	10^7
22	27/08/2021	1	10^7
23	09/09/2021	1	10^7
24	23/08/2021	1	10^7



Gambar 4. Suspensi ToMAT yang telah diformulasi.
Kiri : Suspensi ToMAT merah; Kanan: Suspensi ToMAT biru

Pada proses alih teknologi Kit ToMAT di Pusvetma, dikembangkan antigen *Toxoplasma gondii* dengan dasar *tissue cultur* pada sel vero. *Toxoplasma gondii* bisa menginfeksi berbagai macam jenis sel, tetapi perkembangbiakan yang terbaik dalam penelitian ini didapatkan dengan memakai sel vero. Inokulasi dilakukan pada sel vero yang telah konfluen menggunakan 1 ml takizoit dengan jumlah 10^8 pada flask 25 cm². Bentuk Rosset mulai muncul pada hari ke-3 dan panen Takizoit bisa dilakukan mulai hari ke-4 sampai ke-6.

Kit ToMAT yang sudah dibuat oleh BVet Lampung, merupakan uji serologi berbasis uji aglutinasi untuk mendeteksi antibodi terhadap *Toxoplasma gondii* (*T.gondii*) dan memiliki dua varian, yaitu ToMAT merah untuk mendeteksi antibodi pada kasus akut dan kronis Toksoplasmosis dan ToMAT biru digunakan untuk mendeteksi kasus akut Toksoplasmosis (Valinata, 2020).

Hasil Kit ToMat di BVet Lampung (Valinata, 2020) mempunyai hasil sensitifitas dan spesifisitas diagnostik masing-masing sebesar 98,55% dan 86,21%, dengan demikian kemampuan Kit ToMAT dalam mendeteksi individu yang positif toksoplasmosis sebesar 98,55% dan kemampuan mendeteksi individu yang sehat sebesar 86,21%. Pada kit ToMAT, akurasi yang diperoleh adalah 94,9% yang secara umum menunjukkan ketepatan diagnosis terhadap individu yang diuji.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kit ToMAT untuk IgM dan IgG berhasil dibuat. Langkah selanjutnya diperlukan proses validasi untuk menghitung sensitivitas dan spesivitas Kit Tomat yang dihasilkan.

DAFTAR PUSTAKA

- Dubey, J.P., Lindsay, D.S., & Speer, C.A., 1998. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(2): 267-299
- Halimatunisa, F., Prabowo, A.Y., 2018. Diagnosis *Toxoplasma gondii* dan Toksoplasmosis. *Medula*, 8(1): 127-130
- Iskandar, T., 2008. Penyakit Toksoplasmosis pada Kambing dan Domba di Jawa. *Wartazoa*, 18(3): 157-166.
- Kasper, L.H. & Khan, I.A., 1993. Role of P30 in Host Immunity and Pathogenesis of *T.gondii* Infection. *Research in Immunology*, 144(1): 45-48
- Kasper, L.H., Bradley, M.S. & Pfefferkorn, E.R., 1984. Identification of Stage-Specific Sporozoite Antigens of *Toxoplasma gondii* by Monoclonal Antibodies. *Journal of Immunology*, 132(1): 443-449
- Valinata, S., Sulinawati, Subekti, D.K., 2020. Evaluasi Performa dan Kesesuaian Uji Antara Uji Aglutinasi *Toxoplasma Modified Agglutination Test* dengan Berbagai Kit Uji Serologis Komersial. *Jurnal Veteriner*, 21(2): 278-291