ISBN: 978-602-52965-8
Makassar, 8 Agustus 2020

Variasi Genetik (Polimorfisme) *Anopheles barbirostris* Dengan Menggunakan Metode PCR-RAPD

Genetic Variation (Polymorphisms) Of Anopheles barbirostris by RAPD-PCR

Hasrida Mustafa[1)], Anis nur widayati[2)], Gunawan[3)], Indra rachmawaty[4)]

[1)] Balai Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Donggala
[2)] Balai Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Donggala
[3)] Balai Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Donggala
[4)] Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi, Jakarta

Email korespondensi: *mhasrida@gmail.com*

ABSTRAK

Malaria masih menjadi masalah kesehatan masyarakat di Indonesia. Beberapa jenis nyamuk Anopheles telah terkonfirmasi sebagai vektor malaria dan dapat ditemukan di berbagai ekosistem baik di pedalaman maupun pegunungan. Tingkat polimorfisme yang tinggi memiliki kecenderungan untuk bertahan hidup di alam lebih baik, sehingga berpeluang untuk dapat berkembangbiak dan menularkan penyakit. Tujuan penelitian ini adalah untuk menilai variasi genetik (polimorfisme) *Anopheles barbirostris* pada ekosistem pedalaman dan pegunungan di Kabupaten Sigi, Propinsi Sulawesi Tengah. Metode pemeriksaan DNA yang digunakan adalah *Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction* (RAPD PCR), yaitu dengan melihat pola pita polimorfik dan pita monomorfik. Analisis data dilakukan secara deskriptif dan diolah menggunakan program NTSys-PC. Hasil studi menunjukkan adanya polimorfisme nyamuk *An.barbirostris*. Polimorfisme spesies nyamuk ini pada ekosistem pedalaman sebesar 57 % dan monomorfisme sebesar 43 %. Pada ekosistem pegunungan terdapat polimorfisme *An.barbirostris* sebesar 53 % dan monomorfisme sebesar 47 %. secara umum individu *An. barbirostris* di ekosistem pedalaman dan di ekosistem pegunungan cenderung memiliki kesamaan genetik.

Kata kunci :*Anopheles barbirostris*, polimorfisme, ekosistem pegunungan, ekosistem pedalaman

ABSTRACT

Malaria is still a public health problem in Indonesia. Several Anopheles mosquitoes have been identified as malaria vector in in various both of inland and mountain ecosystems. The aim of this study was to analyze the genetic variation (polymorphism) among *Anopheles barbirostris* in inland and mountain ecosystems in Sigi regency. The level of genetic polymorphism was obtained by Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR) method. Analysis was conducted by comparing the DNA bands patterns to identify polymorphic and

monomorphic among this species. The results showed that 57% of *An. barbirostris* from inland ecosystems were polymorphism and others of 43% were monomorphism. In the mountain ecosystems, about 53% of *An. barbirostris* were polymorphisms and 47% were monomorphism. in general An. barbirostris in inland ecosystems and in mountainous ecosystems tend to have genetic similarities.

Keywords : *Anopheles barbirostris*, polymorphism, inland ecosystem, mountain ecosystem

PENDAHULUAN

Penyakit malaria masih menjadi masalah kesehatan di dunia, Indonesia masih menjadi salah satu dari 91 negara di dunia yang masih melaporkan adanya kasus malaria. Di Indonesia penyakit malaria masih tersebar di berbagai wilayah dengan derajat dan berat infeksi yang bervariasi. Upaya pengendaliannya sudah menjadi komitmen global (World Health Organization, 2017). Penyebaran malaria dipengaruhi oleh beberapa fakor utama yaitu faktor manusia, vektor, parasit, sistem pelayanan kesehatan dan lingkungan yang berinteraksi dalam satu relung ekologi (A.Arsunan, 2012).

Ekosistem dan ketinggian yang berbeda memungkinkan nyamuk *Anopheles spp* terpisah dalam suatu relung ekologi. Hal tersebut berpengaruh juga pada jumlah nyamuk yang didapatkan pada setiap penangkapan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan pada jumlah nyamuk yang di dapatkan per spesiesnya antara dataran rendah dan dataran tinggi (Widawati, Nurjana, & Mayasari, 2018). Adanya lingkungan yang berbeda dapat berpengaruh terhadap variasi susunan genetiknya dalam waktu yang lama dan membentuk spesies yang berbeda dengan induknya walaupun secara morfologis terlihat sama. Ditinjau dari aspek pengendalian vektor, tingkat variasi genetik nyamuk mempengaruhi kemampuannya untuk menularkan penyakit (ketahanan hidupnya di alam) dan responnya terhadap insektisida yang digunakan dalam pengendalian. Keanekaragaman nyamuk Anopheles spp. bersifat lokal spesifik (Magdalena & Ni'mah, 2016). Hal yang mempengaruhi keanekaragaman adalah pengaruh lingkungan (eksternal) dan pengaruh genetik (internal), Secara umum keanekaragaman genetik dari suatu populasi dapat terjadi karena adanya mutasi, rekombinasi, atau migrasi gen dari satu tempat ke tempat lain (Themudo et al., 2020).

Penelitian keanekaragaman spesies *Anopheles* spp. secara morfologi pada ekosistem pedalaman dan ekosistem pegunungan di Kabupaten Sigi (Provinsi Sulawesi Tengah) telah dilakukan. Terdapat beberapa spesies didaerah tersebut, yaitu *Anopheles barbirostris, Anopheles indefinitus, Anopheles vagus, Anopheles nigerrimus* dan *Anopheles tesselatus*. Dari kelima nyamuk tersebut, spesies yang sudah terkonfirmasi sebagai vektor adalah *An. barbirostris* (Udin et al., 2016). Oleh karena itu, spesies *An. barbirostris* diambil sebagai sampel untuk selanjutnya diuji untuk melihat variasi genetiknya (polimorfisme). Tingkat polimorfisme yang tinggi memiliki kecenderungan untuk bertahan hidup di alam lebih baik, sehingga peluangnya lebih besar untuk dapat berkembangbiak dan menularkan penyakit. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menilai variasi genetik (polimorfisme) nyamuk *An. barbirostris* pada ekosistem pedalaman dan ekosistem pegunungan.

ISBN: 978-602-52965-8
Makassar, 8 Agustus 2020

METODE

Jenis penelitian ini adalah penelitian kuantitatif dengan pendekatan observasional deskriptif.

Waktu dan Tempat

Penelitian laboratorium dilaksanakan di dua tempat yaitu di Laboratorium Biologi Molekuler Balai Litbang Kesehatan Donggala dan Laboratorium Teknologi Gen, BPPT, Serpong, Tangerang. Penelitian dilaksanakan pada bulan Juli- November 2014.

Bahan

Sampel nyamuk yang digunakan adalah *An. barbirostris* yang dikumpulkan dari umpan orang di wilayah di dua lokasi yang berbeda. Lokasi yang pertama di Desa Kalukutinggu yang mewakili ekosistem pedalaman dengan topografi dataran rendah (±100 meter dpl) dan lokasi kedua di wilayah di Desa Rejeki Kecamatan Palolo yang mewakili ekosistem pegunungan (>500 meter dpl). *An. barbirostris* dipilih karena merupakan nyamuk yang sudah terkonfirmasi sebagai vektor malaria di Sulawesi Tengah. Pada saat penangkapan berlangsung, sampel nyamuk yang teridentifikasi sebagai *An. barbirostris* kemudian dimasukkan ke dalam *tube* berukuran 1,5 ml yang telah dilapisi *silica gel* dan kapas. Sampel nyamuk kemudian dibawa dengan kondisi ruang (tanpa rantai dingin) ke Balai Litbang Kesehatan Donggala).

Cara Kerja

Tahap ekstraksi DNA

Proses ektraksi DNA dilakukan menggunakan prosedur kerja *PureLink^{TM}Genomic DNA mini Kits* (invitrogen, 2007)(Mustafa, Rachmawati, & Udin, 2016)

Tahap amplifikasi

Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan produk dari *Ready-To-Go RAPD Analysis Kit GE Healthcare Limited, Amersham Place Little Chalfont, Buckinghamshire, UK*. Langkah pertama yaitu menghitung kebutuhan bahan kimia yang digunakan sesuai dengan jumlah sampel. Selanjutnya disiapkan mikrotube yang telah berisi Ready To Go RAPD *analysis Bead* (*buffer, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, BSA, ampliTaq^{TM} dan stoffel fragmen*). Kedalam bead kemudian ditambahkan RAPD komponen dengan komposisi 5 µl RAPD primer, 2 µl DNA template, 18 µl ddH2O. Sehingga total volume standar untuk satu reaksi adalah 25 µl. Selanjutnya dilakukan proses PCR sebanyak 45 siklus dengan denaturasi awal 95 ^{0}C selama 5 menit, denaturasi 95^0 C selama 1 menit, annealing pada suhu 36^0 C selama 1 menit, extension pada suhu 72^0 C selama 2 menit. Amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan TaKaRa PCR *thermal cycle*.

Elekroforesis

Hasil amplifikasi DNA dapat dilihat pada elektroforesis dengan konsentrasi larutan agarose 2%. Sampel DNA hasil PCR diambil sebanyak 10 µl dan ditambahkan *loading dye* 2 µl.Pengamatan pita DNA dilakukan dibawah gel doc dengan sinar UV.

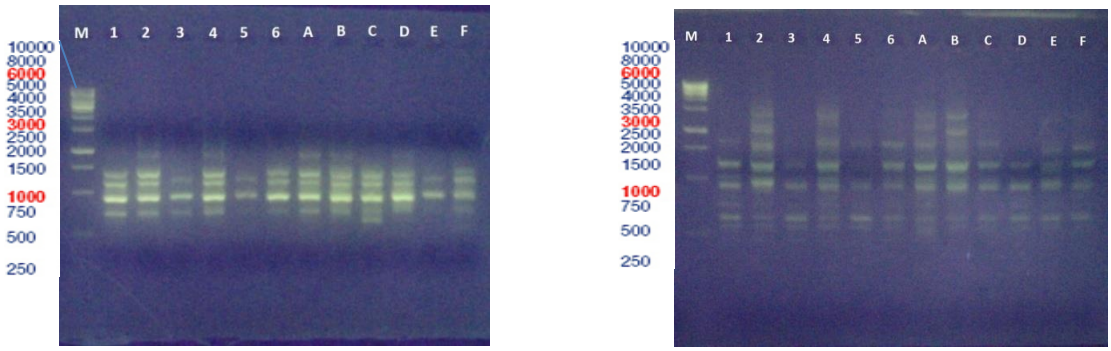
ISBN: 978-602-52965-8
Makassar, 8 Agustus 2020

Analisis hasil

Data dianalisa secara deskriptif dengan melihat pita DNA yang terbentuk dari proses elektroforesis dan dilakukan *scoring* pada pita tersebut. Ada-tidaknya pita dalam masing-masing parameter dikategorikan sebagai data binomial (Data 1-0). Pita DNA yang ada diberi nilai 1 dan yang tidak ada diberi nilai 0. Pita-pita DNA yang selalu hadir pada semua sampel nyamuk *An.barbirostris* yang dibandingkan disebut pita DNA yang monomorfisme sedangkan pita DNA yang hanya hadir pada beberapa sampel yang dibandingkan disebut pita yang polimorfisme (pita yang tidak dimiliki oleh individu yang lain pada ukuran pita DNA yang sama). Selanjutnya data dianalisis dengan program NTSys-PC (Rohlf, F.J.,1998)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada pemeriksaan RAPD-PCR ini awalnya menggunakan 6 jenis primer (primer 1, primer 2, primer 3, primer 4, primer 5, primer 6). Masing-masing primer digunakan untuk mengamplifikasi DNA sampel *An. barbirostris*. Namun hanya primer 4 dan 6 yang menunjukkan teramplifikasi secara merata di semua sampel. Hasil analisis primer 4 dan 6 menghasilkan produk amplifikasi seperti pada Gambar 1 dibawah ini :



(a) (b)

Gambar1 : Pola fragmen DNA nyamuk *Anopheles barbirostris* yang diamplifikasi menggunakan primer 4 (a), primer 6 (b) M : marker; 1-6: sampel nyamuk dari ekosistem pedalaman (Kalukutinggu); A-F: sampel nyamuk dari ekosistem pegunungan (Palolo).

Hasil amplifikasi PCR RAPD menunjukkan primer yang digunakan dapat teramplifikasi dengan baik pada segmen-segmen nukleotida genom nyamuk *An.barbirostris.* Variasi genetik secara molekuler dapat dideteksi antara lain menggunakan teknik PCR. Teknik ini dapat menggunakan beberapa metode antara lain RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*), RFLP (*Restriction Fragment Lenght Polymorphism*) dan *Microsatelite*. Pada metode RAPD-PCR digunakan primer tunggal berantai pendek. Penggunaan primer tersebut untuk dapat melipatgandakan (amplifikasi) fragmen DNA genom secara acak pada segmen yang komplementer tanpa harus mengetahui terlebih dahulu urutan nukleotida DNA genom nyamuk yang akan diperiksa serta dapat menghasilkan pita polimorfisme dalam jumlah banyak (Simbolon, Bangun, & Putri, 2017). Gambaran polimorfisme dan monomorfisme dari kedua ekosistem baik pegunungan dan pedalaman yang hasilnya dapat dilihat pada tabel 1 dibawah ini.

ISBN: 978-602-52965-8
Makassar, 8 Agustus 2020

Tabel 1. Perbandingan persentase pita monomorfisme dan polimorfisme nyamuk *An.barbirostris* menggunakan primer 4 dan primer 6

Lokasi (ekosistem)	**Primer**	**Ukuran pita (bp)**	**Monomorfisme**	**Jumlah total monomorfisme (%)**	**Polimorfisme**	**Jumlah total polimorfisme (%)**	**Total pita**
Pedalaman	Primer 4	650-2000	3	6 (43%)	2	8 (57%)	14
	Primer 6	650-3500	3		6		
Pegunungan	Primer 4	650-2000	3	7 (47%)	3	8 (53%)	15
	Primer 6	650-3500	4		5		

Jumlah pita (fragmen) DNA yang teramplifikasi berbeda-beda untuk tiap primer, disebabkan karena urutan nukleotida dari masing-masing primer juga berbeda-beda sehingga mempengaruhi perbedaan perlekatan primer pada segmen-segmen di sepanjang genom nyamuk. Penghitungan pita DNA monomorfisme dan polimorfisme dilakukan dengan membandingkan pita-pita DNA yang selalu hadir untuk semua sampel antar kedua daerah penelitian dan membandingkan pita-pita yang hadir pada masing-masing daerah dan di hitung presentasenya. Penghitungan ini dilakukan untuk masing-masing primer. Adanya persamaan dan perbedaan pola pita DNA yang diamplifikasi oleh primer memungkinkan untuk menghitung persentase pola pita DNA yang bersifat polimorfisme dan monomorfisme. Semakin banyak daerah genom yang diamplifikasi oleh primer semakin tinggi pula tingkat polimorfismenya (Munif, A., Sudomo, M., Soelaksono, S, Maelita, R., Agus D, 2011).

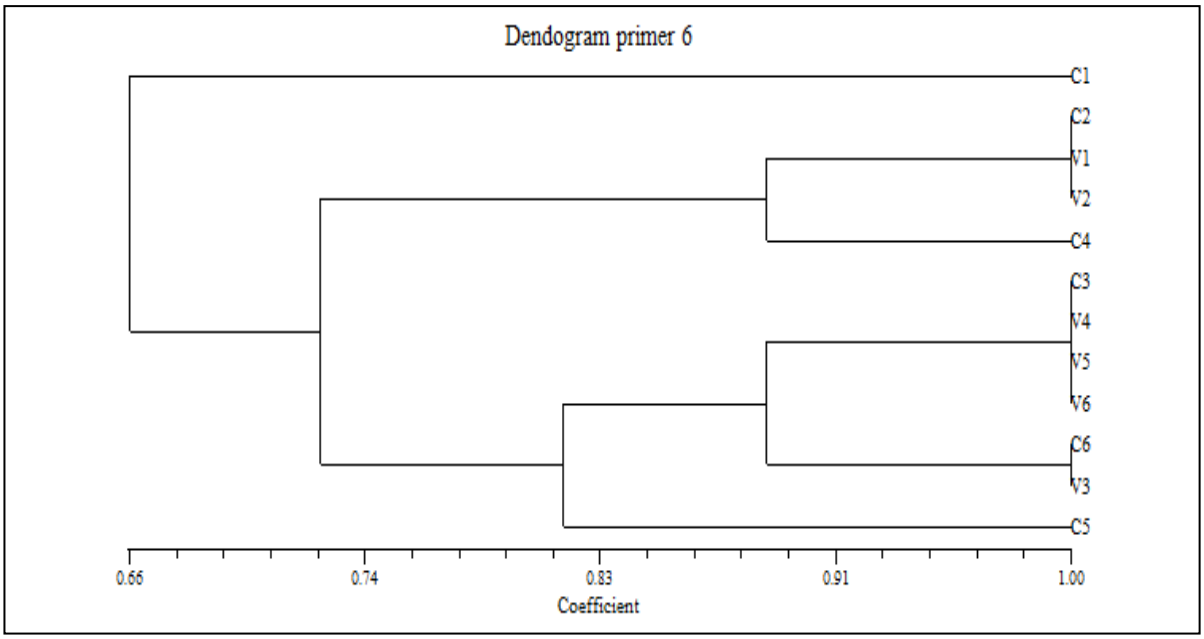
Berdasarkan hasil penelitian ini diketahui di ekosistem pedalaman maupun di ekosistem pegunungan terdapat perbedaan variasi genetik dengan nilai polimorfisme yang tidak jauh berbeda yaitu 57 % di ekosistem pedalaman dan 53 % di ekosistem pegunungan. Perbedaan kondisi geografis dapat menyebabkan variasi terhadap satu atau beberapa urutan pita DNA antara nyamuk dalam satu spesies. Isolasi geografis menyebabkan perbedaan DNA itu sendiri bagi spesies yang sama. Namun adanya perbedaan yang tidak terlalu jauh mengindikasikan perbedaan tersebut tidak menimbulkan isolasi reproduksi sehingga aliran genetik akibat perkawinanan antara populasi di ekosistem yang berbeda masih dapat terjadi (Mas'ud, Abdullah, & Roini, 2018).

Jika dibandingkan nilai polimorfisme dan nilai monomorfisme, terlihat nilai polimorfisme baik di ekosistem pedalaman maupun ekosistem pegunungan lebih besar daripada monomorfismenya. Hal ini menandakan polimorfisme nyamuk yang hidup di alam cenderung lebih tinggi. Pada populasi *in breeding* seperti halnya pada koloni laboratorium biasanya memiliki kecenderungan dengan variasi genetik yang lebih rendah (monomorfisme). Menurut Passarge dalam Utari, populasi dengan keanekaragaman genetik (polimorfisme) yang lebih banyak akan memiliki adaptasi yang lebih baik jika dibandingkan dengan populasi yang individunya relatif homogen (monomorfisme) secara genetik (Utari, 2001). Hasil penelitian Munif pada *Aedes aegypti* di Palembang, diketahui bahwa di daerah Endemis, tingkat polimorfisme cenderung lebih tinggi 63,5-80% sedangkan di daerah non endemis tingkat polimorfisme cenderung lebih rendah hanya 25% sebaliknya monomorfisme cenderung lebih tinggi 75%. (Munif, A., Sudomo, M., Soelaksono, S, Maelita, R., Agus D, 2011). Pada penelitian lain diperoleh kesamaan genetik yang rendah (<10%) ditunjukkan *Cx. vishnui* dari Kota Pekalongan dan Kabupaten Pekalongan, bahkan tidak ada persamaan genetik pada *Cx. tritaeniorhynchus* dari Pekalongan dengan Semarang sehingga disimpulkan bahwa polimorfisme *Cx.*

ISBN: 978-602-52965-8
Makassar, 8 Agustus 2020

tritaeniorhynchus dan *Cx. vishnui* mencapai 100% (Roro et al., 2019). Polimorfisme dapat digunakan untuk mengetahui *fitness* individu dalam jangka pendek dan sintasan suatu populasi dalam jangka waktu panjang. Hal ini berarti tingkat polimorfisme genetik yang tinggi akan hidup yang pada akhirnya tingkat populasinya juga tinggi di alam. Kondisi tersebut memberi peluang nyamuk kontak dengan manusia dan kesempatan untuk menularkan menyebabkan nyamuk tahan terhadap perubahan lingkungan sehingga dapat tetap sukses atau menyuntikan sporozoit ke dalam darah manusia (Munif, A., Sudomo, M., Soelaksono, S, Maelita, R., Agus D, 2011).

Untuk memperoleh dendogramnya, Data pita monomorfik dan polimorfik kemudian diolah menggunakan NTSYSpc 2.0 (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysys Systems*), Data Binomial (Data 1-0) seperti yang terlihat pada gambar 1 dibawah ini.



Gambar 1 : Dendogram pengelompokan berdasarkan kesamaan genetik
Keterangan **:**C1-C6: sampel nyamuk dari daerah pedalaman (Kalukutinggu); V1-V6: sampel nyamuk dari ekosistem pegunungan (Palolo)

Data Polimorfisme dan monomorfisme diatas selanjutnya dibuat pohon filogeni/dendogram antara nyamuk *An. barbirostris* di ekosistem pedalaman dan di ekosistem pegunungan berdasarkan koefisien persamaan genetik. Koefisien persamaan genetik dihitung berdasarkan metode UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average*) menggunakan program NTSYS-pc. Hasil analisis koefisien persamaan genetik menunjukkan ada satu *An. barbirostris* yang terpisah dari kelompok lainnya. Meskipun demikian secara umum individu *An. barbirostris* di ekosistem pedalaman dan di ekosistem pegunungan mengelompok secara berdekatan atau cenderung memiliki kesamaan dengan hasil koefisien persamaan genetik tertinggi 89 (koefisien 0,89) dan terendah 66 persen (koefisien 0,66) sehingga persentase jarak genetik (perbedaannya) sekitar 11 persen dan 34 persen. Hal ini mengindikasikan adanya latar belakang genetik yang cukup dekat antara *An. barbirostris* di ekosistem pedalaman dan ekosistem pegunungan di Kabupaten Sigi. Hasil ini hampir sama dengan penelitian di

India yang menunjukkan ada kemiripan genetik *Aedes aegypti* di Faisalabad dan Lahore (Ashraf, Zahoor, Nasir, Naz, & Zahoor, 2016). Hasil ini berbeda dengan hasil penelitian Utari, (2001) pada *Anopheles subpictus* di daerah Sawangan (dataran tinggi) memisah jauh dengan populasi nyamuk *Anopheles subpictus* di tempat yang lainnya (daerah pantai) dengan persentase jarak genetik (perbedaan) lebih dari 50 persen, sehingga terindikasi di Sawangan telah terbentuk populasi *Anopheles subpictus* tersendiri yang berbeda.

KESIMPULAN

Secara umum individu *Anopheles barbirostris* di ekosistem pedalaman dan di ekosistem pegunungan cenderung memiliki kesamaan genetik.

DAFTAR PUSTAKA

A.Arsunan. (2012). *Malaria di Indonesia (Tinjauan Aspek Epidemiologi*. Masagena Press, Makassar.

Ashraf, H. M., Zahoor, M. K., Nasir, S., Naz, H., & Zahoor, S. (2016). Original Article Genetic Analysis of Aedes aegypti Using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers from Dengue Outbreaks in Pakistan. *Athropod-Borne Disease*, *10*(December), 546–559.

invitrogen. (2007). User Manual : PureLink Genomic DNA Mini Kits for purification of Genomic DNA, invitrogen (pp. 8–9).

Magdalena, V., & Ni'mah, T. (2016). Ekologi Nyamuk Anopheles spp. di Kecamatan Lengkiti, Ogan Komering Ulu, Sumatera Selatan Tahun 2004-2015. *Spirakel*, *8*(2), 27–36.

Mas'ud, A., Abdullah, A., & Roini, C. (2018). Variabilitas Genetik Ornithoptera croesus lydius Kupu-Kupu Endemik Pulau Variabilitas Genetik Kupu-Kupu Endemik Pulau Halmahera Ornithoptera croesus lydius Berbasis Data Molekuler PCR-RAPD. *Biogenesis*, *6*(Juni), 52–58. https://doi.org/10.24252/bio.v6i1.4173

Munif, A., Sudomo, M., Soelaksono, S, Maelita, R., Agus D, P. (2011). Karakteristik Kemiripan Genetik Nyamuk Aedes aegypti Di Daerah Endemis Demam Berdarah Dengue Di Kota palembang, Provinsi Sumatera Selatan. *Ekologi Kesehatan*, *10 No 2*, 93–102.

Mustafa, H., Rachmawati, I., & Udin, Y. (2016). Pengukuran Konsentrasi dan Kemurnian DNA Genom Nyamuk Anopheles barbirostris. *Jurnal Vektor Penyakit*, *10*(1), 7–10.

Rohlf, F. . (1998). *NTSYS pc : Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.0 User Guide*. Applied Biostatistics Inc.

Roro, R., Ngesti, U., Astuti, W., Nurcahyo, R. W., Soesilohadi, R. C. H., Hadisusanto, S., & Mulyaningsih, B. (2019). Phylogenetic Analysis of Culex tritaeniorhynchus and Culex vishnui Vector of Japanese Encephalitis Virus Analisis Filogenetik Culex tritaeniorhynchus dan Culex vishnui Vektor Virus Japanese Encephalitis, *7*(September 2018), 189–196.

Simbolon, A. C., Bangun, M. K., & Putri, L. A. P. (2017). Analisis Keragaman Genetik Klon Kelapa Sawit (Elaeis guineensis Jacq.) Berdasarkan 4 Marka RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA). *Agroekoteknologi FP USU*, *5*(3), 564–592.

Themudo, G. E., Iglesia, A. R., Tascón, L. R., Jensen, A. B., Fonseca, R. R., & Campos, P. F. (2020). Declining genetic diversity of European honeybees along the twentieth century. *Scientific Reports*, 1–12. https://doi.org/10.1038/s41598-020-67370-2

Udin, Y., Maksud, M., Risti, Srikandi, Y., Kurniawan, A., & Mustafa, H. (2016). Keragaman Anopheles spp Pada Ekosistem Pedalaman dan Pegunungan di Kabupaten Sigi , Sulawesi Tengah. *Vektora*, *Vol 8 No 2*, 61–70.

Utari, C. S. (2001). *Analisis Variasi Genetik Anopheles subpictus (Diptera : Culicidae) Di Sekitar Yogyakarta Dengan RAPD-PCR*. Universitas Gajah Mada, Tesis.

Widawati, M., Nurjana, made agus, & Mayasari, R. (2018). Perbedaan Dataran Tinggi dan Dataran Rendah terhadap Keberagaman Spesies Anopheles spp . di Provinsi Nusa Tenggara Timur. *Aspirator*, *10*(September), 103–110.

World Health Organization. (2017). *World malaria report 2017*. Geneva. Retrieved from https://www.who.int/docs/default-source/documents/world-malaria-report-2017.pdf?sfvrsn=8b7b573a_0