

PERBANDINGAN IDENTIFIKASI *Toxoplasma gondii* MENGGUNAKAN METODE PCR DAN METODE ELFA

Miftahul Mushlih^{1*}, Alifia Nurfitriana¹, Kurnia Wahyu Ningsih¹,
Nurul Azizah², Nia Lukita Ariani³, & Ilham Lubiz⁴

- 1) Teknologi Laboratorium Medis, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Sidoarjo, Indonesia.
- 2) Pendidikan Profesi Bidan, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Sidoarjo, Indonesia.
- 3) Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Tribhuwana Tunggaladewi
- 4) Klinik Pramita cabang Sumatera barat

Correspondence to: mif.mushlih@umsida.ac.id

Abstract

Background: *Toxoplasmosis is an infectious disease that does not show specific symptoms.*

Purpose: *This study aimed to determine the differences results of *T. gondii* detection in human blood using the PCR (polymerase chain reaction) with the ELFA (Enzym Linked Fluorescent Assay) method.*

Method: *The research was done by descriptive exploratory methods. Samples taken from 9 West Sumatra Pramita Clinics Laboratory and 1 person came from Sidoarjo as a control. Data analyzes was conducted by a chi-square test with a 95% confidence level. In the ELFA method detects IgG Anti-Toxoplasma. Whereas the molecular test detects B1 gene target. The serological test was able to detect 9 patients of toxoplasmosis and 1 patient was negative/control.*

Result: *The molecular test showed a specific band with 195 bp in length. The accuracy of the molecular test was 77% (T count (4.4) < T table (3.84)).*

Conclusion: *Based on the results its can be concluded that there a difference in identification between the PCR method and the ELFA method.*

Keywords: *Toxoplasmosis, Serologi, Molekular*

Pendahuluan

Toxoplasmosis merupakan suatu penyakit zoonosis, yang dapat menyerang makhluk hidup berdarah panas¹. Penyakit toxoplasmosis telah menyebar pada sebagian besar penduduk di seluruh dunia. Di Indonesia prevalensi toxoplasmosis pada manusia sangat tinggi berkisar di atas 40% kasus, sedangkan pada hewan yaitu pada kucing 5,56-40%,

kambing 2,5-60%, domba 32,18-71,97% dan babi 28–32%².

Adanya parasit *T. gondii* dengan stadium takizoit di dalam tubuh dapat menghasilkan infeksi akut, sedangkan parasit ini dengan stadium bradizoit di dalam tubuh akan menetap seumur hidup dan dapat menimbulkan infeksi primer. Infeksi toxoplasmosis pada keadaan kekebalan tubuh yang baik tidak menyebabkan infeksi yang serius bahkan tidak menunjukkan gejala klinis,

toxoplasmosis berakibat fatal jika infeksi bersifat keturunan dengan pasien mengalami immunosupresi³. Umumnya diagnosis penyakit infeksi dapat dilaksanakan berdasarkan gejala klinis yang terjadi. Pada kasus toxoplasmosis diagnosis berdasarkan gejala klinis tidak bereaksi karena secara klinis kasus toxoplasmosis tidak menunjukkan gejala klinis dan gejala yang timbul tidak spesifik⁴. Berdasarkan tingginya kasus toxoplasmosis diperlukan metode pengembangan diagnosis secara dini, sensitif, spesifik dan dilakukan pencegahan yang baik pada manusia atau hewan. Diagnosis secara serologi juga berhubungan dengan evaluasi profil respon imun dan penetapan status infeksi⁵.

Diagnosa serologi dapat menunjang diagnosis toxoplasmosis yang berguna untuk mengetahui respon imun dan penetapan status infeksi⁵. *Enzym Linked Fluoresense Assay* (ELFA) dalam perangkat mini vidas digunakan untuk mengidentifikasi adanya IgG dan IgM. Metode ELFA merupakan sebuah teknik untuk mendiagnosis patogen seperti virus, parasit, bakteri, dan dapat mengukur imunoglobulin¹. Metode ini menggunakan dua langkah enzim dan dasar yang akan bertindak bergantung

pada interaksi antara antibodi pasien dengan antigen yang ditempatkan dalam reagen strip siap pakai dan fase padat berupa *Solid Phase Reseptacle* (SPR)¹.

Pengembangan diagnosis dengan cara molekular dengan menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) sebagai metode diagnosis dinyatakan dapat memberikan kepekaan dan akurasi yang tinggi untuk mendeteksi adanya *T. gondii*. Diagnosis secara molekuler bertujuan untuk memastikan keberadaan parasit dalam darah dan tipe atau klonet *T. gondii*⁵. *Polymerase Chain Reaction* (PCR) memiliki keunggulan yang dapat dikatakan sangat tinggi. Didasarkan dari spesifitas, efisiensi dan keakuratan yang didapatkan. PCR memiliki spesifitas yang terletak pada kemampuan dalam mengamplifikasi DNA sehingga dapat menghasilkan produk melalui sejumlah siklus. Kelemahan PCR ini yaitu pada biaya yang masih tergolong tinggi PCR sebagai metode molekular keberhasilannya sangat ditentukan oleh primer.

Menurut Robert dalam gen B1 dalam *T. gondii* memiliki spesifitas yang tinggi, sehingga digunakan sebagai target amplifikasi dalam reaksi berantai

polimerasi (PCR) untuk mendeteksi parasit. Primer ditentukan berdasarkan urutandata dari GenBank. Pada metode PCR dengan menggunakan primer gen B1 dapat mendeteksi takizoit, dari hasil yang diberikan metode ini lebih spesifik dan sensitif. Hasil yang diberikan sangat sensitif dalam mendeteksi adanya *T. gondii* pada jaringan atau amnion yaitu dengan menggunakan gen B1 sebagai primer⁴.

Metode Penelitian

Penelitian ini bersifat deskriptif eksploratif. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini dari 10 spesimen darah dari pasien yang telah didiagnosa positif toxoplasmosis pada laboratorium klinik Pramita Sumatera Barat dan 1 spesimen darah dari Sidoarjo sebagai kontrol negatif. Kriteria sampel pada penelitian ini adalah pasien yang telah didiagnosis positif toxoplasmosis. Sampel *T. gondii* didapat dari Sumatera yang merupakan populasi pada penelitian ini. Sedangkan sample yang digunakan dalam penelitian ini adalah serum darah. Dalam penentuan sampel didapatkan dengan cara *purposive sampling*. Pengambilan sampel ini dilakukan dengan pertimbangan tertentu.

Ekstraksi DNA menggunakan protocol standart GeneAid kemudian

dilakukan pengecekan konsentrasi menggunakan menggunakan UV Vis Spektrofotometer. Proses PCR dilakuan dengan volume 25µl dengan komposisi 15µl PCR, 3µl DNA, 1µl Primer Forward 5'GGAAGTGCATCCGTTTCATGAG3' dan 1µl Primer Rivers 5'TCTTTAAAGCGTTCGTGGTC3'.

Proses *Polymerase Chain Reaction (PCR)* dilakukan dengan Biorad T100 thermocycler dengan rincian Predenaturasi 94°C selama 5 menit; Denaturasi 94°C selama 1 menit; Annealing 53°C; Extension selama 72°C 1 menit; post extension 72°C selama 10 menit sebanyak 35 siklus. Produk PCR emudian dilakuan Elektroforesis menggunakan gel agarosa 2%.

Proses *Enzym Linked Fluoresense Assay (ELFA)* dalam pemeriksaan untuk mengetahui IgM dan IgG Anti-Toxoplasma diperlukan alat Mini Vidas yang digunakan untuk pemeriksaan imunologi menggunakan metode ELFA. Kebutuhan sampel yang digunakan yaitu serum untuk pemeriksaan IgM dan IgG Anti-Toxoplasma.

Hasil dan Pembahasan

Sebanyak 10 sampel digunakan dalam penelitian ini yang terdiri dari 1

sampel yang terdiagnosis negative toxoplasmosis dan 9 sampel yang terdiagnosis positif toxoplasmosis. Sampel positif didapatkan berdasarkan hasil pemeriksaan mengenai diagnosis toxoplasmosis oleh dokter. Sampel

kemudian diekstraksi, di PCR kemudian di analisis menggunakan teknik PCR dengan menggunakan primer B1. Serta juga dilakukan proses *Enzym Linked Fluoresense Assay* (ELFA).

Tabel 4. Tabel Hasil IgG toxoplasmosis menggunakan Metode ELFA

No.	Kode Sampel	ELFA (UA/ml)
1.	Sampel 1	325
2.	Sampel 2	55
3.	Sampel 3	39
4.	Sampel 4	55
5.	Sampel 5	75
6.	Sampel 6	58
7.	Sampel 7	30
8.	Sampel 8	273
9.	Sampel 9	78
10.	Sampel Negatif	Negatif

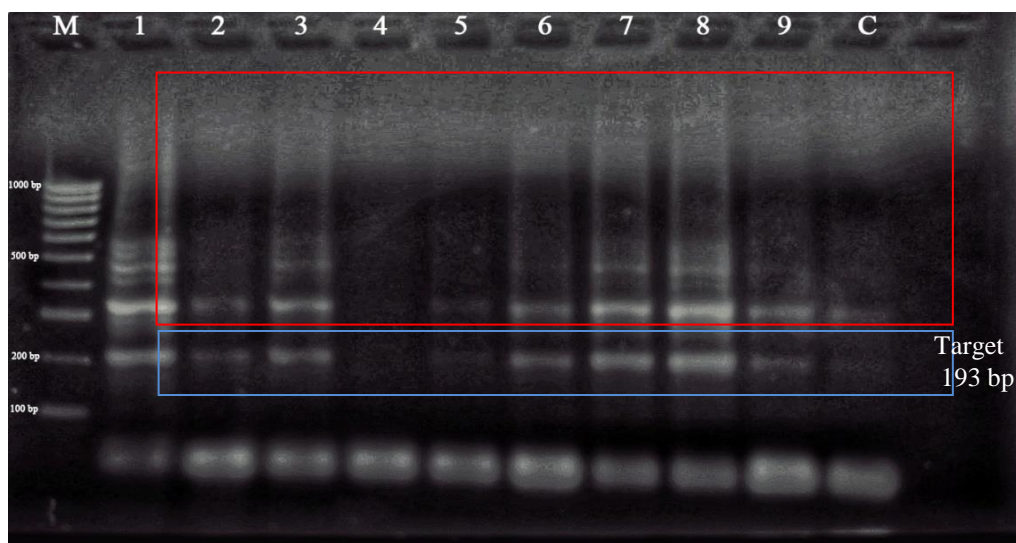
Uji serologi ELFA digunakan untuk mendeteksi anti – toxoplasma dalam tubuh pasien. Teknik ELFA diterapkan dalam instrumen Mini – Vidas. Prinsip ELFA yaitu menggabungkan dua langkah enzim immunassay metode sandwich dengan deteksi fluorescent diakhir perlakuan. *Solid Phase Receptacle* (SPR) atau tahap wadah padat berfungsi sebagai fase padat serta perangkat pemipetan. Anti *Toxoplasma* IgM antibodi dalam serum akan mengikat antigen *Toxoplasma* lapisan anterior dari SPR tersebut. Komponen terikat dieliminasi selama tahap pencucian. Semua proses pengujian metode ELFA

dilakukan secara otomatis menggunakan instrumen⁶.

Uji serologi dianjurkan untuk mengetahui keadaan antibodi dalam tubuh. Dasar pemeriksaan serologis ini adalah antigen toksoplasmosis bereaksi dengan antibodi spesifik Toksoplasmosis yang berada dalam serum darah penderita⁷. Uji serologi untuk identifikasi IgG *T. gondii* memiliki nilai normal < 4. Pada uji serologi diagnosis toxoplasmosis dengan deteksi kadar IgG dan IgM. Deteksi kadar IgG merupakan tes untuk mengkonfirmasi adanya *T. gondii*. Mengetahui perbedaan antara fase kronis dan fase akut pada infeksi toxoplasmosis diperlukan sebuah tes

untuk mengkonfirmasi diagnosa yaitu dengan deteksi kadar IgG)⁸. Pada kode sampel nomer 2, 3, 4, 5, 6, 7 dengan hasil yang telah ditampilkan pada tabel 4 dimungkinkan bahwa pasien telah melewati masa puncak pada titer tinggi, sehingga didapatkan hasil IgG yang

tidak tinggi. Pada masa ini pasien sedang mengalami tahapan kronis dimana titer yang tinggi akan menurun secara perlahan dan infeksi ini akan menetap seumur hidup pada tubuh pasien⁹.



Gambar 1. Hasil Amplifikasi DNA *T. gondii* gen B1 pada sampel manusia. Ket. Agarose : 2%, primer : 100 pmol, siklus : 35 siklus, band target : 193 bp, M : Marker, kode 1 – 9 : sampel positif, kode C : sampel negatif, *mispriming* ditunjukkan pada kotak berwarna merah, dan kotak berwarna biru menunjukkan gen target

Berdasarkan hasil uji kualitas DNA pada Gambar 1. hasil fragmen ampifikasi DNA *T. gondii* pada sampel darah manusia. Sembilan sampel positif *T. gondii* yang digunakan dalam penelitian ini menunjukkan adanya pita DNA dengan panjang 195 bp di beberapa sampel. Hasil elektroforesis pada Gambar 1 pita DNA yang terlihat pada kode sampel 1, 3, 6, 7, 8, 9 sedangkan pada kode sampel yang lain seperti 4, 5 dan C (kontrol) pita DNA

tidak terlihat. Pita Hasil amplifikasi DNA memiliki panjang 195 bp.

Konsentrasi primer memberi efek pada kualitas fragmen hasil *running* elektroforesis. Pada penelitian ini menggunakan primer dengan konsentrasi 100 pmol agar primer yang digunakan membantu proses amplifikasi DNA target yang kemungkinan berjumlah sedikit, sehingga hasil elektroforesis didapatkan hasil band yang jelas. Ada

beberapa faktor yang mempengaruhi hasil kualitas fragmen DNA diantaranya yaitu faktor isolasi DNA yang seharusnya menggunakan kit standart isolasi DNA menggunakan qiagen dan kemungkinan tidak adanya DNA *T. gondii* dalam hasil isolasi DNA¹⁰.

Adanya *mispriming* yaitu karena panjang primer yang tidak sesuai atau konsentrasi primer yang tinggi menyebabkan penempelan primer di luar sekuen target atau munculnya *band* yang tidak diinginkan. Penyebab *mispriming* lainnya kemungkinan adanya genom manusia juga ikut teramplifikasi dan atau adanya patogen lain pada sampel pasien . Hal ini dapat terlihat pada Gambar 4.1 dengan tanda panah merah pada panjang *band* 260 bp – 1056 bp sedangkan *band* target dalam peneitian ini ditunjukkan pada Gambar 4.1 di baris band 195 bp dalam kotak biru. Dalam penelitian ini metode standart untuk melakukan pemeriksaan *T. gondii* menggunakan kit standart dan membutuhkan validasi hasil lebih lanjut untuk memastikan hasil akurat. Kit standart merupakan kit yang sudah menjadi standart pemeriksaan, kit standart yang digunakan yaitu real time PCR lebih disarankan digunakan dari pada menggunakan metode konvensional¹¹.

Diagnosa adanya toxoplasmosis dengan menggunakan gen B1 sebagai target untuk metode PCR mudah untuk mendeteksi adanya *T. gondii*. Namun peran dari gen B1 ini sendiri belum diketahui dengan jelas pada toxoplasmosis. Spesifitas PCR akan lebih baik jika dilakukan dengan test lain seperti diakukannya uji morfologi, uji serologi dan uji molekuler¹². Sebagian besar pasien yang menunjukkan hasil PCR positif adalah pada pasien dengan hasil ELFA IgM positif dan IgG positif. Penelitian lain menunjukkan rendahnya titer IgM negatif dan IgG positif mampu berkorelasi dengan hasil PCR yang positif⁸. Hasil yang tidak muncul pada nomor sampel 4 dan 5 dengan hasil ELFA 55 dan 75 dimungkinkan bahwa titer anti toxopasmosis masih ada dalam tubuh tetapi rendah. Sehingga apabila dilakukan proses penanganan sampel akan didapatkan hasil yang kurang maksimal dan *band* hasil PCR tidak muncul.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan hasil identifikasi *T. gondii* antara metode ELFA dan metode PCR. Analisis lebih lanjut mengenai perbedaan identifikasi toxoplasmosis

perlu dilakukan menggunakan kit standart.

Daftar Pustaka

1. Al-Abady, F.A., Salman, A.N., & Hadi, Z.S. (2014). Diagnostic Study for Some Causes of Abortion by Enzyme Linked Fluorecent Assay (ELFA) among Women in Thi-Qar Governorate. *Basrah Jurnal of Science*, 32(2), 231-247.
2. Ditjen Peternakan dan Kesehatan Hewan. (2014). *Manual Penyakit Hewan Mamalia* (hal. 460-470). Jakarta: Subdit Pegamatan Penyakit Hewan Direktorat Kesehatan Hewan.
3. Priyowidodo, D., Mada, U. G., Hartati, S., Mada, U. G., Kusumawati, A., Mada, U. G., & Prastowo, J. (2015). Diagnosis Toksoplasmosis Kongenital Berdasarkan Gen Surface Antigen-1 *Toxoplasma gondii* Isolat Lokal Menggunakan Polymerase Chain. *Jurnal Veteriner*, 16(3), 303–309.
4. Apsari, I.A.P., Artama, W.T., Sumartono., & Damriyasa, I.M. (2012). Diagnosis Molekuler *Toxoplasma gondii* Berdasar Gen Stage Spesifik Takizoit dan Bradizoit pada Ayam Kampung. *Jurnal Veteriner*, 13(1), 14–19.
5. Subekti, D. T., Artama, W. T., & Iskandar, T. (2010). Perkembangan Kasus dan Teknologi Diagnosis Toksoplasmosis. *Lokakarya Nasional Penyakit Zoonosis*, 253–264.
6. Laze, B., & Lugaj, A. (2017). Evaluation of an electrochemiluminescence immunoassay and an enzyme-linked fluorescent assay for detection of anti-cytomegalovirus IgM and anti-toxoplasma IgM antibodies in pregnant women. Retrieved from <http://bioscience.scientific-journal.com>
7. Hiswani. (2009). Toksoplasmosis Penyakit Zoonosis yang Perlu Diwaspadai. *USU E-Journal*, 9(1), 42–49.
8. Mousavi, P., Mirhendi, H., Mohebali, M., Shojaee, S., Valian, H. K., Fallahi, S., & Mamishi, S. (2018). Detection of *Toxoplasma gondii* in Acute and Chronic Phases of Infection in Immunocompromised Patients and Pregnant Women with Real-time PCR Assay Using TaqMan Fluorescent Probe. *Iranian Journal of Parasitology*, 13(3), 373-381
9. Soedarto. (2012). Masalah Titer IgG dan IgM dalam Menentukan Diagnosis Toksoplasmosis. *Jurnal Ilmiah Kedokteran Wijaya Kusuma*, 6(2), 1-5. DOI: 10.30742/jikw.v6i2.58
10. Hartawan, R & Dharmayanti. (2013). Uji Skrining untuk Virus Newcastle Disease, Avian Influenza dan Infectious Bronchitis Menggunakan Pendekatan Uji Multiplex Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction. *Balai Besar Penelitian Veteriner*, 18(3). Retrieved from <http://medpub.litbang.pertanian.go.id/index.php/jitv/rt/printerFriendly/317/318>
11. ELITechGroup. 2020, *Toxoplasma gondii* Elit MGB Kit, <https://www.elitechgroup.com/product/3360-2>

12. Nurcahyo, W., Prastowo, J., Sahara, A., (2012). Molekular Detection of Toxoplasmosis Using Spesific Primer P30, B1, dan rDNA. *Jurnal Veteriner*, 13(1), 9-13.