

INOKULASI *Trypanosoma evansi* PADA MENCIT *Mus musculus* STRAIN BALB-C YANG BERASAL DARI DARAH SAPI LOKAL

Inoculation of Trypanosoma evansi Isolated from Local Cattle Blood into Balb-C Mice

Yudha Fahrimal¹, Mecky Desca Saad², dan Hamdani Budiman³

¹Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

²Program Studi Pendidikan Dokter Hewan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

³Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

E-mail: yudhafahrimal@yahoo.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengetahui keberhasilan inokulasi *Trypanosoma evansi* (*T. evansi*) pada mencit *Mus musculus* strain Balb-C yang berasal dari darah sapi lokal di Rumah Potong Hewan kota Banda Aceh. Dari 205 sampel darah sapi lokal, 15 sampel positif mengandung *T. evansi* dengan metode hematokrit dan semua darah disuntikkan masing-masing pada mencit secara intraperitoneal untuk memperbanyak jumlah parasit. Semua mencit diperiksa secara regular 2 kali seminggu dengan mengambil darah dari ujung ekor. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari 15 mencit yang diinokulasi, satu ekor mati pada minggu ke-3, satu ekor mati pada minggu ke-5, satu ekor mati minggu ke-8, dua ekor mati minggu ke-9, dan tiga ekor mati pada minggu ke-14, sementara 7 ekor masih hidup sampai minggu ke-20. Dari ke-8 ekor yang mati semuanya tidak ditemukan berkembangnya *T. evansi* pada mencit.

Kata kunci: hematokrit, mouse inoculation (MI), *Trypanosoma evansi*

ABSTRACT

This study was done to find out the successful inoculation of *Trypanosoma evansi* (*T. evansi*) into Balb-C mice. *Trypanosoma evansi* was isolated from cattle blood collected from Banda Aceh abattoir. From 205 blood samples, 15 were positive with *T. evansi* using microhematocrite centrifugation technique (MHCT). All positive samples were individually inoculated intraperitoneally into mice. All mice were inspected twice a week by blood smear examination of tail tip blood. Result of this study showed that none of the 15 mice has positive *T. evansi* in their blood. Eight mice were died at various weeks after inoculation (1 at week 3, 5, and 8, 2 at week 9, and 3 at week 14). Blood examination was done for 20 weeks post inoculation except for died mice. There two main reasons to explain the failure of the inoculation, there was no *T. evansi* in the inoculated blood or *T. evansi* failed to grow inside the mouse.

Key words: haematocrite (MHCT), mouse inoculation (MI), *Trypanosoma evansi*

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*) (Luckins *et al.*, 1992 dan Dargantes *et al.*, 2005) dan ditularkan secara mekanis oleh vektor alat penghisap darah seperti *Tabanus* dan *Stomoxys spp* (Payne *et al.*, 1991, Luckins *et al.*, 1992). *Trypanosoma evansi* merupakan trypanosoma patogen yang penyebarannya paling luas secara geografis (Lohr *et al.*, 1986).

Kasus surra pertama kali dilaporkan di Indonesia pada tahun 1897 pada populasi kuda di Pulau Jawa. Semenjak itu, secara sporadik menyebar ke seluruh wilayah Indonesia (Partoutomo, 1996). Menurut Sukanto (1994) paling tidak ada sebelas provinsi di Indonesia (Aceh, Sumatra Utara, Lampung, Jawa Barat, Jawa Tengah, Jawa Timur, Kalimantan Selatan, Sulawesi Utara dan Selatan, Nusa Tenggara Barat dan Nusa Tenggara Timur) merupakan tempat endemik surra.

Trypanosoma evansi mempunyai inang yang beragam dari hewan liar sampai hewan domestik yang mempunyai nilai ekonomi yang penting dengan berbagai tingkat kerentanan yang berbeda. Diantar 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.* 2001^b), 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).

Inokulasi pada mencit (*mouse inoculation*) sebagai salah satu hewan coba yang sensitif terhadap surra merupakan metode yang sensitif untuk mendeteksi penyakit surra kronis dan sudah banyak dibuktikan oleh para ahli (My *et al.*, 2000; Reid *et al.*, 2001a; Njiru *et al.*, 2004; dan Rodriguez *et al.*, 2009). Di samping itu, MI juga dipakai untuk propagasi *T. evansi* untuk keperluan penelitian lebih lanjut seperti uji patogenisitas, pembuatan vaksin, dan uji imunologi. Artikel ini menjelaskan beberapa alasan ketidak berhasilan inokulasi *T. evansi* pada mencit.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari sampai Agustus 2012. Pengambilan sampel darah dilakukan di Rumah Potong Hewan (RPH) Kotamadya Banda Aceh. Pemeriksaan sampel darah dilakukan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas

Syiah Kuala. Dalam penelitian ini digunakan mencit *Mus musculus* strain Balb-C umur 2 bulan yang belum pernah diberi perlakuan apapun sebelumnya. Mencit berasal dari Fakultas Biologi Universitas Sumatra Utara, Medan. Pakan dan air minum diberikan secara *ad libitum*.

Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan survey yang dilakukan di Rumah Potong Hewan Kotamadya Banda Aceh dengan cara memeriksa darah sapi yang telah dipotong. Sampel darah kemudian dibawa ke Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala untuk diperiksa terhadap keberadaan parasit *T. evansi* dengan menggunakan metode natif, ulas darah tipis, tebal, dan hematokrit.

Pengambilan sampel

Sampel darah diambil dari sapi yang dipotong di Rumah Potong Hewan, Banda Aceh. Darah dimasukkan ke dalam tabung *vacutainer* 3 ml yang sudah berisi *ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA, 1-1,5 mg/ml darah), dalam keadaan dingin dibawa ke Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala untuk dilakukan pemeriksaan terhadap parasit *T. evansi*.

Pemeriksaan Hematokrit

Pemeriksaan terhadap *T. evansi* dengan metode hematokrit menggunakan tabung kapiler mikrohematokrit. Setiap sampel darah diperiksa dua kali (diperlukan 2 mikrokapiler). Darah dihisap dengan menggunakan mikrokapiler sampai $\pm\frac{3}{4}$ dari volume mikrokapiler. Kemudian salah satu ujung mikrokapiler disumbat dengan *crustaseal*. Selanjutnya mikrokapiler yang sudah berisi sampel darah disusun pada alat sentrifus mikrohematokrit dan dilakukan sentrifus selama 2 menit dengan kecepatan 16000 rpm. Tabung hematokrit diperiksa di bawah mikroskop yaitu dibagian *buffy coat* (kumpulan sel darah putih yang terletak diantara plasma dan sel darah merah ditengah tabung). Apabila terdapat *T. evansi* maka akan terlihat gerakan didaerah *buffy coat* tersebut (Gambar 1). Apabila tidak ada, tabung hematokrit dipatahkan di daerah *buffy coat* tersebut dan *buffy coatnya* diletakkan di atas gelas obyek, ditutup dengan kaca penutup, dan dilihat di bawah mikroskop (Anonimus, 2010).

Mouse Inoculation (MI)

Metode *mouse inoculation* dilakukan dengan menyuntikan 0,25-0,5 ml darah positif *T. evansi* secara intraperitoneal ke mencit *Mus musculus* strain Balb-C. Batas pendeteksi dari MI yang digunakan untuk inokulasi adalah 3 *Trypanosoma sp.* per ml darah (My *et al.*, 2000) sampai dengan 1,25 *Trypanosoma sp.* per 4 ml darah dalam *buffy coat* (Reid *et al.*, 2001a). Darah dari ujung ekor mencit diambil dan diperiksa setiap dua hari sekali dengan menggunakan metode natif untuk melihat keberadaan *T. evansi* (OIE, 2009).

Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil pemeriksaan darah dengan menggunakan metode MI dianalisis secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari 205 sampel darah sapi lokal yang diambil dari Rumah Potong Hewan Kota Banda Aceh didapat 15 sampel yang positif mengandung *Trypanosoma sp.* dan semua darah disuntikkan ke masing-masing mencit secara intraperitoneal untuk memperbanyak parasit ini. Semua mencit diperiksa secara regular 2 kali seminggu dengan mengambil darah dari ujung ekor (Fernandez *et al.*, 2009). Setelah minimal dua bulan, tidak satupun mencit yang menunjukkan gejala klinis dan positif mengandung *Trypanosoma sp.* bahkan sebahagian mencit mati tanpa menunjukkan gejala positif trypanosomiasis baik secara klinis maupun keberadaan parasitnya dalam darah yang diperiksa.

Dari lima belas mencit yang diinokulasi satu ekor mati pada minggu ke-3, satu ekor mati pada minggu ke-5, satu ekor mati minggu ke-8, dua ekor mati minggu ke-9, tiga ekor mati minggu ke-14, serta tujuh ekor masih hidup sampai minggu ke-20. Dari delapan ekor yang mati semuanya tidak ditemukan adanya *T. evansi* di dalam darah. Secara garis besar ada dua hal yang menyebabkan ketidakberhasilan *T. evansi* berkembang pada mencit setelah diinokulasi.

Salah satu kemungkinan tidak berhasilnya inokulasi pada mencit adalah karena tidak adanya *T. evansi* dalam darah yang diinokulasi walaupun positif secara hematokrit. Kemungkinan lain tidak adanya *T. evansi* dalam darah yang diinokulasikan juga karena darah dari tabung *vacutainer* tidak atau kurang diaduk terlebih dahulu sebelum diambil dan disuntikkan ke mencit.

Ethylenediaminetetraacetic acid kemungkinan dapat menyebabkan *T. evansi* tidak bisa memperbanyak diri walaupun tetap hidup di dalam darah. Akan tetapi tidak ada literatur yang mendukung pernyataan ini. *Ethylenediaminetetraacetic acid* merupakan salah satu antikoagulan di samping heparin yang biasa dipakai untuk pengambilan sampel darah dari hewan yang dicurigai menderita trypanosomiasis untuk dilakukan inokulasi pada mencit dan penelitian lainnya tentang trypanosomiasis baik *T. evansi* pada sapi dan kerbau (Damayanti dan Graydon, 1994), unta (Dia *et al.*, 1997), mencit (Reid *et al.*, 2001a), kuda (Rodríguez *et al.*, 2009), kambing (El-Metanawey *et al.*, 2009), rusa (Adrian *et al.*, 2010), *Trypanosoma brucei rhodesiense* pada mencit dan manusia (Ndung'u *et al.*, 2008), *Trypanosoma brucei* pada domba dan mencit (Lawal *et al.*, 2004), *Trypanosoma congolense*, *Trypanosoma brucei*, dan *Trypanosoma vivax* pada sapi (Murray, 1974).

Waktu juga sangat berpengaruh terhadap viabilitas dari *T. evansi*, karena makin lama waktu tunggu sebelum diinokulasikan maka semakin lemah *T. evansi*. Sebelum diinokulasikan sampel darah sapi diperiksa dengan metode hematokrit dan hanya yang positif yang

diinokulasikan ke mencit. Kemungkinan sudah lemah atau tidak hidupnya *T. evansi* sewaktu diinokulasikan sehingga tidak terjadi perkembangan di dalam tubuh mencit bisa saja terjadi, akan tetapi sewaktu diperiksa dengan metode hematokrit masih sangat viabel dengan gerak yang aktif walaupun rata-rata sudah 4,7 jam disimpan. Berdasarkan beberapa hasil penelitian, *T. evansi* masih tetap viabel sampai 48 jam dalam sampel darah yang berasal dari kerbau dengan parasitemia yang tinggi dalam tempat penyimpanan dengan kondisi lapangan (Djauhari *et al.*, 1987). Reid *et al.* (2001a), membuktikan bahwa *T. evansi* masih mampu menginfeksi mencit setelah 21 jam disimpan dalam kotak berpendingin *icepack*.

Dalam penelitian ini tidak dilakukan penghitungan jumlah *T. evansi* per ml darah sehingga tidak bisa diperkirakan berapa jumlah *T. evansi* yang disuntikkan ke mencit. Akan tetapi beberapa penelitian membuktikan bahwa dengan konsentrasi yang rendah *T. evansi* sudah bisa menginfeksi mencit. Penelitian yang dilakukan oleh Reid *et al.*, (2001a) memperlihatkan bahwa *T. evansi* masih mampu menginfeksi mencit dengan konsentrasi parasitemia yang rendah (25 *T. evansi*/ml darah) setelah 21 jam disimpan dalam kotak berpendingin *icepack*. Bahkan dengan menggunakan *buffy coat* dari darah sapi sebelum dilakukan metode hematokrit, 1 parasit dalam 2 ml darah dapat menginfeksi mencit (Reid *et al.*, 2001b).

Kemungkinan lain tidak berhasilnya *T. evansi* berkembang biak karena gagal beradaptasi dalam tubuh induk semang. Walaupun mencit merupakan salah satu hewan yang peka terhadap *T. Evansi*, kurang patogennya *T. evansi* isolat lokal terhadap mencit walaupun mencit salah satu hewan yang paling rentan, tersuntikkannya *T. evansi* ke dalam saluran pencernaan atau organ lain. Hal ini kecil kemungkinannya terjadi karena cara penyuntikkannya secara intraperitoneal, setelah jarum masuk ke dalam peritoneum sekitar 1-1,5 cm maka jarum ditarik sedikit sambil menekan ujungnya kearah peritoneal untuk memastikan ujung jarum tidak masuk ke usus. Walaupun masuk ke dalam usus, ada literatur yang mengatakan bahwa *T. evansi* bisa menginfeksi hewan apabila termakan oleh induk semang (Dargantes *et al.*, 2005).

KESIMPULAN

Dari hasil MI tidak ditemukan adanya *T. evansi* yang berkembang pada mencit melalui pemeriksaan darah natif. Ketidakberhasilan inokulasi ini mungkin disebabkan oleh dua faktor utama seperti tidak adanya parasit dalam darah yang disuntikkan atau parasit yang disuntikkan gagal bertumbuh dalam tubuh mencit.

DAFTAR PUSTAKA

Adrian, S.M., A.S. Rehana., L. Hassan., and M.T. Wong. 2010. Outbreaks of trypanosomiasis and the seroprevalence of *Trypanosoma evansi* in a deer breeding centre in Perak, Malaysia. **Trop. Anim. Health. Product.** 42(2):145-150.

- Anonimous, 2010. Jenis Penyakit dan Penanganan pada Usaha Sapi Potong. <http://binaukm.com/2010/05/jenis-penyakit-sapi-potong>.
- Damayanti, R., R.J. Graydon and P. W. Ladd. 1994. The pathology of experimental *Trypanosoma evansi* infection in the Indonesian buffalo (*Bubalus bubalis*). **J. Comp. Pathol.** 110(3):237-52.
- Dargantes, A.P., R.S.F. Campbell., D.B. Copeman, and S.A. Reid. 2005. Experimental *Trypanosoma evansi* infection in the goat. II. **Pathology. J. Comp. Pathol** 133(2):267-276.
- Dia, M.L., N. Vanmeirvenne., E. Magnus, A.G. Luckins, C. Diop, A. Thiam, P. Jacquiet, and R. Hamers. 1997. Evaluation de 4 tests de diagnostic: Frottis sanguins, CATT, IFI et ELISA-Ag dans l'étude de l'épidémiologie de la trypanosomose cameline à *Trypanosoma evansi* en Mauritanie. **Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.** 50(1):29-36.
- Djauhari, D., M. Dahlan., and R.C. Payne. 1987. Survival time of *Trypanosoma evansi* in samples of blood taken from infected buffaloes. **Penyakit Hewan.** 19(33):24-25.
- El-Metanawy, M.T., M.E. Nadia, M.M. Abdel-Aziz, M.S. Hassanane, and T.H. Abde Aziz. 2009. Comparative studies on diagnosis of *Trypanosoma Evansi* in experimentally infected goats. **Global Vet.** 3(4):348-353.
- Fernandez, D., B. González-Baradat, M. Eleizalde, E. González-Marcano, T. Perrone, and M. Mendoza. 2009. *Trypanosoma evansi*: A comparison of PCR and parasitological diagnostic tests in experimentally infected mice. **Experiment. Parasitol.** 121:1-7.
- Lawal, A.I., O. Ewache, and B. Musa. 2004. Survival period, infectivity and morphological composition of *Trypanosoma brucei* maintained at varying intervals in refrigerator and ambient temperature. **Nigerian J. Parasitol.** 25(1):39-44.
- Lohr, K.F., S. Pholpark., P. Siriwan., N. Leesirikul., and L. Srikitjakarn. 1986. *Trypanosoma evansi* infection in cattle in north-east Thailand II. Abortions. **Trop. Anim Health Prod.** 18:8-103.
- Luckins, A.G., N. McIntyre, and P. Rae. 1992. Multiplication of *Trypanosoma evansi* at the site of infection in skin of rabbits and cattle. **Acta Tropica.** 50:19-27.
- Murray, M. 1974. The Pathology of African Trypanosomiasis, In **Progress in Immunology II**, L. Brent & J. Holbrow (eds.). **North Holland Publishing Co.**, Amsterdam.
- My, L.N., W.G. Holland, P.T. Tam, N.G. Thanh., and D.H. Hoan. 2000. Comparative study of techniques for diagnosis of *Trypanosoma evansi* in buffaloes. **Vet. Sci. Tech.** 7:6-14.
- Ndung'u, K., N. Maina, K. Johnson, K. John, G. Samuel, N. Joseph, and M. Grace. 2008. Pathogenicity of bloodstream and cerebrospinal fluid forms of *Trypanosoma brucei rhodesiense* in Swiss White Mice. **Afr. J. Health Sci.** 15:34-41.
- Njiru, Z.K., C.C. Constantine, J.M. Ndung'u, I. Robertson, S. Okaye, R.C. Thompson, and S.M. Reid. 2004. Detection of *Trypanosoma evansi* in camels using PCR and CATT/*T. evansi* tests in Kenya. **Vet. Parasitol.** 124:187-199.
- Office International des Epizootics [OIE]. 2009. **Manual of Diagnostic Tests and Vaccine for Terrestrial Animals.** New York, USA.
- Partoutomo, S. 1996. Trypanosomiasis Caused by *Trypanosoma evansi* ("Surra") in Indonesia. **Proceeding of A Seminar on Diagnostic Techniques for Trypanosoma evansi in Indonesia.** Balitvet, Bogor: 1-9.
- Payne, R.C., I.P. Sukanto, D. Djauhari, and T.W. Jones. 1991. *Trypanosoma evansi* infection in bovine and buffalo calves in Indonesia. **Vet. Parasitol.** 38(2-3):253-256.
- Powar, R. M., V. R. Shegokar. (2006). A rare case of human trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi*. **Indian J. Med. Microbiol.** 24(1):72-74.
- Reid, S.A., Husein, A. Partoutomo, and S. Copeman. 2001b. The susceptibility of two species of wallaby to infection with *Trypanosoma evansi*. **Aust. Vet J.** 79(4):285-288.
- Reid, S.A., A. Husein, and D.B. Copeman. 2001a. Evaluation and improvement of parasitological tests for *Trypanosoma evansi* infection. **Vet. Parasitol.** 102:291-297.
- Rodrigues, A., R.A. Figuera, T.M. Souza, A.L. Schild, and C.S.L. Barros. 2009. Neuropathology of naturally occurring *Trypanosoma evansi* infection of horses. **Vet. Pathol.** 46:251-258.

Sukanto, I.P. 1994. Petunjuk diagnosa parasit darah Trypanosoma, Babesia dan Anaplasma dan **Prosiding Seminar Penelitian Parasit Besar di Indonesia**. Bogor, 12 Mei 1992:23-28.

Vellayan, S.; Mohamad, Aidi; Radcliffe, R.W.; Lowenstine, L.J.; Epstein, J.; Reid, S.A.; Paglia, D.E.; Radcliffe, R.M.; Roth, T.L.;

Foose, T.J.; 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.