

Sekuen Gen *Surface Antigen-1* dan *Bradizoit Antigen-1* Takizoit *Toxoplasma gondii* sebagai Kandidat Pemindai DNA

(*SAG1 AND BAG1 GENE SEQUENCES ANALYSIS
OF TOXOPLASMA GONDII TACHYZOITE AS PROBE CANDIDATE*)

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

¹LabParasitologi, ⁴Lab Patologi Klinik
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana,
Jln. Sudirman Denpasar, tlp.(0361)223791

²Bagian Biokimia, ³Bagian Parasitologi
FKH Universitas Gadjah Mada
Jl.Fauna no 2 Karangmalang-Yogyakarta.
Email : iapapsari@yahoo.co.id

ABSTRAK

Gen *surface antigen* (*Sag 1*) *Toxoplasma gondii* merupakan *gen* spesifik stadium takizoit dan *gen bradizoit antigen-1* (*bag1*) merupakan *gen* spesifik stadium bradizoit. Tujuan penelitian adalah untuk menganalisis sekuen *gen sag1* dan *gen bag1* takizoit *Toxoplasma gondii* isolat lokal sebagai kandidat DNA probe. *Gen sag1* dan *bag1* *Toxoplasma gondii* isolat lokal diamplifikasi menggunakan metode PCR dengan primer dirancang berdasar kedua *gen* tersebut, selanjutnya disekuensing. Hasil penelitian menunjukkan sekuen fragmen *gen sag1* *Toxoplasma gondii* isolat lokal 612 bp dan *bag1* 470 bp. Analisis sekuen sebagai kandidat probe berdasarkan jumlah nukleotida, 4 urutan nukleotida yang tidak sama, persentase GC, sifat karakteristik (hasil BLAST tidak bereaksi silang dengan genom hospes dan parasit lain). Simpulan hasil penelitian *probe sag1* 136 dan *probe bag1* 98 nukleotida sebagai kandidat pemindai DNA.

Kata Kunci : *gen sag1*, *gen bag1*, takizoit, *Toxoplasma gondii*, DNA probe.

ABSTRACT

Sag1 and *bag1* is a gene specific-stage for *Toxoplasma gondii* tachyzoite and bradyzoite. The purpose of this study was analyze the sequences of *sag1* and *bag1* tachyzoite genes of local of *Toxoplasma gondii* isolate as deoxyribonucleic acid probe candidate. Tachyzoite of local of *Toxoplasma gondii* isolate used on this study. Gene *sag1* and *bag1* gene of *Toxoplasma gondii* were amplified by PCR, and then sequenced. The results showed *sag1* fragment gene contained 612 bp and *bag 1* contained 470 bp in length. BLAST analysis of *sag1* and *bag1* gene fragments as probe candidate showed that high specific for *Toxoplasma gondii* and no significant cross-reaction fragment with host and other parasites. The sequences 136 bp and 98 bp fragments as DNA probe candidate of *Toxoplasma gondii sag1* and *bag1* respectively.

Keywords: *Sag1* gene, *Bag1* gene, tachyzoite, *Toxoplasma gondii*, DNA probe

PENDAHULUAN

Toksoplasmosis merupakan penyakit zoonosis yang tersebar di seluruh dunia, disebabkan oleh *Toxoplasma gondii* (Tenter *et al.*, 2000). *T. gondii* adalah parasit intraseluler obligat yang merupakan parasit paling unik di antara famili Apicomplexa (Ajioka *et al.*, 2001). Parasit tersebut dapat menginfeksi semua vertebrata termasuk manusia dan berbagai

hewan kesayangan, seperti anjing, kucing serta hewan ternak seperti sapi, kambing, domba, babi dan unggas serta hewan berdarah panas lainnya (Tenter *et al.*, 2000 ; Dubey dan Jones, 2008). *T. gondii* menginfeksi semua sel berinti, termasuk makrofag yang seharusnya berfungsi memfagositosis dan mengeliminasi patogen (Ahn *et al.*, 2006).

Berdasar karakter genetik pada *T. gondii*, terdiri dari tiga tipe genetik, yaitu tipe I, II dan

III (Darde, 2004). Tipe tersebut terkait dengan virulensi *T.gondii* pada mencit. Isolat yang berasal dari hewan, kebanyakan termasuk tipe II dan III (Dubey *et al.*, 2006). *Toxoplasma* dengan virulensi rendah cenderung membentuk sista jaringan lebih banyak daripada yang virulensi tinggi (Weiss *et al.*, 1998). Sista *Toxoplasma* lebih banyak terdapat di dalam sel neural dan jaringan muskular, seperti: otak, jantung, dan otot rangka (Dubey *et al.*, 1998; Weiss dan Kim, 2000; Cristina *et al.*, 2004). Sista mengandung 1000-2000 bradizoit. Besar kecilnya ukuran sista tergantung umur sista, tempat sista berada, dan strain *T. gondii* (Weiss and Kim, 2000).

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). Penelitian Artama *et al.*, (2009) pada orang di Yogyakarta ditemukan bahwa seroprevalensi *T. gondii* di kota Yogyakarta sebesar 54,76%, di Sleman 60%, Bantul 48,57%, Gunung Kidul 20,48%, dan Kulon Progo 77,14%. Berikut survei epidemiologi di Brazil pada hewan diperoleh bahwa prevalensi toksoplasmosis pada kambing mencapai 95% (Faria *et al.*, 2007), sedangkan di Italia prevalensi toksoplasmosis pada domba dicatat 77,8% (Fusco *et al.*, 2007). Beberapa peneliti yang meneliti prevalensi *T.gondii* pada hewan di Indonesia juga menemukan prevalensi yang tinggi yaitu pada kucing 5-40%, kambing 23-61%, domba 32-71%, sapi perah 21% dan sapi bali 7,1%, kerbau 27,3%, ayam 19,6-52,5%, itik 6,1%, babi 20,5-32% (Priyana, 2000; Subekti *et al.*, 2005; Suratma, 2008, Artama *et al.*, 2009). Mengingat tingginya kasus dan variatifnya faktor yang terkait dengan insiden toksoplasmosis, baik pada manusia maupun hewan, maka diagnosis merupakan hal yang sangat mendasar dan perlu dikembangkan untuk diagnosis dini dan pencegahan baik pada manusia maupun hewan (Subekti *et al.*, 2005; Artama *et al.*, 2009). Diagnosis molekuler bertujuan untuk menentukan keberadaan parasit, sedangkan diagnosis serologi sangat terkait dengan evaluasi profil respons imun dan penetapan status infeksi (Subekti *et al.*, 2005). Pengembangan diagnosis molekuler pada penelitian ini bertujuan menyatukan dua tujuan diagnosis tersebut. Diagnosis adanya infeksi *T.gondii* pada manusia dan hewan prinsipnya sama, yaitu secara langsung dan tidak langsung (Tenter *et al.*, 2000). Deteksi secara langsung adalah

dengan ditemukannya parasit atau materi genetik (Montoya dan Liesenfeld, 2004). Deteksi secara tidak langsung berdasar uji imunologi (IFAT, MAT, Immunoblotting, ELISA) yaitu dengan mendeteksi antibodi berdasar reaksi imunologi.

Diagnosis penyakit infeksi pada umumnya dapat dilakukan berdasar gejala klinis, namun tidak berlaku untuk toksoplasmosis, karena toksoplasmosis secara klinis tidak menunjukkan gejala dan bila muncul gejala tidak spesifik (Bastien, 2002). Diagnosis menggunakan hewan laboratorium untuk uji biologi, juga tidak praktis karena memerlukan waktu yang lama, sedangkan diagnosis untuk mendeteksi adanya antibodi dapat memberi hasil negatif palsu terutama pada individu yang *immunosupresif*. Sehubungan dengan hal tersebut, diperlukan suatu diagnosis konfirmatif untuk mendeteksi keberadaan bradizoit (sista) dalam jaringan (daging atau otak) atau deteksi takizoit yang beredar dalam tubuh penderita. Diagnosis secara histologi, keberhasilan pemeriksaannya sangat rendah atau sensitivitas rendah karena keberadaan parasit tidak menyebar secara merata pada jaringan, sehingga pada tingkat infeksi yang rendah pemeriksaan metode ini tidak realistis. Diagnosis dengan cara isolasi parasit dapat dilakukan dengan metode digesti dan dilanjutkan dengan uji *bioassay* (Dubey *et al.*, 1995; Dubey, *et al.*, 1998), tetapi metode ini memerlukan waktu cukup lama, sehingga tidak praktis. Adanya hal tersebut maka diperlukan suatu metode diagnosis baru yang lebih cepat, lebih mudah aplikasinya dan dapat memberi sensitivitas hasil yang tinggi dan spesifisitas yang akurat, serta tidak terjadi positif palsu. Diagnosis toksoplasmosis secara molekuler dengan menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) sudah banyak dilakukan (Owen *et al.*, 1998; Susanto *et al.* 2002; Priyowidodo, 2003). Walaupun memberi hasil yang sangat spesifik, namun metode ini biayanya mahal dan memerlukan peralatan yang canggih. Berdasar hasil yang spesifik dari metode ini, perlu diupayakan membuat metode diagnosis yang sensitif dan akurat namun sederhana tidak memerlukan peralatan yang canggih.

Pendekatan diagnosis molekuler terhadap parasit dapat dilakukan dengan pemindai/probe molekuler. Sumartono *et al.*, (2005) dan Sumartono *et al.*, (2007) mencoba menggunakan pemindai molekuler untuk mendiagnosis koksidirosis dan toksoplasmosis berdasar sekuen repetitif genom parasit-parasit tersebut. Jin *et*

al., (2005) menggunakan *Fast Dipstick* untuk mendiagnos toksoplasmosis pada manusia, tetapi menggunakan *whole takizoit*. Kebanyakan peneliti lebih memfokuskan kajian pada stadium takizoit *Toxoplasma gondii* dan sangat sedikit peneliti yang memfokuskan pada stadium bradizoit (Cristina *et al.*, 2004; Kazemi *et al.*, 2007). Menurut Zhang *et al.*, (1999), Ajioka *et al.*, (2001) dan Kazemi *et al.*, (2007) ada gen yang spesifik pada stadium takizoit dan gen spesifik pada stadium bradizoit. Sampai saat ini, eksplorasi kedua gena tersebut untuk tujuan diagnosis belum banyak dilakukan. Berkaitan dengan hal metode diagnosis, maka diagnosis berdasarkan sekuen gen spesifik stadium takizoit dan bradizoit tersebut perlu dikembangkan. Pengembangan diagnosis tersebut diarahkan dengan menggunakan pemindai DNA. Penggunaan pemindai DNA sebagai diagnosis, maka harus mempunyai sekuen sebagai kandidat pemindai. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis sekuen gen spesifik stadium takizoit dan bradizoit *T. gondii* isolat lokal sebagai kandidat pemindai DNA.

METODE PENELITIAN

Primer yang digunakan dalam penelitian ini dirancang berdasarkan *gen sag1* dan *bag1 T. gondii*. *Gen* yang telah ditentukan (*sag1* dan *bag1*) untuk diakses sekuennya di *GeneBank* (NCBI). Sekuen nukleotida yang telah diakses, dianalisis sesuai program "Web-base Primer 3". Hasil analisis diperoleh *primer Sag1* yaitu :

forward 5'-CACCTGTAGGAAGCTGTA-GTCACTG-3' dan
Reverse 5'-TCACTGTGACCATACTACTC-TGTG-3'.

Primer Bag1 adalah :

forward 5'-AGGAGAGAAGACTCGAAA-GAAG-3' dan
Reverse 5'-TGAACGCTAGGTTTCTGGA-TACG-3'.

Bahan penelitian ini adalah DNA takizoit *T. gondii* isolat lokal yang diperoleh dari koleksi Prof Wayan Tunas Artama (Bagian Biokimia FKH UGM Yogyakarta). *T. gondii* isolat lokal adalah isolat yang pertama kali berhasil diisolasi dari otot diafragma domba (Iskandar, 1998). *T. gondii* isolat ini berhasil dikembangkan di Balai Besar Penelitian Veteriner Bogor dan dikarakterisasi (Yowani *et al.*, 2007). Amplifikasi DNA takizoit dengan menggunakan *primer*

Sag1 dan *Bag1* (hasil rancangan) dengan metode *Polymerase Chain Reaction*. PCR dilakukan dengan *R-Reaction Mix 2xPCR* (Invitrogen) (yang telah mengandung 0,2 mM dNTP, 1,6 mM MgSO₄ dan buffer) ditambah enzim *Taq Polymerase* (Invitrogen). Mesin PCR (*Thermocycler eppendorf mastercycler*) diatur dengan suhu *annealing* 55°C dengan siklus 35 kali. Elektroforesis dengan pengecatan *Ethidium bromide* dilakukan untuk melihat hasil PCR, dan visualisasi dengan ultraviolet (UV) selanjutnya didokumentasi dengan kamera digital.

Sekuensing pita DNA produk PCR yang terpilih dikirim ke Yayasan Genetika Eijkman Jakarta. Hasil *sequencing* dari produk PCR (sekuen *sag1* dan *bag1*) disejajarkan dengan sekuen *sag1* dan *bag1 T. gondii* dari berbagai strain yang ada di *genebank* dengan menggunakan program Mega 4. Berdasarkan dari hasil penjabaran tersebut dilihat bagian yang *conserve*. Sekuen pada bagian yang *conserve* tersebut ditetapkan sebagai kandidat pemindai/*probe*. Sekuen kandidat pemindai/*probe* ini dipilih dan dikarakterisasi secara deskriptif berdasarkan persentase jumlah GC, jumlah nukleotida, ada tidaknya nukleotida yang sama dan berurutan (Keller dan Manak, 1989; Leitch *et al.*, 1994). Sekuen kandidat pemindai/*probe* terpilih yang telah memenuhi syarat kemudian dianalisis menggunakan program *BLAST* yang dapat diakses pada situs NCBI : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>. Sekuen kandidat pemindai/*probe* yang dipilih adalah yang tidak memiliki homologi dengan genom parasit lain dan berbagai individu yang dapat sebagai inang *T. gondii*, tetapi mempunyai homologi yang tinggi dengan berbagai strain *T. gondii*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil amplifikasi fragmen DNA takizoit *T. gondii* dengan primer yang dirancang berdasarkan *gen* spesifik stadium takizoit dan bradizoit (*sag1* dan *bag1*) *T. gondii* dan hasil elektroforesis pada gel agarose 1%, seperti tersaji pada Gambar 1. Hasil ini mengindikasikan bahwa fragmen spesifik takizoit *T. gondii* berhasil diamplifikasi menggunakan primer sekuen spesifik stadium takizoit (*sag1*) dan sekuen spesifik stadium bradizoit (*bag1*). Sesuai prediksi dari rancang primer bahwa *primer sag1* menghasilkan pita DNA antara 600-00 bp dan

primer bag1 menghasilkan pita DNA berada di antara 400- 500 bp. Keberhasilan amplifikasi suatu fragmen DNA dipengaruhi oleh primer yang digunakan dan adanya *site* primer pada DNA cetakan (McPherson *et al.*, 1992; Yuwono, 2006). Kusumawati *et al.* (2011) berhasil mengamplifikasi *mature sag-1 gene T. gondii* pada 500-800 bp, hasilnya sesuai dengan hasil penelitian ini. Priyowidodo (2003) menggunakan primer *gene B1* mengamplifikasi DNA *T. gondii* isolat lokal diperoleh pita ± 600 bp, sedangkan primer yang dirancang berdasarkan *gene repeat region 529 bp*, berhasil mengamplifikasi DNA takizoit *T. gondii* isolat lokal pada 400 – 500 bp (Pratama, 2009) dan Susanto *et al.* (2002) mengamplifikasi DNA *T. gondii* dengan target *gen P30* memberi hasil pita pada 250 – 400 bp. Berdasar beberapa hasil penelitian tersebut mengindikasikan bahwa *T. gondii* isolat lokal mempunyai *site gene B1, gene repeat region, gene P30, gene sag1* dan *gene bag1*. Takizoit *T. gondii* mempunyai *gen* spesifik *sag1* (stadium takizoit) dan *gen* spesifik *bag1* (stadium bradizoit). Sesuai dengan pendapat Zhang *et al.*, (1999) bahwa *gen bag1* stadium spesifik bradizoit dapat memengaruhi pembentukan sista, yang mana dalam sista terkandung sejumlah bradizoit. Ajioka *et al.*, (2001) dan Kazemi *et al.*, (2007) mengemukakan bahwa *gen* spesifik *sag1* mengkode protein permukaan P30 stadium takizoit.

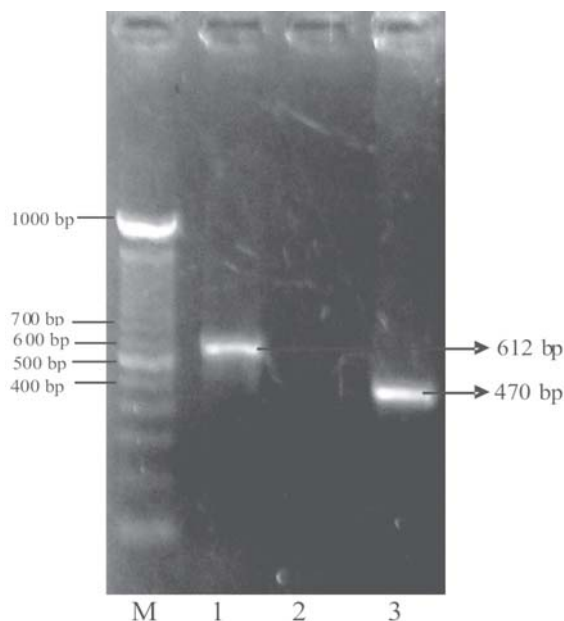
Setelah dilakukan sekuensing pada produk PCR *sag1* dan *bag1* diperoleh hasil panjang sekuen *sag1* 612 bp, sedangkan *bag1* 470 bp dengan sekuen sebagai berikut:

Sekuen *sag1*:

```
GACGACCGGAGTACAGTTTTTGTGGGCAGAGCCGTTGTGCAGCTTCCGTTCTTCTCGGTTGTG
TCACATGTGTCAATGTGCGTGAAATACACGGTGTATGTGCGTTTTCGcTGCACCAcTtCATtAT
TTCTTCTGGTTTTTTGACGAGTATGTTTCCGAAGGCAGTGAGACGCGCCGTCACGGCAGGGGTG
TTTGCCGCGCCCACTGATGTCGTTCTTGGCATGTGGCGTTATGGCATCGGATCCCCCTCTTG
TTGCCAATCAAGTTGTCACTGCCCAGATAAAAAATCGACAGCCGCGGTCATTCTCACACCGAC
GGAGAACCCTTCACTCTCAAGTGCCCTAAAAACAGCGCTCACAGAGCCTCCACTCTTGCGTAC
TCACCCAACAGGCAAATCTGCCAGCGGGTACTACAAGTAGCTGTACATCAAAGGCTGTAACAT
TGAGCTCCTTGATTCTGAAGCAGAAGATAGCTGGTGGACGGGGGATTCTGCTAGTCTCGACAC
GGCAGGCATCAAACCTCACAGTTCCAATCGAGAAGTTCCCCGTGACAACGCAGACGTTTGTGGTC
GGTTGCATCAAGGGAGACGACGCACAGAGTTGTATGG.
```

Sekuen *bag1*:

```
AGACCTCGAAAGAAGCGGAGAAAGTGGATGATGGCAAACAAGAACATTTTGACTGAGCGAGT
GTCCGGTTATTTGCGCGCCGGTCCAGCTCCCGAGTAATTACAAGCCCGACGGAATCAGTGCG
GCAATGGACAACGGCGTTCTACGTGTACAGATCAAGGTCGAGGATTCAGGGGGCGCAAAGCAAC
AAATCAGCGTGAAGTAGAGGCAGCGATGCCGTTCCGTGGGGCAGGGGAACACGGAGGAACCTCAT
GAAAATGTAAAGGTGTGGGGAAACTGTTGACAGTGCAAGATAATAAATAGTACGAGTAGGATTG
CAAAGAAGACCTCCCGTTTGCTGGCGCCAGCCGAGAAAACCTGGTTGATGGGCAGCCTCATGCG
TGACGGTTTTTCTTTAGAGGACTTGTCCGTCGAGGTAGTGCATCGCGTGTCTGCGGTTTATC
GTCGCAGCGGTATCCAGAAACC
```



Gambar 1. Elektroforesis hasil amplifikasi DNA takizoit dengan *primer Sag1* dan *Bag1*
Keterangan. M: Marker, 1: Hasil PCR DNA takizoit dengan Primer Sag1 (612 bp), 2: Kontrol negatif (tanpa *template*), 3: Hasil PCR DNA takizoit dengan Primer Bag1 (470 bp).

Sekuen *sag1* dan *bag1* produk PCR dilakukan aligment dengan sekuen *sag1* dan *bag1 T. gondii* dari berbagai strain yang ada di *GeneBank*. Hasil aligment dengan program *BLAST (NCBI)* 612 nukleotida *sag1* diperoleh nilai *identity homology* 96-100% dengan sekuen *gen sag1* strain *T. gondii* yang ada di *GeneBank*

(NCBI) dan 470 nucleotida *bag1* diperoleh nilai *identity homology* 97-99% dengan sekuen *gen bag1* strain *T. gondii* yang ada di *GeneBank* (NCBI). Hasil ini menunjukkan bahwa *sag1* dan *bag1* hasil sekuensing *T. gondii* isolat lokal sangat *conserve* dengan sekuen yang ada di *GeneBank* dengan homologi tinggi.

Sesuai dengan hasil penelitian sebelumnya, sekuen *mature sag1 gene T. gondii* isolat lokal sangat spesifik dan *mature sag1 gene* berhasil di kloning (Hartati *et al.*, 2003; Hartati *et al.*, 2006). Seperti tersaji pada Tabel 1 dan 2, hasil ini mengindikasikan bahwa sekuen 612 *sag1* dan sekuen 470 *bag1 T. gondii* isolat lokal bersifat sangat spesifik, terlihat hanya nukleotida urutan 46 dan 134, sedangkan sekuen *bag-1* nukleotida 16 dan 17 saja yang berbeda dengan sebagian besar sekuen *sag-1* dan *bag-1* strain

T.gondii di *geneBank*. *Sag1* merupakan *gen* spesifik stadium takizoit (Ajioka *et al.*, 2001; Kazemi *et al.*, 2007) dan *bag1* merupakan *gen* spesifik stadium bradizoit (Zhang *et al.*, 1999). Sekuen yang spesifik sangat memungkinkan untuk dikembangkan sebagai pemindai/*probe* molekuler.

Sag1 sebagai *gen* dapat mengekspresikan protein 30 kDa (P30) *surface antigen* (Kazemi *et al.*, 2007), merupakan *gen* spesifik stadium takizoit (Ajioka *et al.*, 2001) yang menjadi petanda pada infeksi akut dan kongenital (Budijanto, 1995). Protein P18 yang terdapat pada permukaan bradizoit, dikode oleh *gen bag1* menjadi petanda pada infeksi kronis (Susanto *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1999). *Gen* spesifik stadium takizoit (*sag1*) menjadi petanda infeksi akut dan *gen* spesifik stadium bradizoit (*bag1*)

Tabel 1. Asam nukleat polimorfik *gen sag1 Toxoplasma gondii* isolat lokal dibandingkan dengan isolat yang diperoleh di *GeneBank*

No	Nama Isolat	Urutan Nukleotida ke			
		46	89	134	140
1	<i>T.gondii</i> RMS-2000-ROU- <i>Sag1</i>	G	G	C	C
2	<i>T.gondii</i> RMS-1998-BOU - <i>Sag1</i>	*	*	*	*
3	<i>T.gondii</i> RMS-1999-GUI - <i>Sag1</i>	*	*	*	*
4	<i>T.gondii</i> RMS-1999-BOR - <i>Sag1</i>	*	*	*	*
5	<i>T.gondii</i> RMS-1999-BOUC- <i>Sag1</i>	*	*	*	*
6	<i>T.gondii</i> RMS-2000-PER- <i>Sag1</i>	*	*	*	*
7	<i>T.gondii</i> RMS-2000-GIL - <i>Sag1</i>	*	*	*	*
8	<i>T.gondii</i> RMS-1998-ROB - <i>Sag1</i>	*	*	*	*
9	<i>T.gondii</i> RMS-2000-CON- <i>Sag1</i>	*	*	*	*
10	<i>T.gondii</i> RMS-1994-COE - <i>Sag1</i>	*	*	*	*
11	<i>T.gondii</i> RMS-1999-RUN - <i>Sag1</i>	*	*	*	*
12	<i>T.gondii</i> RMS-2000-DAF - <i>Sag1</i>	*	*	*	*
13	<i>T.gondii</i> RMS-1992-RUB- <i>Sag1</i>	A	*	T	*
14	<i>T.gondii</i> RMS-2000-BAR- <i>Sag1</i>	*	*	*	*
15	<i>T.gondii</i> RMS-1992-CUI - <i>Sag1</i>	*	*	*	*
16	<i>T.gondii</i> RMS-2000-TRA- <i>Sag1</i>	*	*	*	*
17	<i>T.gondii</i> RMS-1997-PAR - <i>Sag1</i>	*	*	*	*
18	<i>T.gondii</i> RMS-1998-DAY- <i>Sag1</i>	*	*	*	*
19	<i>T.gondii</i> RMS-1999-BES - <i>Sag1</i>	*	*	*	*
20	<i>T.gondii</i> RMS-2000-WAU - <i>Sag1</i>	*	*	*	*
21	<i>T.gondii</i> RMS-1987-MER - <i>Sag1</i>	*	*	*	*
22	<i>T.gondii</i> RMS-1999-LIN - <i>Sag1</i>	*	*	*	*
23	<i>T.gondii</i> RMS-1995-ABE- <i>Sag1</i>	*	*	*	*
24	<i>T.gondii</i> RH - <i>Sag1</i>	A	C	T	*
25	<i>T.gondii</i> PRU - <i>Sag1</i>	*	*	*	*
26	<i>T.gondii</i> RMS-1994-LEF - <i>Sag1</i>	A	*	T	*
27	<i>T.gondii</i> Chennai - <i>Sag1</i>	*	*	*	*
28	<i>T.gondii</i> Izatnagar – <i>Sag1</i>	*	*	*	G
29	<i>T.gondii</i> Isolat Lokal	A	*	T	*

Keterangan : * nukleotida sama dengan yang diatas

menjadi petanda infeksi kronis. Sekuen spesifik dari stadium-stadium tersebut dengan demikian diharapkan bisa untuk mendiagnosis toksoplasmosis akut atau kronis secara molekuler.

Hasil penjarangan sekuen *sag1* dan *bag1* *T. gondii* isolat lokal dengan berbagai strain di *GeneBank*, diperoleh bagian sekuen *sag1* yang *conserve* adalah sebagai berikut:

ATCGGATCCCCCTCTTGTTGCCAATCAAGTTGTCAC-
CTGCCAGATAAAAAATCGACAGCCGCGTCAATT-
CTCACACCGACGGAGAACCACTTCACTCTCAAG-
TGCCCTAAAACAGCGCTCACAGAGCCTCCACTCTTG-
CGTACTCACCCAACAGGCAAATCTGCCAGCGG-
GTACTACAAGTAGCTGTACATCAAAGGCTGTA-
ACATGAGCTCCTTGATTCCCTGAAGCAGAAGATA-
GCTGGTGGACGGGGGATTCTGCTAGTCTCGACAGG-
CAGGCATCAAACCTCACAGTTCCAATCGAGAAGTTCCCCG-
TGACAACGCAGACGTTTGTGGTCCGTTGCATCAAGG-
GAGACGACGCACAGAGTTGTATGG

Sekuen *bag-1* *Toxoplasma gondii* isolat lokal 470 nukleotida bagian yang *conserve* dengan berbagai strain yang diperoleh di *GeneBank* adalah sebagai berikut:

CATTTTGACTGAGCGAGTGTCCGGTTATTTTGGC-
CGCCGTTCCAGCTCCCGAGTAATTACAAGCCCCGACG-
GAATCAGTGCAGCAATGGACAACGGCGTTCTACG-
TGTCACGATCAAGGTCGAGGATTACAGGGGGCGC-
AAAGCAACAAATCAGCGTGAAGTAGAGGCAGC-
GATGCCGTTCTGGGGCAGGGGAACACGGAGGAA-
CCTCATGAAAATGTAAAGGTGTGGG
AACTGTTGACAGTGCAAGATAATAAATAGTACGAG-
TAGGATTGCAAAGAAGACCTCCCGTTTGTCTGGCGCCA-
GCCGAGAAAACCTGGTTGATGGGCAGCCTCATGCG-
TGACGGTTTTTCTTTAGAGGACTGTCGGTCGAGGTAGTGG-
TATCGCGTGTCTGCGGTTTATCGTCGACGCGGT-
ATCCAGAAAACC

Tabel 2 : Asam nukleat polimorfik *gen bag1* *T. gondii* isolat lokal dibanding dengan isolat yang diperoleh di *GeneBank*

No	Nama Isolat	Urutan nukleotida ke	
		16	17
1	<i>T.gondii</i> ME 49 ME 49 TGME 49	A	G
2	<i>T.gondii</i> NTE hsp30 Bag1	*	*
3	<i>T.gondii</i> NTE Bag1	*	*
4	<i>T.gondii</i> Isolat Lokal	G	A

Keterangan : * nukleotida sama dengan yang diatas

Tabel 3. Hasil penjarangan kandidat pemindai/*probe* dengan parasit lain dan genom inang

Kandidat probe	Spesies parasit	homologi	Inang	homologi
Sag1 Jml. Sekuen : 136 Jml. GC = 52,2 %	<i>Neospora sp</i>	0 %	<i>Bos taurus</i>	0 %
	<i>Sarcocystis sp</i>	0 %	<i>Equus caballus</i>	0 %
	<i>Hammondia hammondi</i>	0 %	<i>Capra hircus</i>	0 %
	<i>Cryptosporidium sp</i>	0 %	<i>Ovis aries</i>	0 %
	<i>Schistosoma sp</i>	26 %	<i>Sus scrofa</i>	0 %
			<i>Canis familiar</i>	0 %
			<i>Mus musculus</i>	13 %
			<i>Ratus norvegicus</i>	13 %
Bag1 Jml. Sekuen : 98 Jml. GC = 57,58 %			<i>Galus domesticus</i>	0 %
			<i>Human</i>	13 %
	<i>Neospora caninum</i>	83 %	<i>Bos taurus</i>	0 %
	<i>Sarcocystis sp</i>	0 %	<i>Equus caballus</i>	0 %
	<i>Hammondia hammondi</i>	0 %	<i>Capra hircus</i>	0 %
	<i>Cryptosporidium sp</i>	0 %	<i>Ovis aries</i>	0 %
	<i>Schistosoma sp</i>	0 %	<i>Sus scrofa</i>	0 %
			<i>Canis familiar</i>	0 %
			<i>Mus musculus</i>	0 %
			<i>Mouse</i>	0 %
			<i>Galus domesticus</i>	0 %
			<i>Human</i>	0 %

Sekuen bagian yang *conserve* dipilih sebagai kandidat pemindai/*probe* sesuai syarat untuk pemindai/*probe* yaitu tidak ada empat nukleotida yang sama dan berurutan, jumlah nukleotida dan persentase jumlah GC (Keller dan Manak, 1989). Panjang ideal probe 100-300 nukleotida serta jumlah GC antara 40-60% (Leitch *et al.*, 1994). Syarat probe berdasar jumlah nukleotida dan persentase jumlah GC (40-60%) maka masing-masing sekuen *gen sag1* dan *bag1* mempunyai 3 sekuen yang memenuhi syarat sebagai kandidat *probe*. *Gen sag1* sekuen 1 jumlah 57 nukleotida dengan 57,9% GC, sekuen 2 jumlah 136 nukleotida dengan 52,2 % GC dan sekuen 3 jumlah 120 nukleotida dengan 52,2% GC. *Gen bag1* sekuen 1 jumlah 98

nukleotida dengan 57,6% GC, sekuen 2 jumlah 78 nukleotida dengan 47,4% GC dan sekuen 3 jumlah 72 nukleotida dengan 56,9% GC.

Pemindai/*probe* dipilih yang mempunyai nukleotida panjang yaitu sekuen *sag-1* 136 dan *bag-1* 98 nukleotida. Probe yang ideal 100-300 nukleotida (Leitch *et al.*, 1994) hal tersebut terkait dengan spesifisitasnya (Brown, 2006; Pruitt *et al.*, 2005), karena probe yang panjang memberi spesifisitas yang tinggi (Herzer dan Englert, 2001). Penjajaran *probe sag1* dan *bag1* dengan *T. gondii* yang ada di *genbank* memberi hasil *homology identity* 99-100%. Hasil ini memenuhi syarat *probe*, karena *probe* dipilih dari sekuen bagian yang *conserve* berasal dari masing-masing gen spesifik. Uji homologi

Tabel 4. Hasil penjajaran *probe sag-1* dan *bag-1* dengan genom hospes dan parasit.

Probe	Genom	Hasil
Sag-1	<i>Schistosoma sp</i>	<p>Your search is limited to records matching entrez query: <i>Schistosoma sp</i>.</p> <p>Edit and Resubmit Save Search Strategies Formatting options Download</p> <p>Probe sag1</p> <p>Query ID: kJ2735 Description: None Molecule type: nucleic acid Query Length: 136</p> <p>Database Name: nr Description: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences) Program: BLASTN 2.2.26+ Help</p> <p>No significant similarity found. For reasons why, click here</p>
	<i>Mus musculus</i>	<p>Your search is limited to records matching entrez query: <i>Mus musculus</i>.</p> <p>Edit and Resubmit Save Search Strategies Formatting options Download</p> <p>Probe sag1</p> <p>Query ID: kJ31247 Description: None Molecule type: nucleic acid Query Length: 136</p> <p>Database Name: nr Description: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences) Program: BLASTN 2.2.26+ Help</p> <p>No significant similarity found. For reasons why, click here</p>
	<i>Ratus novogicus</i>	<p>Your search is limited to records matching entrez query: <i>Ratus novogicus</i>.</p> <p>Edit and Resubmit Save Search Strategies Formatting options Download</p> <p>Probe sag1</p> <p>Query ID: kJ117699 Description: None Molecule type: nucleic acid Query Length: 136</p> <p>Database Name: nr Description: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences) Program: BLASTN 2.2.26+ Help</p> <p>No significant similarity found. For reasons why, click here</p>
	<i>Human</i>	<p>Your search is limited to records matching entrez query: <i>Human</i>.</p> <p>Edit and Resubmit Save Search Strategies Formatting options Download</p> <p>Probe sag1</p> <p>Query ID: kJ43901 Description: None Molecule type: nucleic acid Query Length: 136</p> <p>Database Name: nr Description: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences) Program: BLASTN 2.2.26+ Help</p> <p>No significant similarity found. For reasons why, click here</p>
Bag-1	<i>Neospora caninum</i>	<p>Your search is limited to records matching entrez query: <i>Neospora caninum</i>.</p> <p>Edit and Resubmit Save Search Strategies Formatting options Download</p> <p>Probe Bag1</p> <p>Query ID: kJ35235 Description: None Molecule type: nucleic acid Query Length: 98</p> <p>Database Name: nr Description: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences) Program: BLASTN 2.2.26+ Help</p> <p>No significant similarity found. For reasons why, click here</p>

(*somewhat similar sequences/blastn*, NCBI) *probe sag1* 136 dan *bag1* 98 nukleotida dengan genom inang dan parasit lain, seperti tersaji pada Tabel 3. Hasil ini terlihat masih ada homologi dengan parasit lain (*Neospora sp.* 83%, *Schistosoma sp.* 26%) dan inang (*Human*, *Mus musculus*, *Ratus norvegicus* masing-masing 13%). Setelah dilakukan uji homologi yang lebih akurat (*highly similar sequences/megablast*), ternyata hasilnya tidak ada kesamaan sekuen yang signifikan (Tabel 4). *Probe sag-1* dan *bag-1* berdasarkan hasil uji homologi yang lebih akurat, sudah memenuhi syarat sebagai pemindai/*probe*.

Aplikasi *probe* untuk mendeteksi suatu agen patogen dalam sampel klinis, pemindai/*probe* harus memiliki kemiripan genetik tinggi dengan agen patogen dan kemiripan genetik yang rendah dengan genom inang dan parasit lain (Rueue, 1998; Brown, 2006).

SIMPULAN

Sekuen fragmen gen *sag1* takizoit *T. gondii* isolat lokal 612 bp dan *bag1* 470 bp, analisis masing-masing sekuen ditetapkan 136 dan 98 nukleotida sebagai kandidat pemindai *DNA*

SARAN

Disarankan memilih sekuen *sag1* 136 dan sekuen *bag1* 98 nukleotida sebagai *DNA probe*. Selanjutnya perlu dilakukan uji aplikasi pemindai/*probe* untuk dapat mendiagnosis toksoplasmosis akut maupun kronis pada hewan atau pada manusia.

UCAPAN TERIMAKASIH

Kepada DP2M DIKTI terimakasih atas bantuan dana penelitian melalui Hibah Disertasi Doktor dan kepada semua pihak yang ikut terlibat dalam penelitian ini, terimakasih atas bantuan tenaga serta dukungannya.

DAFTAR PUSTAKA

Ahn HJ, Kim S, Kim HE, Lappin MR. 2006. Molecular cloning of rhoptry protein (ROP6) secreted from *Toxoplasma gondii*. *Korean J Parasitol* 44(3) : 251-254.

- Ajioka JW, Fitzpatrick JM, Reitter CP. 2001. *Toxoplasma gondii* genomic : shedding lighth on Pathogenesis and Chemotheraphy. Expert Review. In *Mol. Med.* <http://www.ermm.cbcu.cam.ac.uk>. Departement of Pathology. University of Cambridge. Cambridge : 2 - 19
- Artama WT, Utami WS, Sujono. 2009. Recombinant Granule Protein-1 for Biomolecular Diagnosis of Toxoplsmosis in Indonesia. Proceeding of International Conference on Animal Health and Human Safety. 6 – 8 Desember 2009 : 298 – 309.
- Bastien P. 2002. Diagnosis. Molecular diagnosis of toxoplasmosis. *Transactions of The Royal Society of Trop Med and Hyg* 96(1) : 205-215.
- Brown TA. 2006. The Basic Principles of Gene Cloning and DNA Analysis. In *Gene Cloning & DNA Analysis. An Introduction*. Fifth Ed. Blackwell Publishing : 1 – 84
- Budijanto SK. 1995. Antibodi IgA anti P30 sebagai petanda pada toksoplasmosis kongenital dan akut. *Majalah Kedokteran Indonesia*, 45(1): 61-65.
- Cristina MD, Porto PD, Buffolano W, Beghetto E, Spadoni A, Gaglietta S, Piccolella E, Felici F, Gargano N. 2004. The *Toxoplasma gondii* bradyzoite antigen BAG1 and MAG1 induce early humoral and cell-mediated immune responses upon human infection. *Microbes and Infections* 6 : 164-171
- Darde ML. 2004. Genetic analysis of diversity in *Toxoplasma gondii*. *Ann Ist Super Sanita*. 40 (1) : 57-63.
- Dubey JP, Thuliez P, Wegel RM, Andrew CD, Lind P, Powel EC. 1995. Sencitivity and Specificity of various serologic test for detection of *Toxoplasma gondii* infection in naturally infected sows. *Am J of Vet Res*. 56: 1033-1036.
- Dubey JP, Linsay DS, Speer A. 1998. Structure of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradizoites and spoozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev*. 11(2) : 267-299.
- Dubey JP, Su C, Oliviera J, Morales JA, Bolanos RV, Sundar N, Kwok OCH, Shen SK. 2006. Biologic and Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in free-ranging chickens from Costa Rica, Central America. *Vet Parasitol*. 139: 29-36
- Dubey JP, Jones JL. 2008. *Toxoplasma gondii* Infection in Human and Animals in United State. *Int J of Parasitol*. 38: 1257-1278

- Faria EB, Gennari MS, Pena HFJ, Athayde RAC, Silva MLCR, Azevedo SS. 2007. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti *Neospora caninum* antibodies in Goats Slaughtered in The Public Slaughterhouse of Patos city, Paraiba State, Northeast region of Brazil. *Vet Parasitol.* 149 : 126-129
- Fusco G, Rinaldi L, Guarino A, Proroga YTR, Pesce A, Giuseppina DM, Cringoli G. 2007. *Toxoplasma gondii* in sheep from the Champania region (Italy). *Vet Parasitol.* 149 : 271-274
- Hartati S, Widada SJ, Sumartono, Kusumawati A. 2003. Cloning of gene encoding SAG1 of lokal isolate *Toxoplasma gondii* in *Escherichia coli* DH5 α . *J Sain Vet.* XX(2): 51-56.
- Hartati S, Kusumawati A, Wuryastuti H, Widada JS. 2006. Primary structure of mature SAG1 gene of an Indonesian *Toxoplasma gondii* and comparison with other strains. *J Vet Sci.* 7(3): 263-270.
- Herzer S, Englert DF. 2001. Nucleic Acid Hybridization. Molecular Biology Problem Solver: A Laboratory Guide. Willey-Liss, Inc.
- Iskandar T. 1998. Pengisolasian *Toxoplasma gondii* dari Otot Diafragma seekor Domba yang mengandung Titer Antibodi Tinggi dan Tanah Tinja dari seekor Kucing. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner.* 3(2) : 111-116.
- Jin Si, Chang ZY, Ming Xu, Min CL, Wei He, Sheng LY, Hong GX. 2005. Fast Dipstick Dye Immunoassay for Detection of Immunoglobulin G (IgG) and IgM Antibodies of Human Toxoplasmosis. *Clin and Diagn Lab Immunol.* 12(1) : 198-201.
- Kazemi B, Bandepour M, Maghen L, Solgi GH. 2007a. Gene Cloning of 30 kDa *Toxoplasma gondii* tachyzoite surface antigen (SAG1). *Iranian J Parasitol.* 2(2) : 1-8.
- Keller GH, Manak MM. 1989. DNA Probe. Macmillan Publisher ltd :1-16
- Montoya, J.G. and Liesenfeld, O. 2004. Toxoplasmosis. *The Lancet* 363 :1965-1967.
- Kusumawati A, Nafratilova S, Hartati S. 2011. Digoxigenin(DIG) Labeled Probe Candidate of Surface antigen1 (SAG1) for *Toxoplasma gondii* Detection. *Ind Jur of Biotech.* 16(1): 17-23.
- Leitch AR, Schwarzacher T, Jackson D, Leitch IJ. 1994. 1sted. In situ hybridization. A practical guide, BOS Scientific Publisher Limited: 4-5:33-39.
- McPherson MJ, Quirke P, Taylor GR. 1992. PCR. A practical Approach. IRL Press.
- Montoya JG, Liesenfeld O. 2004. Toxoplasmosis. *The Lancet* 363 :1965-1967.
- Owen MR, Clarkson MJ, Trees AJ. 1998a. Diagnosis of *Toxoplasma* abortion in ewes by polymerase chain reaction. *The Vet Record.* 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 Universitas Gadjah Mada.
- Priyana A. 2000. Antibodi Anti *Toxoplasma* pada Ayam Kampung (*Gallus domesticus*) di Jakarta. *Majalah Kedokteran Indonesia.* 50(11): 504-507.
- Priyowidodo. 2003. Kajian Metoda Diagnosis Toksoplasmosis secara Polymerase Chain Reaction (PCR) dan Pemeriksaan Histologis. Tesis. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. : 1-51.
- Pruitt KD, Tatusova T, Maglott DR. 2005. NCBI Reference Sequence (RefSeq): A Curated non Redundant Sequence database of genome, transcripts and proteins. *Nucleic Acid Res.* 33, D501-D504.
- Rueue K. 1998. mRNA Quantification Techniques : Consideration for Experimental Design and Application. *The Journal of Nutrition,* 128(11) : 2038-2044.
- Subekti DT, Artama WT, Iskandar T. 2005. Perkembangan kasus dan Teknologi diagnosis Toksoplasmosis. Lokakarya Nasional Penyakit Zoonosis.
- Sumartono, Nurcahyo W, PriyoWidodo D. 2005. Kandidat Probe Parsial Genom *Eimeria tenella* Untuk Optimalisasi Diagnosis Koksidirosis. *J Sain Vet.* 23(2) : 60-66.
- Sumartono, Artama WT, Asmara W, Tabbu CR. 2007. Analisis kandidat probe molekuler untuk diagnosis toksoplasmosis berdasarkan fragmen sekuen repetitif genom takizoit. *Media Kedokteran Hewan* 23(1) : 7-12.
- Susanto L, Gandahusada S, Muljono R. 1999. Invasi *Toxoplasma gondii* ke dalam sel hospes serta deferensiasinya dari takizoit ke bradizoit. *Majalah Kedokteran Indonesia.* 49 (6) : 208-211

- 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.
- Suratma A. 2008. Sensitifitas dan Spesifisitas uji ELISA menggunakan antigen Protein 30 kDa untuk mendeteksi kista *Toxoplasma gondii* dalam jaringan Babi. Disertasi. Denpasar Universitas Udayana.
- 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.
- Susanto L, Gandahusada S, Muljono R. 1999. Invasi *Toxoplasma gondii* ke dalam sel hospes serta deferensiasinya dari takizoit ke bradizoit. *Majalah Kedokteran Indonesia*. 49 (6) : 208-211.
- Tenter AM, Heckerroth AR, Weiss LM. 2000. *Toxoplasma gondii* : From Animals to humans. *Int J of Parasitol*. 30 : 1217-1258.
- Weiss LM, Ma YF, Takvorian PM, Tanowitz HB, Wittner M. 1998. Bradizoite Development in *Toxoplasma gondii* and the hsp 70 Stress Response. *Infect Immun*. 66(2): 3295-3302.
- Weiss LM, Kim K. 2000. The development and Biology of Bradizoite of *Toxoplasma gondii*. *Frontiers in Bioscience* 6: 391-405.
- Yowani SC, Kumolosasi E, Wibowo MS. 2007. Karakterisasi *Toxoplasma gondii* Isolat Indonesia. *Jurnal Kimia* 1(1) : 29-38.
- Yuwono T. 2006. Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction. Edisi pertama. Penerbit Andi Yogyakarta : 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.