

Genotyping & Karakterisasi

Molekular Spesies

Trichomonad

di Indonesia dalam Pencegahan
Penyakit Zoonosis

deepublish / publisher

UU No 28 tahun 2014 tentang Hak Cipta

Fungsi dan sifat hak cipta Pasal 4

Hak Cipta sebagaimana dimaksud dalam Pasal 3 huruf a merupakan hak eksklusif yang terdiri atas hak moral dan hak ekonomi.

Pembatasan Pelindungan Pasal 26

Ketentuan sebagaimana dimaksud dalam Pasal 23, Pasal 24, dan Pasal 25 tidak berlaku terhadap:

- i. Penggunaan kutipan singkat Ciptaan dan/atau produk Hak Terkait untuk pelaporan peristiwa aktual yang ditujukan hanya untuk keperluan penyediaan informasi aktual;
- ii. Penggandaan Ciptaan dan/atau produk Hak Terkait hanya untuk kepentingan penelitian ilmu pengetahuan;
- iii. Penggandaan Ciptaan dan/atau produk Hak Terkait hanya untuk keperluan pengajaran, kecuali pertunjukan dan Fonogram yang telah dilakukan Pengumuman sebagai bahan ajar; dan
- iv. Penggunaan untuk kepentingan pendidikan dan pengembangan ilmu pengetahuan yang memungkinkan suatu Ciptaan dan/atau produk Hak Terkait dapat digunakan tanpa izin Pelaku Pertunjukan, Produser Fonogram, atau Lembaga Penyiaran.

Sanksi Pelanggaran Pasal 113

1. Setiap Orang yang dengan tanpa hak melakukan pelanggaran hak ekonomi sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf i untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 1 (satu) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp100.000.000 (seratus juta rupiah).
2. Setiap Orang yang dengan tanpa hak dan/atau tanpa izin Pencipta atau pemegang Hak Cipta melakukan pelanggaran hak ekonomi Pencipta sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf c, huruf d, huruf f, dan/atau huruf h untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 3 (tiga) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp500.000.000,00 (lima ratus juta rupiah).

Genotyping & Karakterisasi
Molekular Spesies
Trichomonad

di Indonesia dalam Pencegahan
Penyakit Zoonosis

Mudyawati Kamaruddin, M.Kes., Ph.D

 deepublish

Cerdas, Bahagia, Mulia, Lintas Generasi.

**GENOTYPING & KARAKTERISASI MOLEKULAR SPESIES TRICHOMONAD
DI INDONESIA DALAM PENCEGAHAN PENYAKIT ZONOSIS**

Mudyawati Kamaruddin

Editor:
Sri Darmawati

Desain Cover :
Syaiful Anwar

Sumber :
www.shutterstock.com (Arif biswas)

Tata Letak :
Joko Waluyo

Proofreader :
Mira Muarifah

Ukuran :
Jml hal judul, Jml hal isi naskah hlm, Uk: 15.5x23 cm

ISBN :
No ISBN

Cetakan Pertama :
Bulan 2023

Hak Cipta 2023, Pada Penulis

Isi diluar tanggung jawab percetakan

Copyright © 2023 by Deepublish Publisher
All Right Reserved

Hak cipta dilindungi undang-undang
Dilarang keras menerjemahkan, memfotokopi, atau
memperbanyak sebagian atau seluruh isi buku ini
tanpa izin tertulis dari Penerbit.

PENERBIT DEEPUBLISH
(Grup Penerbitan CV BUDI UTAMA)
Anggota IKAPI (076/DIY/2012)

Jl.Rajawali, G. Elang 6, No 3, Drono, Sardonoharjo, Ngaglik, Sleman
Jl.Kaliurang Km.9,3 – Yogyakarta 55581
Telp/Faks: (0274) 4533427
Website: www.deepublish.co.id
www.penerbitdeepublish.com
E-mail: cs@deepublish.co.id

KATA PENGANTAR PENERBIT

Segala puji kami haturkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, atas limpahan segala anugerah dan karunia-Nya. Dalam rangka mencerdaskan dan memuliakan umat manusia dengan penyediaan serta pemanfaatan ilmu pengetahuan dan teknologi untuk menciptakan industri *processing* berbasis sumber daya alam (SDA) Indonesia, Penerbit Deepublish dengan bangga menerbitkan buku dengan judul ***Genotyping & Karakterisasi Molekular Spesies Trichomonad di Indonesia dalam Pencegahan Penyakit Zoonosis***.

Terima kasih dan penghargaan terbesar kami sampaikan kepada penulis, Mudyawati Kamaruddin, M.Kes., Ph.D., yang telah memberikan kepercayaan, perhatian, dan kontribusi penuh demi kesempurnaan buku ini. Semoga buku ini bermanfaat bagi semua pembaca, mampu berkontribusi dalam mencerdaskan dan memuliakan umat manusia, serta mengoptimalkan pemanfaatan ilmu pengetahuan dan teknologi di tanah air.

Hormat Kami,

Penerbit Deepublish

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR PENERBIT	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR.....	ix
Acknowledgement	xi
Daftar Singkatan.....	xii
1 Introduksi	1
A. Kausa.....	1
B. Urgensi Trichomonad pada Kesehatan Masyarakat.....	5
C. Rangkaian Fokus	8
D. Rancangan Tataan	9
E. Kegunaan Substansi.....	9
2 Trichomonad di Indonesia	10
A. Tinjauan tentang Trichomonad	10
B. Potensi Zoonosis Trichomonad	10
C. <i>Surveillance</i> Zoonosis Spesies Trichomonad	19
D. Internal Transcribed Spacer.....	21
3 Kultur & Karakterisasi Molekular Trichomonad	23
A. Kultur dan Pemeriksaan Spesies Trichomonad	23
B. <i>Fixing</i> dan Pewarnaan Spesies Trichomonad	24
C. <i>Low Vacuum Scanning Electron Microscopy</i>	25
D. <i>Design</i> Primer Lokus ITS dan 18S rRNA	27
E. Ekstraksi dan Isolasi DNA Spesies Trichomonad	30
F. Amplifikasi DNA Spesies Trichomonad Menggunakan PCR.....	31
G. Elektroforesis Gel Agarose	32
H. Purifikasi DNA	34
I. Analisis Pengurutan DNA dengan <i>DNA Sequencer</i>	36

4	Konstruksi Filogenetik.....	39
	A. Definisi Filogenetik.....	39
	B. Filogenetik Molekular.....	39
5	Penutup	52
	DAFTAR PUSTAKA	53
	GLOSARIUM.....	56
	INDEKS	60

DAFTAR TABEL

Tabel 1.	Spesies Trichomonad yang teridentifikasi pada sampel klinis	13
Tabel 2.	Komponen bahan untuk larutan <i>10x Ringer's solution-1%Asparagin</i>	23
Tabel 3.	Protokol pewarnaan Protagol.....	25
Tabel 4.	Primer yang digunakan pada lokus ITS dan 18SrRNA dengan sekuens dan besaran <i>basepairs</i>	29
Tabel 5.	Hasil Sekuens DNA spesies Trichomonad menggunakan primer lokus 18S dan ITS.....	37
Tabel 6.	Filogenetika Molekular menggunakan beberapa Gen/Genom	40

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	Model spekulasi zoonosis yang disebabkan oleh spesies Trichomonad (disadur dari Maritz JM <i>et al.</i> , 2014)	2
Gambar 2.	Penyakit zoonosis yang <i>re-emerging</i> pada hewan dan manusia. Jalur penularan dengan kontak langsung melalui penanganan hewan (perdagangan satwa liar, hewan peliharaan), dan penyiapan hewan potong untuk konsumsi daging atau untuk penggunaan obat tradisional (disadur dari Magaoras I., 2020).....	3
Gambar 3.	Penyebaran parasit <i>Giardia intestinalis</i> secara geografi di seluruh dunia (disadur dari <i>slide</i> presentasi Seminar Nasional IKABIO, Makassar oleh Mudyawati Kamaruddin, 2017)	5
Gambar 4.	Pemetaan penyebaran serotipe <i>G. intestinalis</i> seluruh dunia	6
Gambar 5.	Daerah <i>Internal Transcribed Space</i> Genom Inti (nDNA)	7
Gambar 6.	Alat inkubasi mini (merek AccuBlock).....	24
Gambar 7.	Hasil kultur spesies Trichomonad dengan <i>10x Ringer's solution</i> plus antibiotik menunjukkan trofozoit Trichomonad yang bergerak (tanda panah merah)	24
Gambar 8.	Spesies Trichomonad setelah diberikan pewarnaan Protogol FI: flagella; Tr: spesies Trichomonad	25
Gambar 9.	Instrumen SEM terdiri dari perangkat pemindai, penyajian gambar dan citra (JEOL Ltd., Tokyo, Jepang).....	26
Gambar 10.	(A) Sampel No. H79, B79; (B) Sampel No. R10; (C) sampel No. R10, R7.....	27
Gambar 11.	Pemetaan lokus primer untuk <i>design</i> primer ITS dan 18SrRNA	28
Gambar 12.	Visualisasi produk PCR spesies Trichomonad pada gel agarose pita target 1091bp.....	33

Gambar 13. Purifikasi DNA dari gel agarose hasil elektroforesis (kiri), dan dari produk PCR (kanan).....	34
Gambar 14. Prosedur presipitasi Etanol/EDTA pada purifikasi DNA	35
Gambar 15. Hasil sekuensing menggunakan Genetic Analyzer 3500	36
Gambar 16. Perenggangan peak hasil sekuensing untuk analisis.....	36
Gambar 17. Logo MEGA6.06 (atas), kotak dialog MEGA6.06 (bawah)	42
Gambar 18. Rekonstruksi pohon filogenetik <i>neighbor-joining</i> menggunakan lokus ITS.8SrRNA/ITS2 spesies <i>Trichomonad</i> menghasilkan sejumlah 204 basa nukleotida. Nilai pada node 1000 ulangan <i>bootstrap</i> , yang disimpulkan dari analisis komparatif <i>maximum likelihood</i> (ML), <i>maximum parsimony</i> (MP) dan <i>neighbor-joining</i> (NJ). <i>Bootstrap support</i> kurang dari 60% ditandai dengan asterisk. Termasuk <i>Trichomonas vaginalis</i> sebagai <i>out-group</i> (Kamaruddin M. <i>et al.</i> , 2014).	50

Acknowledgement

Monograf ini merupakan luaran dari penelitian kolaborasi antara Kanazawa University dan beberapa Universitas di Indonesia bagian Timur yang berfokus pada penelitian molekular mikrobiota usus. Penelitian kolaborasi ini didukung oleh Dirjen Pendidikan Tinggi Indonesia (DIKTI) dalam bentuk beasiswa selama studi S-3 dan *JSPS KAKENHI Grant in Aid for Scientific Research, Medical Science Faculty of Kanazawa University* memberikan fasilitas berupa *fellowship* dalam bentuk alat dan bahan yang dipergunakan selama penelitian.

Mikrobiota usus merupakan topik yang cukup luas dan kompleks, sehingga pada monograf ini akan berfokus pada *intestinal parasitic infections* dan sebagian isi monograf ini diambil dari artikel yang diterbitkan pada *Jurnal Korean J. Parasitology* tahun 2014, artikel yang telah diseminarkan di *The 6th 2012 Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases* dan artikel yang diseminasi pada *APCPZ, Kobe 2012*.

Monograf ini juga didukung oleh Program Pascasarjana Ilmu Laboratorium Klinik Universitas Muhammadiyah Semarang, serta dukungan para pembaca atas saran dan kritik untuk perbaikan dan pengembangan tulisan di tahun mendatang. Atas sederetan dukungan di atas, penulis ucapkan terima kasih.

Daftar Singkatan

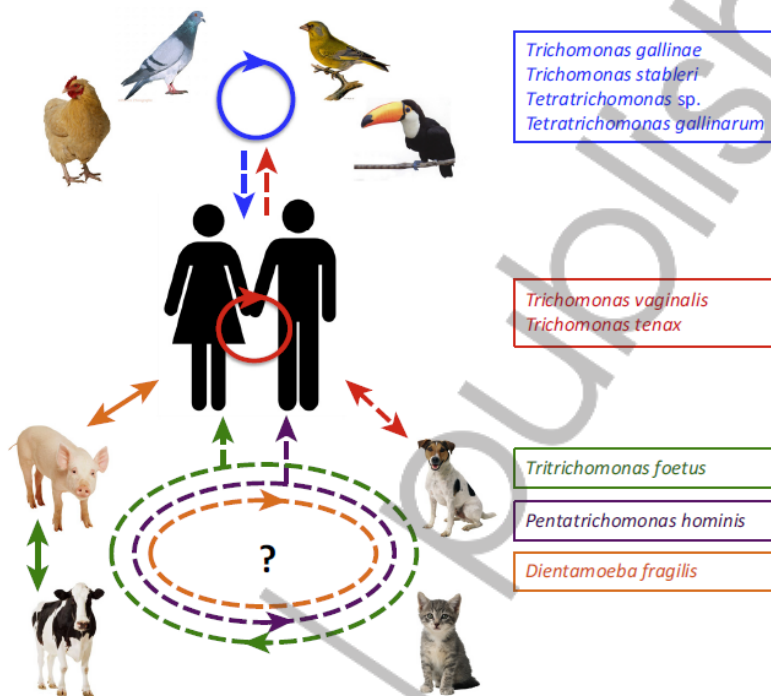
<i>ARDS</i>	<i>Acute Respiratory Distress Syndrome</i>
<i>CoViD-19</i>	<i>Corona Virus Diseases 19</i>
<i>DT</i>	<i>Digestive Tract (Saluran Pencernaan)</i>
<i>DNA</i>	<i>Deoxyribo Nucleat Acid</i>
<i>IBS</i>	<i>Irritable Bowel Syndrom</i>
<i>ITS</i>	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
<i>PBS</i>	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
<i>PCR</i>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<i>PcP</i>	<i>Pneomocystis pneumonia</i>
<i>rRNA</i>	<i>RNA ribosomal</i>
<i>RT</i>	<i>Respiratory Tract (Saluran Pernapasan)</i>
<i>SARS-CoV-2</i>	<i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i>
<i>UGT</i>	<i>Urogenital Tract (Saluran Urogenital)</i>

1

Introduksi

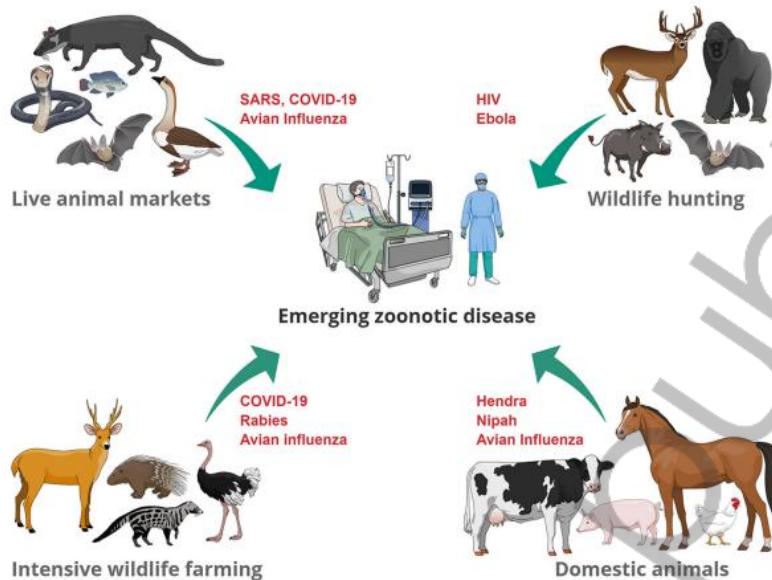
A. Kausa

Infeksi yang disebabkan oleh parasit telah menginfeksi jutaan orang di seluruh dunia, terutama di negara berkembang. Infeksi yang disebabkan oleh parasit dapat menyebabkan penyakit menular baik bersifat ringan hingga berat (kematian). Parasit berkembang-biak dan memiliki siklus hidup dengan inang (hewan atau manusia) dan lingkungan. Secara umum, penyakit infeksi parasit terbagi dalam dua kategori, yaitu kategori ektoparasit (arthropoda) dan endoparasit, di mana endoparasit merupakan kondisi yang disebabkan oleh protista (organisme bersel satu) dan penyakit yang disebabkan oleh cacing. Parasit dapat menginfeksi manusia melalui berbagai perantara. Salah satu perantara infeksi parasit adalah hewan yang dikenal sebagai *zoonotic* (zoonosis) yang penyakitnya disebut sebagai penyakit zoonosis merupakan penyakit yang dapat menular dari hewan ke manusia atau sebaliknya seperti yang diperlihatkan pada Gambar 1 tentang model spekulasi zoonosis akibat Trichomonad.



Gambar 1. Model spekulasi zoonosis yang disebabkan oleh spesies Trichomonad (disadur dari Maritz JM *et al.*, 2014)

Secara mendasar, penularan dapat terjadi melalui tiga cara yaitu penularan secara langsung, penularan secara tidak langsung, dan penularan melalui konsumsi. Kontak langsung dengan hewan yang terinfeksi, seperti dengan cara tergigit dan terkena air liur, kotoran hewan, dan cairan yang semuanya dapat mengakibatkan penularan. Penularan tidak langsung dapat terjadi melalui perantara seperti arthropoda yang berperan sebagai vektor, melalui perantara air, dan tanah. Selain kedua cara tersebut, penularan dapat terjadi melalui konsumsi produk hewani yang terinfeksi dan masih mengandung parasit.



Gambar 2. Penyakit zoonosis yang *re-emerging* pada hewan dan manusia. Jalur penularan dengan kontak langsung melalui penanganan hewan (perdagangan satwa liar, hewan peliharaan), dan penyiapan hewan potong untuk konsumsi daging atau untuk penggunaan obat tradisional (disadur dari Magaoras I., 2020).

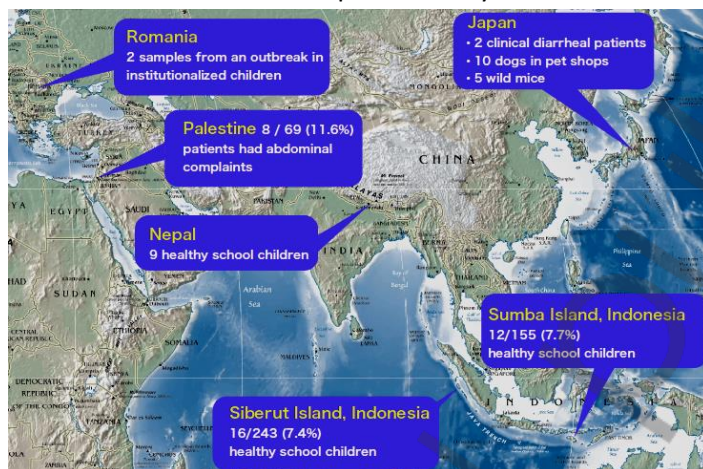
Dalam beberapa tahun terakhir, penyakit zoonosis menjadi perbincangan di seluruh dunia diawali dengan munculnya pandemik *Corona Virus Diseases 19* (CoViD-19) yang disinyalir penyebab awalnya adalah virus hewan kelelawar (SARS-CoV dengan empat isolat *coronavirus* kelelawar RaTG13, RmYN02, ZC45 dan ZXC21,) ditransfer dan terjadi mutasi berulang kali ke manusia menjadi SARS-CoV-2 dengan virulensi yang lebih adekuat dari inang sebelumnya. Terkait dengan hal ini, telah terjadi peningkatan yang mengkhawatirkan dalam jumlah *emerging zoonosis*, termasuk flu burung yang sangat patogen (HPAI), sindrom paru *Hantavirus*, demam *West Nile* (di Amerika Serikat), penyakit Lyme, sindrom uremik hemolitik (*Escherichia coli* serotipe O157:H7), dan virus Hendra. Sedangkan beberapa di antara penyakit zoonosis yang muncul kembali (*re-emerging*) adalah Rabies dan infeksi *Lyssavirus*, *Rift Valley Fever* (RVF), virus Marburg, Tuberkulosis sapi, *Brucella* sp pada satwa liar,

tularemia, plak, dan leptospirosis. Faktor-faktor penyebab munculnya *re-emerging zoonosis*, di antaranya adalah iklim, habitat, dan kepadatan populasi.

Di Indonesia diperkirakan telah ditemukan lebih dari 300 penyakit zoonosis dan 25 penyakit hewan menular yang mengancam kesehatan masyarakat. Seperti Rabies, flu burung, antraks, malaria, leptospirosis, dan toksoplasmosis adalah beberapa contoh penyakit zoonosis. Selain itu, infeksi parasit protozoa usus (umumnya *Giardia intestinalis*) sebagai zoonosis cukup banyak terdeteksi pada pasien yang mengidap HIV/AIDS di Indonesia (Gambar 3 dan 4). Namun, masyarakat belum sepenuhnya mendapat informasi tentang kejadian wabah penyakit yang menyebar dan ditularkan dari hewan ke manusia. Hal ini pula terkait dengan penyakit *emerging zoonosis* dan *re-emerging zoonosis* yang telah muncul pada abad terakhir ini. *Emerging zoonosis* merupakan penyakit zoonosis yang muncul dan dapat terjadi di mana saja di seluruh dunia, dan berpotensi menjadi penyakit yang sangat berbahaya. Sementara itu, *re-emerging zoonosis* adalah penyakit zoonosis yang sebelumnya pernah muncul, namun kini menunjukkan tanda-tanda akan muncul kembali. Pada dasarnya, *emerging* dan *re-emerging zoonosis* dapat diklasifikasikan menjadi tiga (tiga) kelompok yaitu (1) penyakit zoonosis yang baru diketahui; (2) penyakit zoonosis yang baru muncul; dan (3) penyakit zoonosis yang terjadi sebelumnya dengan peningkatan pada kejadian, peningkatan pada perluasan wilayah geografis, inang, atau keragaman vektor. Prevalensi infeksi oportunistik (IO) yang disebabkan oleh parasit protozoa usus juga berbeda-beda menurut wilayah geografis dan tingkat endemik di setiap lokasi. Laporan menunjukkan bahwa diare terjadi pada 30-60% pasien AIDS di negara maju, sedangkan diare mencapai 90% di negara berkembang (Kamaruddin M. *et al.*, 2012).

Penelitian Trichomonad terkait penyakit zoonosis di Indonesia, belum banyak yang melakukan sehingga menghadapi *re-emerging zoonosis* ke depannya menjadi masalah dan kendala besar bagi Indonesia jika tidak segera difokuskan pada penelitian parasit zoonosis. Pada monograf ini, penulis memberikan informasi penting terkait potensi

zoonosis yang terjadi pada manusia dan hewan peliharaannya melalui transmisi spesies Trichomonad secara langsung dan tidak langsung melalui metode molekular dalam *genotyping* dan karakterisasi feses yang diperoleh dari manusia dan hewan peliharaannya.



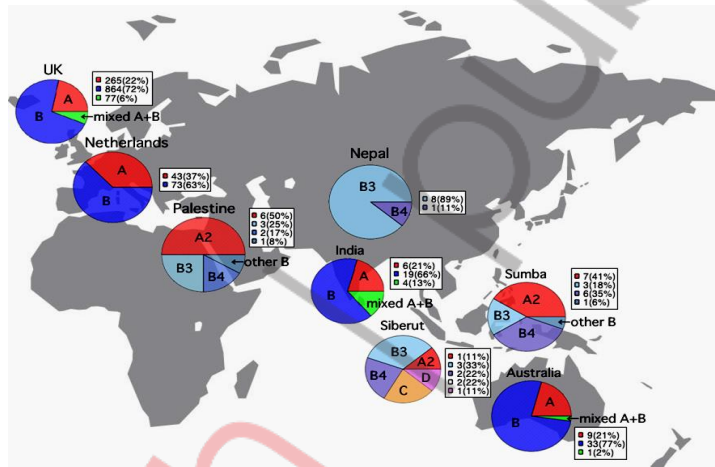
Gambar 3. Penyebaran parasit *Giardia intestinalis* secara geografi di seluruh dunia (disadur dari *slide* presentasi Seminar Nasional IKABIO, Makassar oleh Mudyawati Kamaruddin, 2017)

Berdasarkan sebaran geografi hasil *genotyping* terhadap variasi *Giardia intestinalis* salah satu parasit penyebab diare di seluruh dunia dapat diperlihatkan pada gambar 3.

B. Urgensi Trichomonad pada Kesehatan Masyarakat

Spesies Trichomonad adalah jenis parasit protozoa berflagella yang menghuni berbagai inang vertebrata, termasuk manusia. Meskipun 2 spesies dari trichomonad tersebut, *Trichomonas vaginalis* dan *Dientamoeba fragilis*, masing-masing telah dianggap sebagai patogen pada manusia sebagai agen penyebab vaginitis dan diare. Studi identifikasi molekular baru-baru ini memberikan gagasan baru tentang infeksi trichomonad pada manusia, di mana *Pentatrichomonas hominis*, yang telah diakui sebagai protozoa gastrointestinal komensal yang tidak berbahaya pada manusia (Adl SM, *et al.*, 2012) dapat terdeteksi pada 2

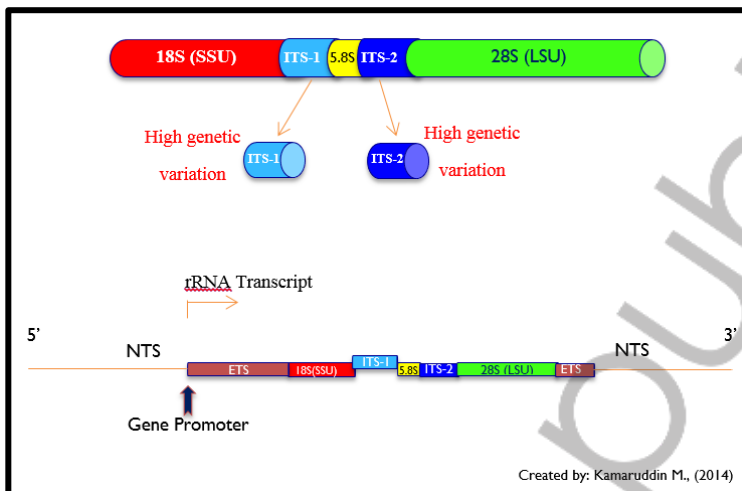
kasus diare pada anak-anak dan diduga sebagai agen etiologi potensial dari gejala gastrointestinal, namun ditemukan pula pada saluran pernapasan pasien dengan empiema dan penyakit paru. Selain itu, jenis infeksi atipikal dengan spesies trichomonad pada manusia juga telah dilaporkan seperti *Trichomonas vaginalis*, *Trichomonas tenax*, *Tetratrichomonas gallinarum* (avian trichomonad) dan *Tritrichomonas foetus* (bovid trichomonad) telah diisolasi dari saluran pernapasan pasien sindrom gangguan pernapasan akut (Cepicka I, *et al.*, 2010).



Gambar 4. Pemetaan penyebaran serotipe *G. intestinalis* seluruh dunia

Mempertimbangkan temuan di atas, spesies trichomonad harus dipantau lebih intensif sebagai masalah kesehatan masyarakat bagi manusia dan hewan peliharaan terkait dari sudut pandang potensi penularan zoonosis dan patogenisitas yang tidak dikenali, berbeda dengan gambaran komensal sebelumnya dari organisme ini. Tentunya membutuhkan suatu metode yang adekuat dapat mendeteksi dan mengidentifikasi organisme tersebut. Salah satu metode yang dapat digunakan adalah pendekatan molekuler dengan menganalisis sekuens DNA *Internal Transcribed Spacer* (ITS), yang memiliki variasi sekuens yang tinggi karena daerah tersebut merupakan daerah *non-coding* yang memiliki laju mutasi lebih tinggi dari daerah *coding*. Pada region ITS sering

terjadi perubahan materi genetik seperti halnya mutasi sehingga dapat berbeda variasi genetiknya antarspesies (James, 1996) (Gambar 5).



Gambar 5. Daerah *Internal Transcribed Space* Genom Inti (nDNA)

Studi Penelitian spesies *Trichomonad* terkait penyakit zoonosis di Indonesia belum banyak yang melakukan. Memang, hampir semua penelitian yang dipublikasikan berfokus hanya pada *T. vaginalis* di Indonesia (Alfari M, *et al.* 2016) dan variasi yang luas pada spesies trichomonad pada inang manusia dan hewan peliharaan masih jarang bahkan hampir tidak ada yang melakukan, sehingga menghadapi *re-emerging zoonosis* ke depannya akan menjadi masalah dan kendala besar bagi Indonesia jika tidak segera difokuskan pada studi parasit zoonosis. Pada monograf ini, penulis memberikan informasi penting terkait potensi zoonosis yang terjadi pada manusia dan hewan peliharaannya melalui transmisi spesies *Trichomonad* secara langsung dan tidak langsung dengan menggunakan metode molekular dalam hal ini PCR dan DNA sequencer dengan *marker* DNA pada *internal transcribe spacer* sebagai primer untuk *genotyping* dan karakterisasi spesies trichomonad gastrointestinal, dan dilanjutkan dengan rekonstruksi pohon filogenetik untuk mengevaluasi distribusi spesies trichomonad pada manusia dan

hewan peliharaan yang terkait erat dengan sifat zoonosis di daerah endemik parasit.

C. Rangkaian Fokus

Perkembangan penyakit zoonosis yang disebabkan oleh parasit zoonotik seperti spesies Trichomonad yang awalnya merupakan parasit yang tidak membahayakan menjadi berbahaya dan bahkan mematikan. Hal ini disebabkan oleh beberapa faktor. Salah satunya adalah parasit dapat hidup pada banyak inang, sehingga cukup sulit untuk dikarakterisasikan.

Beberapa metode yang telah dilakukan membutuhkan teknis dan waktu yang tidak cukup adekuat dalam pengidentifikasian dan pengkarakterisasi spesies Trichomonad saat ini. Sehingga dibutuhkan metode yang lebih mumpuni dalam tujuan karakterisasi sampai rekonstruksi pohon filogenetik yang lebih tajam dalam menelaah hubungan antara spesies Trichomonad satu dengan yang lain, juga hubungan dengan inang utama dan inang dapatan.

Seperti yang dijelaskan di atas bahwa ITS adalah salah satu *marker* atau penanda yang terdapat pada inti (nDNA). Sekuens ITS memiliki variasi sekuens yang tinggi karena daerah tersebut merupakan daerah *non-coding* yang memiliki laju mutasi lebih tinggi dari daerah *coding*. Pada region ITS sering terjadi perubahan materi genetik seperti halnya mutasi sehingga dapat berbeda variasi genetiknya antarspesies (James, 1996).

Daerah (*region*) ITS merupakan suatu urutan RNA dari proses transkripsi utama yang berada di daerah inti. Organisme eukaryotik mempunyai dua daerah ITS yakni ITS-1 terletak di antara 18S gen dan 5.8S gen, dan ITS-2 terletak di antara 5.8S dan 28S gen, sehingga primer dirancang pada daerah ITS-1, 5.8S dan ITS-2 rRNA. Ketiga gen inti tersebut mempunyai tingkat konservasi yang sangat tinggi (Gambar 5).

Berdasarkan uraian di atas, maka perlu sebuah studi *genotyping*, identifikasi, dan karakterisasi molekular spesies Trichomonad untuk tujuan pengawasan (*surveillance*) dan pencegahan penyakit zoonosis di Indonesia.

D. Rancangan Tataan

Dasar pemikiran pelaksanaan studi ini adalah tentang pentingnya *genotyping*, identifikasi dan karakterisasi spesies Trichomonad untuk tujuan pengawasan secara lebih intensif pada manusia dan hewan peliharaan terkait dari sudut pandang potensi penularan zoonosis dan patogenisitas yang tidak dikenali.

Adanya teknologi molekular dengan menggunakan sekuens ITS akan membantu banyak dalam melakukan identifikasi dan karakterisasi spesies Trichomonad berdasarkan daerah spesifik dari DNA genom Trichomonad tersebut.

E. Kegunaan Substansi

Tujuan dari studi ini adalah melakukan *genotyping* dan karakterisasi spesies Trichomonad di Indonesia sehingga penyebaran spesies Trichomonad di Indonesia dapat terawasi dan pencegahan terhadap kemungkinan potensi munculnya penyakit zoonosis.

Urgensi dilakukan *genotyping* dan karakterisasi spesies Trichomonad di Indonesia menjadi pemantauan perkembangan dan penyebaran Trichomonad dalam pencegahan penyakit zoonosis. Data yang diperoleh dari informasi molekular hasil studi ini, menjadi repositori untuk *Genomic sustainable* terhadap perkembangan spesies Trichomonad di Indonesia.

2

Trichomonad di Indonesia

A. Tinjauan tentang Trichomonad

Trichomonad merupakan parasit umum pada vertebrata dan invertebrata, dengan empat spesies yang diakui sebagai parasit manusia yaitu *Dientamoeba fragilis*, *Pentatrichomonas hominis*, *Trichomonas vaginalis*, dan *Trichomonas tenax*. Dua spesies terakhir dianggap sebagai parasit terkhusus ber-host pada manusia, sebaliknya, *D. fragilis* dan *P. hominis* diisolasi dan diperoleh dari mamalia domestik dan peternakan, hal ini menunjukkan terdapatnya kisaran inang yang luas dan potensi asal zoonosis (Kamaruddin M, *et al.*, 2014).

Trichomonad merupakan protista anaerobik, berflagella dan termasuk dalam kelompok Trichomonadea dan Tritrichomonadea dari filum Parabasalia (Adl SM, *et al.*, 2012). Mereka dicirikan oleh adanya tiga sampai Lima flagella anterior, hidrogenosom—organel penghasil hidrogen berdasarkan sifat anaerob, mitokondria, badan paranasal (Golgi besar), dan sitoskeleton kompleks. Beberapa spesies telah diisolasi dari sampel lingkungan dan mungkin mewakili spesies yang hidup bebas; namun, sebagian besar spesies membentuk interaksi simbiosis dengan berbagai inang. Di antara trichomonad parasit, beberapa spesies mendiami rongga mulut, pencernaan, dan urogenital inang invertebrata dan vertebrata, termasuk ternak, hewan peliharaan, dan manusia.

B. Potensi Zoonosis Trichomonad

Potensi zoonosis Trichomonad telah ditunjukkan oleh spesies Trichomonad seperti *Pentatrichomonas hominis* dikenal sebagai protozoa gastrointestinal komensal yang tidak berbahaya pada manusia, namun ditemukan pula pada saluran pernapasan pasien dengan empiema dan penyakit paru. Selain itu, spesies trichomonad lain seperti *Trichomonas vaginalis*, *Trichomonas tenax*, *Tetratrichomonas gallinarum* (avian

trichomonad) dan *Tritrichomonas foetus* (*bovid trichomonad*) telah diisolasi dari saluran pernapasan pasien sindrom gangguan pernapasan akut (Cepicka I, *et al.*, 2010).

Menurut model dinamika penyakit saat ini, kemunculan zoonosis penyakit parasit pada manusia biasanya dikaitkan dengan beberapa karakteristik, termasuk kisaran inang yang luas, variabilitas genetik, adanya genotipe yang lebih cocok untuk parasitisme manusia, dan potensi patogen yang dimodifikasi (Wolfe ND, *et al.*, 2007). *Emergency zoonosis* diperkirakan muncul melalui beberapa tahap yang berbeda, seperti beberapa berkembang sebagai 'parasitosis' hewan yang baru menular ke manusia, meskipun sumber penyakitnya tetap reservoir hewan (Lloyd-Smith JO, *et al.*, 2009). Dalam kasus lain, parasit mampu melintasi penghalang spesies, memodifikasi spesifisitasnya, dan dapat ditularkan secara berkelanjutan dari manusia ke manusia (Jones KE, *et al.*, 2008). Evolusi parasitosis yang muncul ini tidak linier, dan penjelasan untuk proses yang begitu rumit memerlukan pertimbangan ekologi multi-inang dan dinamika kompleks suatu infeksi zoonosis (Cascio A, *et al.*, 2011).

Berdasarkan model ini dan bukti klinis serta molekuler yang dibahas sebelumnya, kemungkinan beberapa trichomonad berada pada tahap kemunculan zoonosis yang berbeda (Gambar 1). Pengamatan ini menimbulkan pertanyaan penting mengenai implikasi dari spektrum patologis perluasan potensial trichomonad pada manusia dan menunjukkan bahwa karena terdapatnya hubungan dengan penyakit lain. Secara historis, trichomonad belum dianggap sebagai infeksi yang muncul karena kejadiannya yang spesifik pada lokasi dan inang. Meskipun demikian, kehadiran trichomonad dalam beragam kelainan klinis menunjukkan bahwa mereka mungkin menunjukkan bentuk oportuniste dan berkembang biak ketika kondisi lokal mendukung. Misalnya, penyakit di mana trichomonad ditemukan sebagai agen koinfeksi pada infeksi pernapasan mungkin tidak terbatas pada infeksi terkait *Pneumocystis pneumonia* (PcP) dan *Acute Respiratory Distress Syndrome* (ARDS) saja, tetapi mungkin termasuk penyakit paru lainnya seperti *cystic fibrosis*

(Duboucher C. *et al.*, 2006). Selain itu, kehadiran dan peranannya di dalam *opportunistic intestinal parasitic infection* pada pasien HIV positif, menguatkan potensi zoonosis Trichomonads (Kamaruddin M. *et al.*, 2012).

Empat spesies trichomonad dianggap parasit manusia: *Trichomonas vaginalis* (ditemukan di saluran urogenital) (Kissinger P., and Adamski A., 2013), *Trichomonas tenax* (terlokalisasi di rongga mulut) (Duboucher C, *et al.*, 1995) dan *Pentatrachomonas hominis* dan *Dientamoeba fragilis* (terletak di saluran pencernaan) (Kamaruddin M. *et al.*, 2014). Hanya satu spesies yang memiliki potensi patogenik yang kuat: *T. vaginalis*, penyebab infeksi menular seksual non-virus yang paling lazim pada manusia, trikomoniasis. Hanya *T. vaginalis* dan *T. tenax* yang dianggap spesifik pada manusia, dengan yang pertama dicirikan oleh data epidemiologi terbanyak, meskipun masih terbatas, tetapi sangat sedikit yang diketahui tentang yang terakhir *P. hominis* dan *D. fragilis* dapat menyebabkan gejala gastrointestinal pada beberapa pasien, seperti sakit perut dan diare (Kamaruddin M, *et al.*, 2014) *D. fragilis* juga berpotensi sebagai agen penyebab sindrom iritasi usus besar (IBS), tetapi masih menjadi perdebatan seputar patogenisitasnya, rute infeksi, dan epidemiologi. Selain itu, beberapa spesies trichomonad memiliki kepentingan veteriner, seperti patogen unggas *Trichomonas gallinae*, *Tetratrachomonas gallinarum*, dan *Histomonas meleagridis*, dan *Tritruchomonas foetus*, agen penyebab penyakit kelamin pada sapi (Amin A, *et al.*, 2014).

Kisaran inang yang luas ini, bersama dengan isolasi *D. fragilis* dan *P. hominis* dari berbagai inang hewan, menunjukkan bahwa spesies trichomonad tertentu mungkin menunjukkan karakteristik zoonosis (Kamaruddin M, *et al.*, 2014). Meskipun pertanyaan tentang trichomonads zoonosis telah dipertimbangkan selama beberapa tahun sebelumnya, hasil terbaru dari beberapa sumber berbeda telah menyoroti potensi ini. Di sini kami meringkas studi klinis dan filogenetik yang menunjukkan potensi zoonosis untuk trichomonad, mendiskusikan implikasinya terhadap kesehatan manusia, dan langkah selanjutnya yang

diperlukan untuk penyelidikan epidemiologi, patobiologi, dan evolusi mereka.

Empat spesies trichomonad yang diakui sebagai parasit manusia pada awalnya dianggap mempunyai spesifik lokasi. Namun, berbagai studi klinis menunjukkan bahwa mereka juga dapat ditemukan di lokasi yang tidak umum. Misalnya, *T. tenax*, komensal dari mulut manusia yang ditemukan pada pasien dengan kebersihan mulut yang buruk, telah teridentifikasi dengan metode mikroskopis dan molekuler pada saluran pernapasan atas dan bawah. Salah satu kemungkinan yang dapat menjelaskan dari lokasi yang ‘menyimpang’ ini adalah terhirupnya parasit dari rongga mulut ke dalam saluran pernapasan. Namun, dalam beberapa kasus di mana *T. tenax* teridentifikasi di saluran pernapasan, tidak ditemukan parasit di mulut. Spesies trichomonad manusia lainnya juga telah diidentifikasi dalam saluran pernapasan termasuk spesies yang ditularkan secara seksual *T. vaginalis* dan parasit usus *P. hominis*, yang menunjukkan bahwa spesies ini juga dapat berkembang-biak di luar tempat kolonisasi mereka yang biasa.

Tabel 1. Spesies Trichomonad yang teridentifikasi pada sampel klinis

Spesies	Host Pertama, lokasi infeksi	Jangkauan host, lokasi infeksi	Metode Diagnostik	Kondisi Klinik	Ref
<i>Trichomonas vaginalis</i>	Manusia, UGT	Manusia, RT	PCR dan sekuensing pada daerah ITS1-5.8S-ITS2rRNA	Trichomoniasis, Infeksi paru-paru, AIDS	(6,8)
<i>Trichomonas tenax</i>	Manusia, DT dan rongga mulut	Manusia, RT	PCR dan sekuensing pada daerah ITS1-5.8S-ITS2rRNA	Trichomoniasis air ludah, Infeksi paru-paru	(1,2,7)
<i>Dientamoeba fragilis</i>	Manusia, DT	Manusia dan mamalia lainnya, DT	Feses, PCR dan sekuensing pada daerah ITS1-5.8S-ITS2rRNA,	Diare kronis, IBS	(10)

Spesies	Host Pertama, lokasi infeksi	Jangkauan host, lokasi infeksi	Metode Diagnostik	Kondisi Klinik	Ref
			18SrRNA		
<i>Pentatrichomonas hominis</i>	Tidak diketahui, DT	Manusia dan mamalia lainnya, DT	Feses, PCR dan sekuensing pada daerah ITS1-5.8S-ITS2rRNA	Diare, infeksi paru-paru, Rematik Artritis	(1,2)
<i>Trichomonas foetus</i>	Sapi, UGT dan DT	Manusia dan mamalia lainnya, RT	PCR dan sekuensing pada daerah ITS1-5.8S-ITS2rRNA, gen EF-1 α , dan TR7/TR8	Infeksi paru-paru, AIDS	(1,4)
<i>Tetratrachomonas gallinarum</i>	Burung, DT	Burung dan manusia, RT	PCR dan sekuensing pada daerah ITS1-5.8S-ITS2rRNA	Infeksi paru-paru	(4)
<i>Tetratrachomonas sp</i>	Tidak diketahui	Manusia, RT	PCR dan sekuensing pada daerah ITS1-5.8S-ITS2rRNA	Infeksi paru-paru	(1,2)

Keterangan : DT, saluran pencernaan; UGT, saluran urogenital; RT, saluran pernapasan; ITS, *internal transcribed spacer*; IBS, sindrom iritasi usus besar.

Setidaknya lima spesies trichomonad, yaitu *P. hominis*, *T. tenax*, *T. vaginalis*, *T. foetus*, dan *T. gallinarum*, telah diidentifikasi pada saluran pernapasan manusia dan sebagai agen penyebab trikomoniasis paru (Tabel 1).

Mereka telah ditemukan pada hingga 60% pasien dengan *Pneumocystis pneumonia* (PcP) dan hingga 30% pasien dengan sindrom gangguan pernapasan akut (ARDS). Oleh karena trichomonad bersifat mikroaerofilik, kecil kemungkinannya mereka memulai dan menyebabkan penyakit itu sendiri, tetapi mungkin merupakan infeksi sekunder dan

oportunistik yang dapat memperburuk gejala dan memperpanjang penyakit (Kamaruddin M, *et al.*, 2012). Infeksi pernapasan trichomonad ini tampaknya bergantung pada: (i) keberadaan bakteri yang menjadi makanan dan (ii) kondisi anaerobik lokal yang disebabkan oleh infeksi terkait PcP atau ARDS tetapi tidak harus pada immunosupresi, karena obat melawan PcP secara konsisten menyembuhkan pasien dari trichomonosis paru dan, dalam satu penelitian, pasien ARDS yang diobati tidak ditemukan mengalami gangguan sistem imun. Dengan demikian, adanya peningkatan jumlah trichomonad berbeda dalam rentang sampel klinis yang lebih luas dari pasien dengan beragam penyakit, seperti AIDS, rheumatoid arthritis, kanker prostat, infeksi paru (empiema dan pneumonia selain PcP dan ARDS), dan sistem pencernaan, kondisi seperti diare dan IBS (Kamaruddin M, *et al.*, 2012) menjadi semakin jelas. Memang, frekuensi infeksi trichomonosis paru mungkin lebih tinggi daripada yang dilaporkan karena transformasi parasit dari tahap motil, berbentuk buah pir ke tahap amoeboid membuat identifikasi mikroskopis dalam sampel klinis menjadi sulit, menyoroti pentingnya data molekuler untuk mengidentifikasi infeksi tersebut (Kamaruddin M, *et al.*, 2014).

Trichomonad dianggap memiliki kekhususan inang yang ketat. Namun, parasit trichomonad yang sebelumnya tidak dilaporkan menginfeksi manusia baru-baru ini ditemukan pada sampel klinis manusia (Tabel 1). Misalnya, parasit yang termasuk dalam genus *Tritrichomonas* dapat diisolasi dari saluran reproduksi sapi (*Tritrichomonas foetus*), mukosa hidung dan usus babi (*Tritrichomonas suis*), dan usus primata non-manusia (*Tritrichomonas mobilensis*). Contoh lain adalah *T. foetus*, secara historis dianggap khusus untuk sapi. Meskipun demikian, infeksi silang eksperimental parasit antara babi dan sapi selain analisis data molekuler menunjukkan bahwa ketiga spesies ini harus dianggap sebagai *strain* dari spesies yang sama (Selain itu, beberapa genotipe yang berbeda dari *T. foetus* telah diidentifikasi sebagai penyebab diare pada kucing di 12 negara dan juga telah diisolasi dari anjing yang mengalami diare. Selain itu, dalam beberapa kasus klinis baru, organisme mirip *T. fetal* secara tak terduga telah diidentifikasi di paru-paru pasien manusia. Temuan

tersebut menunjukkan bahwa *T. fetal* adalah parasit zoonosis yang mampu menjajah berbagai inang dan bagian tubuh. Contoh lain spesies trichomonad non-manusia yang baru-baru ini ditemukan menginfeksi manusia adalah anggota genus Tetratrichomonas, yang saat ini merupakan genus terbesar dalam filum Parabasalia. Spesies Tetratrichomonas ditemukan di usus kecil dari spektrum yang luas dari inang invertebrata dan vertebrata, seperti lintah, burung, dan hewan pengerat. Memang, beberapa spesies tetratrichomonad diketahui menginfeksi berbagai inang yang tidak berkerabat, seperti *Tetratrichomonas prowazeki*, yang telah ditemukan pada spesies amfibi dan reptil. Contoh lain, *Tetratrichomonas gallinarum*, terutama dianggap sebagai parasit unggas dari saluran pencernaan pada burung domestik dan liar, walaupun patogenitasnya belum diketahui. Namun, beberapa penelitian terbaru telah mengidentifikasi *strain* Tetratrichomonas yang diisolasi dari paru-paru manusia atau rongga mulut manusia sebagai organisme mirip *T. gallinarum*. Studi juga menunjukkan bahwa genus Tetratrichomonas jauh lebih beragam daripada yang diperkirakan sebelumnya dan bahwa *T. gallinarum* terdiri dari setidaknya tiga spesies dengan spesifisitas inang variabel, beberapa mewakili isolat manusia. Khususnya, percobaan gagal menularkan dua Tetratrichomonas yang berasal dari manusia ke burung, meskipun penulis berpendapat bahwa hasil ini dapat dijelaskan dengan adaptasi trichomonad mirip *T. gallinarum* ke inang manusia atau pembiakan in vitro yang ekstensif, sehingga infeksi pada burung dapat terjadi, tidak lagi dapat dicapai secara biologis (Maritz JM *et al.*, 2014).

Meskipun profil klinis yang tepat dari *D. fragilis* masih kurang dipahami, beberapa orang menganggap spesies ini memiliki kemampuan patogenik, dan penelitian terbaru telah menghubungkan peningkatan IBS dengan prevalensi tinggi (40%) dari *D. fragilis* di Eropa. Namun, patogenitas *D. fragilis* telah dipertanyakan karena sifat asimtomatik dari banyak infeksi, dan dianggap oleh beberapa orang sebagai flora usus komensal. Memang, pengobatan anak yang terinfeksi *D. fragilis* dengan metronidazole tidak terkait dengan hasil klinis yang lebih baik. Karena

asosiasi bukanlah bukti kausalitas, data tambahan diperlukan untuk menetapkan patogenitas trichomonad di saluran pencernaan dan bagian tubuh yang lain seperti paru-paru. Dalam konteks ini, penting untuk mempertimbangkan karakteristik inang dan parasit sehubungan dengan hasil interaksi mereka. Sebagai contoh, satu ekstrem diwakili oleh pasien dengan gangguan kekebalan parah yang lebih rentan terhadap infeksi mikroba yang lebih luas dibandingkan dengan inang imunokompeten. Ketika mempelajari hasil interaksi mikroba manusia, interaksi kompleks antara virus, bakteri dan archaea, eukariota mikroba, dan parasit hewan mempengaruhi status kesehatan inang manusia, dengan mikrobiota mukosa memainkan peran kunci yang mempengaruhi status kesehatan dan penyakit (Hirt RP., 2013). Berdasarkan pertimbangan dan contoh ini, trichomonad mungkin lebih umum dan memiliki spektrum patologi yang lebih luas pada manusia daripada yang diketahui saat ini, memengaruhi kesehatan manusia melalui patologi langsung tetapi juga secara tidak langsung melalui disbiosis mikrobiota mukosa dan peradangan lokal, memfasilitasi transmisi patogen utama contohnya adalah infeksi *T. vaginalis* dan vaginosis bakteri yang berkontribusi terhadap penularan HIV (Fastring DR. *et al.*, 2014). Potensi pengaruh trichomonad usus terhadap kesehatan manusia juga harus mempertimbangkan dampak potensialnya pada mikrobiota usus, yang mungkin menjelaskan pengamatan hubungan antara *D. fragilis* dan IBS melalui induksi disbiosis usus (Engsbom AL. *et al.*, 2014). Memang, kemampuan trichomonad untuk hidup di berbagai jaringan mukosa mungkin menjadi kunci untuk kisaran inang yang luas dan kemampuan untuk mengembangkan infeksi di berbagai bagian tubuh, serta berkontribusi secara langsung atau tidak langsung terhadap patologi. Setelah kapasitas untuk berkembang pada permukaan mukosa vertebrata telah berkembang, mungkin ada sedikit penghalang untuk melintasi spesies dan situs mukosa. Misalnya, dalam kasus *T. foetus*, spesies yang ditularkan secara seksual ini mungkin menunjukkan perpindahan baru-baru ini dari saluran pencernaan ke saluran urogenital, dengan kapasitas

parasit untuk tumbuh subur di usus pada spesies yang berbeda (misalnya, babi, kucing, dan anjing).

Trichomonad menyediakan sistem unik untuk mempelajari asal-usul dan patobiologi zoonosis dan penyakit menular yang baru muncul. Selain itu, mereka telah menarik minat sebagai sistem model untuk biologi evolusioner dan genomik komparatif, dan untuk penyelidikan biokimia, molekuler, dan biologi sel (Alsmark C. *et al.*, 2013). Urutan genom *T. vaginalis* yang diterbitkan pada tahun 2007 adalah spesies trichomonad pertama yang akan diurutkan (Carlton JM. *et al.*, 2007), dan lainnya saat ini sedang berlangsung termasuk isolat *T. foetus*, *P. hominis*, *T. gallinae*, dan *T. tenax*. Urutan ini akan memungkinkan analisis komparatif dari mode siklus hidup parasit yang umum dan unik, dan kemungkinan mekanisme adaptif. Sebagai contoh, *T. vaginalis* dan *T. fetal* tampaknya telah berevolusi secara independen untuk menjajah saluran urogenital inang mamalia yang berbeda. Selain itu, *T. fetal* telah diisolasi dari saluran pencernaan kucing dan anjing, menunjukkan bahwa Trichomonad ini mampu menjajah berbagai inang dan lingkungan (Reed DL. *et al.*, 2011). Kedua spesies trichomonad yang ditularkan secara seksual ini mungkin mewakili kasus evolusi konvergen dan memberikan kesempatan untuk membandingkan kesamaan yang diturunkan dan asal mula dari sifat-sifat nenek moyang. Spesies trichomonad menunjukkan berbagai ukuran genom, dari 94 Mb untuk genom *P. hominis* hingga 177 Mb untuk genom *T. fetal*. Urutan genom *T. vaginalis* mengungkapkan genom 160-Mb sebagai hasil perluasan elemen transposabel dan keluarga gen pengkode protein, termasuk mereka yang bertanggung jawab untuk interaksi parasit dengan lingkungan terdekatnya (Zubacova Z. *et al.*, 2008).

Trichomonad juga menyediakan sistem unik untuk mempelajari fitur gaya hidup zoonosis melalui pemeriksaan komparatif karakteristik molekuler dan seluler. Sebagai contoh, infeksi *T. vaginalis* yang berhasil mungkin didukung oleh mekanisme virulensi seperti sitoaderensi dan fagositosis. 60.000 gen penyandi protein yang diprediksi dari *T. vaginalis* mencakup sejumlah besar kandidat gen untuk molekul permukaan yang

memediasi interaksi dengan jaringan inang dan membran serta pensinyalan, proses penting yang terlibat dalam patobiologi parasit. Salah satu faktor virulensi pusat antarmuka host-patogen di *T. vaginalis* yang berhasil diidentifikasi adalah sistein protease. Studi transkriptomik telah menunjukkan upregulasi dari beberapa faktor virulensi *T. vaginalis* sebagai respons terhadap kontak dengan sel inang secara in vitro dan hal ini juga teramati pada pertumbuhan *T. foetus* secara in vitro. Serupa dengan *T. vaginalis*, studi terbaru menunjukkan adanya sistein protease dalam filtrat bebas sel *T. gallinae* dan menunjukkan keterlibatan mereka dalam efek sitopatogenik secara in vitro. Berdasarkan data genom trichomonad lainnya untuk mengidentifikasi protein virulensi penting lainnya akan meningkatkan pemahaman kita tentang dasar molekuler dan seluler dari infeksi dan dapat digunakan untuk menguji hipotesis, seperti apakah organisme zoonosis menunjukkan keragaman yang lebih besar dalam protein virulensi utama yang mendasari kapasitas mereka untuk memparasit berbagai spesies inang dan situs mukosa.

C. **Surveillance Zoonosis Spesies Trichomonad**

Tujuan utama dari surveilans penyakit adalah untuk mewaspada, mengawasi atau memantau perkembangan penyakit di suatu populasi. Surveilans penyakit yang berhasil mendeteksi peningkatan kejadian penyakit lebih awal dari tingkat yang diharapkan sehingga intervensi pengendalian penyakit yang efektif, tepat waktu dan sasaran dapat mengurangi morbiditas, mortalitas, dan kerugian ekonomi. Terkait dengan tujuan surveilans penyakit, maka kegiatan surveilans terhadap penyakit zoonosis berupa pengumpulan, analisis, interpretasi, dan penyebaran informasi yang sistematis dan tepat waktu tentang kejadian, distribusi, dan faktor penentu penyakit yang ditularkan antara manusia dan hewan. Surveilans penyakit zoonosis mencapai target ketika digunakan untuk merencanakan, mengimplementasikan, dan mengevaluasi tanggapan untuk mengurangi morbiditas dan mortalitas penyakit menular pada populasi manusia dan hewan melalui sistem

kesehatan manusia dan hewan yang terintegrasi secara fungsional (Kamaruddin M., 2020).

Sistem surveilans penyakit zoonosis bersifat *emerging* yang terintegrasi merupakan suatu sistem yang menyatukan dan menghubungkan pengumpulan data, pemeriksaan, analisis, penyajian/pelaporan, dan komponen diseminasi untuk memberikan informasi klinis, epidemiologi, laboratorium, dan perilaku berisiko pada manusia dan hewan tentang kejadian yang tidak biasa dari penyakit zoonosis yang baru muncul pada populasi manusia dan hewan. Informasi yang disampaikan itu dapat digunakan untuk deteksi dini dan tanggapan tepat waktu di tingkat lokal, provinsi, nasional, regional, dan internasional (NCBI Bookshelf, 2009).

Salah satu surveilans yang dapat menjadi solusi pencegahan penyakit zoonosis adalah *genomic surveillance* yang biasanya diistilahkan dalam Bahasa sebagai pengawasan terhadap genom. *Genomic* (genomik) dikaitkan dengan material genetik suatu organisme berupa DNA (baik DNA yang terkode dalam hal ini yang berisi gen, maupun DNA yang tidak terkode), RNA, DNA yang terdapat di nukleus (inti sel), DNA yang terdapat di mitokondria dan DNA yang terdapat di kloroplas. Sebagai contoh pengawasan genomik pada konservasi dan pengolahan ternak adalah penggunaan penanda molekular diaplikasikan untuk (1) mengidentifikasi individu, spesies atau populasi; (2) mengukur perubahan metrik genetik populasi, dalam hal ini ukuran populasi yang efektif, keragaman genetik dan ukuran populasi yang berubah setiap saat; (3) mendeteksi perubahan kelimpahan dan keanekaragaman spesies.

Sequence Nucleotide Variants (SNVs) yang juga dikenal dengan istilah *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP atau SNIP), merupakan salah satu jenis mutasi, di mana terjadi perbedaan dalam nukleotida tunggal (adenine, timin, guanine dan sitosin) di dalam susunan rangkaian basa DNA pada posisi atau lokasi tertentu dalam genom. Perubahan yang terjadi pada basa tunggal itu akan menyebabkan perubahan asam amino pada daerah *conserve* protein, yang akibatnya struktur dan fungsi ikut berubah. Ketika SNP terjadi di dalam gen atau di wilayah regulasi gen, itu

akan mempengaruhi fungsi gen dengan memainkan pengaruh yang lebih besar pada penyakit. Sebagian besar SNP tidak memiliki efek pada kesehatan atau perkembangan. Namun demikian, beberapa perbedaan genetik telah terbukti sangat penting dalam studi kesehatan manusia. Para peneliti telah menemukan SNP yang dapat membantu memprediksi respons seseorang terhadap obat-obatan tertentu, kerentanan terhadap faktor lingkungan seperti racun, dan risiko mengembangkan penyakit (Kamaruddin M. 2023).

D. Internal Transcribed Spacer

Internal Transcribed Spacer atau ITS merupakan salah satu penanda molekuler yang banyak digunakan dalam taksonomi dan filogeni molekuler karena mudah diamplifikasi dan memiliki derajat variasi tinggi bahkan antara spesies sangat terkait erat (Hollingsworth *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011).

Sekuens ITS memiliki variasi sekuens yang tinggi karena daerah tersebut merupakan daerah *non-coding* yang memiliki laju mutasi lebih tinggi dari daerah *coding*. Pada region ITS sering terjadi perubahan materi genetik seperti halnya mutasi sehingga dapat berbeda variasi genetiknya antarspesies (James, 1996).

Region ITS merupakan suatu urutan RNA dari proses transkripsi utama yang berada di daerah inti. Organisme eukaryotik mempunyai dua daerah ITS yaitu ITS-1 terletak di antara 18S gen dan 5.8S gen, dan ITS-2 terletak di antara 5.8S dan 28S gen (Gambar 6), dan pada daerah ketiga gen inti tersebut mempunyai tingkat konservasi yang sangat tinggi (Yen *et al.*, 2013). ITS pada daerah 18s-28s r-DNA nuklear menjadi fokus utama untuk digunakan pada rekonstruksi filogenetik. Karena region ITS memiliki tingkat variasi yang tinggi dibandingkan dengan daerah lainnya (Takono & Okada, 2002). Dibandingkan dengan region lain, ITS merupakan daerah region yang berbeda dan memiliki informasi untuk proses identifikasi kekerabatan (Sun *et al.*, 1994). Region ITS sering digunakan dalam menganalisis filogenetika molekuler karena ITS memiliki karakteristik unggul dengan memiliki panjang kurang lebih 700bp dan memiliki Salinan

yang banyak di genom inti. Selain itu, ITS juga memiliki tingkat keberhasilan yang tinggi dalam amplifikasi PCR, sekuensing dua arah (*forward* dan *reverse*) dan tingkat variasi yang tinggi bahkan di antara spesies yang berkaitan erat. Region ITS dinilai sebagai DNA *barcoding* yang menyajikan variabel atau karakter lebih tinggi. Sekuens ITS menunjukkan diskriminasi spesies yang tinggi sehingga dapat digunakan untuk penelitian penemuan spesies baru (Letchuman, 2018. Hariri *et al.*, 2021).

3

Kultur & Karakterisasi Molekular Trichomonad

A. Kultur dan Pemeriksaan Spesies Trichomonad

Pemeriksaan spesies Trichomonad dapat dilakukan pada sampel darah, urine dan feses. Pada monograf ini, pemeriksaan spesies Trichomonad difokuskan pada sampel feses. Pengambilan sampel berupa feses yang dikoleksi secara langsung di rumah Masyarakat dan hewan mamalia yang hidup bersama masyarakat (seperti babi, tikus, sapi, kerbau, kambing, dan anjing).

Tabel 2. Komponen bahan untuk larutan *10x Ringer's solution*-1%Asparagin

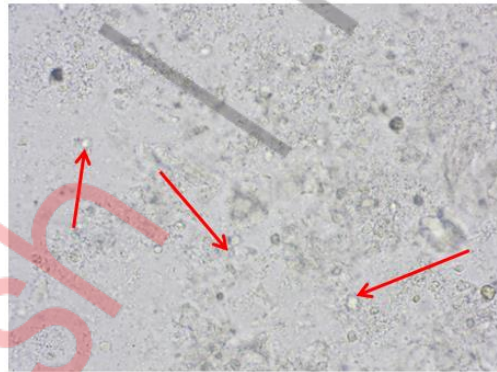
No	Bahan	Volume (gram)
1	Asparagin	1
2	Natrium Klorida (NaCl)	8.6
3	Kalium Klorida (KCl)	0.3
4	Kalsium Klorida (CaCl ₂)	0.33

Sebanyak 0,2gr feses masing-masing sampel diinokulasikan ke dalam media kultur yang berisi 1,5ml larutan Ringer (*10x Ringer's solution*) (Tabel 2) yang mengandung 10% *horse serum*, 0,1% asparagine dan 1mL campuran Penisilin/streptomycin yang merupakan bagian dari metode Tanabe-Chiba (tanpa kandungan glukosa/pati). Setelah biakan diinkubasi pada suhu 35°C selama 3 sampai 4 hari menggunakan alat pada Gambar 6, endapan biakan diperiksa secara mikroskopis untuk mencari trofozoit trichomonad yang bergerak (Gambar 7).



Gambar 6. Alat inkubasi mini (merek AccuBlock)

Selanjutnya, semua sampel positif disubkultur ke media baru. Untuk sedimen yang tersisa (200µl) ditambahkan 800µl reagen DNAzol® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) dalam tabung 1,5 ml dan disimpan pada suhu kamar dan pada -20°C (di laboratorium) untuk analisis lebih lanjut.



Gambar 7. Hasil kultur spesies *Trichomonad* dengan 10x Ringer's solution plus antibiotik menunjukkan trofozoit *Trichomonad* yang bergerak (tanda panah merah)

B. *Fixing* dan Pewarnaan Spesies *Trichomonad*

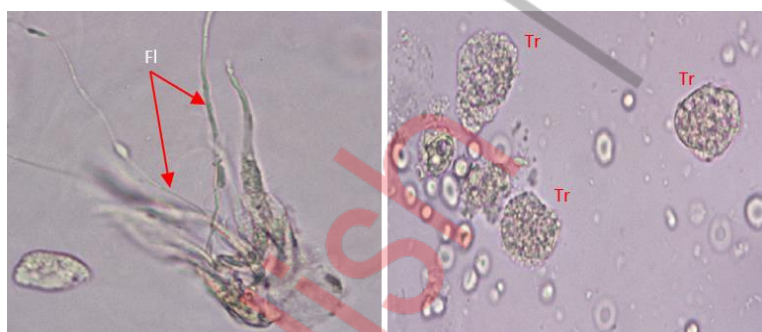
Reagen yang digunakan untuk *fixing* spesies *Trichomonad* adalah:

1. 1% Glutaraldehida
2. 3 sampai 4% Paraformaldehida
3. Osmium tetroksida

Reagen yang digunakan untuk pewarnaan sel Trichomonad adalah dengan Protagol *staining* dengan protokol seperti pada Tabel 3.

Tabel 3. Protokol pewarnaan Protagol

No	Bahan/Aktivitas	Waktu
1	0.2% KMnO ₄	5 min
2	Rinse in tap water	10 detik
3	2.5% asam oksalat	5 min
4	Distilled water	3 x 3 min
5	0.3% larutan protagol	40 min, 60°C + 10min suhu ruang
6	Hydroquinone developer	10-30 detik
7	Tap water	10 detik
8	0.5% gold klorida	3-4 detik
9	2.5% asam oksalat	30 detik
10	Distilled water	2 min
11	2.5% sodium thiosulfat	3 min
12	Tap water	3 x 3 min

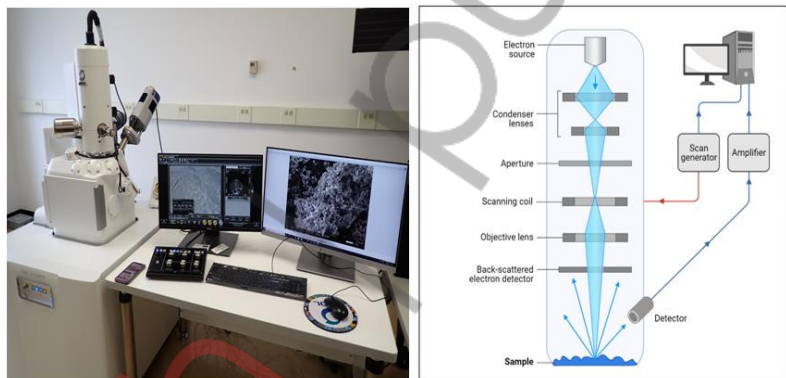


Gambar 8. Spesies Trichomonad setelah diberikan pewarnaan Protagol
Fl: flagella; Tr: spesies Trichomonad

C. *Low Vacuum Scanning Electron Microscopy*

Scanning Electron Microscope (SEM) yang juga dikenal sebagai *low vacuum scanning electron microscopy* (LVSEM) merupakan instrumen mikroskop elektron yang menggunakan elektron untuk memindai sebuah objek. SEM umumnya digunakan untuk melihat objek yang sangat kecil

(skala nano), di antaranya untuk mengidentifikasi *Trichomonad* dan bagian-bagiannya. *Image* (citra) yang dihasilkan dari SEM berupa gambar hitam putih (tanpa warna), hal ini disebabkan karena panjang gelombang yang dihasilkan oleh elektron *probe* (elektron pemindai) tidak berada pada spektrum cahaya tampak. Berkas sinar elektron dengan diameter yang kecil ditembakkan ke sampel. Elektron kemudian berinteraksi dengan atom-atom pada sampel. Elektron hasil interaksi kemudian menghasilkan sinyal yang mengandung informasi tentang topografi permukaan sampel, komposisi, morfologi, dan informasi lainnya yang ditangkap oleh detektor.



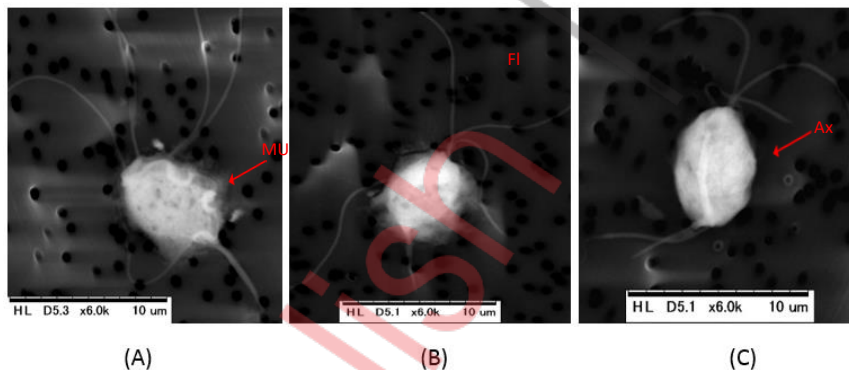
Gambar 9. Instrumen SEM terdiri dari perangkat pemindai, penyajian gambar dan citra (JEOL Ltd., Tokyo, Jepang)

Instrumen SEM terdiri dari beberapa perangkat yang secara garis besar, perangkat-perangkat tersebut dapat dikategorikan dalam tiga komponen, yaitu komponen pemindai, komponen penyajian gambar dan data (*image display*) dan komponen pendukung (Gambar 9).

Analisis sampel spesies *Trichomonad* dengan menggunakan SEM dilakukan setelah spesies *Trichomonad* telah positif tumbuh pada media kultur yang dibuktikan dengan pengamatan di bawah mikroskop. Sebanyak 150 μ l larutan kultur pemeliharaan yang telah ditumbuhkan oleh spesies *Trichomonad* (mengandung trofozoit) dipersiapkan dalam *tube conical* untuk disentrifugasi pada 100 gravitasi selama 5 menit, supernatan dibuang dan pelet fraksi (bagian endapan) diambil dan dicuci

dengan 300µl PBS hangat (35°C) dengan pH7.4, dilanjutkan dengan spin-down untuk penghilangan sisa supernatan. Pelet disuspensikan kembali dengan 100µl PBS hangat dengan cara di-*pipetting* secara perlahan, kemudian seluruh solusi trofozoit kemudian ditempatkan ke dalam 500µl paraformaldehide 4% dingin dalam buffer fosfat (pH 7.0), setetes demi setetes.

Fiksasi dilanjutkan pada suhu 4°C semalaman (*over-night*). Trofozoit dicuci dua kali dengan PBS dan kemudian diwarnai dengan larutan T1 biru (Nisshin EM, Tokyo, Jepang) dan diinkubasi selama 2 menit pada suhu kamar sesuai dengan instruksi pabrik pada filter nano-perkolator (JEOL Ltd., Tokyo, Jepang). Sampel pada filter dipasang langsung ke tempat spesimen dan diperiksa menggunakan mikroskop elektron pemindai Miniscope® TM-3000 (Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo, Jepang). Hasil diamati dengan koneksi ke komputer memperlihatkan seperti Gambar 10.

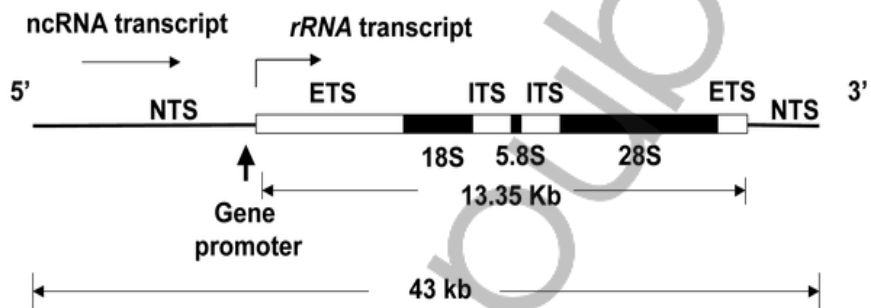


Gambar 10. (A) Sampel No. H79, B79; (B) Sampel No. R10; (C) sampel No. R10, R7
Ket. Ax: Axostyle, MU: Membran Undulating, Fl: Flagellata

D. Design Primer Lokus ITS dan 18S rRNA

Primer merupakan DNA pendek dan berutas tunggal atau lebih yang dikenal sebagai oligonukleotida yang panjangnya antara 10 sampai 40 basa. Fungsi primer sebagai penginisiasi reaksi polimerisasi DNA. Tanpa primer, reaksi polimerisasi DNA tidak akan terjadi. Selain itu, primer membatasi daerah mana yang akan diamplifikasi pada reaksi PCR.

Oleh karena fungsi primer sebagai inisiator dan pembatas daerah yang akan diamplifikasi, maka idealnya primer memiliki urutan basa nukleotida yang tepat berpasangan dengan urutan basa DNA target yang akan diamplifikasi dan tidak menempel di bagian lainnya. Pentingnya *design* primer agar keberhasilan reaksi PCR sedapat mungkin memperoleh keseimbangan antara spesifikasi dan efisiensi.



Gambar 11. Pemetaan lokus primer untuk *design* primer ITS dan 18SrRNA

Pada studi ini, primer yang di-*design* berada pada daerah DNA *internal transcribed spacer* (ITS), khususnya ITS-1, 5.8S rRNA, dan ITS-2 yang letaknya diapit antara 18S (SSU) dan 28S(LSU). Daerah ITS ini merupakan *non-coding region*, yang artinya daerah ini memiliki laju mutasi lebih tinggi daripada di daerah *coding*. Hal ini disebabkan pada daerah ITS sering terjadi perubahan materi genetik sehingga dapat berbeda variasi genetiknya antarspesies (James, 1996), dan mempunyai variasi genetik yang sangat tinggi (Takono & Okada, 2002) (Gambar 11).

Tabel 4. Primer yang digunakan pada lokus ITS dan 18SrRNA dengan sekuens dan besaran *basepairs*

Primer ID dan Lokus	Sequences (5' to 3')	PCR size (bp)	References
TRICHO-F (Locus ITS)	CGGTAGGTGAACCTGCCGTT	387	Jongwutiwes S, <i>et al.</i> 2000
TRICHO-R (Locus ITS)	TGCTTCAGTTCAGCGGGTCT	387	Jongwutiwes S, <i>et al.</i> 2000
TRICHO-FBIS (Locus ITS)	GGTGAACCTGCCGTTGGATC	323	Duboucher C, <i>et al.</i> 2006
TRICHO-RBIS (Locus ITS)	TCAGTTCAGCGGGTCTTCCT	323	Duboucher C, <i>et al.</i> 2006
MK-32 (Locus ITS)	TTC AGT TCA GCG GGT CTT CC	350	Kamaruddin M, <i>et al.</i> 2014
MK-1 (Locus 18SrRNA)	GTAGGCTATCACGGGTAACG	1.350	Kamaruddin M, <i>et al.</i> 2014
MK-4 (Locus 18SrRNA)	GGACATCACGGACCTGTTATTGCTAC	1.310	Kamaruddin M, <i>et al.</i> 2014
MK-5 (Locus 18SrRNA)	GCAGCAGGCGCGAAACTTAC	1.250	Kamaruddin M, <i>et al.</i> 2014
MK-6 (Locus 18SrRNA)	GTTGACACACATTTACAAGGGATTCC	1.350	Kamaruddin M, <i>et al.</i> 2014

Selain itu, studi ini *men-design* primer yang berada pada lokus 18SrRNA untuk mendapatkan kisaran yang lebih luas (Gambar 11, Tabel 4), juga berfungsi membantu mendeteksi Spesies trichomonad jika tidak dapat terdeteksi dengan menggunakan primer ITS.

Trichomonad pada penelitian ini menggunakan *Internal Transcribed Spacer* atau ITS sebagai DNA *barcode* inti (nDNA), dan ITS ini dapat mendeteksi berbagai trichomonad sebagai berikut: *Simplicimonas* sp., *Hexamastix mitis*, dan *Hypotrichomonas* sp. dari hewan pengerat, dan *Tetratrichomonas* sp. dan *Trichomonas* sp. dari babi. Semua spesies ini tidak terdeteksi pada manusia, sedangkan *Pentatrichomonas hominis* diidentifikasi pada manusia, babi, anjing, kerbau, sapi, dan kambing. Bahkan ketika menggunakan lokus gen beresolusi tinggi di wilayah ITS, semua galur *P. hominis* teridentifikasi dan identik secara genetik; dengan demikian penularan zoonosis antara manusia dan mamalia yang berkerabat dekat ini mungkin terjadi di daerah ITS yang diteliti. Deteksi *Simplicimonas* sp. pada hewan pengerat (*Rattus exulans*) dan *P. hominis* pada kerbau air dalam penelitian ini mengungkapkan bahwa adaptasi inang yang baru dikenali dan menyarankan adanya kisaran inang yang tersisa yang belum terungkap pada spesies trichomonad.

E. Ekstraksi dan Isolasi DNA Spesies Trichomonad

Analisis molekular membutuhkan DNA yang murni dan berkualitas. Untuk memenuhi syarat pengerjaan molekular ini dibutuhkan proses ekstraksi DNA yaitu proses pengeluaran atau pemisahan DNA dari komponen sel lainnya seperti protein, lemak, karbohidrat dan lain-lain.

Cara mengekstraksi DNA spesies Trichomonad agak berbeda dengan ekstraksi DNA dari bakteri. Pada ekstraksi DNA ini menggunakan larutan DNAzol®. Berdasarkan instruksi pabrik dan beberapa modifikasi pada tahap *freeze & thaw*, sampel diperlakukan dengan 2 kali siklus pembekuan (*freeze*) dan pencairan (*thaw*), dilanjutkan dengan penambahan enzim proteinase-K selama semalam (*over-night*) (konsentrasi akhir 0,4 mg/ml) pada suhu 55°C sebelum dipresipitasi etanol standar untuk protokol DNAzol®. Endapan DNA akhir disuspensikan kembali dalam 80 µl 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) yang mengandung 1 mM EDTA dan disimpan pada -20°C hingga digunakan pada prosedur berikutnya.

Penentuan kemurnian DNA yang diperoleh dari ekstraksi dan isolasi menggunakan larutan DNAzol® dengan alat Spektrofotometer *Nanodrop*, di mana isolat DNA dikatakan murni jika nilai rasio A_{260nm}/A_{280nm} berkisar antara 1.8-2.0 dan konsentrasi di atas 100ng/μl berdasarkan pengukuran dengan spektrofotometer.

Cara mengukur konsentrasi isolat DNA, dengan 2 μl DNA ditambah 60μl TE. Absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 260nm (A_{260}), selanjutnya konsentrasi DNA dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$[\text{DNA}] \mu\text{g/ml} = \text{absorbansi } A_{260} \times \text{faktor pengenceran DNA} \times 50 \mu\text{g/ml}$$

F. Amplifikasi DNA Spesies *Trichomonad* Menggunakan PCR

Amplifikasi DNA bertujuan untuk memperbanyak salinan suatu daerah rantai DNA yang spesifik dengan bantuan alat *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yang prosedur kerjanya meliputi tiga tahap yaitu denaturasi, *annealing* dan ekstensi.

Gen *internal transcribed spacer 1* (ITS1)/5.8S *small subunit ribosomal RNA* (rRNA)/ITS2 diamplifikasi menggunakan primer spesifik *trichomonad* (Duboucher *et al.*, 2006), dengan sedikit modifikasi (Tabel 2). Set primer PCR pertama adalah TRICHO-F (5'-CGG TAG GTG AAC CTG CCG TT-3') dan TRICHO-R (5'-TGC TTC AGT TCA GCG GGT CT-3'), dan set primer PCR kedua adalah TRICHO-FBIS (5'-GGT GAA CCT GCC GTT GGA TC-3'). *Design* baru MK32 (5'-TTC AGT TCA GCG GGT CTT CC-3') telah dimodifikasi dari primer TRICHO-RBIS asli dengan menambahkan 'T' pada ujung 5' dan menghapus 'T' pada ujung 3' untuk meningkatkan potensi deteksi. Primer ini digunakan untuk *nested*-PCR. PCR dilakukan dalam volume akhir 10 atau 20μl (masing-masing PCR pertama dan kedua) menggunakan buffer PCR 1X LA Taq®, termasuk 0,5 atau 1,0U LA Taq® DNA polimerase (Takara Bio Inc., Shiga, Jepang), sekitar 1μg DNA genomik atau 0,5μl larutan PCR pertama sebagai ciplakan (*template*), ditambahkan masing-masing primer pada 0,2μM, deoxynucleoside triphosphate (dNTP) pada 2,5 mM, dan 2,5 mM MgCl₂ dengan kondisi sebagai berikut:

- Tahap denaturasi 94°C selama 1 menit diikuti oleh 35 siklus 94°C selama 30 detik,
- Tahap *annealing* pada 54-55°C selama 15 detik, dan
- Tahap ekstensi pada 72°C selama 40 atau 20 detik.
- Post-ekstensi selesai pada 72°C selama 5 menit.

Ketika amplifikasi lokus ITS1/5.8S rRNA/ITS2 tidak berhasil, lokus gen parsial 18S rRNA (sekitar 1.350bp) dianalisis sebagai target alternatif. Menurut hasil penyelarasan menggunakan urutan referensi trichomonads, primer baru yang di-*design* seperti pada Tabel 2. Pasangan primer PCR pertama menggunakan MK1 (5'-GTA GGC TAT CAC GGG TAA CG-3') dan MK6 (5'-GTT GAC ACA CAT TTA CAA GGG ATT CC-3') dan PCR kedua menggunakan MK5 (5'-GCA GCA GGC GCG AAA CTT AC-3') dan MK4 (5'-GGA CAT CAC GGA CCT GTT ATT GCT AC-3') dilakukan sebagai *nested-PCR*. Reaksi PCR pertama dan kedua dilakukan dalam volume yang sama dari campuran reaksi 10µl menggunakan 1X buffer PrimeSTAR® yang mengandung 0,5 U PrimeSTAR® HS DNA Polymerase (Takara), 1µg DNA sampel yang diekstraksi atau 0,5µl DNA pertama. Larutan PCR sebagai ciplakan, masing-masing dNTP pada 0,8mM, dan masing-masing primer pada 0.3µM dengan kondisi sebagai berikut:

- Tahap denaturasi 98°C selama 30 detik diikuti oleh 30 siklus 98°C selama 10 detik,
- Tahap *annealing* pada 53°C selama 5 detik pada PCR pertama dan kedua, dan
- Tahap ekstensi pada 72°C selama 81 atau 55 detik, dengan
- Post-ekstensi selesai pada 72°C selama 2 menit.

G. Elektroforesis Gel Agarose

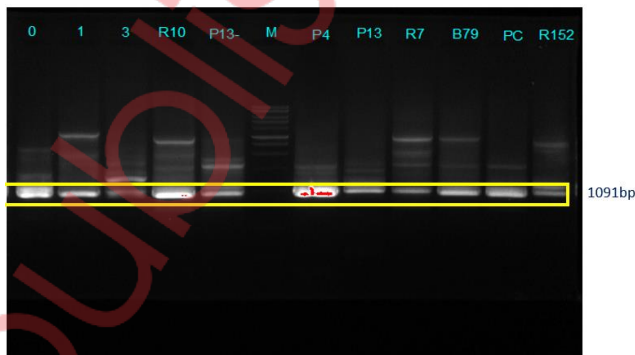
Elektroforesis digunakan untuk mengamati hasil amplifikasi dari DNA, di mana prinsip kerjanya adalah pemisahan molekul bermuatan berdasarkan perbedaan tingkat migrasinya dengan media gel berpori yang dialiri medan listrik. Pori-pori dalam gel bekerja seperti saringan dan memungkinkan molekul yang lebih kecil bergerak lebih cepat daripada

molekul yang lebih besar. Selain itu, kecepatan molekul yang bergerak juga tergantung pada muatan dan bentuk molekul.

Gel konsentrasi 1% diperoleh dari 0,8 gr agarose dicampur 80ml buffer TAE 1x kemudian dimasukkan ke dalam Erlenmeyer dan dipanaskan di *microwave* selama 2 menit atau hingga mendidih. Setelah agarose larut sempurna, diamkan setengah menit kemudian tuangkan *gel-red* sebagai pewarna sebanyak 1 μ l kemudian dihomogenkan. Gel agarose dituang ke cetakan gel elektroforesis yang sudah terpasang dengan 2 sisi cetakan sumur, didiamkan pada suhu ruang hingga memadat.

Masukan gel padat pada perangkat elektroforesis yang telah berisi larutan TAE 1x hingga gel nya terendam. Pada sisi paling ujung sumuran dimasukkan Ladder sebanyak 3 μ l. Sampel DNA diambil 5 μ l untuk dimasukkan ke dalam sumuran. Elektroforesis mulai running dengan kecepatan 100 volt selama 30 menit. Hasil dari elektroforesis kemudian divisualisasikan pada *trans-illuminator* UV Gel DocTM EZ (BioRad Laboratories, Tokyo, Jepang). Untuk produk PCR dapat dielektroforesis pada gel agarose dengan konsentrasi yang berbeda-beda seperti konsentrasi 2% (ITS1/5.8S rRNA/ITS2) dan 1.2% (18S rRNA) dengan ethidium bromida 0.2 μ g/ml.

Setelah hasil dari visualisasi terdapat amplikon yang baik, maka dapat dilanjutkan untuk proses sekuensing.













Gambar 12. Visualisasi produk PCR spesies *Trichomonad* pada gel agarose pita target 1091bp

H. Purifikasi DNA

Purifikasi DNA atau pemurnian DNA dilakukan pada saat selesai melakukan isolasi dan ekstraksi DNA dari sampel (baca pada 3.D) dan pada saat pemotongan band target yang muncul di gel agarose hasil visual elektroforesis. Tujuan purifikasi adalah memisahkan larutan DNA dari debris, protein, RNA dan ekstrak sel lainnya.

Purifikasi DNA dari ekstrak sel dilakukan dengan cara mencampurkan larutan DNA dengan fenol atau campuran fenol: kloroform/isopropanol atau campuran fenol: kloroform: isoamylalkohol. Purifikasi DNA dari kontaminasi protein digunakan enzim protease berupa *pronase* atau *proteinase-K*, sedangkan kontaminan dari RNA, maka larutan DNA ditambahkan *RNase*.

	DNA extraction from gel	Purification of PCR products
Sample preparation	 up to 300mg of gel 500µl of GP1 Vortexing 55°C ; 10 - 15min Invert the tube	 PCR products : Buffer GP1 = 1 : 5 (e.g. 40µl : 200µl) Vortexing
Sample loading	 Load the sample onto the column 13,000rpm ; 30sec	 Load the sample onto the column 13,000rpm ; 30sec
Membrane washing	 600µl of GP2 13,000rpm ; 30sec * For TBE gels this wash step should be repeated.	 600µl of GP2 13,000rpm ; 30sec
Membrane drying	 13,000rpm ; 2min	 13,000rpm ; 2min
Elution	 20 - 50µl of GP3 2min at room temperature 13,000rpm ; 2min	 20 - 50µl of GP3 2min at room temperature 13,000rpm ; 2min

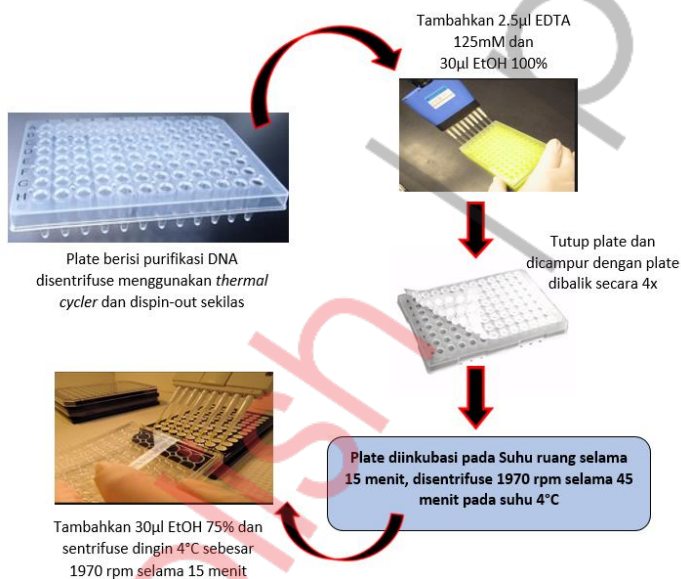
Gambar 13. Purifikasi DNA dari gel agarose hasil elektroforesis (kiri), dan dari produk PCR (kanan)

Densitas gradien sentrifugasi *Cesium Chlorida* (CsCl) dilakukan jika DNA masih terkontaminasi oleh molekul RNA dan protein. Dengan cara

densitas gradien sentrifugasi CsCl ini band DNA akan terpisah pada band berbeda dengan protein dan RNA, bahkan antara linier dan sirkuler DNA. Cara purifikasi yang lain dengan menggunakan garam dengan konsentrasi tinggi seperti 0.25M sodium asetat atau 0.1M sodium klorida.

Penyempurnaan presipitasi dilakukan dengan etanol dalam kondisi dingin di bawah kondisi ionik yang kuat, karena temperatur yang rendah akan menurunkan aktivitas molekul air yang dapat menyebabkan pengendapan DNA lebih efektif. Kemudian dicuci dengan EtOH 70% dan pellet DNA dilarutkan dengan buffer TE atau ddH₂O steril.

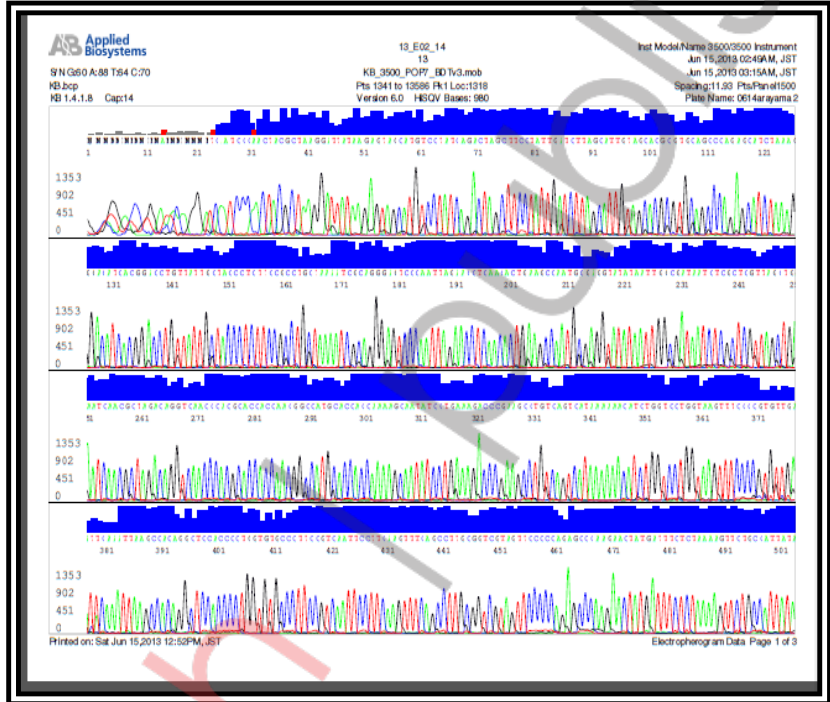
Adapun prosedur kerja purifikasi DNA dengan menggunakan etanol presipitasi dapat dilihat pada Gambar 14.



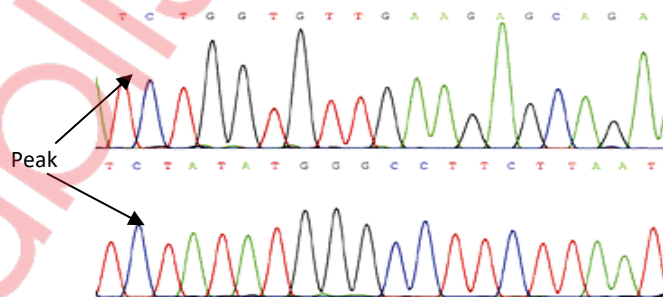
Gambar 14. Prosedur presipitasi Etanol/EDTA pada purifikasi DNA (Kamaruddin M. *et al.*, 2014)

I. Analisis Pengurutan DNA dengan *DNA Sequencer*

Pengurutan DNA atau *alignment* DNA merupakan teknik penentuan urutan basa nukleotida pada suatu molekul DNA.



Gambar 15. Hasil sekuensing menggunakan Genetic Analyzer 3500



Gambar 16. Perengangan peak hasil sekuensing untuk analisis

Kode ID Sampel	DNA Sequencing	
	SSU 18S rRNA primers	(ITS1)-5.8S rRNA Primers
0	<i>Tetratrichomonas sp.</i>	<i>Tetratrichomonas buttreyi.</i>
H475	<i>Pentatrichomonas hominis</i>	<i>Pentatrichomonas hominis</i>
B-79	<i>Pentatrichomonas hominis</i>	<i>Pentatrichomonas hominis</i>
H-79*	<i>Pentatrichomonas hominis</i>	<i>Pentatrichomonas hominis</i>
Vh-68	<i>Pentatrichomonas hominis</i>	<i>Pentatrichomonas hominis</i>
P-13*	<i>Tetratrichomonas sp.</i>	<i>Tetratrichomonas sp.</i>
R-10	Hypotrichomonas	-
R-5	-	<i>Ditrichomonas honigbergii</i>
R97	-	<i>Ditrichomonas honigbergii</i>
R52	-	<i>Pentatrichomonas hominis</i>
R152	-	<i>Trichomonas gallinae</i>
P-4	Hypotrichomonas	<i>Tetratrichomonas sp.</i>
P3	<i>Tetratrichomonas sp.</i>	<i>Tetratrichomonas sp.</i>
P-152	-	<i>Tetratrichomonas sp.</i>
1	-	<i>Tetratrichomonas sp.</i>
3	-	<i>Tetratrichomonas sp.</i>
4	-	<i>Tetratrichomonas buttreyi.</i>
535	-	<i>Pentatrichomonas hominis</i>

Tabel 5. Hasil Sekuens DNA spesies Trichomonad menggunakan primer lokus 18S dan ITS

Urutan basa nukleotida itu dikenal sebagai sekuens DNA yang mengandung informasi mendasar suatu gen (genom).

Prosedur mendapatkan sekuens DNA ini diawali dari pita target (band) yang diperoleh pada gel elektroforesis, kemudian gel yang berisi pita target tersebut dipotong dan dimurnikan menggunakan kit ekstraksi gel/PCR FastGene® (Nippon Genetics, Tokyo, Jepang) sesuai dengan instruksi pabrik. Pengurutan langsung dari setiap produk PCR murni dilakukan dengan ABI *Prism BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Life Technologies Japan, Tokyo, Japan) pada Applied Biosystems 3130 *Genetic Analyzer* (Life Technologies).

4

Konstruksi Filogenetik

A. Definisi Filogenetik

Istilah filogenetik berasal dari istilah Yunani yaitu *phyle* dan *phylon* yang berarti suku/ras, dan genetikos yang berarti kelahiran. Filogenetik adalah studi tentang hubungan evolusi di antara kelompok biologis. Filogenetik merupakan komponen penting dalam menentukan evolusi, epidemiologi, dan ekologi dari suatu populasi. Analisis filogenetik secara khusus didefinisikan sebagai ilmu yang digunakan untuk menentukan hubungan organisme baru dengan organisme yang terdahulu dan organisme yang diturunkan selama evolusi (Dharmayanti, 2012).

Proses evolusi melibatkan mutasi genetik dan proses rekombinan pada spesies untuk membentuk spesies baru dan merubah sifat mereka yang akan menjadi dasar untuk menganalisis hubungan satu spesies satu dengan yang lain. Dalam mempelajari variasi dan diferensiasi genetik antara populasi, jarak genetik dapat dihitung berdasarkan jumlah perbedaan basa polimorfik lokus gen dari populasi pada urutan DNA.

Secara historis, filum Parabasalia dibagi menjadi dua kelompok berdasarkan ciri morfologinya. Namun, berdasarkan data molekuler filum ini menjadi enam kelompok yaitu Trichomonadea, Tritrichomonadea, Hypotrichomonadea, Cristamonadea, Spirotrichonymphea, dan Trichonymphea (Cepicka I, *et al.*, 2010). Tiga kelompok di antaranya (Trichomonadea, Tritrichomonadea, dan Hypotrichomonadea) menjadi perhatian utama para ahli parasitologi, akan tetapi hubungan evolusioner di dalam dan di antara kelompok-kelompok ini belum jelas.

B. Filogenetik Molekular

Filogenetik molekular merupakan teknik kombinasi biologi molekular dan statistik dalam merekonstruksi hubungan filogenetika. Pemikiran dasar penggunaan sekuens DNA dalam studi filogenetika

adalah bahwa terjadi perubahan basa nukleotida menurut waktu, sehingga akan dapat diperkirakan kecepatan evolusi yang terjadi dan akan dapat direkonstruksi hubungan evolusi antara satu kelompok organisme dengan yang lainnya. Beberapa alasan mengapa digunakan sekuens DNA: (1) DNA merupakan unit dasar informasi yang mengkode organisme; (2) relatif lebih mudah untuk mengekstrak dan menggabungkan informasi mengenai proses evolusi suatu kelompok organisme, sehingga mudah untuk dianalisis; (3) peristiwa evolusi secara komparatif mudah untuk dibuat model; dan (4) menghasilkan informasi yang banyak dan beragam, dengan demikian akan ada banyak bukti tentang kebenaran suatu hubungan filogenetika.

Sekuens DNA telah menarik perhatian para praktisi taksonomi dunia untuk dijadikan karakter dalam penelitian filogenetika karena beberapa fakta. Pertama, sekuens DNA menawarkan data yang akurat melalui pengujian homologi yang lebih baik terhadap karakter-karakter yang ada. Kedua, sekuens DNA menyediakan banyak *character states* karena perbedaan laju perubahan basa-basa nukleotida di dalam lokus yang berbeda adalah besar. Dan ketiga, sekuens DNA telah terbukti menghasilkan sebuah hubungan kekerabatan yang lebih alami (natural). Sumber karakter DNA dapat diperoleh dari inti (nDNA), kloroplas (cpDNA), dan mitokondria (mtDNA). Tabel 6 memuat beberapa sistem gen dan genom yang telah digunakan dalam penelitian filogenetika molekuler.

Tabel 6. Filogenetika Molekular menggunakan beberapa Gen/Genom

Metode	Gen/Genom
1. Analisis sekuens	Daerah ITS dari nrDNA
2. Analisis sekuens	DNA mitokondria
3. Analisis sekuens	Gen RNA inti
4. Analisis sekuens	DNA Gen matK dari DNA kloroplas
5. Analisis sekuens	Gen rbcL dari DNA kloroplas
6. Analisis sekuens	Kelompok gen <i>repetitive</i> :
7. Analisis sekuens	- Knob heterokromatin
8. Analisis sekuens	- Gen CAB
9. Analisis sekuens	- Gen rbcS
10. Analisis restriksi	Gen kopi tunggal DNA kloroplas

Berdasarkan Tabel 6 di atas, ada dua dasar sebagai pertimbangan terkait filogenetika. Pertama, gen atau genom yang mana cocok untuk filogenetika dari tumbuhan atau hewan atau mikroorganisme dan kedua, metode mana yang cocok apakah analisis restriksi atau sekuens DNA. Contoh, masalah genetika pada tumbuhan, maka genom yang tepat/cocok harus dipilih adalah kloroplas atau inti, bukan mitokondria karena pada tumbuhan DNA mitokondria memiliki ukuran yang besar dan lebih sulit untuk diisolasi dan dipurifikasi.

C. Prosedur Analisis Filogenetik Molekular

Analisis filogenetika molekular merupakan proses bertahap untuk mengolah data sekuens DNA atau protein sehingga diperoleh suatu hasil yang menggambarkan estimasi mengenai hubungan evolusi suatu kelompok organisme. Ada sejumlah asumsi yang harus diperhatikan sebelum menggunakan data sekuens DNA atau protein ke analisis, di antaranya yaitu (1) sekuens berasal dari sumber yang spesifik, apakah dari inti, kloroplas atau mitokondria; (2) sekuens bersifat homolog (diturunkan dari satu nenek moyang); (3) sekuens memiliki sejarah evolusi yang sama (misalnya bukan dari campuran DNA inti dan mitokondria); dan (4) setiap sekuens berkembang secara bebas.

Paling sedikit, ada tiga tahap penting dalam analisis filogenetika molekular, yaitu *sequence alignment*, rekonstruksi pohon filogenetika, dan evaluasi pohon filogenetika dengan uji statistik.

1. *Sequences alignment*

Tujuan utama dari tahap ini adalah untuk menentukan apakah satu sekuens DNA atau protein adalah homolog dengan yang lainnya. *Alignment* yang melibatkan dua sekuens yang homolog disebut *pairwise alignment*, sedangkan yang melibatkan banyak sekuens yang homolog disebut *multiple alignment*.

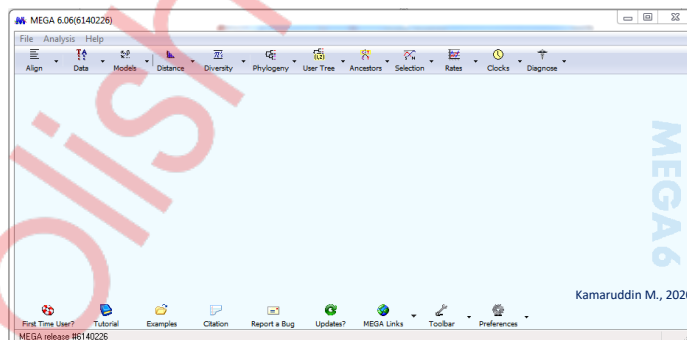
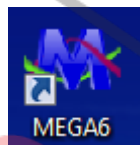
Keberhasilan analisis filogenetika sangat tergantung kepada akurasi proses *alignment*. Saat ini, banyak program komputer tersedia secara gratis di internet untuk membantu proses *alignment*, misalnya ClustalX. Dalam studi filogenetika molekular,

tahap ini akan menjadikan, misalnya setiap basa nukleotida (A,C,T,G), menjadi *site* tertentu yang ekuivalen dengan karakter, seperti karakter lebar daun atau sifat permukaan batang ketika menggunakan data morfologi. Jadi, misalnya diperoleh ukuran sekuens DNA sepanjang 600 pasang basa, maka jumlah karakter yang digunakan adalah sebanyak 600 karakter.

Dalam proses *alignment* sering ditemukan adanya gap, yang ditandai oleh garis putus-putus. Gap terjadi karena adanya insersi dan atau delesi. Dalam praktiknya, gap bisa dianggap sebagai data yang hilang, walaupun dalam banyak kasus gap dapat dilibatkan dalam analisis karena bisa bersifat informatif.

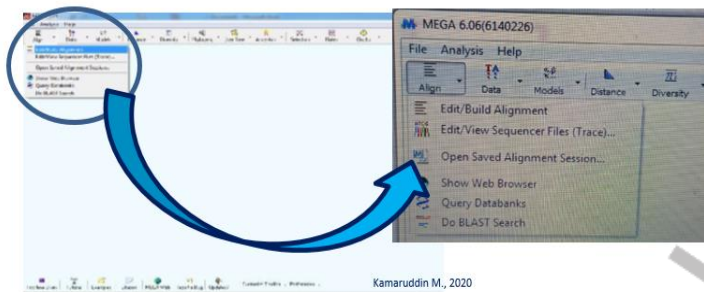
Cara melakukan *alignment* adalah

- 1) buka dan aktifkan program MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*), dalam hal ini menggunakan MEGA6.06 (Gambar 17 atas). Akan terbuka kotak dialog (Gambar 17 bawah).

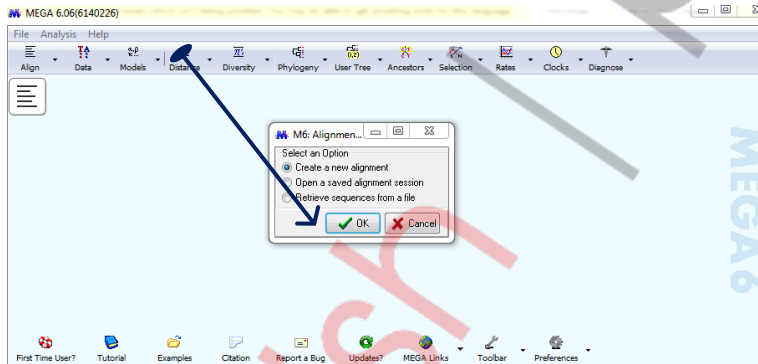


Gambar 17. Logo MEGA6.06 (atas), kotak dialog MEGA6.06 (bawah)

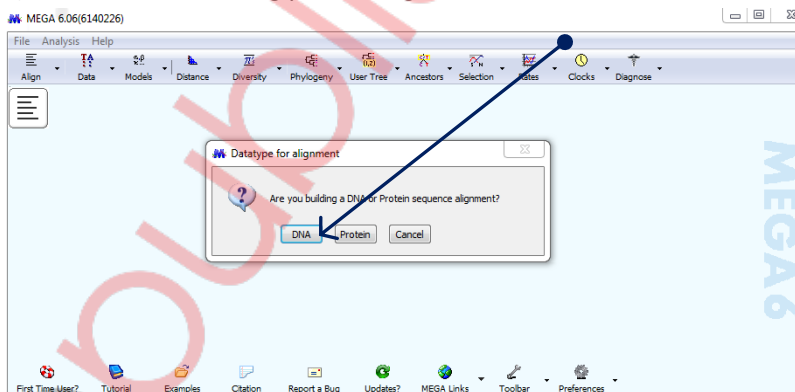
- 2) Tekan *align* pada *tool-bar*, klik *Edit/Build Alignment* untuk mengedit atau membuat penjajaran.



- 3) Pilih *Create a new alignment* (bila membuat penjarangan baru), pilih *open a saved alignment session* (bila ingin mengedit/penjarangan data yang sudah ada sebelumnya), pilih *open retrieve sequences from a file* (bila ingin mengakses data dari file tertentu). Pada monograf ini kita pilih ***create a new alignment***

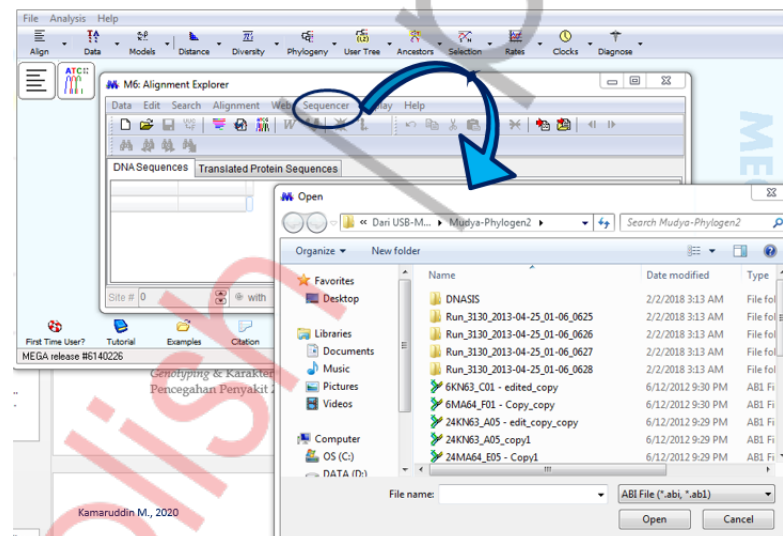
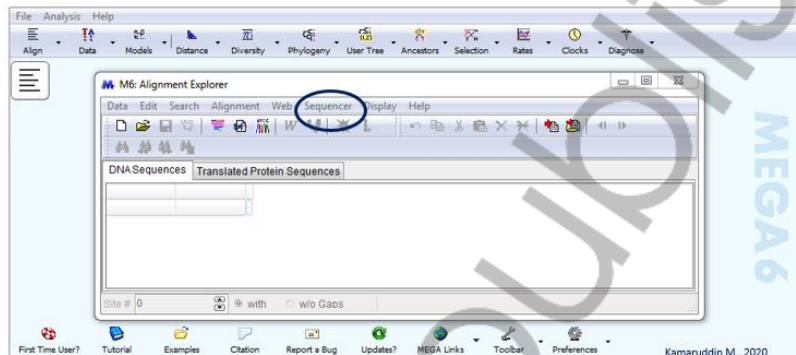


- 4) Muncul kotak dialog pilihan *alignment* dan klik **DNA**





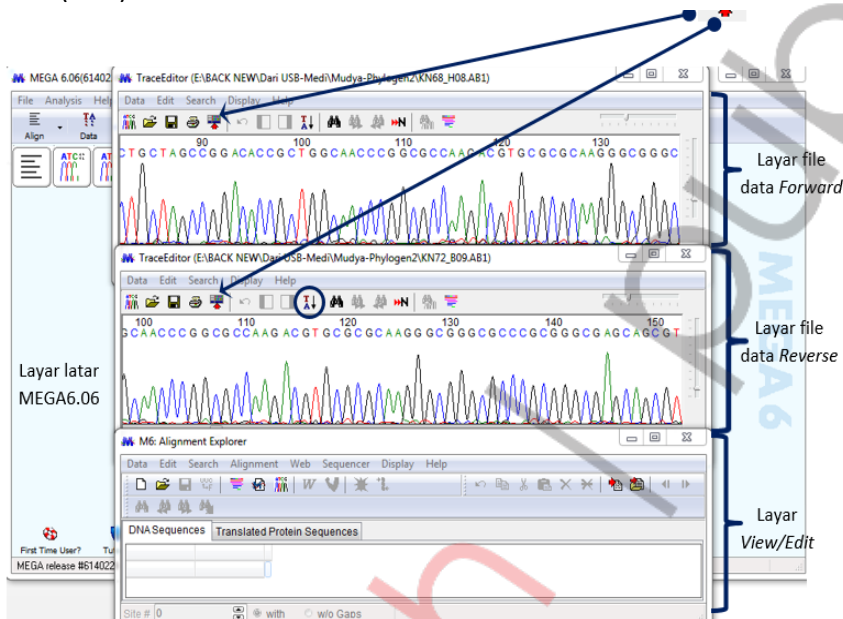
Kamaruddin M., 2020

- 5) Pilih dan klik **sequencer** pada **tool-bar**, dan klik **edit sequencer file** dan akan muncul kotak dialog pilihan memilih **file** sekuens.



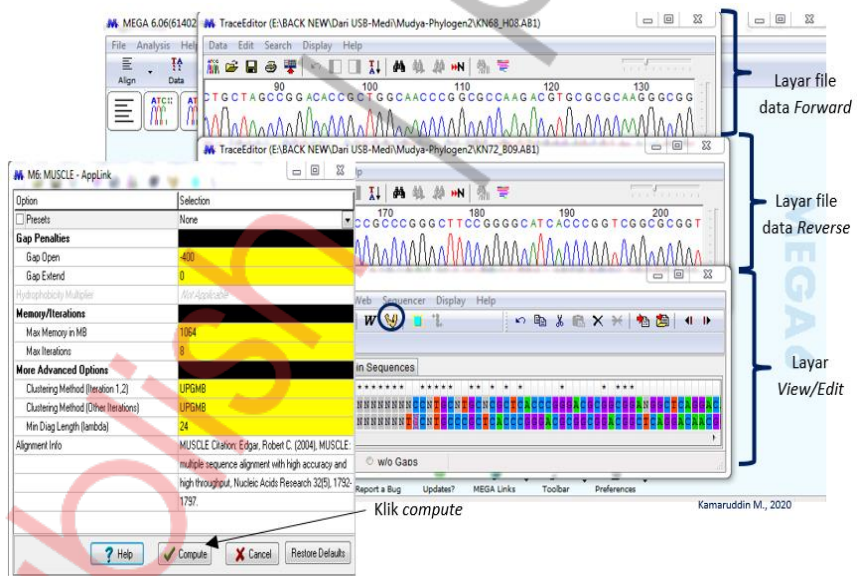
- 6) Pilih **file** sekuens dengan ABI **file** atau berkode (*.abi, *.ab1) dan apabila disekuensing dua arah (**Forward & Reverse**) pilih dan klik kedua **file bersamaan**.
- 7) Layar diatur untuk memudahkan pengeditan dan penjajaran dengan **file** data **forward** bagian atas, data **reverse** di bagian tengah dan layar **view/edit** di bagian bawah.

- 8) Pada layar *file reverse*, pilih **reverse complement sequence** () untuk menyamakan arah dengan *file forward*. Kemudian pindahkan data *file forward* dan *reverse* secara berurutan ke layar *view/edit* dengan menekan **add unmasked sequence to alignment explorer** ()

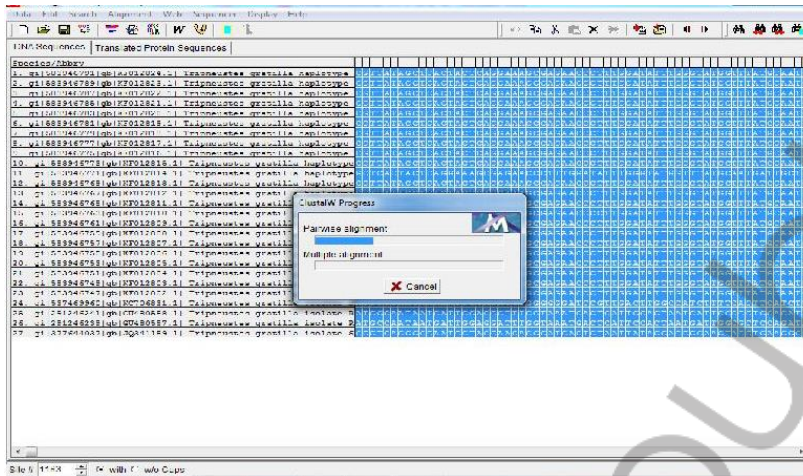


The image shows the Alignment Explorer window displaying a multiple sequence alignment of DNA sequences. The sequences are listed on the left, including identifiers like 'gb|EF023924.1| Trichomonas genitalis haplotyp...' and 'gb|EF023925.1| Trichomonas genitalis haplotyp...'. The alignment itself is a grid of colored characters representing nucleotides (A, C, G, T) across multiple sequences.

9) Bold kedua sekuens dengan menekan Ctrl A untuk penjajaran dengan menekan *align selected block by clustalW* (**W**) atau *align selected with MUSCLE* (**M**). Pilih **align DNA** dan tekan **OK** untuk melanjutkan penjajaran. Setelah disejajarkan, pengecekan urutan nukleotida yang benar. **Tanda bintang** menunjukkan bahwa kedua urutan adalah identik sedangkan **tanpa bintang** berarti kebalikannya. Penting untuk diketahui bahwa **kedua urutan** (data *Forward* dan *Reverse*) sebenarnya satu urutan yang diperoleh melalui **posisi berlawanan** (seharusnya sama). Tanpa bintang menjadi perhatian utama untuk memastikan nukleotida yang sebenarnya.



10) Proses penjajaran (*alignment*) dengan *ClustalW*, setelah hasil *alignment* diperoleh, potong nukleotida yang tidak rata dengan menekan **Delete selected block** mulai dari ujung kiri atau ujung kanan dengan menyamakan jumlah nukleotida setiap sekuens.



2. Rekonstruksi pohon filogenetika

Metode dalam membangun suatu pohon filogenetika dengan menggunakan karakter molekuler, sekuens DNA misalnya, dibagi menjadi empat kelompok utama, yaitu *distance method* (DM), *likelihood method* (LM), *Bayesian method* (BM), dan *parsimony method* (PM). Prinsip DM adalah jumlah perbedaan nukleotida antara dua sekuens DNA menunjukkan jarak evolusi yang terjadi.

Jarak evolusi dihitung untuk semua pasang sekuens DNA dan sebuah pohon filogenetika direkonstruksi dari jarak atau perbedaan pasangan basa nukleotida tersebut dengan menggunakan kriteria *least square*, *minimum evolution*, *neighbor joining*, dan *distance measure*. Sebelum digunakan untuk merekonstruksi pohon filogenetika, LM telah lama digunakan untuk data frekuensi gen.

Prinsip dari LM ini adalah bahwa perubahan-perubahan di antara semua basa nukleotida adalah sebanding. Masalah serius dari metode ini adalah waktu perhitungan yang lama, walaupun telah dikembangkan algoritma baru yang dianggap dapat mempercepat proses perhitungan. Untuk BM, pada dasarnya adalah sama dengan LM, hanya berbeda dalam penghitungan distribusi prior untuk membangun pohon filogenetika. Salah satu

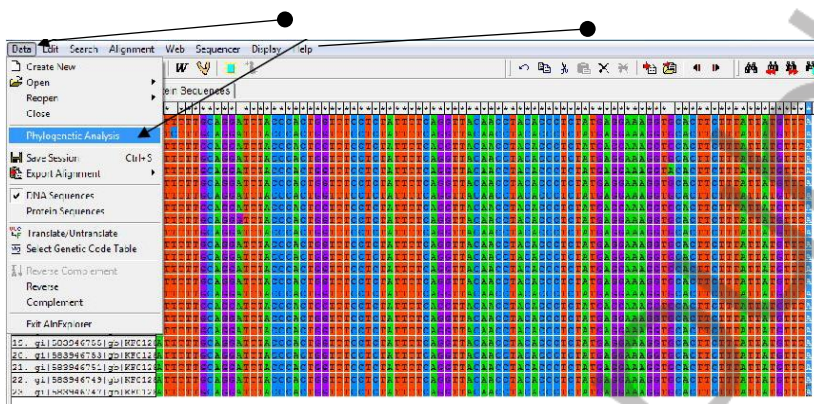
metode untuk menghitung distribusi prior adalah metode MCMC (*Markov Chain Monte Carlo*). PM beranggapan bahwa perubahan mutasional berlangsung pada semua arah di antara empat basa nukleotida atau 20 asam amino yang berbeda dan, berbeda dengan ketiga metode yang lain, hanya jumlah perubahan basa nukleotida atau asam amino yang terkecil yang dapat memberikan penjelasan yang baik mengenai keseluruhan proses evolusi yang terjadi. Kemudian, topologi pohon yang dipilih sebagai yang terbaik adalah yang mengalami jumlah perubahan yang paling kecil. Dari keempat metode di atas, PM sangat sering dipilih, antara lain karena pohon yang dibentuk lebih menggambarkan perubahan evolusioner yang terjadi setiap waktu, mengandung asumsi bahwa proses evolusi akan menempuh jalan yang paling singkat (*parsimonious*), dan perhitungan relatif lebih sederhana dan cepat dengan tingkat reliabilitas yang tinggi.

3. Evaluasi pohon filogenetika

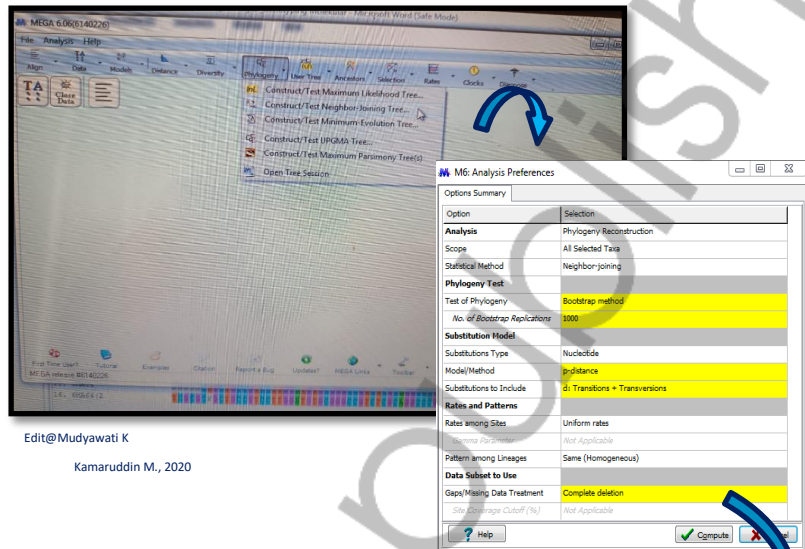
Evaluasi pohon filogenetika berkaitan dengan uji reliabilitas dari sebuah pohon dan uji topologi antara dua atau lebih pohon yang berbeda berdasarkan set data yang sama. Banyak metode telah dikembangkan untuk menguji reliabilitas, di antaranya yaitu *interior branch test* (IB) dan *Felsenstein's bootstrap test* (FB).

Prinsip IB adalah estimasi pohon dengan menguji reliabilitas setiap cabang sebelah dalam (*interior branch*). Pada FB, reliabilitas diuji dengan menggunakan metode *Efron's bootstrap*. Sebuah set dari *site* basa nukleotida dicuplik secara acak yang dilakukan secara berulang, kemudian dilakukan konsensus, sehingga hanya satu pohon filogenetika yang dihasilkan. Karena pada dasarnya pola perubahan basa nukleotida sangat rumit dan sering berubah sejalan dengan waktu evolusi, metode FB sangat baik digunakan dalam mengevaluasi pohon filogenetika.

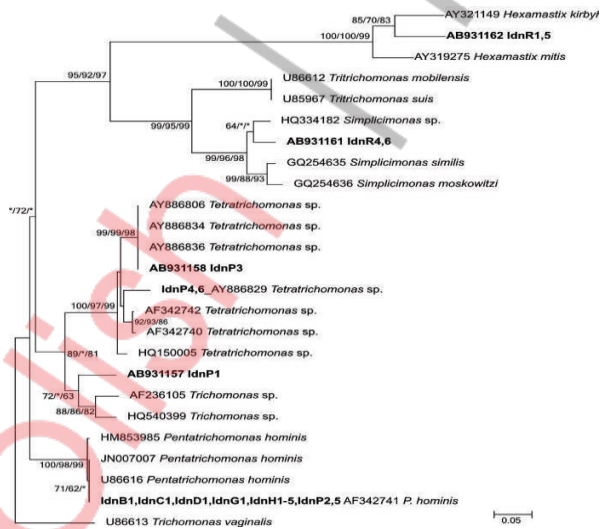
Cara membuat pohon filogenetik, pada layar **Alignment Explorer** (*sequence fasta*) dan klik **Data** kemudian klik **Phylogenetic Analysis**.



Pilih jenis analisis dengan memindahkan kursor ke kolom masing-masing (**Model**, **Diversity**, **User Tree**, **Distance**, **Phylogeny**, **Ancestor**, dan lain-lain) atau lompat ke kolom berisi analisis yang diinginkan. Pada *Phylogeny* misalnya dengan menekan *Construct/test Neighbour-Joining Tree*, akan diproses dan menampilkan hasil pohon filogenetik (Gambar 18).



Edit@Mudyawati K
Kamaruddin M., 2020



Gambar 18. Rekonstruksi pohon filogenetik *neighbor-joining* menggunakan lokus ITS.8SrRNA/ITS2 spesies Trichomonad menghasilkan sejumlah 204 basa nukleotida. Nilai pada node 1000 ulangan *bootstrap*, yang disimpulkan dari analisis komparatif *maximum likelihood* (ML), *maximum parsimony* (MP) dan *neighbor-joining* (NJ). *Bootstrap support* kurang dari 60% ditandai dengan asterisk. Termasuk *Trichomonas vaginalis* sebagai *out-group* (Kamaruddin M. et al., 2014).

Data hasil dari penelitian ini kemudian dianalisis dengan menggunakan beberapa aplikasi. Urutan *contig* dianalisis menggunakan program MEGA VI dengan Kimura-2 parameter model dan di-*contig* antara sekuens *forward* dan *reverse* sebagai sekuens sampel, identifikasi *alignment* menggunakan *Codoncode Aligner*. Sedangkan hasil dari *contig* kemudian diidentifikasi molekuler menggunakan BLAST melalui National Center for Biotechnology Information (NCBI), akan muncul 100 spesies yang memiliki *percent identity* atau kemiripan dengan sampel dan diambil 10 spesies dengan *percent identity* di atas 85% untuk di-*alignment* kembali. Hasil *alignment* kemudian dikonstruksi pohon menggunakan *Neighbor Joining* (NJ) dan Kimura-2 parameter dengan 1000 ulangan *bootstrap* (Gambar 18).

5

Penutup

Studi identifikasi molekuler telah memberikan gagasan baru tentang infeksi dan zoonosis melalui analisis filogenetik. Filogenetik molekuler merupakan teknik kombinasi biologi molekuler dan statistik dalam merekonstruksi hubungan filogenetika. Pemikiran dasar penggunaan sekuens DNA dalam studi filogenetika adalah bahwa terjadi perubahan basa nukleotida menurut waktu, sehingga akan dapat diperkirakan kecepatan evolusi yang terjadi dan akan dapat direkonstruksi hubungan evolusi antara satu kelompok organisme dengan yang lainnya. Berdasarkan analisis filogenetik ini memberikan pengetahuan baru bahwa spesies Trichomonad yang biasanya diketahui menginfeksi burung dan mamalia domestik telah diidentifikasi juga dalam sampel klinis manusia.

Monograf ini hadir untuk menjelaskan penemuan dari hasil penelitian terhadap hewan-hewan yang hidup di sekitar manusia dan interaksi antara hewan tersebut dengan manusia melalui kontak spesies Trichomonad yang diperoleh dari sampel hewan dan manusia. Selain itu, memberikan informasi penggunaan sekuens DNA sebagai unit dasar informasi yang mengkode organisme yang dapat menggabungkan informasi mengenai proses evolusi dan hubungan suatu kelompok organisme, sehingga penyakit zoonosis mudah terpantau.

DAFTAR PUSTAKA

- Adl SM., 2012. The revised classification of eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.* 59, 429-493
- Alsmark C, et al., 2013. Patterns of prokaryotic lateral gene transfers affecting parasitic microbial eukaryotes. *Genome Biol.* 14, R19
- Amin A, et al., 2014. Trichomonads in birds-a review. *Parasitology* 141, 733-747.
- Carlton JM, et al. 2007. Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science* 315, 207-212.
- Cascio A, et al., 2011. The socio-ecology of zoonotic infections. *Clin. Microbiol. Infect.* 17, 336-342.
- Cepicka I, Hampl V, Kulda J. Critical taxonomic revision of Parabasalids with description of one new genus and three new species. *Protist* 2010; 161: 400-433.
- Dharmayanti. *Filogenetika Molekuler: Metode Taksonomi Organisme Berdasarkan Sejarah Evolusi.* 2012; 1-21.
- Duboucher C, et al. 1995. Salivary Trichomoniasis. A case report of infestation of a submaxillary gland by *Trichomonas tenax*. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 119. 277-279.
- Duboucher C, et al. 2006. Molecular identification of *Tritrichomonas foetus*-like organisms as coinfecting agents of human *Pneumocystis pneumonia*. *J. Clin. Microbiol.* 44, 1165-1168.
- Engsborg AL, et al., 2014. Prevalence, incidence, and risk factors of intestinal parasites in Danish primary care patients with irritable bowel syndrome. *Scand. J. Infect. Dis.* 46, 204-209.
- Fastring DR, et al. 2014. Co-occurrence of *Trichomonas vaginalis* and bacterial vaginosis and vaginal shedding of HIV-1 RNA. *Sex. Transm. Dis.* 41, 173-179.

<https://www.jurnalnews.com/2023/01/24/genomic-surveillance-pengawasan-terhadap-mutasi-gen-dan-dukungan-lingkungan-dalam-pencegahan-penyebaran-covid-19-di-indonesia/>

- Hariri MR, Peniwidyanti, Irsyam ASD, Irwanto RR, Martiansyah I, Kusnadi, Yuhaeni E. 2021. Molecular Identification and Morphological Characterization of Ficus Sp. (Moraceae) In Bogor Botanic Gardens. *Jurnal Biodjati*. 6(1):36-44.
- Hirt RP. 2013. Trichomonas vaginalis virulence factors: an integrative overviews. *Sex. Transm. Infect.* 89, 439-443.
- James SA, MD. Collins, IN. Roberts. 1996. Use of an r-RNA Internal Transcribed Spacer of The Genera Zygosaccharomyces and Torulaspora. *International Journal of Systematic Bacteriology*. Vol. 46. No.1: 189-194.
- Jones KE, et al. 2008. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451, 990-993
- Letchuman S. 2018. Shoet Introduction of DNA Barcoding. *International Journal of Research*, 05(04), 673-686.
- Maritz JM, Land KM, Carlton JM, Hirt RP. 2014. What is the importance of zoonotic Trichomonads for human health? *Trends Parasitol.* 30(7): 333-341.
- Mudyawati K, Ei K, Din S, Masaharu T. 2012. Opportunistic Intestinal Parasitic Infection in HIV Positive Patients in Bali, Indonesia. The 6th Nagasaki symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases; The 11th Nagasaki-Singapore Medical Symposium, Nagasaki Japan.
- Mudyawati K, and Masaharu T. 2012. Impact of Intestinal Protozoan Parasites as Opportunistic Infections in HIV Patients. APCPZ Symposium, Kobe Japan.
- Mudyawati K. 2020. Genomic surveillance: Genetic drift and environmental spreading dynamic of COVID-19 in Indonesia. Materi Webinar IKABIO-Universitas Hasanuddin.
- Keusch GT, Pappaioanou M, Gonzalez MC, et al., 2009. Sustaining Global Surveillance and Response to Emerging Zoonotic Diseases.

- National Research Council (US) Committee on Achieving Sustainable Global Capacity for Surveillance and Response to Emerging Diseases of Zoonotic Origin; Washington (DC): [National Academies Press \(US\)](#).
- Kissinger P, and Adamski A. 2013. Trichomoniasis and HIV interactions: A review. *Sex. Transm. Infect.* 89, 426-433.
- Lloyd-Smith JO, et al. 2009. Epidemic dynamic at the human-animal interface. *Science* 326, 1362-1367.
- Reed DL, et al. 2011. The evolution of infectious agents in relation to sex in animals and humans: brief discussions of some individual organisms. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1230, 74-107.
- Sun, Y, et al. 1994. Phylogenetic Analysis of Sorghum and Related Taxa Using Internal Transcribed Spacer of Nuclear Ribosomal DNA. *Theor Appl Genet*, 89: 26-32.
- Takono, A, & Okada. 2002. Multiple occurrences of triploid formation of *Gobba atrosanguinea* from Sumatra, *Indonesia*. *Nordic Journal of Botany*, 21(2) 161-164.
- Yen, SW, Jean, TP, Kiaw, N, Othman, AS, Bon, LL, Ahmad, Boye. 2013. Phylogeny of *Asean Homalomena* (Araceae) based on ITS Region Combined with Morphological and Chemical Data. *American Society of Taxonomists*.
- Wolfe ND, et al., 2007. Origins of major human infectious diseases. *Nature* 447, 279-283.
- Zubacova Z, et al. 2008. Comparative analysis of Trichomonad genome sizes and karyotypes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 161, 49-54.

GLOSARIUM

- Clade* : Suatu kelompok taksonomi yang berasal dari satu leluhur yang sama.
- Dysbiosis : ketidakseimbangan mikrobiota (populasi mikroba di bagian tubuh tertentu dari hewan inang) yang menyebabkan, atau predisposisi, inang terhadap kondisi penyakit.
- Emerging Infectious Disease*: wabah penyakit yang sebelumnya tidak diketahui atau penyakit yang diketahui yang menunjukkan peningkatan insiden, perluasan jangkauan geografis, atau menyebar ke populasi baru. Infeksi yang muncul dapat disebabkan oleh agen infeksi yang sebelumnya tidak diketahui atau tidak terdeteksi, *strain* yang baru berevolusi, perubahan lingkungan, dan perubahan demografi manusia.
- Filogenetik : hubungan kekerabatan
- Genom : Keseluruhan materi genetik yang terdapat pada organisme.
- Hospes/Inang perantara: hospes di dalam atau di mana patogen menghabiskan sebagian hidupnya, biasanya masa transisi, tetapi tidak mencapai kematangan seksual.
- Insiden penyakit : jumlah kasus penyakit baru yang terjadi pada suatu populasi selama periode waktu tertentu (biasanya per tahun).
- Komensal: Bentuk simbiosis antara dua organisme di mana yang satu mendapat manfaat, sedangkan yang lain tidak terpengaruh. Beberapa trikomonad usus dianggap mewakili komensal.
- Mutualisme (mutualis): suatu bentuk simbiosis antara dua organisme di mana keduanya mendapat manfaat dari hubungan

- tersebut. Beberapa parabasalida usus dari rayap dianggap mewakili mutualis.
- Oportunistik : patogen potensial yang biasanya tidak menyebabkan penyakit pada pejamu yang sehat, tetapi dalam situasi tertentu dapat menyebabkan penyakit, misalnya, karena sistem kekebalan tubuh yang lemah (misalnya, disebabkan oleh AIDS, kemoterapi, atau kekurangan gizi) pejamu. Trichomonad paru-paru mewakili kemungkinan infeksi oportunistik—lihat teks utama.
- Parasit (parasit) : simbiosis non-mutual antara dua spesies di mana satu, parasit, mendapat manfaat dengan mengorbankan yang lain, tuan rumah. Parasit biasanya tidak membunuh inang mereka tetapi mengeksploitasi mereka untuk sumber daya yang diperlukan untuk kelangsungan hidup mereka. Parasit obligat tidak dapat menyelesaikan siklus hidupnya dan bereproduksi tanpa inang yang cocok.
- Patogen (patogen) : istilah luas yang mengacu pada kemampuan suatu organisme untuk menyebabkan penyakit. Ini biasanya digunakan untuk menggambarkan agen infeksius atau mikroorganisme, seperti bakteri, protes, virus, dan lain-lain yang menyebabkan penyakit pada inangnya.
- Patogenisitas : kemampuan patogen untuk mengatasi pertahanan inang dan menyebabkan penyakit.
- Penyakit menular yang muncul kembali: munculnya kembali penyakit menular yang diketahui secara historis setelah penurunan insiden yang signifikan. Resistensi yang didapat dari patogen terhadap obat antimikroba merupakan faktor penting dalam munculnya kembali banyak penyakit. Contohnya termasuk

- virus West Nile, kolera, MRSA (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*).
- Penularan : perpindahan agen infeksius dari satu hospes ke hospes lain. Rute transmisi langsung meliputi: kontak fisik, kontak dengan lingkungan atau permukaan yang terkontaminasi, transmisi melalui udara, dan transmisi fecal-oral. Rute transmisi tidak langsung melibatkan organisme lain seperti vektor serangga atau inang perantara.
- Pellet : Bagian endapan hasil sentrifugasi pada sampel.
- Potensi zoonosis : potensi menularnya penyakit satwa liar atau hewan peliharaan ke manusia.
- Purifikasi : Pemurnian
- Reservoir : habitat atau hospes yang menampung agen infeksius, di mana ia dapat hidup, tumbuh, dan berkembang biak. Reservoir dapat mencakup manusia, hewan, dan berfungsi sebagai sumber potensi wabah penyakit.
- Simbiosis : hubungan dekat dan jangka panjang antara dua atau lebih spesies biologis yang berbeda. Hubungan ini dapat bersifat obligat atau fakultatif, mutualistik, komensalistik, atau parasit.
- Similaritas : Derajat kesamaan
- Supernatan : Bagian atas yang berupa cairan hasil sentrifugasi pada sampel.
- Thawing* : Perubahan dari kondisi membeku atau dingin kemudian dilelehkan atau dipanaskan.
- Vektor : organisme yang membawa dan menularkan patogen dari individu yang terinfeksi ke individu lain.
- Virulensi : sifat patogen, seperti elemen struktural spesifik atau senyawa biokimia yang biasa disebut faktor virulensi yang menyebabkan penurunan kebugaran

inang atau kerusakan inang. Sekarang diketahui bahwa virulensi bersifat multifaktorial dan melibatkan karakteristik patogen dan inangnya, yang memengaruhi hasil interaksi mereka dan karenanya virulensi yang diamati (misalnya, patogen oportunistik pada pasien imunokompromais).

Zoonosis : organisme menular, seperti bakteri, virus, parasit, atau jamur, dapat ditularkan antara satwa liar atau hewan peliharaan dan manusia. Contohnya meliputi: (i) bakteri penyakit Lyme *Borrelia* yang ditularkan ke manusia melalui kutu dari reservoir alami pada hewan pengerat; (ii) parasit malaria *Plasmodium knowlesi* yang ditularkan oleh vektor *Anopheles* yang menyebabkan malaria pada monyet dan manusia; dan (iii) *Cryptosporidium parvum*, parasit yang ditemukan pada kucing, anjing, dan hewan ternak dan ditularkan sebagai kista dalam air, makanan, atau melalui rute feses-oral yang terkontaminasi.

INDEKS

A

AIDS, 4, 13, 14, 15, 57
Alignment, 41, 42, 49
ARDS, xii, 11, 14

C

Cryptosporidium parvum, 59

D

Dientamoeba fragilis, 5, 10, 12, 13
DNA, vi, viii, x, xii, 6, 7, 9, 20, 21, 27, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 46, 47, 52, 54, 55
Dysbiosis, 56

E

Elektroforesis, vi, 32, 33
Emerging Infectious Diseases, xi, 54

F

Filogenetik, vii, 39, 41, 52, 56

G

Genotyping, i, iii, v

H

HIV, 4, 12, 17, 53, 54, 55

I

Internal Transcribed Spacer, vi, xii, 6, 21, 30, 54, 55

K

Karakterisasi, i, iii, v, vi, 23

M

MEGA, 42, 51
Molekular, i, iii, v, vi, vii, viii, 23, 39, 40, 41

O

Oportunistik, 57

P

Parasit, 1, 57
Patogenitas, 57

PCR, vi, ix, x, xii, 7, 13, 14, 22, 27,
29, 31, 32, 33, 34, 38

Pentatrachomonas hominis, 5,
10, 12, 14, 30, 37

Penularan, 2, 58

Plasmodium knowlesi, 59

R

Reservoir, 58

S

SARS, xii, 3

Scanning Electron Microscope,
25

Simbiosis, 58

T

Tetratrachomonas gallinarum, 6,
10, 12, 14, 16

Trichomonad, i, iii, v, vi, viii, ix, x,
1, 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 13, 15,
18, 19, 23, 24, 25, 26, 30, 31,
33, 37, 50, 52, 55, 57

Trichomonas tenax, 6, 10, 12, 13,
53

Trichomonas vaginalis, x, 5, 10,
12, 13, 50, 53, 54

Tritrichomonas foetus, 6, 11, 12,
15, 53

Trofozoit, 27

Z

Zoonosis, i, iii, v, vi, 10, 19, 59

CATATAN

