

Penggunaan *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* pada Vektor Insekta untuk Menguji Keberadaan Virus *Bovine Ephemeral Fever*

(Use of Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction to Test Insect Vectors for the Presence of Bovine Ephemeral Fever Virus)

April Hari Wardhana¹, Sawitri DH¹, Subekti DT¹, Bellis G²

¹Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl. RE Martadinata No. 30, Bogor 16114

²University of Queensland, St Lucia, Brisbane, Qld, Australia
wardhana24id@yahoo.com

ABSTRACT

The reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) technique has been developed to monitor arboviruses in animals. The technique can also be used to detect viruses from vectors, including from Culicoides that are suspected as vectors of bovine ephemeral fever (BEF) or three day sickness virus. The aim of the study was to detect BEF virus from Culicoides and to obtain some data on the diversity and abundance of Culicoides species in the field. Culicoides were collected into 80% ethanol using light traps set around cattle pens in the evening. Specimens were identified to species and age graded into nulliparous (not yet taken a bloodmeal) parous (have previously taken a blood meal, produced and laid eggs), blood fed (with a blood meal still present in the midgut) and gravid (containing eggs). A total of 13 species were identified from 500 specimens collected with the most abundant species being *C. fulvus* (22.0%), *C. huffi* (20.4%), *C. oxystoma* (16.4%), *C. Subg. Trithecoides sp* (15.8%) and *C. palpifer* (15.0%). Around 70.41 and 45 parous, blood fed and gravid specimens of *C. fulvus*, *C. huffi*, and *C. oxystoma* respectively were analysed using RT-PCR with primers derived from N *ephemerovirus* (440 bp) fragment. No virus was detected in any of these specimens. The seasonality of BEF in the area where midges were collected was estimated from BEF case data supplied by the Center of Animal Health Clinic, Nglipar Sub District, Gunung Kidul District, Yogyakarta. According to these data, BEF activity peaks during the wet season from October to January and was markedly lower during the dry season from February to September when the insects were collected.

Key Words: RT-PCR, Bovine Ephemeral Fever, Culicoides, Vector

ABSTRAK

Teknik *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR) telah dikembangkan untuk memonitor penyakit-penyakit yang disebabkan oleh arbovirus yang ditransmisikan oleh vektor. Teknik ini memungkinkan untuk mendeteksi kandungan virus di dalam tubuh vektor suatu penyakit, termasuk insekta Culicoides yang diduga sebagai vektor penyakit *bovine ephemeral fever* (BEF) atau demam tiga hari. Tujuan penelitian ini adalah untuk melakukan deteksi *Ephemerovirus* pada Culicoides, sekaligus mendapatkan data jenis-jenis spesies Culicoides yang bersirkulasi di lapang. Sampel Culicoides dikoleksi dengan cara memasang perangkap cahaya (*light trap*) di sekitar kandang sapi pada sore hari. Culicoides yang ditangkap ditransfer ke etanol 80% untuk diidentifikasi dan diklasifikasikan berdasarkan umurnya, yaitu *nulliparous* (betina yang belum bertelur, abdomennya bersih dari darah), *parous* (betina yang bertelur sebelumnya, abdomennya terdapat bintik-bintik darah), *blood fed* (abdomen mengandung darah) dan *gravid* (abdomen yang mengandung telur). Sebanyak 13 spesies berhasil diidentifikasi dari 500 ekor Culicoides yang tertangkap dan empat spesies diantaranya dalam jumlah banyak, yaitu *C. fulvus* (22,0%), *C. huffi* (20,4%), *C. oxystoma* (16,4%), *C. Subg. Trithecoides* (15,8%) dan *C. palpifer* (15,0%). Analisis RT-PCR hanya dilakukan pada *C. fulvus* (70 ekor), *C. huffi* (41 ekor) dan *C. oxystoma* (45 ekor) dengan status *parous*, *blood fed* dan *gravid* menggunakan primer yang didesain dari fragmen gen N *ephemerovirus* (440 bp). Meskipun hasil sampel Culicoides yang diuji negatif, tetapi kontrol positif dapat teramplifikasi secara sempurna. Pola musiman kasus BEF di wilayah tempat koleksi Culicoides diestimasi dari data kasus BEF di Pusat Kesehatan Hewan di Kecamatan Nglipar, Kabupaten Gunung Kidul, Yogyakarta. Berdasarkan data tersebut, kejadian BEF cenderung meningkat dari bulan Oktober hingga Januari ketika musim hujan dan penurunan kasus BEF terjadi pada bulan Februari-September saat musim panas ketika Culicoides dikoleksi pada studi ini.

Kata Kunci: RT-PCR, Bovine Ephemeral Fever, Culicoides, Vektor

PENDAHULUAN

Penyakit *bovine ephemeral fever* (BEF) atau demam tiga hari masih menjadi masalah pada peternakan sapi dan kerbau yang menyebabkan kerugian ekonomis yang cukup besar. Penyakit ini disebabkan oleh *Ephemerovirus* (famili *Rhabdoviridae*) dan ditemukan pertama kali di Afrika Timur pada tahun 1867, yang selanjutnya menyebar dengan cepat di banyak negara Afrika, Asia dan Oceania. Penyakit BEF dilaporkan banyak menyerang sapi, seperti *Bos taurus*, *Bos indicus* dan *Bos javanicus* serta kerbau air (*Bubalus bubalis*). Semua jenis ruminansia dapat menderita penyakit ini tetapi umumnya tidak menunjukkan gejala klinis (sub klinis) (Nandi & Negi 1999). Sapi dan kerbau muda (umur kurang dari 1 tahun) relatif lebih tahan terhadap serangan BEF dibandingkan ternak dewasa karena ternak yang muda masih memiliki maternal antibodi dari induknya (Abu Elzein et al. 1999; Momtaz et al. 2012). Pada kasus wabah BEF, morbiditas dapat mencapai 80% dengan rata-rata kematian ternak berkisar 1-2%. Akibat yang fatal juga dapat terjadi pada ternak yang terlalu gemuk, sehingga dapat menyebabkan kematian hingga 30% (OIE 2003).

Di Indonesia, laporan klinis pertama kali yang mengarah pada penyakit BEF pernah dipublikasi pada masa kolonial Belanda sekitar tahun 1919 dan 1932 (Harkens 1919). Selanjutnya, kasus serupa terjadi di pantai Timur Sumatra (Burgraaf 1932). Laporan lain menyebutkan bahwa pada tahun 1977 di Sumba Timur telah terjadi serangan penyakit yang gejala klinisnya mirip dengan BEF pada sapi Ongole dan sapi-sapi Brahman yang diimpor dari Australia. Kemudian letupan penyakit ini juga dilaporkan di Kabupaten Tuban pada bulan Juni 1978 dan Kabupaten Lamongan pada bulan Agustus 1978. Berdasarkan pengamatan epidemiologik, pemeriksaan klinis, laboratorik dan uji serologis disimpulkan bahwa penyakit yang menyerang sapi di wilayah tersebut adalah BEF. Introduksi BEF ke Kabupaten Tuban dan Lamongan diduga berasal dari sapi-sapi Sumba yang didatangkan ke daerah tersebut pada tahun 1977 (Soeharsono et al. 1983). Secara serologis, penyakit BEF juga dilaporkan di Irian Jaya dan Nusa Tenggara Timur (Soleha et

al. 1992a) dan di Kalimantan Selatan (Soleha et al. 1992b).

Kasus BEF di Kalimantan Selatan dilaporkan pada tahun 2004 yang menyerang 29 ekor sapi di Kabupaten Balangan, 21 kasus di Kabupaten Barito Kuala dan tujuh kasus di Kabupaten Hulu Sungai Tengah (Suryana 2006). Berdasarkan data dari Pusat Kesehatan Hewan-Godean diperkirakan bahwa dari 10 ekor sapi, rata-rata tujuh ekor terserang BEF yang umumnya berulang hingga mencapai 40% (Suwito & Nurini 2009). Meskipun tidak diketahui penyebabnya, berdasarkan hasil pengamatan klinis menunjukkan bahwa kasus BEF di Godean lebih banyak menyerang sapi ras Simental dan Limosin dibandingkan dengan ras peranakan Ongole (Suwito & Nurini 2009). Keadaan ini mengindikasikan bahwa penyakit BEF masih perlu mendapat perhatian yang cukup serius, terutama dari aspek serangga vektornya yang berpotensi untuk menyebarkan virus ke ternak yang lain dan ke daerah yang lebih luas.

Culicoides merupakan famili *Ceratopogonidae* (*biting midges*) yang mempunyai tingkat keragaman spesies yang tinggi. Sejauh ini telah teridentifikasi 31 subgenera dan lebih dari 1.400 spesies (Borkent 2014). Peran Culicoides sebagai vektor yang mampu mentransmisikan penyakit viral telah banyak dilaporkan dan dirangkum oleh Mellor et al. (2000). Makin besar populasi vektor di daerah pengambilan sampel, makin besar pula peluang ternak untuk terinfeksi suatu penyakit. Identifikasi yang akurat dari spesies Culicoides yang beragam merupakan titik kritis dalam studi vektor kompeten karena efisiensi vektor yang mengandung virus sangat beragam. Lebih dari 50 virus telah berhasil dideteksi dari Culicoides dan yang paling sering adalah virus penyebab penyakit *african horse sickness virus* (AHSV), *blue tounge virus* (BTV), *akabane virus* (AKAV) dan *bovine ephemeral fever virus* (BEFV) (Mellor et al. 2000; Kheir 2010).

Meskipun studi Culicoides sebagai vektor penyakit arbovirus telah banyak dilakukan, tetapi penelitian tentang perannya sebagai vektor penyakit BEF masih kontroversial. Di Australia, nyamuk lebih diyakini berperan sebagai vektor BEF (St George & Melville 1995, Murray 1997). Namun demikian, *C. oxystoma* dan *C. nipponensis* di Yunani dan

Taiwan dihubungkan dengan penyebaran virus BEF (Hsu et al. 1997; Dhillon et al. 2000; Wang et al. 2001; Zaher & Ahmed 2011). Di Zimbabwe, virus BEF juga berhasil ditemukan dari *C. coarctatus* dan *C. imicola* (Blackburn et al. 1985). *Culicoides kingi* di Kenya dan *C. oxystoma* di Saudi Arabia dihubungkan dengan keberadaan penyakit BEF (Davies & Walker 1974; Alahmed et al. 2010). Studi-studi di atas membuktikan bahwa jenis spesies *Culicoides* yang diduga sebagai vektor BEF pada tiap-tiap negara berbeda. Kondisi ini mungkin berlaku juga untuk Indonesia yang berbentuk kepulauan.

Metode *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) telah dikembangkan untuk memonitor penyakit-penyakit arbovirus yang ditransmisikan oleh vektor (Shin et al. 2009). Metode ini memungkinkan untuk mendeteksi kandungan virus di dalam tubuh vektor. Teknologi deteksi vektor dan data jenis spesies *Culicoides* terutama spesies yang diduga sebagai vektor sangat diperlukan untuk menentukan langkah-langkah antisipasi penyebaran penyakit yang semakin luas, karena tidak semua spesies *Culicoides* mampu mentransmisikan penyakit BEF pada sapi dan kerbau, walaupun tergolong ke dalam kelompok spesies yang serupa/mirip. Di samping itu, data jenis spesies *Culicoides* sangat diperlukan untuk mempersiapkan tindakan antisipatif dalam menghadapi peningkatan jumlah kasus penyakit viral akibat adanya *global warming* dan perubahan iklim. Tujuan penelitian ini adalah untuk menguji keberadaan *Ephemerovirus* pada *Culicoides* dengan analisis RT-PCR, sekaligus mendapatkan data jenis spesies *Culicoides* yang bersirkulasi di lapang dan melihat pola musiman penyakit BEF di Kecamatan Nglipar, Kabupaten Gunung Kidul, Yogyakarta berdasarkan catatan kasus BEF selama tahun 2007-2011.

MATERI DAN METODE

Koleksi sampel dan data kasus BEF

Koleksi sampel *Culicoides* dilakukan di Kecamatan Nglipar, Kabupaten Gunung Kidul, Yogyakarta menggunakan perangkap cahaya (*light trap*) yang digantung di dalam kandang

sapi pada sore hari (pukul 17:00) dengan ketinggian 1,5-2 meter dan dikoleksi pada pagi hari (pukul 08:00-09:00) pada bulan Juli selama lima hari. *Culicoides* yang tertarik dengan cahaya akan mendekat ke lampu. Akibat adanya hisapan dari kipas angin dari dalam perangkap, *Culicoides* akan tersedot dan masuk ke dalam botol penampung yang telah berisi etanol 80% (Bishop et al. 2004). Data kasus BEF disuplai dari Pusat Kesehatan Hewan di Kecamatan Nglipar selama lima tahun (2007-2011) untuk melihat kejadian musiman kasus BEF di wilayah tersebut.

Perangkap cahaya (*light trap*)

Sebanyak empat perangkap cahaya (*light trap*) digunakan pada penelitian ini yang didesain khusus untuk menangkap *Culicoides* menurut metode Bishop et al. (2004). Perangkap memiliki lampu hijau (*light-emitting diodes/LEDs*) yang dilengkapi dengan kipas angin berkecepatan tertentu dan sensor cahaya otomatis. Power perangkap menggunakan baterai 1,5 V sehingga sangat mudah diaplikasikan di lapang, terutama pada kandang-kandang yang tidak mempunyai aliran listrik. Baterai dapat diganti setelah dua hari pemakaian.

Identifikasi dan pengelompokan *Culicoides*

Spesies *Culicoides* yang tertangkap diidentifikasi berdasarkan karakter sayap, thorak dan abdomen menurut Dyce et al. (2007). Sebelum dilakukan ekstraksi RNA, sampel dikelompokkan berdasarkan jenis kelamin dan umur *Culicoides*, yaitu: jantan, betina yang mengandung darah (*blood engorged females*), betina yang tidak mengandung darah (*nulliparous females, non-engorged*), betina yang pernah menghisap darah (*parous females, non-engorged*) dan betina yang mengandung telur (*gravid females*). Sampel yang diekstrak RNA virusnya adalah sampel yang jumlahnya memenuhi jumlah minimal yang diperlukan, yaitu 30 ekor per spesies yang merupakan gabungan dari *parous, blood fed* dan *gravid*. Adapun sampel jantan tidak digunakan untuk proses ekstraksi RNA. Sampel yang telah diidentifikasi dan mempunyai status yang sama, kemudian

disimpan di dalam etanol 80% pada suhu -20°C untuk analisis lebih lanjut.

Ekstraksi RNA

Sampel *Culicoides* yang telah dikelompokkan (30-50 ekor) dan disimpan pada suhu -20°C, dikeluarkan dan digerus dengan *Phosphate-Buffered Saline* (PBS) dingin selama 30 detik. Hasil gerusan selanjutnya disentrifuse selama 1 menit pada suhu 4°C dan supernatannya ditransfer ke *tube* yang baru untuk ekstraksi RNA (Shin et al. 2009). RNA diekstraksi menggunakan RNeasy mini kit (Qiagen) berdasarkan prosedur yang dianjurkan di dalam brosur. RNA yang diperoleh didilusi dalam 40 µl air distilasi dan disimpan pada suhu -20°C. Primer BEF yang didesain dari fragmen gen N *ephemerovirus* (440 bp), yaitu BEFV F1 (CCTACATT GAGAGTGCCACA) dan BEFV R1 (CTTC CGTGAACAGCAACATC) (Cho 1997; Shin et al. 2009).

RT-PCR

Kondisi RT-PCR menggunakan *One step* RT-PCR kit (Qiagen) dan dilakukan optimasi dengan cara memodifikasi kondisi yang direkomendasikan oleh perusahaan Qiagen dengan metode Shin et al. (2009). Adapun kondisi RT-PCR adalah sebagai berikut: *reverse transcription* pada 50°C selama 30 menit, selanjutnya inisiasi denaturasi pada suhu 94°C selama 2 menit, denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik (35 siklus), *primer annealing* pada suhu 58°C selama 30 detik dan *primer extention* pada suhu 68°C selama 1 menit. Hasil produk RT-PCR difraksinasi melalui elektroforesis gel 1,5% dan divisualisasi di bawah sinar ultra violet (UV).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Salah satu faktor yang menentukan jumlah *Culicoides* yang tertangkap menggunakan perangkap cahaya (*light trap*) adalah warna cahaya lampu yang digunakan. Penelitian ini menggunakan cahaya lampu berwarna hijau karena warna ini lebih banyak menarik *Culicoides* untuk datang ke perangkap. Pernyataan ini sesuai dengan hasil penelitian

Bishop et al. (2004) yang menyimpulkan bahwa beberapa spesies *Culicoides*, terutama yang berperan sebagai vektor penyakit, lebih tertarik pada cahaya hijau daripada warna lainnya. Hasil studi yang sama juga dilakukan di Afrika Selatan yang menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang nyata antara cahaya hijau dan putih (Jenkins & Young 2010).

Sebanyak 13 spesies *Culicoides* telah berhasil diidentifikasi dari 500 ekor yang tertangkap di kandang peternakan tradisional daerah Kecamatan Nglipar, Kabupaten Gunung Kidul, Yogyakarta. Lima spesies ditemukan dalam jumlah yang dominan di daerah tersebut, yaitu *C. fulvus* (22,0%), *C. huffi* (20,4%), *C. oxystoma* (16,4%), *C. Sbg. Trithecoides sp.* (15,8%) dan *C. palpifer* (15,0%) (Tabel 1). Di Taiwan bagian Selatan, Jepang bagian Selatan dan Saudi Arabia, *C. oxystoma* yang merupakan salah satu jenis spesies yang ditemukan dalam jumlah melimpah, dan diduga berpotensi sebagai vektor *Ephemerovirus* (Hsu et al. 1997; Yanase et al. 2005; Alahmed et al. 2010). Spesies ini perlu diwaspadai karena juga berpotensi sebagai vektor penyakit lain. Setidaknya enam virus lain telah berhasil diisolasi dari *C. oxystoma* yang dikoleksi di Kagoshima Jepang, yaitu dua orthobunyavirus (Akabane dan Aino virus), tiga orbivirus (Chuzan, D'aguliar dan Ibaraki virus) dan satu jenis virus yang belum terklasifikasi (*bunyavirus-like virus*) (Yanase et al. 2005).

Hasil identifikasi tersebut menunjukkan bahwa keragaman spesies *Culicoides* di Indonesia cukup tinggi. Di Jepang, Yanase et al. (2005) juga berhasil mengidentifikasi 13 spesies, tetapi berasal dari sampel yang banyak, yaitu 456.300 ekor *Culicoides* yang diamati pada tahun 1985-2002.

Studi lain di Saudi Arabia juga menunjukkan keragaman spesies *Culicoides* yang rendah, yaitu delapan spesies dari 43.505 ekor yang tertangkap pada tahun 2004-2006 (Alahmed et al. 2010). Keragaman spesies yang tinggi di Indonesia juga didukung oleh penelitian Sukarsih et al. (1993) yang berhasil mengidentifikasi 49 spesies yang terbagi menjadi 6 sub genus pada tahun 1991-1992. Semakin banyak spesies yang tersebar di Indonesia berpotensi makin beragamnya spesies yang berperan sebagai vektor.

Untuk analisis RNA *Ephemerovirus* dari *Culicoides* dipilih yang betina dengan status biologis *parous*, *gravid* dan *blood fed* karena ketiga status tersebut mengandung darah dalam tubuhnya dan pernah berinteraksi dengan sapi atau kerbau, sehingga diduga mengandung virus apabila menghisap darah ternak penderita BEF. Menurut Melville & Bellis (2007) bahwa *Culicoides* yang berstatus *parous* dan *gravid* merupakan insekta yang cukup dewasa dan berpotensi untuk terpapar oleh virus dari induk semang penderita penyakit. Pernyataan ini telah dibuktikan melalui hasil penelitian yang menunjukkan tidak adanya virus yang terdeteksi dari betina *nulliparous* dan *Culicoides* jantan. Scheffer et al. (2011) berhasil mendeteksi virus pada abdomen *Culicoides* hingga pada hari kesepuluh pasca infeksi. Hasil penelitiannya juga membuktikan bahwa replikasi virus tidak terjadi pada kelenjar ludah.

Ekstraksi RNA dan RT-PCR

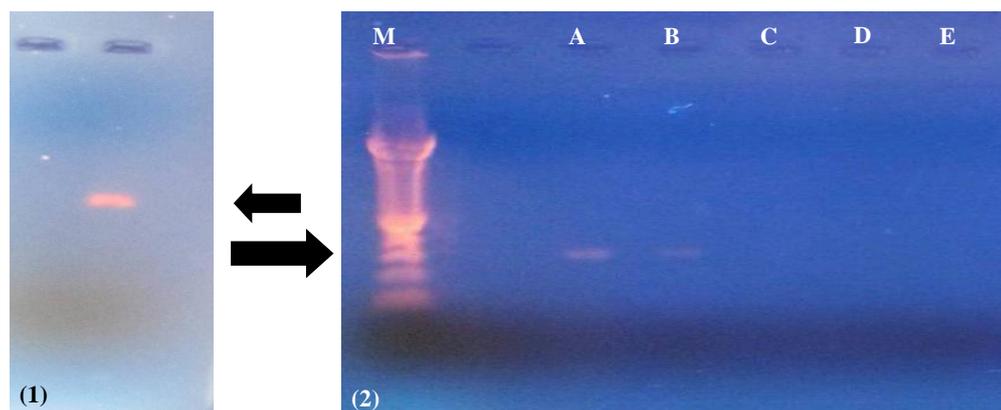
Berdasarkan gabungan jumlah *Culicoides* pada kelompok *parous*, *gravid* dan *blood feed*, hanya tiga spesies yang mencukupi untuk

dapat diekstraksi RNANYa, yaitu *C. fulvus* (70 ekor), *C. huffi* (41 ekor) dan *C. oxystoma* (45 ekor). Hasil optimasi kondisi RT-PCR menunjukkan bahwa kontrol positif (RNA virus) dapat teramplifikasi sempurna. Hasil ini juga mengindikasikan bahwa primer yang digunakan mampu mengamplifikasi fragmen gen N *ephemerovirus* dengan baik. Produk RT-PCR dapat dilihat pada elektroforesis gel 1,5 % yang menampilkan pita tunggal pada posisi 440 bp (Gambar 1 (1)). Kondisi RT-PCR yang telah optimum selanjutnya dijadikan kondisi standar untuk mengamplifikasi sampel-sampel *Culicoides* berikutnya. Namun demikian dari sampel *Culicoides* yang diuji, tidak satupun yang memberikan hasil yang positif. Hanya kontrol positif yang menunjukkan pita tunggal pada posisi 440 bp (Gambar 1 (2)).

Setidaknya ada tiga hal yang dapat menjelaskan mengapa sampel yang diperoleh negatif dari *Ephemerovirus*. Pertama, kemungkinan pada saat dilakukan koleksi *Culicoides*, kasus BEF rendah sehingga insekta tidak menghisap darah ternak yang terpapar oleh virus. Kedua, deteksi virus dari tubuh insekta memerlukan *Culicoides* dalam jumlah yang banyak.

Tabel 1. Hasil identifikasi spesies *Culicoides* sp. yang ditangkap di Kecamatan Nglipar, Kabupaten Gunung Kidul, Yogyakarta dengan perangkap cahaya (*light trap*)

| Spesies | Jantan | Betina | | | | n total | % |
|------------------------------|--------|--------------------|---------------|------------------|---------------|---------|------|
| | | <i>Nulliparous</i> | <i>Parous</i> | <i>Blood Fed</i> | <i>Gravid</i> | | |
| <i>C. actoni</i> | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0,2 |
| <i>C. arakawae</i> | 14 | 5 | 1 | 1 | 2 | 23 | 4,6 |
| <i>C. brevitarsis</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0,2 |
| <i>C. fulvus</i> | 2 | 38 | 3 | 14 | 53 | 110 | 22 |
| <i>C. flavipunctatus</i> | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0,2 |
| <i>C. guttifer</i> | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 2 | 0,4 |
| <i>C. huffi</i> | 12 | 49 | 19 | 7 | 15 | 102 | 20,4 |
| <i>C. Subg. hoffmania</i> | 1 | 4 | 1 | 0 | 2 | 8 | 1,6 |
| <i>C. oxystoma</i> | 12 | 25 | 26 | 2 | 17 | 82 | 16,4 |
| <i>C. peregrinus</i> | 1 | 5 | 1 | 6 | 0 | 13 | 2,6 |
| <i>C. palpifer</i> | 2 | 62 | 0 | 11 | 0 | 75 | 15 |
| <i>C. sumatrae</i> | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 3 | 0,6 |
| <i>C. Subg. Trithecoides</i> | 1 | 64 | 0 | 14 | 0 | 79 | 15,8 |
| Total | 46 | 255 | 53 | 55 | 91 | 500 | 100 |



Gambar 1. Hasil amplifikasi fragmen gen N *Ephemerovirus* dari tubuh *Culicoides* sp.; (1): Produk RT-PCR hasil optimasi menggunakan sampel control positif *Ephemerovirus* dengan primer BEFV F1-BEFV R1; (2) M: *Marker*; A dan B: Amplikon dengan primer BEFV F1-BEFV R1; C: *C. fulvus*; D: *C. huffi*; E: *C. oxystoma*

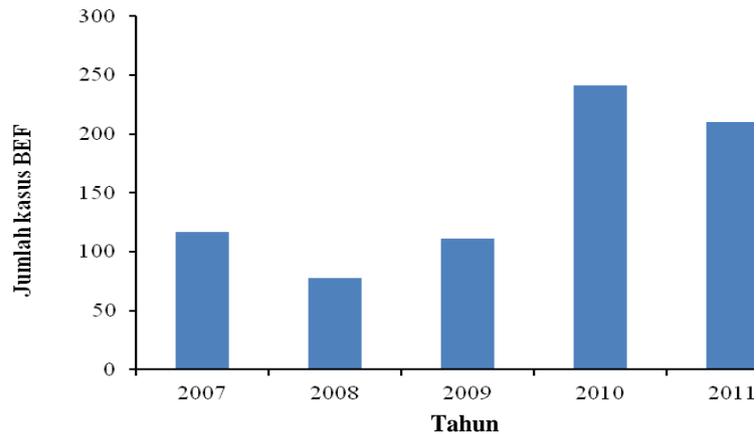
Melville & Bellis (2007) menyatakan bahwa tidak selalu ada korelasi yang positif antara deteksi virus dari sapi (ternak) dengan dari *Culicoides* (insekta). Hasil deteksi virus pada sapi yang positif umumnya lebih banyak daripada deteksi virus dari *Culicoides*. Keadaan ini dikarenakan kandungan virus dalam tubuh satu ekor *Culicoides* sangat sedikit untuk mendeteksi RNA virus tersebut. Oleh karena itu, *Culicoides* harus dikumpulkan berdasarkan spesiesnya, setidaknya dalam jumlah 30-50 ekor. Deteksi virus pada *Culicoides* untuk beberapa penyakit lainnya dilaporkan membutuhkan lebih dari 100 ekor untuk analisis RNA virus tertentu (Melville & Bellis 2007; Shin et al. 2009). Ketiga, *Culicoides* yang diuji tidak berperan sebagai vektor sehingga virus yang dideteksi tidak berada di dalam tubuh insekta. Melville & Bellis (2007) melakukan studi deteksi virus *Bluetounge* pada vektor *Culicoides*. Sebanyak 12 spesies *Culicoides* berhasil diidentifikasi dari 752 insekta yang tertangkap dan hanya 3 spesies (*C. actoni*, *C. fulvus* dan *C. brevitarsis*) yang mampu dideteksi virus RNANYa dengan tehnik *nested PCR*. Hasil positif PCR ini diperoleh dari pengumpulan *Culicoides* dalam satu spesies tertentu dalam jumlah 30-100 insekta.

Kondisi musiman kasus BEF

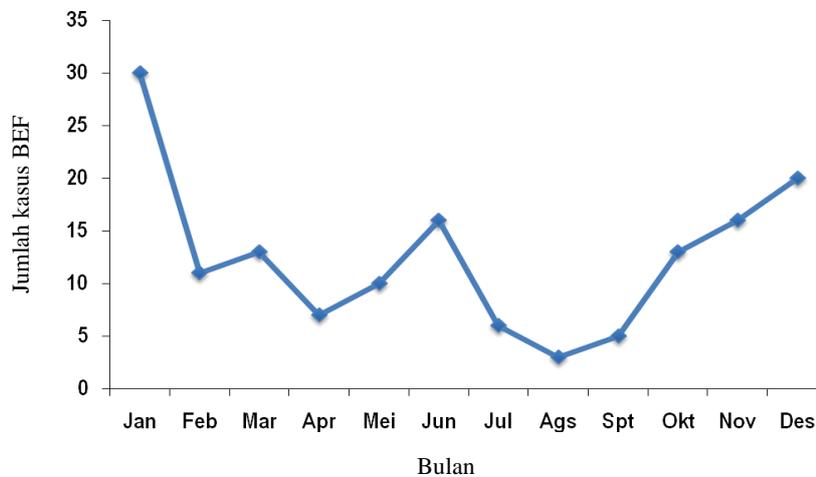
Hasil koleksi data kasus BEF di Pusat Kesehatan Hewan Kecamatan Nglipar selama

5 tahun (2007-2011) berdasarkan gejala klinis ternak dan tindakan pengobatan menunjukkan bahwa telah terjadi kenaikan sebesar 48,55% kasus dari tahun 2007 ke 2010. Kasus BEF meningkat cukup tinggi, yaitu sekitar 54 % dari tahun 2009 ke 2010, sedangkan pada tahun 2010 ke 2011 terjadi kenaikan kasus BEF, sekitar 12,86% atau sebanyak 31 kasus (Gambar 2).

Hasil rata-rata kasus kejadian BEF per bulan di kasus BEF yang terjadi di wilayah Pusat Kesehatan Hewan, di Kecamatan Nglipar, Kabupaten Gunung Kidul dapat dilihat pada Gambar 3. Kecenderungan peningkatan kasus BEF di Nglipar selama lima tahun pengamatan terjadi sejak bulan Oktober hingga Januari ketika musim hujan dan penurunan jumlah kasus terjadi pada bulan Februari-September ketika musim panas. Jumlah kasus BEF terendah terjadi pada bulan Juli-Agustus. Secara garis besar, pola ini sesuai dengan kondisi musiman *Culicoides* selama satu tahun yang diamati oleh Kheir (2010) di Saudi Arabia yang memiliki iklim relatif sama dengan Indonesia. Populasi *C. bahrainensis* mencapai titik terendah pada bulan Juli-Agustus ketika suhu tertinggi (36,2-38°C) dengan kelembaban rendah (26-27% RH) dan curah hujan 0 mm. Sebaliknya, populasi ini cenderung meningkat pada bulan September-Desember ketika curah hujan cukup tinggi (7,9-11,1 mm) dengan suhu 18-32°C dan kelembaban 32-54% RH.



Gambar 2. Jumlah kasus BEF di Kecamatan Nglipar, Kabupaten Gunung Kidul, Yogyakarta berdasarkan gejala klinis dan tindakan pengobatan kasus BEF yang dicatat dari 2007-2011



Gambar 3. Rata-rata kasus BEF per bulan selama pencatatan lima tahun (2007-2011) berdasarkan gejala klinis dan tindakan pengobatan yang dilakukan di Pusat Kesehatan Hewan Kecamatan Nglipar, kabupaten Gunung Kidul, Yogyakarta

KESIMPULAN

Teknologi RT-PCR untuk mengamplifikasi fragmen gen N pada virus yang diisolasi dari *Culicoides* dapat digunakan untuk deteksi dini penyebaran keberadaan penyakit BEF di lapang. Meskipun hasil sampel negatif, tetapi penelitian ini membuktikan bahwa populasi *Culicoides* yang berpotensi sebagai *vector borne diseases* (VBD) masih melimpah, terutama *C. oxystoma* dan *C. brevitarsis*. Kejadian kasus BEF di Kecamatan Nglipar, Kabupaten Gunung Kidul, Yogyakarta cenderung meningkat dari tahun ke tahun

sehingga perlu dilakukan pemantauan dan tindakan pengobatan untuk mencegah penyebaran penyakit ini semakin meluas.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian dilaksanakan atas biaya APBN TA. 2012. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Drh. Retno di Pusat Kesehatan Hewan, Kecamatan Nglipar, Kabupaten Gunung Kidul dan kolega dari Balai Besar Veteriner Wates atas bantuan teknis selama kegiatan lapang. Penulis juga berterima kasih kepada Bapak Eko Setyo Purwanto, Farlin Nefo dan Edi

Satria atas bantuan teknis selama di laboratorium. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Crawford Foundation yang telah memberikan dukungan dana dalam program pelatihan identifikasi *Culicoides* dengan supervisor Bapak Glenn Bellis, sehingga spesies *Culicoides* pada studi ini telah dikonfirmasi kebenarannya.

DAFTAR PUSTAKA

- Abu EEME, Gameel AA, Al Afaleg AI, Al Gundi O, Al Basheir AM, Zeedan A, Al Mageed HA, Abu Khadra H. 1999. Observations on the recent epizootic of bovine ephemeral fever in Saudi Arabia. *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* 18:672-680.
- Allahmed AM, Khier SM, Al Khereiji MA. 2010. Distribution of *Culicoides latreille* (Diptera: Ceratopogonidae) in Saudi Arabia. *J Entomol.* 1-8.
- Bishop AL, Worrall RJ, Spohr LJ, McKenzie HJ, Barchia LM. 2004. Improving light-trap efficiency for *Culicoides* spp. With light-emitting diodes. *Vet Italiana.* 40:266-269.
- Blackburn NK, Searle L, Phelps RJ. 1985. Viruses isolated from *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) caught at the Veterinary research farm, Mazowe, Zimbabwe. *J Entomol Soc South Africa.* 48:331.
- Borkernt A. 2014. World species of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae). American Museum Natural History, and Instituto Nacional de Biodiversidad 691-8th. S.E. Salmon. Arm. British Columbia, Canada. Last updated.
- Burgraaf H. 1932. "Dreitage-krankheit" op de Ooskust van Sumatra. *Tijdschr. Diergeneesk.* 59:234-237.
- Cho JJ. 1997. Development of antigen detection method for bovine ephemeral fever virus. NVRQS Annual Report.
- Davies FG, Walker AR. 1974. The isolation of ephemeral fever virus from cattle and *Culicoides* midges in Kenya. *Vet Rec.* 20:63-64.
- Dhillon J, Cowley JA, Wang Y, Walker PJ. 2000. RNA polymerase (L) gene and genome terminal sequences of ephemeral fever virus and Adelaide River virus indicate a close relationship to vesiculovirus. *Vir Res.* 70:87-95.
- Dyce AL, Bellis GA, Muller MJ. 2007. Pictorial Atlas of Australian *Culicoides* Wings (Diptera: Ceratopogonidae). Australian Biological Resources Study (ABRS), Canberra.
- Herkens J. 1919. Een ziekte onder melkkoeien. *Ned. Indische Diergeneesk.* 31:48-50.
- Hsu HA, Liao YK, Hung HH. 1997. The seasonal successional investigation of *Culicoides* spp. in cattle farms of Pintung district. Taiwan. *J Chinese Soc Vet Sci.* 23:303-310.
- Jenkins AB, Young MB. 2010. Breeding sites of *Culicoides* midges in KwaZulu-Natal. *South Afr J Anim Sci.* 40:510-513.
- Kheir SM. 2010. Seasonal activity of *Culicoides bahrainensis* Boorman, 1989 (Diptera: Ceratopogonidae) in Saudi Arabia. *J King Saudi University Science.* 22:167-172.
- Mellor PS, Boorman J, Baylis M. 2000. *Culicoides* biting midges: Their role as arbovirus vectors. *Ann Rev Entomol.* 45:307-340.
- Melville L, Bellis AG. 2007. Improving bluetongue virus surveillance in remote areas. Australian Biosecurity CRC for Emerging Infectious Disease. Australia.
- Momtaz H, Nejat S, Moazeni M, Riahi M. 2012. Molecular epidemiology of Bovine Ephemeral Fever virus in cattle and buffaloes in Iran. *Rev Medic Vet.* 163:415-418.
- Murray MD. 1997. Possible vectors of bovine ephemeral fever in the 1967/68 epizootic in northern Victoria. *Aust. Vet.* 75: 220.
- Nandi S, Negi BS. 1999. Bovine Ephemeral Fever: a review. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 22:81-91.
- OIE. 2003. Bovine Ephemeral Fever. The Center for food security and public health. Iowa State University. Last update: Aug, 5, 2005.
- Scheffer GE, Venter GJ, Joone C, Osterrieder N, Guthrie AL. 2011. Use of real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction for the detection of African horse sickness virus replication in *Culicoides imicola*. *Onderstepoort J Vet Res.* 78:344-347.
- Shin YK, Oem JK, Yoon S, Hyun BH, Cho IS, Yoon SS, Song JY. 2009. Monitoring of five bovine arboviral disease transmitted by arthropoda vectors in Korea. *J Bacteriol Virol* 39:353-362.
- Soeharsono, Sudana IG, Unruh DH, Malole M. 1983. Dugaan letupan penyakit demam tiga

- hari pada sapi Ongole di Tuban dan Lamongan. *Hem Zoa* 71:127-133.
- Soleha E, Daniels PW, Sebayang D, Bale A, Sendow I, Ronohardjo P. 1992a. First report of serological reactors to bovine ephemeral fever virus in cattle in Irian Jaya and Nusa Tenggara Timur. *Penyakit Hewan*. 24:1-3.
- Soleha E, Sendow I, Tarmudji. 1992b. Survei serologik bovine ephemeral fever (BEF) di Kalimantan Selatan sehubungan dengan beberapa kasus BEF tahun 1991. *Penyakit Hewan*. 24:67-70.
- St George TD, Melville LF. 1995. Infection of cattle in Queensland with bluetongue viruses: I. prevalence of antibodies II. Distribution of antibodies. *Aust Vet J*. 72:358-359.
- Sukarsih, Daniel PW, Sendow I, Soleha E. 1993. Longitudinal studies of *Culicoides* associated with livestock in Indonesia. *In: Proceedings Arbovirus Research in Australia the 6th Symposium*. Brisbane. Australia. 12-18 December 1992:203-208.
- Suryana. 2006. Tinjauan aspek penyakit dan upaya penanggulangannya pada ternak ruminansia besar di Kalimantan Selatan. *Lokakarya Nasional Ketersediaan IPTEK dalam pengendalian penyakit strategis pada ternak ruminansia besar*. 142-148.
- Suwito W, Nurini S. 2009. Penyakit pada sapi di Puskesmas Godean tahun 2006-2008. Dalam: Sani Y, Natalia L, Brahmantyo B, Puastuti W, Sartika T, Nurhayati, Anggraeni A, Matondang RH, Martindah E, Estuningsih SE, penyunting. *Teknologi peternakan dan veteriner untuk meningkatkan ketahanan pangan dan kesejahteraan peternak*. Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Bogor, 13-14 Agustus 2009. Bogor (Indonesia): Puslitbangnak. hlm. 290-299.
- Wang FI, Hsu AM, Huang JK. 2001. Bovine ephemeral fever in Taiwan. *J Vet Diagn Invest*. 13:462-467.
- Yanase T, Kato T, Kubo T, Yoshida K, Ohashi S, Yamakawa M, Miura Y, Tsuda T. 2005. Isolation of bovine arboviruses from *Culicoides* biting midges (Diptera: *Ceratopogonidae*) in Southern Japan: 1985-2002. *J Med Entomol*. 42:63-67.
- Zaher KS, Ahmed WM. 2011. Investigation on Bovine Ephemeral Fever Virus in Egyptian Cows and Buffaloes with emphasis on isolation and identification of a field strain. *Global Vet*. 6:447-452.