

Molecular Detection of the Gene Encoding Second Internal Transcribed Spacer of *Sarcoptes scabiei* in Rabbits in Several Regions in East Java

Nur Rusdiana^{1*}, Nunuk Dyah Retno Lastuti², Siti Aisyah³, Ni Luh Lasmi Purwanti¹, Palagan Senopati Sewoyo⁴

¹Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Pendidikan Mandalika, Mataram NTB

²Departemen Parasitologi Veteriner Universitas Airlangga, Surabaya Jawa Timur

³Departemen Laboratorium Patologi Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

⁴Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana, Denpasar Bali

*Corresponding author: nurrusdiana106@gmail.com

ABSTRACT

This study aimed to detect the Second Internal Transcribed Spacer (ITS-2) encoding gene of *Sarcoptes scabiei* from rabbits. ITS-2 is a highly conserved gene and always used to identify and differentiate host species infected by *S. scabiei*. Isolates of *S. scabiei* were collected from samples of rabbit skin scrapings suspected of being infected with *S. scabiei*. The rabbits were acquired from Surabaya, Sidoarjo, Pasuruan, Mojokerto and Nganjuk. Detection on the presence of *S. scabiei* was carried out microscopically then further confirmed by PCR method and visualized using electrophoresis. PCR identification results showed DNA bands at 304 base pairs. The results showed that samples were infected by *S. scabiei*, determined by the presence of ITS-2 encoding gene. The ITS-2 encoding gene was chosen as the main focus in this study because it was easily amplified that made analysis and identification easier. The high cases of scabies in Indonesia can be a warning to prevent infection of *S. scabiei*, especially in pets that have the potential as a reservoir in spreading diseases.

Keywords: Polymerase Chain Reaction (PCR), *Sarcoptes scabiei*, Second Internal Transcribed Spacer (ITS-2), Scabies

PENDAHULUAN

Skabies adalah penyakit kulit menular yang disebabkan oleh *Sarcoptes scabiei* dan dianggap sebagai salah satu penyakit penting pada manusia dan hewan. Saat ini skabies dianggap sebagai *emerging/re-emerging parasitic disease* yang mengancam kesehatan manusia dan hewan secara global (Lastuti *et al.*, 2018). Tungau *S. scabiei* bersifat sangat menular dan ditransmisikan dengan cepat secara langsung maupun tidak langsung antar hewan dengan spesies yang sama atau dari spesies hewan yang berbeda, antar manusia dan antar hewan (Hu *et al.*, 2016).

Tungau *S. scabiei* mengalami beberapa tahap perkembangan yaitu telur, larva, *protonymph*, *trytonymph* dan dewasa. Keseluruhan dari siklus hidup tersebut terjadi pada sel inang (He *et al.*, 2018). *S. scabiei* adalah obligat parasit, yang berkembang di kulit, menembus stratum korneum dan membentuk terowongan untuk

menyelesaikan siklus hidup mulai dari telur hingga tahap dewasa pada sel inang. Selain kerusakan yang disebabkan oleh adanya terowongan, infeksi *S. scabiei* dapat memicu beberapa reaksi seperti reaksi alergi, peradangan dan dapat menginduksi respons imun humoral dan seluler (Lastuti *et al.*, 2018).

Beberapa penelitian telah dilakukan untuk mengidentifikasi *S. scabiei* menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) baik secara konvensional maupun kuantitatif. Kedua metode ini memiliki sensitivitas yang lebih tinggi untuk mendeteksi tungau dibandingkan menggunakan mikroskop dengan metode *scraping* kulit yang menunjukkan gejala khas skabies (Fraser *et al.*, 2018). Hal ini karena pada infeksi awal skabies, jumlah tungau hanya sedikit dan gejala yang ditimbulkan menyerupai penyakit kulit lainnya seperti dermatitis atopik, eksim, psoriasis, ruam, gigitan serangga, *poison ivy* dan lain

sebagainya. Karena itu kerokan/*scraping* terhadap lesi skabies sulit dilakukan, maka saat ini banyak penelitian yang dilakukan dengan uji analisis darah dan pengembangan kandidat vaksin untuk skabies pada hewan dan manusia (Arlan dan Morgan, 2017).

Banyaknya kasus skabies di Indonesia telah didukung oleh penelitian tentang prevalensi skabies, namun penelitian di bidang molekuler sangat terbatas (Lastuti *et al.*, 2019). Berbagai lokus gen seperti *Second Internal Transcribed Spacer* (ITS-2), 12 *Subunit Ribosom Ribonucleic Acid* (12S rRNA), 16 *Subunit Ribosom Ribonucleic Acid* (16S rRNA) dan *Cytochrome C Oxidase 1* (COX-1) telah digunakan sebagai penanda genetik *S. scabiei* (Makouloutou *et al.*, 2015). Lokus gen *Second Internal Transcribed Spacer* (ITS-2) *nuclear* rRNA dan Mitochondrial 16S rRNA telah diterapkan dalam studi keanekaragaman dalam *acarology* dengan menjelaskan struktur populasi dan hubungan filogenetik (Walton *et al.*, 2007).

Gen penyandi ITS-2 dipilih menjadi fokus utama dalam penelitian ini karena belum ada laporan untuk *S. scabiei* isolat lokal dalam penelitian di bidang molekuler. Selain itu, gen ini mudah di amplifikasi sehingga memudahkan untuk dilakukannya analisis dan identifikasi. Daerah ITS-2 merupakan daerah yang *highly conserved* dan selalu digunakan untuk mengidentifikasi dan membedakan spesies inang yang terinfeksi oleh *S. scabiei* (Peltier *et al.*, 2017). Untuk itu tim peneliti merasa perlu untuk melakukan penelitian mengenai keberadaan *S. scabiei* menggunakan gen ITS-2 yang menginfeksi kelinci yang dianalisis secara mikroskopis dan dikonfirmasi menggunakan PCR.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini menggunakan 22 sampel hasil *scraping* kulit kelinci asal Jawa Timur

yang diperoleh dari tiga kelinci dari Surabaya, lima kelinci dari Sidoarjo, lima kelinci dari Mojokerto, lima kelinci dari Pasuruan dan empat kelinci dari Nganjuk. Kelinci yang digunakan sebagai sampel penelitian adalah kelinci yang menunjukkan gejala skabies parah dengan kategori seperti timbulnya krusta dan penebalan kulit pada daerah telinga, moncong, sekitar mata atau leher dan punggung. Bobot badan masing-masing kelinci berkisar antara 2,5-3 kg per ekor.

Bahan yang digunakan untuk pengambilan sampel *scraping* adalah NaCl fisiologis 0,9%. Bahan untuk pemeriksaan natif yaitu NaCl fisiologis, KOH 10%. Bahan yang termasuk dalam ekstraksi DNA *Sarcoptes scabiei* dengan QIAamp DNA Stool Mini Kit dari Qiagen yaitu *proteinase K*, *buffer ATL*, *buffer AL*, *Ethanol 96%*, *Buffer AW1*, *Buffer AW2*.

Bahan yang digunakan untuk proses amplifikasi dan elektroforesis yaitu primer *forward* (5' CGG TTT CGT CAC ACT TCG ATG 3') dan *reverse* (5' CGG GTA TTC TCG CTT GAT CTG 3') dengan target 304 bp, *Master mix*, *distillated water*, *agarose gel*, *Tris Boric Acid* (TBE), *aquadest*, *redsafe*, *DNA ladder*. Serta bahan-bahan yang digunakan dalam proses sekuensing yaitu *buffer QG*, *propanol*, *buffer EB*, *Big Dye Terminator*, *buffer sequencing*, H_2O , $NaOAC$, *ethanol*, reagen supresan Hi-Di *Formamide*.

Alat yang dibutuhkan untuk pengambilan sampel dengan cara *scraping* kelinci yang terinfeksi adalah sarung tangan steril, tabung steril, gunting *scraping* atau *scalpel*. Untuk pemeriksaan natif adalah mikroskop, *cover* dan *object glass*. Alat untuk ekstraksi DNA *S. scabiei* dengan QIAamp DNA Stool Mini Kit dari Qiagen, *Thermostat plus*. Seperangkat alat untuk amplifikasi PCR dan sekuensing seperti *micropipette*, tabung *Eppendorf*, *microtube*, *white tip*, *yellow tip*, *thermal cycler PCR*,

transluminator-UV, vortex, gel electrophoresis apparatus (Biorad), sekuensing menggunakan ABI PRISM310 Genetic Analyzer.

Teknik Pengambilan Sampel

Sebelum dilakukan *scraping* kelinci terlebih dahulu dipuasakan selama 12 jam. Hal ini dilakukan untuk menghindari terjadinya muntah yang disebabkan oleh penggunaan obat anestesi (Yudaniyanti, 2010). Persiapan anestesi dilakukan dengan cara menimbang kelinci untuk dapat menentukan dosis obat. Dosis ketamin (Ket-A-100, Agrovotmarket, Canada) adalah 35 mg/kg BB secara *intramuscular* pada musculus semitendinosus atau musculus semimembranosus. Hal yang perlu dilakukan untuk menghindari efek negatif yang dapat ditimbulkan, ketamin HCl sering dikombinasikan dengan obat-obat lain seperti xylazin, diazepam, levopromazine, medetomidine, fentanyl, butharphenol, promazine dan acepromazine (Sektiani dan Yuniarti, 2001).

Hewan yang sudah dalam kondisi teranestesi dilakukan *scraping* kulit yang berkrusta. Hasil *scraping* dimasukkan ke dalam tabung konikel berukuran 10 mL dan dilarutkan dalam NaCl fisiologis kemudian disentrifus dengan kecepatan lebih kurang 2000 rpm selama 10 menit untuk memisahkan *debris*, kemudian supernatan diperiksa dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 40 kali dan *S. scabiei* yang terlihat diambil satu persatu dengan pipet kemudian dimasukkan ke dalam tabung berisi NaCl fisiologis (Lastuti *et al.*, 2019).

Pemeriksaan Hasil Scraping dan Identifikasi Morfologi

Hasil *scraping* kulit kelinci yang telah dicuci dengan NaCl fisiologis, diperiksa di bawah mikroskop cahaya dengan cara meneteskan campuran hasil *scraping* ke gelas objek ditambah KOH 10% lalu ditutup

dengan *cover glass*, kemudian diamati dibawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 100-400 kali. Tungau *S. scabiei* memiliki badan yang berbentuk lonjong, cembung di bagian dorsal, pipih di bagian ventral, tembus cahaya, berwarna putih kotor dan tidak memiliki mata. Tubuh bagian dorsal terdapat garis-garis yang berjalan transversal, mempunyai duri, sisik dan bulu keras. Tungau dewasa mempunyai 4 pasang kaki yang pendek dan terdapat bulu cambuk, bagian mulut terdapat kepitulum (Desiandura *et al.*, 2017). Sampel positif adanya tungau dari isolat Surabaya, Sidoarjo, Mojokerto, Pasuruan dan Nganjuk kemudian diperiksa secara molekuler menggunakan metode PCR sebagai uji konfirmasi *S. scabiei*.

Pemeriksaan Molekuler dengan Polymerase Chain Reaction (PCR)

Sejumlah 22 sampel *scraping* kulit kelinci yang positif *S. scabiei* dikelompokkan berdasarkan asal daerah masing-masing yaitu Surabaya, Sidoarjo, Mojokerto, Pasuruan dan Nganjuk. Selanjutnya sample dilakukan uji PCR untuk mengkonfirmasi tungau tersebut. Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan QIAamp DNA *mini kit* (Qiagen, Hilden, Germany) sesuai protokol.

Amplifikasi PCR terdiri dari denaturasi awal dilakukan pada suhu 94° C selama 5 menit, diikuti dengan 35 siklus dari denaturasi 94° C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 54° C selama 30 detik, dan elongasi pada suhu 72° C selama 30 detik; dan elongasi tambahan di suhu 72° C selama 5 menit (Qiagen, Hilden, Germany). Primer yang digunakan didesain oleh peneliti yaitu *Forward* (5' CGG TTT CGT CAC ACT TCG ATG 3') dan *Reverse* (5' CGG GTA TTC TCG CTT GAT CTG 3') dengan target ampikon 304 bp. Produk PCR kemudian dilakukan elektroforesis. Gel elektroforesis dibuat dengan konsentrasi 2% yang telah

ditambahkan *redsafe*. Sebanyak 5 μ L produk PCR termasuk marker (*DNA ladder*) dimasukkan ke dalam sumuran/*well*, proses elektroforesis dilakukan dalam media *buffer* TBE 1x sebagai media penghantar arus pada tegangan 110 volt dan 70 mA selama 35 menit. Produk PCR kemudian dibaca dengan UV Transilluminator. Hasil positif ditandai dengan didapatkan pita DNA pada 304 bp.

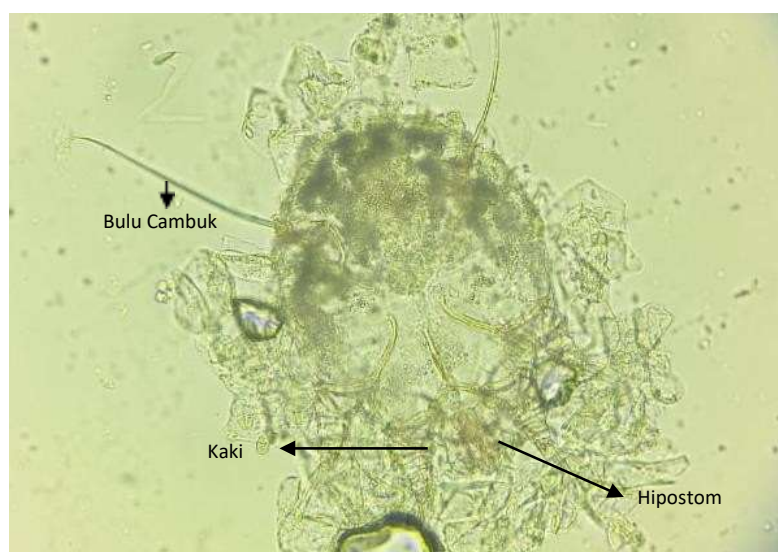
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Pemeriksaan Mikroskopis *Sarcoptes scabiei*

Pemeriksaan mikroskopis sampel *scraping* kulit kelinci yang menunjukkan gejala skabies dari daerah Surabaya, Sidoarjo, Pasuruan, Mojokerto dan Nganjuk dilakukan secara konvensional menggunakan metode pemeriksaan natif dengan perbesaran 400 kali. Sampel yang diperiksa menunjukkan adanya *S. scabiei*. Pemeriksaan

mikroskopis dengan metode natif adalah salah satu metode yang paling umum digunakan untuk mendeteksi *Sarcoptes scabiei* dari hasil kerokan kulit sel inang karena dibutuhkan lebih sedikit waktu dan sumber daya dibandingkan dengan metode lain.

Diagnosis morfologi memiliki beberapa kelemahan, diantaranya adalah tungau yang ditemukan dapat dikelirukan dengan bentukan tungau lain yang morfologinya menyerupai *S. scabiei*, dan gejala simptomatis skabies yang dapat dikelirukan dengan gejala penyakit kulit lainnya, serta pemeriksaan mikroskopis mempunyai sensitivitas yang lebih rendah dibanding dengan pemeriksaan molekuler. Saat ini banyak dikembangkan tes serologi seperti ELISA, juga metode lainnya seperti dermoskopi, biopsi kulit dan *Burrow Ink Test* (BIT) (Ljunggren, 2005).



Gambar 1. Penampang ventral *Sarcoptes scabiei* dengan mikroskop Olympus Optilab Camera (perbesaran 400x).

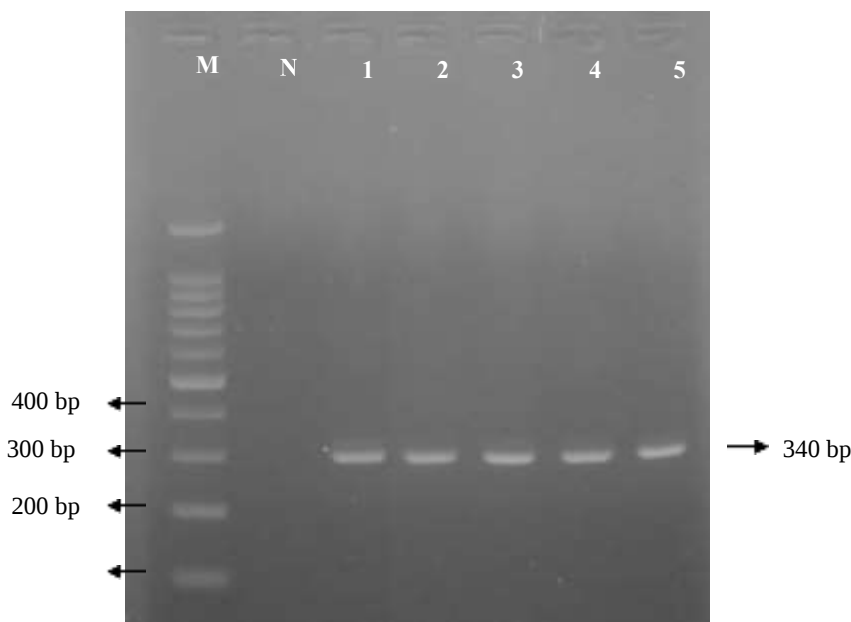
Hasil Uji *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Uji PCR dilakukan bertujuan untuk mengkonfirmasi hasil positif *S. scabiei* pada pemeriksaan mikroskopis. Lima sampel

positif yang dikelompokkan berdasarkan asal daerah masing-masing dilakukan uji PCR dan didapatkan hasil positif dengan pita/*band* sebesar 304 bp pada sampel nomor 1, nomor 2, nomor 3, nomor 4 dan nomor 5. Hasil uji

PCR dibaca pada elektroforesis gel menunjukkan produk PCR dengan spesifikasi tinggi yaitu berbentuk *band* tunggal pada

posisi 304 bp sesuai dengan target amplifikasi (Gambar 2.).



Gambar 2. Hasil visualisasi produk PCR *Sarcptes scabiei* dengan menggunakan elektroforesis pada gel agarose 2%. M: Marker DNA; N: Kontrol Negatif; 1: Sampel Surabaya; 2: Sampel Sidoarjo; 3: Sampel Pasuruan; 4: Sampel Mojokerto; 5: Sampel Nganjuk. Kelima sampel menunjukkan adanya *band* pada posisi 304 bp

Beberapa penelitian terbaru menggunakan amplifikasi asam nukleat secara konvensional dan kuantitatif menggunakan metode PCR memiliki sensitivitas yang lebih tinggi dibandingkan menggunakan identifikasi melalui mikroskop dengan metode pemeriksaan natif hasil *scraping* kulit skabies (Fraser *et al.*, 2018). Metode PCR mempunyai keunggulan dapat mendeteksi mikroorganisme target secara spesifik hingga ke level spesies, namun metode PCR memiliki kekurangan berupa harga yang cukup mahal dibandingkan dengan uji molekuler lainnya (Loeffelholz *et al.*, 2006).

Hasil positif pemeriksaan mikroskopis dilakukan uji PCR menggunakan primer yang komplemen terhadap gen ITS-2 *S. scabiei*. Gen penyandi ITS-2 terletak diantara

5.8S dan 26S rRNA. Gen penyandi ITS-2 selalu digunakan untuk mengidentifikasi dan membedakan spesies inang yang terinfeksi oleh *S. scabiei* (Peltier *et al.*, 2017). Gen penyandi ITS-2 memiliki salinan yang banyak didalam genom inti, karakter ini menyebabkan daerah ITS mudah diisolasi, diamplifikasi dan dianalisis. Pada penelitian ini digunakan primer spesifik *S. scabiei* yang didesain sendiri oleh penulis. Primer terdiri dari primer *forward* (5' CGG TTT CGT CAC ACT TCG ATG 3') dan primer *reverse* (5'CGG GTA TTC TCG CTT GAT CTG 3'). Sampel positif *S. scabiei* dalam uji PCR menunjukkan teramplifikasinya *band* sebesar 304 bp. Persentase spesifisitas dan sensitivitas PCR tergantung oleh primer yang ditentukan dari jumlah salinan homologi (*alignment*) primer dengan urutan target

nukleotida. Hasil deteksi gen penyandi ITS-2 *S. scabiei* dengan menggunakan metode PCR menunjukkan hasil positif dengan teramplifikasinya pita DNA sebesar 304 bp yang ditunjukkan pada gel agarose melalui metode elektroforesis.

Pengobatan skabies pada hewan dan manusia dilakukan dengan cara mengobati individu yang secara klinis terlihat menderita skabies dengan skabisida topikal maupun sistemik. Pemakaian skabisida terbatas untuk tujuan pengobatan saja, tidak dipakai untuk tujuan preventif. Besarnya kerugian yang ditimbulkan skabies dan kekurangan yang dimiliki oleh skabisida untuk penanggulangan skabies (tidak praktis, mahal, dan resistensi) merupakan dorongan yang kuat untuk mencari penanggulangan alternatif yang lebih efisien. Untuk itu, vaksinasi merupakan pilihan yang paling ideal karena vaksin dapat memberikan perlindungan yang lama, aman bagi hewan yang di vaksin, aman bagi konsumen dan juga lingkungan (Tarigan, 2007).

Setelah diidentifikasinya *S. scabiei* secara mikroskopik dan molekuler dengan gen penyandi ITS-2 sebagai marker genetik, diharapkan penularan Skabies pada hewan peliharaan dapat dikendalikan melalui pengobatan dan pencegahan secara dini sehingga penularan pada hewan termasuk pada manusia dapat dicegah. Penelitian ini juga diharapkan dapat dijadikan acuan dasar pengembangan ilmu di bidang molekuler DNA *S. scabiei* yang nantinya dapat dikembangkan sebagai kandidat kit diagnostik dan vaksin untuk skabies.

KESIMPULAN

Hasil pemeriksaan mikroskopis dari 22 sampel kerokan kulit kelinci isolat asal Surabaya, Sidoarjo, Mojokerto, Pasuruan dan Nganjuk ditemukan adanya *S. scabiei*. Sampel positif dari hasil pemeriksaan mikroskopis selanjutnya dilakukan

pemeriksaan molekuler menggunakan PCR menunjukkan hasil positif dengan teramplifikasinya gen penyandi ITS-2 *S. scabiei* yang berada pada posisi 304 bp.

Hasil penelitian *Sarcoptes scabiei* pada kelinci di Kota Surabaya, Sidoarjo, Mojokerto, Pasuruan dan Nganjuk menunjukkan adanya risiko penyebaran dan penularan pada hewan lain dan manusia. Untuk itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut ke sekuensing DNA untuk mengetahui perubahan susunan nukleotida dan homologi *S. scabiei* isolat lokal dengan isolat yang ada di dunia.

DAFTAR PUSTAKA

- Arlian LG, Morgan M.S. 2017. A Review of *Sarcoptes scabiei* : past, present and future. *Parasites and Vectors* 10: 297.
- Desiandura K, Lastuti NDR, Suwanti LT, Handijatno D. 2017. Molecular identification of *Sarcoptes scabiei* var. *cuniculi* from Surabaya and Malang regions of East Java. *Indonesian Journal of Tropical and Infectious Disease* 6(6): 150-153.
- Fraser TA, Martin A, Polkinghorne A, Carver S. 2018. Comparative diagnostic reveals PCR assays on skin scrapings is the most reliable method to detect *Sarcoptes scabiei* infestations. *Vet Parasitol* 251: 119-124.
- He R, Zhang H, Shen N, Guo C, Ren Y, Xie Y, Gu X, Lai W, Peng X, Yang G. 2018. Molecular charcterisation and allergenicity potencial of triosephosphate isomerase from *Sarcoptes scabiei*. *Vet Parasitol* 257: 40-47
- Hu L, Zhao Y, Yang Y J, Niu DL, Wang R, Cheng J, Yang F. 2016. De novo RNA-Seq and functional annotation of *Sarcoptes scabiei* canis. *Parasitol Res* 115: 2661- 2670.
- Lastuti NDR, Hastutiek P, Suwanti LT, Chrismanto D. 2018. Exploration *Sarcoptes scabiei* antigenic protein which play roles in Scabies pathogenesis in goats and rabbits. *Iran J Parasitol* 13(3): 446-472.
- Lastuti NDR, Rohman A, Handiyatno D, Chrismanto D, Desiandura K. 2019. Sequence analysis of the Cytochrome C oxidase subunit 1 Gene of *Sarcoptes scabiei* isolate from goats and rabbits in East Java, Indonesia. *Vet World* 12(7): 959-964.
- Ljunggren EL. 2005. Molecular analysis of *Sarcoptes scabiei*. Uppsala. Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science. Hlm. 1-64.
- Loeffelholz M, Deng H. 2006. PCR and its variations. *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*. USA. Springer US. 166-183.
- Makouloutou P, Suzuki K, Yokoyama M, Takeuchi M, Yanagida T, Sato H. 2015. Involvement of two

- genetic lineages of *Sarcoptes scabiei* mites in a local mange epizootic of wild mammals in Japan. *J Wildl Dis* 51(1):69–78
- Peltier SK, Brown JD, Ternent M, Niedringhaus KD, Schuler K, Bunting EM. 2017. Genetic characterization of *Sarcoptes scabiei* from black bears (*Ursus americanus*) and other hosts in the Eastern United States. *J Parasitol* 103(5): 593–597.
- Sektiari B, Yuniarti WM. 2001. Pengaruh premedikasi Acepromazine terhadap tekanan intraokuler pada anjing yang di anestesi Ketamin HCl. *Media Kedokteran Hewan* 17 (3): 120-122.
- Tarigan S. 2007. Vaksin skabies dibutuhkan namun sulit diwujudkan. Balai Besar Penelitian Veteriner. *Wartazoa* 17(1): 38-45.
- Walton SF, Currie BJ. 2007. Problems in diagnosing scabies, a global disease, in human and animal populations. *Clin Microbiol Rev* 20(2): 268-279.
- Wong SS, Poon RW, Chau S, Wong SC, To KK, Cheng VC, Fung KS, and Yuen K. 2015. Development of conventional and realtime quantitative polymerase chain reaction assay in the diagnosis and monitoring of scabies. *J. Clin. Microbiol* 53: 2095–2102
- Yudaniayanti IS, Maulana E, Ma'ruf A. 2010. Profil penggunaan kombinasi Ketamin- Xylazine dan Ketamin-Midazolane sebagai anestesi umum terhadap gambaran fisiologis tubuh pada kelinci jantan. *Veterinaria Medika* 3(1): 23-30.