

## Perbandingan Metode Penyimpanan Darah Vektor Surra (Lalat *Haematophagus*) Untuk Analisis *Multiplex* Polimerasi Chain Reaction

### (Comparison of Blood Preservation Methods of Surra Vectors (*Haematophagus Flies*) for *Multiplex* Polimerasi Chain Reaction Analysis)

Fitrine Ekawasti, Sawitri DH, Wardhana AH

Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl. R. E. Mardinata 30, 16114 Bogor  
fitrineekawasti@gmail.com

#### ABSTRACT

Surra in livestock caused by *Trypanosoma evansi* (*T. evansi*), at least should be controlled using two approaches, drug treatment and vector eradication. Blood-sucking flies (*Haematophagus*) such as *Stomoxys calcitrans*, *Hippobosca sp* and *Haematobia irritans exigua* are potential mechanical vectors for spreading the disease. Detection of *T. evansi* in a region can be assessed by blood examination in both livestock and vectors. Aim of this study is to compare blood fly preservation methods between using 80% ethanol and filter paper. A total of 33 haematophagous flies (*Stomoxys calcitrans*, *Hippobosca sp* dan *Haematobia irritans exigua*) were collected in East Sumba (5 flies) and Pandeglang Districts (28 flies). Blood samples of flies were preserved into two methods, i.e. 80% ethanol preservation method (blood kept in abdomen of fly, 17 flies) and filter paper preservation method (16 flies). The later method was performed by pressing blood-containing flies on Whatman no. 1 (Whatman Ltd., England) diameter 110 mm filter paper. The 80% ethanol method was conducted by first killing flies into freezer and then stored into 80% ethanol. Genomic DNA Mini Kit (Geneaid) was used for DNA extraction. Two pairs of specific primers for *T. evansi* were used in this study, ITS 1 (480 bp) and Ro Tat 1.2 VSG (151 bp). The PCR product was fractionated in 1.5% electrophoresis gel and was visualised under Ultra Violet (UV). Results demonstrated that all tested flies were positive containing *T. evansi* marked by two DNA bands in one column of the gel. It indicated that both methods were suitable for multiplex PCR analysis and did not damage DNA of *T. evansi*. Filter paper method is more reliable in field because in terms of sample preparation, it is practical and quick. It can be done along with blood collection in livestock.

**Key Words:** Surra, Vectors, *Multiplex PCR*, 80% Ethanol, Filter Paper

#### ABSTRAK

Surra pada ternak disebabkan oleh *Trypanosoma evansi* (*T. evansi*) dapat dikendalikan dengan dua pendekatan, yaitu tindakan pengobatan dan pemberantasan vektor. Lalat penghisap darah (*haematophagous*) seperti *Stomoxys calcitrans*, *Hippobosca sp* dan *Haematobia irritans exigua* adalah vektor mekanis surra yang berpotensi menyebarkan penyakit ini semakin meluas. Deteksi keberadaan *T. evansi* dalam suatu daerah dapat dilakukan dengan cara pemeriksaan darah pada ternak dan pada vektor. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan antara metode penyimpanan sampel darah lalat dengan etanol 80% dan kertas saring guna mendeteksi *T. evansi* dalam tubuh lalat (vektor surra) menggunakan *Multiplex PCR*. Sebanyak 33 ekor lalat penghisap darah (*Stomoxys calcitrans*, *Hippobosca sp* dan *Haematobia irritans exigua*) dikoleksi dari Kabupaten Sumba Timur (5 ekor) dan Pandeglang (28 ekor). Lalat disimpan dalam dua metode, yaitu dengan menggunakan etanol 80% (darah berada di dalam abdomen lalat, 17 ekor) dan kertas saring (16 ekor). Metode kertas saring dilakukan dengan cara memijat abdomen lalat yang mengandung darah di atas kertas saring *Whatman* no. 1 (*Whatman Ltd.*, *England*) diameter 110 mm sedangkan metode etanol 80% dilakukan dengan cara mematikan lalat di dalam freezer, selanjutnya disimpan dalam etanol 80%. *Genomic DNA Mini Kit* (*Geneaid*) digunakan untuk ekstraksi DNA genom dari sampel yang diuji. Fragmen DNA *T. evansi* diamplifikasi dengan dua primer, yaitu ITS 1 (480 bp) dan Ro Tat 1,2 VSG (151 bp). Produk fragmen DNA difraksinasi dalam gel elektroforesis 1,5% dan divisualisasikan di bawah sinar ultra violet (UV). Hasil penelitian menunjukkan bahwa semua lalat yang diuji (100%) mengandung *T. evansi* yang ditandai dengan adanya pita DNA pada gel. Hal ini mengindikasikan bahwa kedua metode penyimpanan tersebut tidak

berpengaruh terhadap DNA *T. evansi* sehingga dapat digunakan untuk analisis *multiplex PCR*. Metode penyimpanan dengan kertas saring lebih praktis karena dapat diaplikasikan langsung di lapang pada saat bersamaan dengan koleksi darah ternak.

**Kata Kunci:** Surra, Vektor, *Multiplex PCR*, Etanol 80%, Kertas Saring

## PENDAHULUAN

Surra yang disebabkan oleh *T. evansi* merupakan penyakit penting pada ternak dan mengakibatkan kerugian ekonomis yang besar berupa kematian dan penurunan produktivitas, produksi susu dan daging rendah, kualitas karkas yang buruk, menurunkan tingkat reproduksi dan tingginya biaya pengobatan (Reid 2002). Penyakit ini dilaporkan endemik di seluruh Asia, Afrika, Amerika Tengah, Amerika Selatan dan Amerika latin (Dávila et al 2003; OIE 2012). Berdasarkan laporan Dinas Peternakan Sumba Timur (2012) menyebutkan bahwa lebih dari 4.268 ekor ternak terserang Surra dan 1.760 ekor diantaranya mengalami kematian dalam kurun waktu 2010-2012. Estimasi kerugian ekonomis juga meningkat dari 75 M di tahun 2010 menjadi 167,5 M di tahun 2012, oleh karena itu, Direktorat Jendral Peternakan dan Kesehatan Hewan memasukkannya ke dalam daftar Penyakit Hewan Menular Strategis (PHMS) sehingga diperlukan tindakan pencegahan dan pengendalian yang serius.

Surra disebut juga *Arthropoda-borne diseases* karena melibatkan beberapa spesies lalat pengisap darah (*haematophagous*) seperti *Tabanids*, *Stomoxes*, *Musca spp*, *Haematopota spp*, *Lyperosia* dan *Atylotus* (Sukanto 1994; OIE 2012). Salah satu pengendalian penyakit surra yang cukup efektif adalah mengontrol vektor arthropoda dan mencegah akses ke spesies *host* dalam mencegah penyebaran infeksi baru *T. evansi* (OIE 2012). Van Hennekeller et al. (2008) menyatakan bahwa kejadian wabah Surra memiliki korelasi positif dengan jumlah vektor yang tinggi, sehingga perlu dilakukan monitoring vektor pada daerah tersebut.

Teknik PCR telah banyak diterapkan untuk mendeteksi *trypanosomiasis* di sejumlah inang dengan tingkat sensitifitas dan spesifisitas yang tinggi (Desquesnes et al. 2013). Teknik ini juga telah diterapkan di Afrika untuk mendeteksi vektor *trypanosoma* (Malele et al. 2003; Adams et al. 2006). Tahun 1988, teknik

*Multiplex PCR* (mPCR) mulai dikembangkan dan dilaporkan sangat efektif untuk mendeteksi berbagai jenis agen penyakit dalam satu kali reaksi. Teknik ini lebih ekonomis dibandingkan dengan teknik *single PCR* karena menggunakan reagen kimia yang lebih sedikit dalam proses amplifikasi fragmen DNA (Chamberlain et al. 1988; Batra et al. 2013).

Variasi sensitifitas dan spesifitas yang tepat pada diagnostik PCR tergantung pada jenis primer yang digunakan dan metode penyimpanan sampel uji (Otranto & Stevens 2002; Njiru et al. 2005; Ahmed et al. 2013). Banyak penanda molekuler yang digunakan untuk mendeteksi, membedakan dan mempelajari spesies *trypanosoma*. Primer internal transkrip spacer satu (ITS1) dilaporkan mampu membedakan spesies *trypanosoma* (Njiru et al. 2005). Demikian pula primer Ro Tat 1,2 *Variant Surface Glycoprotein* (VSG) merupakan primer spesifik yang banyak digunakan untuk identifikasi *T. evansi* dari spesies *Trypanosoma* yang lain (Verloo et al. 2001; Beltrame et al. 2005; Khuchareontaworn et al. 2007; Areekit et al. 2008; Amer et al. 2011).

Koleksi vektor untuk keperluan deteksi penyakit, menggunakan beberapa metode penyimpanan. Metode yang telah lama digunakan untuk memperpanjang masa penyimpanan vektor adalah dengan etanol 80%, sedangkan pengawetan sampel secara kering (*drying*) tidak sesuai untuk analisis DNA (Wardhana et al. 2003; Cruickshank 2002). Chompoochan et al. (2005) menyatakan bahwa sampel darah pada kertas saring (darah kering) dapat diperiksa menggunakan PCR untuk mendeteksi DNA *T. evansi*. Penggunaan kertas saring selain lebih cepat dan nyaman, pengiriman menjadi lebih mudah terutama di daerah terpencil (Handayani et al. 2004; Dargantes 2010).

Tujuan penelitian ini untuk membandingkan metode penyimpanan sampel darah vektor surra dengan menggunakan etanol 80% dan kertas saring sebagai pengembangan metode yang murah dan praktis serta mudah

diaplikasikan di lapang untuk analisis *Multiplex PCR* dalam mendeteksi adanya *T. evansi* dalam suatu daerah.

## MATERI DAN METODE

### Koleksi dan identifikasi lalat

Sebanyak 33 ekor lalat penghisap darah (*haematophagus flies*) dikoleksi di Sumba Timur, Provinsi Nusa Tenggara Timur (NTT) dan Kabupaten Pandeglang (Banten), Provinsi Banten (Tabel 1). Koleksi ini dilakukan bersamaan dengan koleksi darah ternak untuk pemeriksaan Surra. Lalat yang berada di sekitar kandang atau ternak ditangkap dengan menggunakan jaring atau dengan tangan. Identifikasi lalat dilakukan berdasarkan karakteristik morfologi pada bagian kepala, thorak, abdomen dan sayap (Putra et al. 2011).

### Penyimpanan darah vektor surra (lalat *haematophagus*)

Darah vektor surra (lalat *haematophagus*) disimpan dalam dua metode, yaitu dalam etanol 80% dan kertas saring, mengacu pada metode Wardhana et al. (2003); Chompoochan et al. (2005) (Tabel 1). Materi sampel darah yang disimpan pada metode etanol 80% adalah lalat utuh yang mengandung darah pada abdomennya, sedangkan materi yang disimpan pada metode kertas saring adalah bercak darah lalat pada kertas saring.

### Metode etanol 80%

Lalat yang ditangkap dimasukkan ke dalam kantong plastik dan disimpan dalam kotak

pendingin yang berisi es batu (4°C). Setelah sampai di laboratorium, lalat dibunuh dengan cara memasukkan ke dalam *freezer* (-20°C) selama 1 jam, selanjutnya dimasukkan ke dalam botol yang berisi etanol 80% dan diberi label. Seluruh botol disimpan di dalam *freezer* sampai digunakan untuk analisis lebih lanjut (Wardhana et al. 2003).

### Metode kertas saring

Metode kertas saring dilakukan berdasarkan metode Chompoochan et al. (2005) yang dimodifikasi. Lalat dilemahkan dalam kotak pendingin yang berisi es batu (4°C). Setelah diidentifikasi, abdomen lalat yang mengandung darah dipijat di atas kertas saring sehingga meninggalkan bercak darah. Secara individual, kertas saring yang mengandung bercak darah dimasukkan ke dalam plastik klip dan diberi label. Seluruh kertas saring disimpan pada suhu dingin (4°C) untuk analisis lebih lanjut.

### Ekstraksi DNA

Sebelum dilakukan ekstraksi, lalat yang disimpan dengan metode etanol 80%, dicuci 3 kali menggunakan DNA *water* dengan interval 5 menit, selanjutnya secara individual dimasukkan ke dalam tabung *ependorf* 1,5ml. Untuk metode kertas saring dilakukan pengguntingan bercak darah dengan gunting steril, kemudian secara individual dimasukkan ke dalam tabung *ependorf*. Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan kit komersial *genomic DNA mini kit (Geneaid)* sesuai prosedur. Hasil isolasi DNA genom disimpan dalam *freezer* (-20°C) sampai digunakan untuk uji *multiplex PCR*.

**Tabel 1.** Sampel darah yang disimpan dalam dua metode yang berbeda untuk analisis *multiplex PCR* berdasarkan lokasi penangkapan vektor surra

Lokasi	Metode penyimpanan		Total
	Ethanol 80%	Kertas saring	
Sumba Timur	-	5	5
Pandeglang	17	11	28
Total	17	16	33

### Aplikasi uji *Multiplex PCR*

*Multiplex polymerase chain reaction* dilakukan dengan menggunakan KAPA2G™ *Fast Multiplex PCR Kit* dalam 25 µl total campuran reaksi terdiri dari primer ITS-1/F dan ITS-1/R serta RoTat 1,2 VSG/F dan RoTat 1,2 VSG/R masing-masing 25 pmol (2 µl), DNA *template* 25 ng (2 µl) dan ddH<sub>2</sub>O 2,5 µl. Sekuen masing-masing primer yang digunakan pada studi ini dapat dilihat pada Tabel 2.

Amplifikasi fragmen DNA *T. evansi* dilakukan menggunakan *thermal cycler machine (Thermo Scientific)* dengan program PCR yang telah dioptimasi, yang terdiri dari denaturasi 95°C selama 30 menit sebanyak 1 siklus, diikuti denaturasi 95°C selama 20 detik, penempelan primer (*annealing*) pada 57°C selama 30 detik dan ekstensi (*extention*) pada 72°C selama 30 detik sebanyak 35 siklus. Program diakhiri dengan *final extention* pada 72°C selama 20 detik. Produk PCR difraksinasi secara elektroforesis pada gel agarose 1,5%. Pita DNA yang terbentuk divisualisasi di bawah sinar ultraviolet (UV).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Identifikasi lalat *haematophagus*

Pemilihan lokasi untuk koleksi lalat dilakukan di Kabupaten Pandeglang (Banten) dan Kabupaten Sumba Timur (NTT) berdasarkan laporan adanya kasus Surra yang sedang terjadi di kedua kabupaten tersebut. Berdasarkan hasil identifikasi lalat *haematophagus*, sebanyak tiga spesies yang berhasil ditangkap, yaitu *Stomoxys calcitrans* (*S. calcitrans*), *Hippobosca sp.* dan *Haematobia irritans exiqua* (*H. exiqua*) (Tabel 3). Jumlah lalat yang ditangkap di Kabupaten Sumba Timur lebih

sedikit dibandingkan dengan di Kabupaten Pandeglang Banten, diduga karena diduga pengaruh penyemprotan insektisida yang sedang dilakukan di Kabupaten tersebut dalam rangka program pemberantasan surra.

### Metode penyimpanan

Umumnya lalat penyebab surra yang diperoleh di lapang disimpan dengan tiga metode, yaitu disimpan dalam bentuk kering, penyimpanan dalam pendingin (*ultra cold freezing*/-80°C) dan disimpan dalam etanol 80% (Cruickshank 2002; Wardhana et al. 2003). Penyimpanan sampel secara kering (*drying*) merupakan metode standar yang praktis untuk insekta, namun metode ini tidak sesuai untuk jenis diptera karena dapat menyebabkan kerusakan pada kepala, kaki, dan antena yang mudah menjadi patah sehingga sulit untuk diidentifikasi (Shauff 2001) dan tidak sesuai untuk analisis DNA (Cruickshank 2002). Penyimpanan dengan metode pendingin (*ultra cold freezing*/-80°C) sangat efektif untuk studi molekuler insekta, tetapi tidak praktis untuk diterapkan di lapang (Reiss et al. 1995), sedangkan sampel yang diawetkan dengan etanol secara fisik tidak ada pengaruh yang nyata pada sampel tersebut (Wardhana et al. 2003).

Untuk analisis DNA parasit darah dari tubuh vektor lalat, metode penyimpanan etanol 80% lebih banyak direkomendasikan karena secara fisik tidak menyebabkan perubahan atau kerusakan pada vektor dan agen penyakitnya, sehingga dapat dilakukan identifikasi spesies vektor secara morfologi dan juga dilakukan analisis PCR untuk deteksi parasit darahnya (Hall et al. 2001). Metode penyimpanan darah untuk analisis DNA juga dapat dilakukan dengan metode kertas saring.

**Tabel 2.** Sekuen primer yang digunakan untuk analisis *multiplex PCR*

Jenis parasit	Primer	Sekuen Gen	Ukuran amplikon	Pustaka
<i>T. evansi</i>	ITS-1/F	5'-CCGGAAGTTCACCGATATTG-3'	480 bp	Salim (2011)
	ITS-1/R	5'-TGCTGCGTCTCTCAACGAA-3'		
	RoTat 1,2 VSG/F	5'-CTGAAGGGTTGGAAATGGAGAAG-3'	150 bp	
	RoTat 1,2 VSG/R	5'-GTTTCGGTGGTCTGTTGTTGTTA-3'		

**Tabel 3.** Hasil identifikasi lalat *haematophagus* yang ditangkap di Kabupaten Sumba Timur (NTT) dan Kabupaten Pandeglang (Banten)

Lokasi	Spesies lalat			Total
	<i>S. calcitrans</i>	<i>Hippobosca</i> sp.	<i>H. exiqa</i>	
Sumba Timur	2	3	-	5
Pandeglang	17	-	11	28
Total	19	3	11	33

Umumnya metode ini dilakukan untuk sampel darah manusia dan hewan. Handayani et al. (2004) membuktikan hasil yang positif pada sampel darah manusia dengan metode kertas saring untuk pemeriksaan antibodi *meningitis meningokokus* serogrup A melalui analisis ELISA. Penelitian ini didukung oleh Natalia & Priadi (1998) yang menyimpulkan bahwa ekstrak kertas saring dari darah mempunyai persamaan komposisi protein dengan serum. Chompoochan et al. (2005) juga membuktikan efektifitas sampel darah pada kertas saring (darah kering) untuk deteksi DNA *T. evansi* dengan PCR. Namun demikian, belum ada laporan yang menyebutkan efektifitas metode ini untuk analisis DNA dari darah yang terkandung di dalam tubuh insekta (lalat) untuk analisis *multiplex* PCR.

### **Multiplex PCR**

Penggunaan *multiplex* PCR untuk deteksi dan identifikasi *T. evansi* (primer ITS 1 dan Ro Tat 1,2 VSG) dapat menghemat waktu dan biaya karena proses analisis kedua primer dilakukan dalam satu waktu secara bersamaan menggunakan *master mix* yang sama. Teknik PCR tunggal dengan menggunakan hanya satu pasang primer telah digunakan untuk deteksi *T. evansi* pada lalat *haematophagus* yang diisolasi dari Sumbawa Besar (Sukanto et al. 2000). Namun demikian, menurut Ahmed et al. (2013) bahwa teknik PCR reaksi tunggal untuk deteksi sekaligus identifikasi *T. evansi* pada jumlah sampel yang banyak memerlukan biaya yang besar dan membutuhkan waktu yang lebih lama. Keadaan ini dapat diantisipasi dengan mengaplikasikan teknik *multiplex* PCR.

Beberapa primer telah banyak digunakan untuk analisis PCR yang sensitif dan spesifik pada DNA *trypanosome* dalam darah *host* vektor serangga. PCR Primer ITS 1 dilaporkan

mampu mengidentifikasi beberapa spesies *trypanosoma* karena memiliki variasi ukuran untuk spesies tertentu (Desquesnes & Davila 2002). 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 species* (Verloo et al. 2001). Primer Ro Tat 1,2 VSG adalah jenis varian primer yang hanya dimiliki oleh *T. evansi* (Verloo et al. 2001). Pengujian PCR spesifik untuk *T. evansi* dengan menggunakan Rotat 1,2 VSG memiliki ukuran 151 bp (Konnai et al. 2009).

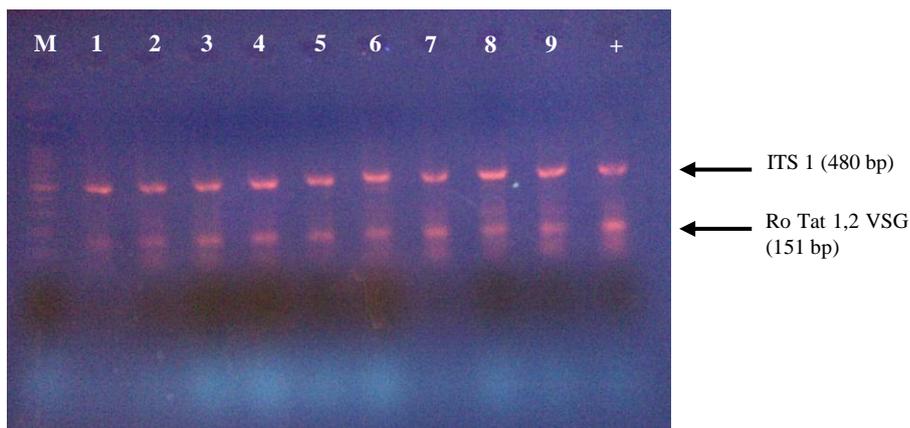
Hasil uji *Multiplex* PCR dengan menggunakan primer ITS-1 dan RoTat 1,2 VSG pada sampel darah vektor lalat yang disimpan dengan dua metode penyimpanan yang berbeda dapat dilihat pada Gambar 1 dan Gambar 2. Visualisasi produk PCR pada gel di bawah sinar UV menunjukkan adanya dua pita DNA dengan ukuran spesifik untuk *T. evansi*, yaitu 480 bp untuk fragmen ITS1 dan 151 bp untuk fragmen Ro Tat 1,2 VSG. Hasil ini membuktikan bahwa sampel darah yang disimpan dalam etanol 80% (berada di dalam tubuh lalat) dan kertas saring tidak menyebabkan perubahan atau kerusakan DNA selama masa penyimpanan. Hasil tersebut juga menunjukkan bahwa amplifikasi fragmen DNA menggunakan analisis *multiplex* PCR dengan mencampur 2 pasang primer dalam satu reaksi dapat berjalan baik yang ditandai dengan adanya dua pita DNA pada setiap kolom dalam gel. Pengembangan metode pengawetan sampel darah pada vektor dengan metode kertas saring memiliki beberapa keuntungan antara lain dapat dilakukan di lapang dengan cepat dan praktis, sampel dapat disimpan pada suhu kamar, sehingga transportasi sampel menjadi lebih praktis terutama di daerah

terpencil yang jauh dari laboratorium. Untuk tujuan pemeriksaan ke laboratorium lain, sampel dapat dikirim melalui pos dengan memasukkan kertas saring dalam amplop atau plastik klip. Metode pengawetan dengan kertas saring ini sangat mudah diterapkan dan sampel mudah untuk dikirim sehingga sangat tepat digunakan dalam survei epidemiologi serta untuk program pengendalian *trypanosomiasis* di daerah endemik (Chompoochan et al. 2005).

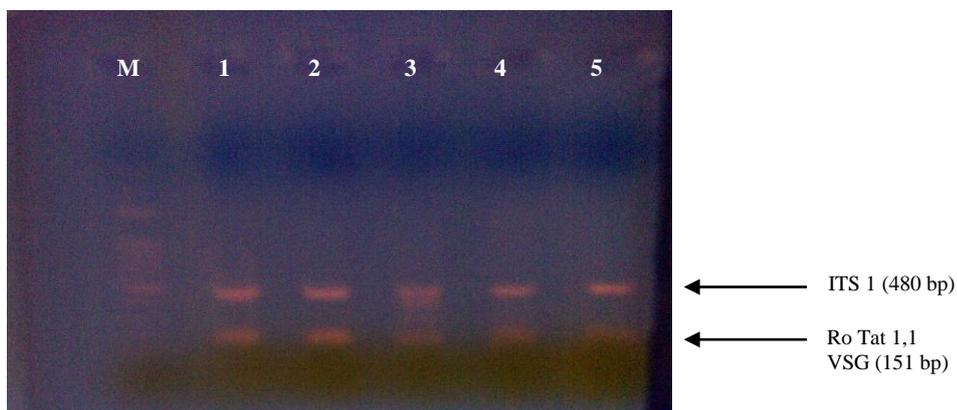
Seluruh sampel darah lalat *haematophagus* yang diuji menunjukkan hasil positif

mengandung *T. evansi* (100%). Setidaknya ada dua hipotesa yang dapat dipahami untuk menjelaskan hasil tersebut yaitu koleksi sampel lalat dilakukan pada saat kasus surra terjadi di Kabupaten Sumba Timur dan Pandeglang.

Hasil pemeriksaan darah ternak dengan metode ulas darah dan *micro haematocrit centrifuge technique* (MHCT) menunjukkan bahwa 2,5% sampel dari Kabupaten Sumba Timur dan 66,67% sampel dari Kabupaten Pandeglang positif *T. evansi* (data tidak dipublikasikan).



**Gambar 1.** Hasil visualisasi produk *multiplex* PCR dalam gel agarose 1,5% menunjukkan dua pita DNA dengan ukuran yang berbeda dalam satu kolom, yaitu 480 bp untuk fragmen ITS 1 dan 151 bp untuk fragmen Ro Tat 1,2 VSG. Sampel 1- 9 adalah lalat *S. calcitrans* yang mengandung darah di dalam abdomennya (Kabupaten Pandeglang) dan disimpan metode etanol 80%



**Gambar 2.** Hasil visualisasi produk *multiplex* PCR dalam gel agarose 1,5% menunjukkan dua pita DNA dengan ukuran yang berbeda dalam satu kolom, yaitu 480 bp untuk fragmen ITS 1 dan 151 bp untuk fragmen Ro Tat 1,2 VSG. Sampel 1-2 adalah lalat *S. calcitrans* dan sampel 3-5 adalah lalat *Hippobosca* sp. Seluruh sampel lalat yang diuji mengandung darah di dalam abdomennya disimpan dengan metode kertas saring

Hipotesa yang kedua adalah penangkapan lalat dilakukan di sekitar kandang atau ternak yang diduga positif surra. Hasil ini mengindikasikan bahwa lalat-lalat di daerah tersebut telah menghisap darah inang positif surra dan berpotensi untuk menyebarkan atau menularkan *T. evansi* ke ternak-ternak lain yang sehat. Oleh karena itu, tindakan pemberantasan vektor surra harus segera dilakukan untuk mencegah penyebaran surra yang lebih luas.

### KESIMPULAN

Metode penyimpanan sampel darah lalat vektor surra dengan menggunakan etanol 80% (darah berada di dalam tubuh lalat) dan kertas saring tidak menunjukkan hasil yang berbeda pada analisis *Multiplex* PCR dengan primer ITS 1 dan Ro Tat 1,2 VSG. Penggunaan metode kertas saring lebih aplikatif di lapang karena dapat dilakukan dengan cepat, mudah dan praktis. Analisis *Multiplex* PCR dengan primer ITS-1 dan RoTat 1,2 VSG dapat digunakan untuk mendeteksi dan mengidentifikasi spesies *T. evansi* sekaligus sehingga menghemat waktu dan biaya.

### SARAN

Perlu dilakukan tindakan pemberantasan vektor lalat *haematophagus* di wilayah Kabupaten Sumba Timur dan Kabupaten Pandeglang karena lalat-lalat tersebut telah mengandung *T. evansi* didalam tubuhnya sehingga penyebaran surra lebih luas dapat diatasi.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dilakukan atas biaya APBN T. A. 2013. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Bapak Drh. Martono Adi Priyatno dan Drh. Manuel Kitu dari Dinas Peternakan Kabupaten Sumba Timur serta Drh. Putut Eko Wibowo dari Balai Veteriner Subang dan Drh. Diah dari Dinas Peternakan Kabupaten Pandeglang atas bantuan teknis selama penelitian berlangsung. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Bapak Eko

Setyo Purwanto, Farlin Nefo, Edi Satria dan Ismail Ali atas bantuan teknis di laboratorium.

### DAFTAR PUSTAKA

- Adams ER, Malele II, Msangi R, Gibson WC. 2006. Trypanosome identification in wild tsetse populations in Tanzania using generic primers to amplify the ribosomal RNA ITS-1 region. *Acta Tropica*. 1000:103-109.
- 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.
- Amer S, Ryu O, Tada C, Fukuda Y, Inoue N, Nakai Y. 2011. Molecular identification and phylogenetic analysis of *Trypanosoma evansi* from dromedary camels (*Camelus dromedarius*) in Egypt, a pilot study. *Acta Trop*. 117:39-46.
- Areekit S, Singhaphan P, Khuchareontaworn S, Kanjanavas P, Sriyapai T, Pakpitchareon A, Chansiri K. 2008. Genetic diversity of *Trypanosoma evansi* in beef cattle based on internal transcribed spacer region. *Infect Genet E* 8:484-488.
- Batra SA, Krupanidhi S, Tuteja U. 2013. A sensitive and specific multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Burkholderia pseudomallei* & *Brucella* species. *Indian J Med Res*. 138:111-116.
- Beltrame-Botelho IT, Gaspar-Silva D, Steindel M, Davila AM, Grisard EC. 2005. Internal transcribed spacers (ITS) of *Trypanosoma rangeli* ribosomal DNA (rDNA): a useful marker for inter-specific differentiation. *Infect Genet E*. 5:17-28.
- Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT 1988. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Research* 16:11141-1156.
- Chompoochan TK, Mohkaew S, Ngamjiaue N, Sarataphan. 2005. Application of dried blood sample on FTA® Paper for detection of *Trypanosoma evansi* by PCR. Parasitology Section, Chatuchak (Thailand): National Institute of Animal Health.
- Cruickshank R. 2002. Molecular markers for the phylogenetics of mites and ticks. *System. Appl. Acar. Soc*. 7:3-14.

- Dargantes AP. 2010. Epidemiology, control and potential insect vectors of *Trypanosoma evansi* (surra) in village livestock in southern Philippines. [Thesis]. [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.* 3:117(1-2):1-13.
- Desquesnes M, Holzmuller P, Lai DH, Dargantes A, Lun ZR, Jittaplapong 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* (2013), Article ID 194176, p.22.
- Desquesnes M, Davila AMR. 2002. Applications of PCR-based tools for detection and identification of animal Trypanosomes: a review and perspectives. *Veterinary Parasitology.* 2429:1-19.
- Dinas Peternakan Sumba Timur. 2012. Kejadian Surra di Sumba Timur. Nusa Tenggara (Indonesia): Dinas Peternakan Sumba Timur.
- Hall MJR, W Edge, JM Testa, Adams ZJO, Ready PD. 2001. Old world screwworm fly, *chrysomya bezziana*, occurs as two geographical races. *Med Vet Entomol.* 15:393-402.
- 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 Volume XIV:2.*
- Khuchareontaworn S, Singhaphan P, Viseshakul Chansiri K. 2007. Genetic diversity of *Trypanosoma evansi* in buffalo based on internal transcribed spacer (ITS) regions. *J Vet Med Sci.* 69:1215-1217.
- 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 E.* 9:449-452.
- Malele I, Craske L, Knight C, Ferris V, Njiru Z, Hamilton P, Lehane S, Lehane M, Gibson W. 2003. The use of specific and generic primers to identify trypanosome infections of wild tsetse flies in Tanzania by PCR. *Infection, Genetics and Evolution.* 3:271-279.
- Natalia L, Priadi A. 1998. Penggunaan kertas saring sebagai alat transpor sampel darah untuk uji serologi *pasteurella multocida*: analisis dan perbandingan komposisi protein antara ekstrak kertas saring dan serum. *JITV.* 3:182-187.
- Njiru ZK, Constantine CC, Guya S, Crowther J, Kiragu JM, Thompson RC, Dávila AM. 2005. The use of ITS1 rDNA PCR in detecting pathogenic African trypanosomes. *Parasito Res.* 95:186-192.
- OIE. 2012. *Trypanosoma evansi* Infection (SURRA) By The World Assembly of Delegates of the OIE in May 2012. *Terrestrial Manual Chapter 2.1.17: Office International Des Epizooties, World Organisation for Animal Health.*
- Otranto D, Stevens JR. 2002. Molecular approaches to the study of myiasis-causing larvae. *Int. J. Parasitol.* 32:1345-1360.
- Putra SN, Suputra, Witjaksono. 2011. *Petunjuk praktikum entomologi dasar. Laboratorium entomologi dasar jurusan hama dan penyakit tumbuhan. Yogyakarta (Indonesia): Universitas Gadjah Mada.*
- Reid SA. 2002. *Trypanosoma evansi* control and containment in Australasia. *Trends Parasitol.* 18:219-241.
- Reiss RA, DP Schwartz and AC Ashworth. 1995. Field preservation of Coleoptera for molecular genetic analyses. *Environ. Entomol.* 24:716-719.
- Shauff ME. 2001. *Collecting and Preserving Insect And Mites: Techniques and Tools. Systematic Entomology Laboratory, USDA. Washington, DC (USA): National Museum of Natural History, NHB 168. 20560.*
- Sukanto IP. 1994. *Petunjuk diagnosa parasit darah trypanosoma, babesia dan anaplasma dan ringkasan hasil seminar penelitian paesit darah pada ruminansia besar di Indonesia. Proyek kerjasama Balitvet-ODA (1986-1992). Puslitbang Peternakan, Bogor. hlm. 3-31.*
- Sukanto IP, Solihat L, Politedy F, Dachlan M, Wardhana AH, Satria E. 2000. Peran diptera hematofagus sebagai vektor trypanosoma evansi. Dalam: Hatyanto B, Darminto, Hastiono S, Utama IK, Partoutomo S, Subandriyo, Sinurat AP, Darmono, Supar, Butar SOB, penyunting. *Teknologi peternakan dan veteriner dalam upaya meningkatkan ketahanan pangan Nasional. Prosiding seminar nasional peternakan dan veteriner Bogor, 18-*

- 19 September 2000. Bogor (Indonesia): Puslitbangnak. hlm. 481-487.
- Van Hennekeller K, Jones RE, Skerratt LF, Fitzpatrick LA, Reid SA and Bellis GA. 2008. A Comparison of Trapping Methods for Tabanidae (Diptera) in North Queensland, Australia. *Medical and Veterinary Entomology* 22:26-31.
- Verloo D, Magnus E, Büscher P. 2001. General expression of RoTat 1.2 variable antigen type in *Trypanosoma evansi* isolates from different origin. *Vet Parasitol.* 97:183-189.
- Wardhana HA, Muharsini S, Suhardono. 2003. Metode pengawetan larva dan lalat dewasa *chrysomya bezziana* (Diptera: Calliphoridae) untuk analisis DNA mitokondria. *JITV.* 8:264-275.

## **DISKUSI**

### **Pertanyaan:**

*Mengapa mengamati darah lalatnya? Sementara penanganan terhadap penyakit surra itu jauh lebih penting.*

### **Jawaban:**

*Ini modifikasi dari deteksi fektor surra yang dapat dikembangkan supaya menjadi metode aplikatif di lapangan.*