

Detection and Identification of Blastocystis DNA in Human Fecal Samples Using Real-Time PCR (qPCR)

Siti Atika Salsabila^{1*}, Afifatul Achyar¹, Dwi Hilda Putri¹, Selvi Renita Rusjdi², Ira Wahyuni³

¹Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang, Sumatera Barat

²Fakultas Kedokteran, Universitas Andalas, Sumatera Barat

³Laboratorium Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Andalas, Sumatera Barat

*Corresponding author: sitiatika162@gmail.com

ABSTRACT. *Blastocystis* is a protozoan parasite that can live in the intestinal tracts of humans and animals. Infection with *Blastocystis* sp. can cause symptoms such as diarrhea, abdominal pain, and vomiting. *Blastocystis* exhibits high genetic variability and has been classified into 17 subtypes. Nine of these subtypes are found in humans, specifically subtype 1 through subtype 9. The purpose of this study is to detect and identify *Blastocystis* isolated from fecal samples of patients. The method used in this research is descriptive, employing real-time PCR. The human fecal samples designated for identification were coded F12, F22, F18, and F19. DNA amplification using the primer pair BL18SPPF1/BL18SR2PP indicated that the samples coded F12 and F22 tested positive for *Blastocystis* sp., with Cq values of 17.73 and 17.54 for sample F12, and 26.28 and 26.45 for sample F22, while samples F18 and F19 tested negative. Identification continued with DNA amplification using the SB83 primer specific for *Blastocystis* subtype 1 and the SB155 primer specific for *Blastocystis* subtype 2. The results showed that sample F12 was positive for both subtype 1 and subtype 2, with Cq values of 39.69 and 38.09 for *Blastocystis* subtype 1, and 36.22 and 36.10 for *Blastocystis* subtype 2.

Keywords: *Blastocystis*, Real-Time PCR

ABSTRAK. *Blastocystis* adalah parasit protozoa yang dapat hidup pada saluran usus manusia dan hewan. Infeksi *Blastocystis* sp menimbulkan gejala diare, sakit perut dan muntah, *Blastocystis* memiliki variabilitas genetik yang tinggi dan telah dikelompokkan menjadi 17 subtype. Sembilan subtype *Blastocystis* ditemukan pada manusia, yaitu subtype 1 hingga subtype 9. Tujuan penelitian ini adalah untuk mendeteksi dan mengidentifikasi *Blastocystis* yang diisolasi dari sampel fekal pasien. Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode deskriptif menggunakan real time PCR. Sampel fekal manusia yang akan diidentifikasi diberi kode F12, F22, F18 dan F19. Amplifikasi DNA menggunakan pasangan primer BL18SPPF1/BL18SR2PP menunjukkan hasil bahwa sampel dengan kode F12 dan F22 positif *Blastocystis* sp. Nilai Cq pada sampel F12 yaitu 17,73 dan 17,54, kemudian nilai Cq pada sampel F22 yaitu 26,28 dan 26,45, Sementara sampel dengan kode F18 dan F19 negatif. Proses identifikasi dilanjutkan dengan amplifikasi DNA menggunakan primer SB83 yang spesifik pada *Blastocystis* subtype 1 dan primer SB155 yang spesifik terhadap *Blastocystis* subtype 2. Hasil yang diperoleh yaitu sampel dengan kode F12 Positif subtype 1 dan Subtype 2 dengan nilai Cq *Blastocystis* subtype 1 yaitu 39,69 dan 38,09, kemudian nilai Cq *Blastocystis* subtype 2 yaitu 36,22 dan 36,10.

Kata kunci: *Blastocystis*, Real-Time PCR

1. PENDAHULUAN

Blastocystis sp. adalah infeksi parasit usus yang paling umum ditemukan di beberapa survei masyarakat dari negara-negara berkembang. Infeksi *Blastocysts* dapat menyebabkan gejala gastrointestinal, namun dapat juga menyebabkan gejala ekstraintestinal seperti urtikaria dan nyeri sendi. Infeksi *Blastocystis* dapat juga asimtomatik atau sebagai carrier (Diarthini *et al.*, 2018).

Blastocystis merupakan salah satu protozoa usus yang cukup sering ditemukan pada manusia. Secara umum prevalensi *Blastocystis* lebih tinggi pada negara berkembang dibandingkan negara maju. Infeksi *Blastocystis* dapat disebabkan oleh hygiene perorangan yang buruk, sanitasi yang tidak memadai, kontak dekat dengan hewan, mengonsumsi makanan dan air yang terkontaminasi, dan kurangnya pasokan air bersih untuk kehidupan sehari-hari (Diarthini *et al.*, 2018). Prevalensi *Blastocystis* lebih tinggi ditemukan pada orang yang menangani hewan dibandingkan dengan orang yang tidak melakukan kontak dengan hewan. Deteksi dini sangat penting dilakukan sebagai upaya pencegahan dan pengendalian zoonosis di Indonesia (Fauzi *et al.*, 2025)

Metode konvensional yang biasa digunakan untuk mendeteksi berbagai parasit usus termasuk *Blastocystis* yaitu metode parasitologi standar seperti pemeriksaan mikroskopik, kultur, dan serologi. *Blastocystis* merupakan parasit yang memiliki berbagai stadium dengan morfologi yang berbeda-beda dan masih sedikit diketahui mengenai distribusinya dalam fekal. Pemeriksaan secara molekular dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan metode diagnosis yang sensitif untuk mendeteksi keberadaan *Blastocystis*. PCR memiliki beberapa keunggulan seperti hasil dapat dianalisis dengan cepat, serta memiliki nilai sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi (>90%) (Atifah & Achyar, 2023). Keragaman genetik *Blastocystis* yang besar telah diidentifikasi berdasarkan perbandingan urutan *Small Subunit Ribosomal RNA* (SSU rRNA). Berdasarkan latar belakang penelitian, perlu dilakukan penelitian untuk mendeteksi dan mengidentifikasi *Blatocystis* yang diisolasi dari sampel fekal pasien.

2. METODE

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biomedik FK UNAND pada bulan Juli-Agustus 2024. Metode yang digunakan adalah metode deskriptif. Hasil penelitian disajikan dalam bentuk gambar dan tabel.

2.1 Persiapan Alat dan Bahan

Alat utama yang dibutuhkan yaitu *real time PCR thermal cycler*. Bahan utama yang digunakan pada penelitian ini yaitu sampel fekal pasien yang diperoleh dari Laboratorium Biomedik UNAND dengan kode sampel F12, F22, F18, dan F19. DNA diamplifikasi menggunakan Primer SB83, SB155, dan BL18S. Sekuen primer disajikan dalam **Tabel 1**.

Tabel 1. Daftar Primer Deteksi *Blastocystis* sp.

Pasangan Primer	Ukuran Amplikon (bp)	Sekuen Primer	Subtype	Referensi
BL18SPPF1 BL18SR2PP	320	5'-AGTAGTCATACGCTCGCTCAAA-3' 5'-TCTTCGTTACCCGTTACTGC-3'	<i>All</i>	(Poirier <i>et al.</i> , 2011)
SB83	351	F:5'-GAAGGACTCTCTGACGATA-3' R:5'-GTCCAAATGAAAGGCAGC-3'	Subtype1	(Yoshikawa <i>et al.</i> , 2004)
SB155	650	F:5'-ATCAGCCTACAATCTCCTC-3' R:5'-ATCGCCACTTCTCCAAT-3'	Subtype2	(Yoshikawa <i>et al.</i> , 2004)

2.2 Pelaksanaan Penelitian

a. Isolasi DNA

Isolasi DNA dari sampel fekal dilakukan dengan menggunakan kit Qiagen fast DNA stool mini kit. Sebanyak 200 mg sampel fekal dimasukkan ke dalam *microtube* 1,5 ml, kemudian ditambahkan 1 ml InhibitEX *buffer*. Campuran diaduk terus-menerus hingga sampel fekal homogen. Suspensi kemudian dipanaskan selama 5 menit pada suhu 70°C lalu di-vorteks selama 15 detik. Sampel disentrifugasi selama 1 menit, kemudian sebanyak 200 µl *supernatant* dipindahkan ke dalam *microtube* baru, lalu sebanyak 15 µl proteinaseK ditambahkan ke dalam *microtube* 1,5 mL.

Selanjutnya sebanyak 200 µl *buffer* AL ditambahkan dan dihomogenkan menggunakan vorteks. Larutan kemudian diinkubasi pada suhu 70°C selama 10 menit menggunakan *thermo shaker*. Sebanyak 200 µl ethanol ditambahkan ke dalam sampel untuk presipitasi, kemudian dihomogenkan menggunakan vorteks. Sebanyak 600 µl campuran dipindahkan ke dalam QIAamp *spin column* lalu sentrifugasi selama 1 menit. *Collection tube* bagian bawah yang berisi filtrat dibuang. Langkah ini diulangi sebanyak 2 kali.

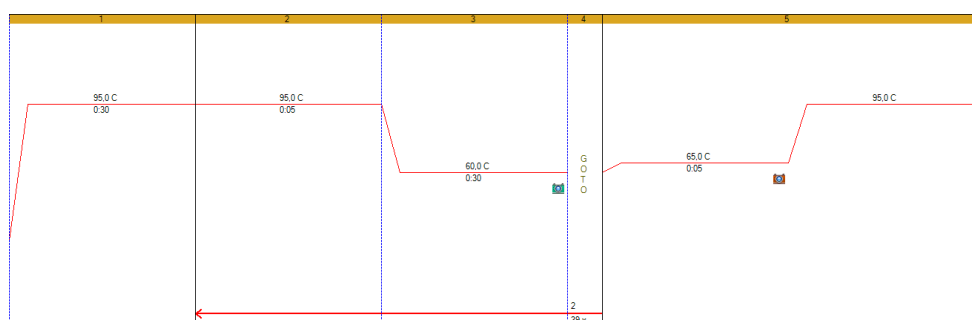
Tahapan *washing* dilakukan dua kali dengan cara menambahkan *buffer* AW1 dan *buffer* AW2. QIAamp *spin column* dipindahkan ke dalam *collection tube* yang baru kemudian 500 µl *buffer* AW1 ditambahkan dan disentrifugasi selama pada kecepatan 13.000 rpm 1 menit. *Collection tube* bagian bawah yang berisi filtrat dibuang. QIAamp *spin column* dipindahkan ke dalam *collection tube* yang baru kemudian 500 µl *buffer* AW2 ditambahkan dan

disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit. *Collection tube* bagian bawah yang berisi filtrat dibuang. *QIAamp spin column* dipindahkan ke dalam ke dalam *microtube* 1,5 ml yang baru, kemudian sebanyak 200 µl *buffer* ATL ditambahkan pada matriks *QIAamp*. Sampel diinkubasi selama 1 menit pada suhu ruang dan disentrifugasi selama 1 menit untuk elusi DNA.

b. Amplifikasi DNA menggunakan qPCR

Proses amplifikasi DNA dilakukan dengan metode qPCR menggunakan primer spesifik *Blastocystis* yang menargetkan gen *Small Subunit Ribosomal RNA* (SSU rRNA). Langkah awal yang dilakukan dalam proses PCR yaitu semua komponen PCR dicampurkan dalam tube PCR yang disebut dengan mix PCR. Reaksi PCR dengan volume total 10µL terdiri dari 1x SYBR Green Real-time PCR master mix, 0,5 µM primer *forward*, 0,5µM primer *reverse*, dan DNA *template*. *Nuclease-free water* (NFW) ditambahkan hingga volume akhir mencapai 10µL. Komposisi masing-masing komponen disajikan dalam **Tabel 2**.

Tabel 2. Komponen reaksi qPCR			
Komponen	Konsentrasi awal	Konsentrasi akhir	Volume (µL)
SYBR-Green Real-time PCR master mix	2x	1x	5
Primer Reverse	10 µM	0,5 µM	0,5
Primer Forward	10 µM	0,5 µM	0,5
NFW	-	-	3
DNA Template			1
Volume akhir			10



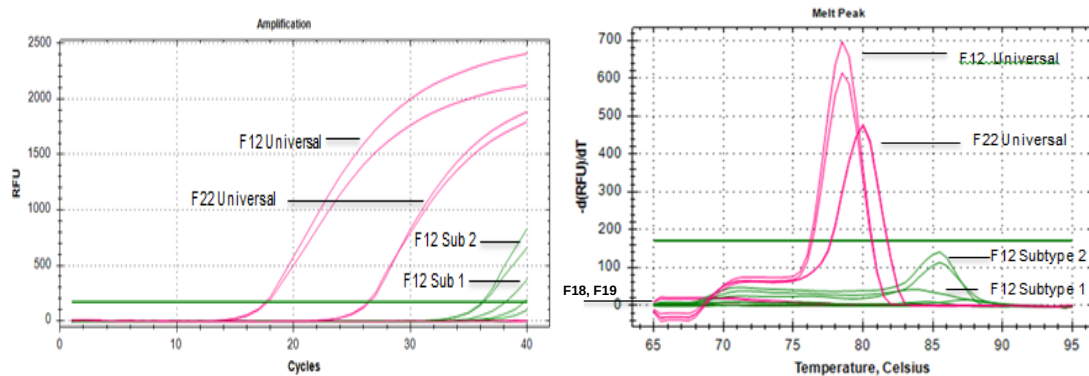
Gambar 1. Program *real time* PCR deteksi *Blastocystis* sp.

Gambar 1 merupakan program *running* PCR dengan menggunakan primer BL18SPPF1/BL18SR2PP, primer SB83 dan primer SB155. Proses PCR *Blastocystis* sp. Umumnya menggunakan suhu annealing 60°C (Beyhan *et al.*, 2023). Sampel yang terdeteksi positif *Blastocystis* selanjutnya akan diidentifikasi menggunakan primer SB83

yang spesifik pada *Blastocystis* type 1 (Subtype1) dan primer SB155 yang spesifik terhadap *Blastocystis* type 2 (Subtype2).

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Deteksi *Blastocystis* dapat dilakukan secara molekuler dengan amplifikasi PCR dengan menargetkan *Small Subunit Ribosomal RNA* (SSU rRNA). Dari 28 *subtype* yang ditemukan, 22 *subtype* (ST1–ST17, ST21, ST23–ST26) telah dikonfirmasi memiliki SSU rRNA (Maloney *et al.*, 2020). Penelitian ini menggunakan pasangan primer universal BL18SPPF1/BL18SR2PP yang dapat mengamplifikasi fragmen DNA sepanjang 320 hingga 342 bp, tergantung pada *subtype* (Poirier *et al.*, 2011).



Gambar 2. hasil deteksi *Blastocystis* sp. menggunakan primer BL18SPPF1/BL18SR2PP, primer SB83 dan primer SB155
(a) Quantitative curve (b) Melting curve

Gambar 2 (a) menunjukkan kurva kuantitatif DNA *Blastocystis* sp. menggunakan Primer BL18SPPF1/BL18SR2PP, primer SB83, dan primer SB155. Analisis amplifikasi DNA hasil real time PCR dilakukan dengan melihat kenaikan kurva dan nilai Cq pada kurva amplifikasi. Cq adalah jumlah siklus sampel mulai terbaca yang menunjukkan awal fase pertumbuhan eksponensial dimulai. Nilai Cq merepresentasikan jumlah siklus PCR yang dibutuhkan untuk mencapai intensitas. Besarnya nilai Cq ditentukan oleh jumlah awal gen target pada sampel (Farma *et al.*, 2020). Semakin rendah nilai Cq maka jumlah DNA target semakin tinggi, sebaliknya semakin tinggi nilai Cq, maka jumlah DNA target semakin rendah (Zilhada *et al.*, 2017). Nilai Cq (*quantification cycle*) deteksi *Blastocystis* dari sampel fekal pasien menggunakan primer BL18SPPF1 dan Primer BL18SR2PP disajikan dalam Tabel 3.

Tabel 3. Nilai Cq (*quantification cycle*) Deteksi *Blastocystis* Menggunakan Primer BL18SPPF1/BL18SR2PP

Sampel	Cq (<i>quantification cycle</i>)
F12	17,73
F12	17,54
F22	26,28
F22	26,45
F19	N/A
F19	N/A
F18	N/A
F18	N/A

Nilai Cq yang didapatkan pada pemeriksaan Real Time PCR menggunakan primer BL18SPPF1/BL18SR2PP dengan kode sampel F12 yaitu 17,73 dan 17,54, sementara Nilai Cq pada kode sampel F22 yaitu 26,28 dan 26,45. Nilai Cq berbanding terbalik dengan konsentrasi DNA target, semakin rendah nilai Cq artinya semakin cepat terjadinya amplifikasi untuk melewati *threshold* (Pramila *et al.*, 2023). Nilai Cq sebesar 17,54 merupakan nilai terendah yang menandakan bahwa sampel F12 memiliki konsentrasi DNA *Blastocystis* paling banyak di antara seluruh sampel.

Gambar 2 (b) menunjukkan *Melting curve* hasil deteksi *Blastocystis* menggunakan pasangan primer BL18SPPF1/BL18SR2PP, primer SB83 (subtype1) dan primer SB155 (subtype2). Sejumlah 2 sampel dengan kode F12 dan F22 terdeteksi positif *Blastocystis* sp., sedangkan sampel dengan kode F18 dan F19 negatif *Blastocystis*. Subtype *Blastocystis* yang paling umum ditemukan pada manusia adalah Subtype1, Subtype2, Subtype3 dan Subtype4. Sampel yang terdeteksi positif *Blastocystis* selanjutnya diidentifikasi menggunakan primer SB83 yang spesifik pada *Blastocystis* type 1 (Subtype 1) dan primer SB155 yang spesifik terhadap *Blastocystis* type 2 (Subtype 2). Sampel dengan kode F12 terdeteksi positif *Blastocystis* Subtype 1 dan Subtype 2, sementara sampel F22 negatif *Blastocystis* subtype 1 dan subtype 2.

Studi molekuler menemukan bahwa *Blastocystis* sp. memiliki variabilitas genetik yang tinggi dan telah diklasifikasikan menjadi 28 subtype. Sejauh ini sebanyak 9 subtiptipe *Blastocystis* telah berhasil diisolasi dari manusia (Subtype 1 – Subtype 9) (Lepczyńska *et al.*, 2017). *Blastocystis* subtype 1 dapat ditemukan pada pasien dengan *Irritable Bowel Syndrome* (IBS). IBS merupakan gangguan sistem gastrointestinal yang bersifat kronis, ditandai oleh rasa nyeri atau sensasi tidak nyaman pada abdomen, kembung serta perubahan kebiasaan buang air besar (Jaya, 2014). Nilai Cq (*quantification cycle*) deteksi *Blastocystis* menggunakan primer SB83 dan SB155 disajikan dalam Tabel 4.

Tabel 4. Nilai Cq (*quantification cycle*) Deteksi *Blastocystis* Menggunakan Primer SB83 (Subtype1) dan Primer SB155 (Subtype2)

Primer	Subtype	Sampel	Cq (<i>quantification cycle</i>)
SB83	Subtype1	F12	39,69
SB83	Subtype1	F12	38,09
SB83	Subtype1	F22	N/A
SB83	Subtype1	F22	N/A
SB155	Subtype2	F12	36,22
SB155	Subtype2	F12	36,10
SB155	Subtype2	F22	N/A
SB155	Subtype2	F22	N/A

Sampel dengan kode F12 Positif Subtype 1 dan Subtype 2 dengan nilai Cq *Blastocystis* subtype 1 yaitu 39,69 dan 38,09, kemudian nilai Cq *Blastocystis* subtype 2 (ST2) yaitu 36,22 dan 36,10. Nilai Cq sebesar 36,10 merupakan nilai terendah yang menandakan bahwa sampel F12 memiliki konsentrasi DNA *Blastocystis* subtype 2 yang lebih banyak dibandingkan *Blastocystis* subtype 1. Infeksi *Blastocystis* dapat terjadi lebih dari satu subtype. Sementara sampel F22 tidak teramplifikasi menandakan bahwa sampel ini negatif *Blastocystis* subtype 1 dan subtype 2.

4. KESIMPULAN

Sampel fekal pasien dengan kode F12 dan F22 terdeteksi positif *Blastocystis* sp., sementara sampel dengan kode F18 dan F19 negatif. Real-Time PCR lanjutan menunjukkan sampel F12 positif subtype 1 dan subtype 2, sedangkan sampel F22 negatif *Blastocystis* subtype 1 dan subtype 2..

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada ibu dr. Hirowati Ali, Ph.D. yang telah membimbing, memberikan ide dan saran dalam penulisan artikel ini. Terima kasih kepada seluruh analis Laboratorium Biomedik FK UNAND yang telah memberikan bantuan demi lancarnya penelitian dan penulisan artikel ini. Terima Kasih kepada semua pihak yang telah berpartisipasi dalam penelitian dan penulisan artikel.

REFERENSI

- Atifah, Y., & Achyar, A. (2023). Design of Specific Primer for Methallothionein Gene of Tor Fish (Tor tambra). *Natural Science: Journal of Science and Technology*, 11(02), 42–48. <https://doi.org/10.22487/25411969.2022.v11.i02.16216>
- Beyhan, Y. E., Güven, İ., & Aydın, M. (2023). Detection of *Blastocystis* sp. in ulcerative colitis, Crohn's and chronic diarrheal patients by microscopy, culture and real-time

- polymerase chain reaction. *Microbial Pathogenesis*, 177. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.106039>
- Diarthini, N. L. P. E., Swastika, I. K., Ariwati, L., Isyaputri, R., Fitri N, M. Y., Hidajati, S., & Basuki, S. (2018). *Blastocystis* and Other Intestinal Parasites Infections in Elementary School Children in Dukuh Village, Karangasem District, Bali. *Indonesian Journal of Tropical and Infectious Disease*, 7(3). <https://doi.org/10.20473/ijtid.v7i3.7323>
- Farma, S. A., Handayani, D., Putri, D. H., Argantos, & Syahrastani. (2020). *Optimization of Annealing Temperature of HIF-1 A and 18s rRNA in Blood of Swimming Athletes Using RT-PCR*. 10(ICoBioSE 2019), 34–38. <https://doi.org/10.2991/absr.k.200807.008>
- Fauzi, A., Yuniarti, E., Roza, D., Nugraha, F. D. A., & Amimi, S. (2025). Dynamics of animal-related infections and transmission to humans in Indonesia: A bibliometric analysis. *Multidisciplinary Reviews*, 8(1), 1–8. <https://doi.org/10.31893/multirev.2025003>
- Fevria, R., Vauzia, Putri, D. H., Achyar, A., Putri, S. D., & Edwin. (2024). Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria Using PCR Gene from Tempe Wrapped with Banana Leaves and Plastic. *Indonesian Food Science and Technology Journal*, 7(2), 127–132. <https://doi.org/10.22437/lfstj.v7i2.32503>
- Jaya, J. (2014). Irritable Bowel Syndrome (IBS) – Diagnosis dan Penatalaksanaan. *Continuing Medical Education*, 41(10), 727–732.
- Lepczyńska, M., Białkowska, J., Dzika, E., Piskorz-Ogórek, K., & Korycińska, J. (2017). *Blastocystis*: how do specific diets and human gut microbiota affect its development and pathogenicity? In *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-2965-0>
- Maloney, J. G., Molokin, A., & Santin, M. (2020). Use of Oxford Nanopore MinION to generate full-length sequences of the *Blastocystis* small subunit (SSU) rRNA gene. *Parasites and Vectors*, 13. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04484-6>
- Poirier, P., Wawrzyniak, I., Albert, A., El Alaoui, H., Delbac, F., & Livrelli, V. (2011). Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Blastocystis* parasites in human stool samples: Prospective study of patients with hematological malignancies. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(3), 975–983. <https://doi.org/10.1128/JCM.01392-10>
- Pramila, C., Ahda, Y., Putri, D. H., & Achyar, A. (2023). *Optimization of Multiplex Real Time Polymerase Chain Reaction (qPCR) Based Pork Contamination Detection in Beef Processed Food Products Optimasi Deteksi Kontaminasi Daging Babi Berbasis Multiplex Real Time Polymerase Chain Reaction (qPCR) pada Produk*. 8(3), 466–

472.

- Yoshikawa, H., Wu, Z., Kimata, I., Iseki, M., Ali, I. K. M. D., Hossain, M. B., Zaman, V., Haque, R., & Takahashi, Y. (2004). Polymerase chain reaction-based genotype classification among human *Blastocystis* hominis populations isolated from different countries. *Parasitology Research*, 92(1), 22–29. <https://doi.org/10.1007/s00436-003-0995-2>
- Zilhadia, Z., Izzah, A. N., & Betha, O. S. (2017). Perbandingan Metode SYBR Green dan Hydrolysis Probe dalam Analisis DNA Gelatin Sapi dan Gelatin Babi Menggunakan Real Time Polymerase Chain Reaction. *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*, 4(1), 16. <https://doi.org/10.29208/jsfk.2017.4.1.194>