

Molecular Detection of Second Internal Transcribed Spacer (ITS-2) Encoding Gene *Sarcoptes scabiei* of Stray Cat from Several Market in Bondowoso

Nur Rusdiana^{1*}, Prima Ayu Wibawati¹, Nunuk Dyah Retno Lastuti², Pandu Tokoh Amukti³

¹Departemen Kesehatan Masyarakat Veteriner, Fakultas Ilmu Kesehatan Kedokteran dan Ilmu Alam Banyuwangi, Universitas Airlangga

²Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

³Pascasarjana Magister Agribisnis Terapan Politeknik Negeri Jember
Fakultas Kesehatan, Kedokteran dan Ilmu Alam Banyuwangi, Universitas Airlangga. Jalan Wijaya Kusuma 113, Mojopanggung, Giri, Banyuwangi, Telepon: 0333-417788

Laman: <https://fikkia.unair.ac.id>, Email : kontak@fikkia.unair.ac.id

*Corresponding author: nur.rusdiana@fikkia.unair.ac.id

ABSTRACT

Scabies is an infectious disease which is caused by Sarcoptes scabiei mites and considered as an emerging/re-emerging parasitic disease. Recent study using the Polymerase Chain Reaction (PCR) method has a higher sensitivity for detecting mites than using the skin scraping method. This study aims to detect the Second Internal Transcribed Spacer (ITS-2) encoding gene of S. scabiei. ITS-2 is a highly conserved area and always used to identify and differentiate host species infected by S. scabiei. S. scabiei isolates were obtained from skin scrapings from stray cat suspected of being infected with Scabies from Pasar Induk Bondowoso, Pasar Tamanan and Pasar Pujer. Detection on the presence of S. scabiei was carried out microscopically and then confirmed by molecular examination using the PCR method and visualized by electrophoresis on 2% agarose gel. The Polymerase Chain Reaction (PCR) results showed DNA bands at 304 bp Based on the result it can be concluded that samples are positively infected by Scabies can be detected by the ITS-2 encoding gene of Sarcoptes scabiei.

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

PENDAHULUAN

Pasar merupakan salah satu tempat mobilitas banyak orang dan semua pasar di Kabupaten Bondowoso terdapat kucing liar yang sangat dekat dengan kehidupan orang-orang di pasar. Kesehatan kucing liar dipasar tidak dapat dikontrol karena bisa saja membawa penyakit zoonosis yang penyebarannya bisa dari hewan ke manusia atau sebaliknya (Hermawan dkk, 2021).

Penyebaran penyakit dalam satu spesies atau antar spesies akan terus meningkat seiring dengan kedekatan interaksi antara kucing dan manusia. Beberapa agen penyakit pada kucing adalah bakteri, virus, jamur dan parasit. Penyakit parasit dibagi menjadi dua yaitu penyakit yang disebabkan oleh endoparasit dan ektoparasit. Endoparasit adalah parasit yang hidupnya berada dalam tubuh inang, sedangkan ektoparasit merupakan parasit

yang hidup di permukaan tubuh inangnya (Azmi *et al.* 2013).

Ektoparasit yang dapat menginfestasi kucing yaitu tungau, kutu dan pinjal. Infestasi ektoparasit menyebabkan ketidaknyamanan, kesakitan, menyebabkan kematian dalam jangka panjang dan dapat menularkan penyakit ke manusia (zoonosis) (Siagian, 2022). *Sarcoptes scabiei* merupakan salah satu ektoparasit yang biasa menyerang kucing. Tungau ini hidup pada kulit dengan membuat terowongan pada stratum corneum dan melangsungkan hidupnya pada tempat tersebut (Hengge *et al.* 2006).

Deteksi molekuler *Sarcoptes scabiei* dengan penanda gen mikrosatelit dan DNA mitokondria secara konsisten dapat menentukan spesifitas *S. scabiei* berdasarkan geografis hospes (Niedringhaus *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* (Mokouloutou *et al.* 2015). Gen penyandi ITS-2 dipilih menjadi fokus utama dalam penelitian ini karena gen ini mudah diamplifikasi sehingga mudah untuk dilakukan analisis dan identifikasi (Peltier *et al.* 2017). Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi *S. scabiei* yang menginfeksi kucing liar secara mikroskopis dan dikonfirmasi secara PCR melalui gen ITS-2.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini dilakukan di beberapa pasar yang ada di Kabupaten Bondowoso : tiga kucing liar dari Pasar Induk Bondowoso, tiga kucing liar dari Tamanan dan dua kucing liar dari Pasar Pujer. Kucing yang digunakan sebagai sampel penelitian adalah kucing yang menunjukkan gejala skabies dengan kategori timbulnya krusta pada daerah telinga, sekitar mata dan sela-sela kaki. Bobot masing-masing kucing berkisar antara 2-2,5 kg per ekor.

Bahan yang digunakan untuk pengambilan sampel *scraping* adalah NaCl fisiologis 0,9% dan label. Bahan untuk pemeriksaan natif yaitu NaCl Fisiologis, KOH 10%. Bahan yang digunakan untuk ekstraksi DNA *Sarcoptes scabiei* dengan QIAamp DNA Stool Mini Kit dari Qiagen meliputi *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*. 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* kucing yang terinfeksi adalah sarung tangan steril, tabung steril, gunting *scraping* atau *scalpel*. Untuk pemeriksaan natif adalah mikroskop, *cover glass* 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* kucing terlebih dahulu dipuasakan selama 12 jam. Hal ini dilakukan untuk menghindari terjadinya muntah yang disebabkan oleh penggunaan obat anastesi (Yudaniyanti, 2010). Persiapan anastesi dilakukan dengan cara menimbang kucing untuk dapat menentukan dosis obat. Anastesi dilakukan dengan memberikan sediaan kombinasi ketamin hidroklorida, atropin sulfat dan xylazin hidroklorida dalam satu campuran dengan dosis 0,1 ml/kgBB dengan kandungan ketamin hidroklorida 100 mg, xylazin hidroklorida 20 mg, atropin sulfat 1 mg dalam 1 ml menggunakan *tubercle bacillus syringe* dengan rute intramuskuler (aprilianti *et al.* 2020).

Hewan yang sudah dalam kondisi teranastesi dilakukan *scraping* kulit yang berkrusta. Jenis kerokan kulit yang diambil merupakan kerokan kulit permukaan pada epidermis kulit atau *superficial skin scraping*. 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 perbesaran 40 kali dan *S. Scabiei* yang terlihat diambil satu persatu dengan pipet kemudian dimasukkan ke dalam tabung berisi NaCL fisiologis (Lastuti *et al.* 2019). Terapi yang diberikan pada kucing setelah *scraping* adalah terapi kausatif berupa antiparasit ivermectin wormectin (PT Medion Farma Jaya, Bandung, Indonesia) dosis 0,02 mg/kg BB diberikan secara injeksi subkutan dengan dua kali pemberian pada interval 14 hari (Ningrum *et al.* 2023).

Pemeriksaan Hasil Scraping dan Identifikasi Morfologi

Hasil *scraping* kulit kucing yang telah dicuci dengan NaCl fisiologis ditetaskan di atas 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 kapitolium (Desiandura *et al.* 2017). Sampel positif adanya tungau dari isolat yang telah dikoleksi kemudian diperiksa secara molekuler menggunakan metode PCR sebagai uji konfirmasi *S. Scabiei*.

Pemeriksaan Molekuler dengan Polymerase Chain Reaction (PCR)

Sejumlah delapan sampel *scraping* kulit kucing dikelompokkan berdasarkan asal daerah masing-masing yaitu Pasar Induk Bondowoso (Induk), Pasar Tamanan

(Tamanan) dan Pasar Puger (Puger) yang secara mikroskopis ditemukan tungau *S. scabiei* selanjutnya dilakukan uji konfirmasi dengan PCR. Larutan sampel yang positif diekstraksi menggunakan QIAamp DNA *mini kit* (Qiagen, Hilden, Germany) sesuai protokol pabrik.

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 µL 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 dengan panjang 304 bp.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Pemeriksaan Mikroskopis *S. scabiei*

Pemeriksaan mikroskopis sampel *scraping* kulit kucing yang menunjukkan gejala skabies (Gambar 1) dari Pasar Induk Bondowoso (Induk), Pasar Tamanan (Tamanan), dan Pasar Puger (Puger) dilakukan secara konvensional menggunakan metode pemeriksaan natif dengan perbesaran 400 kali. Sampel yang diperiksa menunjukkan adanya *S. Scabiei* (Gambar 2). Pemeriksaan mikroskopis

dengan metode natif adalah salah satu metode yang paling umum digunakan untuk mendeteksi *Sarcoptes scabiei* dari hasil

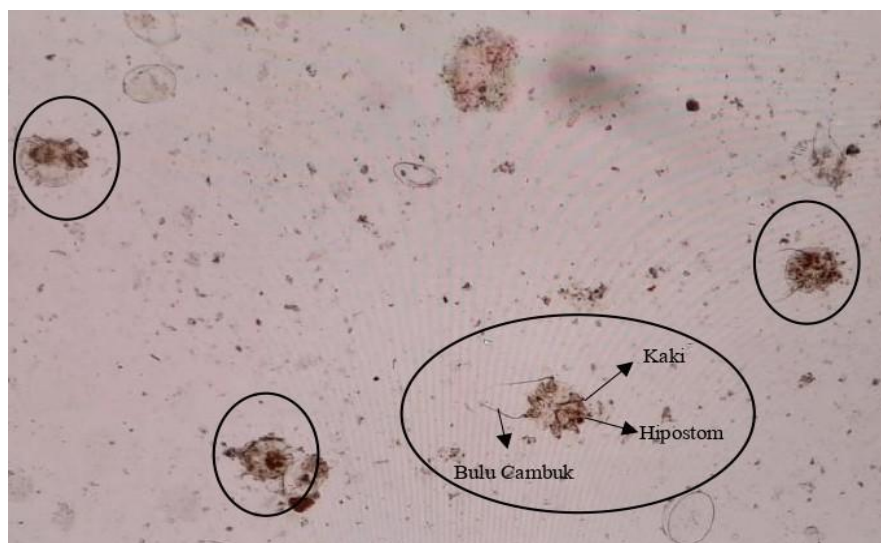
kerokan kulit sel inang karena dibutuhkan lebih sedikit waktu dan sumber daya dibandingkan dengan metode lain.



Gambar 1. Krusta skabies pada daun telinga kucing liar

Diagnosis morfologi memiliki beberapa kelemahan, diantaranya adalah tungau yang ditemukan dapat dikelirukan dengan bentuk tungau lain yang morfologinya menyerupai *S. Scabiei* seperti *Notoedres cati*, dan gejala simptomatis skabies yang dapat dikelirukan dengan gejala penyakit kulit lainnya sehingga saat

ini banyak dikembangkan tes serologi seperti ELISA. Metode lain untuk diagnosis skabies seperti dermoskopi, biopsi kulit dan *Burrow Ink Test* (BIT) dan pemeriksaan mikroskopis mempunyai sensitivitas yang lebih rendah dibanding dengan pemeriksaan molekuler (Ljunggren, 2005).

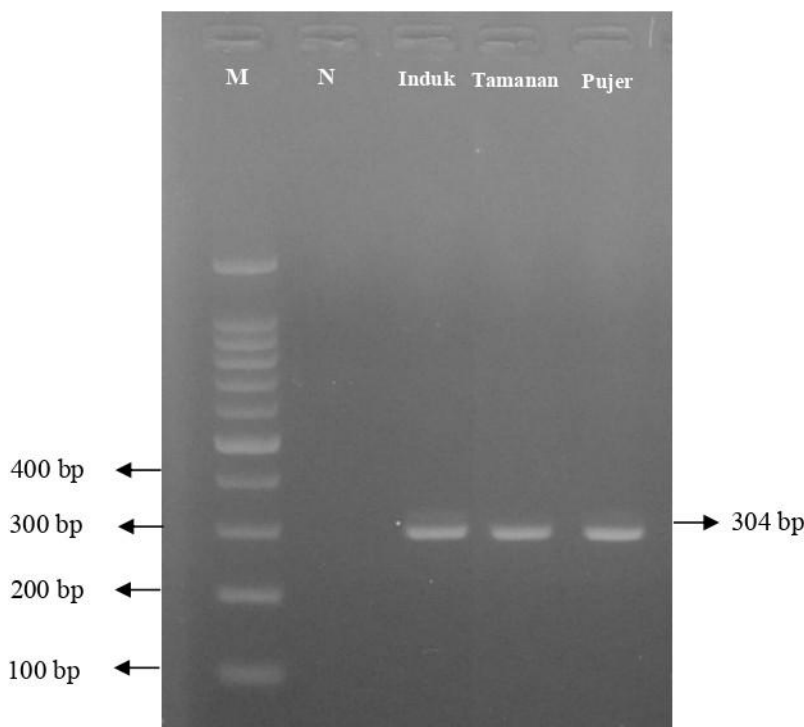


Gambar 2. Penampang ventral *Sarcoptes scabiei* dengan mikroskop Olympus Optilab Camera (perbesaran 400x).

Hasil Uji *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Uji PCR dilakukan bertujuan untuk mengkonfirmasi hasil positif *S. scabiei* pada pemeriksaan mikroskopis. Tiga sampel positif yang dikelompokkan berdasarkan asal daerah masing-masing dilakukan uji PCR dan didapatkan hasil positif dengan

pita/*band* sebesar 304 bp pada sampel Induk, Tamanan dan Pujer. Hasil uji PCR divisualisasikan pada elektroforesis gel menunjukkan produk PCR dengan spesifikasi tinggi yaitu berbentuk *band* tunggal pada posisi 304 bp sesuai dengan target amplifikasi (Gambar 3).



Gambar 3. Hasil visualisasi produk PCR *Sarcoptes scabiei* dengan menggunakan elektroforesis pada gel agarose 2%. M: Marker DNA; N: Kontrol Negatif; 1: Sampel Pasar Induk Bondowoso (Induk); 2: Sampel Pasar Tamanan (Tamanan) ; 3: Sampel Pasar Pujer (Pujer). Ketiga 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).

Gen penyandi ITS-2 terletak diantara 5.8S dan 26S rRNA digunakan untuk mengidentifikasi dan membedakan spesies inang yang terinfeksi oleh *S. scabiei* (Peltier *et al.*, 2017). Gen penyandi ITS-2 memiliki salinan yang banyak di dalam 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 DNA 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 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, konsumen dan lingkungan (Tarigan, 2007).

Setelah diidentifikasi *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 skin scraping pada kucing liar di Pasar Induk Bondowoso, Pasar Tamanan dan Pasar Pujer menunjukkan hasil positif *S. scabiei*, kemudian selanjutnya dilakukan pemeriksaan molekuler menggunakan PCR menunjukkan hasil positif dengan teramplifikasinya gen penyandi ITS-2 *S. scabiei* yang berada pada posisi 304 bp. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut ke tahap molekuler sekuensing DNA untuk mengetahui perubahan susunan nukleotida dan homologi *S. Scabiei* isolat lokal dengan isolat yang ada di dunia sehingga dapat menekan risiko sebagai upaya pengendalian terhadap penyebaran dan penularan pada hewan lain dan manusia.

DAFTAR PUSTAKA

- Aprilianti, Y., Rahmiati, D.U., Setyowati, E.Y., Dahlan, A. (2020). Potensi Anestetik Sediaan jadi Kombinasi Ketamin Hidroklorida, Atropin Sulfat dan Xylazin Hidroklorida pada Kucing Jantan Lokal. *Indonesia Medicus Veterinus*,9(3): 475-487.
- Desiandura, K., Lastuti, N.D.R., Suwanti, L.T., 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, T. A., 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.
- Hengge, U. R., Currie, B. J., Jager, G., Lupi, O., Schwartz, R. A. (2006). Scabies: a Ubiquitous Neglected Skin Disease. *The Lancet Infectious Disease*, 6(12): 769-779.
- Hermawan, I. P., Sari, D. A. K., Rahman, M. N. (2021). Deteksi Parasit Darah pada Kucing Liar (Stray Cats) dengan Metode Pewarnaan MDT di Pasar Tradisional Surabaya. *Jurnal Kajian Veteriner*, 9(3): 142-147.
- Lastuti, N. D. R., 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, E. L. (2005). *Molecular analysis of Sarcoptes scabiei*. Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Uppsala.
- Loeffelholz, M., & Deng, H. (2006). PCR and its variations. *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology* (pp.166-183) Springer US.
- 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
- Niedringhaus, K. D., Brown, J. D., Sweely, K. M., Yabsley, M. J. (2019). A Review of Sarcoptic Mange in North American Wildlife. *The International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*. 9: 285-297.
- Ningrum, N. M. A. A., Soma, I. G., Batan, I. W. (2023). Treatment of Scabiosis in Domestic Cat with Combination Therapy of Ivermectin and Sulphur Soap : A Case Report. *Indonesia Medicus Veterinus*, 12(5): 657-667.
- Peltier, S. K., Brown, J. D., Ternent, M., Niedringhaus, K.D., Schuler, K., Bunting, E. M. (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.
- Siagian, T. B. (2022). Infestasi Ektoparasit pada Kucing Liar di Kampus IPB Gunung Gede. *Jurnal Sains Terapan*, 12(2): 15-25.
- Tarigan, S. (2007). Vaksin skabies dibutuhkan namun sulit diwujudkan. Balai Besar Penelitian Veteriner. *Wartazoa*, 17(1): 38-45.
- Yudaniayanti, I.S., Maulana, E., Ma'ruf, A. (2010). Profil penggunaan kombinasi Ketamin-Xylazine dan Ketamin-Midazolane sebagai anastesi umum terhadap gambaran fisiologis tubuh pada kelinci jantan. *Veterinaria Medika*, 3(1): 23-30