

## **Sensitivitas Probe Sag 1 dan Bag 1 untuk Deteksi *Toxoplasma gondii* pada Ayam Buras**

### **The Sensitivity of Sag 1 and Bag 1 Probes to Detect *Toxoplasma gondii* in The Free-Rearing Chicken**

**Ida Ayu Pasti Apsari<sup>1</sup>, Wayan Tunas Artama<sup>2</sup>, Sumartono<sup>3</sup>, I Made Damriyasa<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Bagian Parasitologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana, Bali

<sup>2</sup>Bagian Biokimia, Fakultas kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

<sup>3</sup>Bagian Parasitologi Fakultas kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

<sup>4</sup>Bagian Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana, Bali

Email : iapapsari@yahoo.co.id

#### **Abstract**

This study was aimed to determine the sensitivity of Sag1 and Bag1 Probe to detect *Toxoplasma gondii* in free-rearing chicken using dot blot hybridization method. Thirty serologically free-rearing chicken toxoplasmosis DNA were used as samples in this study. Sag1 and Bag1 probes were labeled by non-radioactive Dig-11-dUTP. The success of detection was based on the establishment of colored dot on the nylon membrane after detected with antibody-antiDig. The Sensitivity test of Sag1 and Bag1 probes in detection were conducted by making serial dilutions of the dot blot hybridization positive free-rearing chicken DNA. The results showed that 19 positive samples detected by Sag1 and Bag1 probe by dot blot hybridization method. The sensitivity of 5.87 pg/μl Bag1 probe to detect free-range chicken DNA was 0.23 ng/μl, and sensitivity of 6.72 pg/μl Sag1 Probe was 0.45 ng/μl. From the results above it can be concluded that the Bag1 probe was more sensitive than that of the Sag1 probe to detect *Toxoplasma gondii* of free-range chicken DNA.

**Keywords :** *Toxoplasma gondii*; Sag1 and Bag1 Probe; Dig-11-dUTP; free-rearing chicken

#### **Abstrak**

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan sensitivitas *Probe Sag1* dan *Bag1* dalam mendeteksi *Toxoplasma gondii* pada ayam buras menggunakan metode *hibridisasi dot blot*. Sejumlah 30 DNA ayam buras secara serologis terdeteksi toksoplasmosis, digunakan sebagai sampel pada penelitian ini. *Probe Sag1* dan *Bag1* dilabel *Dig-11-dUTP*. Keberhasilan deteksi berdasarkan terbentuknya *dot* berwarna pada membran nylon yang dideteksi dengan antibodi-antiDig. Sensitivitas *Probe Sag1* dan *Bag1* dalam mendeteksi *Toxoplasma gondii* dilakukan dengan pembuatan serial pengenceran DNA ayam buras yang positif terdeteksi dengan *hibridisasi dot blot*. Hasil penelitian menunjukkan 19 sampel positif terdeteksi oleh *Probe Sag1* dan *Bag1*. Sensitivitas *Probe Bag1* 5,87 pg/μl mampu mendeteksi 0,23 ng/μl DNA ayam buras, sedangkan *Probe Sag1* 6,72 pg/μl mampu mendeteksi 0,45 ng/μl DNA ayam buras. Simpulan bahwa *Probe Bag1* lebih sensitif dari *Probe Sag1* dalam mendeteksi *Toxoplasma gondii* pada ayam buras.

**Kata kunci :** *Toxoplasma gondii*, hibridisasi, Sag1 dan Bag1, *Dig-11-dUTP*, ayam buras.

## Pendahuluan

Diagnosis merupakan salah satu tahapan yang penting dalam penanganan toksoplasmosis. Banyak metode yang dapat dilakukan untuk diagnosis toksoplasmosis, seperti diagnosis pada level molekuler dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Susanto dkk., 2002; Priyowidodo, 2003). Walaupun memberi hasil yang sangat spesifik, metode PCR ini membutuhkan biaya mahal dan memerlukan peralatan khusus. Diagnosis berdasar gejala klinis toksoplasmosis tidak menunjukkan gejala yang spesifik (Bastien, 2002), sementara dengan uji biologis, metode ini tidak praktis karena memerlukan waktu lama. Berdasar beberapa metode diatas, perlu diupayakan membuat metode diagnosis yang sensitif dan akurat namun sederhana tidak memerlukan peralatan yang canggih.

Diagnosis suatu penyakit, secara *bioassay* dan serologis maupun molekuler masing-masing mempunyai kelemahan yang dapat menjadi kendala dalam hal interpretasi hasil. Mengatasi masalah tersebut, maka metode teknik hibridasi dengan *DNA probe* perlu dikembangkan (Weiss, 1995, Akin, 2001, Aidawati dkk., 2007, Sarova dan Saigopal, 2010).

*Probe* adalah molekul yang hanya dapat bereaksi secara kuat dengan molekul targetnya. Ikatan ini sama seperti interaksi antigen-antibodi, avidin-biotin, latex-karbohidrat dan interaksi untai tunggal dengan komplementernya, seperti ikatan antara G=C atau A=T (Keller dan Manak, 1989). *Deoxyribonucleic acid Probe* panjangnya relatif kecil (10 – 1000 basa), dan molekulnya *single stranded DNA* yang dapat mengenali dan terikat

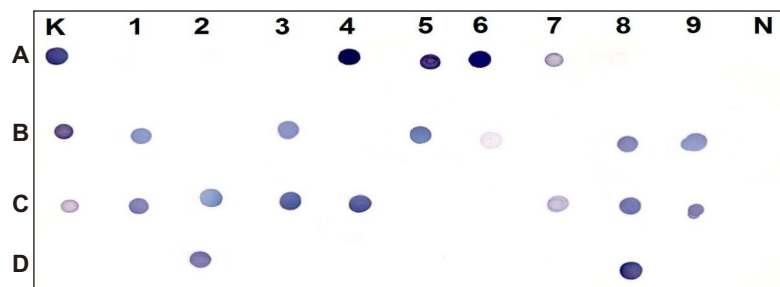
pada segmen komplementer DNA dari molekul DNA yang besar. *Deoxyribonucleic acid probe* bereaksi sangat spesifik dengan sekuen DNA target (Alcama, 2001).

Penggunaan *DNA Probe* untuk deteksi parasit dilakukan dengan pemberian label pada *probe* tersebut. Target sekuen parasit dilinierisasi lebih dahulu, lalu dihibridisasikan dengan *probe* yang telah terlabel (Weiss, 1995). Tanda positif (terjadi hibridasi) terbaca atas peran molekul label yang berikatan dengan sekuen target dalam membran kertas saring, membran *nitroselulose* atau nilon (Weiss, 1995; Herzer dan Englert, 2001). Penggunaan label non radioaktif, seperti biotin, digoxigenin-dUTP, fosfatase alkali banyak dipilih, karena lebih aman dan stabil (Weiss, 1995; Indri, 1999; Yuwono, 2006). Digoxigenin-dUTP lebih banyak digunakan karena molekul ini didapat dari tanaman *Digitalis* sehingga lebih bersifat alamiah. Demikian pula dengan label digoxigenin-dUTP ini lebih sedikit diperlukan DNA dalam optimalisasi hibridasi pada metode *dot blot* yang mampu membentuk *dot* lebih jelas pada membran (Yang dkk., 1999; Herzer dan Englert, 2001; Kruchen dan Rueger, 2001).

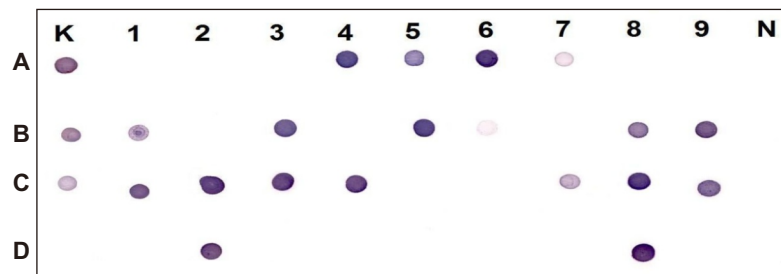
Keller dan Manak (1989) menyatakan bahwa suatu gen dapat digunakan sebagai *probe* jika memenuhi beberapa syarat antara lain : panjang nukleotida harus diantara 100 -300 basa. *Probe* yang lebih panjang akan mengakibatkan waktu hibridasi lebih lama, sedangkan bila terlalu pendek akan menurunkan spesifitasnya. Sumartono dkk., (2005) dan Sumartono dkk., (2007) menggunakan DNA probe dengan panjang 54 bp dan 80 bp berhasil mendeteksi DNA komplementernya dalam sampel. Demikian pula Pratama (2009)

menggunakan *probe toxo*-103 bp berhasil mendeteksi DNA komplementernya dalam sampel. Sementara Samuelson dkk. (1989) dengan sequen *clone* rekombinan *Entamoeba histolitica* dengan panjang 145 bp berhasil membuat *probe* untuk diagnosis parasit Entamoeba. Sebelumnya Palmer dkk. (1991) menggunakan fragmen DNA 5 kb sebagai *probe* berhasil melakukan *colony hybridization* dengan genom komplementernya. Komposisi basa G dan C harus jumlahnya antara 40 – 60%, karena bila persentase diluar kisaran tersebut akan menyebabkan hibridasi tidak kuat. Hal yang harus dihindari pula yaitu sekuen yang mengandung empat atau lebih basa yang sama secara berurutan, misalnya AAAA, GGGG atau yang lain. *DNA probe* harus bebas dari sekuen gena hospes, agar tidak terjadi *false positif* (Brown, 2000; Yuwono, 2006).





Gambar 1. Deteksi *Toxoplasma gondii* pada sampel DNA ayam buras berasal dari 9 kabupaten di Bali menggunakan Probe Sag-1 konsentrasi 6,72 pg/ $\mu$ l dengan metode Hibridisasi *Dot Blot*. Keterangan : K.DNA Takizoit, (A) konsentrasi 1433,3 ng/ $\mu$ l, (B) konsentrasi 143,3ng/ $\mu$ l, (C) konsentrasi 14,33ng/ $\mu$ l,(D) blanko **1**.DNA ayam Badung, (1A)DNA ayam Bdg.6, (1B).DNA ayam Bdg.7, (1C).DNA ayam Bdg.13, (1D).DNA ayam Bdg.17. **2**.DNA ayam Bangli, (2A).DNA ayam Bgl.2, (2B).DNA ayam Bgl.5, (2C).DNA ayam Bgl.20, (2D).DNA ayam Bgl.23, **3**.DNA ayam Buleleng, (3A)DNA ayam Bll.3, (3B).DNA ayam Bll.8, (3C).DNA ayam Bll.22, **4**.DNA ayam Denpasar, (4A).DNA ayam Dps.2, (4B).DNA ayam Dps.10, (4C).DNA ayam Dps.17, **5**.DNA ayam Gianyar, (5A).DNA ayam Gyr.10, (5B).DNA ayam Gyr.13, (5C).DNA ayam Gyr.18, **6**.DNA ayam Karangasem, (6A).DNA ayam KA.5, (6B).DNA ayam KA.17, (6C).DNA ayam KA30, **7**.DNA ayam Klungkung, (7A).DNA ayam Klk.4, (7B).DNA ayam Klk.13, (7C).DNA ayam Klk.19, (7D).DNA ayam Klk.23, **8**.DNA ayam Negara, (8A).DNA ayam Ngr.2, (8B).DNA ayam Ngr.10, (8C).DNA ayam Ngr.17, (8D).DNA ayam Ngr.24, **9**.DNA ayam Tabanan, (9A).DNA ayam Tbn.4, (9B).DNA ayam Tbn.6, (9C).DNA ayam Tbn.11, N. DNA mencit sehat



Gambar 2. Deteksi *Toxoplasma gondii* pada sampel DNA ayam buras berasal dari 9 kabupaten di Bali menggunakan Probe Bag-1 konsentrasi 5,87 pg/ $\mu$ l dengan metode Hibridisasi *Dot Blot*. Keterangan : K.DNA Takizoit, (A) konsentrasi 1433,3 ng/ $\mu$ l, (B) konsentrasi 143,3ng/ $\mu$ l, (C) konsentrasi 14,33ng/ $\mu$ l, (D) blanko. **1.**DNA ayam Badung, (1A)DNA ayam Bdg.6, (1B).DNA ayam Bdg.7, (1C).DNA ayam Bdg.13, (1D).DNA ayam Bdg.17. **2.**DNA ayam Bangli, (2A).DNA ayam Bgl.2, (2B).DNA ayam Bgl.5, (2C).DNA ayam Bgl.20, (2D).DNA ayam Bgl.23, **3.**DNA ayam Buleleng, (3A)DNA ayam Bll.3, (3B).DNA ayam Bll.8, (3C).DNA ayam Bll.22, **4.**DNA ayam Denpasar, (4A).DNA ayam Dps.2, (4B).DNA ayam Dps.10, (4C).DNA ayam Dps.17, **5.**DNA ayam Gianyar, (5A).DNA ayam Gyr.10, (5B).DNA ayam Gyr.13, (5C).DNA ayam Gyr.18, **6.**DNA ayam Karangasem, (6A).DNA ayam KA.5, (6B).DNA ayam KA.17, (6C).DNA ayam KA30, **7.**DNA ayam Klungkung, (7A).DNA ayam Klk.4, (7B).DNA ayam Klk.13, (7C).DNA ayam Klk.19, (7D).DNA ayam Klk.23, **8.**DNA ayam Negara, (8A).DNA ayam Ngr.2, (8B).DNA ayam Ngr.10, (8C).DNA ayam Ngr.17, (8D).DNA ayam Ngr.24, **9.**DNA ayam Tabanan, (9A).DNA ayam Tbn.4, (9B).DNA ayam Tbn.6, (9C).DNA ayam Tbn.11, N. DNA mencit sehat

Hasil deteksi *Toxoplasma gondii* sampel DNA ayam buras menggunakan *Probe Sag-1* dan *Bag-1* dengan hibridisasi *dot blot*, seperti disajikan pada Gambar 1 dan 2. Ternyata *Probe Sag1* dan *Bag1* sangat spesifik dapat mendeteksi *Toxoplasma gondii* pada ayam buras. Kedua *probe* yang digunakan untuk mendeteksi (*Probe Sag-1* dan *Bag-1*) pada 30 sampel DNA, dapat terdeteksi 19 (63,3%) DNA positif pada hibridisasi *dot blot*. Jadi dengan

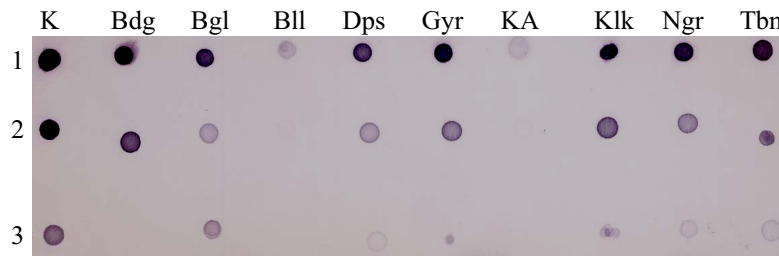
pengenceran 1000 x *Probe Sag1* (6,72 pg/ $\mu$ l) dan *Bag1* (5,87 pg/ $\mu$ l) spesifik dapat mendeteksi *Toxoplasma gondii* 63,3 % dari sampel lapangan pada ayam buras.

Uji sensitivitas *probe Sag1* dan *Bag1* dalam mendeteksi *Toxoplasma gondii* dilakukan pembuatan serial pengenceran pada DNA sampel ayam yang positif terdeteksi pada hibridisasi *dot blot*. Serial pengenceran seperti disajikan pada Tabel 1.

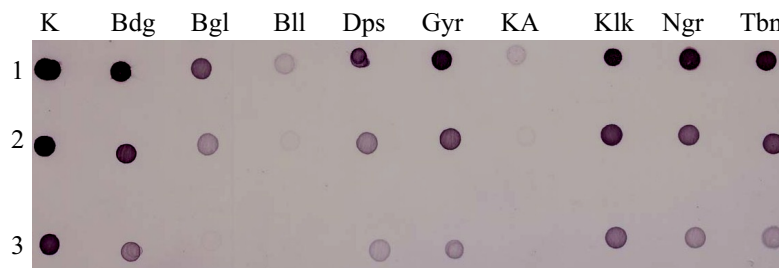
Tabel 1. Serial Pengenceran DNA sampel Ayam Buras

Pengen cer	Faktor pengenc eran	DNA dengan konsentrasi ng/ $\mu$ l								
		Bdg	Bgl	Bll	Dps	Gyr	KA	Klk	Ngr	Tbn
1	1 : 1	240	135	60	173	68	30	278	165	173
2	1 : 3	80	45	20	57,67	22,67	10	92,67	55	57,67
3	1 : 30	8,0	4,5	2,0	5,77	2,27	1,0	9,27	5,5	5,77
4	1 : 300	0,80	0,45	0,20	0,576	0,23	0,10	0,93	0,55	0,58

Keterangan : Bdg. DNA ayam Badung, Bgl.DNA ayam Bangli, Bll. DNA aya Buleleng, Dps. DNA ayam Denpasar, Gyr. DNA ayam Gianyar, KA, DNA ayam Karangasem, Klk. DNA ayam Klungkung, Ngr. DNA ayam Negara, Tbn. DNA ayam Tabanan.



Gambar 3. Deteksi *Toxoplasma gondii* pada sampel DNA ayam buras dengan berbagai serial pengenceran dan deteksi kuantifikasi hibridisasi dot blot dengan **Probe Sag-1**. Keterangan : 1.serial pengenceran 3x, 2.serial pengenceran 30x, 3 serial pengenceran 300x, Bdg.DNA ayam Badung, Bgl. DNA ayam Bangli, Bll. DNA ayam Buleleng, Dps. DNA ayam Denpasar, Gyr. DNA ayam Gianyar, KA.DNA ayam Karangasem, Klk. DNA ayam Klungkung, Ngr. DNA ayam Negara, Tbn. DNA ayam Tabanan



Gambar 4. Deteksi *Toxoplasma gondii* pada sampel DNA ayam buras dengan berbagai serial pengenceran dan deteksi kuantifikasi hibridisasi dot blot dengan **Probe Bag-1**. Keterangan : 1.serial pengenceran 3x, 2.serial pengenceran 30x, 3 serial pengenceran 300x, Bdg. DNA ayam Badung, Bgl. DNA ayam Bangli, Bll. DNA ayam Buleleng, Dps. DNA ayam Denpasar, Gyr. DNA ayam Gianyar, KA.DNA ayam Karangasem, Klk. DNA ayam Klungkung, Ngr. DNA ayam Negara, Tbn. DNA ayam Tabanan

*Probe Sag-1* dan *Bag-1* sangat spesifik (63,3%) dapat mendeteksi *Toxoplasma gondii* pada sampel DNA ayam buras dengan hibridisasi dot blot seperti disajikan pada Gambar 1 dan 2. Setelah dilakukan uji kuantifikasi ternyata *Probe Sag-1* sensitif deteksi DNA ayam buras sampai konsentrasi 0,45 ng/ $\mu$ l (Gambar 3), sedangkan *probe Bag-1* mampu deteksi sampai konsentrasi 0,23 ng/ $\mu$ l (Gambar 4). Hasil ini ternyata 5,87 pg/ $\mu$ l *Probe Bag-1* mampu mendeteksi sampai 0,23 ng/ $\mu$ l DNA ayam buras, yang lebih sensitif dari 6,72 pg/ $\mu$ l *Probe Sag-1* mampu mendeteksi 0,45 ng/ $\mu$ l DNA ayam.

Hasil ini sebagai indikasi bahwa *Probe Bag-1* lebih sensitif untuk mendeteksi DNA stadium bradizoit *T. gondii* yang ada pada sampel lapangan. Sampel lapangan berasal dari organ jantung dan otak ayam buras, yang mana jantung dan otak merupakan

jaringan muscular dan neural yang menjadi kecenderungan tempat sista lebih banyak ada dengan stadium bradizoit di dalamnya (Weiss dan Kim, 2000).

Sesuai implementasi penggunaan metode hibridisasi dot blot untuk diagnosis suatu penyakit di lapangan, bahwa metode hibridisasi dot blot lebih sensitif dari pada uji komersial dalam mendiagnosis bovine spongiform encephalitis (Polak dkk., 2003). Hal yang sama juga oleh Mudenda dkk, (2011) dengan menggunakan metode yang sama dalam mendeteksi *Salmonella Inv.A* dan *Inv.C* dari sampel lapangan, lebih sensitif daripada teknik culture.

Sensitivitas sampai 0,45 ng/ $\mu$ l untuk *Probe Sag1* dan 0,23 ng/ $\mu$ l untuk *Probe Bag1* mampu mendeteksi DNA ayam buras dengan metode hibridisasi dot blot.

Disarankan menggunakan *Probe Sag1* dan *Bag1* dengan metode hibridisasi *dot blot* untuk melakukan deteksi *Toxoplasma gondii* pada sampel lapangan dari ayam buras.

### Ucapan Terima Kasih

Terimakasih kepada Prof. Dr. drh. I Gst. Kade Mahardika selaku Kepala Laboratorium Biomedik FKH-UNUD dan Dr. drh. Rini Widayanti, MP selaku Kepala Laboratorium Biokimia FKH-UGM atas fasilitas penggunaan lab selama penelitian ini berlangsung. Demikian pula pada semua pihak yang ikut terlibat pada penelitian ini terimakasih atas bantuannya.

### Daftar Pustaka

- Aidawati, N., Hidayat, S.H., Hidayat, P., Suseno, R. and Sujiprihati, S. (2007) Response of Various Tomato Genotypes to Begomovirus Infection and Its Improved Diagnostic. *Hayati J. Bioscience*. 14 : 93-97.
- Ajioka J.W., Fitzpatrick, J.M. and Reitter, C.P. (2001) *Toxoplasma gondii* genomic : shedding lighth on Pathogenesis and Chemothe. raphy. Expert Review. In: *Mol. Med.* <http://www.ermm.cbcu.cam.ac.uk>. Departement of Pthology. University of Cambridge. Cambridge : 2 – 19.
- Akin, H.M. (2001) Penggunaan Pelacak Nonradioaktif (Digoxigeni-DNA Probe) untuk Mendeteksi Peanut Stripe Virus. *J. Hama dan Penyakit Tumbuhan Tropika*. 1: 75-79.
- Alcamo, E. (2001) *DNA Analysis and Diagnosis. In DNA Technology*. The Awesome skill. Second edition. Academic Press, Printed USA. 155-158.
- Apsari, I.A.P., Artama, W.T., Sumartono dan Damriyasa, I M. (2012) *Analisis Sekuen Sag1 dan Bag1 Takizoit Toxoplasma gondii Sebagai Kandidat Deoxyribonucleic Acid (DNA) Probe. In press.*
- Apsari, I.A.P., Artama, W.T., Sumartono dan Damriyasa, I M. (2012a) *Detection of Digoxigenin-11-dUTP Labeling Sag1 and Bag1 Toxoplasma gondii DNA Probe. In press.*
- Bastien, P. (2002) Diagnosis. Molecular diagnosis of toxoplasmosis. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* 96 : 205-215.
- Brown, T. (2000) *Hybridization Analysis of DNA Blots. Current Protocol in Molecular Biology*. 2.10.1-2.10.16. By John Willey & Sons Inc, USA.
- Chevalier, J., Yi, J., Michel, O. and Tang, X.M. (1997) Biotin and Digoxigenin as Labels for Lighth and Electron microscopy in situ hybridization probe : Where Do We Stand ?. *J. Histochem. Cytochem.* 45: 481-492.
- Herzer, S. and Englert, D.F. (2001) *Nucleic Acid Hybridization. Molecular Biology Problem Solver: A Laboratory Guide*. Willey-Liss, Inc, USA.
- Indri, S. (1999) *Hibridisasi Asam Nukleat. Dalam Biologi Molekuler Kedokteran. Ed Suhartono Taat Putra*. Airlangga University Press. : 168-172.
- Jones, D.D., Okbravi, N.; Adamson, P., Tasker, S. and Lightman, S. (2000) Comparison of PCR detection methods for B1, P30 and 18S rDNA genes of *Toxoplasma gondii* in equeous humor. *Int. Opthamol. Vis. Sci.* 41: 634-644.
- Kasper, L.H. and Boothroyd, J.C. (1993). *Toxoplasma gondii and Toxoplasmosis. In Immunology and Moleculr Biology of Parasitic Infections*. Ed by Kenneth S Warren. Blackwell Scientific Publications. Oxford. London Edinburgh, Melbourne Paris Berlin Vienna : 269-301.
- Kazemi, B., Bandepour, M., Maghen, L. and Solgi, G.H. (2007) Gene Cloning of 30 kDa *Toxoplasma gondii* tachyzoite surface antigen (SAG1). *Iranian J. Parasitol.* 2 : 1-8.
- Keller, G.H. and Manak, M.M. (1989) *DNA Probe*. Macmillan Publisher ltd., USA.



- Kruchen, B. and Rueger, B. (2003) The Dig System – Nonradioactive and Highly Sensitive Detection of Nucleic Acids. *Biochemica* 3: 13-15.
- Mudenda, H.B., William, U., James, M.C.L., Charles, M., Nayuta, I., Evans, M., Ladslav, M.; Hiroshi, I. and Emiko, I. (2011) Feasibility of using dot blot hybridization to detect Salmonella InvA, SpiC and SipC directly from clinical specimens. *African J. Microbiol. Res.* 5: 582-585.
- Nardone, R.M. (1999) *Overview of In Situ Hybridization. In Immunocytochemical Methods and Protocols.* Second eds. Edited by Lorette C Javois. Humana Press. Totowa, New Jersey : 357-363.
- Palmer, H.M., Atkinson, H.J. and Perry, R.N. (1991) The Use of DNA probe to identify *Ditylenchus dipsaci*. *Revue Nematol* 14: 625-628.
- Polak, M.W.P., Wojciech, R. and Zmudzinski, J.F. (2005) Implementation of Dot Blot in Rapid Diagnosis of BSE. *Bull. Vet. Inst. Pulawy.* 49: 263-266.
- Pratama, D.A.O.A. (2009) *Analisis Toxoplasma gondii repeat region 529 bp (NCBI Acc No AF146527) sebagai kandidat probe untuk diagnosis molekuler toksoplasmosis.* Tesis Program Studi Bioteknologi. Pasca Sarjana – UGM. Yogyakarta.
- Priyowidodo. (2003) *Kajian Metoda Diagnosis Toksoplasmosis secara Polymerase Chain Reaction (PCR) dan Pemeriksaan Hstologis.* Tesis. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. : 1-51.
- Roche. (2009) DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I. [www.roche-applied-science.com](http://www.roche-applied-science.com).
- Samuelson, J., Soto, R.A., Reed, S., Biage, F. and Wirth, D. (1989) DNA Hybridization Probe for Clinical Diagnosis of *Entamoeba histolitica*. *J.of Clin. Microbiol.* 27: 671-676.
- Sarovar, B. and Saigopal, D.V.R. (2010) *Development of Probe-base blotting technique for the detection of Tobacco streak virus. Acta Virologica.* 54: 221-234.
- Sumartono, Nurcahyo, W. dan PriyoWidodo, D. (2005) Pengembangan Probe Molekuler untuk Optimalisasi diagnosis Koksidirosis. *J.Sain Vet.* 23: 60-66.
- Sumartono, Artama, W.T., Asmara, W. dan Tabbu, C.R. (2007) Analisis kandidat probe molekuler untuk diagnosis toksoplasmosis berdasarkan fragmen sekuen repetitif genom takizoit. *Media Kedokteran Hewan* 23: 7-12.
- Susanto, L., Supali, T. dan Gandahusada, S. (2002) Penentuan konsentrasi minimal Gen B1 dan Gen P30 *Toxoplasma gondii* yang masih terdeteksi dengan reaksi Rantai Polimerase. *Makara Kesehatan* 6: 64-70.
- Weiss, J. (1995) DNA Probe and PCR for Diagnosis of Parasitic Infectious. *Clin. Microbiol.* 8: 113-130.
- Weiss, L.M. and Kim, K. (2000) The development and Biology of Bradizoite of *Toxoplasma gondii*. *Frontiers in Bioscience* 6: 391-405.
- Wu, K, Chen, X.G, Li, H., Yan, H., Yang, P.L., Lun, Z.R. and Zhu., X.Q. (2009). *Diagnosis of Human toxoplasmosis by using the rwcobinant truncated surface antigen 1 of Toxoplasma gondii.* *Diag. Microbiol. Infect. Dis.*
- Yang, H., Wanner, I.B., Roper, S.D. and Chaudhari, N. (1999) An Optimized Method for In Situ Hybridization with signal amplification hat allows the detection of Rare mRNAs. *J. Histochem. Cytochem.* 47: 431-446
- Yuwono, T. (2006) *Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction.* Edisi pertama. Penerbit Andi Yogyakarta : 1-237.
- Zhang, Y.W., Kim, K., Ma, Y.F., Wittner, M, Tanowitz, H.B. and Weiss, L.M. (1999) Disruption of *Toxoplasma gondii* bradyzoite-specific gene BAG 1 decreases in vivo cyst formation. *Mol. Microbiol* 31: 691-701.