

Penelitian

Deteksi Parasit Darah pada Sapi Perah Berdasarkan Analisis Pcr Duplex

(Detection of Blood Parasites in Dairy Cattle with Duplex PCR Analysis)

Rizal Arifin Akbari^{1*}, Risa Tiuria², April Hari Wardhana³, Dyah Haryuningtyas Savitri³

¹Program Studi Parasitologi dan Entomologi Kesehatan, Sekolah Pascasarjana IPB

²Departemen Ilmu Penyakit Hewan dan Kesmavet FKH IPB

³Departemen Parasitologi, Balai Besar Penelitian Veteriner Bogor

*Penulis untuk korespondensi: rizalarifinakbari@gmail.com

Diterima 1 Maret 2018, Disetujui 12 Juni 2018

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi parasit darah pada sapi (*Babesia* spp., *Theileria* spp., dan *Trypanosoma* spp.) secara molekular berdasarkan analisis *duplex* PCR. Seratus sampel darah sapi perah *Friesian Holstein* diambil secara acak untuk deteksi parasit darah dengan pemeriksaan ulas darah. Sebanyak tiga puluh dari seratus sampel diseleksi untuk analisis PCR *single* berdasarkan jenis parasit dan tingkat parasitemia yang terdiri dari 5 sampel positif *Babesia* spp, 15 sampel positif *Theileria* spp., dan 10 sampel negatif parasit darah untuk dilanjutkan pada tahap PCR *single*. Optimasi PCR *single* dilakukan menggunakan tiga primer spesifik untuk *B. bovis* (Bover2A), *T. annulata* (Cytob 1) dan *T. evansi* (ITS 1). Hasil optimasi PCR *single* menunjukkan bahwa suhu *annealing* 56 °C merupakan suhu optimal untuk deteksi *Babesia bovis* dan *T. evansi* sedangkan *T. annulata* tidak menunjukkan hasil positif pada kondisi tersebut. Hasil analisis PCR *single* menunjukkan 28 sampel positif *B. bovis*, 1 sampel positif *T. evansi*, 1 sampel negatif semua parasit darah dan 0 sampel positif *T. annulata* sehingga hanya *B. bovis* dan *T. evansi* yang dilanjutkan ke tahap analisis *duplex* PCR *duplex*. Teknik *duplex* PCR berhasil dioptimasi dengan dilakukannya modifikasi penambahan $MgCl_2$ (25 μM) sebanyak 0.5 μL /tube sehingga dapat diaplikasikan untuk mendeteksi parasit darah *B. bovis* dan *T. evansi* pada sampel di lapang.

Kata kunci: *B. bovis*, *T. annulata*, *T. evansi*, metode ulas darah, PCR *single*, PCR *duplex*

ABSTRACT

The purpose of research was to detect blood protozoa in cattle (*Babesia* spp., *Theileria* spp., and *Trypanosoma* spp.) based on duplex PCR method. A total of 100 blood samples of dairy cattle, *Friesian Holstein*, was collected from dairy farms in Cibungbulang district, Bogor, West Java. Based on blood smear examination and degree of parasitemia, 30 samples were selected consisting of 5 samples of positive *Babesia* spp., 15 samples of positive *Theileria* spp. and 10 samples of negative blood parasites followed by single PCR analysis using optimized annealing temperature (56 °C) for 3 specific primer for *B. bovis* (Bover2A), *Theileria annulata* (Cytob 1) and *Trypanosoma evansi* (ITS-1). As a result, 28 samples were detected positive for *B. bovis*, 1 sample for *T. evansi*, none for *T. annulata* and 1 sample for negative parasite. The duplex PCR method was optimized by adding $MgCl_2$ (25 μM) for 0.5 μL /tube. The result of duplex PCR demonstrated that 1 sample infected by *B. bovis* and *T. evansi* indicating that the developed method enables to be implemented in the field for detection of blood protozoa in livestock.

Keywords: *B. bovis*, *T. annulata*, *T. evansi*, blood smear method, single PCR, duplex PCR.

PENDAHULUAN

Perkembangan subsektor peternakan menjadi salah satu pilar yang penting untuk menunjang pembangunan pertanian di Indonesia. Kementerian Pertanian Republik Indonesia telah melakukan berbagai program peningkatan populasi sapi untuk mencapai swasembada daging. Salah satu program yang akan dilaksanakan adalah Upaya Khusus Sapi Induk Wajib Bunting (Upsus Siwab) (Permentan, 2017). Upaya tersebut tidak akan tercapai jika ternak terserang oleh berbagai penyakit, contohnya yang disebabkan oleh parasit darah, seperti Babesiosis, Theileriosis dan Trypanosomiasis (Bilgic *et al.*, 2013).

Selama ini, penyakit-parasit parasit darah pada ternak dilaporkan masih menjadi kendala yang serius dalam industri peternakan. Kerugian ekonomi yang disebabkan oleh penyakit-parasit tersebut berupa pertumbuhan ternak menjadi terhambat, penurunan daya kerja, bobot badan, daya reproduksi dan produksi susu (Kocan *et al.*, 2003; Nasution, 2007). Kerugian ekonomi akibat wabah penyakit Surra di Sumba Timur pada tahun 2010 dan diperkirakan mencapai 22,4 Juta USD. Perhitungan kerugian tersebut belum termasuk biaya paramedik, pengobatan, pencegahan pada ternak termasuk biaya pengendalian vektor, sehingga kerugian ekonomi tersebut dapat melebihi dari hasil perhitungan diatas (Ekaswati *et al.*, 2014).

Beragam metode diagnosis telah dilakukan untuk mendeteksi keberadaan parasit darah, namun yang umum digunakan adalah metode pemeriksaan ulas darah yang diambil dari pembuluh darah perifer dengan pewarnaan Giemsa (OIE, 2014). Metode ini memiliki kelemahan, yaitu terjadinya negatif palsu pada sampel-sampel dengan tingkat parasitemia yang rendah. Selain itu, ukuran parasit yang sangat kecil (intraseluler) sulit dibedakan dengan *artefact*. Akibatnya berpotensi juga terjadi kesalahan diagnosis menjadi positif palsu.

Secara molekular, identifikasi parasit darah dapat dilakukan dengan *Polimerase Chain Reaction* (PCR) dengan berbagai macam penanda molekular yang spesifik. Selama ini, tehnik PCR yang banyak dilakukan masih bersifat konvensional, yaitu satu reaksi PCR untuk mendeteksi satu jenis penyakit. Namun, kondisi di lapang menunjukkan bahwa beberapa ternak berpotensi untuk terinfeksi oleh lebih dari satu jenis parasit darah (*Babesia* spp., *Theileria* spp., dan *Trypanosoma* spp). Apabila deteksi penyakit pada kasus-kasus tersebut masih bertumpu pada PCR konvensional, maka akan membutuhkan waktu yang relatif lama dan biaya yang lebih mahal karena harus dilakukan lebih dari

satu kali PCR. Oleh karena itu, perlu dikembangkan modifikasi teknik PCR untuk mendeteksi lebih dari satu jenis penyakit dengan mengkombinasikan lebih dari satu jenis penanda molekular, misalnya melalui teknik *duplex* PCR. Teknik ini relatif lebih murah dan cepat dibandingkan dengan PCR konvensional. Sejauh belum pernah dilakukan penelitian apakah teknik *duplex* PCR dapat digunakan untuk mendiagnosis penyakit yang disebabkan oleh parasit darah terutama *Babesia* spp., *Theileria* spp., dan *Trypanosoma* spp. pada ternak di Indonesia.

BAHAN DAN METODE

Sampel

Pengambilan sampel dilaksanakan di Kawasan Usaha Peternakan (KUNAK), Kecamatan Cibungbulang, Kabupaten Bogor, Jawa Barat. Pengambilan sampel darah telah disetujui oleh Komisi Etik Balai Besar Penelitian Veteriner (BBlitvet) Bogor. Sampel yang digunakan berupa darah yang dikoleksi dari seratus ekor sapi *Friesian Holstain* (FH) berumur 1 – 7 tahun. Darah diambil dari vena *coxigealis* menggunakan Venoject[®] yang telah dihubungkan dengan tabung EDTA.

Pewarnaan Ulas Darah

Pembuatan preparat ulas darah dilakukan di Laboratorium Parasitologi, BBlitvet Bogor. Preparat ulas darah yang sudah difikasi menggunakan metanol absolut diwarnai menggunakan larutan Giemsa 10% dengan cara merendamnya selama 30 menit (Mahmmod *et al.*, 2011). Sisa sampel darah pada tabung EDTA disimpan pada -20°C untuk analisis molekular. Sampel positif parasit darah *Babesia* spp. dan *T.evansi* (kontrol) berasal BBlitvet Bogor sedangkan sampel uji adalah sampel lapang yang diseleksi positif (*Babesia* spp, *T. evansi* dan *Theileria* spp).

Perhitungan Tingkat Parasitemia dan Seleksi Sampel untuk Analisis PCR

Pemeriksaan ulas darah dilakukan secara acak pada lima lapang pandang dengan perbesaran 1000x. Teknik perhitungan parasitemia pada penelitian ini dilakukan modifikasi dari Alamzan *et al.* (2008), yaitu jumlah parasit intraseluler darah dihitung untuk tiap 1000 butir sel darah merah. Sebanyak 30 dari 100 sampel darah digunakan untuk analisis PCR yang terdiri dari 20 sampel positif parasit darah dan 10 sampel negatif parasit darah.

Kategori pemilihan sampel ini berdasarkan jenis parasit darah dan tingkat parasitemia. Sampel ini akan dianalisis secara molekular dengan teknik PCR *single* dan *duplex*.

Ekstraksi DNA dan Optimasi Single PCR

Kit ekstraksi yang digunakan adalah Genomic DNA Mini-Kit® (Blood) (Geneaid Taiwan). Tahapan ekstraksi DNA terdiri dari tahap pelisisan sel, pengikatan DNA, pencucian DNA, dan elusi DNA. Teknik ini digunakan untuk mendapatkan kondisi PCR yang optimal pada masing-masing jenis parasit darah sebelum dikembangkan menjadi teknik *duplex* PCR. Sebanyak 3 buah primer digunakan pada penelitian ini, yaitu Bovar2A (Forward: 5'-CAA GCA TAC AAC CAG GTG G-3'/Reverse: 5'-ACC CCA GGC ACA TCC AGC TA-3') untuk *Babesia bovis* dengan ukuran fragmen pita DNA teramplifikasi pada 166 bp (Bilgic et al. 2013), Cytob 1 (Forward: 5'-ACT TTG GCC GTA ATG TTA AAC-3'/Reverse: 5'-CTC TGG ACC AAC TGT TTG G-3') untuk *Theileria annulata* dengan ukuran fragmen pita DNA teramplifikasi pada 312 bp (Bilgic et al. 2013), dan ITS-1 (Forward: 5'-CCG GAA GTT CAC CGA TAT TG-3'/Reverse: 5'-TGC TGC GTT CTT CAA CGA A-3') untuk *T. evansi* dengan ukuran fragmen pita DNA teramplifikasi pada 480 bp (Sawitri et al., 2015). Modifikasi suhu yang dilakukan pada tahap *annealing* adalah pada suhu 50°C, 56°C, dan 58°C. Pertimbangan dipilihnya ketiga suhu ini karena suhu *annealing* yang optimal untuk PCR adalah berkisar 50-72°C (McPherson dan Moller 2006), sedangkan Sawitri et al., (2015) menyatakan bahwa suhu *annealing* optimal untuk primer ITS 1 adalah 58°C.

Duplex Polimerase Chain Reaction

Kondisi PCR yang efektif didapat dengan cara menyatukan hasil optimasi. Sampel yang menunjukkan hasil positif terinfeksi *B. bovis*, *T. annulata*, dan *T. evansi* dengan kondisi optimasi yang sama berdasarkan hasil *single* PCR akan diuji kembali dengan teknik PCR *duplex*. Teknik

Ini diujikan pada beberapa modifikasi sampel, antara lain mencampur kontrol positif *T. evansi* dengan kontrol positif *B. bovis*, termasuk melakukan *sparking* antara kontrol positif dengan sampel lapang. Uji lain yang dilakukan juga pada sampel kontrol positif yang hanya terinfeksi 1 jenis parasit darah saja (*T. evansi* atau *B. bovis*).

Elektroforesis

Sampel yang telah diuji PCR diambil 6 µL kemudian ditambahkan dengan 1 µL larutan *loading dye buffer*. Larutan dihomogenkan dan dimasukkan ke dalam sumur *gel*. *Agarose gel* 2% dielektroforesis dengan kondisi tegangan 100 V selama 45 menit. Produk PCR divisualisasikan pada *Agarose gel* dibawah sinar UV transilluminator. Pita DNA produk PCR dibandingkan dengan Marka ukuran DNA. Sampel dinyatakan positif jika terlihat pita DNA berukuran tertentu sesuai dengan referensi panjang fragmen DNA yang diamplifikasi.

HASIL

Hasil Pemeriksaan parasit darah terhadap 100 sampel lapang dari KUNAK dapat dilihat pada Tabel 1. Sebanyak 49% sampel menunjukkan hasil positif terhadap *Theileria spp.* dan 5% sampel positif *Babesia spp* dan *Anaplasma spp.* Adapun 41% sampel tidak ditemukan adanya parasit darah (Tabel 1). Hasil seleksi terhadap 30 sampel yang digunakan untuk analisis PCR tertera pada Tabel 2. Sampel yang positif *Anaplasma sp.* tidak diikuti dalam analisis *duplex* PCR karena memiliki karakteristik kondisi PCR yang sangat berbeda dibandingkan dengan ketiga parasit darah lainnya.

Disamping sampel positif, sebanyak sepuluh sampel negatif juga diuji pada analisis PCR *single* dan *duplex*. Pengujian pada sampel negatif ditujukan untuk mengkonfirmasi apakah sampel-sampel tersebut benar hasilnya negatif. Sebelum dilakukan tahap analisis *single* PCR dilakukan proses optimasi terlebih dahulu. Hasil analisis suhu *annealing* yang optimal pada optimasi *single* PCR dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 1 Hasil pemeriksaan parasit darah sapi FH berdasarkan teknik pewarnaan Giemsa

Jenis Parasit Darah	Jumlah Sampel (%)
<i>Theileria spp.</i>	49
<i>Babesia spp.</i>	5
<i>Trypanosoma spp.</i>	0
Negatif Parasit Darah	41
<i>Anaplasma spp.</i>	5
Total	100

Tabel 2 Sampel darah yang diseleksi berdasarkan jenis parasit dan tingkat parasitemia yang digunakan untuk analisis molekular

Jenis Parasit Darah	Jumlah Sampel
<i>Babesia</i> spp.	5 (16.67%)
<i>Theileria</i> spp.	15 (50%)
<i>Trypanosoma</i> spp.	0 (0%)
Negatif Parasit Darah	10 (33.33%)
Total Sampel	30 (100%)

Tabel 3 Hasil analisis suhu *annealing* pada kondisi *single* PCR

Jenis Parasit	Jumlah sampel	50°C	56°C	58°C
<i>B. bovis</i> (kontrol)	2	-	+++	+
<i>T. evansi</i> (kontrol)	1	-	+++	+++
<i>Theileria</i> spp. (sampel lapang)	2	-	-	-

Keterangan :

- : pita fragmen DNA tidak terlihat ++ : pita fragmen DNA terlihat cukup jelas
 + : pita fragmen DNA terlihat kurang jelas +++ : pita fragmen DNA terlihat sangat jel

Tabel 4 Perbandingan hasil uji parasit darah dengan metode ulas darah dan PCR *single*

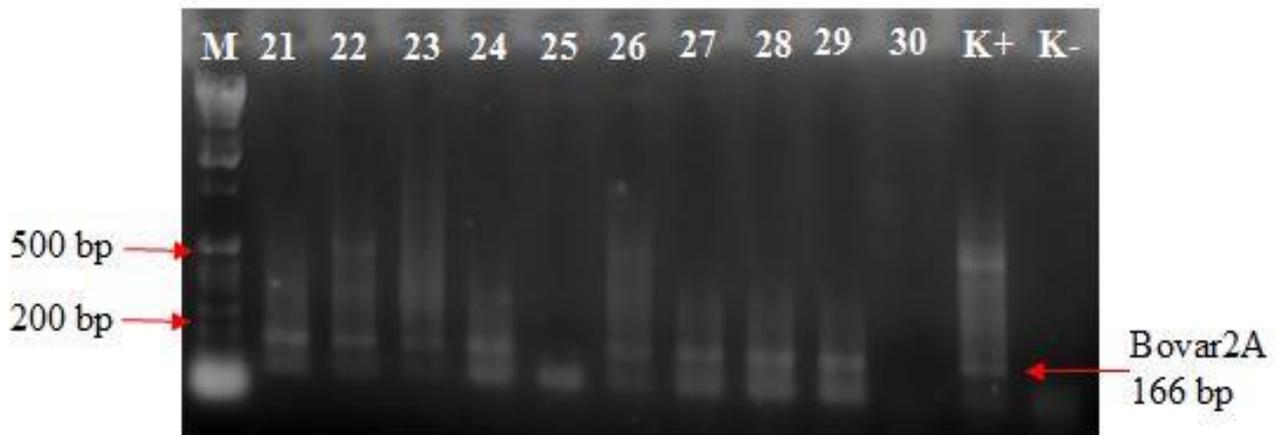
Jenis Parasit	Metode Ulas Darah	Metode PCR <i>Single</i>
<i>Babesia</i> sp.	5 (16.67%)	28 (93%)
<i>Theileria</i> spp.	15 (50%)	0 (0%)
<i>Trypanosoma</i> spp.	0 (0%)	1 (0%)
Negatif Parasit Darah	10 (33.33%)	1 (3.3%)
Total Sampel	30 (100%)	30 (100%)

Hasil optimasi PCR *single* pada Tabel 3 menunjukkan suhu *annealing* 56°C merupakan suhu terbaik yang mampu menghasilkan pita *B. bovis* dan *T. evansi* terlihat dengan sangat jelas. Sementara sampel *Theileria* spp. tidak menunjukkan pita DNA pada ketiga suhu tersebut sehingga dapat disimpulkan bahwa sampel tersebut negatif terinfeksi *T. annulata*. Oleh karena itu, suhu *annealing* 56°C ini digunakan pada pengujian teknik PCR *single* dan *duplex*. Masing-masing sampel lapang diuji dengan 3 pasang primer secara reaksi individu, yaitu Bovar 2A (*B. bovis*), ITS-1 (*T. evansi*), dan Cytob 1 (*T. annulata*) dengan metode *single* PCR. Perbandingan hasil uji parasit darah dengan pemeriksaan ulas darah dan PCR *single* dapat dilihat pada Tabel 4.

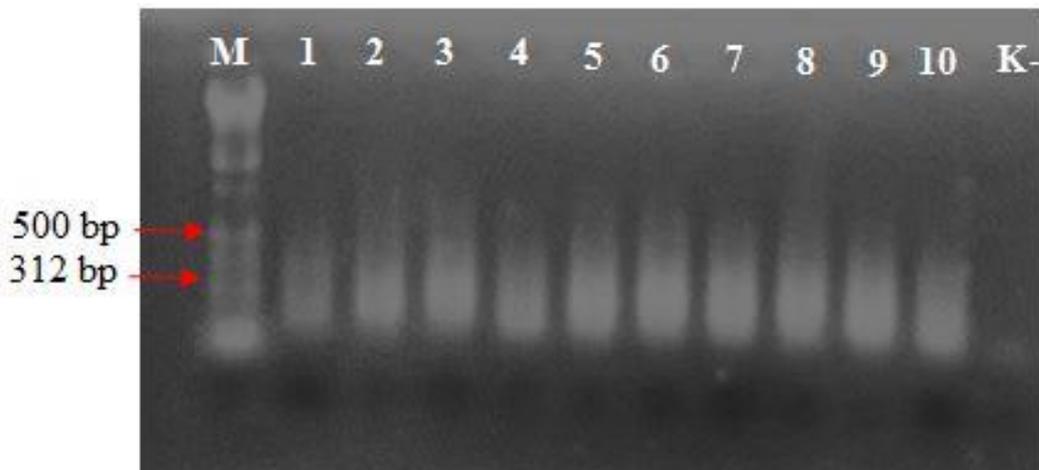
Hasil penelitian menunjukkan bahwa analisis PCR *single* memberikan hasil positif yang lebih tinggi 96,67% (29/30) dibandingkan dengan hasil pemeriksaan ulas darah 66,67% (20/30) sampel positif. Dari sepuluh sampel negatif ulas darah, sembilan diantaranya memberikan hasil positif *B. bovis* dan hanya satu sampel yang benar-benar negatif. Hal tersebut mengindikasikan bahwa metode pemeriksaan ulas darah telah memberikan

hasil negatif palsu. Berbeda dengan *B. bovis*, sebanyak lima belas sampel yang menunjukkan hasil positif *Theileria* spp. secara ulas darah, tidak ada satu pun yang memberikan hasil positif ketika diuji dengan PCR *single* menggunakan primer *T. annulata*. Hasil tersebut membuktikan bahwa sampel-sampel tersebut diduga bukan *T. annulata* atau telah terjadi hasil positif palsu. Dugaan tersebut tidak dapat dikonfirmasi pada penelitian ini karena tidak dilakukan analisis PCR lebih lanjut dengan menggunakan marka dari spesies *Theileria* yang lainnya.

Hasil yang menarik terjadi pada satu sampel bernomor 14 dengan kode ternak 1121. Hasil pemeriksaan ulas darah menunjukkan bahwa sampel tersebut negatif terhadap parasit *T. evansi* dan *Babesia* spp. Namun, berdasarkan hasil analisis PCR *single* membuktikan bahwa sampel tersebut positif *T. evansi* dan *B. bovis*. Hasil ini mengindikasikan bahwa sapi perah dengan kode 1121 telah terinfeksi oleh dua parasit darah, yaitu *T. evansi* dan *B. bovis*, sekaligus menunjukkan bahwa hasil pemeriksaan ulas darah adalah negatif palsu. Untuk selanjutnya, sampel ini akan diuji menggunakan teknik PCR *duplex*.



Gambar 1 Hasil *single* PCR pada sampel nomor 21-30 sampel nomor (21, 22, 23, 24, 26, 27, 28, 29, dan 30) menunjukkan adanya fragmen pita DNA teramplifikasi pada 166 bp dan sampel (25 dan 30) tidak menunjukkan adanya ukuran fragmen pita DNA teramplifikasi pada 166 bp.



Gambar 2 Hasil *single* PCR pada sampel nomor 1-10 sampel tidak menunjukkan adanya ukuran fragmen pita DNA teramplifikasi pada 312 bp

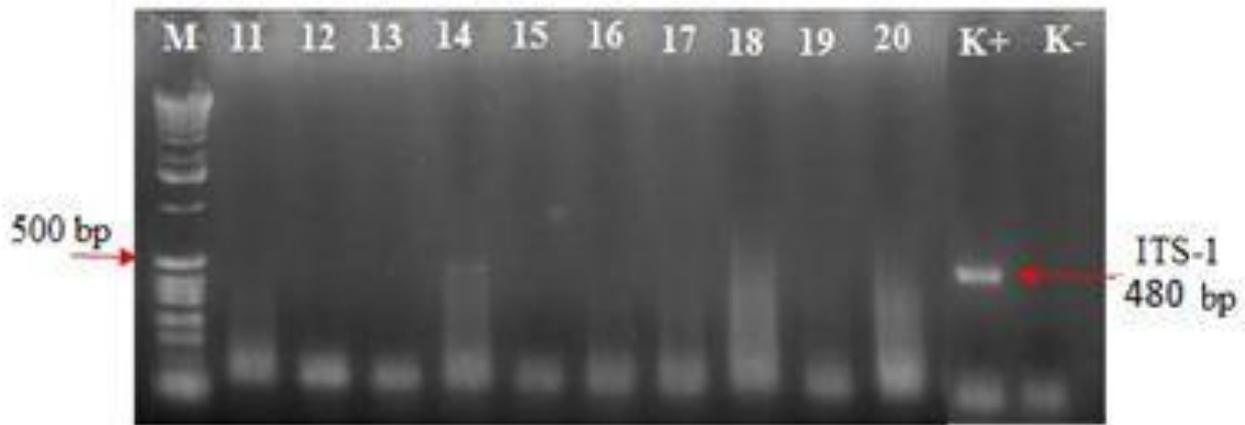
PEMBAHASAN

Umumnya teknik diagnosis yang banyak dilakukan untuk sampel darah adalah pemeriksaan ulas darah dengan pewarnaan Giemsa. Selain murah dan mudah dilaksanakan, teknik ini juga hanya membutuhkan peralatan yang sederhana. Namun demikian, teknik ini memiliki beberapa kelemahan yang dapat menyebabkan kesalahan diagnosis. Menurut Sharma et al. (2013) bahwa pemeriksaan ulas darah dengan menggunakan pewarnaan Giemsa tidak terlalu sensitif karena siklus parasit darah yang periodik dan tidak terlihat terlalu jelas, terutama untuk parasit yang bersifat intraselular. Oleh karena itu, analisis molekular menjadi alternatif untuk menegaskan diagnosis secara cepat dan akurat, salah satunya menggunakan teknik PCR baik PCR *single* maupun PCR *duplex*.

Suhu *annealing* adalah titik kritis dalam teknik PCR

karena pada tahap ini terjadi penempelan DNA target pada primer (McPherson & Moller 2006). Dari ketiga suhu yang diuji, suhu 56°C merupakan kondisi yang paling ideal untuk melakukan PCR parasit darah ini, baik untuk pita *B. bovis* maupun *T. evansi*. Suhu tersebut mampu memberikan visualisasi pita DNA dengan jelas ketika dideteksi pada gel agarose. Hasil PCR *single* menunjukkan bahwa teknik ini mampu memberikan hasil positif yang lebih tinggi (28 sampel positif *B. bovis*) dibandingkan dengan pemeriksaan ulas darah. Hal ini dapat dipahami karena sensitivitas *single* PCR yang tinggi dibandingkan dengan ulas darah. Selain itu, PCR dapat mendeteksi parasit darah dalam fase klinis dan laten (Sharma et al., 2013).

Dari hasil diatas dapat dilihat bahwa analisis parasit darah dengan menggunakan metode ulas darah terutama untuk mendeteksi *B. bovis* memiliki banyak kelemahan, yaitu seringnya terjadinya negatif palsu.



Gambar 3 Hasil *single* PCR pada sampel nomor 11-20 sampel nomor (14) menunjukkan adanya ukuran fragmen pita DNA teramplifikasi pada 480 bp dan sampel (11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, dan 20) tidak menunjukkan adanya ukuran fragmen pita DNA teramplifikasi pada 166 bp.

Kesalahan deteksi ini akan berimplikasi besar terhadap penyebaran penyakit parasit darah dalam suatu kawasan ternak. *Babesia bovis* secara umum lebih bersifat fatal jika dibandingkan dengan *B. divergen* dan *B. bigemina* (CSFH, 2008). Oleh karena itu, deteksi parasit ini secara dini sangat penting dilakukan. Berbeda dengan *B. bovis*, lima belas sampel yang menunjukkan hasil positif secara ulas darah memberikan hasil yang berbeda ketika diuji dengan teknik *single* PCR. Tidak satupun sampel tersebut memberikan hasil positif *T. annulata* (Gambar 2). Setidaknya ada tiga hipotesis yang dapat menjelaskan hasil ini, yaitu lima sampel tersebut benar-benar negatif *T. annulata*, hasil ulas darah memberikan hasil positif palsu, atau sampel-sampel tersebut terinfeksi spesies *Theileria* yang lain. Billiow (2005) menyebutkan bahwa sapi dapat diinfeksi oleh beberapa spesies *Theileria* antara lain *T. annulata*, *T. mutans*, *T. parva*, *T. sergenti*, *T. taurotragii*, dan *T. velifera*. Oleh karena itu, untuk pengujian PCR *duplex* dengan menggunakan marka genetik *T. annulata* tidak dapat dilakukan pada penelitian ini karena tidak ditemukannya sampel positif *T. annulata* dan tidak tersedianya kontrol positif. Terdapat satu sampel yang didapatkan positif *B. bovis* dan *T. evansi* dengan PCR *single*. Sampel tersebut akan diujikan dengan metode PCR *duplex* untuk diujikan sebagai sampel lapangan (Gambar 3).

Hal mendasar yang membedakan antara PCR *single* dan *duplex* adalah penambahan jumlah primer dalam satu reaksi, yaitu satu pasang primer untuk PCR *single* dan dua pasang primer untuk *duplex* PCR. Uji pendahuluan membuktikan bahwa *duplex* PCR tidak dapat berjalan optimal apabila komposisi formula

master mix yang digunakan serupa dengan PCR *single*. Hasil penelitian ini membuktikan bahwa penambahan $MgCl_2$ (25 μM) sebanyak 0.5 μL /tube mampu meningkatkan produk PCR sehingga pita DNA dapat terlihat jelas. Perbandingan komposisi antara PCR *single* dan PCR *duplex* dapat dilihat pada Tabel 5.

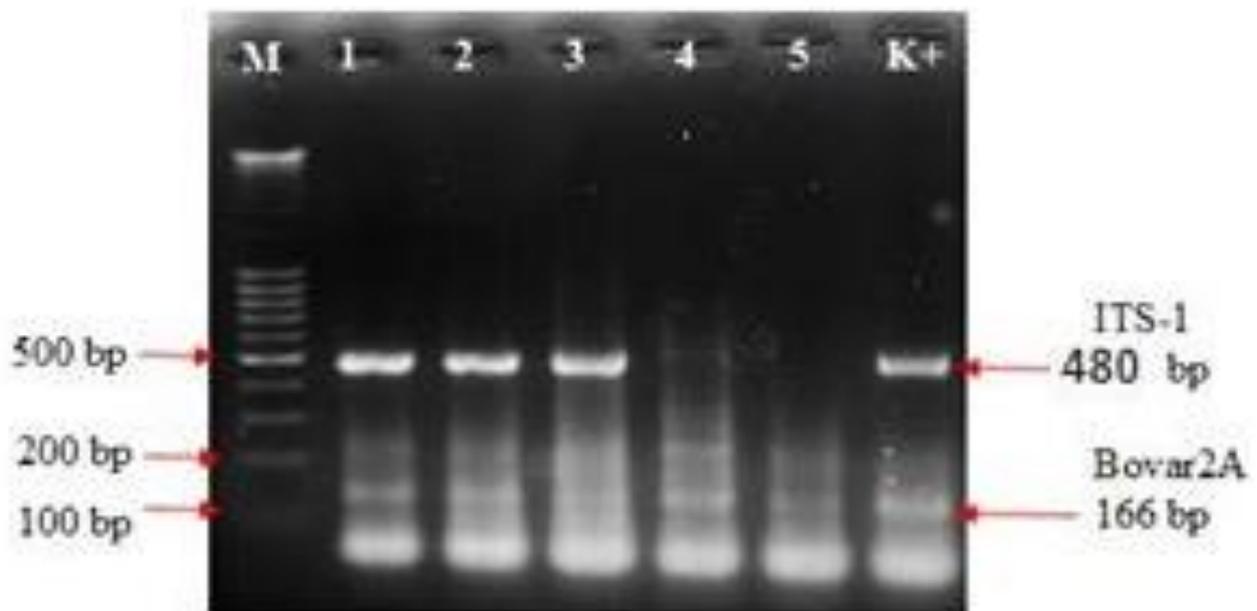
Menurut McPherson dan Moller 2006 bahwa senyawa $MgCl_2$ dalam reaksi PCR akan terurai menjadi Mg^{2+} yang berfungsi sebagai kofaktor yang menstimulasi aktifitas DNA polimerase dan meningkatkan interaksi antara primer dengan cetakan (*template*) DNA. Oleh karena itu, pada PCR *duplex* dilakukan penambahan $MgCl_2$ karena DNA yang akan di deteksi lebih dari satu jenis, yaitu *B. bovis* dan *T. evansi*. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Sharma *et al.* (2013), yang menambahkan konsentrasi $MgCl_2$ sebanyak 1 mM pada formula *master mix* PCR untuk mendeteksi *T. evansi* dan *B. bigemina* dengan PCR *duplex*. Perbandingan komposisi bahan kimia pada *duplex* dan *single* PCR dapat dilihat pada Tabel 5.

Hasil PCR *duplex* pada sampel kontrol positif *B. bovis*, kontrol *T. evansi*, sampel lapang dan kombinasi *sparking* DNA dapat dilihat pada Gambar 4. Sampel 1, 2 dan 4 menunjukkan bahwa hasil PCR positif terhadap *T. evansi* dan *B. bovis* yang ditunjukkan dengan ukuran fragmen pita DNA teramplifikasi pada 480 bp dan 166 bp (Gambar 4). Hal ini membuktikan metode PCR *duplex* yang diuji sensitif mendeteksi DNA kedua parasit tersebut baik sampel dari lapang ataupun DNA yang dicampur antara *T. evansi* dan *B. bovis*.

Sampel kontrol positif yang hanya mengandung DNA dari *T. evansi* (Sampel 3) dan *B. bovis* (sampel 5)

Tabel 5 Perbandingan komposisi formula master mix antara *single* dan *duplex* PCR

Komposisi Bahan Kimia	1X Reaksi <i>Duplex</i> PCR	1X Reaksi <i>Single</i> PCR
5x KAPA 2G <i>buffer with MgCl₂</i>	5 µL	5 µL
10 mm dNTP Mix	0.5 µL	0.5 µL
KAPA 2G Fast DNA Polymerase	0.1 µL	0.1 µL
MgCl ₂ (25µM)	0.5 µL	-
Nuclease free water	7.9 µL	13.4 µL
Bovar2A- Forward (10 µM)	2 µL	2 µL
Bovar2A- Reverse (10 µM)	2 µL	2 µL
ITS-1- Forward (10 µM)	2 µL	-
ITS-1- Reverse (10 µM)	2 µL	-
DNA Template	3 µL	2 µL
Total Reaksi	25 µL	25 µL

Gambar 4 Hasil PCR *duplex* pada sampel kontrol positif dan sampel lapang dan kombinasi antara sampel kontrol positif dan lapang

Keterangan :

sampel 1: K+ BBlitvet *B. bovis* dan *T. evansi*

sampel 2: K+ BBlitvet *T. evansi* + sampel lapang hasil *single* PCR terinfeksi *B. bovis* dengan konsentrasi masing-masing 2 µL

sampel 3: K+ BBlitvet *T. evansi*

sampel 4: DNA dari isolat lapang nomor sampel 14 dengan kode 1121 yang secara *single* PCR terbukti terinfeksi *B. bovis* dan *T. evansi*)

sampel 5: (sampel lapangan yang positif *Babesia bovis*)

K+ : Kontrol Positif (K+ BB Litvet *B. bovis* dan *T. evansi*)

mampu dideteksi dengan teknik yang ditunjukkan dengan ukuran pita DNA teramplifikasi pada 480 bp dan *B. bovis* (Sampel 5) yang ditunjukkan dengan ukuran fragmen pita DNA teramplifikasi pada 166 bp (Gambar 4). Berdasarkan hasil penelitian terbukti bahwa metode PCR *single* (PCR konvensional) yang dikembangkan menjadi PCR *duplex* mampu untuk mendeteksi dua parasit sekaligus (*B. bovis* dan *T. evansio* dengan beberapa modifikasi, yaitu menambahkan senyawa MgCl₂ (25µM) sebanyak

0.5 µL/tube dan menggunakan suhu *annealing* 56°C. *Duplex* PCR terhadap *T. annulata* tidak dapat dilakukan karena tidak ditemukannya kontrol positif pada penelitian ini.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada para peneliti BBlitvet Bogor yang telah mendukung dan membantu dalam penelitian ini.

“Penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan dengan pihak-pihak yang terkait dalam penelitian ini”.

DAFTAR PUSTAKA

- Alamzan C, Medrano C, Ortiz M, Fuente JDL. 2008. Genetic diversity of *Anaplasma marginale* strains from an outbreak of bovine anaplasmosis in an endemic area *Vet Parasitol* 158(1-2):103-109.
- Bilgic HB, Karagenc T, Simuunza M, Shiels B, Tait A, Eren H, Weir W. 2013. Development of a multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Theileria annulata*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* in cattle. *Exp Parasitol* 133(2): 222–229.
- Billiow M. 2005. *The epidemiology of bovine theileriosis in the Eastern Province of Zambia*. Laboratorium voor Parasitologie. Faculteit Diergeneeskunde. Universiteit Gent.
- [CSFH] the Center of Food Security and Public Health. 2008. Bovine Babesiosis. http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/bovine_babesiosis.pdf. Download : January 9, 2018.
- Ekaswati F, Sawitri DH, Wardhana AH. 2014. Perbandingan metode penyimpanan darah vektor Surra (lalat *Haematophagus*) untuk analisis multiplex polymerase chain reaction. <http://peternakan.litbang.pertanian.go.id/fullteks/somnas/pro14-34.pdf>. Download : January 9, 2018.
- Kocan KM, Fuente J, Guglielmone AA, Meleńdez RD. 2003. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *J Clin Microbiol Rev* 16: 698-712.
- Mahmmod YS, Elbalkemy FA, Klaas IC, Elmekawy MF, Monazie AM. 2011. Clinical and haematological study on water buffaloes (*Bubalus bubalis*) and crossbred cattle naturally infected with *Theileria annulata* in Sharkia province, Egypt. *Ticks and Tick-borne Diseases* 2: 168-171.
- McPherson M dan Moller S. 2006. PCR. 2th ed. Taylor dan Francis Group. Abingdon.
- Nasution AYA. 2007. Parasit Darah pada Ternak Sapi dan Kambing di Lima Kecamatan, Kota Jambi. Skripsi S₁. Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor.
- [OIE] Office Internationaldes Epizooties. 2014. OIE Terrestrial Manual: Bovine Babesiosis. Office International des Epizooties.
- [OIE] Office Internationaldes Epizooties. 2012. OIE Terrestrial Manual: Theileriosis. Office International des Epizooties.
- Peraturan Menteri Pertanian [Permentan]. 2017. Upaya khusus percepatan peningkatan populasi sapi dan kerbau bunting. perundangan.pertanian.go.id. Download: May 7, 2017.
- Sawitri DH, Wardhana AH, Wibowo H, Sadikin M, Ekaswati F. 2015. Molecular identification technique of *Trypanosoma evansi* by multiplex polymerase chain reaction. *JITV* 20(4): 297-307.
- Sharma A, Singla DL, 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 Vol* (2013): 1-8.