



KARAKTERISASI MOLEKULER DAN KAJIAN FILOGENETIK TRYPANOSOMA EVANSI ISOLAT ACEH BERDASARKAN GEN RoTat.1.2 DAN SEKUENSING DNA

Seminar Hasil Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat (LPPM) Unsyiah Tahun 2018

AI Azhar, Yudha Fahrimal, Erina
SUMBER DANA: PNPB



PENDAHULUAN

- Tripanosomiasis hewan merupakan penyakit parasit endemik yang sangat mempengaruhi sosioekonomi dan produktivitas hewan di dunia¹⁻², dengan total kerugian lebih dari 1,5 milyar dolar per tahun³.
- Salah satu Trypanozoon patogen penyebab tripanosomiasis hewan adalah *Trypanosoma evansi* (*T. evansi*)⁴.
- *T. evansi* disebarkan secara mekanis dan menginfeksi ternak piara dan hewan liar daerah tropis dan subtropis Afrika Utara, Asia Tenggara, Amerika Tengah dan Selatan^{2, 5-6}
- *T. evansi* secara biologi sangat mirip dengan *T. equiperdum*⁷, dan secara morfologi sukar dibedakan dari *T. brucei* and *T. equiperdum*⁷⁻⁸.
- Strain *T. evansi* dari sumber inang dan daerah geografi berbeda sukar dibedakan¹⁰.
- Karakterisasi molekuler menunjukkan strain *T. evansi* yang diisolasi di Asia, Afrika dan Amerika Selatan sangat homogen¹⁰.
- Metode molekuler dengan marker spesifik dilakukan di banyak negara untuk karakterisasi lebih baik :
 - Amplifikasi PCR gen dengan primer TBR¹¹, TEPAN¹², TE2249/2250¹³
 - dan RoTat¹⁴⁻¹⁵
 - Teknik lain yang dikatakan spesifik dan cepat adalah *loop-mediated isothermal amplification* (LAMP)¹⁶ dan Taqman¹⁷.
- Penelitian epidemiologi menunjukkan variasi prevalensi tripanosomiasis pada sapi dan kebau di sejumlah daerah di Aceh seperti Aceh Besar, Aceh Barat, Aceh Utara dan Simeulue¹⁸.
- Jenis tripanosoma penyebab tripanosomiasis di Aceh tidak diketahui karena belum dilakukan karakterisasi molekuler dan uji filogenetik.

METODE PENELITIAN

Lokasi Penelitian

RPH Kota Banda Aceh, peternakan di Pidie Jaya, Lab. Diagnostik Dinas Peternakan Pidie Jaya, Lab. Riset dan Lab Parasitologi FKH UNSYIAH.

Subjek dan Sampel Penelitian

Subjek adalah 149 ekor sapi lokal umur 1-8 tahun (13 di Banda Aceh, 86 di Aceh Besar dan 50 di Pidie Jaya). Darah (2-3 ml) diambil dari vena jugularis subjek dengan venoject Vacutainer™ dan antikoagulan EDTA¹⁶.

Deteksi *Trypanosoma* pada sampel darah:

Dengan metode sentrifugasi mikrohematokrit¹⁶.

Isolasi DNA *Trypanosoma*

DNA genom diisolasi dengan kit Wizard™ DNA Purification kit (Promega).

Konfirmasi Molekuler dengan PCR

Gen RoTat1.2 (205 bp) diamplifikasi dengan primer 5'-GCGGGGTGTTTAAAGCA ATA-3' (*forward*) dan 5'-ATTAGTGCTGCGTGTGTTTCG-3' (*reverse*)²⁴⁻²⁵. Reaksi PCR (25 µl) mengandung 50 ng DNA dan 12.5 µl master mix (Promega). Kondisi PCR (41 siklus): predenaturasi 94° C, 3 menit (min); denaturasi 94° C, 1 min; anealling 57° C, 1 min; Ekstensi 72° C, 1 min; ekstensi akhir 72° C, 5 min. Elektroforesis (80V, 1 jam) pada agarosa 1.5% mengandung GelRed 1 µg/ml²⁶.

Karakterisasi Molekuler *T. evansi*

DNA yang dengan uji konfirmasi PCR diamplifikasi dengan primer TR3 (5'-GCGCGGATTCTTTGCAGACGA-3') dan TR4 (5'-TGCAGACACTGGAATGTTA CT-3')²⁷. Reaksi PCR (50 µl) mengandung 100 ng DNA dan 25 µl *master mix* (Promega). Kondisi/siklus PCR dan elektroforesis sama dengan yang digunakan untuk PCR gen RoTat1.2. Produk (257 bp) dikirim ke PT Genetika Science untuk disekuensing. Urutan DNA disejajarkan dengan program ClustalW daring. Pohon filogenetik dibuat dengan program Muscle daring¹⁷.

HASIL PENELITIAN

Uji Sentrifugasi Mikrohematokrit

- Tripanosoma berhasil dideteksi pada 1 dari 13 (7,63%) sapi di Banda Aceh, 8 dari 86 (9,3%) sapi di Aceh Besar dan pada 18 dari 50 (36%) sapi di Pidie Jaya.

No	Asal Sampel	Jumlah	Positif		Positif	
			Hematokrit	Prevalensi (%)	Molekuler	Prevalensi (%)
1	Aceh Besar	86	8	9.30	8	9.30
2	Banda Aceh	13	1	7.69	1	7.69
3	Pidie Jaya	50	18	36.00	32	64.00
Jumlah		149	27	18.12	41	27.52

Konfirmasi Molekuler berdasarkan Gen RoTat1.2

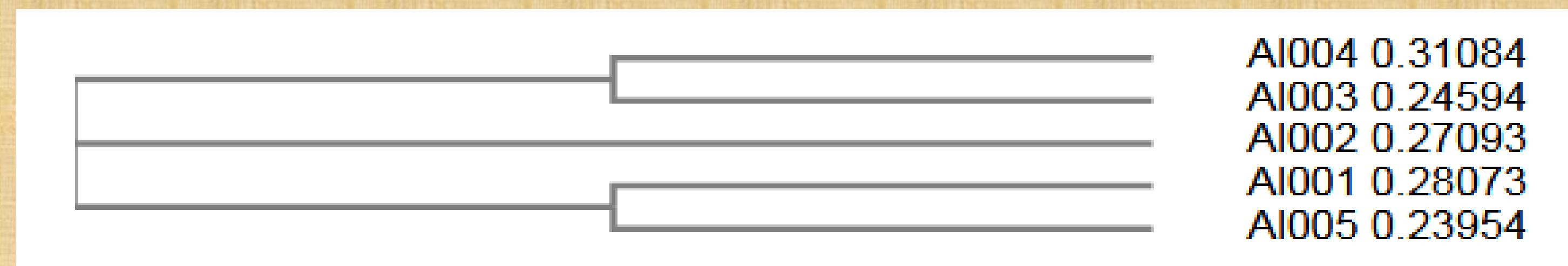
- Dari konfirmasi molekuler terhadap isolat yang diperoleh hasil bahwa sampel yang terdeteksi positif mengandung DNA *T. evansi* di daerah Pidie jaya bertambah dari 18 menjadi 32 sehingga prevalensi tripanosomiasis pada ternak sapi yang diperiksa di daerah tersebut meningkat dari 36% menjadi 64%.
- Hasil ini menunjukkan bahwa deteksi tripanosomiasis dengan metode molekuler prevalensi dengan menggunakan primer spesifik mengenali fragmen DNA Rotat.1.2 *T. evansi* memberikan hasil yang lebih akurat.
- Temuan ini sejalan dengan hasil pernyataan bahwa penggunaan metode molekuler seperti PCR dengan primer yang mengenali urutan DNA yang spesifik mampu memberikan hasil identifikasi yang lebih tinggi dalam mendeteksi keberadaan mikroorganisme¹⁹.

Konfirmasi Molekuler berdasarkan Gen RoTat1.2

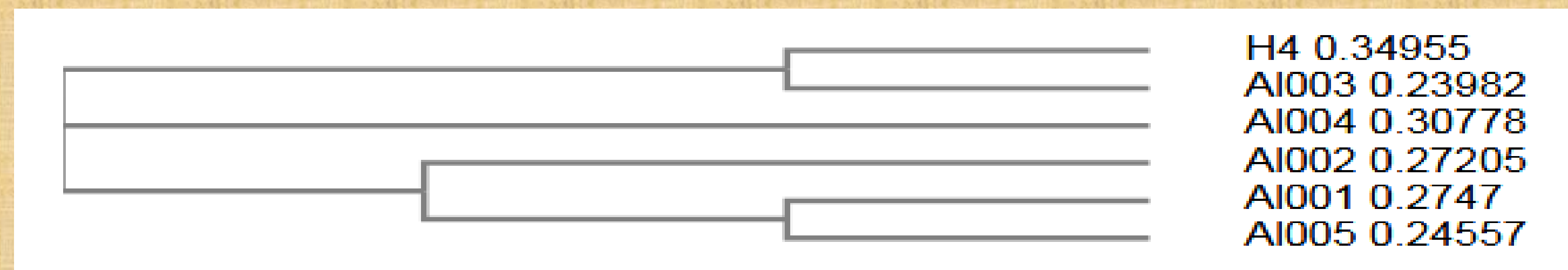
- Amplifikasi PCR gen *repetitive sequence* *T. evansi* (*T. evansi repetitive sequence*, TR) menggunakan primer TR3/TR4 dilakukan terhadap 10 sampel DNA menunjukkan fragmen DNA TR berukuran 257 bp²⁰ berhasil diamplifikasi dari semua sampel.
- Beberapa produk PCR disekuensing dengan jasa komersial PT Genetika Science Indonesia. Urutan nukleotida yang diperoleh kemudian ditentukan kesamaannya satu sama lain dan dengan satu urutan gen TR *T. evansi* negara lain menggunakan program Clustal Omega daring.

Strain	H4	AL001	AL002	AL003	AL004	AL005
H4		88.0	80.0	85.1	79.1	77.8
AL001	88.0		81.8	95.7	78.8	89.9
AL002	80.0	81.8		89.5	86.6	79.0
AL003	85.1	95.7	89.5		79.0	90.4
AL004	79.1	78.8	86.6	89.9		77.9
AL005	77.8	89.9	79.0	90.4	77.9	

- Analisis filogenetik isolat *T. evansi* yang diperoleh, baik satu sama lain (AI001-AI005) maupun dengan urutan isolat negara lain (H4) dilakukan menggunakan program Muscle daring.

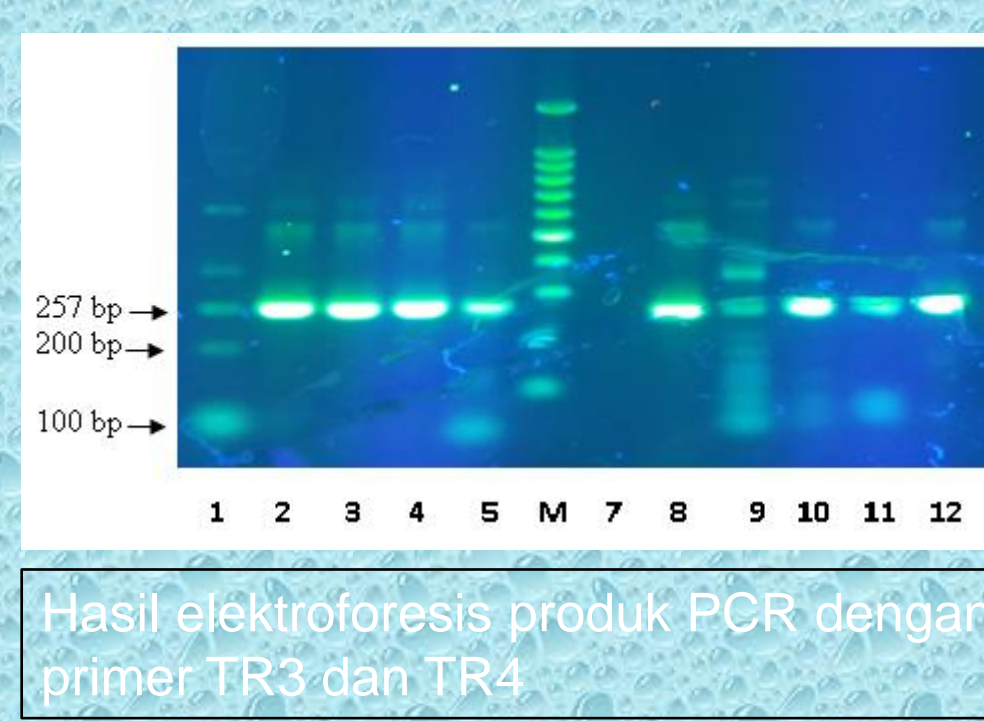
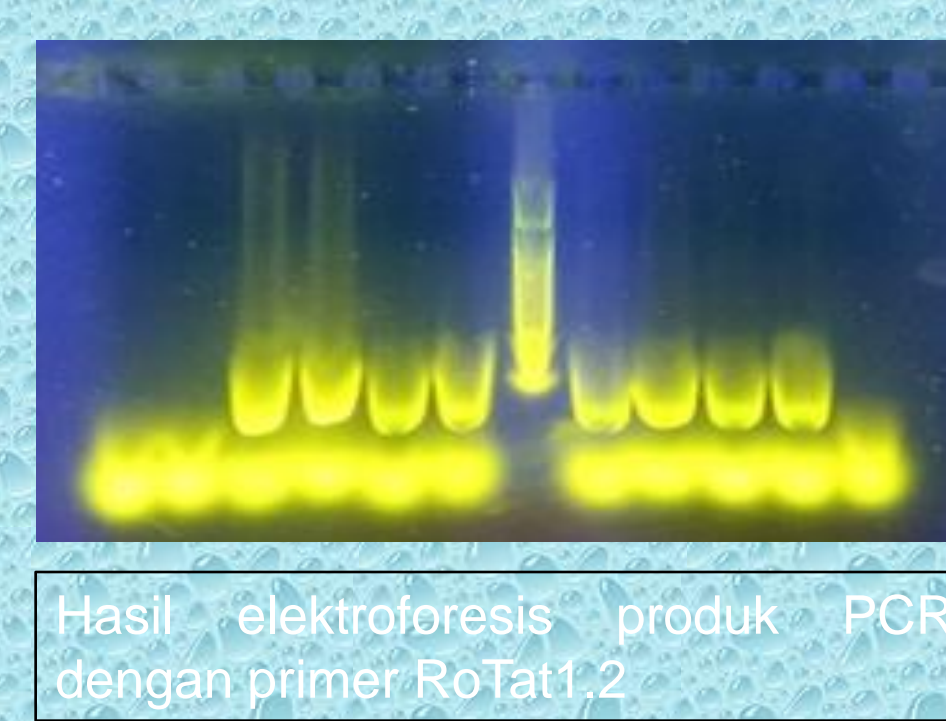
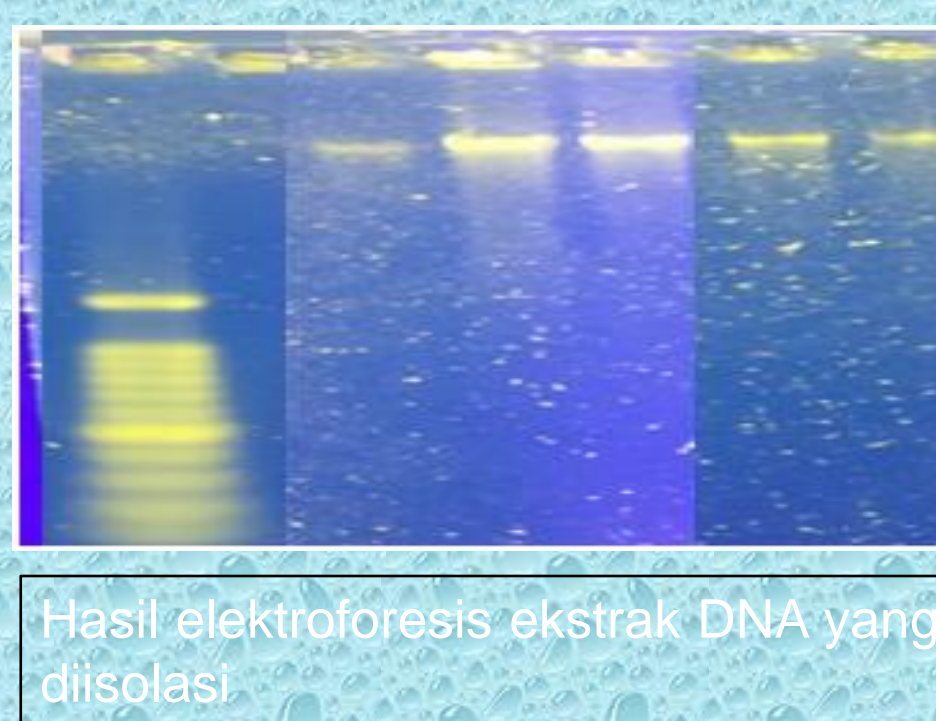


- *Trypanosoma evansi* isolat Aceh terdapat pada tiga kluster terpisah dalam pohon filogenetik. Kluster 1 terdiri atas isolat AI003 dan AI004, kluster 2 terdiri dari isolat AI002, dan kluster 3 terdiri atas isolat AI001 dan AI005.



- *Trypanosoma evansi* isolat luar Indonesia (H4) lebih dekat kekerabatannya dengan *T. evansi* isolat Aceh AI003 dibandingkan *T. evansi* isolat Aceh lain.

DOKUMENTASI KEGIATAN



KESIMPULAN

1. Kabupaten Pidie Jaya memiliki tingkat prevalensi tripanosomiasis tertinggi (64%), diikuti oleh Kabupaten Aceh Besar (9,30%) dan Kota Banda Aceh (7.69%).
2. Konfirmasi molekuler berdasarkan gen RoTat1.2 lebih sensitif dan spesifik dalam mendeteksi terdapatnya *T. evansi* dalam isolat klinis daripada metode mikrohematokrit.
3. *Trypanosoma evansi* isolat Aceh terdiri atas beberapa strain yang berbeda dan tidak sama dengan isolat luar Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

1. Desquesnes M, Holzmüller P, Lai DH, Dargantes A, Lun ZR, Jittapalapong S. 2013a. *Trypanosoma evansi* and Surra: A Review and Perspectives on Origin, History, Distribution, Taxonomy, Morphology, Hosts, and Pathogenic Effects. *Bio Med Res Int*. 2013;1:20.
2. Luckins AG dan Dwyer RH. 2004. Non-tsetse-transmitted Animal Trypanosomiasis. In: Maudlin I, Holmes PH, Miles MA, editors. *The Trypanosomiasis*. CABI Publishing, Oxfordshire.
3. Bilew M, Amide Y, Zenebe T dan Degefu H. 2011. Trypanosomiasis Infection Rate in *G. pallidipes* and *G. fuscipes* in Gojeb Valley, *Southwest Ethiopia*. *Global Veterinaria*, 6 (2): 131-135. Sánchez et al., 2015).
4. Sánchez E, Penone T, Recchiniuzzi G, Cardoso I, Bilew N, Aso MP, A. Mijares A, Baltz T, Benhier D, Balzano-Nogueira, and Ml Conzatti IM. 2015. Molecular characterization and classification of *Trypanosoma* spp. Venezuelan isolates based on microsatellite markers and kinetoplast maxicircle genes. *Parasites and Vectors*: 1-11.
5. Villareal MV, Mingala CN, Rivera WL. 2013. Molecular characterization of *Trypanosoma evansi* isolates from water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in the Philippines. *Acta Parasitol* 58(1): 6-12.
6. Desquesnes M, Dargantes A, Lai DH, Lun ZR, Holzmüller P, Jittapalapong S. 2013b. *Trypanosoma evansi* and Surra: A Review and Perspectives on Transmission, Epidemiology and Control, Impact, and Zoonotic Aspects. *Bio Med Res Int*. 2013(2): 95–107.
7. Brun R, Hecker H, dan Lun ZR. 1998. *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum*: distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship (a review). *Vet. Parasitol*. 79(2): 95–107.
8. Wei Y, Wen Y-Z, Desquesnes M., Lun, Z-R. 2011. Molecular Epidemiology of *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum* and Atypical Human Infection by Animal Trypanosomes. In: *The Molecular Epidemiology of Trypanosomes and Leishmaniasis*. Geoff Hide, NY (USA). Claes F, Radwanska M, Urakawa T, Majiwa PA, Goddeeris BM, et al. 2004. Variable surface glycoprotein RoTat 1.2 PCR as a specific diagnostic tool for the detection of *Trypanosoma evansi* infections. *Kinetoplast Biol Dis* 3: 3.
9. Hoare CA. 1972. *The Trypanosomes of mammals*. A zoological monograph. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
10. Ventura RM, Takata CS, Silva RA, Nunes VL, Takeda GF, and Teixeira MM. 2002. Molecular and morphological studies of Brazilian *Trypanosoma evansi* stocks: the total absence of kDNA in trypanosomes from both laboratory stocks and naturally infected domestic and wild mammals. *Parasitol* 96 (6): 1289-98.
11. Masiga DK, Smyth AJ, Hayes P, Bromidge TJ, Gibson WC. 1992. Sensitive detection of trypanosomes in tsetse flies by DNA amplification. *Int J Parasitol* 22 (7): 909-918
12. Panyim S, Viseshakul N, Lukananil P, Wuyts N, Chokesajawatee N. 1993. A PCR method for highly sensitive detection of *Trypanosoma evansi* in blood samples. Proceedings of EEC contractants workshops, Resistance or tolerance of animals to diseases and veterinary epidemiology and diagnostic methods, Rethymno, Greece, 2–6 November 1992. CIRAD-EMVT, Maisons Alfort, France (Monographie): 138–143.
13. Ariana et al., 1992). Ariana WT, Agey MW, Donelson JE. (1992). DNA comparisons of *Trypanosoma evansi* (Indonesia) and *Trypanosoma brucei* spp. *Parasitol*. 104 (1):67-74.
14. Croft MH, Malelle I, Brooks D, Abella SH, and Ali MON. 2017. Molecular Isolation and Characterization of *Trypanosoma evansi* in Dromedary Camels from Different Regions of Sudan. *Am J Microbiol Biotechnol* 4(6): 67-74
15. Barghash MS, Danwishi MA, and Abou-ElNaga RT. 2016. Molecular Characterization and Phylogenetic Analysis of *Trypanosoma evansi* from Local and Imported Camels in Egypt. *J Phylogenetics Evol* 4:3
16. Thekiso O.M.M., N. Inoue, N. Kuboki, D. Tuntanusan, W.Bunnoy, S. Borisutsuwan, I. Igarashi dan C. Sugimoto. 2005. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification (LAMP), PCR and parasitological tests for detection of *Trypanosoma evansi* in experimentally infected pigs. *Vet. Parasitol*. 130(5): 327-30.
17. Taylor TK, Boyle DB, Bingham J. 2008. Development of a TaqMan PCR assay for the detection of *Trypanosoma evansi*, the agent of surra. *Vet Parasitol* 153(3-4): 255-64
18. Fahrimal Y, Elwardani, Rafina, A., Azhar A dan Asmita N. 2014. Profil darah tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinfeksi *Trypanosoma evansi* dan diberikan ekstrak kulit batang jalah (*Salix tetrasperma* Roxb). *Jurnal Kedokteran Hewan* 8(2): 164-8.
19. Sedgley C.M., Molander, A., Filannagan, S.E., Nagel, A.C., Appelle, O.K., Clewell, D.B. and Dahlen, G. 2005. Virulence, phenotype and genotype characteristic of endodontic *Enterococcus*. *Oral Microbiol Immunol*. 20: 10-9.
20. Wuyts N, Chokesajawatee N, Panyim S. 1994. A simplified and highly sensitive detection of *Trypanosoma evansi* by DNA amplification. *Southeast Asian J Trop Med Publ Health* 25: 266-271.