

Kajian Keberagaman Genetik Nyamuk *Anopheles barbirostris* dan *A. vagus* di Dua Daerah Endemik Penyakit Malaria di Jawa Barat

R. Ameria Sumantri & Djoko T. Iskandar

Program Studi Biologi, FMIPA Institut Teknologi Bandung
10, Jalan Ganesa, Bandung 40132 Indonesia; Email: iskandar@bi.itb.ac.id

Diterima November 2004; disetujui untuk dipublikasi Juni 2005

Abstrak

Keberagaman genetik dari dua jenis nyamuk *Anopheles* yang terdapat di dua daerah endemik malaria, yaitu Tasikmalaya dan Pelabuhan Ratu diteliti dengan menggunakan teknik analisis isozim melalui media elektroforesis selulosa asetat. Sebanyak 15 macam sistem enzim dianalisis pada 46 ekor nyamuk *Anopheles vagus* dan 44 ekor *A. barbirostris* yang mewakili kedua populasi tersebut. Jumlah gen yang polimorf pada *A. vagus* lebih rendah (Polimorfisme genetik = $P=0,20-0,27$) dibandingkan dengan *A. barbirostris* ($P=0,40-0,47$) dengan tingkat heterozigositas *A. vagus* (Heterozigositas = $H=0,027-0,031$) lebih rendah dibandingkan dengan *A. barbirostris* ($H=0,083-0,100$). Adanya alel diagnostik yang membedakan antar populasi dalam penelitian ini mempunyai frekuensi yang relatif rendah. Meskipun hal ini menunjukkan bahwa kedua populasi intra jenis tersebut tidak berhubungan, tetapi alel tersebut sukar digunakan dalam praktek untuk menanggulangi masalah yang berkaitan dengan genetika populasi. Gen Pgm mempunyai sejumlah alel diagnostik dengan frekuensi cukup tinggi, tetapi frekuensinya tidak memenuhi hukum Hardy Weinberg, sehingga data tersebut tidak dapat digunakan untuk menarik kesimpulan dalam penelitian ini, karena masih membutuhkan kajian dan verifikasi terlebih lanjut. Tidak dipenuhinya hukum Hardy Weinberg dapat disebabkan oleh (1) adanya frekuensi alel yang dipengaruhi oleh jenis kelamin; (2) adanya jenis tersembunyi; (3) jumlah sampel masih kurang banyak dan (4) kesalahan interpretasi. Populasi Tasikmalaya untuk kedua jenis nyamuk ternyata mempunyai keberagaman genetik yang lebih rendah bila dibandingkan dengan populasi Pelabuhan Ratu, diperkirakan berkorelasi positif dengan adanya aktivitas manusia, juga dapat mengakibatkan penurunan populasi dan jenis nyamuk. Hal sebaliknya, erat kaitannya dengan lebih tinggi dan lebih beraneka ragamnya populasi nyamuk di daerah Pelabuhan Ratu. Lebih tingginya keberagaman genetik populasi Pelabuhan Ratu juga dikaitkan dengan adanya area hutan, kebun dan ladang yang lebih luas dan sedikitnya persawahan sehingga perindukan nyamuk dan macam jenisnya juga lebih tinggi.

Kata kunci: *Anopheles barbirostris*, *A. vagus*, malaria, keberagaman genetik, elektroforesis selulosa asetat, analisis allozim.

The Genetic Diversity of Anopheles barbirostris and A. vagus in Two Endemic Malaria Areas in West Java.

Abstract

Genetic diversity of two mosquitoes species in two malaria endemic areas, Tasikmalaya and Pelabuhan Ratu, has been studied using isozyme techniques on cellulose acetate gels. Fifteen enzyme systems have been analyzed for this study, performed on 46 specimens of *Anopheles vagus* and 44 specimens of *A. barbirostris*, each representing both study areas. Polymorphism in *A. vagus* was lower ($P=0.20-0.27$) compared to *A. barbirostris* ($P=0.40-0.47$) and the heterozygosity level of *A. vagus* ($H=0.027-0.031$) was equally lower compared to *A. barbirostris* ($H=0.083-0.100$) in both populations. Numerous diagnostic alleles representing each populations and species were found, but each of them only occurred at very low frequencies. These results clearly showed that the two areas were distinct entities and not as part of two related meta-populations. Unfortunately such results have a very low applicable advantage to study the population genetics of the two species or populations. One gene, Pgm owns a number of diagnostic alleles characteristics for each population at a relatively high frequencies, but its advantages are negligible, because their frequencies do not follow the Hardy-Weinberg equation, This phenomenon could be explained by: (1) unequal gene frequencies between sexes caused by gender; (2) hidden species or (3) low number of analyzed individuals and (4) artifact of electrophoresis techniques. The Tasikmalaya populations for the two distinct species had a lower genetic diversity compared to Pelabuhan Ratu populations. These results were interpreted as follows: Tasikmalaya populations suffered from human activities and had more or less uniform habitats or in the other hand, Pelabuhan Ratu populations were much larger than those from Tasikmalaya. The results of Pelabuhan Ratu were more variable as a logical consequence of having a more extensive population with more *Anopheles* species as the area included forested and garden or plantation areas but less rice-fields and had likely undergone lesser exposure to human activities.

Key words: *Anopheles barbirostris*, *A. vagus*, malaria, genetic biodiversity, cellulose acetate electrophoresis, allozyme analysis.

1. PENDAHULUAN:

Salah satu penyakit yang banyak menyebabkan kematian pada manusia dan disebabkan oleh suatu bentuk parasit protozoa yang dikenal dengan malaria, ditularkan melalui nyamuk, yang juga berfungsi sebagai inangnyanya yang lain. Penyakit sejenis ini dinamakan penyakit yang ditularkan oleh suatu vektor, sebab penyakit tersebut biasanya dipindahkan dari makhluk yang satu ke makhluk yang lain oleh makhluk yang ketiga. Dalam hal penyakit malaria, vektor tersebut adalah nyamuk *Anopheles* spp. Dampak penyakit malaria, sangat nyata pada penduduk yang hidup di daerah yang relatif terisolasi dari bantuan kesehatan, misalnya daerah yang menjadi perhatian dalam penelitian ini, Sukabumi Selatan yang kini sedang dijangkiti penyakit malaria dalam dua bulan terakhir (Agustus-September 2004).

Tempat yang paling banyak dikunjungi nyamuk malaria untuk berkembang biak adalah tempat dengan air jernih yang tidak mengalir. Nyamuk betina umumnya bersifat zoofilik dan juga bersifat eksofilik, yaitu puncak keaktifan menggigit mulai senja hingga menjelang tengah malam, meskipun aktivitasnya dapat terus berlangsung hingga pagi hari dan cenderung bersifat eksofagik yaitu hampir selalu menggigit di luar rumah.

Genus *Anopheles* mempunyai lebih kurang 300 jenis di dunia dan lebih 60 jenis di antaranya merupakan vektor malaria. Jumlah jenis *Anopheles* di Indonesia sangat banyak, meskipun tidak semuanya berperan sebagai vektor penyakit malaria melalui *Plasmodium*. Menurut catatan kepustakaan, terdapat 68 jenis *Anopheles* di Indonesia, tetapi yang berperan sebagai vektor malaria atau yang diduga dapat menjadi vektor malaria adalah sekitar 22 jenis^{1,2,3,4}. Menurut Adhyatma⁵ misalnya *Anopheles aconitus* ditemukan sebagai vektor malaria di Cianjur (1919), Purworejo (1954), Banjarnegara (1978), Jepara (1980) dan Wonosobo (1982).

Kedua jenis nyamuk *Anopheles* yang diteliti merupakan jenis yang mempunyai persebaran yang jauh lebih luas, dari pantai hingga ke dekat daerah pegunungan dan terdapat di seluruh Asia Tenggara^{3,4}. Di Indonesia misalnya, antara lain dapat ditemukan:

- *Anopheles sudaicus* di daerah pantai
- *Anopheles aconitus* di daerah persawahan
- *Anopheles balabacensis* di daerah hutan
- *Anopheles maculatus* di daerah pegunungan (di atas 800 meter)
- *Anopheles subpictus* dari daerah pantai sampai dengan pegunungan

Penelitian ini bertujuan untuk dapat mengetahui variasi genetika dan sistematik nyamuk yang dapat juga berfungsi sebagai vektor malaria secara umum, yaitu meliputi:

- Menentukan jenis-jenis nyamuk *Anopheles* yang terdapat di daerah yang diteliti.
- Mempelajari hubungan kekerabatan genetik antar jenis dan antar populasi secara elektroforesis.
- Mempelajari variasi keberagaman genetik dari dua jenis nyamuk, *A. barbirostris* dan *A. vagus*.

2. BAHAN DAN TATA KERJA:

Imago nyamuk betina untuk penelitian ini berasal dari (1) Pelabuhan Ratu, Desa Loji, kampung Cibuntu RT 12 RW 05 Kecamatan Simpenan, Kabupaten Sukabumi dan (2) Daerah Cieunteung Gede, Kecamatan Cineam, Kabupaten Tasikmalaya. Dari setiap daerah dikumpulkan sekitar 200 ekor nyamuk dengan cara "human baiting" atau "animal baiting" di daerah kandang kerbau dan diisap dengan aspirator. Meskipun nyamuk yang diperoleh cukup banyak, namun pada akhirnya hanya 90 ekor nyamuk dari jenis *Anopheles vagus* dan *A. barbirostris* digunakan dalam analisis dan mewakili kedua jenis dari kedua tempat tersebut di atas. Identifikasi jenis dilakukan dengan bantuan teknisi NAMRU II dan dikonfirmasi dengan literatur^{1,2,3,4}

Preparasi imago nyamuk dan proses elektroforesis selulosa asetat maupun prosedur analisis isozim yang dilakukan adalah sesuai dengan mengikuti prosedur dan resep pewarnaan dari Harris & Hopkinson⁶, Steiner & Joslyn⁷, Pasteur *et al.*⁸, Hebert & Margaret⁹, Goldman¹⁰ atau Bader¹¹. Macam isozim yang dianalisis dapat dilihat pada Tabel 2 dan 3. Nomenklatur alel dilandaskan atas jarak relatif migrasi suatu alel terhadap alel yang paling umum dari *A. vagus* sebagai titik tolak awal (alel¹⁰⁰). Pada penelitian ini abdomen imago nyamuk dibuang untuk menghindari kontaminasi darah hewan atau manusia yang dihisapnya. Sebagai kontrol positif digunakan juga sejumlah sampel *A. maculatus* yang dipelihara di laboratorium, tetapi tidak dilampirkan dalam data analisis.

Keberadaan suatu alel dan untuk menentukan tipe penurunan gen, dikonfirmasi dengan analisis hukum Hardy-Weinberg:

$$(p^2 + 2pq + q^2) = 1 \text{ (Pasteur et al.}^8\text{)} \quad (1)$$

Yang mana p = frekuensi alel p dan q adalah frekuensi alel q untuk gen yang sama dan p+q = 1.

Untuk analisis data, digunakan sejumlah formulasi untuk menghitung heterozigositas tiap populasi dihitung dengan rumus:

$$\hat{H} = 1 - \sum q_i^2 \text{ (Pasteur et al.}^8\text{)} \quad (2)$$

Yang mana q_i adalah frekuensi alel dari gen tertentu

Polimorfisme tiap populasi dihitung dengan rumus:

$$P_{bp} = \sum x_{bp}^2 / n \text{ (Pasteur et al.}^8\text{)} \quad (3)$$

Yang mana X_{bp} adalah gen yang polimorf sedangkan n adalah jumlah gen yang diamati.

Identitas dan jarak genetik antar populasi dihitung menurut Nei¹²:

$$I_1 = \frac{\sum_{bp, bt}}{\sqrt{(\sum_{bp} \sum_{bt})}} \quad (4)$$

Yang mana $\sum_{bp, bt}$ adalah jumlah frekuensi alel jenis p dikalikan frekuensi alel jenis t

Jarak genetik antar populasi (Nei¹²) adalah:

$$D_1 = - \ln I_1 \quad (5)$$

Hasil dari jarak dan identitas genetik dikelompokkan untuk memperoleh suatu fenogram sesuai dengan algoritma UPGMA secara manual (Gambar 1).

Pembandingan populasi Tasikmalaya terhadap populasi Pelabuhan Ratu dilakukan dengan Chi square dengan derajat bebas 5 pada tingkat 5%.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN:

3.1 Macam-macam jenis *Anopheles*:

Jenis-jenis nyamuk yang ditangkap dari kedua tempat pada dasarnya adalah sama, walaupun populasi Tasikmalaya mempunyai dua jenis nyamuk lebih sedikit (Tabel 1.) Perbedaan populasi nyamuk di kedua tempat diperkirakan oleh adanya perbedaan habitat dan aktivitas manusia. Ke-enam jenis tersebut di bawah ini menurut penelusuran kepustakaan, berpotensi sebagai vektor penyakit malaria di Asia Tenggara^{13,14,15,16,17,18,19}.

Tabel 1. Macam-macam Jenis *Anopheles* yang Ditangkap di Kedua Lokasi

jenis	Pelabuhan Ratu	Tasikmalaya
<i>Anopheles (Cellia) aconitus</i>	3 ekor	37 ekor
<i>Anopheles (C.) annularis</i>	13 ekor	-
<i>Anopheles (C.) maculatus</i>	7 ekor	-
<i>Anopheles (C.) sundaicus</i>	32 ekor	48 ekor
<i>Anopheles (C.) vagus</i>	29 ekor	55 ekor
<i>Anopheles (Anopheles) barbirostris</i>	45 ekor	65 ekor

Catatan: Analisis statistik dengan chi-square menunjukkan pada $df = 5$, $\chi^2 = 409,16$, kedua populasi berbeda sangat nyata.

3.2 Sistem enzim:

Dari 17 sistem enzim yang dianalisis, hanya 15 sistem enzim digunakan dalam mempelajari genetika populasi nyamuk. Hal ini dianggap sudah cukup banyak mengingat ukuran imago nyamuk yang kecil dan dari akibat sudah dihilangkannya bagian abdomennya²⁰. Apabila imago nyamuk yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari hasil pemeliharaan larva atau pupa (yang ditangkap di lapangan) di dalam laboratorium, maka jumlah sistem enzim yang dapat dianalisis dapat ditingkatkan menjadi sekitar dua kali lipat, walaupun tidak menjanjikan adanya perubahan yang drastis dari hasil yang sekarang diperoleh, karena 15 sistem enzim biasanya sudah menggambarkan hubungan kekerabatan genetik secara umum dengan cukup baik.

3.3 Ekspresi gen

Ekspresi gen yang diteliti umumnya dapat dianalisis tanpa kesulitan karena cukup jelas. Sejumlah gen ternyata monomorf (Tabel 2 dan 3) dan macam gen yang monomorf sangat bergantung kepada jenis nyamuk dan populasi tempat nyamuk tersebut ditangkap. Kebanyakan gen yang polimorf pada umumnya menunjukkan bahwa frekuensi alel yang kedua biasanya sangat rendah. Adalah suatu hal yang menarik pada gen (Cholin-) Esterase yang digunakan dalam penelitian ini, karena gen ini bertanggung jawab terhadap resistensi nyamuk pada insektisida organofosfat akibat adanya amplifikasi gen^{21,22}.

Meskipun monomorf, tingkat amplifikasi gen yang terjadi dapat dideteksi dengan metode ini dengan

mengukur dari intensitas pewarnaan larik dari gel selulosa asetat, meskipun tidak dilakukan dalam penelitian ini.

Tabel 3. Variasi Alozim dan Frekuensi Alel dari *Anopheles vagus* yang Berasal dari Dua Populasi yang Berbeda

Enzim	Alel	Pelabuhan Ratu	Tasikmalaya
Enzim Malik (Me)-1	105	1,00	0,95
	110	0	0,05
Xantin dehidrogenase (Xdh)	95	0	0,10
	105	1,00	0,90
6-Pgdh	105	0,04	0
	110	0,96	1,00
Heksokinase (Hk)-1	100	0,04	0
	105	0,96	1,00
Hk-2	105	0,96	1,00
	110	0,04	0
Hk-3	105	0,92	1,00
	110	0,04	0
Malat dehidrogenase (Mdh)-1	115	0,04	0
	90	0	0,08
	100	0,96	0,92
	110	0,04	0

Catatan: Alozim Me-2, Fosfoglukoisomerase (Pgi), 6-Fosfogluko dehidrogenase (6-Pgdh), α - Gliserofosfat dehidrogenase (α -Gdh), Fosfogluko mutase (Pgm), Mdh-2, Mdh-3, Esterase (Est) dan Adenilat kinase (Ak) monomorf untuk kedua populasi, sehingga tidak ditampilkan dalam tabel.

3.4 Frekuensi alel:

Frekuensi alel dari masing-masing gen menunjukkan bahwa polimorfisme genetik dan heterozigositas (Tabel 1-2) pada dasarnya masih dalam kisaran normal dengan pengertian bahwa frekuensi alel masing-masing lokus gen masih memenuhi hukum Hardy Weinberg, kecuali untuk isozim Pgm. Pada isozim tersebut ditemukan dua macam alel utama, tetapi frekuensi individu heterozigot sangat rendah dalam populasi, sehingga kejadian ini dapat digolongkan sebagai kasus defisit heterozigot. Adanya defisit heterozigot dapat diinterpretasikan sebagai cerminan ketidak hadiran perkawinan antara individu dengan genotip yang berbeda. Hal ini dapat diinterpretasikan dengan paling sedikit empat macam alternatif:

a. Kemungkinan pertama: rendahnya frekuensi individu heterozigot bukan disebabkan oleh karena tidak ada perkawinan, tetapi diakibatkan karena gen tersebut dipengaruhi oleh adanya jenis kelamin, apakah akibat gen tersebut terpaut kromosom X ataupun kromosom Y, menyebabkan frekuensi alel pada hewan jantan dibandingkan dengan pada hewan betina tidak akan sama. Probabilitas ini tidak dapat dibuktikan karena individu yang dianalisis semuanya berjenis kelamin betina. Individu jantan tidak dianalisis dalam penelitian ini, karena sifatnya yang

tidak membutuhkan darah menyebabkan mereka tidak tertangkap dengan teknik "human baiting".

Tabel 2. Variasi Alosim dan Frekuensi Alel *Anopheles barbirostris* yang berasal dari Dua Populasi yang Berbeda

Enzim	Alel	Pelabuhan Ratu	Tasikmalaya
Me-1	100	0,96	1,00
	110	0,04	0
Me-2	80	0,04	0
	100	0,82	0
Xdh	110	0,14	1,00
	95	0,18	0
α-Gdh	100	0,82	0,95
	105	0	0,05
	90	0,16	0,05
Hk-1	100	0,84	0,95
	90	0	0,05
Hk-2	95	0	0,05
	100	1,00	0,90
	95	0	0,05
Hk-3	100	1,00	0,95
	95	0	0,10
	100	0,96	0,90
Pgm	105	0,04	0
	100	0,59	0,48
Mdh-1	110	0,41	0,52
	90	0	0,05
	100	1,00	0,95

Catatan: Alosim Pgi, 6-Pgdh, Mdh-2, Mdh-3, Est dan Ak monomorf untuk kedua populasi, sehingga tidak ditampilkan dalam tabel.

b. Kemungkinan kedua: pada dasarnya defisit heterozigot dapat diterangkan oleh adanya dua jenis kembar yang sulit dibedakan secara morfologi^{24,25,26,27}. Dalam penelitian ini, teori ini tidak didukung oleh data dari gen-gen yang lain, karena gen yang lain semuanya cenderung mengikuti hukum Hardy-Weinberg. Apabila ada perbedaan dari hipotesis secara statistik, diperkirakan bahwa hal ini diakibatkan oleh jumlah sampel per populasi masih belum cukup untuk mewakili populasi tersebut. Adanya jenis kembar akan terlihat apabila pada individu tertentu mempunyai sejumlah besar perbedaan alel secara konsisten untuk sejumlah sistem gen dibandingkan dengan individu-individu lain yang diperlakukan sebagai satu jenis. Adanya jenis kembar pada *Anopheles* menjadi perhatian mengingat mereka sering menunjukkan alel yang berbeda terhadap analisis elektroforesis maupun analisis molekuler^{23,27} dan dapat dilihat juga dari analisis morfologi²⁹.

c. Kemungkinan ketiga yang merupakan kemungkinan yang paling umum adalah frekuensi alel tersebut memang sangat rendah dalam populasi. Diperkirakan apabila kita menaikkan jumlah individu menjadi dua kali lipat, bahkan tiga kali lipat, maka kejadian defisit individu heterozigot akan tereliminasi dengan sendirinya, meskipun frekuensi alelnya belum tentu berubah. Dalam penelitian ini digunakan 46

individu *Anopheles vagus* dan 44 individu *A. barbirostris*, suatu jumlah yang secara statistik dianggap cukup untuk mewakili satu populasi atau satu jenis, tetapi masih kurang cukup untuk mewakili dua populasi terpisah untuk masing-masing jenis.

d. Kemungkinan ke-empat yang perlu disikapi adalah terjadinya "artifact" yang menyebabkan peneliti salah melakukan interpretasi dari data. Hal ini amat sangat mungkin terjadi mengingat bahwa teknik elektroforesis merupakan teknik yang cukup sensitif dan adanya gangguan teknis (misalnya gelembung udara dapat menghambat migrasi suatu protein atau migrasinya bergeser lebih lambat atau lebih cepat. Dapat juga terjadi kekeringan gel akibat panas yang dihasilkan arus listrik dapat menghambat proses migrasi dari protein yang sedang diteliti, sehingga pembacaan data dapat menjadi salah).

3.5. Polimorfisme:

Mengingat polimorfisme dalam populasi alamiah sering kali dijumpai dalam frekuensi yang sangat kecil, dalam penelitian ini digunakan kesepakatan 1% untuk menyatakan bahwa gen tersebut polimorf^{20,21,28}. Dari hasil ditunjukkan bahwa hanya sekitar 2-10% gen dari populasi yang diamati adalah polimorf, dengan demikian tingkat heterozigositasnya pun relatif rendah (Tabel 5). Apabila tingkat heterozigositas suatu populasi sangat rendah (≈ 0) maka populasi tersebut dapat mudah terancam punah.

3.6. Alel Diagnostik:

Sejumlah alel diagnostik dapat diamati. Misalnya alel Mdh 1⁹⁰ yang dimiliki *A. vagus* Tasikmalaya dan Mdh 1¹¹⁰ yang hanya terdapat di Pelabuhan Ratu, demikian pula alel Me 1¹¹⁰ hanya dijumpai pada *A. barbirostris* dari Tasikmalaya (Tabel 2 dan Tabel 3). Secara umum alel-alel diagnostik tersebut di atas frekuensinya sangat rendah, sehingga tidak banyak berarti untuk studi dinamika populasi, walaupun hasil ini menunjukkan dengan pasti bahwa populasi Pelabuhan Ratu terpisah dari populasi Tasikmalaya. Penggunaan alel diagnostik sebaiknya diambil dari metode yang lain, misalnya penanda DNA.

Tabel 4. Alel Diagnostik yang dapat Digunakan untuk Membedakan ke-Dua Jenis yang Diteliti

<i>Anopheles barbirostris</i>	<i>Anopheles vagus</i>
Me 1 ¹⁰⁰	Me 1 ¹⁰⁵
6-Pgdh ¹⁰⁰	6 Pgdh ¹¹⁰
Hk 1 ¹⁰⁰	Hk 1 ¹⁰⁵
Hk 2 ¹⁰⁰	Hk 2 ¹⁰⁵
Hk 3 ¹⁰⁰	Hk 3 ¹⁰⁵
Xdh ¹⁰⁰	Xdh ¹⁰⁵

Alel diagnostik antar jenis dijumpai dalam jumlah yang cukup banyak dan dapat digunakan dengan mudah untuk mengidentifikasi jenis. Sebagian besar variasi alel yang diamati antara kedua jenis berbeda sehingga dapat dipakai untuk mendiagnosis jenis apabila identifikasi dari karakter morfologi tidak dapat dilakukan karena keterbatasan alat dan literatur (Tabel 4).

3.7. Identifikasi jenis:

Sesuai dengan kaidah definisi jenis, maka dapat dipastikan bahwa identifikasi jenis secara morfologis tidak mengalami hambatan meskipun diambil dari dua populasi yang berbeda (Tabel 1). Hal ini dibuktikan karena kedua populasi yang berbeda memberikan hasil kesamaan genetik maupun jarak genetik yang sesuai dengan definisi jenis pada umumnya. Kesamaan genetik antara dua populasi *A. barbirostris* adalah 99.3%, sedangkan kesamaan genetik antar populasi *A. vagus* adalah 99.7%. Menurut kepustakaan, perbedaan genetik antar populasi nyamuk pada umumnya tidak pernah lebih dari 5%^{7,8,11,12,24,25,26,28,30}. Dengan demikian kedua jenis tersebut di atas memang terdapat dalam dua populasi yang berbeda, yang pertama mewakili daerah pantai dan yang kedua mewakili populasi daerah pedalaman. Dengan demikian kedua daerah tersebut merupakan daerah edar dari kedua jenis tersebut dan lingkungan dan ketinggian dari muka laut tidak menjadi faktor pembatas bagi kedua jenis *Anopheles* tersebut. Sebaliknya antara kedua jenis di atas hanya memiliki kesamaan genetik yang sangat kecil atau jarak genetik yang besar (Tabel 5).

3.8. Keberagaman genetika:

Lebih rendahnya keberagaman genetik bagi populasi Tasikmalaya diperkirakan berkaitan erat

dengan ketersediaan relung dan aktivitas manusia (antara lain polutan, pestisida, dll.). Dugaan ini diperkuat dengan hilangnya *Anopheles annularis* dan *A. maculatus* di daerah Tasikmalaya (Tabel 1), diperkirakan karena kedua jenis tersebut rentan terhadap aktivitas manusia. Alternatif yang lain adalah bahwa jenis nyamuk di Pelabuhan Ratu lebih beragam, karena lingkungan yang lebih bervariasi, mempunyai daerah hutan dan kebun yang jauh lebih luas, tetapi daerah persawahan sangat kurang dan tidak banyak mendapat gangguan aktivitas manusia. Meskipun data atau interpretasi semacam ini masih perlu dikonfirmasi terlebih lanjut dengan penelitian lanjutan, tetapi konsekuensi penggunaan data elektroforesis selulosa asetat adalah potensinya yang cukup besar untuk digunakan sebagai penanda genetik suatu populasi. Hal ini terlihat dilapangan, karena di daerah Pelabuhan Ratu, usaha yang dilakukan untuk memperoleh jumlah individu yang cukup untuk penelitian ini jauh lebih besar dibandingkan dengan usaha yang dilakukan di Tasikmalaya. Dengan demikian jumlah perindukan di daerah Tasikmalaya umumnya lebih sedikit dan diperoleh dari daerah yang berdekatan dan dengan sendirinya memberikan peluang tertangkapnya beberapa individu yang berkerabat dekat atau dari perindukan yang sama.

Tabel 5. Nilai Heterozigositas (\hat{H}), Polimorfisme (P), Jarak genetik (D) dan Identitas genetik (I) dari ke-Dua Jenis dan dari ke-Dua Populasi yang Diteliti

	<i>Anopheles barbirostris</i> (Pelabuhan Ratu)	<i>Anopheles barbirostris</i> (Tasikmalaya)	<i>Anopheles vagus</i> (Pelabuhan Ratu)	<i>Anopheles vagus</i> (Tasikmalaya)
<i>Anopheles barbirostris</i> (Pelabuhan Ratu)	$\hat{H}_1 = 0,1007$ $P_1 = 0,4000$	$D_1 = 0,0069$	$D_2 = 1,974$	$D_4 = 2,005$
<i>Anopheles barbirostris</i> (Tasikmalaya)	$I_1 = 0,993$	$\hat{H}_2 = 0,0831$ $P_2 = 0,4670$	$D_3 = 2,068$	$D_5 = 2,020$
<i>Anopheles vagus</i> (Pelabuhan Ratu)	$I_2 = 0,1390$	$I_3 = 0,1264$	$\hat{H}_3 = 0,0305$ $P_3 = 0,2670$	$D_6 = 0,0026$
<i>Anopheles vagus</i> (Tasikmalaya)	$I_4 = 0,1350$	$I_5 = 0,1323$	$I_6 = 0,997$	$\hat{H}_4 = 0,0273$ $P_4 = 0,2000$

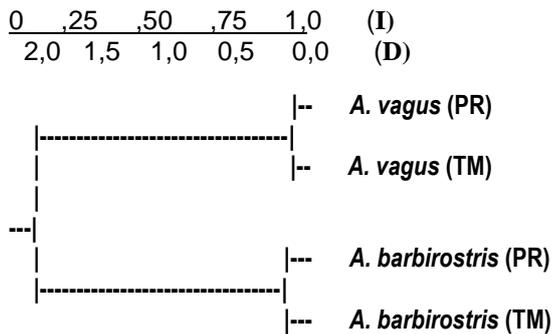
3.9. Diversitas intra-generik:

Kesamaan genetik antara *Anopheles vagus* dan *A. barbirostris* sangat rendah, hanya berkisar antara 0,126-0,139 atau dengan perkataan lain, hanya sekitar 12-14% dari alel kedua jenis yang serupa. Hal ini menggambarkan bahwa jarak genetiknya sangat jauh atau dapat dianggap bahwa keduanya sudah merupakan anggota dari suatu genus yang berbeda, karena biasanya kesamaan genetik di bawah 30% sudah mencirikan perbedaan tingkat genus^{20,21,24,25,26,28}. Menurut sistematika morfologis, kedua nyamuk tersebut di atas dikelompokkan dalam dua subgenus yang berbeda. *A.*

barbirostris termasuk dalam subgenus *Anopheles*, sedangkan *A. vagus* termasuk dalam subgenus *Cellia*^{1,2,3,4}.

Sayangnya hal tersebut belum dapat dijadikan kesimpulan akhir bahwa perbedaan genetik antara kedua jenis adalah memang perbedaan antar genus²¹. Dengan pernyataan lain, belum dapat dinyatakan bahwa *Cellia* sebetulnya merupakan genus terpisah dari genus *Anopheles*, karena masih dibutuhkan lebih banyak penelitian yang menggunakan macam dan jumlah gen yang berbeda, bermacam-macam jenis dan jumlah individu yang jauh lebih banyak dan mewakili semua daerah persebaran masing-masing jenis maupun

pendekatan dengan metode yang berbeda, misalnya imunologi dan genetika molekuler dan analisis filogenetik.



Gambar 1. Hubungan kekerabatan antara ke-empat populasi nyamuk dari dua jenis *Anopheles* di Tasikmalaya (TM) dan Pelabuhan Ratu (PR) ditinjau dari nilai identitas (I) dan jarak genetik (D) (Tabel 5).

3.10. Hubungan fenetik:

Hubungan fenetik antara kedua jenis dan kedua populasi berbeda dapat dilakukan dengan menggunakan sejumlah algoritme, tetapi tidak dilakukan dalam penelitian ini mengingat bahwa hanya ada empat parameter yang akan dibandingkan dan hubungan antara yang satu dengan yang lain sudah sangat nyata dari matriks (Tabel 5). Kedua populasi dari masing-masing jenis akan membentuk kelompok tersendiri masing-masing dengan $I = 0,993-0,997$ atau $D = 0,003-0,007$, sesuai dengan data Pasteur & Pasteur¹². Kedua jenis tersebut kemudian akan menyatukan kedua kelompok tersebut di atas dengan $I = 0,126-0,139$ atau $D = 1.974-2.068$ (Gambar 1).

3.11. Analisis pengelompokan:

Penggunaan algoritma pengelompokan (*clustering*) yang tepat untuk menampilkan hasil dengan tingkat deformasi visual yang serendah-rendahnya hanya diperlukan apabila kita menggunakan data yang besar, sedangkan data seperti pada penelitian ini presentasi visualnya tidak akan berbeda jauh meskipun kita dapat menggunakan pendekatan dengan bermacam-macam algoritma berbeda dan dengan cara pengelompokan yang berbeda pula³¹.

3.12. Dinamika populasi:

Hasil penelitian semacam ini dapat lebih baik apabila jumlah populasi yang dibandingkan terdiri dari beberapa populasi tambahan antara Pelabuhan Ratu dan Tasikmalaya ataupun daerah sekitarnya, karena data semacam itu dapat menggambarkan bagaimana dinamika populasi tersebut dari suatu daerah ke daerah yang lain. Selain itu penelitian yang memperhatikan dinamika populasi sepanjang tahun pada beberapa daerah dapat memberikan kontribusi yang besar pada masyarakat ilmiah. Kedua data tersebut di atas sangat dibutuhkan untuk membantu masalah melakukan analisis awal untuk

mendeteksi kemungkinan terjadinya peledakan populasi *Anopheles*, apabila tingkat heterozigositasnya tinggi, biasanya di atas 15 %^{8,11,21}.

4. KESIMPULAN

- Pada dasarnya paling sedikit ada enam jenis nyamuk potensial pembawa penyakit malaria di Pelabuhan Ratu, sedangkan di Tasikmalaya hanya dijumpai empat jenis saja (Tabel 1). Hal ini diterangkan oleh adanya daerah hutan di daerah Pelabuhan Ratu dan luasnya persawahan dan juga dapat diakibatkan oleh besarnya pengaruh aktivitas manusia di daerah Tasikmalaya
- Keberagaman genetik nyamuk *Anopheles barbirostris* dan *A. vagus* pada dasarnya masih cukup tinggi untuk dapat dikategorikan sebagai populasi yang sehat. Pengaruh aktivitas manusia di kedua daerah tersebut di atas, pada saat ini belum mencirikan adanya suatu perubahan genetik
- Penelitian ini memastikan bahwa populasi Tasikmalaya dan populasi Pelabuhan Ratu tidak mempunyai hubungan yang langsung, meskipun kedua jenis dari kedua lokasi masing-masing digolongkan dalam jenis yang sama
- Penggunaan alel diagnostik isozim tidak dapat dilakukan mengingat frekuensi alel-alel tersebut sangat rendah. Oleh karena itu penggunaan cara lain lebih dianjurkan, misalnya penggunaan penanda DNA

5. UCAPAN TERIMAKASIH:

Penulis (RAS) mengucapkan banyak terimakasih atas bantuan pengarahan Dr. E. Mawarni dan atas penerimaan Dr. A. Sjarmidi di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik (ITB) hingga studi ini dapat diselesaikan. Terima kasih kami haturkan kepada M.J. Bangs Ph.D. dan Pak Bimo yang telah memberi izin untuk mengerjakan penelitian di bagian Entomologi, NAMRU II. Ucapan terimakasih yang sebesar-besarnya kami sampaikan kepada Mas Y.R. Gionar dan Mbak Ririn dari bagian Entomologi, NAMRU II yang telah banyak membantu dan membagi ilmunya terhadap penulis. Tidak lupa kami ucapkan terima kasih kepada Ibu Umi, Pak Nasir, Pak Dwiko, dan Pak Bambang (Laboratorium Entomologi, NAMRU II) yang telah membantu di lapangan dan melakukan rearing nyamuk sebelum dianalisis. Penelitian ini merupakan bagian dari tugas akhir penulis (RAS) dan disponsori oleh Laboratorium Entomologi Namru II, Jakarta dan Laboratorium Ekologi dan Biosistematik Departemen Biologi FMIPA ITB.

6. DAFTAR PUSTAKA:

1. Wepster, J.B. & N.H. Swellengrebel, *The Anophelini Mosquitoes of the Indo-Australian Region*, Netherlands Publishing, Amsterdam (1953).
2. Koesoemawinangoen, R.W., *Anophelini di Indonesia*, Lembaga Malaria, Kementrian Kesehatan RI, Jakarta (1954).
3. Reid, J.A. *Anophelini Mosquitoes of Malaya and Borneo*. Government of Malaysia. (1968).

4. Subbarao, S.K. *Anophelini species complexes in Southeast Asia*. Technical Publication, SEARO No 18: WHO, New Delhi. (1998)
5. Adhyatma, M., *Malaria*, Departemen Kesehatan (P₃M), Jakarta, Indonesia (1983).
6. Harris, H. & D.A. Hopkinson, *Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics*, North-Holland Publishing Company, Amsterdam (1976).
7. Steiner, W.W.M. & D.J. Joslyn, *Electrophoretic techniques for the genetic study of mosquitoes*, Department of Genetics and Development, University of Illinois (1979).
8. Pasteur, N., F. Bonhome & J. Britton-Davidian, *Practical isozyme genetics*, John Wiley & Sons, New York (1988).
9. Herbert, P.D.N. & J.B. Margaret, *Methodologies for allozyme analysis using cellulose acetate electrophoresis*, Helena Laboratories Handbook, Beaumont, Texas (1993).
10. Goldman, C.A, *Measuring genetic variation using cellulose acetate electrophoresis*, Association for Biology Laboratory Education, US (2002).
11. Bader, J.M., *Measuring genetic variability in natural populations by allozyme electrophoresis*, Department of Biology, Case Western Reserve University, Ohio (1998).
12. Nei, M. *Molecular population genetics and evolution*. *Frontiers of Biology*. Elsevier, North Holland Publ. Co. (1975).
13. Amerasinghe, F. P., P. H. Amerasinghe, J. S. M. Peiris, and R. A. Wirtz. Anopheline ecology and malaria infection during the irrigation development of an area of the Mahaweli project, Sri Lanka. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 45: 226-235 (1991).
14. Maheswary N.P., Khan Z., Molla F.R. & Haq M.I. Incrimination of *Anopheles annularis* van der Wulp-1854 as an epidemic malaria vector in Bangladesh. *Southeast Asian J. Trop. Med. Publ. Health.* 24(4): 776-778 (1993).
15. Upatham E.S., C. Prasittisuk, S. Ratanatham, C.A. Green, W. Rojanasunan, P. Setakana, N. Theerasilp, A. Tremongkol, V Viyanant & S. Pantuwatana. Bionomics of *Anopheles maculatus* complex and their role in malaria transmission in Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Publ. Health.* 19(2): 259-269 (1988).
16. Dusfour I, R.E. Harbach & S Manguin. Bionomics and systematics of the oriental *Anopheles sudaicus* complex in relation to malaria transmission and vector control. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 71(4): 518-524 (2004).
17. Schapira, A. Malaria risk and malaria control in Asian countries affected by the tsunami disaster. *Roll Back Malaria Department, WHO/RBM*. pp 1-11 (2005).
18. Limrat D., B. Rojruthai, C. Apiwathnasorn, Y. Samung & S. Prommongkol. *Anopheles barbirostris/campestris* as a probable vector of malaria in Aranyaprathet, Sa Kaeo Province. *Southeast Asian J. Trop. Med. Publ. Health.* 32(4): 739-744 (2001).
19. Maguire J.D, S. Tuti, P. Sismadi, I. Wiady, H. Basri, Krisin, S. Masbar, P. Projodipuro, I.R. Elyazar, A.L. Corwin & M.J. Bangs. Endemic coastal malaria in the Thousand Islands District, near Jakarta, Indonesia. *Trop. Med. Int. Health.* 10(5): 489-496 (2005).
20. Rioux, J.A., G. Lanotte, R. Maazoun & N. Pasteur. L'électrophorèse des enzymes dans le genre *Leishmania* Ross, 1903. *Parasitologia* 27: 141-156 (1985).
21. Pasteur, G. & N. Pasteur. Les critères biochimiques et l'espèce animale, dalam Bouquest, G., J. Genermont & M. Lamote (eds.) *Les problème de l'espèce dans le règne animale*. Soc. Zool. France. Vol 3. 99-150 (1980).
22. Mouchès, C., N. Pasteur, J.B. Bergé, O. Hyrien, M. Raymond, B.R. de Saint Vincent, M. de Silvestri & G.P. Georghiou. Amplification of an esterase gene is responsible for insecticide resistance in a California *Culex* mosquito. *Science* 233: 778-780 (1986).
23. Raymond, M., N. Pasteur & G.P. Georghiou. Inheritance of chlorpyrifos resistance in *Culex pipiens* L (Diptera: Culicidae) and estimation of the number of genes involved. *Heredity* 58: 351-356 (1987).
24. Foley, D.H., H. Paru, H. Dagoro & J.H. Bryan. Allozyme analysis reveal six species within the *Anopheles punctulatus* complex of mosquitoes in Papua New Guinea. *Med. Veter. Entomol.* 7: 37-48 (1993).
25. Foley, D.H. & J.H. Bryan. Electrophoretic key to identify members of the *Anopheles punctulatus* complex of vector mosquitoes in Papua New Guinea. *Med. Veter. Entomol.* 7: 49-53 (1993).
26. Foley, D.H., S.R. Meek & J.H. Bryan. The *Anopheles punctulatus* group of mosquitoes in Solomon Island and Vanuatu surveyed by allozyme electrophoresis. *Med. Veter. Entomol.* 8: 340-350 (1994).
27. Satoto, T.B.T. *Cryptic species within Anopheles barbirostris van der Wulp, 1884, inferred from nuclear and mitochondrial gene sequence variation*. Thesis, University of Liverpool (2001).
28. Lucotte, G. *Génétique des populations*. Intereditions (1983).
29. Sari, J.F.K., F.A. Sujadi & S.J. Mardihusodo. Diferensiasi spesies sibling *Anopheles farauti* Laveran, 1902, vektor malaria di Jayapura dengan "scrutiny morphometry" vena sayap. *Sains Kesehatan* 17 (3): 301-314 (2002).
30. Mendes, J.M. & J. de Freitas-Maia, *Isoenzymatic variability among five Anopheles species belonging to the Nyssorhynchus and Anopheles subgenera of the Amazon Region*, Brazil, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia, Brasil (2003).
31. Iskandar, D.T. *Evolution génétique de la superfamille des muroïdes révélée par électrophorèse classique et électrophorèse séquentielle*. Disertasi Doktor, Université Montpellier II (1984).

=====//=====