

# Diversitas Genetik *Anopheles balabacensis*, Baisas di Berbagai Daerah Indonesia Berdasarkan Sekuen Gen ITS 2 DNA Ribosom

## GENETIC DIVERSITY OF *Anopheles balabacensis*, Baisas BASE ON THE SECOND INTERNAL TRANSCRIBED SPACER (ITS2) RIBOSOMAL GENE SEQUENCE AT SEVERAL AREAS IN INDONESIA

Widiarti, Triwibowo Ambar Garjito, Umi Widyastuti

Balai Besar Litbang Vektor dan Reservoir Penyakit  
Jl. Hasanudin No. 123 PO BOX 200, Salatiga, Indonesia  
E-mail : widiarti123@gmail.com

*Submitted : 19-3-2014, Revised : 21-4-2014, Revised : 10-7-2014, Accepted : 3-11-2014*

### **Abstract**

*Malaria control is remain a challenge although various attempts have been conducted. One of the issues in controlling the vectors is the presence of species complex. The species complex is an example of genetic diversity. Anopheles balabacensis, Baisas reported as complex species in various countries, but has not been widely reported in Indonesia. In order to enhance malaria control, it is important to understand the vectors and its bioecology. The aim of the study were a). to identify An. balabacensis, Baisas suspected as species complex based on ribosomal DNA the second internal transcribed spacer (ITS2) gene sequences, b). to understand the genetic diversity of An. balabacensis, Baisas collected from endemic and non endemic regions distncted by geographical distance, c). to understand the genetic relationships (taxonomi distance) among An. balabacensis, Baisas from difference regions in Indonesia through reconstructing the phylogenetic trees. The results showed that An. balabacensis, Baisas in Indonesia is identified as sympatric and allopatrik complex species. There were differences which was far enough in the genetic relationships among An. balabacensis populations collected from Pusuk Lestari in the area of Meninting Health Center, West Lombok, NTB. This differences were identified as sympatric complex. In addition, base on the relationship among An. leucosphyrus group, An balabacensis, Baisas collected from Berjoko Nunukan Regency showed that the species quite far compare to An. balabacensis, Baisas originally from Central Java and Lombok NTB.*

*Keywords : An. balabacensis, genetic variation, the second Internal Transcribed Spacer (ITS2).*

### **Abstrak**

Penanggulangan malaria masih banyak menemui kendala walaupun berbagai upaya telah dilakukan. Salah satu kendala yang menyulitkan dalam pengendalian vektor adalah adanya spesies kompleks pada populasi nyamuk vektor. Spesies kompleks merupakan contoh diversitas genetik. *Anopheles balabacensis* dilaporkan sebagai spesies kompleks di berbagai negara, akan tetapi belum banyak dilaporkan di Indonesia. Penanggulangan malaria agar lebih efektif perlu adanya perbaikan dan pendekatan strategi dalam pengendalian vektor, termasuk sangat diperlukan adanya pemahaman terhadap spesies dan bioekologinya. Tujuan penelitian adalah untuk : a). Mengidentifikasi secara molekuler nyamuk *An. balabacensis* yang dicurigai sebagai spesies kompleks berdasarkan sekuen ITS2 DNA ribosom, b). Mengetahui diversitas genetik nyamuk *An. balabacensis* dari daerah endemis dan non endemis dengan jarak geografis yang berbeda, c). Mengetahui kekerabatan genetik (jarak taksonomi) nyamuk *An. balabacensis* dari berbagai daerah di Indonesia dengan merekonstruksi

pohon filogenetik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *An. balabacensis* di Indonesia merupakan spesies kompleks simpatrik dan allopatrik. Ada perbedaan kekerabatan genetik yang cukup jauh diantara populasi *An. balabacensis* di Pusuk Lestari, wilayah Puskesmas Meninting, Lombok Barat, NTB yang merupakan simpatrik kompleks. Berdasarkan hubungan kekerabatan *An. leucosphyrus* group, *An. balabacensis* dari Berjoko, Kabupaten Nunukan menunjukkan kecenderungan terpisah cukup jauh dibandingkan dengan *An. balabacensis* kompleks lainnya yang berasal dari Jawa Tengah dan Lombok, NTB.

Kata kunci : *An. balabacensis*, variasi genetik, ITS2 DNA ribosom

## PENDAHULUAN

Malaria sampai sekarang masih merupakan masalah kesehatan masyarakat yang dapat menyebabkan kematian terutama pada kelompok risiko tinggi yaitu bayi, anak balita, ibu hamil. Malaria secara langsung menyebabkan anemia dan menurunkan produktivitas kerja. Penyakit ini masih endemis di sebagian besar wilayah provinsi di Indonesia<sup>1</sup>. Upaya untuk menekan angka kesakitan dan kematian dilakukan melalui program pemberantasan malaria yang kegiatannya antara lain meliputi diagnosis dini, pengobatan cepat dan tepat, surveilans dan pengendalian vektor yang kesemuanya ditujukan untuk memutus mata rantai penularan malaria. Penularan malaria diminimalkan dengan melakukan upaya pengendalian terhadap *Anopheles* sp sebagai nyamuk penular, mengingat kondisi geografis Indonesia luas dan bionomik vektor yang beraneka ragam sehingga pemetaan habitat perkembangbiakan dan perilaku nyamuk menjadi sangat penting. Agar penanggulangan malaria lebih efektif, sangat perlu adanya perbaikan dan pendekatan strategi dalam pengendalian vektor, termasuk pemahaman terhadap spesies dan bioekologinya. Dalam pemahaman suatu spesies diperlukan identifikasi secara benar dan akurat sehingga tidak terjadi kesalahan dalam menentukan spesies nyamuk yang berperan sebagai vektor<sup>1</sup>.

Nyamuk *Anopheles balabacensis* merupakan salah satu vektor malaria di daerah endemis di kawasan Bukit Menoreh (Kabupaten Magelang, Purworejo, dan Kulon Progo selain *An. aconitus* dan *An. maculatus*), Kalimantan, Sumatera, dan Nusa Tenggara Barat 2, namun ditemukan juga di daerah non endemis di wilayah Kabupaten Klaten. Hal ini menimbulkan kecurigaan adanya

spesies kompleks pada nyamuk *An. balabacensis* di Indonesia. Berbagai upaya pengendalian sudah dilakukan di wilayah endemis tersebut akan tetapi penularan malaria masih tetap terjadi dari tahun ke tahun<sup>3</sup>. Usaha untuk pengendalian nyamuk vektor menjadi terkendala oleh kapasitas reproduksi dan fleksibilitas genetiknya. Fleksibilitas genetik terrefleksi oleh karena resistensi nyamuk terhadap insektisida dan adanya sejumlah spesies kompleks yang muncul sebagai akibat perubahan lingkungan yang memungkinkan spesies tersebut beradaptasi<sup>4</sup>. Spesies kompleks yaitu nyamuk mempunyai ciri-ciri morfologi yang sama atau amat mirip sehingga sulit dibedakan satu dengan lainnya, berbeda secara genetik, terisolasi reproduksi dan di alam menunjukkan perilaku berbeda<sup>5</sup>. Spesies kompleks menjadi penting karena terdapat anggota-anggota nyamuk yang mampu berperan sebagai vektor. Apabila vektor dan non vektor tidak dapat dibedakan maka usaha penanggulangan penyakit yang ditularkannya tidak akan berhasil<sup>6</sup>. Spesies kompleks dapat dibedakan menjadi simpatrik kompleks dan allopatrik kompleks. Simpatrik kompleks merupakan kelompok spesies yang anggota-anggotanya terdapat pada satu daerah yang sama. Allopatrik kompleks mempunyai anggota yang berasal dari daerah yang berbeda<sup>6</sup>. Nyamuk *An. balabacensis* di Indonesia tersebar di Kalimantan, Sumatera<sup>7</sup>, Jawa Tengah, DIY<sup>8,9</sup>, dan Nusa Tenggara Barat<sup>10</sup>. *An. balabacensis* dikenal mempunyai tendensi mengisap darah manusia (antropofilik) dan binatang (zoofilik). Penelitian di Sabah, Malaysia menunjukkan bahwa *An. balabacensis* lebih antropofilik daripada zoofilik, cenderung istirahat di dalam rumah dan mengisap darah manusia serta menunjukkan bukti yang kuat adanya variabilitas genetik diantara populasinya<sup>11,12</sup>. Diversitas genetik pada tingkat DNA dapat dideteksi dengan berbagai metode pengujian

berbasis PCR antara lain dengan menggunakan sekuen tertentu yang spesifik spesies yang merupakan penanda molekuler seperti gen ITS2 DNA ribosom, domain 2 dan 3 (D2 dan D3) DNA ribosom 28S dan Cytochrome Oxidase subunit I dan II (COI dan COII) DNA mitokondria. Penanda molekuler tersebut digunakan secara luas selain untuk membedakan spesies nyamuk juga untuk rekonstruksi filogenetik/hubungan kekerabatan genetik<sup>13,14</sup>. Berdasarkan uraian di atas diajukan rumusan permasalahan sebagai berikut: a). Apakah secara molekuler *An. balabacensis* di Indonesia merupakan spesies kompleks?, b). Bagaimana hubungan kekerabatan genetik diantara *An. balabacensis* dari berbagai daerah di Indonesia? Penelitian ini bertujuan untuk: a). Mengidentifikasi secara molekuler nyamuk *An. balabacensis* yang dicurigai sebagai spesies kompleks berdasarkan sekuen ITS2 DNA ribosom, b). Mengetahui diversitas genetik nyamuk *An. balabacensis* dari daerah endemis dan non endemis dengan jarak geografis yang berbeda, dan c). Mengetahui kekerabatan genetik (jarak taksonomi) nyamuk *An. balabacensis* dari berbagai daerah di Indonesia dengan merekonstruksi pohon filogenetik

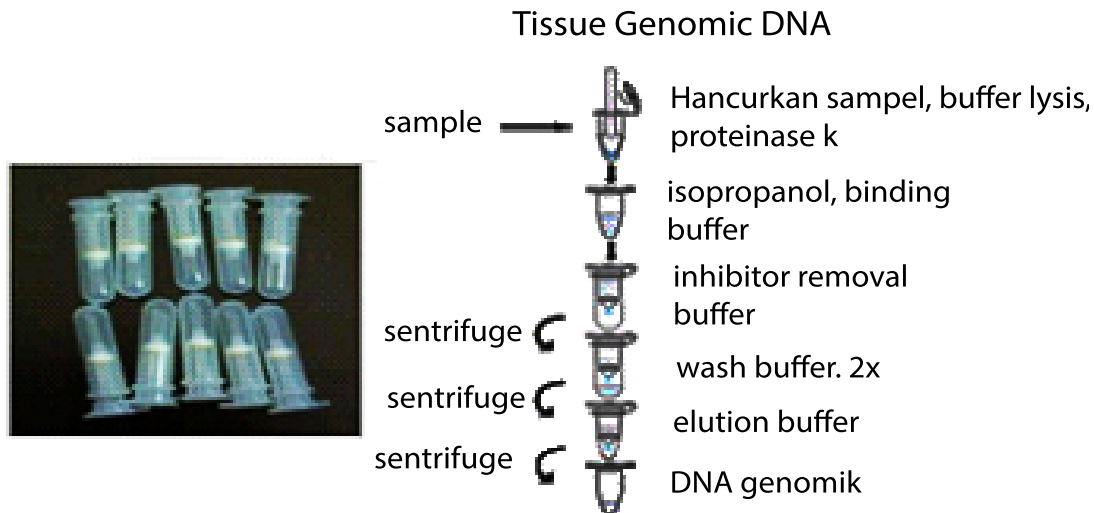
## BAHAN DAN METODE

Kemalang (Klaten), Srumbung (Magelang), Kaliagung (Purworejo), Kalibuko (Kulonprogo), Berjoko (Nunukan), Kedondong Atas (Lombok Barat) dipilih berdasarkan kriteria antara lain ekosistem hutan sekunder, topografi daerah berbukit-bukit, habitat perkembangbiakan berupa kobakan batu di sepanjang sungai, sumber air, perigi (jernih/ keruh). Hal lain yang dipertimbangkan misalnya Berjoko (Desa Sungai Limau, Kabupaten Nunukan, Kalimantan Timur) merupakan kawasan perbatasan lintas negara yang menjadi prioritas pembangunan kesehatan di Indonesia. Selain itu lokasi yang dipilih adalah merupakan dusun atau desa endemis tinggi malaria dan selalu ditemukan ada kasus, kecuali Kemalang, Kabupaten Klaten yang merupakan dusun/desa non endemis malaria.

Penelitian ini merupakan penelitian observasional dengan rancangan *cross sectional*. Variabel bebas adalah populasi *An. balabacensis*. Variabel tergantung, yaitu kompetensi vektorial. Variabel pengganggu, meliputi curah hujan, suhu, kelembaban, jarak antara pemukiman dan habitat

perkembangbiakan nyamuk. Populasi pada penelitian ini adalah nyamuk *An. balabacensis* yang memenuhi kriteria ditangkap di lokasi penelitian. Sampel untuk penelitian ini adalah *An. balabacensis*. Nyamuk *An. balabacensis* diperoleh dengan melakukan penangkapan di luar dan dalam rumah penduduk sepanjang malam (18.00-06.00) dan pagi hari (06.00-08.00) sesuai dengan standar WHO (2003)<sup>15</sup>, yaitu metode hinggap pada manusia di dalam rumah (HMD) dan di luar rumah (HML) masing-masing selama 40 menit, penangkapan nyamuk yang istirahat di dalam rumah (IDR), dan istirahat di luar rumah /sekitar kandang ternak (ISKD) masing-masing selama 10 menit. Penangkap nyamuk berjumlah 6 orang. Penangkapan nyamuk juga dilakukan pada pagi hari terhadap nyamuk yang istirahat di dalam rumah, di luar rumah dan di habitat aslinya. Nyamuk yang tertangkap dimasukkan ke dalam *paper cup*. Nyamuk dimatikan dengan kloroform dan diidentifikasi spesiesnya menurut kunci identifikasi O'Connor dan Soepanto (1989)<sup>16</sup>, dihitung kepadatannya, selanjutnya dibedah kandung telurnya untuk mengetahui paritasnya. Nyamuk dipisahkan bagian-bagiannya dan dimasukkan ke dalam tabung eppendorf yaitu kaki dan sayap untuk pemeriksaan diversitas genetik<sup>17</sup>. Bagian lain untuk studi yang berbeda seperti dada-kepala nyamuk parous untuk pemeriksaan Elisa sporozoit. Untuk pemeriksaan Elisa pakan darah diperoleh dengan cara perut nyamuk kenyang darah (*fed*) ditekan kemudian dibuat apus pada kertas Whatman. Sampel disimpan dalam kondisi kering (*silica gel* sebagai bahan pengering) dan dibawa ke laboratorium untuk diproses selanjutnya. Untuk kelengkapan data vektor khususnya perilaku berkembangbiak, dilakukan penangkapan jentik nyamuk vektor di habitat sekitar lokasi penangkapan. Jentik yang terkumpul selanjutnya dipelihara di laboratorium sampai menjadi nyamuk sehingga dapat diidentifikasi spesiesnya.

Sampel dari berbagai lokasi penelitian diperiksa keragaman genetiknya. Ekstraksi DNA dilakukan secara individual. Ekstraksi DNA nyamuk *An. balabacensis* dilakukan menurut prosedur dari Roche Applied Science, Germany (2012)<sup>18</sup>, yaitu menggunakan metode spin kolom (Gambar 1).



**Gambar 1. Prosedur Ekstraksi DNA dengan Menggunakan Metode Spin Kolom.**

DNA genom hasil ekstraksi selanjutnya diamplifikasi dengan PCR. PCR super mix (Invitrogen), terdiri dari  $Mg^{++}$ , dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), dan taq DNA polymerase rekombinan. Reaksi PCR dengan komposisi sebagai berikut (Tabel 1):

**Tabel 1. Komposisi Reaksi PCR untuk Sampel DNA *An. bababacensis***

Larutan stok	Volume ( $\mu$ l)
Super mix	20
DNA	5
10-20 pmol Primer (F dan R)	2

DNA genom diamplifikasi dengan menggunakan primer kit. Primer didesain berdasarkan sekuen gen ITS2 DNA ribosom yaitu 5,8F: 5'-TGTGAACTGCAGGACACAT-3' dan 28R: 5'-TATGCTTAAATTCAGGGGGT-3'<sup>19</sup>. Temperatur Siklus PCR yang digunakan sesuai hasil optimasi adalah: denaturasi awal suhu 94°C selama 10 menit dan siklus denaturasi suhu 94°C selama 1 menit, annealing suhu 56°C selama 45 detik, siklus polimerisasi suhu 72°C selama 1 menit dan polimerisasi akhir suhu 72°C selama 10 menit untuk menghindari adanya DNA yang belum sempurna teramplifikasi. Total siklus yang digunakan adalah 40 siklus. Hasil produk PCR kemudian dielektroforesis pada gel agarosa 2%. Gel yang telah dielektroforesis selanjutnya didokumentasikan dalam bentuk foto gel pada GelDoc.

Sekuensing fragmen gen produk PCR

dilakukan dengan metode *Dye terminator cycle sequencing* pada *sequencer AB3130 genetic analyser 4 kapiler*. Seluruh proses dilakukan di laboratorium rekayasa terapan, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT), Serpong, Tangerang, Banten.

Hasil penelitian dianalisis secara deskriptif. Hasil sekuen nukleotida pada daerah ITS2 sampel *An. balabacensis* dari berbagai daerah di Indonesia kemudian dibandingkan dengan sekuen *An. balabacensis* dari negara lain seperti Vietnam, Thailand, Malaysia, dan Kamboja. Hasil sekuen nukleotida diposisikan (aligned) menggunakan *Clustal X 1.81* dan *BioEdit 5.0.6*. Analisis filogenetik dilakukan dengan metode *The neighbor-joining* (NJ) dan *maximum parsimony* (MP). Analisis dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak *MEGA 5.05*. Seluruh urutan kodon pada analisis ini dan seluruh data yang kemungkinan menghasilkan makna ganda dianggap sebagai missing data. Analisis merekonstruksi filogenetik dengan metode *neighbor-joining* (NJ) dan jarak evolusioner diukur dengan metode *Jukes-Cantor* berdasarkan penyatuan urutan nukleotida dari parsial gen ITS2. Seluruh missing data dieliminasi dengan menggunakan pilihan *pairwise deletion*. Penilaian kesesuaian dari pohon NJ, bootstrap test dilakukan dengan 2000 ulangan. Untuk merekonstruksi pohon filogenetik menggunakan metode *Maximum parsimony* (MP), seluruhnya dilakukan dengan *close-neighbor-interchange algorithm* pada penelusuran level 3 dengan penentuan pohon awal dilakukan dengan analisis *random addition* dari urutan nukleotida yang dianalisis dengan 10.000 ulangan<sup>20</sup>.



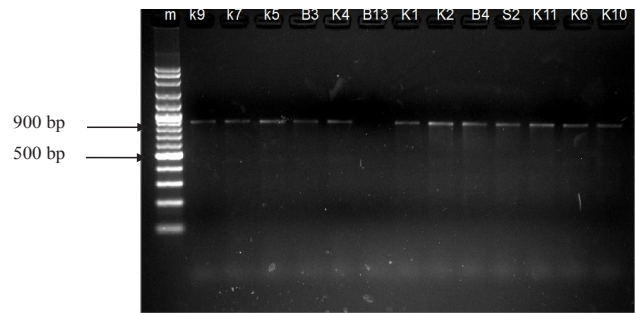
## HASIL

Sampel *An. balabacensis* dari Kemalang (Klaten), Berjoko (Nunukan), Kedondong Atas (Lombok Barat), Srumbung (Magelang), Kalibuko (Kulonprogo), dan Sokoagung (Purworejo) berhasil diamplifikasi berdasarkan sekuen gen ITS2 DNA ribosom seperti terlihat pada Tabel 2.

**Tabel 2. Pemeriksaan Ragam Genetik *An. balabacensis***

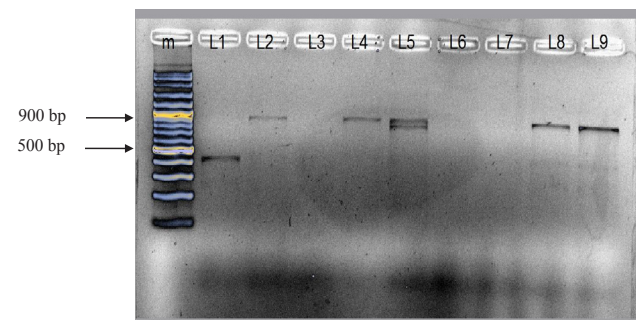
Lokasi	Jumlah nyamuk diperiksa
Kemalang, Klaten	17
Berjoko, Nunukan	13
Kedondong Atas, Lombok Barat	17
Srumbung, Magelang	3
Kalibuko, Kulonprogo	5
Sokoagung, Purworejo	3

Sampel DNA yang diperoleh dari masing-masing lokasi, diamplifikasi dengan menggunakan universal primer berdasarkan sekuen gen ITS2 DNA ribosom untuk mengidentifikasi adanya spesies kompleks pada *An. balabacensis*, dielektroforesis, dan secara visual dilihat pada gel dokumentasi. Profil produk PCR disajikan pada Gambar 2, 3 dan 4. Pada Gambar 2 dan 4 terlihat bahwa sampel *An. balabacensis* dari berbagai lokasi yang tersebut pada (Tabel 2) menunjukkan produk PCR dengan panjang ukuran DNA yang relatif sama (900 bp). Pada Gambar 3 terlihat bahwa sampel L1 menunjukkan ukuran panjang DNA (450 bp) yang berbeda dengan L2-L9 (900 bp), dengan demikian menggambarkan secara jelas terdapat perbedaan genetik pada populasi *An. balabacensis* meskipun berasal dari dusun yang sama yaitu Kedondong Atas. Hasil tersebut juga membuktikan adanya spesies kompleks (simpatrik) di daerah Kedondong Atas Kabupaten Lombok Barat. Untuk memastikan hal tersebut dilanjutkan dengan sekuensing sampel untuk mengetahui urutan nukleotidanya, dilakukan alignment sehingga dapat terlihat perbedaan dan jarak genetik *An. balabacensis* meskipun sepintas produk PCR menunjukkan ukuran panjang DNA yang sama. Selanjutnya dilakukan rekonstruksi pohon filogenetik yang menggambarkan kekerabatan genetik *An. balabacensis* (Gambar 5 dan 6).



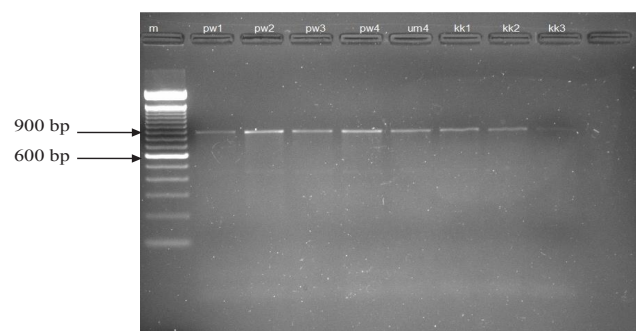
Keterangan: m = marker, K9, K7, K5, K4, K1, K2, K11, K6, dan K10 = sampel dari Kemalang (Klaten), B3, B13, dan B4 = sampel dari Berjoko (Nunukan), S2 = sampel dari Nganggrung, Srumbung (Magelang).

**Gambar 2. Hasil Amplifikasi ITS2 DNA Ribosom Nyamuk *An. balabacensis* dari Kemalang (Klaten), Berjoko (Nunukan) dan Srumbung (Magelang).**



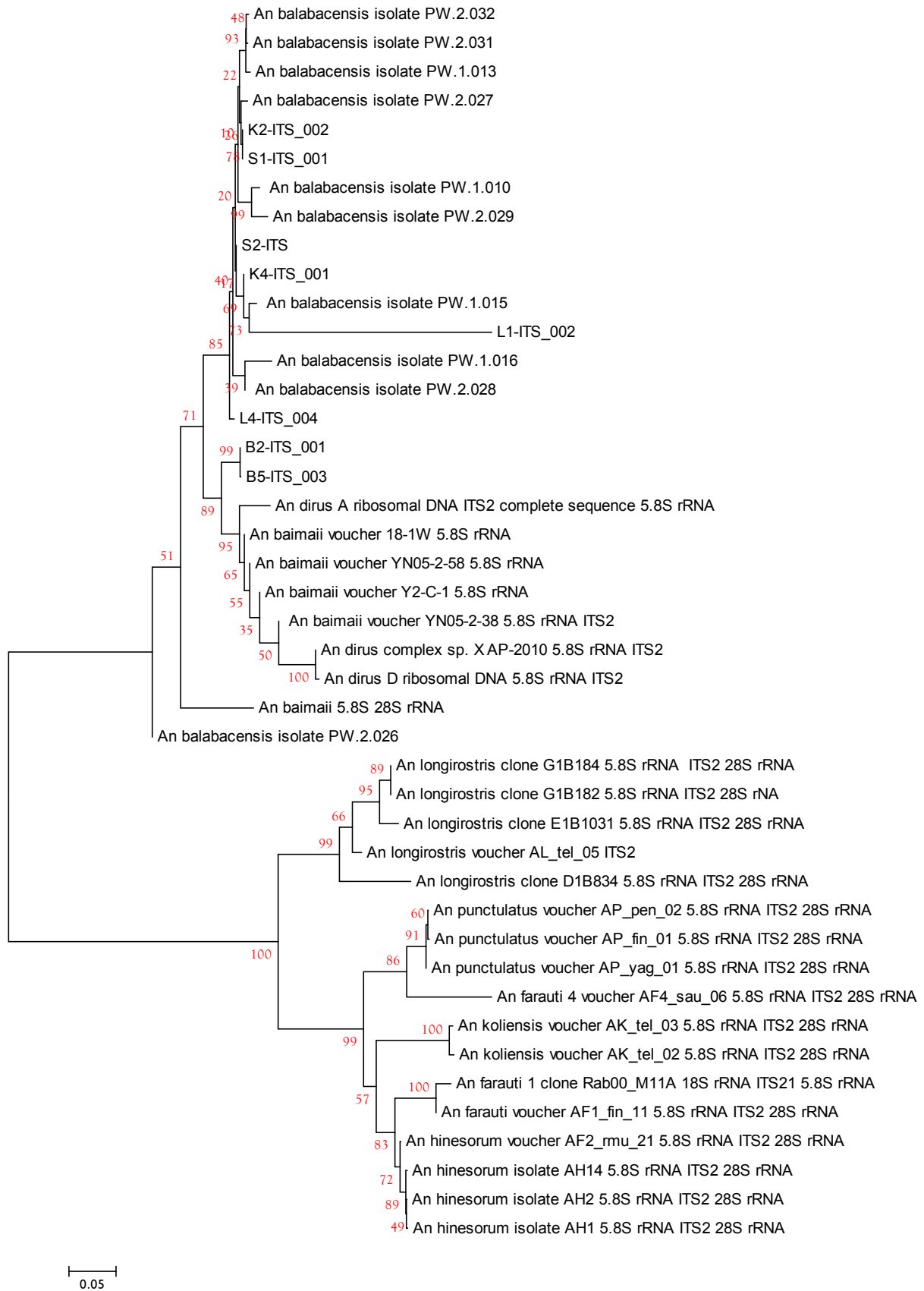
Keterangan: m = marker, L1-9 = sampel dari Kedondong Atas (Lombok Barat)

**Gambar 3. Hasil Amplifikasi ITS2 DNA Ribosom Nyamuk *An. balabacensis* dari Kedondong Atas, Kabupaten Lombok Barat**

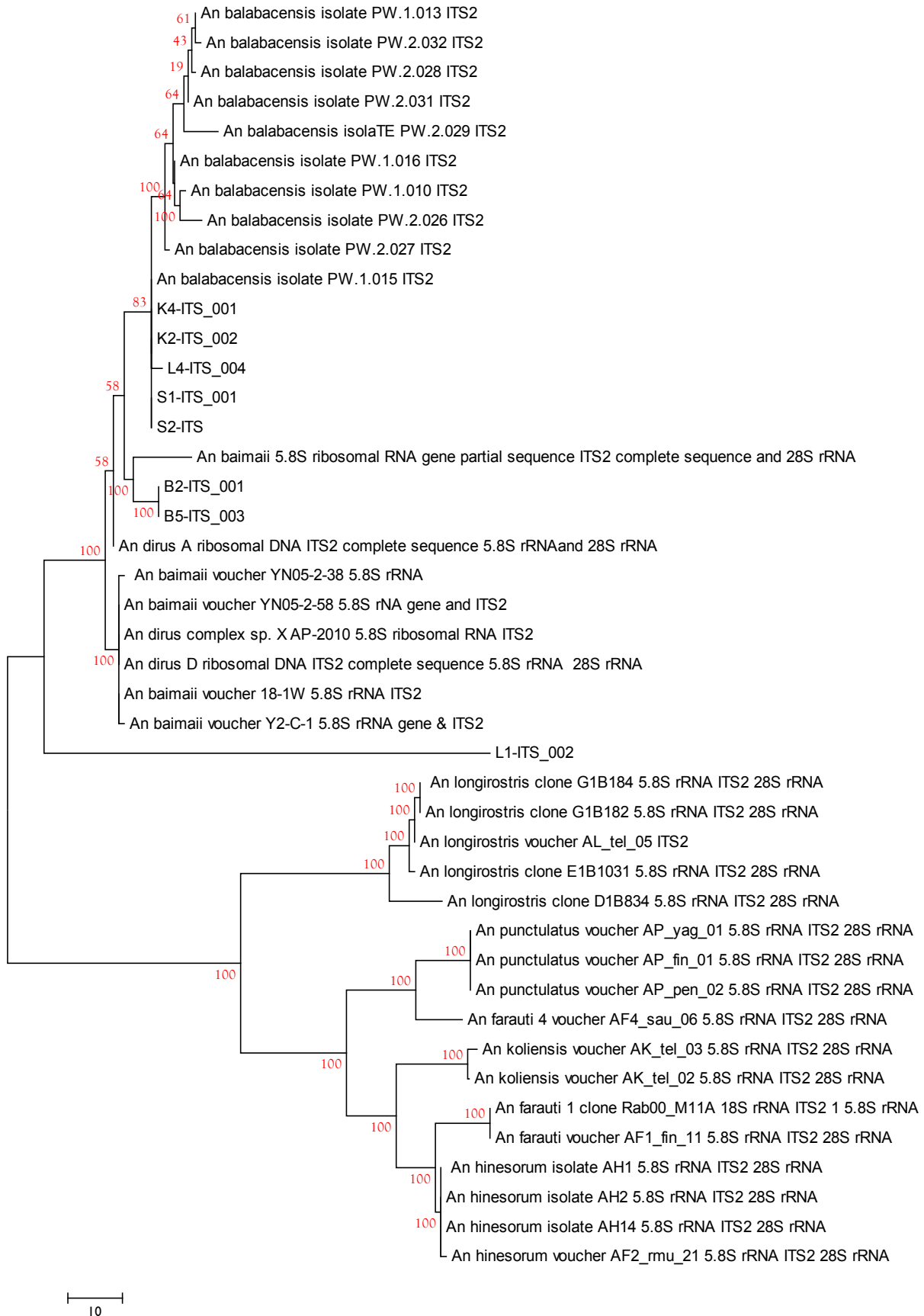


Keterangan: m = marker, pw1-pw4 = sampel dari Kaliagung (Purworejo), um4 = sampel dari Srumbung (Magelang), kk1-kk3 = sampel dari Kalibuko (Kulonprogo)

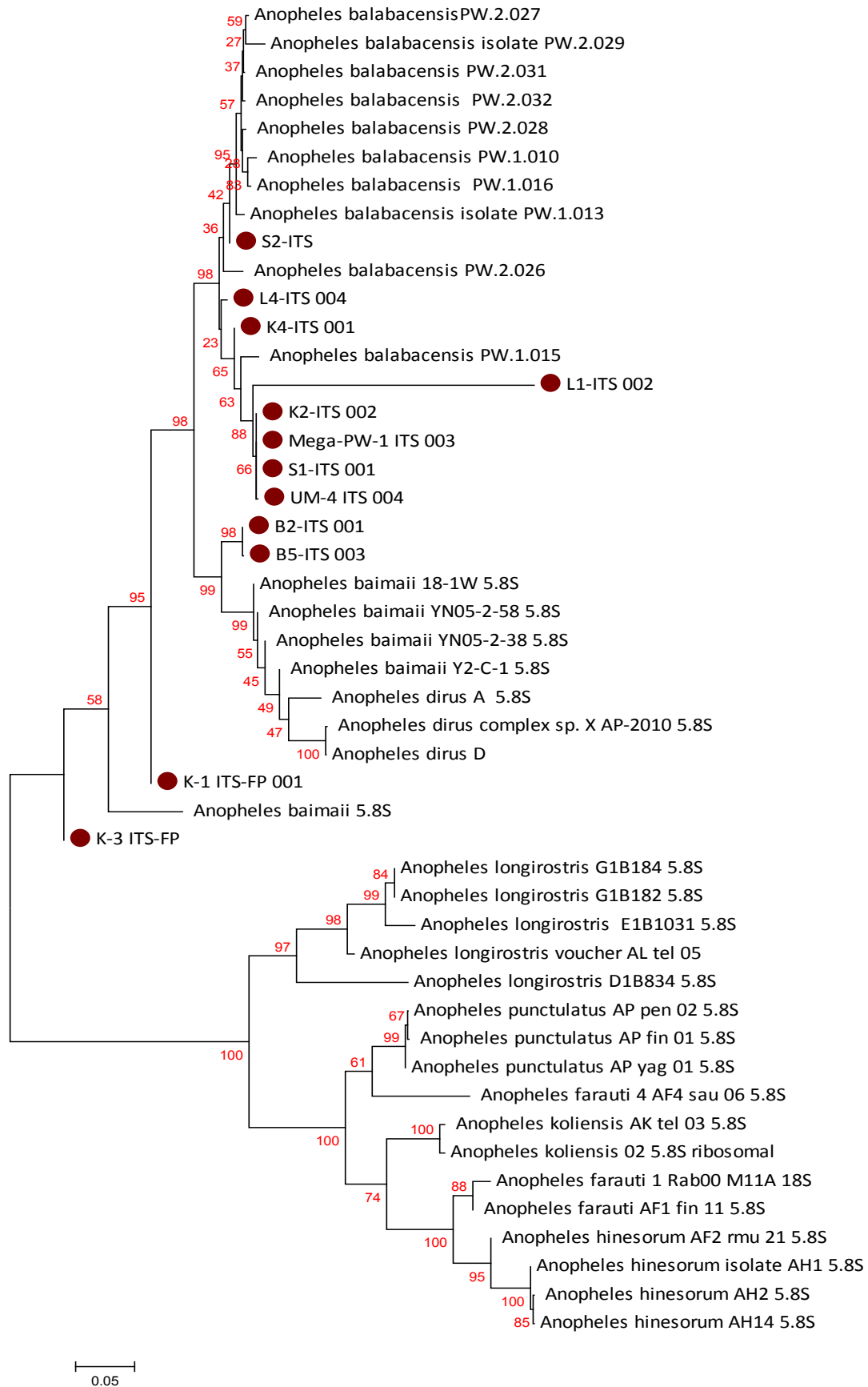
**Gambar 4. Hasil Amplifikasi ITS2 DNA Ribosom Nyamuk *An. balabacensis* dari Kaliagung (Purworejo), Srumbung (Magelang) dan Kalibuko (Kulonprogo).**



**Gambar 5.** Filogenetik *An. balabacensis* dari Berbagai Daerah di Indonesia (Analisis dengan Metode *Neighbor-joining tree with tradisional classification*)

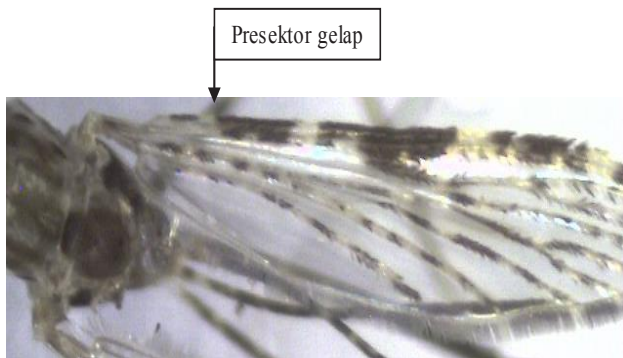


**Gambar 6. Filogenetik *An. balabacensis* dari Berbagai Daerah di Indonesia (Analisis dengan Metode *Maximum parsimony 50%-majority-rule consensus tree with tradisional classification*)**



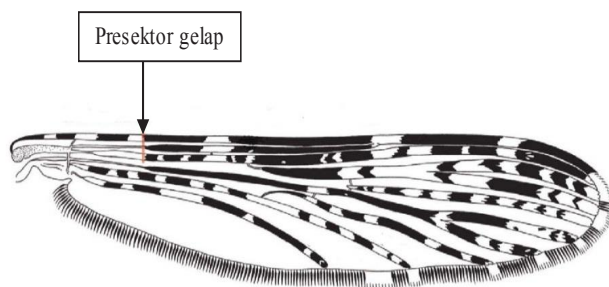
Gambar 7. Filogenetik *An. balabacensis* dari Berbagai Daerah di Indonesia (Analisis dengan Metode Neighbor-joining tree with tradisional classification)



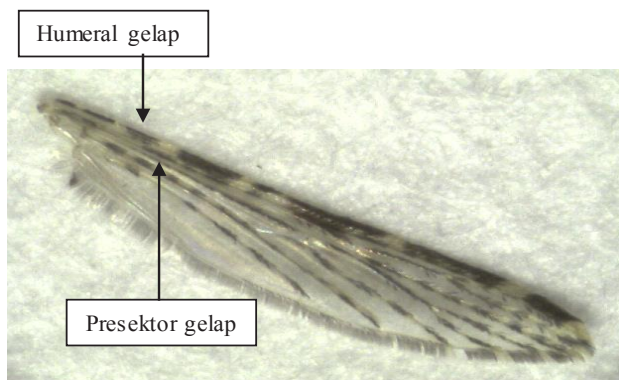


Sayap *An. balabacensis* dari Berjoko, Pulau Sebatik, Nunukan

*An. balabacensis* asal Berjoko, Nunukan secara topologi lebih cenderung menunjukkan kemiripan dengan *An. takasagoensis*<sup>21</sup>, yaitu presektor gelap pada vena 1 sejajar dengan presektor gelap pada costa.



Tipe sayap *An. takasagoensis*



Sayap *An. balabacensis* dari Purworejo

*An. balabacensis* dari Jawa Tengah (Purworejo, Magelang, dan Klaten) dan Kulon Progo (DIY), tanda gelap presektor vena 1 memanjang ke pangkal sampai di tengah-tengah tanda gelap humeral pada costa.

**Gambar 8.** Perbandingan morfologi sayap *An. balabacensis* yang berasal dari Berjoko, Pulau Sebatik, Nunukan dengan *An. balabacensis* asal Purworejo dan *An. takasagoensis* asal Thailand.

## PEMBAHASAN

Hasil pemeriksaan dengan PCR untuk mengamplifikasi gen ITS2 DNA ribosom berhasil dilakukan untuk sampel-sampel dari Kemalang (Klaten) yang merupakan daerah non endemis, Magelang, Purworejo, Kulonprogo, Lombok Barat, dan Nunukan (semuanya daerah endemis malaria). *Anopheles balabacensis* dari berbagai lokasi terdapat perbedaan secara genetik, bahkan dari dusun yang sama yaitu Kedondong Atas (Lombok Barat) menunjukkan perbedaan genetik yang mencolok. Hal tersebut menggambarkan bahwa *An. balabacensis* di Indonesia merupakan spesies kompleks baik simpatrik maupun allopatrik.

Rekonstruksi pohon filogenetik menggambarkan bagaimana kekerabatan genetik *An. balabacensis* yang ada di berbagai daerah di Indonesia. Beberapa hal pokok yang menyebabkan ITS2 DNA ribosom nyamuk *Anopheles* sering digunakan untuk identifikasi spesies antara lain adalah : a). Dapat digunakan untuk identifikasi spesifik spesies, b). Ukuran ITS2 relatif pendek yaitu kurang dari 1 kbp sehingga untuk mengamplifikasi ITS2 dengan primer yang dibuat dari daerah terkonservasi di *flanking coding region* relatif mudah dilakukan, c). Tingkat variasi intraspesifik lebih rendah dari interspesifik, dan d). ITS2 mempunyai laju evolusi lebih cepat dibandingkan dengan *coding region*<sup>13,14,22</sup>.

Berdasar hasil analisis filogenetik dengan menggunakan metode *Neighbor-Joining* (NJ), cukup jelas dibedakan antara kelompok species kompleks *An. balabacensis* dengan kelompok species kompleks *An. dirus* dan *An. baimaii* dengan nilai bootstrap sebesar 71%, dengan perkecualian *An. baimaii* 4.8S 28S rRNA dan *An. balabacensis* isolat PW 2.026 yang merupakan isolat referensi. Hasil analisis menunjukkan bahwa *An. balabacensis* yang dikoleksi dari Kemalang, Klaten (K2 dan K4), Srumbung, Magelang (S1, S2) dan Kedondong Atas, Lombok Barat (L1 dan L4) berada dalam *Clade* yang sama dengan *An. balabacensis* yang berasal dari Purworejo. Meskipun demikian sampel nyamuk L4 yang berasal dari Lombok Barat menunjukkan variasi nukleotida yang cukup besar dibandingkan dengan sampel nyamuk *An. balabacensis* lainnya yaitu K2, K4, S1, S2 dan L1 dengan nilai bootstrap sebesar 85%. Namun demikian, sampel

*An. balabacensis* yang berasal dari Pulau Sebatik (B2, B5) justru masuk dalam *clade An. dirus* dan *An. baimaii* dan tidak masuk dalam *clade An. balabacensis* lainnya. Hal ini cukup menarik, karena secara lebih spesifik, sampel B2 dan B5 tersebut membentuk kelompok sendiri terpisah dari kelompok *An. dirus* dan *An. baimaii* dengan nilai bootstrap sebesar 89%. Perbedaan *clade* antara *An. balabacensis* yang berasal dari Pulau Sebatik, Kalimantan Timur dengan *An. balabacensis* dari Jawa Tengah dan Lombok (NTB) tersebut juga didukung dengan adanya perbedaan morfologi pada sayap, khususnya tanda gelap presektor urat 1. Pada *An. balabacensis* yang berasal dari Pulau Sebatik, tanda gelap presektor 1 sama panjangnya dengan tanda gelap pada costa (didukung gambar sayap). Pada *An. balabacensis* yang berasal dari Jawa Tengah (Purworejo, Magelang, Kulon Progo dan Klaten), tanda gelap presektor vena 1 memanjang ke pangkal sampai di tengah-tengah tanda gelap humeral pada costa. *An. balabacensis* asal Kalimantan Timur (Gambar 8) tersebut secara topologi lebih cenderung menunjukkan kemiripan dengan *An. takasagoensis* yaitu presektor gelap pada vena 1 sejajar dengan presektor gelap pada costa<sup>21</sup>.

Pada analisis filogenetik dengan menggunakan metode *Maximum Parsimony* (MP), *clade An. balabacensis* juga didukung dengan nilai konsensus sebesar 58%, terpisah dengan *clade An. dirus* dan *An. balabacensis* sampel B2 dan B5 (Gambar 7). Meskipun demikian, secara topologi, hasil analisis dengan menggunakan MP ini menunjukkan perbedaan dibandingkan dengan metode NJ sebelumnya. Dengan metode MP, variasi urutan nukleotida dari sampel K4, K2, L4, S1 dan S2 cenderung sama. Sedangkan sampel B2 dan B5, yaitu sampel *An. balabacensis* dari Berjoko, Sebatik Tengah, Kabupaten Nunukan, Kalimantan Timur, kedua sampel tersebut menunjukkan perbedaan variasi nukleotida dengan *An. baimaii* 5.8S ribosomal RNA (NCBI) dengan nilai konsensus 100%. Berdasarkan hubungan kekerabatan dalam *An. leucosphyrus* group, Sampel B2 dan B5 menunjukkan kecenderungan terpisah cukup jauh dibandingkan dengan *An. balabacensis* kompleks lainnya yang berasal dari Jawa Tengah dan Lombok NTB. Penelitian serupa berkaitan dengan *phylogeni Anopheles* yang dilakukan *Johns Hopkins Malaria Research Institute in Macha, Zambia* melaporkan

bahwa pada penelitian tersebut rekonstruksi pohon phylogenetik ITS2 lebih kuat apabila dibandingkan dengan penanda COI (*Cytochrome Oksidasi I*)<sup>23</sup>.

Identifikasi nyamuk secara moleculer sudah sangat berkembang pesat seperti juga di daerah Provinsi Rahad Sudan identifikasi *Anopheles funestus* grup digunakan ITS2. Berdasarkan hasil penelitian menggunakan ITS2, sangat membedakan anggota dari grup *An. funestus* dengan jelas berdasarkan ukuran molekul yang ditunjukkan pada band/pita yang muncul pada proses elektroforesis. Dilaporkan pula bahwa *An. funestus* merupakan spesies simpatrik kompleks yaitu merupakan kelompok spesies yang anggota-anggotanya terdapat pada satu daerah yang sama<sup>24</sup>. Variasi genetik ternyata juga terjadi tidak hanya pada spesies *Anopheles*, namun juga terjadi pada spesies *Aedes albopictus* seperti yang sudah diteliti di Thailand dan *Aedes aegypti* Madavi Gujarat ke Cochin India<sup>25,26,27</sup>. Analisis dengan ITS2 dilaporkan bahwa telah terjadi variasi genetik diantara individu dan populasi *Ae. albopictus* sebesar 74,36 %<sup>25</sup>.

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa *Anopheles balabacensis* di Indonesia merupakan spesies kompleks simpatrik dan allopatrik. Terdapat perbedaan genetik yang cukup jauh diantara populasi *An. balabacensis* dari Desa Pusuk Lestari Kabupaten Lombok Barat yang merupakan simpatrik kompleks.

Berdasarkan hubungan kekerabatan dalam *An. leucosphyrus* group, *An. balabacensis* dari Berjoko, Kabupaten Nunukan menunjukkan kecenderungan terpisah cukup jauh dibandingkan dengan *An. balabacensis* kompleks lainnya yang berasal dari Jawa Tengah dan Lombok, Nusa Tenggara Barat.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kami panjatkan kehadirat Tuhan yang Maha Esa atas selesainya penelitian dan penyusunan artikel ini. Terima kasih yang sebesar-besarnya ditujukan kepada: Kepala B2P2VRP selaku koordinator penelitian tim peneliti, pembantu administrasi dan pembantu peneliti di laboratorium Entomologi dan Biologi Molekuler B2P2VRP

Salatiga yang telah mengarahkan dan membantu pelaksanaan penelitian di lapangan dan laboratorium.

Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Kepala Dinas Kesehatan Kabupaten Klaten, Magelang, Purworejo, Kulonprogo, Nunukan, dan Lombok Barat beserta staf P2 Malaria dan Kepala Puskesmas di lokasi penelitian atas kerjasama dan fasilitas yang diberikan pada pelaksanaan penelitian di lapangan.

## DAFTAR RUJUKAN

1. Kementerian Kesehatan RI. Epidemiologi Malaria di Indonesia. Buletin Jendela Data dan Informasi Kesehatan. RI. Triwulan I; 2011
2. Harijanto, PN. Malaria, epidemiologi, patogenesis, manifestasi klinis dan penanganan. Jakarta:EGC;1999.
3. Dinkes Provinsi Jawa Tengah. Gebrak Malaria. 2003.
4. Coluzzi M, V. Petrarca dan MA. Dideco. Chromosomal inversion intergradation and incipient speciation in *An. gambiae*. *Bull. Zool.* 1985; 52: 45-63
5. Service, MW and H. Townson. *The Anopheles* vector. In Warrel D and HM. Gilles. *Essential Malariology*. London: Hodder Headline Group London; 2004
6. Dharmawan R. *Metoda identifikasi spesies kembar nyamuk Anopheles*. Solo: Sebelas Maret Univ. Press;1993.
7. WHO. *Anopheline species complexes in South and South-east Asia*. SEARO Technical Publication. 2007; (57)
8. Barodji, Boesri H, Boewono DT dan Sumardi. *Bionomik vektor malaria di daerah endemis malaria Kecamatan Kokap Kabupaten. Kulonprogo, DIY*. 2001.
9. Boewono DT dan Ristiyanto. *Studi bioekologi vektor malaria di Kecamatan Srumbung, Kabupaten Magelang. Buletin Penelitian Kesehatan*. 2005; 33(2):
10. Maekawa Y, T. Suhanara, YP. Dachlan, S. Yotoranoto, S. Basuki, H. Uemura, H. Kanbara, dan M. Takagi. First record of *An. balabacensis* from western Sumbawa Island, Indonesia. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.* 2009;25(2):203-205.
11. Tsun HY. A review of literature on *An. balabacensis balabacensis*. WHO/MAL/83.999. WHO/VBC/83.873. 1983;
12. Hii, JLK. Evidence for the Existence of Genetik Variability in the Tendency of *An. balabacensis* to Rest in Houses and to Bite Man. Seameo-Tropmed Technical Meeting: Mosquito Vectors of Malaria in Southeast Asia. Bangkok, Thailand. 1985;
13. Jia-Siang Sum, Wenn-Chyau Lee, Amirah Amir, Kamil A Braima, John Jeffery, Noraishah M Abdul-Aziz, Mun-Yik Fong and Yee-Ling Lau. Phylogenetic study of six species of *Anopheles* mosquitoes in Peninsular Malaysia based on inter-transcribed spacer region 2 (ITS2) of ribosomal DNA. *Parasites & Vectors*. 2014;7(309):1-8.
14. Marsden C, D., Lee, Y., Kreppel, K. Weakley, A., Cornel A., Ferguson, H.M., Eskin, E., et.al. G.C. Diversity, differentiation and linkage disequilibrium: prospects for association mapping in the malaria vector, *Anopheles arabiensis*. Genetics Society of America; 2013
15. WHO. *Malaria entomology and vector control. Leaner's guide*. WHO HIV/AIDS, Tuberculosis and Malaria, Rollback Malaria. Trial Ed. WHO/CDS/CPE/SMT/2002. 2003; 18 Rev.1. Part 1.
16. O'Connor, CT and A. Soepanto. *Kunci bergambar untuk Anopheles betina di Indonesia*. Dit. Jen P3M, Depkes RI, 1979. Jakarta: Dit. Jen P3M, Depkes RI;1979.
17. Dhananjeyan, KJ., R. Paramasivan, SC. Tewari, R. Rajendran, V. Tenmozhi, SVJ. Leo, A. Venkatesh, and BK.Tyagi. Molecular identification of mosquito vectors using genomic DNA isolated from eggshells, larval and pupal exuvium. *Trop. Biomed*. 2010;27(1): 47-53.
18. Roche (www.roche-applied-science.com). High pure PCR template preparation kit. Version 20. Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, 68298 Mannheim, Germany. 2012: 26 p.
19. Sharma M & S. Chaudhry. Molecular cytogenetics of some *Anopheles mosquitoes* (Culicidae: Diptera). *E. Journal of Biol.* 2010; 6(1):13-18
20. Tamura K, D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, & S. Kumar. 2011. *Mega 5.05*.
21. Takano, KT., NTH. Nguyen, BTH. Nguyen, T. Sunahara, M. Yasunami, MD. Nguyen, and M. Takagi. Partial mitochondrial DNA sequences suggest the existence of a cryptic species within the Leucosphyrus group of the genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae), forest malaria vectors, in northern Vietnam. *Parasite & Vectors*. 2010;3(41): 1-16
22. Paul, S., A. Chattopadhyay and P. K. Banerjee.

- Anopheline diversity: morphological and molecular variation of *an. subpictus* in rural and urban areas of west Bengal. *Journal of Entomology and Zoology Studies*. 2013;1(2):35-40.
23. Laura C.N and E.N.Douglas. Phylogeny of *Anopheline* (Diptera : Culicidae) species in Southern Africa, based on nuclear and mitochondrial genes. 2015. *Journal of Vector Ecology*.2015; 40(1):16-27
24. Abdelrafie M.M; A.A. Mariam; M.E. Fathi; O.F. Omran; A.E. Dia-Edin. Identification of *anopheles* species of the *funestus* group and their role in malaria transmission in Sudan. *Journal of Applied and Industrial Sciences*. 2015;3(2):58-62.
25. Manni M; M.G. Ludvik; A.Nidchaya ; T.Gabriella; S.Francesca; P.Somboon; R.G. Carmela; R.M. Anna and G. Gasperi. Molecular markers for analyses of intraspecific genetic diversity in the Asian Tiger Mosquito, *Aedes albopictus*. *Parasites & Vectors*. 2015; 8:188.
26. Mourya DT; R.Kumar; PV. Barde ; MD. Gokhale; and PD. Yadav. Genetic variation in *aedes aegypti* mosquito population along the west cost of India and their susceptibility to insecticides and dengue virus. 2015. *Medical Science Volume : 5 Issue 1*.p 378-383.
27. Walter J. Tabachnick. Nature, nurture and evolution of intra-species variation in mosquito arbovirus transmission competence. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2013, 10, 249-277