

Perbandingan Lima Set Primer untuk Mendeteksi *Trypanosoma evansi* pada Mencit dengan Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

(A Comparison of Five Primer Sets for Detection of *Trypanosoma evansi* in Mice Using PCR Technique)

Dias Aprita Dewi, Wardhana AH, Ekawasti F, Sawitri DH

Balai Besar Penelitian Veteriner, PO Box 151, Bogor 16114
diasaprita@gmail.com

ABSTRACT

Diagnose technique for detection of *Trypanosoma evansi* have been developed for many years, including *Polymerase Chain Reaction* (PCR) technique. One of fundamental factors on this technique is primer desain which possess high sensitivity and specificity. The aim of the current study was to examine five primer sets for detection of *T. evansi* on mice. They were ITS 1, ESAG 6/7, RoTat 1,2 VSG, TBR1/2 and TR3/TR4. Balitvet Culture Collection (BCC)-Bangkalan isolate of *T. evansi* was injected into two male mice DDY strain. Three days after infection, mice blood was collected and stored at -20°C . In addition, some blood was dropped on the filter paper and kept at 4°C . Another mice was killed and some tissues (brain, liver, lung, heart, spleen and kidney) were removed from mice and preserved into 80% Ethanol and then stored at -20°C . All samples were amplified using five primer sets and repeated twice. Results demonstrated that all primers (ITS 1, ESAG 6/7, RoTat 1,2 VSG, TBR1/2 and TR3/TR4) were able to detect *T. evansi* on all samples (the blood, the filter paper and all tissues). In order to detect *T. evansi* in the field, primer ITS-1 is recommended because it is able to discriminate some spesies *T. evansi* in livestock and generate a good intensity of DNA band from tested samples.

Key Words: *Trypanosoma evansi*, Primer, PCR, Tissue, Blood

ABSTRAK

Teknik diagnosis untuk mendeteksi *Trypanosoma evansi* terus dikembangkan, termasuk teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Salah satu faktor penting dalam keberhasilan PCR adalah pemilihan primer yang memiliki sensitifitas dan spesifisitas yang tinggi. Tujuan penelitian ini adalah menguji lima set primer untuk mendeteksi *T. evansi* pada mencit. Primer yang digunakan adalah ITS 1, ESAG 6/7, RoTat 1,2 VSG, TBR1/2 dan TR3/TR4. Isolat *T. evansi* dari *Balitvet Culture Collection* (isolat Bangkalan) disuntikkan ke dua ekor mencit jantan strain DDY. Tiga hari pasca infeksi, darah dikoleksi dan disimpan pada suhu -20°C . Di samping itu, sampel darah diteteskan ke kertas saring yang selanjutnya disimpan pada suhu 4°C . Satu ekor mencit yang lain dibunuh dan dikoleksi organ otak, hati, paru, jantung, limpa dan ginjal. Organ-organ tersebut disimpan dalam etanol 80% pada suhu -20°C . Semua sampel diamplifikasi dengan lima jenis primer dengan dua ulangan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa primer yang digunakan dalam penelitian ini (ITS1, ESAG 6/7, RoTat 1.2 VSG, TBR1/2 dan TR3/TR4) mampu mendeteksi *T. evansi* pada semua jenis sampel yaitu darah, kertas saring dan organ mencit yang diinfeksi *T. evansi*. Untuk kepentingan diagnosis, primer ITS 1 dapat direkomendasikan karena mampu membedakan spesies *Trypanosoma* pada ternak yang menghasilkan DNA pita tunggal dengan intensitas yang baik.

Kata Kunci: *Trypanosoma evansi*, Primer, PCR, Organ, Darah

PENDAHULUAN

Trypanosomiasis atau Surra merupakan salah satu jenis penyakit strategis yang menyerang hewan ternak dan domestik lainnya di Indonesia yang disebabkan oleh *Trypanosoma evansi* (*T. evansi*) (Dargantes et al. 2005). Penyakit ini ditularkan secara mekanis oleh vektor lalat penghisap darah seperti *Tabanus* dan *Stomoxys spp.* *T. evansi* merupakan *Trypanosoma* patogen yang penyebarannya paling luas secara geografis (Desquesnes et al. 2013).

Trypanosoma evansi mempunyai inang yang beragam dari hewan liar sampai hewan domestik yang mempunyai nilai ekonomi yang penting dengan berbagai tingkat kerentanan yang berbeda. Diantara hewan domestik yang rentan adalah kuda, sapi, kerbau, kambing, domba, babi, anjing, dan kucing, sedangkan hewan liar yang rentan diantaranya adalah badak (Vellayan et al. 2004), rusa (Adrian et al. 2010), wallaby (Reid et al. 2001a) dan bisa berpotensi sebagai sumber infeksi untuk hewan domestik (Dargantes et al. 2005). Hewan coba seperti tikus dan mencit juga sangat peka terhadap infeksi *T. evansi* (OIE 2009). Mencit merupakan salah satu hewan coba yang sensitif terhadap surra. Inokulasi pada mencit (*mouse inoculation*) merupakan metode yang sensitif untuk mendeteksi Surra penyakit kronis dan sudah banyak dibuktikan oleh para ahli (My et al. 2000; Reid et al. 2001b; Rodríguez et al. 2009). Inokulasi pada mencit dapat dipakai untuk propagasi *T. evansi* untuk keperluan penelitian lebih lanjut seperti uji PCR untuk deteksi dan identifikasi *T. evansi*.

Diagnosa surra sering terjadi kesalahan karena rendahnya sensitivitas dan spesifisitas uji serologis, uji parasitologis di lapang, maupun uji patologi klinik dan perubahan yang terjadi pada pengamatan post mortem. Hal ini dikarenakan tingkat parasitemia yang berfluktuasi khususnya pada tahap infeksi kronis. Oleh karena itu diperlukan teknologi yang lebih sensitif dan spesifik (Baticados et al. 2011).

Teknik PCR telah banyak diterapkan untuk mendeteksi trypanosomiasis di sejumlah inang dengan tingkat sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi (Desquesnes et al. 2013). Teknik ini dapat mendeteksi 1 trypanosoma/ml darah atau 1 pg DNA *Trypanosoma* dalam DNA hospes (Davila et al. 2003; Clausen et al. 1998). Faktor yang mempengaruhi diagnosa dengan teknik PCR dapat optimal antara lain kuantitas dan kualitas DNA, proses ekstraksi DNA, level parasitemia dalam tubuh inang dan desain primer yang sesuai (MacLeod et al. 1997; Desquesnes & Davila 2002; Desquesnes 2004; Gonzales et al. 2006).

Variasi sensitifitas dan spesifitas yang tepat pada diagnostik PCR tergantung pada jenis primer yang digunakan (Otranto & Stevens 2002; Njiru 2005; Ahmed 2013). Banyak penanda molekuler yang digunakan untuk mendeteksi, membedakan dan mempelajari spesies *Trypanosoma*. Primer yang didesain dengan baik akan memiliki kesesuaian antara primer dengan sekuen target serta jumlah kopi dari sekuen target yang terpresentasi dengan tepat di dalam genom parasit sehingga produk amplifikasi melalui proses PCR akan tinggi dan tepat (MacLeod et al. 1997; Desquesnes & Davila, 2002).

DNA untuk teknik PCR dapat diekstraksi dari sampel darah dan organ. Sampel darah dapat berupa darah segar maupun darah kering. Kertas saring sebagai media darah kering dapat diperiksa menggunakan PCR untuk mendeteksi DNA *T. evansi*. Penggunaan kertas saring selain lebih cepat dan nyaman, pengiriman sampel darah menjadi lebih mudah terutama di daerah terpencil (Handayani 2004; Dargantes 2010).

Beberapa primer untuk mendeteksi *Trypanosoma evansi* telah dilaporkan. Primer yang didesain menggunakan sekuen DNA berulang sebagai sekuen target diantaranya TBR 1 /2 yang mengamplifikasi kromosom mini satelit (Masiga et al. 1992), primer ESAG 6/7 ditujukan untuk mengkode kompleks heterodimer pada reseptor transferin

(Kabiri & Steverding 2001; Isobe et al. 2003). Primer ITS 1 ditujukan untuk mengamplifikasi *internal transcribed spacer* rDNA (Desquesnes 2001) sedangkan RoTat 1.2 VSG (*Variable Surface Glicoprotein*) digunakan untuk mengamplifikasi sekuen VSG cDNA (Urakawa et al. 2001; Salim et al. 2011). Adapun primer TR 3/ TR4 digunakan untuk mengamplifikasi ITS 1 rDNA dengan ukuran yang spesifik untuk mendeteksi dan mengidentifikasi infeksi yang polispesifik (Sharma et al. 2013).

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui sensitivitas dan spesifitas lima set primer yang digunakan untuk mendeteksi dan mengidentifikasi *T. evansi* pada sampel darah segar, darah kering dalam kertas saring dan sampel organ mencit pasca diinfeksi *T. evansi* isolat patogen.

MATERI DAN METODE

Isolat *Trypanosoma evansi*

Isolat *Trypanosoma evansi* diperoleh dari *Balivet Culture Collection* (BBC) dengan nomor P0 176. Isolat tersebut dikoleksi dari darah kerbau pada tahun 1988 di Kabupaten Bangkalan, Madura, Provinsi Jawa Timur dan disimpan di dalam nitrogen cair (kriopreservasi).

Hewan coba

Hewan coba yang digunakan adalah mencit DDY jantan berumur 2-3 bulan dengan bobot badan 25-30 g. Hewan tersebut diadaptasikan selama 10 hari dan diterapi dengan obat cacing, antibiotik dan anti protozoa. Selama masa penelitian, hewan coba diberi pakan pelet komersial dan minum secara *ad libitum*. Sekam sebagai alas kandang (*litter*) di *autoclave* untuk membersihkan dari kontaminan biologis lainnya.

Perbanyakan *Trypanosoma evansi* dan inokulasi pada hewan coba

Perbanyakan *T. evansi* pada hewan coba bertujuan untuk menyediakan stok isolat yang akan digunakan untuk penelitian dalam jumlah yang melimpah, yaitu dengan cara *passase* pada mencit. Stabilat *T. evansi* dari dalam nitrogen cair di-*thawing* terlebih dahulu. Selanjutnya, stabilat dicairkan dengan *Phosphate Buffer Saline Glucose* (PBSG) pH 8 hingga 0,2 mL dan diinfeksi ke mencit jantan (strain DDY) sebanyak 0,1 mL/mencit secara *intraperitoneal* (i.p). Tingkat parasitemia diamati setiap hari dengan cara melakukan pemeriksaan natif melalui pembedahan ekor.

Koleksi darah dan organ hewan coba

Darah mencit dikoleksi apabila telah mencapai puncak parasitemia (umumnya 3-4 hari pasca infeksi, untuk isolat Bangkalan). Darah mencit dikumpulkan dengan *syringe* 1 mL yang berisi antikoagulan heparin (0,1 mL) melalui jantung (*cardiac puncture*) yang sebelumnya hewan terlebih dahulu dibunuh dengan cara dislokasi.

Hewan yang telah diambil darahnya selanjutnya dibedah dan organ dikoleksi, antara lain otak, hati, paru, jantung, limpa dan ginjal. Masing-masing organ dimasukkan ke dalam kontainer plastik yang berisi ethanol 80%.

Pengawetan sampel darah dan organ untuk uji PCR

Sampel darah disimpan dalam dua metode, yaitu diteteskan ke dalam kertas saring dan disimpan langsung ke dalam tabung *Eppendorf*. Darah dalam kertas saring yang telah kering dimasukkan ke dalam kantong plastik obat secara individu dan disimpan pada suhu 4°C, sedangkan darah dalam *Eppendorf* disimpan pada suhu -20°C. Sampel organ yang berada di dalam kontainer plastik selanjutnya disimpan pada suhu -20°C sampai digunakan untuk analisis selanjutnya.

Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA sampel darah

Ekstraksi DNA dilakukan terhadap darah mencit yang telah diinfeksi isolat *Trypanosoma evansi*. Sebanyak 300 µl darah diletakkan dalam tabung mikrosentrifus bervolume 1,5 mL. Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan kit komersial *Genomic DNA Mini Kit (Blood/Cultured Cell-Geneaid)* sesuai prosedur perusahaan.

Ekstraksi DNA sampel darah dalam kertas saring

Metode ekstraksi DNA dari kertas saring dilakukan berdasarkan metode Chompoochan et al. (2005) yang dimodifikasi, yaitu dengan memotong kertas saring yang mengandung darah kemudian diekstrak mengikuti prosedur kit komersial *Genomic DNA Mini Kit (Blood/Cultured Cell-Geneaid)*.

Ekstraksi DNA sampel organ

Ekstraksi DNA dilakukan terhadap organ mencit yang telah diinfeksi isolat patogen *Trypanosoma evansi*. Sebelum diekstraksi organ disimpan dalam ethanol 80% kemudian dicuci dengan akuades steril sebanyak 3 kali dengan interval waktu 5 menit. Organ dipotong dengan berat sekitar 30 mg kemudian dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifus 1,5 ml. Organ digerus menggunakan *micropestle*. Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan kit komersial *Genomic DNA Mini Kit for tissues (Tissues-Geneaid)* sesuai prosedur perusahaan. Seluruh hasil ekstraksi genom DNA pada masing-masing jenis sampel digunakan sebagai cetakan (*template*) fragmen DNA yang akan diamplifikasi.

Primer untuk uji PCR

Sebanyak lima pasang primer diuji pada masing-masing jenis sampel (Tabel 1). Setiap pasang primer dilakukan uji 2 ulangan untuk memastikan bahwa proses amplifikasi berjalan dengan baik.

Aplikasi Uji PCR

Polymerase Chain Reaction (PCR) dilakukan dengan menggunakan KAPA 2G™ PCR Kit dalam 25 µl total campuran reaksi. Campuran reaksi terdiri dari primer Forward, primer Reverse masing-masing 25 pmol (2 µl), DNA template 25 ng (2 µl) dan ddH₂O 2,5 µl. Sekuen urutan basa primer dapat dilihat pada Tabel 1.

Amplifikasi DNA dengan PCR dilakukan dengan kondisi berikut: denaturasi awal suhu 95°C selama 30 menit, diikuti dengan denaturasi pada suhu 95°C selama 20 detik,

annealing pada suhu 57°C selama 30 detik, *elongation* pada suhu 72°C selama 30 detik sebanyak 35 siklus dan kemudian diakhiri dengan *post-elongation* selama 20 detik pada suhu 72°C.

Hasil produk PCR dari fragmen-fragmen DNA yang diamplifikasi dengan primer-primer yang berbeda difraksinasi secara elektroforesis pada gel *agarose* 1,5% selama 30 menit pada 100 volt. Pita DNA yang terbentuk diamati di atas UV *transilluminator*.

Tabel 1. Urutan basa primer untuk mengamplifikasi DNA *T. evansi*

Target	Primer	Urutan basa	Ukuran amplicon (bp)	Pustaka
ITS1	<i>forward</i>	5`-CCGGAAGTTCACCGATATTG-3`	480	Njiru (2005)
	<i>reverse</i>	5`-TGCTGCGTTCCTCAACGAA-3`		
RoTat 1,2 VSG	<i>forward</i>	5`-CTGAAGAGGTTGGAAATGGAGAAG-3`	151	Salim et al. (2011)
	<i>reverse</i>	5`-GTTTCGGTGGTTCTGTTGTTGTTA-3`		
TBR 1/2	<i>forward</i>	5`-GAATATTAACAATGCGCAG-3`	164	Masiga et al. (1992)
	<i>reverse</i>	5`-CCATTTATTAGCTTTGTTGC-3`		
ESAG 6/7	<i>forward</i>	5`-CATTCCAGCAGGAGTTGGAGG-3`	740	Isobe et al. (2003)
	<i>reverse</i>	5`-TTGTTCACTCACTCCTCTCTTTGACAG-3`		
TR3/TR4	<i>forward</i>	5`-GCGCGGATTCTTTGCAGACGA-3`	545	Sharma et al. (2013)
	<i>reverse</i>	5`-TGCAGACACTGGAATGTTACT-3`		

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolat *T. evansi* yang digunakan pada penelitian ini telah diuji patogenitasnya dan tergolong kedalam kelompok isolat yang patogen karena mampu membunuh hewan coba kurang dari satu minggu. Kematian yang disebabkan oleh isolat ini juga cenderung serentak pasca puncak tingkat parasitemia, berbeda dengan isolat non patogen yang memiliki profile parasitemia yang fluktuatif. Isolat Bangkalan dipilih sebagai isolat *T. evansi* yang diuji molekuler pada penelitian ini karena karakteristiknya yang seragam pada hewan coba.

Hasil uji PCR pada pada ketiga jenis sampel sediaan yang mengandung *T. evansi* dengan berbagai macam primer dapat dilihat pada Tabel 2. Seluruh sampel dapat teramplifikasi dengan baik meskipun menggunakan kondisi PCR yang sama. Perbedaan diantara hasil produk terletak dari ketebalan pita DNA yang dihasilkan. Hal ini dikarenakan konsentrasi pada masing-masing ekstrak genom DNA berbeda.

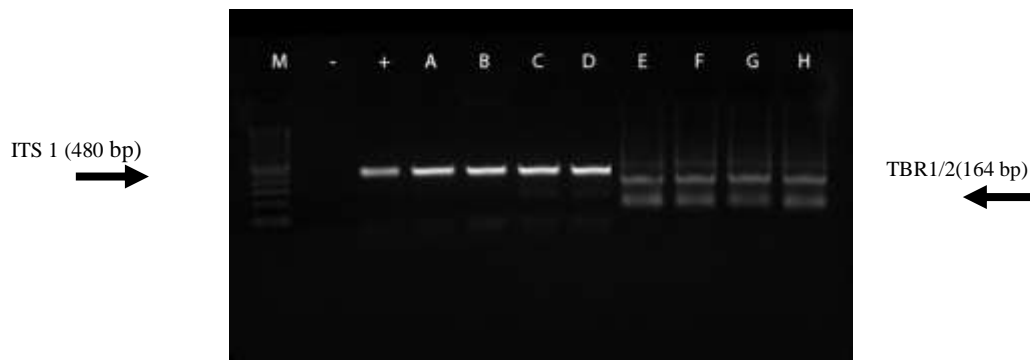
Gambar 1 menunjukkan bahwa fragmen DNA *T. evansi* dari sampel darah dan kertas saring dapat teramplifikasi dengan baik. Pita DNA dari fragmen DNA dengan primer ITS 1 terletak di posisi 480 bp baik pada sampel darah segar dalam *Eppendorf* maupun sampel darah yang diteteskan ke dalam kertas saring. Hasil yang sama juga dijumpai pada sampel yang diamplifikasi dengan primer TBR1/2. Pita DNA terletak pada posisi 164 bp. Amplifikasi dengan primer TBR 1/2 menghasilkan pita DNA lebih dari satu (ekstra pita).

Adanya ekstra pita DNA dengan primer ini bervariasi tergantung dari sampel yang diuji. Namun, apabila dalam sampel yang diuji terdapat fragmen DNA yang terletak pada posisi 164 bp maka dapat dipastikan bahwa sampel tersebut positif *T. evansi*. Demikian pula pada sampel-sampel yang diamplifikasi dengan primer ESAG 6/7, TBR1/2, TR3/TR4 menunjukkan hasil yang pita DNA dengan intensitas yang baik. Hasil ini membuktikan

bahwa primer-primer yang diuji sesuai untuk diaplikasikan pada sampel darah dan kertas saring yang mengandung *T. evansi*.

Tabel 2. Hasil uji PCR pada jenis sampel yang berbeda dan diamplifikasi menggunakan lima set primer

Jenis sampel	n	Jenis primer					
		ITS 1	RoTat 1.2 VSG	TBR 1/2	ESAG 6/7	TR3/TR4	
Darah	Dalam Eppendorf	1	+	+	+	+	+
		2	+	+	+	+	+
	Dalam kertas saring	1	+	+	+	+	+
		2	+	+	+	+	+
Organ	Otak	1	+	+	+	+	+
		2	+	+	+	+	+
	Hati	1	+	+	+	+	+
		2	+	+	+	+	+
	Paru	1	+	+	+	+	+
		2	+	+	+	+	+
	Jantung	1	+	+	+	+	+
		2	+	+	+	+	+
	Limpa	1	+	+	+	+	+
		2	+	+	+	+	+
	Ginjal	1	+	+	+	+	+
		2	+	+	+	+	+

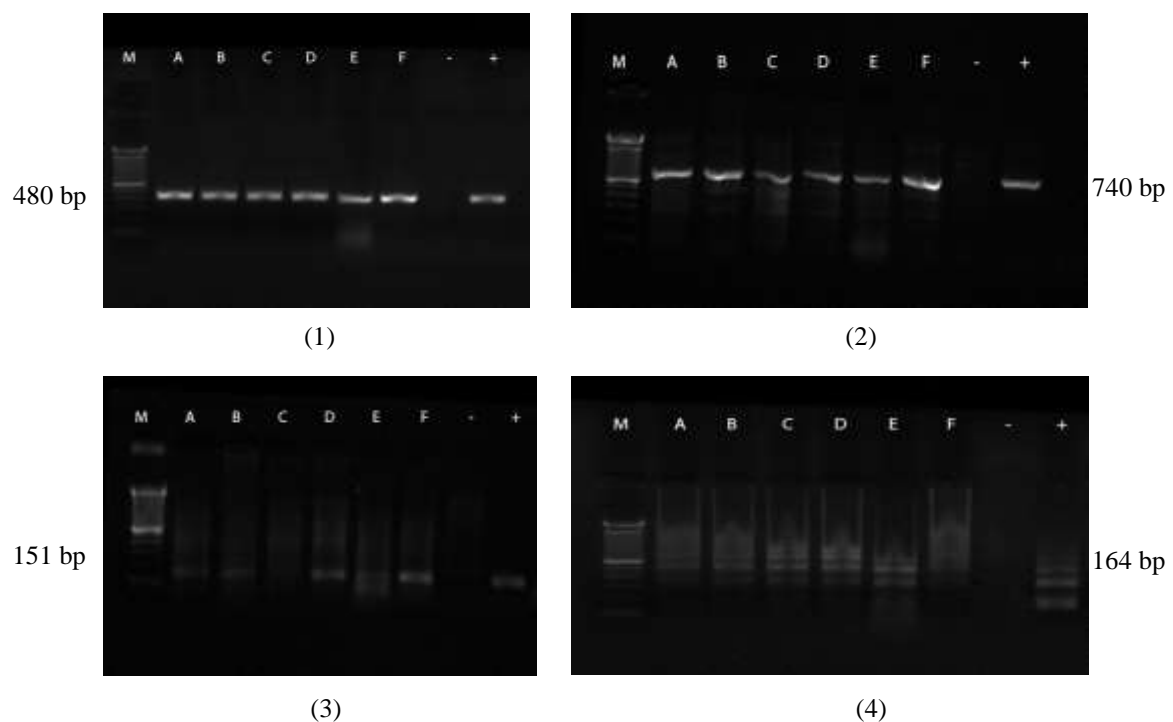


Gambar 1. Pita DNA *T. evansi* dari sampel darah yang diamplifikasi dari sampel darah segar dan kertas saring dengan dua pasang primer yang berbeda. M: Marker; -: kontrol negatif; +: kontrol positif (Fragmen ITS 1); A-B sampel darah-primer ITS 1; C-D: sampel kertas saring-ITS 1; E-F: sampel darah-primer TBR1/TBR2; dan G-H: sampel kertas saring-primer TBR1/TBR 2

Sampel-sampel dari organ juga memberikan hasil yang sama. Kontrol positif teramplifikasi dengan baik (primer ITS 1) dan pada kolom kontrol negatif tidak dijumpai adanya pita DNA. Hasil ini mengindikasikan bahwa selama proses persiapan ekstraksi DNA dan PCR tidak terjadi kontaminasi. Produk PCR dari masing-masing kolom menunjukkan bahwa pita fragmen DNA ITS 1 telah berhasil diamplifikasi (480 bp)

(Gambar 2.1). Demikian pula pada fragmen DNA dengan primer ESAG 6/7-740 bp (Gambar 2.2), primer RoTat 1,2 VSG-151 bp (Gambar 2.3), primer TBR1/2-164 bp (Gambar 2.4) dan primer TR3/4-545 bp (Gambar tidak ditampilkan).

Meskipun semua pita DNA yang teramplifikasi dengan baik, tetapi jika dibandingkan dengan tampilan gambar, kemudahan dalam mendeteksi dan konsistensi hasil menunjukkan bahwa primer ITS 1 dan ESAG 6/7 memberikan tampilan yang jelas. Fragmen DNA yang diamplifikasi dengan primer RoTat 1,2 VSG pada organ paru (Gambar 2.3C) terlihat tipis dibandingkan organ yang lainnya. Hasil ini diduga karena beberapa faktor, yaitu kuantitas dan kualitas DNA, proses ekstraksi DNA, jumlah parasitemia pada sampel dan desain primer yang sesuai (MacLeod et al. 1997; Desquesnes & Davila 2002; Desquesnes 2004; Gonzales et al. 2006). Hasil amplifikasi fragmen DNA dengan primer TBR1/2 memberikan hasil pita DNA lebih dari satu, sedangkan untuk primer TR3/TR4 memberikan gambaran pita DNA tunggal.



Gambar 2. Pita DNA *T. evansi* dari sampel organ mencit yang diamplifikasi dengan berbagai macam primer. 1: Primer ITS 1 (480 bp); 2: Primer ESAG 6/7 (740 bp); 3: Primer RoTat 1,2 VSG (151 bp); dan 4: Primer TBR1/2 (164 bp); M: Marker, -: kontrol negatif; +: kontrol positif (480 bp). A: otak; B: hati; C: paru; D: jantung; E: limpa; F: ginjal

Desquesnes et al. 2002 melaporkan bahwa primer ITS 1 mampu mengidentifikasi beberapa spesies *Trypanosoma* karena memiliki variasi ukuran untuk spesies tertentu. Panjang produk PCR ITS1 pada beberapa spesies *Trypanosoma* antara lain 700 bp untuk *T. congolense savannah*, 400 bp untuk *T. Simiae*, 250 bp untuk *T. vivax* dan 480 bp untuk *T. evansi*. Ukuran panjang fragmen ITS 1 *T. evansi* sama dengan ukuran fragmen DNA *T. brucei sub spesies* (Verloo et al. 2001). Primer ini telah banyak digunakan untuk studi molekuler epidemiologi pada trypanosomiasis Afrika yang patogen (Salim et al. 2011). Primer ini memiliki kelebihan dibandingkan dengan primer yang lain, yaitu dapat menggambarkan produk PCR yang berbeda apabila dalam sebuah sampel terjadi dua atau lebih spesies *Trypanosoma* yang menginfeksi ternak. Njiru et al. (2005) menyatakan bahwa primer ITS 1 mampu mengidentifikasi spesies *Trypanosoma* secara simultan pada

sampel yang diinfeksi dengan lebih dari satu jenis *Trypanosoma*. Di Brazil, primer ini mampu mengidentifikasi adanya multi infestasi *Trypanosoma* pada kerbau dan sapi (Davila et al. 2003) sehingga dapat menekan biaya diagnosis dan memberikan hasil yang lebih cepat dibandingkan dengan primer tunggal untuk satu jenis *Trypanosoma*.

Primer ESAG 6/7 juga memberikan hasil produk PCR yang bagus yang ditandai dengan adanya visualisasi pita DNA dengan intensitas yang jelas (740 bp) pada seluruh organ yang diuji. Sensitivitas primer ESAG 6/7 dengan fragmen yang lebih pendek (237 bp) diuji oleh Fernandez et al. (2009); Holland et al. (2001) dan berhasil mengamplifikasi fragmen DNA dari sampel darah rodent dan kerbau-kerbau di Vietnam, termasuk DNA murni *T. evansi*. Namun demikian, Pruvot et al. (2010) melaporkan bahwa primer ESAG 6/7 dengan fragmen yang lebih pendek kurang spesifik untuk sapi-sapi perah, khususnya di Thailand. Produk PCR yang dihasilkan menunjukkan adanya sejumlah pita DNA non spesifik yang dapat menyebabkan interpretasi yang salah terhadap sampel yang diuji. Lebih lanjut dijelaskan bahwa primer ESAG 6/7 (237 bp) mempunyai reaksi silang dengan sapi yang terinfeksi *Babesia* sp. Primer ESAG 6/7 pada penelitian ini mengamplifikasi fragmen yang lebih panjang, tetapi belum pernah diuji coba pada sampel di lapang, sehingga belum diperoleh data apakah cukup sensitif untuk mendeteksi *T. evansi* dari sampel sapi potong, sapi perah, kuda, kerbau atau yang lainnya. Sejauh ini, amplifikasi DNA *T. evansi* yang diekstrak dari sampel darah dan organ mencit memberikan hasil yang bagus.

Primer Ro Tat 1,2 VSG adalah jenis varian primer yang hanya dimiliki oleh *Trypanosoma evansi* (Verloo et al. 2001). Primer ini mampu membedakan *Trypanosoma evansi* dari *T. brucei*. Menurut Urakawa et al. 2001 bahwa dalam keadaan normal seluruh *T. evansi* mengekspresikan gen RoTat 1,2 VSG. Pengujian PCR spesifik untuk *T. evansi* dengan menggunakan Rotat 1.2 VSG memiliki ukuran 151 bp (Konnai et al. 2009). Namun primer ini tidak selalu memberikan hasil yang memuaskan. Salim et al. 2011 melaporkan bahwa primer RoTat 1,2 VSG hanya mampu mendeteksi 13 sampel dari 30 sampel darah unta yang mengandung *T. evansi* di Sudan. Hasil yang sama juga diperoleh dari penelitian Claes et al. (2004); Ngaira et al. (2004) yang mendapatkan hasil negatif pada beberapa sampel dari Kenya. Studi lebih lanjut menunjukkan bahwa *T. evansi* yang berasal dari Kenya merupakan kelompok strain tipe B, sedangkan primer RoTat 1,2 VSG hanya mampu mengamplifikasi fragmen DNA dari kelompok strain tipe A (Claes et al. 2004). Hasil penelitian pada studi ini juga menunjukkan bahwa sampel organ paru mencit menghasilkan pita DNA *T. evansi* yang lebih tipis dibandingkan organ-organ lainnya.

Menurut Ashour et al. (2013) menyebutkan bahwa perbedaan intensitas pita DNA dapat dipengaruhi oleh jumlah infeksi *T. evansi* dalam darah. Namun hasil amplifikasi dari organ-organ yang lain memberikan hasil pita DNA dengan intensitas yang baik, sehingga jumlah parasit didalam organ dapat dikatakan cukup untuk diamplifikasi. Diduga produk PCR dengan primer RoTat 1,2 VSG akan menampilkan pita DNA dengan intensitas yang lebih baik apabila jumlah *T. evansi* dalam sampel tinggi.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa produk PCR yang diamplifikasi dengan primer TBR1/2 pada semua sampel organ mencit menghasilkan pita DNA lebih dari satu (*dimers* atau *trimmers*). Hasil yang sama juga dilaporkan oleh Fernandez et al. (2009) dan Ashour et al. (2013). Keadaan ini diduga karena adanya *tandem repeat nature* dari target DNA (Fernandez et al. 2009). Lebih lanjut dijelaskan oleh Ashour et al. (2013) bahwa adanya multi pita DNA pada primer TBR1/2 diduga karena adanya ko-amplifikasi sebagai akibat dari penempelan primer dalam daerah yang berulang (*repeated regions*) pada genom DNA *Trypanosoma*. Keadaan ini juga dapat diakibatkan karena jumlah cetakan DNA yang melimpah (Pereira et al. 1998). Disamping mampu mendeteksi *T. evansi*, primer ini juga dapat mengamplifikasi DNA *T. brucei* dengan ukuran pita DNA

lebih pendek dari 164 bp (Ashour et al. 2013). Namun menurut Fernandez et al. (2009) bahwa primer TBR1/2 tidak menyebabkan reaksi silang dengan *T. vivax* dan mampu mendeteksi *T. evansi* dari inang yang berbeda-beda di daerah Venezuela.

Berbeda dengan primer ESAG 6/7, primer TR3/TR4 dilaporkan tidak menimbulkan reaksi silang terhadap parasit *Babesia bigemina*, *Theileria annulata*, *Leucocyte sp*, dan *Anaplasma marginale*. Sharma et al. (2013) melakukan penelitian pada darah yang mengandung *T. evansi* dan *B. bigemina* dan hanya memperoleh produk PCR fragmen DNA *T. evansi* dengan primer ini. Lebih lanjut dijelaskan bahwa kedua parasit tersebut merupakan infeksi laten yang umum menyerang sapi dan kerbau, sehingga primer TR3/TR4 dapat direkomendasikan untuk membedakan deteksi tepat kedua trypanosomiasis dan babesiosis. Disamping itu, primer TR3/TR4 dapat diamplifikasi dengan metode *Duplex* PCR sehingga lebih hemat sebagai piranti diagnostik pada ternak.

KESIMPULAN

Primer yang digunakan dalam penelitian ini (ITS1, ESAG 6/7, RoTat 1.2 VSG, TBR1/2 dan TR3/TR4) mampu mendeteksi *T. evansi* pada semua jenis sampel yaitu darah, kertas saring dan organ mencit yang diinfeksi *T. evansi*. Untuk kepentingan diagnosis, primer ITS 1 dapat direkomendasikan karena mampu membedakan spesies *Trypanosoma* pada ternak yang menghasilkan DNA pita tunggal dengan intensitas yang baik.

Untuk kepentingan diagnosis, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai sensitivitas primer terhadap sampel darah dan organ yang diuji pada berbagai rentang waktu pasca-diinfeksi.

DAFTAR PUSTAKA

- Adrian SM, Rehana AS, Hassan L, Wong MT. 2010. Outbreaks of trypanosomiasis and the seroprevalence of *Trypanosoma evansi* in a deer breeding centre in Perak, Malaysia. *Trop. Anim. Health. Product.* 42: 145-150.
- Ahmed HA, Picozzi K, Welbum SC, Macleod ET. 2013. A comparative evaluation of PCR- based methods for species-specific determination of African animal trypanosomes in Ugandan cattle. *Parasit Vectors.* 6: 316.
- Ashour AA, El-Naga TRA, Barghash SM, Salama MS. 2013. *Trypanosoma evansi* : Detection *Trypanosoma evansi* DNA in naturally and experimentally infected animals using TBR1 and TBR2 primers. *Experimental Parasitology.* 134:109-114.
- Baticados WN, Castroand LD, Baticados AM. 2011. Parasitological and PCR detection of *Trypanosoma evansi* in buffaloes from Luzon, Philippines. *Ceylon J Sci.* 40:41-146.
- Claes F, Radwanska M, Urakawa T, Majiwa PAO, Goddeeris B, Buscher P. 2004. Variabl surface glycoprotein RoTat 1.2 PCR as a specific diagnostic tool for the detection of *Trypanosoma evansi* infections. *Kinetoplastid Biology and Disease.* 3:1-6.
- Clausen PH, Wiemann A, Patzelt R, Kakaire D, Poetzsch C, Peregrine A, Mehltitz D. 1998. Use of a PCR assay for the specific and sensitive detection of *Trypanosome* spp. In naturally infected dairy cattle in peri urban Kampala, Uganda. *Annals of the New York Academy of Science.* 849:21-31
- Dargantes AP, Reid SA, Copeman DB. 2005b. Experimental *Trypanosoma evansi* Infection in the Goat. I. Clinical Signs and Clinical Pathology. *J. Comp. Pathol.* 133:261-266.
- Dargantes AP. 2010. Epidemiology, control and potential insect vectors of *Trypanosoma evansi* (surra) in village livestock in southern Philippines (Tesis). [Murdoch (Australia)]: Murdoch University.

- Dávila AM, Herrera HM, Schlebinger T, Souza SS, Traub-Cseko YM. 2003. Using PCR for unraveling the cryptic epizootiology of livestock trypanosomosis in the Pantanal, Brazil. *Vet Parasitol.* 117:1-13.
- Desquesnes M, Davila AMR. 2002. Application of PCR-based tools for detection and identification of animal trypanosomes: a review and perspectives. *Vet. Parasitol.* 109:213-231.
- Desquesnes M, Gerald ML, Zoungrana A, Davila AMR. 2001. Detection and identification of *Trypanosoma* of Africa livestock through a single PCR based on internal transcribed spacer 1 of rDNA. *Int. J. Parasitol.* 31:610-614.
- Desquesnes M, Helzmuller P, Lai DH, Dargantes A, Lun ZR, Jittapalapong S. 2013. *Trypanosoma evansi* and Surra: A Review and perspectives on origin, history, distribution, taxonomy, morphology, hosts, and pathogenic effects. *Biomed Research International*. Volume 2013. Article ID 194176, 22 pages.
- Desquesnes M. 2004. Diagnosis and overall epidemiology. In : *Livestock Trypanosomoses and their vectors in Latin America*. CIRAD French Agricultural Research Centre for International Development. OIE, Paris, France. Chapter 4-5:pp.65-108
- Fernandez D, Gonzalez-Baradat B, Eleizalde M, Gonzalez-Marcano E, Perrone T, Mendoza M. 2009. *Trypanosoma evansi*: A comparison of PCR and parasitological diagnostic tests in experimentally infected mice. *Exp. Parasitol.* 121:1-7.
- Gonzales JL, Loza A, Chacon E. 2006. Sensitivity of different *Trypanosoma vivax* specific primers for the diagnosis of livestock trypanosomiasis using different DNA extraction methods. *Vet Parasitology.* 136:119-126.
- Handayani S, Prijanto M, Siburian F, Mariani S, SW Hambrah. 2004. Penggunaan Kertas Saring untuk Pemeriksaan Titer Antibodi Meningitis Meningokokus Serogrup A dan C pada Jamaah Haji. *Puslitbang Pemberantasan Penyakit. Badan Litbang Kesehatan. Jakarta (Indonesia): Media Litbang Kesehatan.* 2.
- Holland WG, Claes F, My LN, Thanh NG, Tam PT, Verloo D, Buscher P, Godderis B, Vercruyse J. 2001. A comparative evaluation of parasitological tests and a PCR for *Trypanosoma evansi* diagnosis in experimentally infected water buffaloes. *Vet Parasitology.* 97:23-33.
- Isobe T, Holmes E, Rudenko G. 2003. The transferrin reseptor genes of *Trypanosoma equiperdum* are less diverse in the transferrin binding site than those of the broad-host range *Trypanosoma brucei*. *J Mol. Evol.* 56:377-386
- Kabiri M, Steverding D. 2001. *Trypanosoma evansi* : demonstration of transferrin receptor derived from expression site associated genes 6 and 7. *Journal of Parasitology.* 87:1189-1191.
- Konnai S, Mekata H, Mingala CN, Abes NS, Gutierrez CA, Herrera JR, Dargantes AP, Witola WH, Cruz LC, Inoue N, Onuma M, Ohashi K. 2009. Development and application of a quantitative real time PCR for the diagnosis of surra in water buffaloes. *Infect Genet Evol.* 9: 449-452.
- MacLeod A, Turner CM, Tait A. 1997. Detection of single copy gene sequences fom single trypanosomes. *Molecular and Biochemical Parasitology.* 84:267-270.
- Masiga DK, Smyth AJ, Hayes P, Bromidge TJ, Gibson WC. 1992. Sensitive detection of Trypanosomes in tsetse flies by DNA amplification. *J Parasitol.* 22:909-918.
- My LN, Holland WG, Tam PT, Thanh NG, Hoan DH. 2000. Comparative study of techniques for diagnosis of *Trypanosoma evansi* in buffaloes. *Vet Sci Tech.* 7:6-14.
- Ngaira JM, Njagi ENM, Ngeranwa, JJN, Olembo NK. 2004. PCR amplification of RoTat 1.2 VSG gene in *Trypanosoma evansi* isolates in Kenya. *Vet Parasitol.* 120: 3-33.

- Njiru ZK, Constantie CC, Guya S, Crowther J, Kiragu JM, Thompson RC, Davilla AM. 2005. The use of ITS 1 rDNA PCR in detecting pathogenic African Trypanosomes. *Parasitol Res.* 95: 186-192.
- OIE. 2009. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccine for Terrestrial Animals*. New York (USA): Academic Press.
- Otranto D and Stevens JR. 2002. Molecular approaches to the study of myiasis-causing larvae. *Int. J Parasitol.* 32:1345-1360.
- Pereira de Almeida PJL, Ndao M, Goossens B, Osaer S. 1998. PCR primer evaluation for the detection of trypanosome DNA in naturally infected goats. *Veterinary Parasitology.* 80:111-116.
- Privot M, Kamyngkird K, Desquesnes M, Sarataphan N, Jittapalapong S. 2010. A Comparison of six primers sets for Detection of *Trypanosoma evansi* by polymerase chain reaction in rodents and Thai livestock. *J Vet Parasitol.* 171:185-193.
- Reid SA, Husein A, Copeman DB. 2001a. Evaluation and improvement of parasitological tests for *Trypanosoma evansi* infection. *Vet Parasitol.* 102:291-297.
- Reid SA, Husein A. Partoutomo, Copeman S. 2001b. The susceptibility of two species of wallaby to infection with *Trypanosoma evansi*. *I.* 79:285-288.
- Rodrigues A, Figuera RA, Souza TM, Schild AL, Barros CSL. 2009. Neuropathology of naturally occurring *Trypanosoma evansi* infection of horses. *Vet. Pathol.* 46:251-258.
- Salim B, Bakheit MA, Kamau J, Nakamural I, Sugimoto C, 2011. Molecular epidemiology of camel trypanosomiasis based on ITS1 rDNA and RoTat 1.2 VSG gene in the Sudan. *Parasit. Vectors* 4:31.
- Sharma A, Singla LD, Tuli A, Kaur P, Batth BK, Javed M, Juyal PD. 2013. Molecular prevalence of *Babesia bigemina* and *Trypanosoma evansi* in dairy animals from Punjab, India, by duplex PCR: a step forward to the detection and management of concurrent latent infections. *Biomed Research International.* 1-8.
- Urukawa T, Verloo D, Moens L, Buscher P, Majiwa PAO. 2001. *Trypanosoma evansi*: cloning and expression in *Spodoptera fugiperda* insect cells of the diagnostic antigen Rotat 1.2. *Experimental Parasitology.* 99:181-189.
- Vellayan S, Mohamad A, Radcliffe RW, Lowenstine LJ, Epstein J, Reid SA, Paglia DE, Radcliffe RM, Roth TL, Foose TJ, Khan M, Jayam V, Reza S, Abraham M. 2004. Trypanosomiasis (Surra) in The Captive Sumatran Rhinoceros (*Dicerorhinus Sumatrensis Sumatrensis*) in Peninsular Malaysia. *Proceedings of the International Conference of the Association of Institutions for Tropical Veterinary Medicine.* 11:187-189.
- Verloo D, Magnus E, Buscher P. 2001. General expression of RoTat 1.2 variable antigen type in *Trypanosoma evansi* isolates from different origin. *Vet Parasitol.* 97:183-189.