

GENOTIPE MOLEKULAR *Giardia lamblia* PADA PENDUDUK ASIMPTOMATIK DI LOMBOK BARAT, INDONESIA

Ersandhi Resnhaleksmana^{1*}, Ida Bagus Rai Wiadnya¹,
I Gusti Ayu Nyoman Danuyanti¹, I Wayan Getas¹

¹Poltekkes Kemenkes Mataram, Jurusan Teknologi laboratorium Medis

*) Email Korespondensi: resnha@gmail.com

Abstract: Molecular Genotype of Giardia Lamblia in Asymptomatic Populations in West Lombok, Indonesia. *Giardia Lamblia* is an intestinal parasite that is often found polluting the environment and is pathogenic to humans. The spread of *Giardia* can occur between asymptomatic humans to other humans and even the surrounding environment. This study aims to identify the genotype of *G. lamblia* in the asymptomatic population in the West Lombok region. *Giardia* examination was carried out microscopically and molecularly using the COX1 gene. *Giardia* was identified in 1.37% (6/438) of the asymptomatic population stool samples. The phylogenetic analysis showed that *G. lamblia* isolate from Lombok had a monophyletic relationship with the *Giardia lamblia* isolate in GenBank with no X55287.1. The low number of *G. lamblia* infections in the asymptomatic population in the Lombok region can act as a source of pathogenic infection for susceptible populations. These results indicate the need for special attention for health programs to prevent *G. lamblia* infection.

Keyword: Molecular Genotyping , Intestinal parasite, *Giardia Lamblia*

Abstrak: Genotipe Molekular Giardia lamblia Pada Penduduk Asimptomatik Di Lombok Barat, Indonesia. *Giardia Lamblia* merupakan parasit usus yang sering ditemukan mencemari lingkungan dan bersifat patogen terhadap manusia. Penyebaran *Giardia* dapat terjadi antara manusia asimtomatis ke manusia lainnya dan bahkan kelingkungan sekitar. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi genotipe *G. Lamblia* pada penduduk asimptomatis di wilayah Lombok Barat. Pemeriksaan *Giardia* dilakukan secara mikroskopis dan molekular menggunakan menggunakan gen *COX1*. *Giardia* teridentifikasi 1.37% (6/438) dari sampel tinja penduduk asimptomatis. Analisa filogenetik menunjukkan bahwa *G. Lamblia isolat lombok* memiliki kekerabatan monofiletik dengan isolat *Giardia lamblia* pada GenBank dengan no X55287.1. Jumlah infeksi rendah *G. lamblia* pada penduduk asimptomatis di wilayah lombok dapat berperan sebagai sumber infeksi patogen bagi penduduk yang rentan. Hasil ini menunjukkan perlunya perhatian khusus bagi program kesehatan sebagai pencegahan terhadap infeksi *G. lamblia*.

Kata Kunci: Genotipe molekular, Intestinal parasite, *Giardia Lamblia*

PENDAHULUAN

Penyakit zoonotik sering ditemukan meningkat di negara-negara berkembang dengan tingkat ekonomi rendah. Pada negara-negara tersebut penyakit ini menjadi penyakit infeksi yang terabaikan. Hasil survei menghasilkan 1.407 patogen pada manusia adalah 58% *emerging infectious diseases* dan 75% dari *emerging*

infectious diseases adalah penyakit zoonotik (Taylor *et al.*, 2001; Woolhouse & Gowtage, 2005). *Giardiasis* merupakan salah satu penyakit zoonotik yang disebabkan oleh parasit *Giardia lamblia*, parasit ini dapat mencapai angka kejadian infeksi 1-50% pada negara-negara berkembang. Pada negara-negara maju parasit ini terdeteksi dengan kisaran mencapai 0-7% (Romero

et al., 2015). *Giardia lamblia* sering ditemukan menginfeksi penduduk dengan sanitasi yang rendah. *Giardia lamblia* dapat ditemukan di seluruh dunia, yaitu pada sejumlah besar mamalia termasuk ternak, hewan peliharaan, satwa liar, dan hewan air. Beberapa laporan terbaru juga menggambarkan adanya infeksi *Giardiasis* intestinal pada jenis burung dan bahkan ikan. Prevalensi *Giardiasis* bervariasi terutama terdapat di daerah dengan kondisi higienitas rendah. Diperkirakan sekitar 200 juta orang memiliki *Giardiasis* simptomatik dan sekitar 500.000 kasus baru terjadi tiap tahunnya (Lebbad, 2010).

Giardia lamblia memiliki morfologi seperti buah peer dengan ukuran 12-15µm, dilengkapi empat pasang flagella. Di permukaan ventral terdapat bentuk cekung (cakram penghisap) dan berfungsi untuk kontraksi. Flagella terdapat searah dengan bagian ventral berfungsi memompa menghilangkan cairan di bawah perekat, atau sebagai fasilitas pemindahan nutrisi dari mukosa hospes. Kista berbentuk oval berukuran 8-12µm, tahap pertama terdapat 2 nukleus kemudian menjadi 4 setelah dewasa, terdapat axonema menonjol merupakan mikrotubulus. Kista akan keluar bersama feces dalam jumlah besar yaitu 108 kista/gram feces (Gunn & Pitt, 2012; Midlej et al., 2016). Duodenum dan bagian atas usus halus merupakan habitat utama dari *Giardia lamblia*, dan dapat meluas sampai ke daerah ileum dan colon. Parasit yang menempel pada permukaan epitel dan mukosa usus tanpa infasi sampai ke bagian bawah. Banyak penderita non simptomatis yang dapat berperan sebagai carrier, dan beberapa di antaranya dapat menjadi enteritis akut atau *Giardiasis*. Gejala diare yang ditimbulkan berbau busuk yang khas karena infeksi terkait dengan terganggunya penyerapan lemak. Diare kronis menyebabkan sakit bagian abdomen, feces berwarna pucat, dan berbau telur busuk. Diare dalam waktu jangka panjang juga menimbulkan kekurangan vitamin terutama vitamin K (Gunn & Pitt, 2012; Midlej et al., 2016).

Setiap jenis parasit memiliki karakteristik molekuler tersendiri walaupun memiliki kesamaan secara morfologi. Karakteristik molekuler yang beragam pada parasit dapat berperan sebagai penentu fenotif dan genotifnya. Penelitian terhadap DNA mitokondria sering digunakan mencari variasi populasi atau spesies tertentu karena molekul DNA mitokondria tidak memiliki protein histon dan perbaikan enzim pada keadaan terjadinya kesalahan replikasi atau kerusakan DNA, mutasi yang terjadi cenderung diteruskan dari waktu ke waktu (Castro Antônia & Ramon, 1998). Penelitian molekuler pada pasien klinik di Iran menggunakan sekuen *triose phosphate isomerase* (148-bp dan 81-bp) menunjukkan terdapatnya perbedaan antigenik antara infeksi *Giardiasis* pada pasien frekuensi infeksi *Giardia lamblia* genotype A (148 bp) enam kali lebih tinggi sebagai penyebab diare dibandingkan genotype B (81 bp) (Pestechian et al., 2014). Sebagai contoh lain yaitu *Giardia duodenalis* berdasarkan analisis filogenetik dari urutan lokus *small* subunit 18S RNA ribosom, terutama *gdh* dan *tpi*, menunjukkan bahwa spesies terdiri dari strain yang berbeda. Strain ini merupakan satu dari delapan kelompok genetik (*Assemblages*, yaitu A-H), berdasarkan *genotip* dan Tuan rumah mamalia. Dari beberapa sumber *genotipe* yang terkait dengan infeksi *Giardia* pada manusia terbagi dalam dua kelompok, yaitu "kelompok Polandia" dan "kelompok Belgia", "Kelompok 1 / 2" dan "Kelompok 3", "Geno-tipe A" dan "Genotipe B" atau "Assemblage A" dan "Assemblage B", dengan sebagian besar peneliti cenderung menggunakan "Assemblage A" dan "Assemblage B". Isolat *Assemblage A* ditemukan dari manusia, ternak, anjing, kucing, berang-berang, babi guinea, kukang, dan untuk *Assemblage B* dari manusia, anjing, berang-berang, kukang, chinchilla dan siamang (Thompson, 2004). *Assemblage A* memiliki dua 'sub kelompok' yang berbeda yaitu AI dan AII, kelompok AI mengandung isolat dari manusia dan beberapa mamalia lainnya, sedangkan AII terdiri dari *genotipe* yang hanya

ditemukan pada manusia. Beberapa kelompok lain juga memiliki rentang host yang lebih terbatas, *genotipe Assemblage C* hanya ditemukan pada anjing, *Assemblage D* spesifik untuk kucing dan *Assemblage E* spesifik untuk ternak (Gunn & Pitt, 2012).

Puebla *et al.* (2017) melakukan penelitian untuk mengetahui subspecies dari *Giardia* pada populasi anak di Cuba dengan menggunakan teknik molekuler. Penelitian ini menggunakan gen *triose phosphate isomerase (tpi)* dan *smallsubunit ribosomal RNA (SSU rRNA)* sebagai penanda genetik untuk identifikasi *assemblage's* dan *sub-assemblages Giardia duodenalis*. Infeksi *G. duodenalis* teridentifikasi secara mikroskopis pada 68 dari 847 sampel anak-anak yang diperiksa. Identifikasi molekuler menggunakan gen SSU-rRNA terdeteksi *Giardia duodenalis* 100,0%, menggunakan gen *tpi* terdeteksi 92,6%. Subtipe *Giardia duodenalis* menggunakan *assemblage-specific tpi-PCR* teridentifikasi *assemblage B* 50, 8%, *assemblage A* 27, 0%, dan infeksi campuran (A+B) 22, 2%. Hasil penelitian menemukan *assemblage B* lebih sering ditemukan pada anak-anak diare. Analisis sekuen gen *tpi* isolat *Giardia* dari anak simtomatik menunjukkan bahwa *assemblage A* termasuk dalam sub *assemblage AII*, dan empat sub *assemblage BIV* dan satu sub *assemblage BIII* juga ditemukan. Hanya dua hasil genotyping *discordant* yang diamati oleh perbandingan filogenetik dari SSU-rRNA dan *tpi* sequences.

METODE

Subjek yang digunakan dalam penelitian ini adalah penduduk di sekitar peternakan babi Lombok barat, Indonesia. Sampel penelitian berupa 438 sampel tinja manusia, dengan pengawet Kalium Bikromat 5%. Pemeriksaan yang digunakan untuk menentukan parasit adalah dengan metode mikroskopis dengan konsentrasi sedimentasi dari Ritchi, *Polymerase Chain Reaction (PCR)*, dan sekuensing. Produk PCR positif parasit dilanjutkan dengan sekuensing dan pemetaan (Ridley, 2012; Munshi, 2012).

Isolasi DNA

Hasil pemeriksaan mikroskopis dilanjutkan dengan PCR, diawali dengan isolasi DNA menggunakan modifikasi KIT Favor Prep Fasti 001-1. Sampel bebas pengawet di masukkan ke dalam bead tube dan diberikan reagen SDE1, dilanjutkan dengan pelisisan menggunakan mini bead beater. Untuk mendapatkan hasil yang baik dilanjutkan dengan freezer -80°C dan pemanasan waterbath 60°C selama 5 menit dan dilakukan 4 kali berulang (freeze-thaw) (Çetinkaya *et al.*, 2018; Hidalgo *et al.*, 2018). Penambahan enzim protein K dan inkubasi pada suhu 60°C selama 20 menit untuk menyempurnakan proses pelisisan parasit. Masukkan SDE2 ke dalam tube campur homogen inkubasi 5 menit pada suhu 4°C , sentrifuge 10.000rpm selama 5 menit untuk mendapatkan supernatan. Pindahkan semua supernatan ke tube 1.5 ml, tambahkan SDE3 dan campur sampai homogen dan sentrifuge lagi untuk mendapatkan supernatan. 250 μL supernatan dipindahkan ke tube 1.5 ml, ditambahkan 250 μL Etanol dan 250 μL SDE4, campur sampai homogen. Pindahkan semua campuran ke dalam SDE Coloum, sentrifuge dan pindahkan SDE coloum ke Tube baru. SDE coloum dibilas dengan 750 μL wash buffer dan disentrifugasi 10.000 rpm, pembilasan dilakukan 2 kali. SDE coloum dipindahkan ke tube kosong dan sentrifugasi untuk mengeringkan coloum. Untuk mendapatkan isolat, pindahkan SDE coloum ke tabung 1.5 ml tambahkan elution buffer 100-200 μL , dan sentrifugasi 1000 rpm. SDE coloum di buang, Isolat berada dalam tabung 1.5 ml, simpan suhu -4°C .

PCR, sequencing and analyses

Identifikasi *Giardia lamblia* menggunakan gen *Cathepsin L-Like Protease (CP)*, dengan amplifikasi PCR menggunakan primer forward dan reverse: GLCP6-S1: 5'-GGAGCTGACTGGGGAGTCTA-3'; GLCP6-AS1: 5'-CCCTAGTGAATGGGCTGCAA-3', dengan panjang produk 241 bp (Zebardast *et al.*, 2016). *Amplifikasi PCR* menggunakan kit Bioline dengan campuran mixer master (Bioline) 10 μL , 7

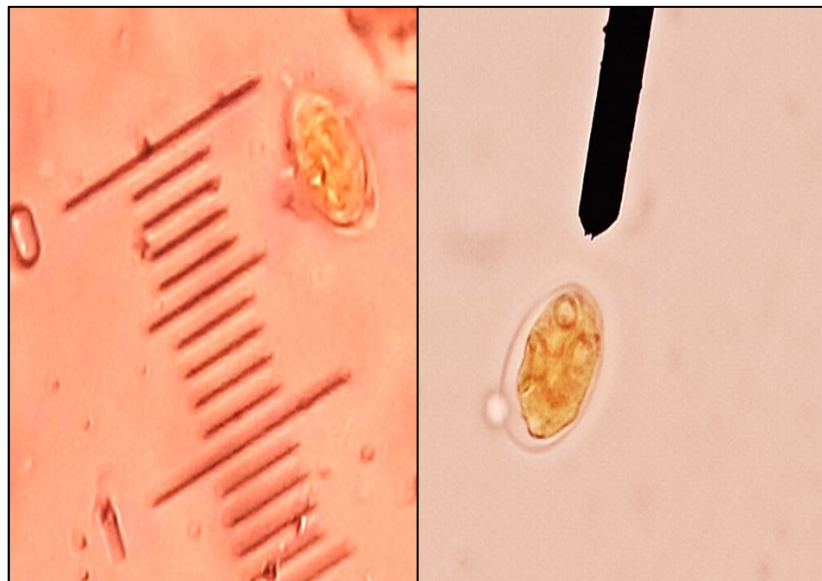
μL ultrapure water, 1 μL primer forward, 1 μL dari primer reverse dan 1 μL sampel template DNA. Kondisi temperatur siklus PCR yang digunakan denaturasi awal 95°C/5 menit; Denaturasi 95°C/30 detik; Annealing 59°C/45 detik; Elongation 72°C/3 menit; final elongation 72 °C/10 menit, dengan 35 siklus PCR. DNA produk PCR, dielektroforesis pada gel agarosa 2% yang tercat floresafe DNA stain 3 μL /100ml dan dilihat pada Gel Doc sinar ultraviolet (Barbosa *et al.*, 2017). Analisis Kekebabatan parasit dilakukan dengan uji filogenetik, DNA sampel hasil amplifikasi dilanjutkan dengan proses purifikasi dan sequencing. Sequencing menggunakan alat Applied Biosystem 3500 Genetic Analyzer 2500 dengan Bigdye Terminator kit. Analisa Sekuen DNA *Giardia lamblia* Pencocokan kesamaan sekuen *Giardia lamblia* isolat sample Lombok barat dengan sekuen DNA *gene Bank* menggunakan program BLAST secara online pada website

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Selanjutnya dilakukan analisa untuk melihat tingkat kekerabatan antar spesies melalui pensejajaran sekuens menggunakan urutan gen didasarkan pada akses yang tersedia di *Gene Bank*. Konsensus pohon *bootstrap* dengan penyimpulan 1000 replikasi dan evolusi jarak parasit dihitung berdasarkan metode "Kimura 2". Semua perhitungan dilakukan dengan analisis filogenetik menggunakan perangkat lunak "MEGA X" (Felsenstein, 1985; Kimura, 1980; Kumar *et al.*, 2018; Saitou & Nei, 1987).

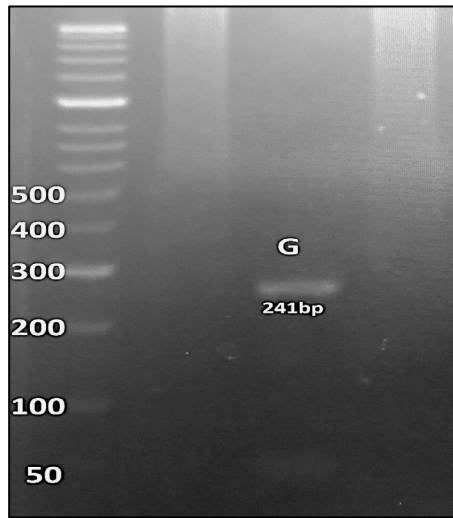
HASIL

Pemeriksaan mikroskopis sebagai tahap awal, dan untuk hasil yang lebih spesifik terhadap *Giardia lamblia* dilanjutkan dengan pemeriksaan PCR. 438 sampel penduduk asimtomatis teridentifikasi 6 *G. Lamblia* (1.37%). Hasil pemeriksaan mikroskopis ditunjukkan pada gambar 1.



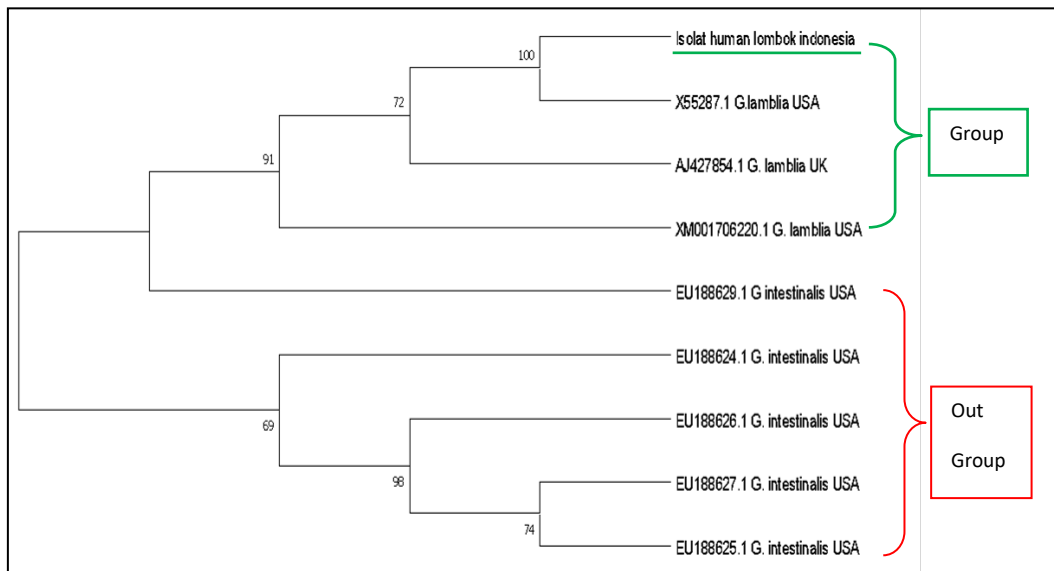
Gambar 1. *Giardia lamblia*, Perbesaran Lensa Objektif 40X, Phase Kista Ukuran Panjang 11 μm dan Terlihat Dengan 2 Nukleus

Analisa molekuler *Giardia* wilayah Lombok Barat, NTB ditunjukkan menggunakan gen *Cathepsin L-Like Protease* teridentifikasi pada penduduk di pada gambar 2.



Gambar 2. Hasil Dari Elektroforesis Sampel Isolat Penduduk Berdasarkan Gen *Cathepsin L-Like Protease 1* Teridentifikasi Pada 241bp.

Pohon Filogenetik yang ditunjukkan gambar 3, tersusun dari gen EU188629.1; U188627.1 EU188626.1; EU188625.1 EU188624.1; XM001706220.1; AJ427854.1; X55287.1 *G.lamblia* di Amerika.



Gambar 3. Pohon Filogeni *Giardia lamblia* Isolat Penduduk di Wilayah Lombok Barat Yang Disejajarkan Dengan Isolat Dari Gen Bank Berdasarkan *Cathepsin L-Like Protease 1*

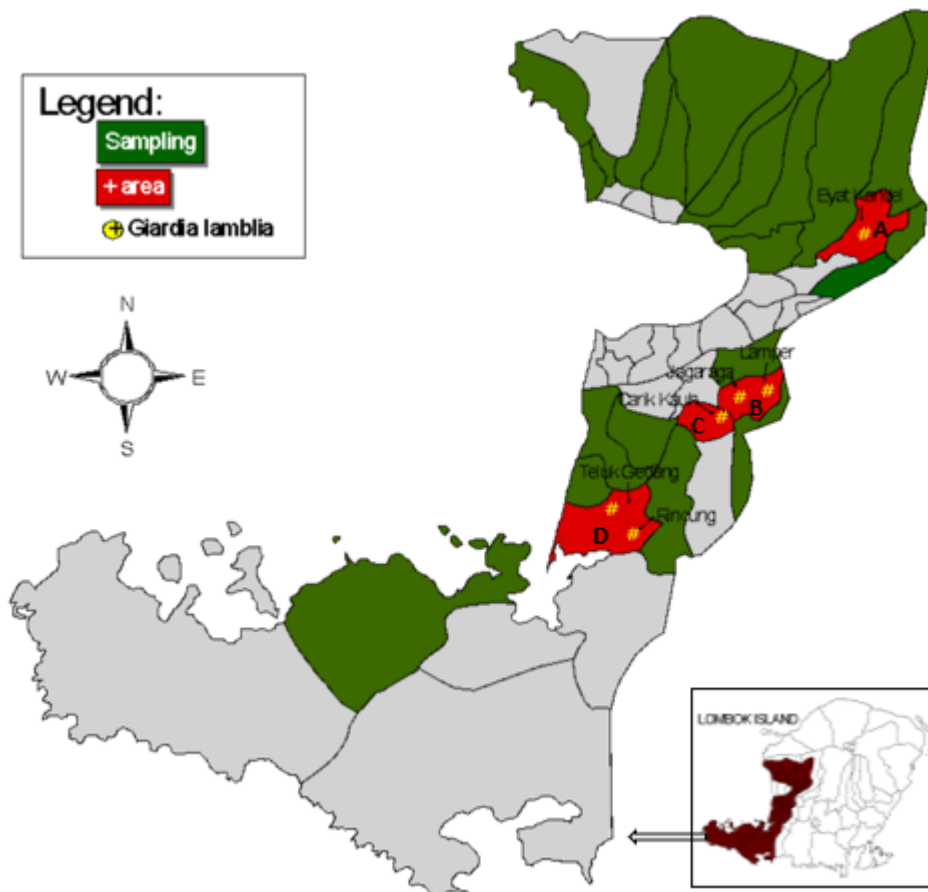
Analisis pohon filogenetik ini diperjelas dengan hasil tabel 1. *pairwise distance calculation*.

Tabel 1. Jarak Genetik *Giardia lamblia* Sekuen DNA Isolat Penduduk di Wilayah Lombok Barat Berdasarkan Gen *Cathepsin L-Like Protease*

No	Sampel	Human
1	Isolat <i>human</i> lombok	
2	EU188629.1 <i>G. intestinalis</i> USA	0,0376
3	EU188627.1 <i>G. intestinalis</i> USA	0,0376
4	EU188626.1 <i>G. intestinalis</i> USA	0,0376
5	EU188625.1 <i>G. intestinalis</i> USA	0,0376
6	EU188624.1 <i>G. intestinalis</i> USA	0,0376
7	XM001706220.1 <i>G. lamblia</i> USA	0,0463
8	AJ427854.1 <i>G. lamblia</i> UK	0,0463
9	X55287.1 <i>G. lamblia</i> USA	0,8732

Penyebaran infeksi *Giardia* di wilayah Lombok Barat ditunjukkan pada gambar 4, *Giardia* ditemukan persentase

kecil (1.37%) dikarenakan sampel yang digunakan adalah sampel penduduk asimtomatis.



Gambar 4. Daerah Penyebaran *Giardia lamblia*
Ket. A: Dusun Eyat Kandel; B: Dusun Lamber dan Jagaraga; C: Dusun Carik Kauh; D: Dusun Teluk Gedang dan Rincung

PEMBAHASAN

Analisa molekuler *Giardia* isolat penduduk, ternak babi, dan tikus di wilayah Lombok Barat, NTB menggunakan gen *Cathepsin L-Like Protease* merupakan salah satu gen virulensi aktivasi kontak pelekatan *Giardia* dengan dinding usus dan stabil terdapat pada bentuk vegetatif atau kista *Giardia* (Allain *et al.*, 2019; DuBois *et al.*, 2008). Beberapa penelitian yang menggunakan Gen *Cathepsin L-Like Protease* antara lain dapat mendeteksi keberadaan *Giardia lamblia* pada sampel stool di Iran (Bairami *et al.*, 2016).

Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) sekuen *Cathepsin L-Like Protease Giardia* isolat penduduk kedekatan kekerabatan dengan beberapa isolat *Giardia* pada GenBank. Nilai Query sekuens 1-240 didapatkan jumlah keselarasan semua segmen dari urutan database yang cocok dengan urutan nukleotida pada gen *Cat.L Giardia lamblia*. Sekuens gen *Cat.L* pada spesies *G.lamblia* dengan nilai skor 416 dengan persentase query cover 97%. Sedangkan nilai E-value $2e-12$ dengan persentasi identity sebesar 97.30 %. Kemudian juga didapatkan hasil Taksonomi dari gen *Cat.L* gene *G. lamblia* memiliki nilai skor tertinggi 416.

Analisa kekerabatan pohon filogenetik menggunakan metode *Neighbour-joining* dengan *Bootstrap* 1000x ulangan memperlihatkan bahwa analisis menggunakan gen *Cathepsin L-Like Protease* pada Isolat penduduk, menunjukkan kekerabatan berkarakter monofiletik dengan isolat *Glamblia* pada GenBank dengan no X55287.1, berarti keduanya memiliki kesamaan *common ancestor* dan mempunyai arah evolusi searah. *G. Lamblia* isolat penduduk di wilayah Lombok Barat merupakan kekerabatan sinafomorfik dengan *G. Lamblia* isolat GenBank dengan No. AJ427854.1, ditunjukkan dengan topo filogenetiknya tidak sejajar dengan *G. Lamblia* isolat penduduk di wilayah Lombok Barat, dan merupakan turunan *common ancestor* dari *G. lamblia* isolat penduduk di wilayah Lombok Barat, hal ini ditunjukkan dengan topo filogenetik yang masih dalam satu titik

percabangan. Analisa pohon filogenetik terhadap *Giardia* isolat EU188629.1; U188627.1 EU188626.1; EU188625.1 EU188624.1; XM001706220.1 *G.lamblia* di Amerika berkarakter plesiomorfik yaitu keluar dari titik percabangan *Common Ancestor* dari *G. Lamblia* isolat penduduk di wilayah Lombok Barat, hal ini menunjukkan tidak ada keterkaitan kekerabatan diantara isolat *Giardia* (Gordon, 2003).

Kedekatan hubungan genetik antara *Giardia* isolat penduduk di wilayah Lombok Barat dianalisis menggunakan *Pairwise Distance Calculation* yang menggambarkan jarak genetik antar spesies. Hasil *Pairwise Distance Calculation* berkisar antara 0.0100-0.8732, menunjukkan kedekatan hubungan genetik cukup kuat *Giardia lamblia* Isolat penduduk di Lombok Barat dengan isolat *Giardia* di Amerika. Analisis pairwise distance digunakan untuk melihat tingkat substitusi transisi dan transversi melalui banyaknya perbedaan nukleotida per pasangan. Spesies yang memiliki nilai jarak genetik semakin rendah, maka memiliki hubungan kekerabatan semakin dekat. Sebaliknya spesies yang memiliki jarak genetik tinggi, maka hubungan kekerabatannya semakin jauh (Dharmayanti, 2018).

Analisis filogenetik isolat *Giardia* intestinal, tikus terhadap gen penyandang *G. ardeae*, *G. muris*, dan *G. microti* (*Glutamat Dehydrogenase*, *Triose Phosphate Isomerase*, 18S rRNA) menunjukkan kekerabatan monofiletik terhadap *G. intestinalis*, dan menunjukkan bahwa spesies ini termasuk genotipe yang mewakili tujuh galur turunan kekerabatan (A – G), analisa filogenetik juga menunjukkan bahwa *G. microti* bukan satu kekerabatan (out group), melainkan sebagai satu kompleks filogeni (Monis *et al.*, 1999). Hasil serupa juga ditemukan oleh Sianturi *et al.* (2016) yang mengidentifikasi *Giardia* 5.9% (10/170) secara mikroskopis pada anak-anak Sekolah Dasar Salahutu dan Leihutu, Maluku; dan Jerez Puebla *et al.* (2017) mengidentifikasi 8% (68/847) secara molekular pada *Paediatric Hospital "William Soler"*, infeksi *Giardia*

assemblage B lebih banyak terjadi pada kasus diare. Walaupun infeksi yang terdeteksi dalam jumlah kecil secara asimtomatis, sangat berguna sebagai informasi bahwa *Giardia* pada penduduk karena dapat menularkan ke penduduk dan hewan di lingkungan sekitar (Feng & Xiao, 2011).

Beberapa studi epidemiologi menyatakan pentingnya penularan zoonosis *Giardiasis* ke manusia. Penelitian di Inggris, menemukan sebuah hubungan *Giardiasis* antara hewan ternak dan hewan peliharaan (khususnya babi, anjing, dan kucing), penelitian terhadap beragam beragam terhadap transmisi zoonosis *Giardiasis*, yaitu laporan wabah *waterborne diseases Giardia* pada pelancong dan kelompok yang berkemah, akibat meminum air dari sungai atau danau sekitar perkemahan. Penelitian survei mengungkapkan bahwa ditemukan 3,8% *Giardia* pada penduduk dengan klinis *Giardiasis* pada padahal 318 penduduk yang sehat.

KESIMPULAN

Giardia teridentifikasi 1.37% (6/438) dari sampel tinja penduduk asimtomatis. Analisa filogenetik menunjukkan bahwa *G. Lamblia isolat lombok* memiliki kekerabatan monofiletik dengan isolat *Glamblia pada* GenBank dengan no X55287.1.

SARAN

Penelitian molekular sangat diperlukan untuk mendukung informasi molekular epidemiologi dengan menggunakan marka spesifik yang mampu membedakan genotipe parasit beberapa wilayah merupakan dasar untuk mengkonfirmasi potensi *parasit* sebagai zoonosis baru.

DAFTAR PUSTAKA

Allain, T., Fekete, E. & Buret, A.G. (2019). *Giardia* cysteine proteases: The teeth behind the smile. *Trends in parasitology*.

Bairami, A., Rezaei, S. & Rezaeian, M. (2016). Evaluation of a New Primer In Comparison With Microscopy for the Detection of *Giardia lamblia* Infection in Stool

Samples. *Iranian journal of parasitology*, 11(1): 19.

Barbosa D. S., A., Ponce-Gordo, F., Dib, L.V., Uchôa, C.M.A., Bastos, O.M.P., Pissinatti, A. & Amendoeira, M.R.R. (2017). First molecular characterization of *Balantioides coli* (Malmsten, 1857) isolates maintained in vitro culture and from feces of captive animals, Rio de Janeiro, Brazil. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 10: 102–113.

Castro Antônia, J.A. & Ramon, P.M. (1998). Mitochondrial DNA: A tool for populational genetics studies. *International Microbiology*, 1(4): 327–332.

Çetinkaya, Ü., Charyyeva, A., Sivcan, E. & Gürbüz, E. (2018). Evaluation of four commercial DNA extraction kits for the detection of Microsporidia and the importance of pretreatments in DNA isolation. *Acta Parasitologica*, 63(2): 386–392.

<http://www.degruyter.com/view/j/ap.2018.63.issue-2/ap-2018-0044/ap-2018-0044.xml>.

Dharmayanti, N.L.P. (2018). Molecular Phylogenetic: Organism Taxonomy Method Based on Evolution History.

DuBois, K.N., Abodeely, M., Sakanari, J., Craik, C.S., Lee, M., McKerrow, J.H. & Sajid, M. (2008). Identification of the major cysteine protease of *Giardia* and its role in encystation. *Journal of Biological Chemistry*, 283(26): 18024–18031.

Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4): 783–791.

Feng, Y. & Xiao, L. (2011). Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clinical microbiology reviews*, 24(1): 110–140.

Gordon, M. (2003). Methods of Phylogenetic Analysis: New Improvements on Old Methods.

- Biochem 218 final project.*
- Gunn, A. & Pitt, S.J. (2012). *Parasitology: an integrated approach*. John Wiley & Sons.
- Hidalgo, A., Melo, A., Romero, F., Hidalgo, V., Villanueva, J. & Fonseca-Salamanca, F. (2018). DNA extraction in *Echinococcus granulosus* and *Taenia* spp. eggs in dogs stool samples applying thermal shock. *Experimental Parasitology*, 186: 10–16.
- Jerez Puebla, L.E., Núñez, F.A., Santos, L.P., Rivero, L.R., Silva, I.M., Valdés, L.A., Millán, I.A. & Müller, N. (2017). Molecular analysis of *Giardia duodenalis* isolates from symptomatic and asymptomatic children from La Habana, Cuba. *Parasite Epidemiology and Control*, 2(3): 105–113. <http://dx.doi.org/10.1016/j.parepi.2017.05.003>.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution*, 16(2): 111–120.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. & Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6): 1547–1549.
- Lebbad, M. (2010). *Molecular Diagnosis and Characterization of Two Intestinal Protozoa: Entamoeba histolytica & Giardia intestinalis*. Institutionen för mikrobiologi, tumör-och cellbiologi/Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology.
- Midlej, V., Souza, W. De & Benchimol, M. (2016). Chapter 1 *Giardia Intestinalis: An Intriguing Smile-Faced Parasite Introduction: A Brief History*.
- Monis, P.T., Andrews, R.H., Mayrhofer, G. & Ey, P.L. (1999). Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. *Molecular biology and evolution*, 16(9): 1135–1144.
- Munshi, A. (2012). DNA sequencing—methods and applications. *InTech, Rijeka*.
- Pestechian, N., Rasekh, H., Rostami-Nejad, M., Yousofi, H.A. & Hosseini-Safa, A. (2014). Molecular identification of *Giardia lamblia*; is there any correlation between diarrhea and genotyping in Iranian population? *Gastroenterology and Hepatology from bed to bench*, 7(3): 168.
- Puebla, L.E.J., Núñez, F.A., Santos, L.P., Rivero, L.R., Silva, I.M., Valdés, L.A., Millán, I.A. & Müller, N. (2017). Molecular analysis of *Giardia duodenalis* isolates from symptomatic and asymptomatic children from La Habana, Cuba. *Parasite Epidemiology and Control*, 2(3): 105–113.
- Ridley, J.W. (2012). *Parasitology for medical and clinical laboratory professionals*. Cengage Learning.
- Romero, G., Quintero, J., Astiazarán-García, H. & Velazquez, C. (2015). Host defences against *Giardia lamblia*. *Parasite immunology*, 37(8): 394–406.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4): 406–425.
- Sianturi, M.D.G., Rahakbauw, I.M., Meyanti, F., Kusumasari, R.A., Yayuk Hartriyanti, E. & Elsa Herdiana Murhandarwati, E. (2016). Prevalence of intestinal protozoan infections and association with hygiene knowledge among primary schoolchildren in Salahutu and Leihitu districts, Central Maluku regency, Indonesia. *Tropical Biomedicine*, 33(3): 428–436.
- Taylor, L.H., Latham, S.M. & Mark, E.J. (2001). Risk factors for human disease emergence. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 356(1411): 983–989.
- Thompson, R.C. (2004). The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and

- giardiasis. *Veterinary parasitology*, 126(1-2): 15.
- Woolhouse, M.E.J. & Gowtage-Sequeria, S. (2005). Host range and emerging and reemerging pathogens. *Emerging infectious diseases*, 11(12): 1842.
- Zebardast, N., Yeganeh, F., Gharavi, M.J., Abadi, A., Tabaei, S.J.S. & Haghghi, A. (2016). Simultaneous detection and differentiation of *Entamoeba histolytica*, *E. dispar*, *E. moshkovskii*, *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium* spp. in human fecal samples using multiplex PCR and qPCR-MCA. *Acta tropica*, 162: 233–238.