

PENENTUAN KONSENTRASI MINIMAL GEN B1 DAN GEN P30 TOXOPLASMA GONDII YANG MASIH TERDETEKSI DENGAN REAKSI RANTAI POLIMERASE

Lisawati Susanto, Taniawati Supali, dan Srisasi Gandahusada

Bagian Parasitologi, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jl. Salemba Raya No. 6. Jakarta 10430

Abstrak

Toxoplasma gondii adalah protozoa intraselular yang dapat menyebabkan toksoplasmosis. Jenis pemeriksaan yang banyak dilakukan untuk diagnosis toksoplasmosis pada saat ini adalah pemeriksaan serologi (*enzyme-linked immunosorbent assay* / ELISA) untuk mendeteksi zat anti IgG dan IgM terhadap *T.gondii* di dalam serum, namun pemeriksaan serologi ini tidak adekuat. Oleh karena itu diperlukan pemeriksaan laboratorium yang tepat untuk mendiagnosis toksoplasmosis akut, dan dalam hal ini PCR merupakan teknik yang terpilih. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan konsentrasi minimal DNA *T.gondii* yang masih dapat terdeteksi oleh PCR dengan menggunakan target gen B1 dan gen P30 *T.gondii*. PCR terhadap target gen B1 dilakukan menurut metode Chang & Ho dan gen P30 menurut metode Weiss dkk. dan Chang & Ho. *Primer* gen B1 terdiri dari oligo 1 : 5'GGAAGTGCATCCGTTTCATGAG3' dan oligo 2 : 5'TCTTTAAAGCGTTCGTG GTC3'. *Primer* gen P30 terdiri dari oligo 1 : 5'CACACGGTTGTATGTTCGGTTTCGCT3' dan oligo 2 : 5'TCAAGGAGCTCAATG TTACAG CCT3'. Pada penelitian ini, PCR dengan target gen P30 yang dilakukan menurut metode Weiss dkk. memberikan pita yang spesifik dan tidak spesifik. Pada metode Chang & Ho penggunaan siklus sebanyak 30, 35, 40 dan 45 siklus tidak memberikan gambaran pita, sedangkan penggunaan 50 siklus baru memberikan hasil pita spesifik *T.gondii* pada elektroforesis. Dapat disimpulkan bahwa uji yang menggunakan target gen B1 lebih sensitif dibandingkan dengan gen P30.

Abstract

Toxoplasma gondii is an intracellular protozoan which causes toxoplasmosis. A serological test (ELISA) for detecting the presence of IgG and IgM antibodies against *T.gondii* is usually performed nowadays, however this serological test is not adequate. Therefore an accurate laboratory test is needed for diagnosing acute toxoplasmosis, and in this case the polymerase chain reaction (PCR) is the method of choice. The aim of this study is to assess the minimal concentration of the DNA of *T.gondii* which still can be detected by the PCR using B1 and P30 genes as targets. The PCR against B1 gene as target was performed by using the method described by Chang & Ho. Two methods described by Weiss et al and Chang & Ho were used against P30 gene as target. The B1 gene primers consisted of oligo 1 :5'GGAAGTGCATCCGTTTCAGAG 3' and oligo 2 : 5'TCTTTAAAGCGTTCGTGGTTC3', whereas the P30 gene primers consisted of oligo 1 : 5'CACACGGTTGTATGTTCGGTTTCGCT3' and oligo 2 : 5'TCAAGGAGCTCAATGTTACAGCCT3'. It was shown that no specific bands were observed in the PCR with P30 gene as target using the method by Weiss et al. With the method Chang & Ho the electrophoresis did not show any band when 30, 35, 40 and 45 cycles of PCR were used however, by using 50 cycles a specific band was observed. It was concluded that the assay using B1 gene as target was more sensitive than the one using P30 gene as target.

Key words : *Toxoplasma gondii*, B1 gene, P30 gene, PCR

Pendahuluan

Prevalensi *Toxoplasma gondii* di Indonesia 2-63%¹. Pada orang sehat (imunokompeten) infeksi biasanya tidak disertai gejala klinis (asintomatik), sedangkan pada penderita imunokompromais misalnya AIDS infeksi dapat berakibat fatal². Infeksi primer pada wanita hamil dapat mengakibatkan terjadinya abortus, cacat fetus dan kelahiran mati. Pemeriksaan laboratorium mutlak diperlukan untuk menentukan adanya infeksi *T.gondii* akut, sehingga pengobatan dapat diberikan dengan segera untuk menghindari kerusakan lebih lanjut.

Pemeriksaan yang terbanyak dilakukan pada saat ini⁶⁴ adalah pemeriksaan dengan *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) untuk mendeteksi zat anti IgG dan IgM terhadap *T.gondii* di dalam serum. Pemeriksaan serologi ini memberikan hasil yang memuaskan pada penderita imunokompeten dengan infeksi primer atau reaktivasi akut, namun pada penderita imunokompromais yang kemampuan membentuk antibodi berkurang, hasilnya kurang memuaskan³. Selain itu, IgM spesifik terhadap *T.gondii* kadang-kadang dapat menetap bertahun-tahun dan pada bayi terlambat terbentuk sehingga menimbulkan kesulitan dalam menentukan waktu terjadinya infeksi⁴.

Teknik diagnosis mutakhir seperti reaksi rantai polimerase (*polymerase chain reaction/PCR*) telah digunakan untuk mendiagnosis toksoplasmosis akut⁵. PCR adalah suatu teknik *in vitro* untuk memperbanyak DNA (amplifikasi) secara enzimatis melalui proses sintesis DNA baru secara berulang. Diagnosis toksoplasmosis dengan teknik PCR ini dapat mendeteksi 10 organisme atau kurang dalam 10⁵ leukosit manusia⁶, dan bersifat spesifik⁷⁻⁸.

Ada 2 target gen yaitu gen B1 dan gen P30, tetapi belum ditentukan konsentrasi minimal DNA yang masih terdeteksi oleh masing-masing gen. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi DNA *T.gondii* di dalam darah manusia dengan PCR menggunakan target gen B1 dan gen P30 serta menentukan konsentrasi minimal DNA *T.gondii* dalam darah yang masih terdeteksi oleh PCR dengan target gen B1 dan gen P30 dengan cara ekstraksi DNA yang sederhana. Apabila konsentrasi minimal dari masing-masing gen yang akan dideteksi diketahui maka diharapkan dapat memberi keterangan target gen mana yang sebaiknya dipilih untuk mendeteksi DNA *T.gondii* dengan menggunakan PCR.

Metode Penelitian

Sebanyak 0,02 ml cairan yang mengandung takizoit *T.gondii* strain RH yang diperoleh dari *Institute for Medical Research*, Malaysia diinokulasikan ke dalam rongga peritoneum mencit albino yang berumur 4-6 minggu. Setelah 4 hari, mencit tersebut diperiksa cairan peritoneumnya apakah mengandung takizoit *T.gondii*. Apabila ternyata mengandung takizoit maka cairan peritoneum dikumpulkan sambil dibilas dengan NaCl 0,9% berulang kali sampai cairan bilas terlihat jernih. Setelah cairan bilas dipaksa ke luar dari spuit 50 ml melalui jarum ukuran 27 agar sel makrofag yang mengandung takizoit rusak sehingga didapat takizoit bebas. Cairan yang mengandung takizoit bebas ini kemudian disaring melalui filter yang mempunyai pori dengan ukuran 3 mikron, lalu disentrifus 600 x g selama 10 menit. Supernatan dibuang dan endapan dicuci sebanyak 3 kali dengan NaCl 0,9%. Ke dalam endapan takizoit ditambahkan gliserol 20% dalam *phosphate buffer saline* (PBS) pH 7,4. Jumlah takizoit dihitung dengan hemositometer. Setelah itu disimpan pada suhu -70°C sampai digunakan untuk isolasi DNA takizoit yang dilakukan menurut metode Supali dkk.⁹

Pada penelitian ini isolasi DNA dilakukan pada 2 macam bahan pemeriksaan yaitu pada darah manusia sehat (tidak terinfeksi *T.gondii* pada pemeriksaan ELISA) dan pada bermacam-macam pengenceran suspensi takizoit *T.gondii* dalam 99 µl darah manusia sehat.

Ke dalam masing-masing tabung Eppendorf 1,5 ml dimasukkan 99 µl darah manusia sehat yang telah diberi antikoagulan EDTA dan dicampur dengan 1 µl suspensi takizoit *T.gondii* yang masing-masing mengandung 1000, 100, 50, 40, 30, 20, 10, 5 dan 1 takizoit. Setelah itu dilakukan pencucian dengan larutan Tris-EDTA (TE) dan dikocok dengan vorteks selama 1 menit serta disentrifus dengan kecepatan 14.000 x g. Supernatan dibuang dan prosedur ini dilakukan sebanyak 3 kali. Setelah itu ke dalam pelet ditambahkan larutan RCLB dan dilakukan pencucian sebanyak 3 kali. Setelah pencucian terakhir, supernatan dibuang dan ke dalam pelet dimasukkan 200 µl larutan DSP dan dikocok dengan vorteks selama 1 menit. suspensi ini kemudian diinkubasi selama 4 jam di dalam *waterbath* dengan suhu 65°C dan dikocok dengan vorteks setiap jam. Kemudian suhu ditingkatkan sampai 90-95°C selama 10-15 menit. Suspensi disentrifus agar mengendap di dasar tabung, kemudian disimpan dalam *freezer* -20°C sampai digunakan pada reaksi rantai polimerase.

Isolasi DNA darah manusia sehat dilakukan dengan cara mengambil 5 ml darah manusia sehat yang dicampur dalam EDTA dengan konsentrasi akhir 100 mM EDTA. Ke dalam tabung Eppendorf 1,5 ml dimasukkan 100 μ l darah manusia sehat tersebut. Setelah itu dilakukan isolasi DNA seperti yang dilakukan untuk isolasi DNA takizoit *T.gondii*. Berbagai macam konsentrasi pengenceran DNA murni *T.gondii* (stok bagian Parasitologi FKUI dengan konsentrasi 150 ng/ μ l) dimasukkan ke dalam 100 μ l darah manusia sehat yang sudah diisolasi. Larutan ini kemudian disimpan dalam freezer -20°C sampai digunakan pada reaksi rantai polimerase.

Perbanyak DNA dengan target gen B1 *T.gondii* menurut Chang & Ho. Ke dalam tabung Eppendorf 0,5 ml dimasukkan 0,5 μ l 10 x larutan dapar, 2 mM MgCl₂, masing-masing 200 μ M deoksinukleosida trifosfat, masing-masing 15 pmol *primer* gen B1, suspensi DNA dan 2,5 unit taq polimerase dalam 50 μ l larutan PCR. Oligo 1 (5'GGAAGTGCATCCCTTCATAG3') dan oligo 2 (5'TCTTTAAAGCGTTTCGTG GTC3'). Oligo 1 adalah oligonukleotida untuk daerah 694-714 dan oligo 2 untuk daerah 887-868. Pada bagian atas campuran tersebut diberi *mineral oil* untuk mencegah penguapan. PCR dilakukan sebanyak 30, 35, 40, 45 dan 50 siklus¹⁰ di dalam mesin DNA *thermal cycler* (Perkin-Elmer Cetus). Mula-mula dilakukan denaturasi awal pada suhu denaturasi awal 94°C selama 10 menit kemudian untuk setiap siklus diikuti dengan tahap denaturasi 94°C selama 1 menit, tahap penempelan *primer* 60°C selama 15 detik, sintesis DNA 72°C selama 45 detik dan dilanjutkan dengan inkubasi akhir pada suhu 72°C selama 7 menit.

Perbanyak DNA dengan target gen P30 dilakukan menurut Weiss dkk.⁵ dengan jumlah siklus sebanyak 30 dan menurut Chang & Ho¹⁰ dengan jumlah siklus sebanyak 30, 35, 40, 45 dan 50. Oligo 1 : 5'CACACGGTTGTATGTCGGTTTCGCT3' dan oligo 2 : 5'TCAAGG AGCTCAA TGTTACAGCCT3' *primer* gen P30. Oligo 1 adalah oligonukleotida untuk daerah 326-350 dan oligo 2 untuk daerah 649-672. Suhu reaksi yang digunakan oleh Weiss dkk.⁵ adalah sebagai berikut: denaturasi awal pada suhu 95°C selama 1 menit, penempelan *primer* pada suhu 45°C selama 2 menit dan sintesis DNA pada suhu 72°C selama 3 menit dan dilanjutkan dengan inkubasi akhir pada suhu 72°C selama 10 menit.

Pemeriksaan hasil PCR dilakukan dengan cara memasukkan campuran 8 μ l sampel DNA dan 2 μ l 5 x *loading dye* ke dalam sumur-sumur agarose gel 2%. Sebagai petanda (*marker*) digunakan 10 μ l ϕ x 174 Hae III dengan konsentrasi 20 ng/ μ l. Setelah itu dilakukan elektroforesis 65 volt selama 2 jam. Setelah itu agarose gel diwarnai dengan etidium bromida (10 mg/ml) selama 1 menit kemudian dicuci dengan akuades dan difoto dengan pencahayaan ultraviolet menggunakan transiluminator.

Dalam penelitian ini yang dimaksud dengan sensitivitas adalah konsentrasi DNA terkecil yang masih memberikan pita spesifik DNA *T.gondii* pada pemeriksaan elektroforesis. Sedangkan spesifisitas dalam penelitian ini adalah sifat *primer* gen B1 dan gen P30 *T.gondii* yang hanya dapat membentuk DNA *T.gondii* saja dan tidak dapat bereaksi dengan DNA manusia (Promega, USA) dan DNA manusia yang diisolasi.

Hasil dan Pembahasan

Pada analisis hasil amplifikasi (elektroforesis dengan agarose gel 2%, pewarnaan etidium bromida) didapatkan bahwa fragmen hasil amplifikasi gen B1 yang ditentukan dengan menggunakan petanda ϕ x 174 Hae III menunjukkan panjang 193 pasangan basa (base pairs/bp) sedangkan fragmen dengan panjang 347 pasangan basa dihasilkan oleh amplifikasi gen P30.

Amplifikasi DNA *T.gondii* dengan gen B1 menggunakan 30, 35, 40, 45 siklus menurut Chang & Ho¹⁰ tidak memberikan hasil positif yaitu tidak memberikan pita spesifik 193 pasangan basa pada pemeriksaan dengan elektroforesis. Hasil positif baru didapat bila amplifikasi dilakukan sebanyak 50 siklus.

Penentuan konsentrasi minimal DNA murni *T.gondii* yang masih dapat terdeteksi oleh PCR pada target gen B1 dilakukan dengan amplifikasi berbagai konsentrasi DNA murni *T.gondii* yaitu : 5 ng; 2,5 ng; 1 ng; 0,1 ng; 0,01 ng; 1 pg; 0,001 ng dan 0,0001 ng dalam 50 μ l larutan PCR. Pada pemeriksaan dengan elektroforesis didapatkan pita spesifik *T.gondii* sampai konsentrasi 0,0001 ng.

Pada penelitian ini PCR dengan target gen B1 menurut metode Chang & Ho¹⁰ baru berhasil saat digunakan 50 siklus dan hal ini sesuai dengan pendapat Newton & Graham¹¹ yang mengatakan bila tidak ada produk PCR yang terlihat maka untuk mengatasi hal ini dapat dilakukan peningkatan jumlah siklus. Jumlah siklus yang diperlukan untuk amplifikasi gen B1 lebih sedikit daripada metode Chang & Ho karena mereka menggunakan 55 siklus.

Pada pengenceran DNA murni *T.gondii* dengan DNA darah manusia sehat terdapat konsentrasi akhir DNA murni *T.gondii* sebesar 25 ng; 10 ng; 5 ng; 2,5 ng; 1 ng; 0,1 ng; 0,01 ng; 0,001 ng dan 0,0001 ng dalam 50 µl larutan PCR. Setelah dilakukan amplifikasi ternyata pita spesifik *T.gondii* terlihat sampai pengenceran 0,001 ng.

Hasil penelitian yang didapat menunjukkan bahwa DNA murni *T. gondii* masih dapat terdeteksi sampai konsentrasi 0,01 pg dengan target gen B1 untuk amplifikasi. Burg dkk.¹² yang menggunakan 60 siklus dengan denaturasi 93°C selama 1 menit, penempelan *primer* 55°C selama 1-2 menit dan sintesis DNA 72°C selama 1,5-3 menit diikuti dengan inkubasi akhir 72°C selama 5 menit dapat mendeteksi DNA dari lisat 1 parasit, dan karena 1 organisme mengandung 0,96 pg DNA¹³ maka metode yang dipakai pada penelitian ini lebih sensitif dari penelitian Burg dkk.¹².

Pada pengenceran DNA murni dengan DNA darah manusia sehat yang dilakukan dalam penelitian ini, pita spesifik *T.gondii* (193 bp) terlihat pada pengenceran DNA murni hingga 1 pg. Oleh karena Burg dkk.¹² dapat mendeteksi hingga 10 organisme (9,6 pg) dalam 10⁵ leukosit, maka sensitivitas penelitian ini lebih baik dibandingkan dengan penelitian Burg dkk.¹². Abbot dkk.¹⁴ menyatakan bahwa 1 µg DNA manusia dapat menghambat amplifikasi target yang terdapat dalam jumlah sedikit, namun pada penelitian ini tidak ditemukan hambatan oleh DNA manusia, bahkan DNA parasit masih dapat terdeteksi sampai pengenceran 1 pg. Pada penelitian lain Hitt & Filice¹⁵ dapat mendeteksi 0,1 - 1 pg DNA murni *T.gondii* yang dicampur dengan 1 atau 2 µg DNA genom kelinci atau manusia dan hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan. Pada penelitian lain terhadap DNA *Toxoplasma* yang dicampur dengan DNA manusia murni dalam jumlah yang banyak¹⁵ menemukan bahwa DNA dari 1 hingga 10 takizoit masih dapat dideteksi. Hasil yang diperoleh ini ternyata sesuai dengan hasil penelitian Burg dkk.¹².

Pada 99 µl darah manusia sehat yang dicampur dengan 1 µl suspensi takizoit yang masing-masing mengandung 1; 5; 10; 20; 30; 40; 50; 100; 1.000 takizoit, ternyata pita spesifik masih dapat terlihat sampai 1 takizoit.

Pada penelitian ini di mana dilakukan pencampuran darah manusia sehat dengan suspensi takizoit terlihat bahwa pita spesifik DNA *T.gondii* masih terdeteksi sampai pengenceran 1 takizoit. Dibandingkan dengan hasil penelitian Joss dkk.¹⁶ yang menggunakan *primer* yang sama, namun jumlah siklus yang digunakan 30 siklus dan profil siklus suhu yang digunakan berbeda yaitu tahap denaturasi 94°C selama 1,3 menit, tahap penempelan *primer* 53°C selama 2 menit dan sintesis DNA 72°C selama 2-5 menit yang diikuti dengan inkubasi akhir 72°C selama 5 menit dapat mendeteksi DNA dari 64 - 100 parasit setelah PCR pertama dan 1 - 4 parasit setelah *nested* PCR, maka hasil penelitian ini lebih baik karena dapat mendeteksi takizoit dengan jumlah yang lebih sedikit dengan target gen B1.

Untuk menentukan sensitivitas pada sampel darah yang mengandung monosit yang terinfeksi, Filice dkk.⁶ melakukan percobaan dengan cara mengisolasi dan membiak monosit darah yang didapat dari sukarelawan yang seronegatif terhadap *T.gondii*. Setelah itu setiap monosit diinfeksi dengan 5 takizoit selama 1 jam, dan pada sampel dengan jumlah 0,2 - 2 monosit yang terinfeksi per ml darah dapat dideteksi adanya gen B1. Masing-masing monosit yang terinfeksi mengandung rata-rata 5 takizoit dan darah yang diperlukan untuk setiap kali uji adalah 45 µl, sehingga dapat dideteksi 0,045 - 0,45 takizoit per uji. Masing-masing takizoit mengandung kira-kira 35 salinan gen B1¹² maka untuk tiap uji dapat dideteksi 1,575 - 15,75 gen.

Amplifikasi DNA *T.gondii* dengan target gen P30 menurut metode Weiss dkk.⁵ ternyata memberikan hasil sebanyak 3 pita yaitu 1 pita spesifik yang berukuran 347 bp untuk gen P30 *T.gondii* dan 2 pita lain : 1 pita berukuran kurang dari 347 bp dan 1 pita yang berukuran lebih dari 347 bp, sedangkan amplifikasi menurut metode Chang & Ho¹⁰ tidak memperlihatkan pita pada elektroforesis. Hasil positif baru didapat bila digunakan sebanyak 50 siklus.

Oleh karena metode tersebut memberikan 2 pita yang tidak spesifik maka dilakukan amplifikasi ulang gen P30 menurut metode Chang & Ho¹⁰ yang biasanya digunakan untuk amplifikasi gen B1, namun pita spesifik baru tampak bila

digunakan 50 siklus. Terbentuknya pita tidak spesifik mungkin disebabkan oleh suhu *annealing* yang tidak cukup. Bila suhu *annealing* terlalu rendah, penempelan yang tidak spesifik akan meningkat, namun pada suhu yang terlalu tinggi, penempelan *primer* tidak akan terjadi¹⁷. Tm dari *primer* gen P30 adalah 70-76°C, sedangkan suhu *annealing* yang digunakan pada penelitian ini adalah 45°C. Menurut Newton¹⁸ suhu *annealing* yang diperlukan untuk tahap penempelan *primer* adalah 3-5°C di bawah Tm yang ditentukan. Jadi seharusnya suhu *annealing* yang digunakan pada penelitian ini adalah 67-73°C. Oleh karena suhu *annealing* yang digunakan pada metode Weiss dkk.⁵ ini terlalu rendah maka dihasilkan produk sebanyak 3 pita di mana terdapat 2 pita yang tidak spesifik untuk *T.gondii*. Dengan menggunakan suhu *annealing* 60°C berdasarkan metode Chang & Ho¹⁰ maka dapat terlihat hasil positif, namun jumlah siklus yang digunakan harus 50 siklus.

Penentuan konsentrasi minimal DNA murni *T.gondii* yang masih dapat terdeteksi dengan PCR pada target gen P30 dilakukan juga dengan amplifikasi berbagai konsentrasi DNA murni *T.gondii* yaitu : 1 ng; 0,5 ng; 0,25 ng; 0,1 ng; 0,001 ng dan 0,0001 ng dalam 50 µl larutan PCR dan pada elektroforesis pita spesifik DNA *T.gondii* dapat terlihat sampai konsentrasi 0,001 ng.

Untuk menentukan sensitivitas PCR dengan target gen P30 maka dilakukan amplifikasi pada pengenceran serial DNA *T.gondii* murni dan ternyata dapat dideteksi hingga 1,5 pg DNA yang setara dengan 10 organisme. Bila DNA *T.gondii* dicampur dengan 1 µg DNA limpa tikus maka dapat dideteksi 0,015 ng DNA *T.gondii* yang setara dengan 100 organisme⁵. Sedangkan pada penelitian ini pengenceran DNA murni masih dapat dideteksi sampai 1 pg dan bila dilakukan pengenceran dengan DNA manusia maka hasil positif masih dapat dideteksi sampai pengenceran 0,025 ng.

Pada pengenceran campuran DNA murni *T.gondii* dengan DNA darah manusia sehat terdapat konsentrasi akhir DNA murni *T.gondii* yaitu : 5 ng; 1 ng; 0,25 ng; 0,05 ng; 0,01 ng, 0,025 ng dan 0,005 ng dan ternyata pita spesifik terlihat sampai pengenceran 0,025 ng.

Untuk menentukan sensitivitas PCR dengan target gen P30 Savva dkk.¹⁹ telah melakukan penelitian pada berbagai konsentrasi DNA *T.gondii* strain RH. Setelah amplifikasi sebanyak 30 siklus sebuah fragmen DNA sepanjang 914 bp masih terlihat hingga konsentrasi DNA *Toxoplasma* sebesar 10 pg. Dengan cara amplifikasi yang sama DNA *Toxoplasma* dicampur dengan DNA manusia (5 µg DNA manusia yang setara dengan $1,5 \times 10^6$ DNA leukosit), namun pada reaksi ini tidak ditemukan pita tersebut di atas, karena tertutup oleh DNA manusia. Pada penelitian yang telah dilakukan dengan DNA *Toxoplasma* murni didapatkan pita spesifik DNA *T.gondii* yang dapat terlihat sampai konsentrasi DNA *Toxoplasma* sebesar 1 pg. Hal ini mungkin disebabkan oleh metode yang digunakan berbeda misalnya perbedaan dalam suhu siklus dan jumlah siklus. Pita spesifik DNA *T.gondii* terlihat juga sampai konsentrasi 0,025 ng walaupun dilakukan pencampuran DNA *Toxoplasma* dengan DNA manusia, sehingga hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa DNA manusia tidak menutupi DNA *Toxoplasma* dengan cara penelitian yang dilakukan.

Pada 99 µl darah manusia sehat yang dicampur dengan 1 µl suspensi takizoit yang masing-masing mengandung 1; 5; 10; 20; 30; 40; 50; 100 dan 1.000 takizoit didapatkan pita spesifik yang masih terlihat sampai 20 takizoit.

Wastling dkk.²⁰ melakukan penelitian perbandingan 2 metode amplifikasi gen untuk mendeteksi adanya DNA *T.gondii* pada domba yang diinfeksi secara eksperimental. Amplifikasi gen B1 dilakukan dengan metode Burg dkk.¹² yang dimodifikasi. Dengan metode ini dapat dideteksi 0,05 pg DNA *T.gondii*. Amplifikasi gen P30 dilakukan menurut metode Savva dkk.¹⁹ dan dapat mendeteksi DNA *T.gondii* sampai konsentrasi 0,1 pg. Pada penelitian ini DNA murni masih dapat dideteksi dengan target gen B1 hingga konsentrasi 0,001 ng sedangkan dengan target gen P30 hingga konsentrasi 0,025 ng.

Pada penelitian ini amplifikasi yang dilakukan terhadap gen B1 dan gen P30 untuk mendeteksi adanya DNA *T.gondii* membutuhkan konsentrasi yang lebih kecil dibandingkan dengan peneliti lainnya. Hal ini mungkin disebabkan karena metode yang digunakan untuk isolasi DNA tidak menggunakan fenol, dan ini sesuai dengan pendapat Rolfs dkk.¹⁷ yang mengatakan bahwa fenol dapat menghambat kerja enzim DNA polimerase. Dengan demikian maka metode isolasi DNA cacing filaria dapat digunakan untuk isolasi DNA *T.gondii*. dengan hasil yang cukup baik. Van de Ven dkk.⁷ berpendapat bahwa heme, heparin dapat menghambat reaksi PCR dan sebagai antikoagulan pada penelitian ini digunakan EDTA.

Pada penentuan spesifisitas ternyata tidak didapatkan adanya reaksi antara *primer* yang digunakan dengan DNA manusia (Promega, USA) maupun DNA manusia sehat yang diekstraksi dengan target gen B1 dan gen P30 pada penelitian ini.

Pada penentuan spesifisitas ternyata tidak didapatkan reaksi antara *primer* yang digunakan baik gen B1 maupun gen P30 dengan DNA manusia yang diisolasi pada penelitian ini. Ini membuktikan bahwa *primer* yang digunakan untuk mendeteksi gen B1 maupun gen P30 *T.gondii* sangat spesifik. Untuk menentukan spesifisitas *T.gondii*, maka Burg dkk.¹² melakukan amplifikasi dengan menggunakan *primer* gen B1 untuk diuji spesifisitasnya terhadap DNA parasit-parasit lain yang mungkin terdapat bersamaan dengan *T.gondii* di dalam darah yaitu *Sarcocystis*, *Neospora*, *Plasmodium*, *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus* dan *Absidia spp.*, dan ternyata pada pemeriksaan elektroforesis tidak ditemukan pita spesifik *T.gondii*. Pada penelitian lainnya, Weiss dkk.⁵ tidak mendapatkan adanya reaksi antara *primer* gen P30 dengan *Trypanosoma cruzi* dan *Leishmania donovani*. Dengan demikian *primer* gen B1 dan gen P30 memang spesifik untuk *T.gondii*.

Kesimpulan

Gen B1 ternyata lebih sensitif dibandingkan dengan uji untuk mendeteksi gen P30, sehingga untuk diagnosis lebih baik dipakai *primer* dengan target gen B1. Ditemukan bahwa jumlah siklus yang diperlukan pada penelitian ini adalah 50 siklus. Kemudian dianggap perlu untuk melakukan penelitian lanjutan untuk mendeteksi DNA toksoplasma dengan target gen B1 dan gen P30 pada berbagai sampel klinis.

Daftar Acuan

- Gandahasada S. Important Protozoan Parasites in Indonesia, *Bul Penel Kes* 1989; 17: 148-153.
- Frenkel JK, Escajadilo A, Cyst Rupture as a Pathogenic Mechanism of Toxoplasma encephalitis, *Am J Trop Med Hyg* 1987; 36: 517–522.
- Liesenfeld O, Roth A, Weinke T, Foss HD, Hahn H. A Case of Disseminated Toxoplasmosis Value of PCR for Diagnosis, *J Infect Dis* 1994; 29: 133-138.
- Skinner LJ, Chatterton JMW, Joss AWL, Moir IL, Ho-Yen D. The Use of an IgM Immunosorbent Agglutination Assay to Diagnose Congenital Toxoplasmosis, *J Med Microbiol* 1989; 28: 125 – 128.
- Weiss LM, Udem SA, Salgo M, Tanowitz HB, Wittner M, Sensitive and Specific Detection of Toxoplasma DNA in an Experimental Murine Model: Use of Toxoplasma gondii-Specific cDNA and the Polymerase Chain Reaction, *J Infect Dis* 1991; 163: 180-186.
- Filice GA, Hitt JA, Mitchell CD, Blackstad M, Sorensen SW. Diagnosis of Toxoplasma Parasitemia in Patients with AIDS by Gene Detection After Amplification with Polymerase Chain Reaction, *J Clin Microbiol* 1993; 3: 2327–2331.
- van de Ven E, Melchers W, Galama J, Camps W, Weuwissen J. Identification of Toxoplasma gondii Infections by B1 Gene Amplification, *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2120 – 2124.
- Ho-Yen D, Joss AWL, Balfour AH, Smyth ETM, Baird D, Chatterton JMW. Use of Polymerase Chain Reaction to Detect Toxoplasma gondii in Human Blood Samples, *J Clin Path* 1992; 45: 910–913.
- Supali T, Wibowo H, Ekarina R. The Use of PCR-ELISA for Brugia malayi Detection in Day Blood (in press)
- Chang GN, Ho KC. Study on the Differentiation of the DNA Fingerprint Between the Human Origin (RH) and Pig-Origin (GC/YC) Strains of Toxoplasma gondii. Program and Abstracts of the Fourth Asian-Pacific Congress for Parasitic Zoonoses; Taichung, ROC, 1996, Aug 2-4.
- Newton CR, Graham A, *PCR*, 2nd ed, UK: BIOS scientific publishers Ltd, 1997:1-28.
- Burg JL, Grover CM, Pouletty P, Boothroyd JC. Direct and Sensitive Detection of a Pathogenic Protozoan, Toxoplasma gondii by Polymerase Chain Reaction, *J Clin Microbiol* 1989; 27: 1787–1792.
- Cornelissen A, Overdulve JP, van der Ploeg M. Determination of Nuclear DNA of Five Eucoccidian Parasites, Isospora (Toxoplasma) gondii, Sarcocystis cruzi, Eimeria tenella, E. acervulina and, Plasmodium berghii, with Special Reference to Gametogenesis and Meiosis in I. (T.) gondii, *Parasitology* 1984; 88: 531–553.
- Abbott MA, Poiesz BJ, Byrne BC, Kwok S, Sninsky JJ, Ehrlich GD GD. Enzymatic Gene Amplification: Qualitative and Quantitative Methods for Detecting Proviral DNA Amplified in Vitro, *J Infect Dis* 1988; 158: 1158–1169.
- Hitt JA, Filice GA. Detection of Toxoplasma gondii Parasitemia by Gene Amplification, Cell Culture and Mouse Inoculation, *J Clin Microbiol* 1992; 30: 3181-3184.
- Joss AWL, Chatterton JMW, Evans R, Ho-Yen D. Toxoplasma Polymerase Chain Reaction on Experimental Blood Samples, *J Med Microbiol* 1993; 38: 38–43.

17. Rolfs A, Schuller I, Finckh U, Weber-Rolfs I. *PCR: Clinical Diagnostics and Research*, Berlin: Springer-Verlag, 1992: 4.
18. Newton CR, Primers. In: Newton CR, editor. *PCR: Essential Data*, UK: BIOS scientific publishers Ltd, 1995: 49-56.
19. Savva D, Morris JC, Johnson JD, Holliman RE. Polymerase Chain Reaction for Detection of *Toxoplasma gondii*, *J Med Microbiol* 1990; 32: 25-31.
20. Wastling JM, Nicoll S, Buxton D. Comparison of Two Gene Amplification Methods for the Detection of *Toxoplasma gondii* in Experimentally Infected Sheep, *J Med Microbiol* 1993; 38: 360-365.

