

Diagnosis Molekuler *Toxoplasma gondii* Berdasar Gen Stage Spesifik Takizoit dan Bradizoit pada Ayam Kampung

(MOLECULAR DIAGNOSIS OF TOXOPLASMA GONDII BASED ON THE TACHYZOITE AND BRADYZOITE STAGE SPECIFIC GENES IN FREE-RANGE CHICKEN)

Ida Ayu Pasti Apsari¹, Wayan Tunas Artama², Sumartono³, I Made Damriyasa⁴

¹Lab Parasitologi, ⁴Lab Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana.
Jl.P.B.Sudirman Denpasar Bali tlp.0361-223791, Email iapapsari@yahoo.co.id

²Lab Biokimia, ³Lab Parasitologi, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada.
Jl.Fauna 2 Karangmalang-Yogyakarta, 55281

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan menentukan adanya *Toxoplasma gondii* pada ayam kampung secara molekuler dengan metode Polymerase chain reaction (PCR) berdasarkan gen *stage spesifik takizoit* dan *bradizoit*. Gen SAG1 merupakan gen *stage spesifik takizoit* sedangkan gen BAG1 merupakan gen *stage spesifik bradizoit*. Primer untuk SAG1 dan BAG1 dirancang menggunakan program *Web-base Primer 3*. Isolasi DNA dari jantung dan otak ayam kampung menggunakan *pure-link genomic isolation kit*. Amplifikasi DNA dengan metode PCR menggunakan sepasang primer SAG1 dan BAG1 sebagai dasar diagnosis. Hasil penelitian menunjukkan bahwa primer SAG1 dan BAG1 berhasil mengamplifikasi DNA *T. gondii* pada ayam kampung.

Kata Kunci : *Toxoplasma gondii*; SAG1 dan BAG1; Takizoit; Bradizoit; ayam kampung

ABSTRACT

The aims of this study was to determine the presence of *Toxoplasma gondii* in free-range chicken using Polymerase Chain Reaction (PCR) method based on the tachyzoite and bradyzoite stage specific genes. SAG1 and BAG1 are the tachyzoite and bradyzoite stage-specific gene respectively. The primers for SAG1 and BAG1 were designed using *Web-base Program Primer 3*. Genomic DNA from free-range chicken heart and brain was isolated using *Pure-Link Genomic Isolation Kit*. DNA amplification by PCR using primers for SAG1 and BAG1 genes was used for diagnosis of *T.gondii*. The results showed that the DNA amplification using primers for SAG1 and BAG1 genes was successfully applied to determine of *Toxoplasma gondii* in free-range chicken.

Key Word : *Toxoplasma gondii*; SAG1 dan BAG1; Tachyzoite; Bradyzoite; free-range chicken

PENDAHULUAN

Kasus toksoplasmosis pada hewan dan manusia baik di dunia maupun di Indonesia sangat tinggi. Kasus pada manusia berkisar antara 40–85%, sedangkan pada hewan berkisar antara 5–80% (Subekti *et al.*, 2005). Tingginya kasus toksoplasmosis pada hewan dan manusia, maka teknik diagnosis merupakan hal

yang sangat mendasar untuk dikembangkan. Diagnosis toksoplasmosis secara molekuler dengan menggunakan metode PCR sudah banyak dilakukan (Owen *et al.*, 1998; Susanto *et al.*, 2002, dan Priyowidodo, 2003) memberi hasil yang sangat spesifik dan sensitif. PCR sebagai suatu metode diagnosis terutama untuk toksoplasmosis keberhasilannya sangat ditentukan oleh salah satu syarat yaitu primer.

Sekuen oligonukleotida primer berupa urutan yang dapat berhibridisasi secara spesifik dengan molekul DNA cetakan (Yuwono, 2006).

Keberadaan *T.gondii* stadium takizoit pada inang menimbulkan infeksi akut, sedangkan stadium bradizoit yang berada di dalam sista jaringan inang, menetap seumur hidup (*dormant*) di dalam sel inang dan menimbulkan infeksi laten (Jones *et al.*, 2003; Dubey, 2007). Deferensiasi takizoit ke bradizoit terjadi bersamaan dengan pembentukan kekebalan protektif (Darcy dan Santoro, 1993). Sebaliknya, perubahan bradizoit menjadi takizoit terjadi bila sistem imun terganggu, misalnya pada keadaan imunokompromais (Luft *et al.*, 1993).

Diagnosis secara molekuler dengan menggunakan metode PCR sebagai metode diagnosis toksoplasmosis ternyata memberikan akurasi yang tinggi (spesifisitas 100% dan sensitivitas 97,4) (Hohlfeld *et al.*, 1994; Chiabchalard *et al.*, 2005). Diagnosis molekuler bertujuan untuk menentukan keberadaan parasit, sedangkan diagnosis serologis bertujuan untuk evaluasi respons imun dan penetapan status infeksi (Subekti *et al.*, 2005).

Kajian diagnosis toksoplasmosis selama ini kebanyakan dari stadium takizoit tetapi hanya sedikit yang mengkaji stadium bradizoit. Diketahui pula bahwa ada gen *stage spesifik tachyzoite* dan gen *stage spesifik bradyzoite* (Zhang *et al.*, 1999; Weiss dan Kim, 2000; Ajioka *et al.*, 2001). Sampai saat ini, eksplorasi kedua gen tersebut untuk tujuan diagnosis belum pernah dilakukan. Berkaitan dengan hal itu maka metode diagnosis berdasarkan sekuen DNA spesifik takizoit dan bradizoit, perlu dikembangkan. Sarva dan Holliman (1989) melaporkan keberhasilan metode PCR untuk mendeteksi *T.gondii* pada jaringan domba dan manusia. Metode ini dilaporkan dapat melacak satu *T.gondii* dalam 10^6 sel inang. Burg *et al.*, (1989) melaporkan bahwa metode PCR mempunyai sensitifitas 10 takizoit / 10^5 sel leukosit. Muller *et al.*, (1996) menggunakan fragmen gen B1 *T.gondii* pada PCR, ternyata dapat menurunkan potensi terjadinya reaksi silang dengan sampel yang mengandung DNA dari *Sarcocystis spp.*, *Hamondia hamondi*, *Neospora caninum*. Diagnosis toksoplasmosis dengan metode PCR pada cairan amnion dapat dikerjakan dengan cepat, aman dan akurat serta memberi angka sensitivitas 97,4% dan spesifisitas 99,7% (Hohlfeld *et al.*, 1994). Owen *et al.*, (1998) menggunakan PCR untuk mendiagnosis abortus pada domba akibat

toksoplasmosis. Primer gen B1 pada metode PCR dapat mendeteksi 10 takizoit, metode ini lebih akurat dibanding dengan uji *bioassay*. Peneliti yang menggunakan gen B1 sebagai primer memberikan hasil yang sangat sensitif untuk mendeteksi *T.gondii* di jaringan maupun cairan amnion (Owen *et al.*, 1998; Susanto *et al.*, 2002; Priyowidodo, 2003).

Tujuan penelitian untuk mendeteksi *T.gondii* pada ayam kampung berdasarkan gen *SAG1* dan *BAG1* *T.gondii* dengan metode PCR.

METODE PENELITIAN

Sampel penelitian berupa organ jantung dan otak ayam kampung berumur sekitar enam bulan berasal dari sembilan kabupaten di Bali (Badung, Bangli, Buleleng, Kota Denpasar, Gianyar, Jembrana, Karangasem, Klungkung, Tabanan). Pemilihan sampel jantung dan otak karena organ ayam kampung ini paling banyak terdeteksi *T.gondii* (Suwanti, 2005)

Jantung dan otak ayam kampung dari masing-masing kabupaten diambil sekitar 50 mg dicacah dengan *scalpel*. Dimasukkan kedalam tabung ependorf 1,5 ml. Pada penelitian ini tiap 10 jantung dan otak ayam kampung dari masing-masing kabupaten digabung menjadi satu untuk dilakukan isolasi DNA. Jaringan yang telah tercacah dihomogenkan dengan menggunakan *pestel*. Selanjutnya jaringan yang telah homogen, DNA diisolasi sesuai prosedur "*pure-link genomic isolation kit*" (Invitrogen). Hasil isolasi DNA ini disimpan pada -20°C sampai digunakan.

Untuk desain primer, gen yang telah ditentukan (*SAG1*, *BAG1*) diakses sekuennya di Gene Bank (NCBI). Sekuen nukleotida yang telah diakses, dianalisis sesuai program "*Web-base Primer 3*". Hasil analisis diperoleh Primer *SAG1* yaitu :

Forward: 5²-CACCTGTAGGAAGCTGTAGTCACTG-3²

Reverse: 5²-TCACTGTGACCATACTCTGTG-3²

Primer *BAG1* yaitu :

Forward: 5²-AGGAGAGAAGACCTCGAAAGAAG-3²

Reverse: 5²-TGAACGCTAGGTTTCTGGATACG-3²

Metode PCR komponen utama yang diperlukan adalah DNA cetakan; oligonukleotida primer yaitu sekuen oligonukleotida pendek 15–25 bp yang untuk mengawali sintesis rantai DNA; deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP) terdiri atas dATP, dCTP, dGTP, dTTP; enzim DNA polimerase yaitu enzim yang melakukan katalisis reaksi sintesis rantai DNA dan

senyawa buffer yang mengandung $MgCl_2$ (Purwanto *et al.*, 1997; Yuwono, 2006; Sudjadi, 2008).

Amplifikasi sekuen spesifik dilakukan dengan menggunakan primer yang telah didesain untuk gen *SAG1* dan *BAG1* seperti di atas dengan metode PCR (Yuwono, 2006; Sudjadi, 2008). *Polymerase Chain Reaction* dilakukan dengan R-reaction mix 2xPCR (Invitrogen) yang telah mengandung 0,2 mM dNTP, 1,6 mM $MgSO_4$ dan buffer. Formulasi PCR pada penelitian ini diatur sebagai berikut : tabung eppendorf mini ke dalamnya dimasukkan sebanyak 1 μ l DNA (5 μ g/ μ l) yang telah diisolasi dari jantung dan otak ayam kampung dan ditambahkan *primer forward* (1 pmol) 0,6 μ l dan *reverse* (1 pmol) 0,6 μ l yang telah ditentukan (*SAG1* atau *BAG1*), ditambahkan R-mix (10xbuffer dan 0,2 mM dNTP) 5 μ l. Setelah penambahan enzim Taq polymerase (1 unit) 0,25 μ l dan terakhir ditambahkan aquabides sehingga volume akhir menjadi 10 μ l, tabung PCR dimasukkan ke dalam *Thermocycler eppendorf mastercycler personal* atau PTC-100TM. Mesin penyiklus panas diprogram sesuai metode PCR Yuwono (2006) dan Sudjadi (2008) dengan kondisi 95^oC selama 1 menit (denaturasi), kemudian diturunkan 94^oC selama 45 detik, selanjutnya pengaturan suhu *annealing* diatur sesuai hasil optimasi pengaturan suhu *annealing* primer yang digunakan. Untuk primer *SAG1* digunakan suhu *annealing* 55^oC sedangkan primer *BAG1* suhu 45^oC selama 30 detik . Elongasi dengan suhu 72^oC selama 1 menit. Siklus dengan kondisi ini diulang 35 kali. Pada bagian akhir diinkubasi pada suhu 72^oC selama lima menit sampai selesai mencapai 22^oC. Langkah selanjutnya dilakukan elektroforesis pada gel agarose 1% yang telah diisi ethidium bromide dengan konsentrasi 25 μ g/ml dengan tegangan 100 V selama 30 menit. Visualisasi DNA dilakukan dengan ultraviolet (UV) dan didokumentasi dengan kamera digital.

HASIL DAN PEMBAHASAN

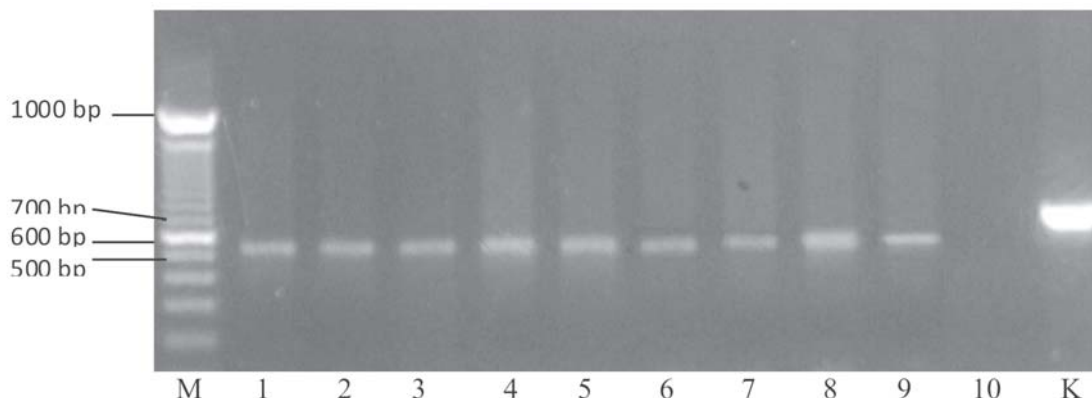
Hasil amplifikasi DNA *T.gondii* dengan primer *SAG1* dan *BAG1* pada ayam kampung adalah seperti disajikan pada Gambar 1 dan Gambar 2.

Pada Gambar 1 disajikan ke sembilan ayam kampung positif mengandung *T. gondii* dengan

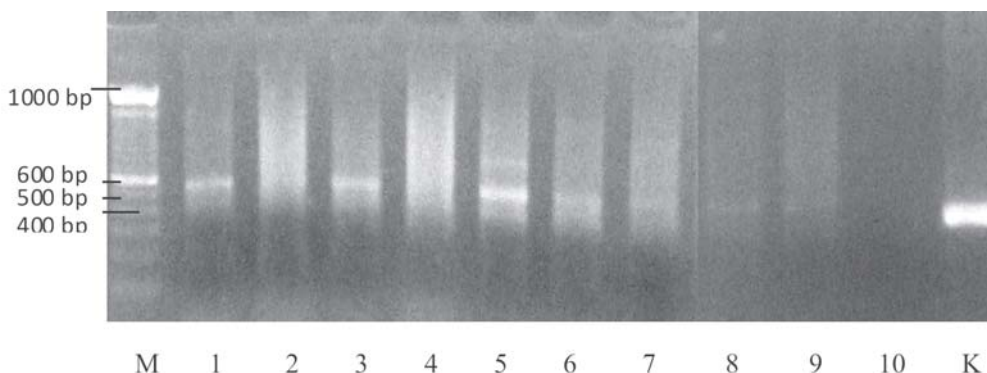
munculnya pita DNA. Pita DNA hasil amplifikasi DNA takizoit dengan primer *SAG1* mempunyai panjang 600-700 bp, DNA takizoit merupakan DNA murni *T.gondii*. Hasil sekuensing amplifikasi gen *SAG1* takizoit isolat lokal adalah 612 bp.

Pita DNA hasil amplifikasi *T.gondii* pada ayam kampung dengan primer *SAG1* (Gambar 1), tampak posisinya lebih rendah dari DNA kontrol positif (DNA takizoit). Hal ini kemungkinan sekuen *T.gondii* pada ayam kampung teramplifikasi sedikit lebih pendek dari DNA takizoit isolat lokal. Hasil ini tidak jauh berbeda dengan hasil penelitian Priyowidodo (2003) bahwa DNA *T.gondii* dapat diamplifikasi dengan primer gen B1 dari sampel cairan asites dan serum darah pada \pm 600bp, sedangkan dengan gen yang sama Groa *et al.*, (1992) DNA *T.gondii* dapat diamplifikasi pada 634 bp. Berbeda dengan hasil penelitian Pratama (2009) yang menggunakan primer *repetitif region* 529 bp untuk diagnosis molekuler toksoplasmosis pada sapi, kambing, babi, dan ayam sebagai uji konfirmasi dengan PCR melaporkan *T.gondii* terdeteksi amplifikasi pada 434 bp. Perbedaan yang diperoleh sebagai indikasi bahwa jumlah kopi gen menentukan kepekaan gen tersebut untuk dapat mengamplifikasi DNA cetakan menghasilkan pita yang spesifik. Gen B1 mempunyai jumlah kopi 35, *repetitif region* mempunyai jumlah kopi 600, sedangkan gen *SAG1* mempunyai jumlah kopi gen hanya satu. Walaupun demikian ternyata dari hasil penelitian ini berhasil mengamplifikasi DNA *T.gondii* sebagai dasar untuk mendiagnosis *T.gondii* pada ayam kampung.

Pita DNA hasil amplifikasi *T. gondii* pada ayam kampung dengan primer *BAG1* (Gambar 2), tampak posisinya lebih tinggi dari DNA kontrol (DNA takizoit Isolat lokal). Hal ini kemungkinan sekuen *T gondii* pada ayam kampung teramplifikasi sedikit lebih panjang dari sekuen takizoit isolat lokal. Hasil sekuensing dari amplifikasi gen *BAG1* takizoit isolat lokal adalah 470 bp. Hasil penelitian Susanto *et al.*, 2002 dengan amplifikasi gen B1 dan P30 *T.gondii* menggunakan metode PCR memberi hasil pita yang spesifik dan tidak spesifik tergantung siklus yang digunakan dan penentuan suhu *annealing*. Pada Gambar 2 disajikan pita kontrol takizoit paling jelas kemungkinan karena DNA takizoit murni *T.gondii*, sedangkan pita pada lajur 2, 4, 6, 7, 8



Gambar 1 : Hasil Amplifikasi DNA *T.gondii* pada ayam kampung dengan primer SAG1. Keterangan : M. Marker; 1.Ayam Karangasem; 2.Ayam Badung; 3.Ayam Kota Denpasar; 4.Ayam Tabanan; 5.Ayam Bangli; 6.Ayam Klungkung; 7.Ayam Buleleng; 8.Ayam Gianyar; 9.Ayam Jembrana; 10.Kontrol negatif; K.Takizoit.



Gambar 2 :Hasil amplifikasi DNA *T.gondii* pada ayam buras dengan primer BAG1. Keterangan : M. Marker; 1.Ayam Karangasem; 2.Ayam Badung; 3.Ayam Kota Denpasar; 4.Ayam Tabanan; 5.Ayam Bangli; 6.Ayam Klungkung; 7.Ayam Buleleng; 8.Ayam Gianyar; 9.Ayam Jembrana; 10. Kontrol negatif; K.Takizoit.

dan 9 terlihat tidak jelas kemungkinan karena DNA *T.gondii* bercampur dengan DNA ayam kampung. Savva *et al.*, (1990) melaporkan bahwa pita DNA *T.gondii* hasil amplifikasi gen P30 menjadi tidak jelas karena tercampur dengan DNA manusia. Hasil yang sama juga terjadi pada penelitian Susanto *et al.*,2002 menggunakan gen P30 *T.gondii*, dan pita DNA *T.gondii* tidak muncul karena tertutup oleh DNA manusia. Mengatasi hal tersebut maka Savva *et al.*, (1990) melakukan *Southern Hybridisation* menggunakan DNA probe dilabel biotin, sedangkan Susanto *et al.*, (2002) mengubah metode yang digunakan yaitu dengan mengatur suhu dan jumlah siklus menjadi 50

kali. Pada penelitian ini digunakan suhu *annealing* 45°C dengan siklus 35 kali. Berdasarkan hasil yang diperoleh maka untuk penelitian selanjutnya agar diperoleh hasil yang maksimal perlu dirubah pengaturan suhu dan jumlah siklus.

SIMPULAN

Disimpulkan bahwa primer SAG1 dan BAG1 dengan metode PCR berhasil mengamplifikasi DNA *T. gondii* sebagai dasar diagnosis toksoplasmosis pada ayam kampung.

SARAN

Disarankan untuk melakukan sekuensing terhadap produk PCR dari *T. gondii* pada ayam kampung, baik dari hasil amplifikasi dengan primer SAG1 dan BAG1. Melakukan penelitian lanjutan mendeteksi *T. gondii* menggunakan primer SAG1 dan BAG1 dengan PCR pada berbagai organ berbeda seperti hati, jantung, otak dan daging ayam kampung sebagai dasar diagnosis dan mengatur ulang program PCR terutama dalam pengaturan suhu dan jumlah siklus.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih kepada DP2M Dikti atas dana penelitian "Hibah Penelitian Disertasi Doktor Tahun 2010" dan kepada Prof.Dr.drh.I Gusti Kade Mahardika kepala Laboratorium Biomedik FKH Unud terimakasih atas bantuan fasilitas selama penelitian ini dilakukan serta semua pihak yang ikut membantu pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Ajioka JW, Fitzpatrick JM, Reitter CP 2001. Toxoplasmosis Gondii genomic:shedding lighth on Pathogenesis and Chemotherapy. *Expert Review in Moleculer Medicine*. Januari 2003.
- Burg JL, Grover CM., Poeletty P, Boothroyd JC. 1989. Direct and Sensitive Detection of a pathogenic protozoa *Toxoplasma gondii* by Polymerase chain Reaction. *J of Clin Microbiol*. 27: 1787-1792
- Chiabchalard R, Wiengcharoen JT, Sukthana Y. 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
- Darcy F, Santoro P. 1994. Toxoplasmosis. Dalam Kierszen-baum F (Ed). *Parasitic Infection and the immune system*. London Academic Press. Pp. 163-201.
- Dubey JP. 2007. The history and life cycle of *Toxoplasma gondii*. In : *Toxoplasma gondii the model apicomplexa*. Perspectives and methods. Weiss LM. and Kim K (eds). Amsterdam Elsevier Ltd. Pp. 425-440
- Groâ U, Roggenkamp A, Janitschke K, Heesemann J. 1992. Improved sensitivity of the Polymerase Chain Reaction for detection of *Toxoplasma gondii* in biological and human clinical specimens. *Euk J Clin Microbiol Infect Dis*. 11(1) : 33-39
- Hohlfield P, Daffos F, Costa JM, Thulliez P, Forestier F, Vidaud M. 1994. Prenatal diagnosis of congenital Toxoplasmosis with Polymerase Chain Reaction test on amniotic fluid. *The New England J of Med*. 331 (11) : 695-699.
- Jones DD, Okbravi N, Adamson P, Tasker S, Lightman S. 2003. Comparison of PCR detection methods for B1, P30 and 18S rDNA genes of *Toxoplasma gondii* in aqueous humor. *Int Opthamol Vis Sci*. 41(3) : 634-644
- Luft BJ, Haffler MD, Korzun AH. 1993. Toxoplasmic encephalitis in patients with the aquaired immunodeficiency syndrome. *New England Journal of Medicine* 329 : 995-1000.
- Muller N, Zimmerman V, Hetrich B, Gottstein B. 1996. Diagnosis of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infection by PCR and DNA hybridization immunoassy. *J of Clin Microbiol*. 34: 2850-2652.
- Owen MR, Clarkson MJ, Trees AJ. 1998. Diagnosis of *Toxoplasma* abortion in ewes by polymerase chain reaction. *Vet Rec* 142: 445-448.
- Pratama DAOA. 2009. Analisis *Toxoplasma gondii* repeat region 529 bp (NCBI Acc No AF146527) sebagai kandidat probe untuk diagnosis molekuler toksoplasmosis. Tesis Program Studi Bioteknologi. *Tesis*. Yogyakarta. Universitas Gadjah Mada.
- Priyowidodo. 2003. Kajian Metoda Diagnosis Toksoplasmosis secara Polymerase Chain Reaction (PCR) dan Pemeriksaan Hstologis. *Tesis*. Yogyakarta. Universitas Gadjah Mada.
- Purwanto M, Lusida MI, Handayani R. 1997. Polymerase chain reaction. Dalam Biologi Molekuler Kedokteran. Editor Suhartono Taat Putra. Edisi pertama. Erlangga Universiy Press. Pp.150-167
- Sarva U, Holliman RE. 1989. Diagnosis of Ovine Toxoplasmosis: an alternative to Serology. *Vet Rec* 125: 212-213.
- Savva D, Morris JC, Johnson JD, Holliman RE. 1990. Polymerase Chain Reaction from detection of *Toxoplasma gondii*. *J Med Microbiol*. 32: 25-31

- Subekti DT, Artama WT, Iskandar T. 2005. Perkembangan kasus dan Teknologi diagnosis Toksoplasmosis. Lokakarya Nasional Penyakit Zoonosis. Balai Penelitian Veteriner. Bogor. Pp.253-264
- Sudjadi. 2008. Bioteknologi Kesehatan. Cetakan pertama. Kanisius. Pp.21-279
- Susanto L, Supali T, Gandahusada S. 2002. Penentuan konsentrasi minimal Gen B1 dan Gen P30 *Toxoplasma gondii* yang masih terdeteksi dengan reaksi Rantai Polimerase. *Makara Kesehatan* 6(2) : 64-70.
- Suwanti LT. 2005. Deteksi Kista Jaringan *Toxoplasma gondii* pada beberapa organ Ayam. Abstrak. Airlangga University Library. Abstrak : 1-2
- Taylor GR. 1991. Polymerase Chain Reaction. Basic principles and automation. In *PCR a practical approach*. Ed by M.J.Mepheron, P.Quirhe and GR.Taylor. Oxford University Press. Pp.1-13
- Weiss LM, Kim K. 2000. The development and Biology of Bradizoite of *Toxoplasma gondii*. *Frontiers in Bioscience* 6: 391-405.
- Yuwono T. 2006. Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction. Edisi pertama. Yogyakarta. Penerbit Andi. Pp.1-237
- Zhang YW, Kim K, Ma YF, Wittner M, Tanowitz HB, Weiss LM. 1999. Disruption of *Toxoplasma gondii* bradyzoite-specific gene BAG1 decreases in vivo cyst formation. *Mol Microbiol.* 31(2) : 691-701.