

Pengembangan diagnostik spesies kriptik pada nyamuk (Diptera: Culicidae) dengan metoda *Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)*

Budi Mulyaningsih
Bagian Parasitologi
Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada
Yogyakarta

ABSTRACT

Budi Mulyaningsih - *Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers readily distinguish cryptic mosquito species (diptera : culicidae)*

Cryptic species complexes are groups of closely related species that are difficult or impossible to be distinguished by morphological trait. These complexes are known from a wide variety of arthropods and are common among the well-studied, medically-important insects. Various methods have been developed for identifying the species of individual specimen from these complexes. Recently, the use of polymerase chain reaction (PCR) to amplify DNA has become widespread. By the development of PCR method that employs a single, 10 base-long primer of arbitrary DNA sequence, random amplified polymorphic DNA (RAPD) was used to differentiate closely related species. The problem discussed is whether the RAPD-PCR is effective to differentiate cryptic mosquito species. This method has been applied in many studies to answer the problem. It proved to be a quick effective mean of finding genetic markers to separate populations of morphologically indistinguishable mosquito.

Key words : cryptic species - mosquito - polymorphic DNA - RAPD-PCR

ABSTRAK

Budi Mulyaningsih - *Pengembangan diagnostik spesies kriptik pada nyamuk (Diptera: Culicidae) dengan metoda random amplified polymorphic DNA (RAPD)*

Spesies kriptik isomorfik atau sering disebut spesies kembar, pada tiap anggotanya terdapat sifat-sifat yang berbeda, meskipun secara morfologi sulit dibedakan satu sama lain. Keberadaan spesies tersebut diketahui secara luas pada artropoda dan khususnya pada insekta yang penting dalam bidang kesehatan. Beberapa metoda pemeriksaan telah dikembangkan untuk alat diagnostik tiap anggota spesies kriptik. Dalam perkembangan terakhir untuk diagnosis spesies digunakan pendekatan secara molekular, yaitu pemeriksaan DNA dengan teknik PCR dalam bentuk *random amplified polymorphic DNA (RAPD)*. Masalah yang akan dibahas adalah apakah metoda RAPD merupakan cara yang efektif untuk diagnostik spesies kriptik isomorfik pada nyamuk. Metoda ini telah digunakan dalam berbagai penelitian dan terbukti bahwa RAPD-PCR dapat menemukan penanda genetik untuk membedakan suatu populasi nyamuk yang secara morfologis sulit dibedakan. Dengan demikian metoda ini dapat digunakan sebagai alat diagnostik yang cepat dan efektif untuk identifikasi spesies kriptik isomorfik.

(B.I.Ked. Vol. 34, No. 2: 123-127, 2002)

PENDAHULUAN

Spesies kriptik kompleks adalah suatu grup yang hubungan antar anggotanya sangat dekat dan secara morfologi sulit atau tidak mungkin dibedakan satu sama lain¹. Keberadaan spesies kompleks tersebut telah banyak dipelajari, terutama pada insekta yang mempunyai peranan penting dalam dunia kesehatan.

Nyamuk diketahui dapat menyebarkan penyakit pada manusia jauh lebih banyak daripada artropoda lain. Diperkirakan nyamuk *Anopheles* saja bertanggungjawab pada hampir 500 juta kasus malaria setiap tahun². Kebanyakan vektor malaria yang penting adalah anggota dari spesies kompleks yang secara morfologi sulit dibedakan, misalnya *maculipennis* group^{3,4}, *quadrimaculatus complex*⁵, *dirius complex*⁶, dan *gambiae complex*⁷. Keberadaan spesies kriptik ini sering mengacaukan penelitian epidemiologi, ekologi, dan taksonomi. Kesulitan dalam identifikasi spesies kriptik ini dapat membawa kesulitan pula pada program pemberantasan penyakit yang ditularkannya. Nyamuk yang seharusnya berbeda spesies dengan sifat yang berbeda pula, dalam pengendalian penyakit yang ditularkannya sering dianggap sama. Dengan demikian maka penelitian sering tidak memberi hasil seperti yang diharapkan. Berbagai pengalaman menunjukkan bahwa kegagalan pengendalian penyakit yang ditularkan melalui gigitan nyamuk, seperti halnya pada penyakit malaria, sering kali dapat dikaitkan dengan keadaan vektornya yang merupakan kompleks spesies kriptik⁸.

Banyak metoda telah dikembangkan sebagai alat diagnostik untuk mengidentifikasi spesies dari spesimen individual dari kompleks tersebut, meskipun sampai kini yang masih banyak digunakan adalah metoda *allozymes* dan kromosom politen. Secara teknis metoda tersebut tidak mudah dilakukan sehingga kurang menguntungkan. Untuk mengatasi kekurangan tersebut selanjutnya dikembangkan cara diagnostik lain yang juga dimaksudkan spesifik untuk spesies, dan dalam perkembangan terakhir dilakukan dengan pendekatan secara molekular, yaitu metoda yang berdasarkan pada analisis DNA. Metoda yang berdasarkan pada analisis DNA mempunyai banyak kelebihan sebab tidak dipengaruhi oleh jenis kelamin

maupun stadium dari sampel yang diperiksa; selain itu DNA dapat diperoleh dari sampel yang telah disimpan dengan berbagai cara penyimpanan.

Pada dasa warsa ini beberapa metoda identifikasi spesies yang berdasarkan analisis DNA telah dikembangkan, termasuk cara hibridisasi yang berdasarkan pada sekuen spesies-spesifik yang berulang dan analisis fragmen produk teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR), yang menggunakan primer ganda yang spesifik⁹. Meskipun demikian cara ini masih membutuhkan informasi sekuen sebagai pertimbangan dari sampel yang diperiksa.

William *et al.*¹⁰ dan Welsh & Mc Clelland¹¹ mengembangkan suatu cara baru untuk mendapatkan penanda genetik yang tidak tergantung pada informasi sekuen dari sampel yang diperiksa. Cara ini disebut *random amplified polymorphic DNA* (RAPD) yang merupakan pengembangan dari teknik PCR. Pada teknik tersebut digunakan primer tunggal untuk melipatgandakan fragmen DNA genom nyamuk secara acak. Primer itu berupa oligonukleotid berantai pendek (biasanya terdiri atas 10 basa) tanpa harus mengetahui urutan nukleotid genom nyamuk yang diperiksa. Fragmen-fragmen nukleotid nyamuk yang diperiksa diharapkan dapat bereaksi dengan primer yang sesuai. Produk RAPD-PCR yang berupa fragmen-fragmen harus dianalisis untuk mengetahui tingkat persamaan atau tingkat perbedaan dari nyamuk yang diperiksa sehingga dapat diketahui hubungan kekerabatannya.

Keuntungan dari teknik RAPD-PCR adalah prosedurnya cepat, beberapa sampel dapat dikerjakan secara simultan, bahan sampel yang diperiksa bisa sangat kecil (sedikit), misalnya bagian sayap dari nyamuk saja sehingga bagian yang lain dapat digunakan untuk pemeriksaan lainnya¹². Dari latar belakang tersebut timbul suatu permasalahan apakah metoda RAPD-PCR dapat digunakan sebagai alat diagnostik spesies kriptik isomorfik pada nyamuk yang lebih baik jika dibandingkan dengan metoda-metoda yang sudah dipakai sebelumnya.

Tujuan dari tulisan ini adalah membahas pemanfaatan metoda RAPD-PCR apakah efektif sebagai alat diagnostik spesies kriptik isomorfik pada nyamuk.

PEMBAHASAN

1. Isolasi DNA

Untuk isolasi DNA nyamuk digunakan metoda dari Hoelzel¹³, yaitu metoda CTAB (*Cetyl Trimetil Amonium Bromide*) dengan sedikit modifikasi penambahan proteinase K ke dalam larutan bufer lisis dan sodium asetat diganti dengan amonium asetat¹⁴. Nyamuk yang dipakai adalah nyamuk dewasa utuh yang dipreservasi pada suhu -70°C atau dibekukan dalam nitrogen cair.

2. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Pada prisipnya PCR dikerjakan menurut cara dari Williams *et al.*¹⁰, dengan sedikit modifikasi. Setiap produk PCR yang diperoleh divisualisasikan dengan elektroforesis (1,2% agarose gel dalam *Tris-boric acid- EDTA buffer*). Elektroforesis dijalankan selama lebih kurang 3,5 jam pada 30 Volt.

Analisis produk PCR: semua fragmen DNA nyamuk yang telah digandakan diskor berdasarkan ada atau tidaknya fragmen DNA tersebut. Fragmen yang ada diberi nilai 1 dan yang tidak ada diberi nilai 0. Data tersebut dianalisis dengan 2 jalan yaitu analisis secara kualitatif dan kuantitatif. Koefisien kesamaan antara pasangan objek yang diperbandingkan ditentukan dengan koefisien kesamaan Simple Matching. Berdasarkan koefisien kesamaan tersebut dibuat dendogram dengan metoda UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages*). Berat molekul fragmen hasil amplifikasi dihitung pasangan basanya dengan berpedoman kepada migrasi DNA standar (*Lamda Hind*) yang telah dipotong dengan enzim *Eco RI* dan *Hind III*.

Fragmen DNA yang selalu hadir pada semua sampel nyamuk yang dibandingkan disebut fragmen DNA yang monomorfisme, sedangkan fragmen DNA yang hanya hadir pada beberapa sampel yang dibandingkan disebut fragmen DNA yang polimorfisme. Penghitungan pola fragmen DNA monomorfisme dan polimorfisme antara sampel nyamuk dalam setiap lokasi dilakukan dengan jalan membandingkan pola fragmen DNA yang selalu hadir dan fragmen DNA yang hanya hadir pada beberapa sampel per lokasi. Semua penghitungan di atas dilakukan untuk setiap primer yang digunakan.

Wilkerson *et al.*¹⁵ telah melakukan diferensiasi pada nyamuk vektor malaria di Afrika yaitu *Anopheles gambiae* dan *Anopheles arabiensis* (masing-masing spesies nyamuk diperiksa 30 ekor) dengan menggunakan 37 macam RAPD primer, dan telah dihasilkan 377 macam pita DNA. Dari pita-pita tersebut ternyata sebanyak 295 pita di antara kedua spesies tersebut berbeda. Dari primer-primer yang digunakan tersebut ternyata ada 7 primer yang menghasilkan pita-pita yang dapat digunakan sebagai diagnostik. Wilkerson *et al.*¹⁶ dengan cara tersebut juga telah melakukan diferensiasi nyamuk *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* dari Paraguay, Argentina dan Brazil, yang diketahui sebagai spesies kompleks, dan secara genetik menunjukkan ada 4 spesies yang berbeda.

Kambhampati *et al.*¹² telah melakukan identifikasi terhadap 5 spesies nyamuk *Aedes*, dari hasil penelitian tersebut diketahui bahwa beberapa fragmen DNA yang dihasilkan merupakan spesifik untuk tiap spesies dan muncul pada setiap individu yang diperiksa, dan hubungan kekerabatan dari 5 spesies nyamuk *Aedes* yang diperiksa dapat juga diketahui.

Mary *et al.*¹⁷, telah berhasil membedakan dan mengidentifikasi nyamuk *Aedes aegypti* yang berasal dari 11 populasi geografik. Dengan menggunakan 3 macam primer tunggal dapat diketahui bahwa 89% benar sampel yang diperiksa berasal dari populasi geografis yang berbeda, dan 100% benar bahwa sampel yang berbeda terdiri atas 2 subspecies yang berbeda yaitu *Ae. aegypti aegypti* dan *Ae. aegypti formosus*.

Evita¹⁴ telah memeriksa nyamuk *Ae. aegypti* yang berasal dari beberapa daerah di Bandung. Hasil tersebut menunjukkan bahwa secara kualitatif tingkat polimorfisme antar individu pada setiap lokasi seperti Sukajadi 74%, Padasuka 80%, Cibiru 72%, dan Tamblong 66%. Hasil analisis tingkat polimorfisme berdasarkan seluruh lokasi sampel yang berasal dari Bandung adalah Sukajadi 94,6%, Padasuka 95,3%, Cibiru 94,1%, dan Tamblong 94,0%. Hasil analisis pita DNA secara kuantitatif menunjukkan bahwa nyamuk yang berasal dari beberapa daerah di Bandung membentuk kelompok yang terpisah dengan nyamuk yang berasal dari NAMRU (Jakarta).

Efriwati¹⁸ meneliti nyamuk *Ae. aegypti* yang berasal dari daerah Bandung, Padang, dan beberapa

daerah di Yogyakarta. Hasil pemeriksaan tersebut menunjukkan bahwa tingkat polimorfisme dari daerah Donoharjo (Yk) 64,4%, Balai catur (Yk) 51,5%, Muja-muju (Yk) 48,0%, Condong Catur (Yk) 40,2%, Padang 41,7%, dan Bandung 45,2%.

Hasmiwati¹⁹ memeriksa nyamuk *Anopheles balabacensis* yang berasal dari Sarolangun Bangko (Jambi) dan Purworejo (Jawa Tengah). Hasil pemeriksaan tersebut menunjukkan bahwa analisis tingkat polimorfisme pita DNA secara kualitatif dari seluruh sampel yang diperiksa menunjukkan yang berasal dari Purworejo 97,0% dan dari daerah Bangko 97,0%. Analisis pita DNA secara kuantitatif menunjukkan bahwa nyamuk yang berasal dari Bangko mengelompok terpisah dari nyamuk yang berasal dari Purworejo, dengan hubungan tingkat kekerabatan rendah (indeks similaritas kurang dari 50%)

Dewasa ini telah banyak dilakukan penelitian yang menggunakan teknik RAPD-PCR untuk studi keanekaragaman genetik, hubungan kekerabatan genetik, peta genetik, sidik jari DNA, dan populasi genetik serangga. Hasil pengembangan teknik tersebut sangat membantu memecahkan masalah taksonomi dan biologi populasi serangga. Untuk nyamuk cara ini menghasilkan amplifikasi DNA yang cukup baik.

Dari hasil elektroforesis terlihat bahwa fragmen DNA genom nyamuk hasil amplifikasi bermigrasi dengan jarak yang berbeda-beda sehingga terlihat sebagai pita-pita DNA. Ada pita yang sangat tebal dan jelas, dan ada yang hanya tipis dan terlihat samar-samar. Keadaan ini kadang-kadang menyulitkan pada waktu analisis hasil amplifikasi DNA, namun demikian dapat diatasi dengan cara hasil elektroforesis sesudah difoto langsung diplotkan dengan plastik transparan dan pita-pita yang terbentuk langsung digambar pada transparan tersebut. Hal ini untuk menghindari hilangnya pita-pita yang tipis atau samar-samar.

Adanya pita-pita DNA yang bervariasi intensitasnya disebabkan jumlah copy yang diamplifikasi mewakili suatu pita (lokus RAPD) tidak sama, ada yang berulang cukup banyak sehingga pita yang terbentuk cukup tebal dan jelas dan ada yang berulang hanya beberapa saja sehingga pita yang terbentuk tipis dan samar-samar. Perbedaan ini terjadi karena adanya variasi dalam jumlah copy pada lokus yang diamplifikasi oleh suatu kombinasi

khusus antara primer dan template, atau karena adanya perbedaan dalam jumlah copy dengan adanya urutan pengulangan tandem yang bisa diamplifikasi suatu lokus²⁰.

Selain hal tersebut di atas perbedaan intensitas ini dapat juga disebabkan karena metode RAPD-PCR tidak bisa membedakan antara DNA yang homozigot (2 copy) dan yang heterozigot (1 copy) dengan pasti. Pita DNA dengan laju migrasi yang sama (*comigrasi*) juga sulit ditentukan apakah fragmen tersebut benar-benar merupakan lokus yang homolog. Sesuai dengan pendapat Smith *et al.* Cit. Grasberg *et al.*²⁰ yang menyatakan bahwa migrasi yang sama tetapi berbeda alel atau non homolog alel di dalam suatu individu yang sama (di lajur yang sama pada gel) akan menghasilkan pita-pita yang terdiri atas 2 atau lebih produk amplifikasi.

Pita-pita yang dihasilkan oleh suatu primer untuk semua individu yang diuji banyaknya atau jumlahnya sangat bervariasi. Hal ini terjadi karena masing-masing primer mempunyai urutan nukleotida yang berbeda sehingga daerah perlekatan masing-masing primer di sepanjang genom juga akan berbeda, dan daerah yang diamplifikasi juga akan berbeda. Akibat dari keadaan ini maka jumlah dan panjang fragmen yang dihasilkan berbeda antara satu primer dengan primer yang lain. Grosberg *et al.*²⁰ menyatakan jumlah fragmen yang diamplifikasi oleh suatu primer tergantung pada jumlah daerah perlekatan primer pada genom individu tersebut. Biasanya suatu primer dapat mengamplifikasi 0-30 macam fragmen amplifikasi.

Apabila dilihat dari satu jenis primer yang mengamplifikasi beberapa individu, terlihat jumlah fragmen yang dihasilkan juga bervariasi sekali. Pita-pita yang mewakili suatu fragmen DNA yang dihasilkan oleh suatu primer bisa muncul pada suatu individu tetapi tidak pada individu yang lain atau sebaliknya, dan begitu juga untuk kelompok individu tertentu.

SIMPULAN

1. RAPD-PCR merupakan suatu teknik yang dapat mengidentifikasi polimorfisme DNA dengan cepat dan efektif.
2. Teknik RAPD-PCR dapat digunakan untuk analisis genetik untuk tujuan diagnostik spesies kriptik kompleks.

KEPUSTAKAAN

1. Collin, FH and Paskewitz, S.M. A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic *Anopheles* species. *Insect Mol. Biol.* 1996; 5(1): 1-9.
2. Struchler, D. How much malaria is there worldwide? *Parasitol Today.* 1989; 5: 39-40.
3. Guy, Y., Salleres, A. and Boesiger, E. Contribution a l'elude du 'Complexe Maculipennis'(Diptera-Culicidae-*Anophelinae*). Mise au point en 1975. *Annee Biol.* 1976; 15: 227-82.
4. White, G.B. *Anopheles bwambae* sp. n., a malaria vector in the Semliki Valley, Uganda, and its relationships with other sibling species of the *An. gambiae* complex (Diptera - Culicidae). *Syst Entomol.* 1978; 10: 501-522.
5. Mitchell, S.E., Narang, S.K., Cockburn, A.F., Seawright, J.A. and Goldenthan, M. Mitochondrial and ribosomal variation among members of the *Anopheles quadrimaculatus* (Diptera : Culicidae) species complex. *Genome* (in pres), 1993.
6. Peyton, E. L. and Ramalingam, S. *Anopheles* (Cellia) nemophilous, anew species of the Leucosphyrus Group from Peninsular Malaysia and Thailand (Diptera : Culicidae). *Mosq Syst.* 1988; 20: 272-99.
7. White, G.B. Systematic reappraisal of the *Anopheles maculipennis* complex. *Mosq Syst.* 1985; 10: 13-44.
8. Hackett, L.W. *Malaria in Europe.* Oxford University Press, 1937.
9. Paskewitz, S.M. and Collins, F.H. Use of the *polymerase chain reaction* to identify mosquito species of the *Anopheles gambiae* complex. *Med Vet Entomol.* 1990; 4: 367-73.
10. Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livax, K.J., Rafalski, J.A., and Tingey, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic marker. *Nucl. Acids Res.* 1990; 18: 6531-5.
11. Welsh, J. and McClellan, M. Finger printing genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl Acids Res.* 1990; 18: 7213-8.
12. Kambhampati, S., Black, W.C., Rai, K.S. Random Amplified Polymorphic DNA of Mosquito Species and Populations (Diptera, Culicidae) : Techniques, Statistical Analysis, and Applications. *J. Med. Entomol.* 1992; 29(6): 939-45.
13. Hoelzel, A.R. Molecular genetic analysis of populations, A practical approach. IRL Press, Oxford University Press, 1994: 71-74.
14. Evita Anggereini. Analisis tingkat keanekaragaman genetik nyamuk *Aedes aegypti* dari Kotamadya Bandung dengan menggunakan metoda random amplified polymorphic DNA (RAPD). Thesis S2 Program Pasca Sarjana ITB, 1998.
15. Wilkerson, R.C., T. J. Persons, D.G. Albright, T.A.Klein, and M.J. Braund. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers readily distinguish cryptic mosquito species (Diptera : Culicidae: Anopheles) . *Ins. Mol. Biol.* 1993; 1: 205-211.
16. Wilkerson, R.C., T. J. Persons, T.A.Klein, T. V. Gaffican, E. Berco and J. Consolim. Diagnosis by random amplified polymorphic DNA *Polymerase Chain Reaction* of four cryptic species related to *Anopheles (Nyssorhynchus) albitaris* (Diptera : Culicidae) from Paraguay, Argentina, and Brazil. *J. Med. Entomol.* 1995; 32(5): 697-704.
17. Mary, E., Ballinger-Crabtree, Black IV, W.C., Miller, B.R. Use of Kambhampati, S., Black, W.C., Rai, K.S. Random Amplified Polymorphic DNA of mosquito species and populations (Diptera, Culicidae) : Techniques, statistical analysis, and applications. *J. Med. Entomol.* 1992; 29(6): 939-45.
18. Efriwati. Analisis polimorfisme genetik *Aedes aegypti* dari daerah endemis dan non endemis DBD dengan RAPD-PCR. Thesis S2 Pasca Sarjana UGM, 1999.
19. Hasmiwati. Analisis genetik *Anopheles balabacensis Baisas* (Diptera : Culicidae) dari Daerah Bangko (Jambi) Dan Purworejo (Jateng) dengan menggunakan metode *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD-PCR). Thesis S2 Pasca Sarjana UGM, 2000.
20. Grosberg, R. K., Levitan, D.R. and Cameron, B.B. Characterization of genetic structure and genealogies RAPD-PCR Markers : A random primer for the novice and nervous, dari Fawrrais J. D. and Palumbi, S.R., *moleculer zoology, advances, strategies and protocols*, John Willey & Sons, Inc, Publication, New York. 1996; 67-132.