

PEMERIKSAAN DIAGNOSIS MOLEKULER *TOXOPLASMA GONDII*/MENGGUNAKAN TEKNIK PCR: STUDI LABORATORIUM DAN ANALISIS DIAGNOSTIK

Ayu Eka Fatril, S.Pd., M.Biomed.
Fakultas Kedokteran IPB University
ayuekaf@apps.ipb.ac.id

ABSTRAK

Polymerase Chain Reaction (PCR) telah menjadi metode yang sangat sensitif dan spesifik dalam deteksi molekuler berbagai patogen, termasuk *Toxoplasma gondii*, parasit protozoa penyebab penyakit toksoplasmosis. Penelitian ini bertujuan dalam memahami pelaksanaan diagnosis molekuler *T. gondii* melalui PCR dengan menggunakan gen target spesifik untuk identifikasi dan interpretasi hasil melalui hasil elektroforesis. Sampel DNA diuji dengan teknik PCR dan hasil diamati dengan sinar UV setelah elektroforesis gel agarosa 2%. Hasil menunjukkan keberadaan pita DNA dengan panjang sekitar 300 bp pada salah satu sampel, sedangkan sampel lainnya tidak menunjukkan pita, dan kontrol negatif menunjukkan hasil sesuai harapan yaitu tidak terdapat pita. Temuan ini menegaskan pentingnya teknik PCR sebagai alat diagnostik akurat dalam mendeteksi *T. gondii*, serta pentingnya kontrol kualitas untuk menghindari hasil positif palsu.

Keyword: *Toxoplasma gondii*, PCR, diagnosis molekuler, elektroforesis, DNA parasit

PENDAHULUAN

Toxoplasma gondii merupakan parasit obligat intraseluler yang menginfeksi hampir semua spesies berdarah panas, termasuk manusia. Infeksi tersebut dikenal sebagai toksoplasmosis, yang pada sebagian besar individu imunokompeten bersifat asimptomatis. Infeksi toksoplasmosis dapat menjadi fatal pada janin, pasien dengan gangguan imun, atau individu yang menerima transplantasi organ. Penularan dapat terjadi melalui konsumsi daging mentah yang mengandung kista, kontaminasi makanan dengan ookista dari feses kucing, atau secara vertikal dari ibu ke janin.

Toxoplasma gondii di dalam hospes perantara terdapat dalam dua stadium yaitu stadium takizoit yang menimbulkan infeksi akut dan stadium bradizoit yang berada dalam kista jaringan dan akan menetap seumur hidup. Takizoit menginfeksi semua sel berinti dan akan berkembang biak secara endodiogeni. Takizoit dengan cepat menyebar melalui aliran darah atau limfe ke seluruh tubuh. Setelah kira-kira dua minggu takizoit akan berkurang dan bradizoit akan berkembang dalam jaringan hospes. Bradizoit dapat menghindarkan diri dari sistem imun dan pengobatan karena berada di dalam kista. Bradizoit dapat kembali berubah menjadi takizoit bila sistem imun terganggu misalnya pada keadaan imunosupresi.

Diagnosis toksoplasmosis secara konvensional umumnya dilakukan melalui pemeriksaan serologi, namun metode ini memiliki keterbatasan, terutama pada kasus infeksi akut atau kronis yang sulit dibedakan berdasarkan respons antibodi. Oleh karena itu, teknik PCR dikembangkan sebagai metode diagnostik molekuler yang lebih sensitif dan spesifik.

Teknik PCR mampu mendeteksi sejumlah kecil DNA parasit dalam sampel biologis. Dengan menggunakan primer spesifik yang menargetkan segmen DNA tertentu dari *T. gondii*, teknik ini memungkinkan amplifikasi DNA hingga jutaan kali lipat. Teknik ini sangat penting terutama dalam mendeteksi infeksi dini, memantau reaktivasi pada pasien immunocompromised, serta untuk keperluan penelitian dan surveilans epidemiologis.

METODOLOGI

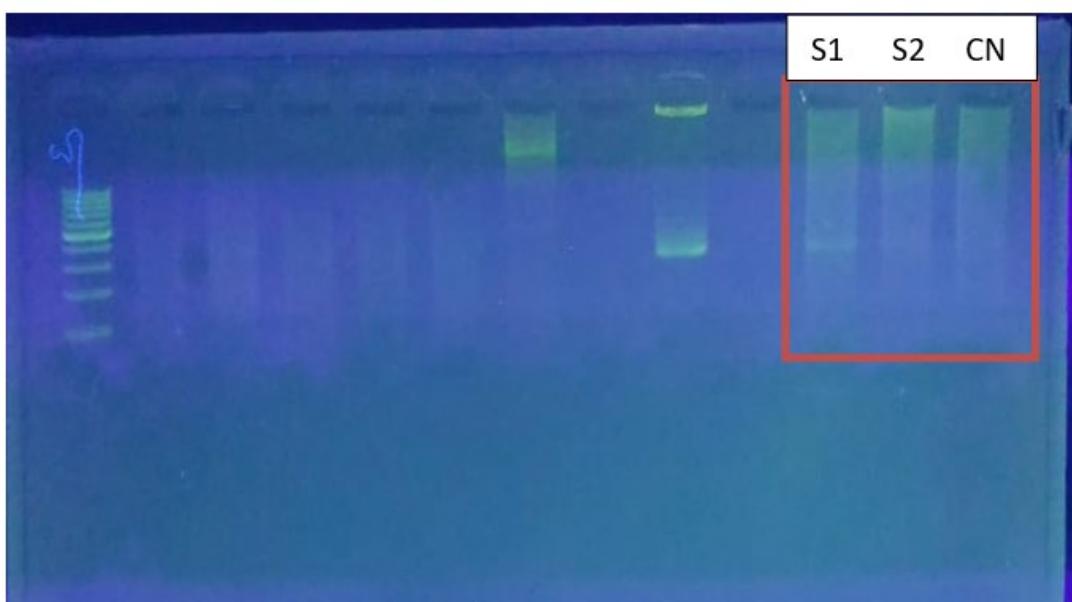
Penelitian dilakukan di Laboratorium Serologi Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia pada 29 November 2018. Alat-alat yang digunakan seperti mesin PCR, mikropipet, tube mikroreaksi, serta alat elektroforesis dan transiluminator UV. Bahan yang digunakan meliputi campuran master (TopTaqMM), MgCl₂, primer spesifik untuk *T. gondii*, DNA sampel, dan *nucleus free water (nfw)*.

Dalam melakukan perhitungan reaksi, maka sebanyak tiga reaksi PCR disiapkan, terdiri dari dua sampel DNA dan satu kontrol negatif. Setiap tabung PCR berisi 20 µl reaksi: 18 µl master mix dan 2 µl DNA (atau air untuk kontrol negatif). Reaksi PCR dilakukan dalam mesin dengan siklus sebagai berikut: denaturasi awal pada 98°C selama 30 detik; diikuti 40 siklus denaturasi pada 94°C selama 45 detik, annealing pada 60°C selama 45 detik, dan ekstensi pada 72°C selama 1 menit; serta ekstensi akhir pada 72°C selama 10 menit.

Produk PCR kemudian dijalankan dalam elektroforesis gel agarosa 2% dengan Hyperladder 100 bp sebagai penanda ukuran, pada 100 volt selama 30 menit, dan diamati di bawah sinar UV.

HASIL

Hasil PCR yang dilakukan dan di elektroforesis menunjukkan hasil sebagai gambar berikut :



Gambar 1. Hasil elektroforesis pada agarose 2%

Interpretasi hasil sebagai berikut:

- a. Sampel 1: Muncul pita DNA yang jelas dengan ukuran sekitar 300 bp.
- b. Sampel 2: Tidak terlihat adanya pita DNA.
- c. Kontrol Negatif: Tidak terdapat pita, menunjukkan tidak adanya kontaminasi silang atau amplifikasi non-spesifik.

PEMBAHASAN

Berdasarkan penelitian yang dilakukan maka didapatkan hasil dari teknik PCR, untuk gen *T. gondii*, dilakukan dua kali tahapan PCR. Tahapan pertama dan tahapan kedua, dengan langkah yang berbeda. Tahapan pCR yang dilakukan pada penelitian ini hanyalah tahapan PCR yang pertama.

Pada tahapan ini, didapatkan hasil bahwa

- a. Sampel 1 :
Pada sampel satu saat dilakukan elektroforesis, terlihat ditemukan adanya band yang tampak dengan panjang 300 bp. Hal ini menandakan tahapan PCR yang dilakukan untuk pemeriksaan gen *T. gondii* sesuai. Hasil ini sama dengan yang ditemukan di literatur bahwa hasil panjang bp dari PCR yakni sekitar 200-300 bp. Untuk mendapatkan hasil PCR yang lebih baik lagi maka dilanjutkan ke tahapan PCR ke 2. Akan terlihat bahwa hasil band lebih jelas.
- b. Sampel 2 :
Pada sampel 2 saat dilakukan elektroforesis didapatkan hasil bahwa tidak terlihat adanya band. Hal ini tidak bisa digolongkan bahwa hasilnya adalah negatif, hasil negatif untuk tahapan PCR dari gen *T. gondii* yakni setelah tahapan PCR kedua. Hasil negatif ini bisa disebabkan karena kurangnya jumlah amplifikasi yang terbentuk ataupun belum terjadi proses amplifikasi dengan baik. Oleh karena itu dilakukan tahapan PCR kedua untuk memastikan hal tersebut.
- c. Kontrol negatif :
Kontrol negatif pada penelitian ini menghasilkan hasil yang diinginkan, yakni tidak adanya band yang terlihat. Hal ini menandakan bahwa tahapan PCR yang dilakukan sudah benar, tidak adanya band yang terlihat disebabkan oleh karena tidak adanya DNA yang dimasukkan ke dalam tube dan tahapan PCR, jadi tidak ada proses amplifikasi yang terjadi. Jika pada kontrol negatif ini ditemukan adanya band, menandakan ada perlakuan yang salah saat melakukan PCR, seperti adanya kontaminasi dari DNA lain sehingga terjadi proses amplifikasi.

Teknik PCR merupakan teknik unggulan dalam diagnostik molekuler karena kemampuannya mengamplifikasi segmen DNA target secara eksponensial. Keberhasilan amplifikasi pada Sampel 1 mengindikasikan keberadaan DNA *T. gondii* dalam sampel tersebut, sesuai dengan target ukuran yang dilaporkan dalam literatur (200–300 bp tergantung primer).

ketidakditemukannya pita pada Sampel 2 tidak serta-merta menandakan hasil negatif. Hasil ini bisa disebabkan oleh:

- a. Konsentrasi DNA target yang sangat rendah (di bawah limit deteksi PCR).
- b. Inhibitor PCR dalam sampel.
- c. Mutasi pada situs pengikatan primer.
- d. Kesalahan teknis saat pipetasi.

Teknik PCR tahap kedua atau nested PCR dapat digunakan untuk meningkatkan sensitivitas, terutama pada kasus dengan beban parasit yang rendah.

Sementara itu, hasil negatif pada kontrol menunjukkan bahwa prosedur dilakukan tanpa kontaminasi, mengindikasikan integritas teknik yang baik. Keberadaan kontrol negatif dalam setiap reaksi PCR adalah prinsip penting dalam menghindari interpretasi salah.

Akurasi hasil PCR juga dipengaruhi oleh desain primer, efisiensi enzim, dan kondisi termal. Oleh karena itu, proses optimasi suhu annealing dan konsentrasi MgCl₂ sangat penting.

Studi sebelumnya juga mendukung efektivitas PCR dalam mendeteksi DNA *T. gondii* dari berbagai sampel biologis seperti darah, cairan serebrospinal, dan jaringan. Menurut studi Newton dan Graham (1994), PCR memiliki sensitivitas yang jauh lebih tinggi dibandingkan metode konvensional dan dapat mendeteksi 1–10 salinan DNA per reaksi.

KESIMPULAN

Teknik PCR terbukti sebagai metode yang efektif dan akurat untuk mendeteksi DNA *Toxoplasma gondii*. Hasil elektroforesis menunjukkan bahwa setidaknya satu dari dua sampel mengandung DNA target, sedangkan kontrol negatif tidak menunjukkan kontaminasi. Untuk meningkatkan sensitivitas deteksi, dapat dilakukan nested PCR atau real-time PCR sebagai tindak lanjut.

DAFTAR PUSTAKA

1. Nurcahyo, W., Priyowidodo, D. & Hanafiah, M. (2004). Pengaruh Infeksi *Toxoplasma gondii* Isolat Lokal Terhadap Gambaran Darah pada Mencit (*Mus musculus*). *Jurnal Sains Veteriner*, XXX(1), 68–73.
2. Lesmana, S.D. (2010). Diferensiasi Stadium Takizoit-Bradizoit pada *Toxoplasma gondii*. *Jurnal Ilmu Kedokteran*, 4, 89–94.
3. Hartono, T. (1989). Temuan Kista *Toxoplasma gondii* Pada Babi di Rumah Potong Surabaya dan Malang.
4. Bruce, B. (Ed.). (1997). *Genome Analysis, A Laboratory Manual Vol. 1 (Analyzing DNA)*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
5. Newton, C.R. & Graham, A. (1994). *PCR*. Oxford: BIOS Scientific Publishers.
6. Montoya, J. G., & Liesenfeld, O. (2004). Toxoplasmosis. *The Lancet*, 363(9425), 1965–1976.
7. Burg, J.L., Grover, C.M., Pouletty, P., & Boothroyd, J.C. (1989). Direct and Sensitive Detection of a Pathogenic Protozoan, *Toxoplasma gondii*, by Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 27(8), 1787–1792.