

**KARAKTERISASI BERBASIS MARKA MOLEKULER ITS2  
TERHADAP SUB-SPESES KOMPLEKS*****Anopheles vagus vagus* DAN *Anopheles vagus limosus*****ITS2 Based Molecular Characterization of sub-species complex of  
*Anopheles vagus vagus* and *Anopheles vagus limosus***

**Kartika Senjarini\***, Lailly Nur Uswatul Hasanah, Miatin Alvin Septianasari,  
Muhammad Khalid Abdullah, Rike Oktarianti, Syubbanul Wathon

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember  
Jalan. Kalimantan No. 37, Kampus Tegalboto, Jember, Jawa Timur, 68121, Indonesia  
E mail: [senjarini@unej.ac.id](mailto:senjarini@unej.ac.id)

**ABSTRACT**

The presence of intraspecies variations of *An. vagus* later categorized as the subspecies of *An. vagus vagus* and *An. vagus limosus*, could be an obstacle to the identification process, which is an important step for malaria vector's competence characterization. Based on morphological identification, those subspecies could be distinguished by the presences of pale scales in prehumeral and pale bands in proboscis. The objective of this research was to compare subspecies complexes of *An. vagus* morphologically and molecularly using Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2). *Anopheles* samples were collected from Bangsring, Banyuwangi. Their phylogenetic tree was constructed by using NJ method based on their ITS2 sequences. BLAST result showed that *An. vagus vagus* and *An. vagus limosus* were similar to *An. vagus FJ654649.1* from East Java Indonesia and East Timor based on its 99% homology and their molecular distance. The Neighbour Joining (NJ) tree grouped those subspecies in one clade with a bootstrap value of 82%. This subspeciation might be due to the different rates of evolution. ITS2 sequences of *An. vagus vagus* and *An. vagus limosus* were submitted to GenBank with the accession number of MW314227.1 and MW319822.1, respectively.

**Keywords:** malaria, intraspecies variation, *Anopheles vagus vagus*, *Anopheles vagus limosus*, ITS2

**ABSTRAK**

Kemunculan variasi intraspecies *An. vagus* yang kemudian dikategorikan sebagai subspecies *An. vagus vagus* dan *An. vagus limosus* menjadi kendala dalam proses identifikasi yang merupakan langkah penting dalam menentukan kompetensi vektor malaria. Berdasarkan karakter morfologi, subspecies tersebut dibedakan dengan adanya sisik pucat pada bagian prehumeral dan pita pucat pada probosis. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan subspecies *An. vagus* secara morfologis dan molekuler menggunakan Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2). Nyamuk *Anopheles* didapatkan dari Bangsring, Banyuwangi. Konstruksi pohon filogeni dilakukan berdasarkan sekuen ITS2 yang dianalisis menggunakan metode NJ. Hasil BLAST menunjukkan, ITS2 *An. vagus vagus* dan *An. vagus limosus* memiliki tingkat homologi 99% dan jarak evolusi molekuler terendah dengan *An. vagus FJ654649.1* dari Jawa Timur Indonesia dan Timor Timur. Pohon NJ mengelompokkan subspecies tersebut dalam satu klade dengan nilai bootstrap 82%. Hal ini dapat terjadi karena perbedaan kecepatan evolusi yang memungkinkan terjadinya subspeciesasi. Urutan basa ITS2 dari *An. vagus vagus* dan *An. vagus limosus* telah didaftarkan ke GenBank dengan nomor akses MW314227.1 dan MW319822.1.

**Kata Kunci:** malaria, variasi intraspecies, *Anopheles vagus vagus*, *Anopheles vagus limosus*, ITS2

## PENDAHULUAN

Pengawasan terhadap vektor (*vector surveillance*) dilaksanakan secara rutin di negara-negara dengan tingkat kasus *vector borne diseases* yang cukup tinggi (WHO 2020). Hal ini dilakukan untuk mengetahui dinamika populasi dan persebaran geografis vektor sehingga dapat memprediksi potensi terjadinya Kejadian Luar Biasa (KLB; *outbreaks*) serta melakukan evaluasi terhadap program pengendalian vektor (Davidson et al. 2019). Seiring meningkatnya kasus malaria dan DBD, identifikasi vektor nyamuk menjadi langkah penting dalam pengendalian dan pengawasan vektor kedua penyakit ini (Bowman et al. 2014, Ototo et al. 2015). Secara khusus untuk *Anopheles* yang merupakan vektor malaria (Molina-Cruz et al. 2016), identifikasi juga penting untuk menentukan kapasitas vektorial nyamuk dalam mentransmisikan *Plasmodium* penyebab malaria (Musime et al. 2019).

Identifikasi vektor *Anopheles* dapat dilakukan melalui identifikasi morfologi yang didasarkan pada kunci identifikasi dengan karakter morfologi seperti pada bagian antena, palpus, probosis, venasi sayap, kaki dan bagian tubuh lainnya menggunakan kunci determinasi *Anopheles* (Cagampang-Ramos dan Darsie 1970). Identifikasi morfologi membutuhkan keutuhan tubuh nyamuk, serta ahli taksonomi dengan pengalaman khusus terkait vektor *Anopheles*, sehingga ketika terjadi kerusakan morfologi serta keterbatasan ahli taksonomi menyebabkan proses identifikasi sulit dilakukan (St Laurent et al. 2018). Selain identifikasi morfologi saat ini telah berkembang identifikasi molekuler dengan metode DNA *barcoding* (Beebe 2018).

Identifikasi molekuler menjadi penting digunakan dalam proses identifikasi nyamuk *Anopheles*, sebab *Anopheles* memiliki anggota yang tergolong dalam spesies kompleks seperti *sibling* dan *cryptic* spesies (Blažejová et al. 2018), yang sulit dibedakan dengan hanya mengandalkan identifikasi berbasis karakter morfologi (Chatpiyaphat et al. 2020). Oleh karena itu, identifikasi molekuler berbasis DNA *barcoding* dibutuhkan untuk menentukan keakuratan identifikasi spesies *Anopheles* (Weeraratne et al. 2018). Beberapa spesies *Anopheles* yang termasuk ke dalam kompleks spesies

diketahui mempunyai kapasitas vektorial yang berbeda (Zheng 2020).

DNA *barcoding* merupakan metode identifikasi spesies berbasis marka molekuler yang didasarkan pada sekuens DNA. Konsep dari metode ini adalah setiap spesies memiliki identitas genetik yang unik yang mencirikan spesies tersebut (Lopez-Rubio et al. 2016). Penggunaan DNA *barcoding* berbasis *Internal Transcribed Spacer region 2* (rDNA ITS2) dalam identifikasi *Anopheles* juga dapat memperkirakan hubungan kekerabatan antar spesies yang direpresentasikan dalam pohon filogenetik (Zhang et al. 2020). Berdasarkan sekuens spesifik yang dihasilkan oleh *restriction site-associated DNA sequence* (RAD-loci), peneliti dapat memperkirakan *common ancestor* suatu spesies. Hal ini dapat menjadi dasar untuk memprediksi kapan terjadinya spesiasi *Anopheles* (Fouet et al. 2017).

Marka molekuler yang sering digunakan untuk DNA *barcoding* di antaranya yaitu DNA nuklear ribosomal (ITS1, ITS2, D2, D3 dan IGS) dan DNA mitokondria (Cyt b, ND5, COI dan COII). Sementara itu marka DNA yang banyak digunakan pada identifikasi nyamuk terutama spesies *Anopheles* adalah DNA ribosomal *Internal Transcribed Spacer region 2* (rDNA ITS2) (Lobo et al. 2015). ITS2 merupakan *non-coding region* yang berada pada *nuclear* ribosomal DNA dan berada di antara 5,8S dan 28S rRNA (Batovska et al. 2017). ITS2 memiliki *region* yang terkonservasi, mudah dalam amplifikasi karena ukuran marka molekuler ini relatif tidak terlalu panjang dengan kisaran 400–700 pb, serta kemampuan sekuens tersebut untuk membedakan spesies yang berkerabat dekat (Zhang et al. 2020). Sekuens ini banyak digunakan untuk membedakan antar spesies *Anopheles* di daerah endemik malaria (Lobo et al. 2015), bahkan juga digunakan untuk mendeteksi spesies kompleks *Anopheles* (Surendran et al. 2013).

*An. vagus* merupakan vektor potensial malaria di Indonesia (Davidson et al. 2019). Ada dua variasi intraspesies *An. vagus* yang kemudian dikategorikan dalam dua subspesies *An. vagus vagus* dan *An. vagus limosus* (Cagampang-Ramos dan Darsie 1970). Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan karakter morfologi dan

karakter molekuler berbasis sekuen ITS2 kedua subspecies *An. vagus* tersebut. Hasil identifikasi molekuler dapat mengkonfirmasi kebenaran karakterisasi morfologi yang akan sangat penting dalam penentuan kapasitas vektorial serangga dalam mentransmisikan penyakit. Lebih lanjut data molekuler akan memberikan gambaran terkait kecepatan evolusi intraspecies yang merupakan data penting untuk mengetahui perkembangan keberadaan spesies kompleks dalam *Anopheles* (Fouet et al. 2017).

## BAHAN DAN METODE

### Tempat dan waktu penelitian

Sampel nyamuk *Anopheles* dewasa diambil pada bulan Mei – September 2020 di Dusun Paras Putih, Desa Bangsring, Kecamatan Wongsorejo, Kabupaten Banyuwangi (Gambar 1). Identifikasi dan karakterisasi morfologi dilakukan di tempat pengambilan sampel dengan menggunakan mikroskop stereo. Sedangkan identifikasi dan karakterisasi molekuler berbasis sekuen ITS2 dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember.

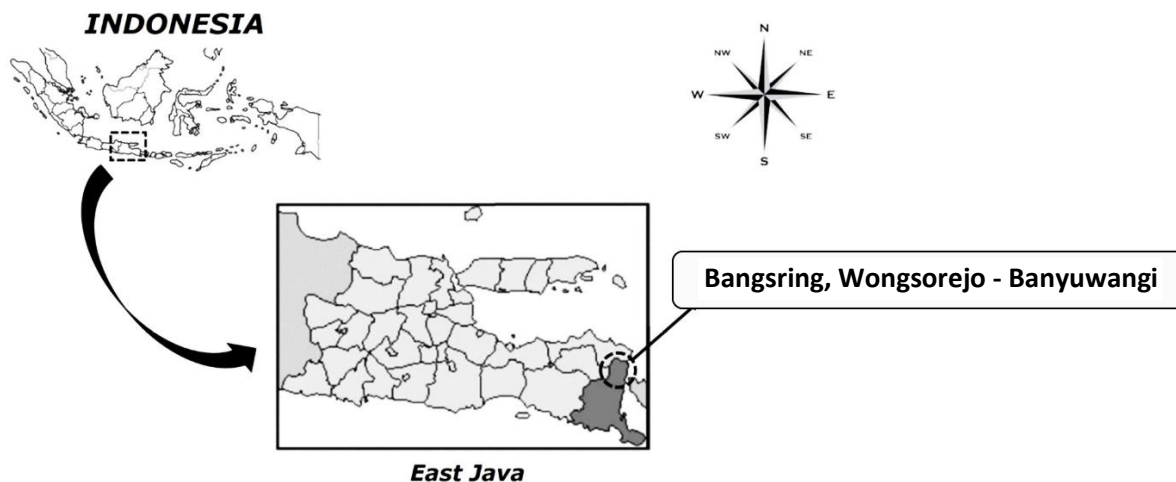
### Identifikasi morfologi

Proses pengambilan nyamuk dilakukan menggunakan aspirator dan semua nyamuk yang diperoleh dimasukkan ke dalam *paper cup* kemudian nyamuk diidentifikasi berdasarkan karakter morfologi. Identifikasi morfologi nyamuk *Anopheles* dilakukan dengan mengamati karakteristik palpus, probosis serta bercak pada bagian

kaki. Identifikasi dilakukan dengan menggunakan mikroskop stereo dan berdasarkan Reid (1968), Cagampang-Ramos dan Darsie (1970), serta O'Connor dan Soepanto (2013).

### Isolasi DNA genom nyamuk

Nyamuk yang teridentifikasi morfologi sebagai *An. vagus vagus* dan *An. vagus limosus* dimasukkan ke dalam tabung 1,5 mL steril dan kemudian diisolasi DNA genom menggunakan metode *salting out* (Aljanabi dan Martinez 1997). DNA genom dari *An. vagus vagus* dan *An. vagus limosus* masing-masing diisolasi dari 5 ekor nyamuk. *Salting out extraction* merupakan larutan yang berisi 400  $\mu$ L *homogenizing* buffer (0,4 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,0 dan 2 mM EDTA pH 8,0). Setelah itu ditambahkan 40  $\mu$ L 20% SDS dan 8  $\mu$ L proteinase K, kemudian diinkubasi pada suhu 65 °C selama minimal 1 jam. Resuspensi dengan vortex dilakukan setelah ditambahkan 300  $\mu$ L NaCl 6 M. Sampel selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 30 menit. Supernatan dipindahkan ke tabung 1,5 mL steril yang baru, ditambahkan 350  $\mu$ L isopropanol dan diinkubasi pada suhu -20 °C selama 2 jam. Setelah diinkubasi, sampel disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm, 4 °C, selama 20 menit. Pelet yang didapatkan kemudian dicuci menggunakan etanol 70%, disentrifugasi kembali dengan kecepatan 10.000 rpm, 4 °C, selama 5 menit, dan dilanjutkan dengan pengeringan dalam desikator. DNA genom sampel yang diperoleh kemudian ditambahkan 50  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O steril. Hasil isolasi DNA divisualisasi pada agarose 1% dengan pewarnaan



Gambar 1. Peta lokasi sampling

ethidium bromide. Elektroforesis dilakukan selama 30 menit pada voltage 100 V dan divisualisasi menggunakan UV transilluminator.

### Amplifikasi ITS2

Sekuen ITS2 diamplifikasi dari DNA genom nyamuk dengan PCR menggunakan primer *forward* (5'TGT GAA CTG CAG GAC ACA TG 3') dan *reverse* (5' ATG CTT AAA TTT AGG GGG TA 3' (Surendran et al. 2013). Komposisi PCR yang ditambahkan adalah 1,25  $\mu$ L primer *forward* (10 pmol), 1,25  $\mu$ L primer *reverse* (10 pmol), 21,5  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O steril, 25  $\mu$ L 2x PCR master mix (GoTaq Promega, USA) dan 1  $\mu$ L DNA *template*. Kondisi PCR yang digunakan disesuaikan dengan T<sub>m</sub> primer serta mengacu pada penelitian Lobo et al. (2015) untuk meningkatkan spesifitas penempelan primer pada sekuen target, yaitu predenaturasi 94 °C 5 menit, denaturasi 94 °C 40 detik, *annealing* 45 °C 1 menit (predenaturasi sampai dengan *annealing* dilakukan 4x), *extension* 72 °C 1 menit 30 detik, denaturasi 94 °C 40 detik, *annealing* 72 °C 1 menit, *extension* 1 menit 30 detik (predenaturasi sampai dengan *annealing* dilakukan 25x), dan *final extension* 72 °C 5 menit. Hasil PCR divisualisasi menggunakan agarose 1,5%. DNA ampikon dipurifikasi menggunakan kit purifikasi *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, USA) sesuai instruksi produk.

### Sekuensing dan rekonstruksi pohon filogeni

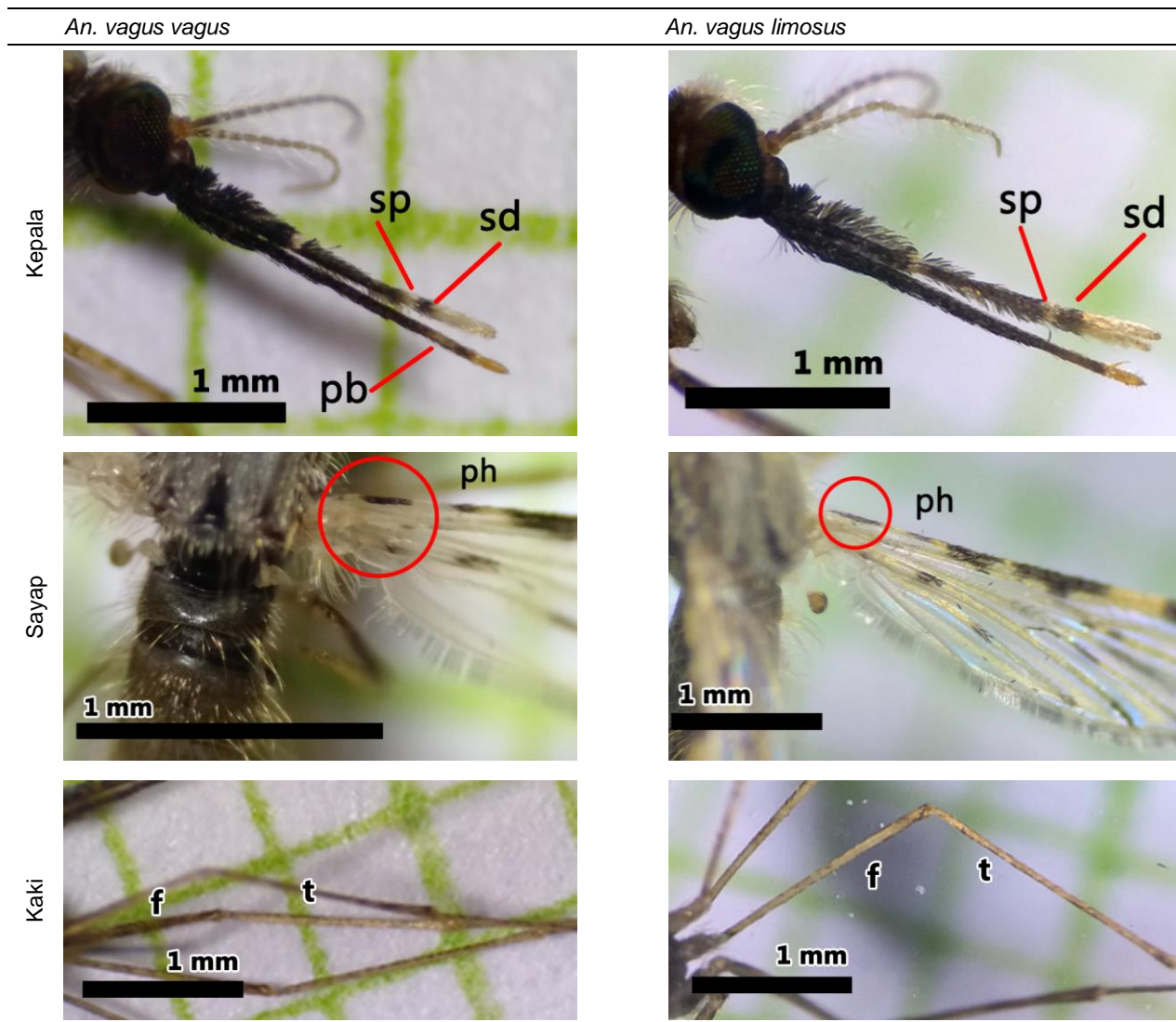
DNA ampikon kemudian disekuensing menggunakan metode Sanger dengan mengirimkan ke 1<sup>st</sup> BASE Singapura. Data hasil sekuensing diolah menggunakan software Bioedit dengan melakukan pensejajaran antara hasil pembacaan sekuen *reverse* dan *forward* untuk mendapatkan sekuen konsensusnya. Penentuan spesies *Anopheles* dilakukan dengan membandingkan basa nukleotida hasil sekuensing dengan sekuen DNA pengkode ITS2 yang ada pada database *Gene Bank* dengan menggunakan BLAST. Dari beberapa sekuen yang memiliki homologi tertinggi tersebut, kemudian dikonstruksi pohon filogenetiknya. Pensejajaran sekuen dilakukan dengan ClustalW menggunakan software MEGA (*The Molecular Evolutionary Genetic Analysis*) versi 10. Pembuatan pohon

filogeni menggunakan metode jarak *Neighbour joining tree* (NJ) dengan nilai *bootstrap* 1.000 kali pengulangan yang digunakan untuk mengestimasi variasi (Russo dan Selvatti 2018).

### HASIL DAN PEMBAHASAN

*An. vagus* berhasil diidentifikasi dari daerah sampling dengan ciri khusus adanya tiga gelang pucat pada bagian palpus dengan panjang gelang pucat apikal (*apical pale band*) kisaran 5 hingga 3 kali panjang gelang gelap sub apikal (*subapical dark band*). Ciri khusus ini tidak ditemukan pada *Anopheles* lainnya. Lebih lanjut, pada penelitian ini ditemukan 2 subspecies dari *An vagus* tersebut yaitu *An vagus vagus* dan *An vagus limosus*. Secara morfologi *An. vagus vagus* dan *An. vagus limosus* asal Bangsring Banyuwangi memiliki perbedaan di bagian probosis dan *prehumeral* sayap. Probosis *An. vagus vagus* memiliki gelang pucat di bagian ujung (setelah labelum) sedangkan *An. vagus limosus* probosis hitam seluruhnya. Adapun bagian *prehumeral* sayap kedua spesies ini juga tampak berbeda yaitu *prehumeral* sayap *An. vagus vagus* terdapat sisik putih, sedangkan *An. vagus limosus* seluruhnya hitam tanpa sisik putih. Sementara itu tidak terdapat perbedaan pada kaki kedua subspecies, yang menunjukkan warna kecoklatan. Hasil identifikasi morfologi tersebut sesuai dengan deskripsi yang disampaikan Reid (1968) tentang variasi *An vagus* di Malaya dan Kalimantan dan juga sesuai dengan Cagampang-Ramos dan Darsie (1970) yang mendeskripsikan variasi *An vagus* di Filipina. Zarowiecki et al. (2011) dalam penelitiannya menemukan variasi yang lebih banyak antara kedua subspecies *An. vagus* tersebut berkaitan dengan variasi geografi dan jenis marka molekuler yang digunakan (ITS2 dan COI). Beberapa individu nyamuk dewasa yang mereka temukan memiliki kombinasi ciri antara *An. vagus vagus* dan *An. vagus limosus* seperti terdapat individu *An. vagus* yang memiliki gelang pucat di probosis tetapi *prehumeral* sayapnya tidak seluruhnya hitam. Variasi ini tidak ditemukan pada subspecies *An. vagus* asal Bangsring Banyuwangi. Perbandingan karakter morfologi *An. vagus vagus* dan *An. vagus limosus* dapat dilihat pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Perbandingan karakter morfologi *An. vagus vagus* dan *An. vagus limosus*

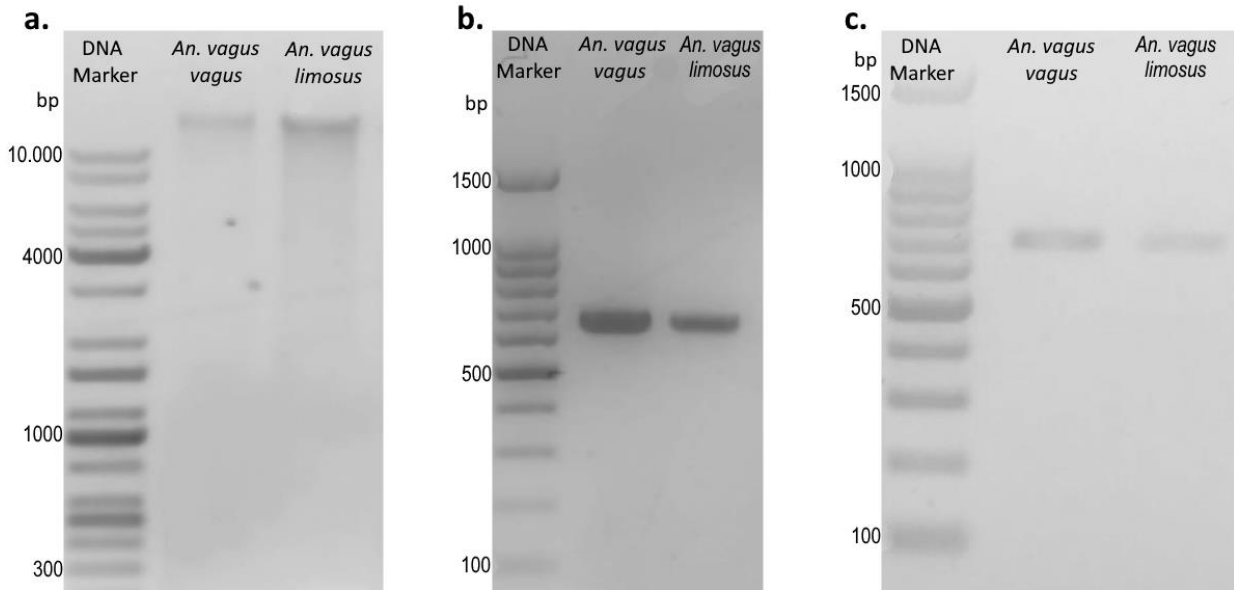


Karakterisasi molekuler dilakukan untuk mengkonfirmasi hasil identifikasi morfologi. Isolasi genom yang dilanjutkan dengan amplifikasi dengan PCR dan purifikasi produknya berhasil dilakukan sebagaimana hasil pada Gambar 2. Ukuran genom famili *Culicidae* diperkirakan ~ 240 hingga 290 Mpb (Holt et al. 2002). Visualisasi hasil isolasi genom menunjukkan keberhasilan isolasi DNA genom dan kebaikan kualitasnya karena genom utuh dan tidak terdegradasi.

Visualisasi hasil PCR menunjukkan adanya satu pita DNA dengan ukuran ~700 pb untuk kedua sub spesies *An. vagus*. (Gambar 2b). Teori menunjukkan bahwa panjang sekuen ITS2 genus *Anopheles* berkisar antara 400 – 700 pb (Zomuanpuui et al. 2013) dengan demikian, pita DNA yang

dihasilkan oleh PCR dengan primer tersebut sudah sesuai. Hal ini kemudian akan dikonfirmasi dengan hasil sekuensing produk PCR tersebut.

Analisis terhadap sekuen DNA produk sekuensing menghasilkan sekuen konsensus yang merupakan sekuen hasil penggabungan dan pensejajaran sekuen hasil amplifikasi menggunakan primer *forward* dan *reverse* sehingga didapatkan sekuen utuh. Sekuen utuh ITS2 sampel *An. vagus vagus* dan *An. vagus limosus* digunakan untuk mengkonfirmasi identitas spesies *Anopheles* yang didapatkan dengan membandingkannya dengan sekuen ITS2 pada GenBank melalui *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (Chatzou et al. 2016). Hasil BLAST online menunjukkan sekuen ITS2 *An. vagus vagus* dan *An. vagus*



**Gambar 2.** (a) Hasil isolasi genom *An. vagus vagus* dan *An. vagus limosus*, (b) Hasil amplifikasi sekuen ITS2 genom *An. vagus vagus* dan *An. vagus limosus*, (c) Hasil purifikasi produk PCR. Keterangan, *DNA ladder* = Marker 1kb (kappa) (a) dan 100bp (G-Bioscience) (b dan c); Visualisasi menggunakan *UV-Transilluminator*

**Tabel 2.** Hasil BLAST sekuen ITS2 *An. vagus vagus* dan *An. vagus limosus*

No	Nomor Akses NCBI	Similaritas		Perbedaan Basa Nukleotida				Panjang Sekuen (bp)
		<i>An. vagus vagus</i>	<i>An. vagus limosus</i>	Indel	Transversi	Transisi	Ambigu	
1	FJ654649	99%	99%	–	0	0	1	657
2	HQ873039	99%	99%	4	2	0	0	686
3	EU919718	99%	99%	4	2	1	0	679

Keterangan:

1. Sekuen ITS2 *An. vagus vagus* dan *An. vagus limosus* dalam analisis ini secara berurutan 700 bp and 677 bp
2. Dalam model analisis Kimura-2 parameter, transisi (perubahan basa nukleotida A ↔ G dan C ↔ T) nilainya berbeda dengan transversi (perubahan basa nukleotida A ↔ T, A ↔ C, G ↔ C, and G ↔ T) karena transisi lebih banyak ditemukan daripada transversi

**Tabel 3.** Estimasi evolusi divergen antar sekuen ITS2

No	Spesies	<i>An. vagus vagus</i>	<i>An. vagus limosus</i>	<i>An. vagus</i> FJ654649	<i>An. vagus</i> HQ873039	<i>An. vagus</i> EU919718
1	<i>An. vagus vagus</i>	–				
2	<i>An. vagus limosus</i>	0,0015				
3	<i>An. vagus</i> FJ654649	0,0015	0,0000			
4	<i>An. vagus</i> HQ873039	0,0029	0,0045	0,0031		
5	<i>An. vagus</i> EU919718	0,0044	0,0060	0,0046	0,0044	–

Keterangan:

1. Analisis dilakukan menggunakan model Kimura 2-parameter pada MEGAX
2. Semua posisi ambigu dihilangkan dari pasangan sekuen (pairwise deletion option)
3. Total posisi dalam dataset adalah 700 posisi

*limosus* asal Bangsring Banyuwangi memiliki tingkat homologi tinggi dengan sekuen ITS2 tiga isolat *An. vagus* pada GenBank dengan tingkat similaritas yang sama yaitu 99%. Ketiga *An. vagus* tersebut adalah *An. vagus*

dengan *accession number* FJ654649.1 asal Indonesia dan Timor Timur, HQ873039.1 asal Hattigarh-India dan EU919718.2 asal Jiangcheng-China ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) diakses Oktober 2020). Hasil analisis



#Anopheles_vagus_vagus1	GTGAAGTACA	GGACACATGA	ACACCGATAA	GTTGAACGCA	TATGGCGCAT	[ 50]
#Anopheles_vagus_limosus3	A-----	-----	-----	-----	-----	[ 50]
#Anopheles_vagus_FJ654649.1	A-----	-----	-----	-----	-----	[ 50]
#Anopheles_vagus_HQ873039.1	A-----	-----	-----	-----	-----	[ 50]
#Anopheles_vagus_EU919718.2	A-----	-----	-----	-----	-----	[ 50]
#Anopheles_vagus_vagus1	CGGACGTTTC	AACCCGACCG	ATGCACACAT	CCTTGAGTGC	CTACTAGGTA	[100]
#Anopheles_vagus_limosus3	-----	-----	-----	-----	-----	[100]
#Anopheles_vagus_FJ654649.1	-----	-----	-----	-----	-----	[100]
#Anopheles_vagus_HQ873039.1	-----	-----	-----	-----	-----	[100]
#Anopheles_vagus_EU919718.2	-----	-----	-----	-----	-----	[100]
#Anopheles_vagus_vagus1	CTGAGATTTA	ACTATGACTT	GACTACAGAC	GCCGCCACTA	AAGGGCTGAC	[150]
#Anopheles_vagus_limosus3	-----	-----	-----	-----	-----	[150]
#Anopheles_vagus_FJ654649.1	-----	-----	-----	-----	-----	[150]
#Anopheles_vagus_HQ873039.1	-----	-----	-----	-----	-----	[150]
#Anopheles_vagus_EU919718.2	-----	-----	-----	-----	-----	[150]
#Anopheles_vagus_vagus1	GGGCCATCCG	TCGTCGCGCG	TGCGACTGTG	CAGCATGGCG	TGCTCGGGTC	[200]
#Anopheles_vagus_limosus3	-----	-----	-----	-----	-----	[200]
#Anopheles_vagus_FJ654649.1	-----	-----	-----	-----	-----	[200]
#Anopheles_vagus_HQ873039.1	-----	-----	-----	-----	-----	[200]
#Anopheles_vagus_EU919718.2	-----	-----	-----	-----	-----	[200]
#Anopheles_vagus_vagus1	TCGGCGTGA	CCCTTGGGCG	CTGAAAGTGG	ACACTGTTTG	GCGGCACCTG	[250]
#Anopheles_vagus_limosus3	-----	-----	-----	-----	-----	[250]
#Anopheles_vagus_FJ654649.1	-----	-----	-----	-----	-----	[250]
#Anopheles_vagus_HQ873039.1	-----	-----	-----	-----	-----	[250]
#Anopheles_vagus_EU919718.2	-----	-----	-----	-----	-----	[250]
#Anopheles_vagus_vagus1	CGCGTGTGCT	CTCAGTGTG	ACGTATGGT	AGGGTAGTGT	CAAGTCGCAC	[300]
#Anopheles_vagus_limosus3	-----	-----	-----	-----	-----	[300]
#Anopheles_vagus_FJ654649.1	-----	-----	-----	-----	-----	[300]
#Anopheles_vagus_HQ873039.1	-----	-----	-----	-----	-----	[300]
#Anopheles_vagus_EU919718.2	-----	-----	-----	-----	-----	[300]
#Anopheles_vagus_vagus1	GGTTCGACAA	CAAGCGTACC	GTCGAGTTTG	GTGCAATCGG	ATGCCTACTA	[350]
#Anopheles_vagus_limosus3	-----	-----	-----	-----	-----	[350]
#Anopheles_vagus_FJ654649.1	-----	-----	-----	-----	-----	[350]
#Anopheles_vagus_HQ873039.1	-----	-----	-----	-----	-----	[350]
#Anopheles_vagus_EU919718.2	-----	-----	-----	-----	-----	[350]
#Anopheles_vagus_vagus1	CCATGGGCGG	TGCCGGCGTG	CATTCAACAC	ACTCGACGTC	CCGTACCAAC	[400]
#Anopheles_vagus_limosus3	-----	-----	-----	-----	-----	[400]
#Anopheles_vagus_FJ654649.1	-----	-----	-----	-----	-----	[400]
#Anopheles_vagus_HQ873039.1	-----	-----	-----	-----	-----	[400]
#Anopheles_vagus_EU919718.2	-----	-----	-----	-----	-----	[400]
#Anopheles_vagus_vagus1	CGGATGCCTG	TGAAGCGGCT	GCCGGCGCAG	ACGGGACACT	GAATTGATCT	[450]
#Anopheles_vagus_limosus3	-----	-----	-----	-----	-----	[450]
#Anopheles_vagus_FJ654649.1	-----	-----	-----	-----	-----	[450]
#Anopheles_vagus_HQ873039.1	-----	-----	-----	-----	-----	[450]
#Anopheles_vagus_EU919718.2	-----	-----	-----	-----	-----	[450]
#Anopheles_vagus_vagus1	TGGTGATATT	GGGTGGGGGA	TGATGGATGA	TGTGTGTCGC	GAGTGACAAC	[500]
#Anopheles_vagus_limosus3	-----	-----	-----	-----	-----	[500]
#Anopheles_vagus_FJ654649.1	-----	-----	-----	-----	-----	[500]
#Anopheles_vagus_HQ873039.1	-----	-----	-----	-----	-----	[500]
#Anopheles_vagus_EU919718.2	-----	-----	-----	-----	-----	[500]
#Anopheles_vagus_vagus1	CGGATGCCAG	CGATGGCGGT	GCCGGCGCAC	ACGAGCGCTC	ACACACGCCT	[550]
#Anopheles_vagus_limosus3	-----	-----	-----	-----	-----	[550]
#Anopheles_vagus_FJ654649.1	-----	-----	-----	-----	-----	[550]
#Anopheles_vagus_HQ873039.1	-----	-----	-----	-----	-----	[550]
#Anopheles_vagus_EU919718.2	-----	-----	-----	-----	-----	[550]
#Anopheles_vagus_vagus1	CTCCCCTCGG	TCGCTTGTGG	CGTGTAACGC	GTGTGATCCA	TACACTTACC	[600]
#Anopheles_vagus_limosus3	-----	-----	-----	-----	-----	[600]
#Anopheles_vagus_FJ654649.1	-----	-----	-----	-----	-----	[600]
#Anopheles_vagus_HQ873039.1	-----	-----	-----	-----	-----	[600]
#Anopheles_vagus_EU919718.2	-----	-----	-----	-----	-----	[600]
#Anopheles_vagus_vagus1	TGTTTGAAGC	GTGCGTTCGA	CGCAAGTATG	AGAGTTGCCA	GACAAACCAC	[650]
#Anopheles_vagus_limosus3	-----	-----	-----	-----	-----	[650]
#Anopheles_vagus_FJ654649.1	-----	-----	-----	-----	-----	[650]
#Anopheles_vagus_HQ873039.1	-----	-----	-----	-----	-----	[650]
#Anopheles_vagus_EU919718.2	-----	-----	-----	-----	-----	[650]
#Anopheles_vagus_vagus1	ATTCCAGTAG	GCCTCAAGTG	ATGTGTGACT	ACCCCTAAA	TTTAAGCATA	[700]
#Anopheles_vagus_limosus3	-----	-----	-----	-----	-----	[700]
#Anopheles_vagus_FJ654649.1	-----	-----	-----	-----	-----	[700]
#Anopheles_vagus_HQ873039.1	-----	-----	-----	-----	-----	[700]
#Anopheles_vagus_EU919718.2	-----	-----	-----	-----	-----	[700]

**Gambar 3.** Hasil pensejajaran sekuen ITS2 kelima sampel *Anopheles* menggunakan software Clustal X, titik = kesamaan sekuen; merah muda = insersi/delesi; kuning dan hijau = transversi/transisi.

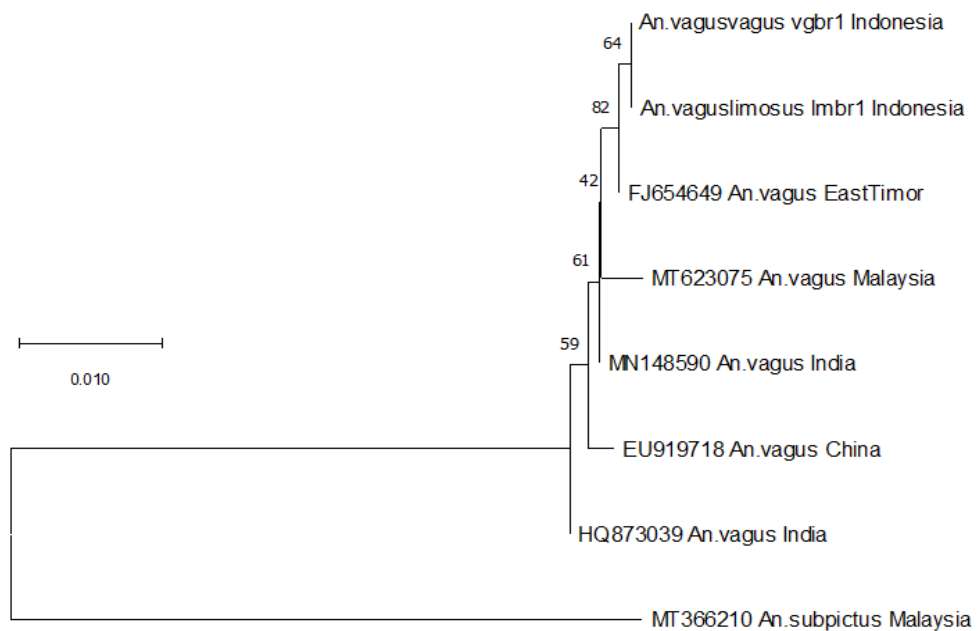
perbandingan antara sekuen ITS2 hasil penelitian ini dengan sekuen ITS2 yang memiliki homologi tertinggi dari GenBank dapat dilihat pada Tabel 2.

Hasil pensejajaran kelima sekuen ITS2 menunjukkan adanya *gap* sebanyak empat basa nukleotida yang terletak pada urutan basa nukleotida ke-459 hingga 462 antara sekuen ITS2 *An. vagus vagus*, *An. vagus limosus* hasil penelitian ini dan *An. vagus* FJ654649.1 jika dibandingkan dengan sekuen ITS2 *An. vagus* HQ873039.1 dan EU919718.2 (Gambar 3). Adanya *gap* tersebut mengindikasikan telah terjadi insersi pada sekuen ITS2. Dengan demikian sekuen ITS2 kedua sampel penelitian ini memiliki tingkat kekerabatan yang lebih tinggi dengan *An. vagus* FJ654649.1 (satu satunya dari GenBank yang memiliki insersi sama dengan sampel penelitian). Hal ini didukung juga dengan nilai transversi dan transisi 0 antara kedua sampel jika dibandingkan dengan *An. vagus* FJ654649.1 (Tabel 2).

Sekuen ITS2 *An. vagus* FJ654649.1 merupakan sampel yang didapatkan dari wilayah Jawa Timur Indonesia dan Timor Timur yang secara spesifik disebutkan memiliki karakter sekuen ITS2 yang berbeda dengan sampel sekuen ITS2 *An. vagus* asal Myanmar, Singapura, Thailand, Kamboja, Vietnam, Filipina (Zarowiecki et al. 2011). Konsistensi homologi secara genetik ini menunjukkan kekhasan vektor *An vagus*

asal Indonesia dengan adanya insersi 4 basa nukleotida tersebut. Hal ini dibuktikan lebih lanjut dengan estimasi jarak evolusi menggunakan model Kimura 2-parameter pada MEGAX (Tabel 3). ITS2 *An. vagus* FJ654649.1 memiliki jarak evolusi yang terendah dengan *An. vagus vagus* dan *An. vagus limosus* hasil penelitian ini (Kimura 1980, Kumar et al. 2018). Hal ini mengindikasikan dekatnya kekerabatan spesies tersebut dengan kedua sampel dalam penelitian ini. Dengan demikian sekuen ITS2 berhasil membedakan sampel sampai tingkat species dan sesuai dengan hasil identifikasi morfologinya.

Berdasarkan sekuen ITS2 tersebut, pohon filogenetik dapat dikonstruksi untuk membuktikan lebih lanjut hubungan kekerabatan di antara kelima isolat *An.vagus*. Pohon filogenetik dikonstruksi menggunakan metode *Neighbour Joining* dengan metode *Bootstrap* (Chatzou et al. 2016). Metode *Neighbour Joining* merupakan metode konstruksi pohon filogenetik berdasarkan tingkat similaritas sekuen (Russo dan Selvatti 2018) (Gambar 4). Berdasarkan pohon filogenetik *An. vagus* dan *An. vagus limosus* terletak dalam satu *cluster* namun demikian memiliki nilai bootstrap yang rendah yaitu 66%. Kerabat terdekat dengan kedua subspecies adalah *An. vagus* FJ654649.1 yang berasal dari Jawa Timur Indonesia dan Timor Timur



**Gambar 4.** Hasil konstruksi pohon filogeni kelima sampel dengan tingkat homologi tertinggi (Direkonstruksi menggunakan *software* MEGA6).



(Zarowiecki et al. 2011), namun demikian terletak dalam *clade* yang berbeda dan dengan nilai bootstrap yang juga tidak tinggi yaitu 82% yang mengindikasikan perbedaan dalam kecepatan evolusinya. Tingginya nilai bootstrap juga menunjukkan tingginya similaritas sekuen ITS2 yang digunakan dalam analisis pembuatan pohon filogeni. Hal ini mengindikasikan bahwa sekuen ITS2 yang digunakan belum dapat membedakan karakteristik molekuler antar subspecies dikarenakan sekuen ITS2 sangat terkonservasi secara intraspecies (Zhang et al. 2020). Oleh karena itu diperlukan marka molekuler tambahan untuk mengkonfirmasi perbedaan pada tingkat subspecies tersebut. Sekuen ITS2 untuk kedua sub-spesies kompleks asal Bangsring hasil penelitian ini telah di-*submit* pada GenBank dengan nomor akses MW314227.1 untuk *An. vagus* dan MW319822.1 untuk *An. vagus limosus*.

## KESIMPULAN

Penelitian ini berhasil mengidentifikasi secara morfologi keberadaan 2 subspecies *An. vagus* yaitu *An. vagus vagus* dan *An. vagus limosus* di daerah Bangsring Banyuwangi. Parameter penting yang digunakan di antaranya adalah karakteristik yang terdapat pada bagian probosis dan *prehumeral* sayapnya. Marka molekuler ITS2 berhasil mengidentifikasi vektor *An. vagus* dalam penelitian ini sampai tingkat spesies, sesuai dengan hasil identifikasi morfologinya. Namun demikian, rendahnya nilai bootstrap dari hasil konstruksi pohon filogeni antar subspecies menunjukkan bahwa sekuen tersebut belum dapat membedakan antar sub-spesies. Kerabat terdekat dengan kedua subspecies tersebut adalah sekuen ITS2 *An. vagus* FJ654649.1 dari sampel peneliti lain yang berasal dari Jawa Timur Indonesia dan Timor Timur. Terdapat konsistensi dalam sekuen-sekuen ITS2 *An. vagus* tersebut yaitu dengan keberadaan insersi 4 basa nukleotida pada posisi 459–462.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Hibah Penelitian Kelompok Riset (KeRis Batch I 2020) - Universitas Jember.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aljanabi SM, Martinez I (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acid Res* 25: 4692–4693. doi: 10.1093/nar/25.22.4692
- Batovska J, Cogan NOI, Lynch SE, Blacket MJ (2017) Using next-generation sequencing for DNA barcoding: Capturing allelic variation in ITS2. *G3 (Bethesda)* 7: 19–29. doi: 10.1534/g3.116.036145
- Beebe NW (2018) DNA barcoding mosquitoes: Advice for potential prospectors. *Parasitology* 145: 622–633. doi: 10.1017/S0031182018000343
- Blažejová H, Šebesta O, Rettich F, Mendel J, Čabanová V, Miterpáková M, Betášová L, Peško J, Hubálek Z, Kampen H, Rudolf I (2018) Cryptic species *Anopheles daciae* (Diptera: Culicidae) found in the Czech Republic and Slovakia. *Parasitol Res* 117: 315–321. doi: 10.1007/s00436-017-5670-0
- Bowman LR, Runge-Ranzinger S, McCall PJ (2014) Assessing the relationship between vector indices and dengue transmission: A systematic review of the evidence. *PLoS Negl Trop Dis* 8: e2848. doi: 10.1371/journal.pntd.0002848
- Cagampan-Ramos A, Darsie RF (1970) Illustrated keys to the *Anopheles* mosquitoes of the Philippine Islands. Technical Report 70–1. USAF Fifth Epidemiological Flight, San Francisco
- Chatpiyaphat K, Sumruayphol S, Dujardin JP, Samung Y, Phayakkaphon A, Cui L, Ruangsittichai J, Sungvornyothin S, Sattabongkot J, Sriwichai P (2020) Geometric morphometrics to distinguish the cryptic species *Anopheles minimus* and *An. harrisoni* in malaria hot spot villages, western Thailand. *Med Vet Entomol* 35: 293–301. doi: 10.1111/mve.12493
- Chatzou M, Magis C, Chang JM, Kemena C, Bussotti G, Erb I, Notredame C (2016) Multiple sequence alignment modeling: Methods and applications. *Brief Bioinformatics* 17: 1009–1023. doi: 10.1093/bib/bbv099

- Davidson JR, Wahid I, Sudirman R, Makuru V, Hasan H, Arfah AM, Nur N, Hidayat MY, Hendershot AL, Xiao H, Yu X, Asih PBS, Syafruddin D, Lobo NF (2019) Comparative field evaluation of kelambu traps, barrier screens and barrier screens with eaves for longitudinal surveillance of adult *Anopheles* mosquitoes in Sulawesi, Indonesia. *Parasit Vectors* 12: 399. doi: 10.1186/s13071-019-3649-7
- Fouet C, Kamdem C, Gamez S, White BJ (2017) Genomic insights into adaptive divergence and speciation among malaria vectors of the *Anopheles nili* group. *Evol Appl* 10: 897–906. doi: 10.1111/eva.12492
- Holt RA, Subramanian GM, Halpern A, Sutton GG, Charlab R, Nusskern DR, Wincker P, Clark AG, Ribeiro JMC, Wides R, Salzberg SL, Loftus B, Yandell M, Majoros WH, Rusch DB, Lai Z, Kraft CL, Abril JF, Anthouard V, Arensburger P, Atkinson PW, Baden H, de Berardinis V, Baldwin D, Benes V, Biedler J, Blass C, Bolanos R, Boscus D, Barnstead M, Cai S, Center A, Chaturverdi K, Christophides GK, Chrystal MA, Clamp M, Cravchik A, Curwen V, Dana A, Delcher A, Dew I, Evans CA, Michael Flanigan M, Grundschober-Freimoser A, Friedli L, Gu Z, Guan P, Guigo R, Hillenmeyer ME, Hladun SL, Hogan JR, Hong YS, Hoover J, Jaillon O, Ke Z, Kodira C, Kokoza E, Koutsos A, Letunic I, Levitsky A, Liang Y, Lin J-J, Lobo NF, Lopez JR, Malek JA, McIntosh TC, Meister S, Miller J, Mobarry C, Mongin E, Murphy SD, O'Brochta DA, Pfannkoch C, Qi R, Regier MA, Remington K, Shao H, Sharakhova MV, Sitter CD, Shetty J, Smith TJ, Strong R, Sun J, Thomasova D, Ton LQ, Topalis P, Tu Z, Unger MF, Walenz B, Wang A, Wang J, Wang M, Wang X, Woodford KJ, Wortman JR, Wu M, Yao A, Zdobnov EM, Zhang H, Zhao Q, Zhao S, Zhu SC, Zhimulev I, Coluzzi M, della Torre A, Roth CW, Louis C, Kalush F, Mural RJ, Myers EW, Adams MD, Smith HO, Broder S, Gardner MJ, Fraser CM, Birney E, Bork P, Brey PT, Venter JC, Weissenbach J, Kafatos FC, Collins FH, Hoffman SL (2002) The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science* 298: 129–149. doi: 10.1126/science.1076181
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16: 111–120. doi: 10.1007/BF01731581
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 35: 1547–1549. doi: 10.1093/molbev/msy096
- Lobo NF, St Laurent B, Sikaala CH, Hamainza B, Chanda J, Chinula D, Krishnankutty SM, Mueller JD, Deason NA, Hoang QT, Boldt HL, Thumloop J, Stevenson J, Seyoum A, Collins FH (2015) Unexpected diversity of *Anopheles* species in Eastern Zambia: Implications for evaluating vector behavior and interventions using molecular tools. *Sci Rep* 5: 17952. doi: 10.1038/srep17952
- Lopez-Rubio A, Suaza-Vasco J, Marcet PL, Ruiz-Molina N, Caceres L, Porter C, Uribe S (2016) Use of DNA barcoding to distinguish the malaria vector *Anopheles neivai* in Colombia. *Zootaxa* 4175: 377–389. doi: 10.11646/zootaxa.4175.4.7
- Molina-Cruz A, Zilvermit MM, Neafsey DE, Hartl DL, Barillas-Mury C (2016) Mosquito vectors and the globalization of *Plasmodium falciparum* malaria. *Annu Rev Genet* 50: 447–465. doi: 10.1146/annurev-genet-120215-035211
- Musiime AK, Smith DL, Kilama M, Rek J, Arinaitwe E, Nankabirwa JI, Kanya MR, Conrad MD, Dorsey G, Akol AM, Staedke SG, Lindsay SW, Egonyu JP (2019) Impact of vector control interventions on malaria transmission intensity, outdoor vector biting rates and *Anopheles* mosquito species composition in Tororo, Uganda. *Malar J* 18: 445. doi: 10.1186/s12936-019-3076-4
- O'Connor CT, Soepanto A (2013) Pictorial Key for Adult *Anopheles* in Indonesia and Pictorial Larvae *Anopheles* in

- Indonesia. Dirjen P2PL and P2B2. Ministry of Health Indonesia Press, Jakarta
- Ototo EN, Mbugi JP, Wanjala CL, Zhou G, Githeko AK, Yan G (2015) Surveillance of malaria vector population density and biting behaviour in western Kenya. *Malar J* 14: 244. doi: 10.1186/s12936-015-0763-7
- Reid JA (1968) Anopheline Mosquitoes of Malaya and Borneo. Institute for Medical Research Malaysia, Kuala Lumpur
- Russo CAM, Selvatti AP (2018) Bootstrap and rogue identification tests for phylogenetic analyses. *Mol Biol Evol* 35: 2327–2333. doi: 10.1093/molbev/msy118
- St Laurent B, Sukowati S, Burton TA, Bretz D, Zio M, Firman S, Sumardi, Sudibyo H, Safitri A, Suwito, Asih PB, Kosasih S, Shinta, Hawley WA, Burkot TR, Collins FH, Syafruddin D, Lobo NF (2018) Comparative evaluation of anopheline sampling methods in three localities in Indonesia. *Malar J* 17: 13. doi: 10.1186/s12936-017-2161-9
- Surendran SN, Sarma DK, Jude PJ, Kempainen P, Kanthakumaran N, Gajapathy K, Peiris LB, Ramasamy R, Walton C (2013) Molecular characterization and identification of members of the *Anopheles subpictus* complex in Sri Lanka. *Malar J* 12: 304. doi: 10.1186/1475-2875-12-304
- Weeraratne TC, Surendran SN, Karunaratne SHPP (2018) DNA barcoding of morphologically characterized mosquitoes belonging to the subfamily Culicinae from Sri Lanka. *Parasites Vectors* 11: 266. doi: 10.1186/s13071-018-2810-z
- WHO (2020) World malaria report 2020. 20 years of global progress and challenges. World Health Organization. <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2020>. Diakses 05 November 2020
- Zarowiecki M, Walton C, Torres E, McAlister E, Htun PT, Sumrandee C, Sochanta T, Dinh TH, Ng LC, Linton YM (2011) Pleistocene genetic connectivity in a widespread, open-habitat-adapted mosquito in the Indo-Oriental region. *J Biogeogr* 38: 1422–1432. doi: 10.1111/j.1365-2699.2011.02477.x
- Zhang W, Tian W, Gao Z, Wang G, Zhao H (2020) Phylogenetic utility of rRNA ITS2 sequence-structure under functional constraint. *Int J Mol Sci* 21: 6395. doi: 10.3390/ijms21176395
- Zheng XL (2020) Unveiling mosquito cryptic species and their reproductive isolation. *Insect Mol Biol* 29: 499–510. doi: org/10.1111/imb.12666
- Zomuanpuii R, Ringngheti L, Brindha S, Gurusubramanian G, Kumar NS (2013) ITS2 characterization and *Anopheles* species identification of the subgenus *Cellia*. *Acta Trop* 125: 309–319. doi: 10.1016/j.actatropica.2012.12.001