

FILOGENETIK KUTU PENGHISAP DARAH (*Haematopinus sp.*) PADA BEBERAPA JENIS SAPI BERDASARKAN GEN 18S rRNA

Phylogenetic of Blood-Sucking Lice (Haematopinus sp.) in Some Cattles Based on 18S rRNA Gene

Aan Awaludin^{1*}, Yudhi Ratna Nugraheni², Mira Andriani¹, Niswatin Hasanah¹, dan Agus Hadi Prayitno¹

¹Jurusan Peternakan, Politeknik Negeri Jember

²Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada

Email: aanawaludin@polije.ac.id

INTISARI

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui hubungan kekerabatan dari *Haematopinus sp.* yang menjadi parasit di beberapa jenis sapi yaitu sapi Simmental, Limousin, PO (Peranakan Ongole), dan FH (*Friesian Holstein*) dari Kabupaten Jember dan jenis sapi Simmental dan PO dari Kabupaten Karanganyar. Metode yang digunakan adalah dengan mengisolasi DNA dari sampel kutu sejumlah 6 sampel *Haematopinus sp.* dan diamplifikasi menggunakan *universal primer* 18S rRNA dengan *forward primer* 18S (5'-TCATTACGAGGCTCTGCAAT-3') dan *reverse primer* 18S (5'-TTCAAAGTAAACGTGTCGGC-3') yang selanjutnya dilakukan sekuensing produk PCR. Hasil sekuensing dianalisis menggunakan *software* MEGA 6 untuk konstruksi pohon filogenetik dengan metode *Neighbor-Joining* dan *Maximum Parsimony*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sampel *Haematopinus sp.* yang berasal dari sapi Simmental, Limousin, dan PO dari Jember, serta Simmental dan PO yang berasal dari Karanganyar adalah termasuk dalam satu *cluster* dengan *Haematopinus quadripertusus*. Sampel *Haematopinus sp.* dari sapi FH Jember mempunyai jarak genetik yang cukup jauh dengan *Haematopinus quadripertusus* yang dimungkinkan karena sekuen yang bisa dianalisis hanya 236 nt.

Kata kunci: DNA, Filogenetik, *Haematopinus sp.*, Kutu, Sapi

ABSTRACT

The purpose of this study was to determine the phylogenetic relationship of *Haematopinus sp.* which became parasites in several types of cattle, namely Simmental, Limousin, PO (Peranakan Ongole), and FH (*Friesian Holstein*) from Jember Regency and Simmental and PO cattle from Karanganyar Regency. The method used was to isolate DNA from 6 samples of *Haematopinus sp.* and amplified using 18S rRNA universal primers with 18S (5'-TCATTACGAGGCTCTGCAAT-3') reverse primers and 18S (5'-TTCAAAGTAAACGTGTCGGC-3') sequential PCR sequencing. Sequencing results were analyzed using MEGA 6 software for phylogenetic tree construction using the *Neighbor-Joining* and *Maximum Parsimony* Methods. The results showed that the sample *Haematopinus sp.* originating from Simmental, Limousin, and PO cattle from Jember, and Simmental and PO from Karanganyar were included in one cluster by *Haematopinus quadripertusus*. *Haematopinus sp.* sample from Jember FH cattle had a considerable genetic distance from *Haematopinus quadripertusus* which was possible because the sequence that could be analyzed was only 236 nt.

Keywords: DNA, Phylogenetic, *Haematopinus sp.*, Louse, Cattle

PENDAHULUAN

Salah satu masalah utama mengenai kesehatan hewan yang berpengaruh pada peternakan di berbagai belahan dunia adalah parasit dari jenis ektoparasit (Hourigan,

1979). Kelompok kutu yang sering menjadi parasit pada sapi adalah famili *Haematopinus idae*. *Haematopinus eurysternus* adalah spesies kutu yang cukup berpengaruh pada kesehatan sapi di daerah beriklim dingin, sedangkan *Haematopinus quadripertusus* adalah spesies

kutu yang cukup berpengaruh pada kesehatan sapi di daerah beriklim tropis dan subtropis (Scofield *et al.*, 2012).

Kutu merupakan parasit pada sapi yang bisa menyebabkan rasa gatal, penurunan berat badan, iritasi, rasa tidak nyaman, dan penurunan produksi air susu serta penurunan kualitas produk asal sapi (Lasisi *et al.*, 2010). Menurut Cahyadi (2012) beberapa jenis kutu penghisap pada sapi diantaranya, yaitu *Haematopinus quadripertusus*, *Haematopinus eurysternus*, *Haematopinus tuberculatus*, *Linognathus vituli*, dan *Solenopotes capillatus*. Jenis-jenis kutu tersebut berparasit pada sapi dan mampu menyebabkan iritasi serta anemia sehingga produktivitas sapi akan menurun.

Haematopinus merupakan salah satu jenis parasit dari keluarga kutu yang banyak menginfeksi hewan domestik. Semua siklus hidup ektoparasit ini hanya terjadi pada induk semang dan hanya mampu bertahan hidup beberapa jam di luar tubuh induk semang (Guimaraes *et al.*, 2001). Hadi dan Saviana (2000) menjelaskan bahwa kutu termasuk dalam ektoparasit yang bersifat obligat karena seluruh siklus hidupnya berada pada tubuh induk semangnya. Kutu yang dapat beradaptasi memiliki morfologi antara lain tidak memiliki sayap, bentuk tubuh pipih dorsoventral, sebagian besar tidak mempunyai mata, bagian mulut bertipe menusuk-isap atau untuk mengunyah, memiliki enam kaki yang kokoh dengan kuku yang besar pada ujung tarsus serta tonjolan tibia untuk merayap dan mencengkrum bulu (rambut) inangnya.

Beberapa kajian molekular tentang *Haematopinus* sp. yang berparasit pada beberapa jenis ternak telah dilakukan. Song *et al.* (2014) melaporkan bahwa pada DNA mitokondria antara spesies *Haematopinus* sp. yang berparasit pada kuda dan babi terdapat variasi berdasarkan amplifikasi gen pada daerah 12S rDNA. Nugraheni (2015) mengidentifikasi *Haematopinus* sp. pada sapi potong (bangsa Limousin, Simmental, Peranakan Ongole) dan sapi perah (bangsa

Friesian Holstein) di Provinsi D.I. Yogyakarta berdasarkan morfologi dan molekular secara genotip pada daerah 18S rDNA *Haematopinus* sp. asal 4 jenis sapi (*Friesian Holstein*, Limousin, Peranakan Ongole, dan Simmental) di Provinsi D.I. Yogyakarta diperoleh hasil bahwa ada kedekatan kekerabatan dengan *Haematopinus quadripertusus* namun berbeda spesies.

Hasil penelitian Dong *et al.* (2014) menunjukkan bahwa adanya variasi yang substansial dalam tingkat dan fragmentasi genom mitokondria di antara garis keturunan yang berbeda dari masing-masing jenis kutu penghisap darah pada manusia dengan kutu babi (*Haematopinus suis*) dan kutu babi hutan (*Haematopinus apri*) dengan menggunakan sekuensing genom pada mitokondria. Penelitian yang mengkaji molekular ektoparasit pada *Haematopinus* sp. masih jarang dilakukan di Indonesia. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengkaji tentang filogenetik *Haematopinus* sp. pada sapi.

MATERI DAN METODE

Materi Penelitian

Penelitian ini menggunakan 6 sampel yaitu sapi Simmental, Limousin, Peranakan Ongole (PO), dan *Friesian Holstein* (FH) di Kabupaten Jember dan sapi Simmental, dan PO dari Kabupaten Karanganyar yang diambil secara acak. Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu sarung tangan karet, pinset, dan *microtube* (1,5 ml dan 2 ml), *beaker glass*, cawan petri, *GD column*, mikropipet (10 μ l, 100 μ l, dan 1.000 μ l), *tip*, *vortex mixer*, *waterbath (drybath)*, *thermalcycler*, *microwave*, seperangkat alat elektroforesis, *UV transilluminator*, dan kamera digital.

Bahan yang digunakan adalah etanol absolut, minyak cengkeh, etanol (50%, 70%, 85%, dan 95%), *glutaraldehyde*, *coccodylate buffer*, *tannin acid*, tetraoksida, *tert-butanol*, *DNA extraction kit* (Geneaid), *PCR master mix* (Go Taq® Green), *DNA staining*, *agarose*

(Seakem@LE agarose), 1x buffer Tris-Acetate-EDTA (TAE), *loading dye*, 100 bp DNA Ladder (DNA marker intron 1000 bp), *nuclease-free water* (ddH₂O), dan *primer* pada area 18S rRNA dengan *forward primer* 18S (5'-TCATTACGAGGCTCTGCAAT-3'), dan *reverse primer* 18S (5'-TTCAAAGTAAACGTGTCTGGC-3') (Nugraheni, 2015).

Metode Penelitian

Penelitian ini terdiri dari 2 tahapan yaitu pengambilan sampel dan pemeriksaan molekular. Data yang dihasilkan kemudian dianalisis dengan menggunakan konstruksi pohon filogenetik dengan metode *Neighbor-Joining* dan *Maximum Parsimony*.

Pengambilan sampel *Haematopinus* sp.

Sampel *Haematopinus* sp. diambil dari ujung ekor yang berambut di daerah sekitar *perineum vulva*, telinga, dan sekitar mata dari sapi yang terindikasi terinfeksi *Haematopinus* sp. dengan menggunakan pinset. Setiap satu ekor sapi diambil 5 sampai 10 ekor kutu kemudian dimasukkan dalam *microtube* 2 ml berisi etanol absolut dan dihitung sebagai satu sampel kutu kemudian diberi label.

Pemeriksaan molekular

Sampel *Haematopinus* sp. diekstraksi menggunakan *DNA extraction kit* (Geneaid). Ekstraksi sampel dilakukan dengan mengambil 1 ekor kutu *Haematopinus* sp. yang telah difiksasi selanjutnya dicuci menggunakan akuades dan didiamkan beberapa saat kemudian dipotong dengan menggunakan *blade* steril. Selanjutnya dimasukkan ke dalam *microtube* 2 ml, ditambahkan GST 200 µl dan proteinase K sebanyak 20 µl kemudian divortex, diinkubasikan pada suhu 60°C selama 12 jam, disentrifus pada kecepatan 16.000 rpm selama 2 menit. Larutan supernatan dipindah ke *microtube* 1,5 ml dan ditambahkan GSB buffer 200 µl kemudian divortex.

Proses pengikatan DNA diawali dengan penambahan etanol absolut 200 µl lalu

divortex. Larutan tersebut dipindah ke *column* GD yang ditempatkan pada *microtube* 2 ml dan disentrifus pada kecepatan 16.000 rpm selama 1 menit. *Microtube* 2 ml yg berisi cairan dibuang dan *column* GD dipindah ke *microtube* 2 ml yang baru. Pencucian DNA dilakukan dengan menambahkan 400 µl W1 buffer kemudian disentrifus pada kecepatan 16.000 rpm selama 1 menit. *Column* GD dipindah ke *microtube* baru dan ditambah 600 µl *wash buffer*, kemudian disentrifus kembali pada kecepatan 16.000 rpm selama 30 detik. *Column* GD dipindah pada *microtube* baru dan disentrifus kembali pada kecepatan 16.000 rpm selama 3 menit sehingga dihasilkan matrik *column* kering. *Column* GD ditaruh pada *microtube* baru kemudian ditambahkan 100 µl *pre heated elution buffer* ke bagian tengah matrik *column* selama 3 menit, setelah itu dilakukan sentrifus dengan kecepatan 16.000 rpm selama 30 detik. Hasil ekstraksi DNA sampel *Haematopinus* sp. ini langsung digunakan untuk amplifikasi DNA atau disimpan pada suhu -20°C.

Hasil ekstraksi dari DNA sampel *Haematopinus* sp. selanjutnya dilakukan amplifikasi menggunakan *primer universal* 18S *forward primer* 18S (5'-TCATTACGAGGCTCTGCAAT-3') dan *reverse primer* 18S (5'-TTCAAAGTAAACGTGTCTGGC-3') (Nugraheni, 2015). Proses amplifikasi DNA pada setiap ekstraksi DNA sampel dilakukan dengan mencampur PCR *master mix* (Go Taq@ Green) sebanyak 12,5 µl ditambah ddH₂O (*nuclease-free water*) 10 µl ditambah *primer* 1 µl *forward primer* 18S (5'-TCATTACGAGGCTCTGCAAT-3') dan 1 µl *reverse primer* 18S (5'-TTCAAAGTAAACGTGTCTGGC-3') dalam *microtube* hingga homogen kemudian ditambah 0,5 µl ekstraksi DNA sampel sehingga didapatkan volume akhir 25 µl. Amplifikasi DNA dilakukan dengan kondisi predenaturasi 95°C (5 menit), denaturasi 94°C (1 menit), *annealing* 55°C (1 menit), *extension* 72°C (1 menit), dilakukan sebanyak 30 siklus, dan *final extension* 72°C (5 menit) dengan suhu

akhir 4°C. Hasil PCR DNA sampel *Haematopinus* sp. selanjutnya dielektroforesis pada gel agarose 2% selama 30 menit pada 100 volt.

Pembuatan gel agarose 2% dengan melarutkan agarose (*Seakem@LE agarose*) sebanyak 0,50 g ke dalam 25 ml 1x buffer *Tris-Acetate-EDTA* (TAE) yang dididihkan di dalam *erlenmeyer* 100 ml menggunakan *microwave*. Larutan agarose didinginkan selama 10 menit dan ditambahkan 2,5 µl *DNA staining* diaduk sampai homogen, kemudian dituang secara perlahan ke dalam cetakan dan kemudian dipasang sisir pencetak sumuran. Selanjutnya gel agarose dibiarkan mengeras kemudian sisir pencetak diangkat. Gel agarose diletakkan ke dalam unit elektroforesis berisi 1x buffer *Tris-Acetate-EDTA* (TAE).

Hasil dari PCR DNA sampel *Haematopinus* sp. masing-masing diambil sebanyak 5 µl kemudian dicampur dengan 2 µl *loading dye* di atas parafilm kemudian dimasukkan ke dalam sumuran. Sumur pertama diisi dengan campuran 3 µl sebagai penanda molekuler (*marker*) 100 bp dan 2 µl *loading dye*. Hasil gel elektroforesis divisualisasikan dengan menggunakan *UV transiluminator* dan didokumentasikan dengan kamera digital. Proses sekuensing DNA dilakukan di Balai Uji Standar Karantina Ikan, Pengendalian Mutu, dan Keamanan Hasil Perikanan (BUSKIPMKHP) Jakarta.

Analisis data

Hasil dari uji molekular (sekuensing DNA) dianalisis menggunakan *software* MEGA 6 untuk mendapatkan konstruksi pohon filogenetik (Tamura *et al.*, 2013) dengan metode *Neighbor-Joining* dan *Maximum Parsimony* (Tamura *et al.*, 2011).

HASIL DAN PEMBAHASAN

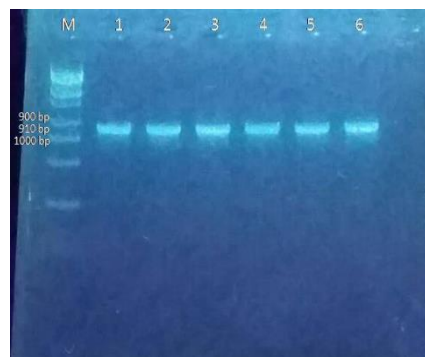
Sampel *Haematopinus* sp. ditemukan pada ujung ekor yang berambut, sekitar telinga, dan sekitar *perineum vulva* terutama bagian bawah dari sapi yang terinfeksi *Haematopinus* sp. (Gambar 1).



Gambar 1. Infestasi *Haematopinus* sp. pada ujung ekor.

Haematopinus sp. yang dikoleksi merupakan spesies dari *Haematopinus quadripertusus*. Menurut Scofield *et al.* (2012) bahwa *Haematopinus quadripertusus* adalah spesies kutu yang cukup berpengaruh pada kesehatan sapi di daerah beriklim tropis dan subtropis.

DNA dari sampel *Haematopinus* sp. berhasil diisolasi dan diamplifikasi dengan terlihatnya band yang jelas pada 910 bp dengan menggunakan universal primer pada area 18S rRNA (Gambar 2). Menurut Meyer *et al.* (2010) sub unit kecil gen 18S rRNA adalah salah satu area yang sering digunakan dalam studi filogenetik.



Gambar 3. Hasil amplifikasi DNA *region* 18S rRNA (910 bp) sampel kutu.

Keterangan M. Marker:

1. *Haematopinus* sp. dari sapi FH Jember;
2. *Haematopinus* sp. dari sapi Simmental Jember;
3. *Haematopinus* sp. dari sapi Limousin Jember;

4. *Haematopinus* sp. dari sapi PO Jember;
5. *Haematopinus* sp. dari sapi Simmental Karanganyar;
6. *Haematopinus* sp. dari sapi PO Karanganyar.

Penghitungan jarak genetik dilakukan dengan menggunakan metode Kimura-2-Parameter yang tersaji pada Tabel 1. Jarak genetik sampel *Haematopinus* sp. dihitung dengan perbandingan dari GenBank yang terdiri dari spesies *Haematopinus quadripertusus* (GenBank: KJ522491.1) dan perbandingan *outgroup* dari spesies *Linognathus africanus* (GenBank: LT598598.1).

Hasil analisis data jarak genetik didapatkan hasil 0% dari sampel *Haematopinus* sp. dari sapi Simmental Jember, Limousin Jember, PO Jember, Simmental Karanganyar, dan PO Karanganyar dengan *Haematopinus quadripertusus* (GenBank: KJ522491.1) sehingga sangat dimungkinkan sampel *Haematopinus* sp. tersebut adalah spesies *Haematopinus quadripertusus*.

Hasil yang berbeda didapatkan pada analisis sampel *Haematopinus* sp. dari sapi FH Jember yang mempunyai jarak genetik 6% dengan *Haematopinus quadripertusus* (GenBank: KJ522491.1), namun hal tersebut belum bisa untuk menyimpulkan bahwa sampel *Haematopinus* sp. dari sapi FH Jember sebagai spesies baru walaupun perbedaan 2% sudah merupakan spesies yang berbeda. Hal tersebut dikarenakan dari primer target 910 bp nukleotida pada sekuensing *region* 18S rRNA dari *Haematopinus* sp. (GenBank: JQ309927.1) sebanyak 2.835 bp didapatkan hasil yang teranalisis hanya 236 nt sehingga hasil sekuensing yang teranalisis belum bisa mewakili untuk identifikasi pada penentuan spesies baru secara akurat.

Meskipun demikian, hasil analisis tersebut masih bisa digunakan untuk melakukan deteksi kedekatan kekerabatan. Menurut Nugraheni (2015) *Haematopinus* sp. yang teridentifikasi sebagai spesies *Haematopinus quadripertusus* dari sapi

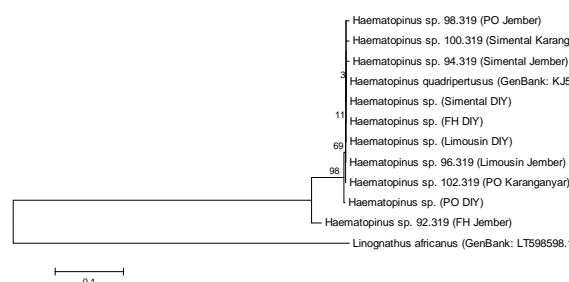
Simmental, Limousin, FH, dan PO di Provinsi D.I. Yogyakarta memiliki jarak genetik 0% dengan *Haematopinus quadripertusus* (GenBank).

Tabel 1. Jarak Genetik (Metode Kimura-2-Parameter).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1												
2	0,00											
3	0,00	0,00										
4	0,00	0,00	0,00									
5	0,00	0,00	0,00	0,00								
6	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06							
7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,06						
8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,00					
9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,06	0,01	0,00				
10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,06	0,01	0,00	0,01			
11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00		
12	0,98	0,98	0,98	0,98	0,97	0,94	0,99	0,98	0,99	0,99	0,98	

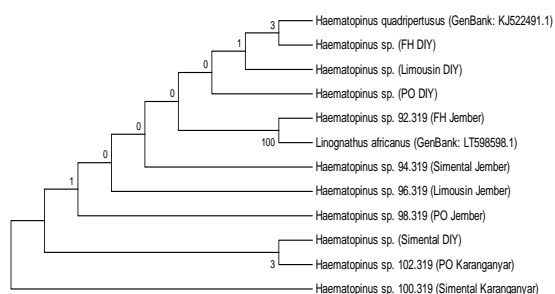
Keterangan: 1. *Haematopinus quadripertusus* (GenBank: KJ522491.1), 2. *Haematopinus* sp. (Simmental DIY), 3. *Haematopinus* sp. (FH DIY), 4. *Haematopinus* sp. (Limousin DIY), 5. *Haematopinus* sp. (PO DIY), 6. *Haematopinus* sp. 92.319 (FH Jember), 7. *Haematopinus* sp. 94.319 (Simmental Jember), 8. *Haematopinus* sp. 96.319 (Limousin Jember), 9. *Haematopinus* sp. 98.319 (PO Jember), 10. *Haematopinus* sp. 100.319 (Simmental Karanganyar), 11. *Haematopinus* sp. 102.319 (PO Karanganyar), 12. *Linognathus africanus* (GenBank: LT598598.1)

Hasil analisis pohon filogenetik dengan menggunakan konstruksi *Neighbor-Joining* dengan *bootstrap* 1.000x menunjukkan bahwa semua sampel *Haematopinus* sp. masih dalam satu cabang dengan *Haematopinus quadripertusus* (GenBank) dengan nilai validitas 98%. Sampel *Haematopinus* sp. dari sapi FH Jember walaupun masih dalam satu cabang, namun memiliki jarak genetik yang lebih jauh dengan *Haematopinus quadripertusus* (GenBank) (Gambar 3).



Gambar 3. Konstruksi pohon filogenetik *Neighbor-Joining* dengan *bootstrap* 1000x.

Hasil analisis pohon filogenetik dengan menggunakan konstruksi *Maximum Parsimony* dengan *bootstrap* 1.000x menunjukkan hasil kemiripan dengan *Haematopinus quadripertusus* (GenBank) dengan validitas rendah. *Haematopinus* sp. asal sapi FH Jember erat hubungannya dengan *Linognathus africanus* dengan validitas 100% mungkin karena sekuen yang teranalisis hanya 236 nt atau tidak termasuk *Haematopinus* sp. secara molekuler (Gambar 4).



Gambar 4. Konstruksi pohon filogenetik *Maximum Parsimony* dengan *bootstrap* 1.000x.

Hasil pemeriksaan molekular yang meliputi analisis jarak genetik (Kimura-2-Parameter) konstruksi pohon filogenetik *Neighbor-Joining* dan *Maximum Parsimony* pada sampel *Haematopinus* sp. sapi Simental Jember, Limousin Jember, PO Jember, Simental Karanganyar, dan PO Karanganyar menunjukkan sebagai spesies *Haematopinus quadripertusus* dengan nilai validitas beragam, sedangkan pada sampel kutu sapi FH Jember dimungkinkan bukan spesies *Haematopinus quadripertusus*.

KESIMPULAN

Sampel *Haematopinus* sp. yang berasal dari sapi Simental, Limousin, dan PO dari Jember, serta Simental dan PO yang berasal dari Karanganyar adalah termasuk dalam satu cluster dengan *Haematopinus quadripertusus*. Sampel *Haematopinus* sp. dari sapi FH Jember mempunyai jarak genetik yang cukup jauh dengan *Haematopinus quadripertusus* yang dimungkinkan karena sekuen yang bisa dianalisis hanya 236 nt.

DAFTAR PUSTAKA

Cahyadi. 2012. Infeksi Kutu Pada Hewan (Anjing, Kucing, Sapi, Kuda, Domba, Kambing, Ayam, Kalkun, Merpati dan Itik). <http://cahyadiblogsan.blogspot.com/2012/06/infeksi-kutu-pada-hewan-anjing-kucing.html>. Diakses 6 April 2016.

Dong, W., S. Song, D.C. Jin, X. Guo, and R. Shao. 2014. Fragmented mitochondrial genomes of the rat lice, *polyplax asiatica* and *polyplax spinulosa*: intra-genus variation in fragmentation pattern and a possible link between the extent of fragmentation and the length of life cycle. *BMC Genomic*. 15(44).

Guimaraes, J.H., E.C. Tucc, and D.M. Barros-Battesti. 2001. Ectoparasitos de Importância Veterinária. Plêiade, São Paulo.

Hadi, U.K. dan S. Saviana. 2000. Ektoparasit: Pengenalan, Diagnosis dan Pengendaliannya. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor. Bogor.

Hourigan, J.L. 1979. Spread and detection of Psoroptic scabies of cattle in the United States. *Journal of American Veterinary Association*. 175:1278-1280.

Lasisi, O.T., Eyarefe, and J.O. Adejimi. 2010. Anaemia and mortality in calves caused by the short-nosed sucking louse (*Haematopinus eurysternus*) (Nitzsch) in Ibadan. *Nigerian Veterinary Journal*. 31(4):295-299.

Meyer, A., C. Todt, N.T. Mikkelsen, and B. Lieb. 2010. Fast evolving 18S rRNA sequences from Solenogastres (Mollusca) resist standard PCR amplification and give new insights into mollusk substitution rate heterogeneity. *BMC Evolutionary Biology*. 10(70):1-12.

Nugraheni, Y.R. 2015. Identifikasi Morfologi dan Molekuler Kutu *Haematopinus* sp. pada Sapi Lokal dan Impor Yogyakarta. Tesis. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.

Scofield, A., K.F., Campos, A.M., Melo da Silva, C.H.S. Oliveira, J.D. Barbosa, and G. Goes-Cavalcante. 2012. Infestation by *Haematopinus quadripertusus* on cattle in São Domingos do Capim, state of Pará. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*. 21(3):315-318.

Song, S.D., S.C. Barker, and R. Shao. 2014. Variation in mitochondrial minichromosome composition between blood sucking lice of the genus *Haematopinus* that infest horses and pigs. *Parasit Vectors*. 7:7-144.

Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, and S. Kumar. 2011. MEGA5: molecular evolutionary

genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology Evolution.* (28): 2731-2739.

Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, and S. Kumar. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology Evolution.* 30(12):2725-2729.