

DETEKSI GEN P30 UNTUK DIAGNOSIS TOKSOPLASMOSIS DENGAN REAKSI RANTAI POLIMERASE

Lisawati Susanto, Taniawati Supali, Srisasi Gandahusada

Bagian Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta 10430

Abstrak

Toxoplasma gondii adalah protozoa intraselular yang dapat menyebabkan toksoplasmosis. Pada orang sehat (imunokompeten) infeksi biasanya tidak disertai gejala klinis, sedangkan pada penderita imunokompromais terutama pada penderita AIDS infeksi dapat berakibat fatal. Infeksi primer pada wanita hamil dapat mengakibatkan terjadinya transmisi melalui plasenta ke janin. Karena itu pemeriksaan laboratorium mutlak diperlukan untuk menentukan adanya infeksi *T.gondii*, sehingga pengobatan dapat diberikan dengan segera untuk menghindari kerusakan lebih lanjut. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan apakah *Polymerase chain reaction* (PCR) dengan menggunakan gen P30 dapat mendeteksi DNA *T.gondii*. Pada DNA yang diisolasi dilakukan PCR terhadap target gen P30 menurut metode menurut metode Weiss dkk. dan Chang & Ho. *Primer* gen P30 terdiri dari oligo 1 : 5'CACACGGTTGTATGTCGGTTTCGCT3' dan oligo 2 : 5'TCAAGGAGCTCAATG TTACAGCCT3'. Sampel DNA yang digunakan untuk PCR dengan target gen P30 terdiri dari berbagai macam bahan yaitu : (a) DNA murni *T.gondii* dengan berbagai konsentrasi, (b) campuran DNA murni *T.gondii* dengan DNA darah manusia sehat, (c) DNA dari takizoit yang berasal dari campuran 99 µl darah manusia sehat dengan 1 µl suspensi takizoit yang masing-masing mengandung 1000,100, 50, 40, 30, 20 dan 10 takizoit. PCR dengan target gen P30 yang dilakukan menurut metode Weiss dkk. memberikan pita yang 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. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa konsentrasi minimal DNA *T.gondii* yang masih terdeteksi pada sampel DNA murni *T.gondii* adalah 1 pg, pada sampel DNA murni *T.gondii* yang dicampur dengan DNA manusia sehat adalah 0,025 ng dan pada sampel darah manusia sehat yang dicampur dengan suspensi takizoit adalah DNA yang berasal dari minimal 20 takizoit. Dengan demikian dapat disimpulkan PCR dengan menggunakan target gen P30 dapat digunakan untuk mendeteksi DNA *T.gondii*.

Abstract

Detection of P30 gene to diagnosis of toxoplasmosis by using polymerase chain reaction. *Toxoplasma gondii* is an intracellular protozoan which causes toxoplasmosis. In healthy persons (immunocompetent) the infection is usually asymptomatic; however in immunocompromised patients, especially AIDS patients, the infection can be fatal. Primary infection in pregnant women can be transmitted to the fetus via the placenta. Therefore laboratory examination is absolutely necessary to assess the presence of *T.gondii* infection hence prompt treatment can be given to prevent further damage. The aim of this study is to know whether by using P30 gene as target the *Polymerase chain reaction* (PCR) can detect *T.gondii* DNA in Indonesia. The PCR was performed on the DNA which had been isolated against P30 gene as target by using the method described by Weiss et al and Chang & Ho. The P30 gene primers consisted of oligo 1: 5'CACACGGTTGTATGTCGGTTTCGCT3' and oligo 2: 5'TCAAGGAGCTCAATGTTAC GCT3'. The DNA samples used in the PCR with P30 gene as target were derived from the following materials: (a) pure *T.gondii* DNA of various concentrations, (b) a mixture of pure *T.gondii* DNA and normal human blood DNA, (c) tachyzoite DNA derived from the mixture of 99 µl normal human blood and 1 µl tachyzoite suspension with the following amount of tachyzoites :1000,100, 50, 40, 30, 20 and 10 tachyzoites. It was shown that no specific bands were observed in the PCR with P30 gene as target (performed according to the method described by Weiss et al). The PCR according to the method described by Chang & Ho 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. The results obtained showed that the minimal DNA concentrations which still could be detected using P30 gene as target were as follows : 0.001 ng DNA in 50 µl PCR solution from samples of pure DNA, 0.025 ng DNA in 50 µl PCR solution from samples of pure DNA mixed with normal human blood and the amount of DNA originated from at least 20 tachyzoites. It was concluded that the assay using P30 gene as target could be used for detecting *T.gondii* DNA in Indonesia.

Keywords : *Toxoplasma gondii*, DNA, P30 gene

Pendahuluan

Toxoplasma gondii adalah suatu protozoa yang hidupnya secara intraselular. Infeksi *T.gondii* pada manusia dapat menyebabkan toksoplasmosis. Infeksi pada individu yang imunokompeten biasanya asimtomatik. Sebaliknya, toksoplasmosis pada penderita imunokompromais dapat berakibat fatal¹. Diagnosis toksoplasmosis biasanya dilakukan dengan pemeriksaan serologi yaitu dengan *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) untuk mendeteksi adanya zat anti IgG dan IgM terhadap *T.gondii* di dalam serum. Pemeriksaan serologi ini memberikan hasil yang memuaskan pada penderita imunokompeten bila dilakukan pada infeksi primer atau reaktivasi akut, namun pada penderita imunokompromais pemeriksaan serologi ini tidak memberikan hasil yang memuaskan¹. Selain itu, produksi IgM spesifik terhadap *T.gondii* kadang-kadang dapat menetap bertahun-tahun sehingga menimbulkan kesulitan dalam menentukan waktu terjadinya infeksi². Pada kasus tersebut, diagnosis toksoplasmosis dilakukan dengan cara isolasi *T.gondii* yang diperoleh melalui inokulasi mencit. Walaupun inokulasi mencit ini cukup sensitif, namun memerlukan waktu yang lama yaitu 3-6 minggu³⁻⁴. Akhir-akhir ini telah dikembangkan suatu teknik reaksi rantai polimerase (*polymerase chain reaction/PCR*) yang digunakan untuk mendiagnosis toksoplasmosis akut⁵. PCR adalah suatu teknik *in vitro* untuk memperbanyak DNA secara enzimatik, sehingga DNA dalam jumlah sedikitpun dapat terdeteksi. PCR merupakan teknik yang terpilih karena PCR bersifat sensitif dan spesifik serta dapat mendeteksi adanya DNA *T.gondii* dalam waktu 10 jam⁵. Savva dkk,⁶ telah melakukan penelitian untuk mendeteksi *T.gondii* dengan menggunakan gen P30 sebagai target. Dengan menggunakan teknik PCR Savva dkk,⁶ dapat mendeteksi 10 pg DNA murni *T.gondii*.

Sampai saat ini pemeriksaan yang banyak dilakukan untuk diagnosis toksoplasmosis akut adalah pemeriksaan serologi untuk mendeteksi adanya zat anti IgG dan IgM terhadap *T.gondii* di dalam serum. Namun pemeriksaan serologi ini tidak memberikan hasil yang memuaskan terutama pada bayi dan penderita imunodefisiensi. Oleh karena itu perlu pemeriksaan alternatif yaitu PCR yang bersifat sensitif dan spesifik. Amplifikasi DNA dengan menggunakan gen P30 sebagai target telah dilakukan oleh beberapa peneliti^{5,6}, namun belum pernah dilakukan di Indonesia. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah teknik PCR dengan target gen P30 dapat mendeteksi DNA *T.gondii* dan menentukan konsentrasi minimal DNA murni *T.gondii* dan DNA *T.gondii* dalam darah yang masih terdeteksi oleh PCR dengan target gen P30.

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 dimatikan dengan kloroform lalu direntangkan di atas gabus dengan fiksasi pada ke-4 kakinya. Kulit abdomen mencit diangkat dengan pinset kemudian digunting selebar ± 1 cm. Selanjutnya, melalui lubang tersebut cairan peritoneal diambil dengan pinset dan dibilas dengan cairan NaCl 0,9% steril. Cairan bilasan pertama diperiksa dan apabila ternyata mengandung takizoit maka pembilasan dilakukan berulang kali sampai cairan bilas terlihat jernih. Cairan bilas ini ditampung dalam tabung sentrifus. Setelah itu 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,⁷.

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 menambahkan 500 μl larutan Tris-EDTA (TE) ke dalam tabung tersebut dan dikocok dengan vorteks selama 1 menit serta disentrifus dengan kecepatan 14.000 x g selama 2 menit. Supernatan dibuang dan prosedur ini dilakukan sebanyak 3 kali. Setelah itu ke dalam pelet ditambahkan 500 μl larutan RCLB dan dilakukan pencucian seperti larutan TE sebanyak 3 kali. Setelah pencucian terakhir dengan larutan RCLB, 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. Setelah inkubasi selama 4 jam, suhu ditingkatkan sampai mencapai $90-95^{\circ}\text{C}$ selama 10-15 menit. Suspensi disentrifus sebentar agar mengendap di dasar tabung. Larutan ini kemudian disimpan dalam *freezer* -20°C sampai siap digunakan pada reaksi rantai polimerase.

Isolasi DNA darah manusia sehat dilakukan dengan cara mengambil 5 ml darah manusia sehat diambil sebanyak 5 ml dan dicampur dalam EDTA dengan konsentrasi akhir 100 mM EDTA. Ke dalam tabung Eppendorf 1,5 ml dimasukkan 100 µl 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/µl) dimasukkan ke dalam 100 µl darah manusia sehat yang sudah diisolasi. Larutan ini kemudian disimpan dalam freezer -20°C sampai siap digunakan untuk reaksi rantai polimerase.

Ke dalam tabung Eppendorf 0,5 ml dimasukkan 0,5 µl 10 x larutan dapar, 2 mM MgCl₂, masing-masing 200 µM deoksinukleosida trifosfat, masing-masing 15 pmol oligo 1 (5'CACACGGTTGTATGTCGGTTTCGCT3') dan oligo 2 (5'TCAAGGAGCTCAATGTTACAGCC T3') primer gen P30, suspensi DNA dan 2,5 unit taq polimerase dalam 50 µl larutan PCR. Oligo 1 adalah oligonukleotida untuk daerah 326-350 dan oligo 2 adalah oligonukleotida untuk daerah 649-672. Perbanyakkan DNA dengan target gen P30 dilakukan menurut Weiss dkk,⁵ dengan jumlah siklus sebanyak 30 dan menurut Chang & Ho⁸ dengan jumlah siklus sebanyak 30, 35, 40, 45 dan 50 di dalam mesin DNA thermal cycler (Perkin-Elmer Cetus). 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. Menurut Chang & Ho⁸ suhu denaturasi awal adalah 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.

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

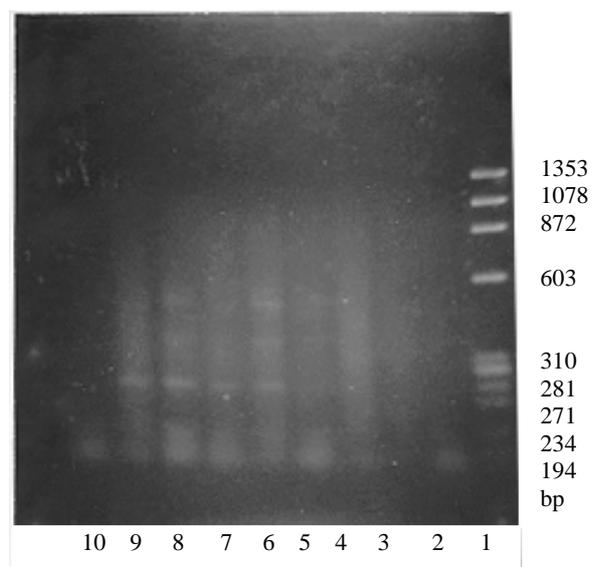
Dalam penelitian ini yang dimaksud dengan sensitivitas adalah konsentrasi DNA terkecil yang masih memberikan pita spesifik DNA *T.gondii* pada pemeriksaan elektroforesis. Sedangkan spesifisitas dalam penelitian ini adalah sifat primer gen P30

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 P30 yang ditentukan dengan menggunakan petanda φx 174 Hae III menunjukkan panjang 347 pasangan basa (*base pairs/bp*) menurut metode Weiss dkk,⁵ yang menggunakan 30 siklus, 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 (gambar 1), sedangkan amplifikasi menurut metode Chang & Ho⁸ yang menggunakan 30, 35, 40 dan 45 siklus tidak memperlihatkan pita pada elektroforesis. Hasil positif baru didapat bila digunakan sebanyak 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 terjadi⁹. Tm dari primer gen P30 adalah 70-76°C, sedangkan suhu *annealing* yang digunakan pada penelitian ini adalah 45°C. Menurut Newton¹⁰ suhu *annealing* yang diperlukan untuk tahap penempelan primer adalah 3-5°C di bawah Tm yang ditentukan. Jadi seharusnya

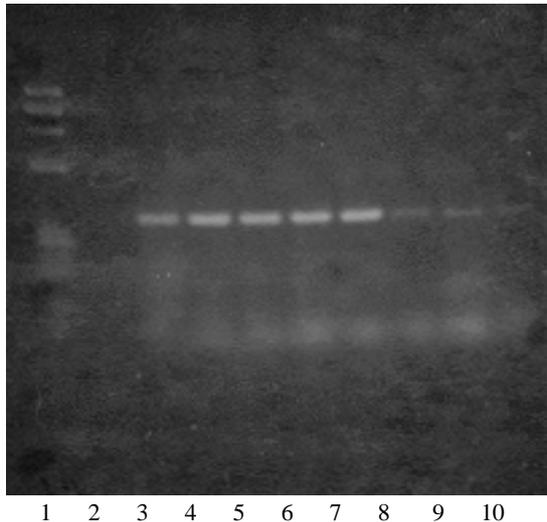


Gambar 1. Hasil elektroforesis dari PCR terhadap DNA darah manusia sehat yang dicampur suspensi takizoit dengan target gen P30 menurut metode Weiss dkk.⁵

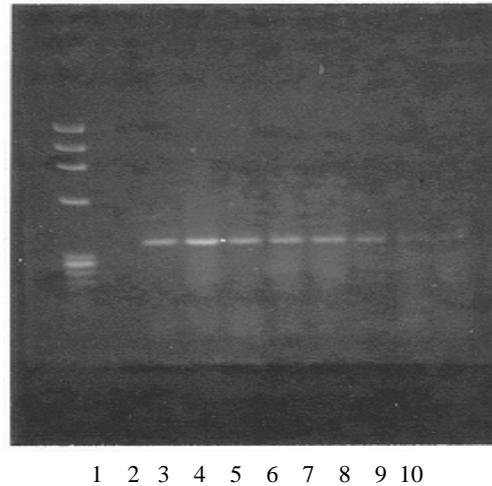
suhu *annealing* yang digunakan pada penelitian ini adalah 67-73°C. Oleh karena suhu *annealing* yang digunakan pada metode Weiss dkk,⁵ ini terlalu rendah maka dihasilkan produk sebanyak 3 pita di mana terdapat 2 pita yang tidak spesifik untuk *T.gondii*. Dengan menggunakan suhu *annealing* 60°C berdasarkan metode Chang & Ho⁸ 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; 1 pg dan 0,1 pg dalam 50 µl larutan PCR dan pada elektroforesis pita spesifik DNA *T.gondii* dapat terlihat sampai konsentrasi 0,1 pg (Gambar 2).

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 0,1 pg dan bila dilakukan pengenceran dengan DNA manusia maka hasil positif masih dapat dideteksi sampai pengenceran 0,025 ng.



Gambar 2. Hasil elektroforesis dari PCR terhadap DNA murni *T.gondii* dengan target gen P30. Kolom 1: petanda ϕ x 174 Hae III, kolom 2: kontrol negatif, kolom 3: kontrol positif, kolom 4: 1 ng, kolom 5: 0,5 ng DNA, kolom 6: 0,25 ng DNA, kolom 7: 0,1 ng DNA, kolom 8: 0,01 ng DNA, kolom 9: 1 pg DNA, kolom 10: 0,1 pg DNA.



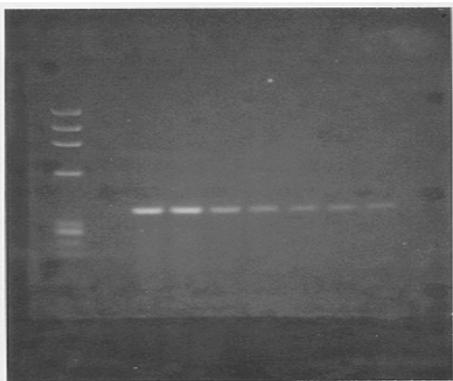
Gambar 3. Hasil elektroforesis dari PCR terhadap DNA darah manusia sehat yang ditambahkan DNA murni *T.gondii* dengan target gen P30. Kolom 1: petanda ϕ x 174 Hae III, kolom 2: kontrol negatif, kolom 3: kontrol positif, kolom 4: 5 ng DNA, kolom 5: 1 ng DNA, kolom 6: 0,25 ng DNA, kolom 7: 0,05 ng DNA, kolom 8 : 0,01 ng DNA, kolom 9: 0,025 ng DNA, kolom 10 : 0,005 ng DNA.

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 (Gambar 3).

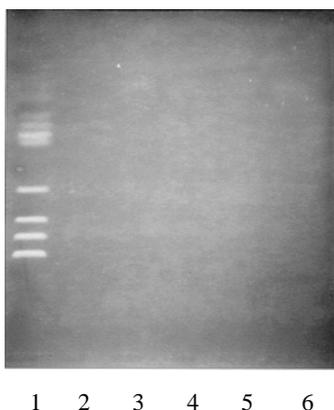
Untuk menentukan sensitivitas PCR dengan target gen P30 Savva dkk,⁶ telah melakukan penelitian pada berbagai konsentrasi DNA *T.gondii* strain RH. Setelah amplifikasi sebanyak 30 siklus sebuah fragmen DNA sepanjang 914 bp masih terlihat hingga konsentrasi DNA *Toxoplasma* sebesar 10 pg. Dengan cara amplifikasi 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 μ l darah manusia sehat yang dicampur dengan 1 μ l 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 (Gambar 4).

Wastling dkk,¹¹ 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*.



Gambar 4. Hasil elektroforesis dari PCR terhadap darah manusia sehat yang dicampur suspensi takizoit dengan target gen P30. Kolom 1 : petanda ϕ x 174 Hae III, kolom 2 : kontrol negatif, kolom 3 : kontrol positif, kolom 4 : 1000 takizoit, kolom 5 : 100 takizoit, kolom 6 : 50 takizoit, kolom 7 : 40 takizoit, kolom 8 : 30 takizoit, kolom 9 : 20 takizoit, kolom 10 : 10 takizoit.



Gambar 5. Hasil elektroforesis dari PCR terhadap DNA manusia yang diekstraksi dan DNA manusia (Promega,USA) dengan target gen P30. Kolom 1: petanda ϕ x 174 Hae III, kolom 2: DNA manusia yang diekstraksi, kolom 3: DNA manusia (Promega,USA).

Amplifikasi gen P30 dilakukan menurut metode Savva dkk,⁶ dan dapat mendeteksi DNA *T.gondii* sampai konsentrasi 0,1 pg. Pada penelitian ini DNA murni masih dapat dideteksi dengan target gen P30 hingga konsentrasi 0,025 ng.

Pada penelitian ini amplifikasi yang dilakukan terhadap 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,⁹ 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,¹³ 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 (Gambar 5).

Ini membuktikan bahwa *primer* yang digunakan untuk mendeteksi gen P30 *T.gondii* sangat spesifik. Pada penelitian lainnya, Weiss dkk,⁵ tidak mendapatkan adanya reaksi antara *primer* gen P30 dengan *Trypanosoma cruzi* dan *Leishmania donovani*.

Kesimpulan

PCR dengan menggunakan *primer* gen P30 dapat mendeteksi konsentrasi minimal 0,1 pg DNA murni *T.gondii*, 0,025 ng DNA murni yang dicampur dengan darah manusia sehat serta DNA yang berasal dari 20 takizoit.

Daftar Acuan

1. Liesenfeld O, Roth A, Weinke T, Foss HD, Hahn H. A case of disseminated toxoplasmosis value of PCR for diagnosis. *J Infec Dis* 1994; 29: 133-138.
2. Skinner LJ, Chatterton JMV, Joss AWL, Moir IL Do HY. The use of an IgM immunosorbent agglutination assay to diagnose congenital toxoplasmosis. *J Med Microbiol* 1989; 28: 125-128.
3. Grover CM, Thulliez P, Remington JS, Boothroyd JC. Rapid prenatal diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection by using polymerase chain reaction and amniotic fluid. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 2297-2301.
4. Hitt JA, Filice GA. Detection of *Toxoplasma gondii* Parasitemia by Gene Amplification, Cell

- Culture and Mouse Inoculation, *J Clin Microbiol* 1992; 30: 3181-3184.
5. 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.
 6. Savva DD, Morris JC, Johnson JD, Holliman RE, Polymerase chain reaction for detection of *Toxoplasma gondii*. *J Med Microbiol* 1990; 32: 25-31.
 7. Supali T, Wibowo H, Ekarina R. The use of PCR-ELISA for *Brugia malayi* detection in day blood. (sedang dicetak).
 8. 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.* Chung Shan Medical & Dental College Taichung, ROC 1996: 2-4.
 9. Rolfs A, Schuller I, Finckh U, Weber-Rolfs I. *PCR: Clinical Diagnostics and Research*, Springer-Verlag, Berlin, 1992: 4
 10. Newton CR, Primers, In: C.R. Newton, J. Wiley & Sons, *PCR essential data*, UK: BIOS scientific publishers Ltd, 1995: 49-56.
 11. 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.
 12. 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.
 13. 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.