

## **Kekerabatan Genetik Caplak *Rhiphicephalus (Boophilus) microplus* Asal Indonesia Berdasarkan Sekuen *Internal Transcribed Spacer-2***

**(GENETIC RELATIONSHIP INDONESIAN RHIPHICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS TICK BASED ON INTERNAL TRANSCRIBED SPACER-2 SEQUENCE)**

**Ana Sahara<sup>1</sup>, Joko Prastowo<sup>1</sup>, Rini Widayanti<sup>2</sup>, Kurniasih<sup>3</sup>, Wisnu Nurcahyo<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Bagian Parasitologi, <sup>2</sup>Bagian Biokimia, <sup>3</sup>Bagian Patologi,  
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, jln Fauna No 2, Yogyakarta,  
55281 Email: sahara@ugm.ac.id

### **Abstrak**

*Rhiphicephalus (Boophilus) microplus (R. microplus)* merupakan ektoparasit yang merugikan karena selain mengisap darah, berperanan sebagai vektor *Babesia sp.*, *Theileria sp.* dan *Anaplasma sp.* pada ternak sapi. Beragamnya jenis dan adanya kompleks spesies yang berkerabat dekat seringkali identifikasi secara morfologi tidak mudah dilakukan, sehingga diperlukan metode molekuler. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui urutan sekuen *Internal Transcribed Spacer-2 (ITS2)* dari *R. microplus*, yang dapat digunakan untuk identifikasi, dan mengetahui hubungan kekerabatan genetik caplak asal Indonesia. Amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan primer BOO2 *forward* dan BOO2 *reverse*. Fragmen daerah ITS2 sepanjang 1099 nt diperoleh dari hasil penjajaran berganda nukleotida sampel *R. microplus* dengan sekuen dari caplak lain yang diambil dari *Genebank* menggunakan perangkat lunak *Clustal W*, dan selanjutnya dianalisis menggunakan program MEGA versi 6. Jarak genetik berdasarkan sekuen nukleotida ditentukan dengan metode Kimura 2-parameter, menghasilkan jarak genetik intra spesies terkecil 0%, paling tertinggi 1,2%, dan rataannya 0,33%. Konstruksi pohon filogenetik berdasarkan sekuen ITS2 menggunakan metoda *Neighbour joining* dapat membedakan inter dan intra spesies caplak. Caplak dari berbagai wilayah yang ada di Indonesia adalah kompleks spesies yang memiliki kekerabatan lebih dekat dengan *R. microplus* asal India, Laos, Afrika Selatan, China, dan *R. australis* asal Australia.

Kata-kata kunci: caplak, ektoparasit, *Rhiphicephalus (Boophilus) microplus*, ITS2

### **ABSTRACT**

*Rhiphicephalus (Boophilus) microplus* is important obligatory blood feeding ectoparasites transmitting many different viral, bacterial and protozoan and plays a role as a vector of *Babesia sp.*, *Theileria sp.* and *Anaplasma sp.* in cattle. The accuracy in identifying and distinguishing interspecies and intraspecies diversity among parasites is needed to understand the epidemiology, biology and capacity as a vector. Variations in the DNA base sequence of the internal transcribed spacer region2 (ITS 2) has been used as a molecular marker for identification in an effort to determine phylogenetic relationships. The aim of this study was to determine the ITS 2 gene nucleotide sequence of *R. microplus*, which was expected to be useful for accurate identification the parasite diversity and phylogenetic relationship among many different species. DNA amplification was conducted using BOO2 forward dan BOO2 reverse primers. The DNA samples containing ITS2 region fragment of 1099 nt were derived from the nucleotide sequence multiple alignments of *R. microplus* and other ticks genes obtained from Gene bank using *Clustal W* software, and then analyzed using the MEGA program version 6. Genetic distances based on nucleotide sequence were determined with Kimura 2-parameter method producing the smallest genetic distance of 0 % and 1.2 %. Construction of phylogenetic trees using the Neighbor joining method showed that ticks from various regions in Indonesia was species complex which have a closer with *R. microplus* isolates from India, Laos, South Africa, China and Australia *R. australis* origin.

*Key words:* Tick, Ectoparasite, *Rhiphicephalus (Boophilus) microplus*

### PENDAHULUAN

Caplak *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* dikelompokkan dalam genus *Boophilus*, famili Ixodidae, ordo Acarina, kelas Arachnida, subfilum Chelicerata (Hoogstraal dan Aeschlimann, 1982). Caplak *R. (Boophilus) microplus (R. microplus)* merupakan salah satu ektoparasit yang secara ekonomis penting, karena menyebabkan kerugian pada ternak. Caplak tersebut berparasit terutama pada sapi-sapi yang ada di wilayah Asia Timur, Asia Selatan, Asia Tenggara, Australia, Amerika Tengah, Amerika Selatan, Afrika Timur, Afrika Selatan (Kolonin, 2009). Serangan caplak umumnya terjadi karena ternak dipelihara secara ekstensif dan tidak dikandangkan. Caplak *R. microplus* merupakan caplak yang menyerang ternak sapi, kerbau dan hewan liar dengan distribusi luas tersebar di berbagai wilayah di Indonesia (Sigit et al., 1983). Selain mengisap darah dan menyebabkan kerusakan kulit, menurut Bock et al. (2008), caplak *R. microplus* terbukti sebagai penyebar babesiosis (*Babesia bovis* dan *B. bigemina*) dan anaplasmosis (*Anaplasma marginale*) (Peter et al., 2005; De la Fuente et al., 2008), terutama pada ternak sapi. Data prevalensi babesiosis di wilayah Kalimantan, Sulawesi, Sumatra, dan Timor berdasarkan hasil pemeriksaan serologi adalah 96% (Sukanto et al., 1993)

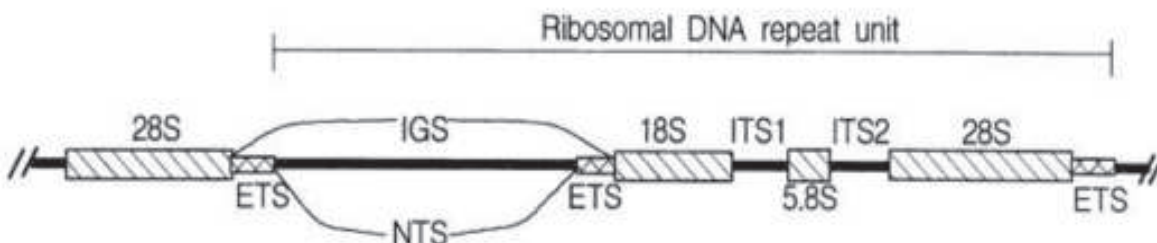
Caplak *R. microplus* pertama kali dideskripsikan oleh Canestrini dengan nama *Boophilus micropla* (Cooley, 1946). Setelah nama tersebut, caplak ini mempunyai beberapa nama sinonim, tergantung pada pencirian yang dideskripsikan oleh penelitiannya di masa itu. Beberapa nama-nama yang diberikan pada caplak ini di antaranya adalah : *Haemaphysalis micropla*, *Rhipicephalus micropla* (Canestrini, 1890), *Boophilus australis* (Fuller, 1901), *Margaropus annulatus australis* (Fuller, 1912).

Nama *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ditetapkan sebagai nama sinonim caplak *B. microplus* berdasarkan urutan sekuen nukleotida dan analisis morfologinya, terungkap bahwa genus *Rhipicephalus* pengelompokannya bersifat parafiletik (berbeda tetua/ancestor), genus *Boophilus* ada di dalam kelompok genus *Rhipicephalus*, sehingga posisi genus *Boophilus* berubah menjadi subgenus *Rhipicephalus* atau *Boophilus* (Murell et al., 2000; Beati dan Keirans, 2001, Murell dan Barker, 2003)

Sebagian genus caplak merupakan kompleks spesies yang berkerabat dekat, seringkali membuat identifikasi tidak mudah, terlebih lagi pada spesimen yang mengalami kerusakan, pada stadium pradewasa ataupun pada caplak yang kenyang darah (Nava et al., 2009). Adanya kelemahan karakter morfologi tersebut, mendorong digunakannya metode molekuler, karena karakter urutan basa DNA diketahui relatif lebih konsisten dibandingkan karakter morfologi (Hillis et al., 1996). Urutan basa DNA dapat pula digunakan untuk membangun hubungan filogenetik atau mengungkap kekerabatan di dalam jenis (intra spesies) dan dengan jenis-jenis lainnya (interspesies).

Pada DNA inti eukariot terdapat sekuen gen yang lestari (*conerved*) yaitu gen penyandi untuk komponen RNA ribosom 18S, 5.8S dan 28S (Gambar 1).

Di antara sekuen penyandi tersebut dipisahkan oleh *spacer* (pembatas), yaitu daerah yang disebut *Internal Transcribed Spacer* (ITS1 dan ITS2) (Hillis dan Dixon, 1991; Rumer et al., 2011). Sekuen rDNA regio ITS berkembang lebih cepat dan memungkinkan terjadinya keragaman di antara spesies maupun populasi. Urutan sekuen ITS2 dari *R. microplus* asal Indonesia belum banyak diteliti. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui urutan sekuen



Gambar 1 Gen rDNA multikopi yang berulang secara tandem (Hwang dan Kim, 1999).

IGS= intergenic spacer

NTS= non transcriber spacer

ETS = External transcriber spacer

ITS = Internal transcriber spacer

ITS2 dari *R. microplus* sebagai salah satu metode identifikasi spesies dan mengetahui hubungan kekerabatannya berdasarkan variasi sekuen-sekuennya dengan cara membandingkannya terhadap sekuen sekuen asal negara lain.

### METODE PENELITIAN

Sampel yang digunakan adalah 10 larva caplak *R. microplus* dan *R. pilans*. Caplak *R. pilans* digunakan sebagai sampel pembandingan, karena mirip *R. microplus*. Larva diperoleh dari hasil menetas telur – telur yang dikeluarkan oleh caplak betina *engorged* (kenyang darah). Caplak betina ini diperoleh dari ternak sapi simpo (simmental dan peranakan PO), sapi PO, sapi Bali dan kerbau (*Bubalus sp*) (Tabel 1). Caplak betina tersebut diteguhkan dengan kunci identifikasi Anastos (1950).

Isolasi dan purifikasi DNA dilakukan menggunakan kit *Genomic® DNA Mini Kit (Tissue) GT 100*. Larva dimasukkan dalam tabung 2 mL, kemudian dihaluskan dengan *plastic pestle*. Hasil gerusan ditambah 20 µL Proteinase K dan buffer digesti yang ada pada kit, kemudian diinkubasi pada suhu 55°C dalam penangas air selama satu malam. Proses selanjutnya dilakukan sesuai prosedur. Hasil isolasi DNA dideteksi dengan diimigrasikan pada gel agarosa 1,2% dengan menggunakan buffer 1xTBE (89 mM Tris, 89mM asam borak dan 2 mM EDTA, pH 8,0). Pengamatan DNA

dilakukan dengan bantuan sinar *ultra violet* (λ = 260 nm) setelah gel diwarnai dengan *cybersave* (Invitrogen).

Amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan primer *forward* BOO2 (BOOF) dan primer *reverse* BOO2 (BOOR). Desain primer oligonukleotida untuk sekuen ITS2 dilakukan berdasarkan *database* urutan *R. microplus* (Kode akses Genbank NC\_002811). Program primer 3 *output* ([http://www.genome.wi.mit.edu/cgi.in/primer3.cgi/results\\_from-primer3](http://www.genome.wi.mit.edu/cgi.in/primer3.cgi/results_from-primer3)) digunakan sebagai dasar untuk menyeleksi primer-primer mana saja yang diperkirakan memberikan kemungkinan hasil yang baik. Pasangan primer yang dipilih berasal dari sekuen urutan ITS2 yang memiliki kesamaan nukleotida yang tinggi. Selanjutnya primer dianalisis menggunakan *software Design Oligoprimers*. Urutan basa primer untuk mengamplifikasi sekuen ITS2 disajikan pada Tabel 2. Total DNA hasil ekstraksi digunakan sebagai cetakan DNA untuk proses amplifikasi, menggunakan *Polymerase chain reaction* (PCR). Amplifikasi dilakukan dengan volume total 50 µL terdiri dari 25 µL campuran pereaksi PCR Kappa, 3 µL DNA (100-300ng) / DNA template, 2 µL primer BOO2 F dan BOO2 R (10 pmol) dan 20 µL ddH<sub>2</sub>O.

Amplifikasi dimulai dari denaturasi awal selama lima menit pada suhu 94°C, selanjutnya diikuti dengan 94°C selama 30 detik untuk denaturasi, 55°C selama 45 detik untuk penempelan primer (*annealing*), 72°C selama satu menit 20 detik untuk pemanjangan

Tabel 1. Daftar spesimen yang digunakan sebagai sampel penelitian.

Spesies	Asal	Jumlah sampel	Inang
<i>R. microplus</i>	Makassar, Sulawesi Selatan	1	Sapi
<i>R. microplus</i>	Banjarmasin, Kalimantan Selatan	2	Sapi
	Banjarmasin, Kalimantan Selatan	1	Kebau
<i>B. microplus</i>	Papua	1	Sapi
<i>B. microplus</i>	Suka Bumi, Jawa Barat	1	Sapi
	Tanah Toraja, Sulawesi Selatan	1	Kerbau
<i>R. microplus</i>	Denpasar, Bali	1	Sapi
<i>R. microplus</i>	Lombok, Nusa Tenggara Barat	1	Sapi
<i>R. microplus</i>	Kupang (Kupang 1, 2 dan 3)	3	Sapi
	Kupang	1	Kebau
<i>R. microplus</i>	Riau	1	Sapi
<i>R. microplus</i>	Bengkulu	1	Sapi
<i>R. microplus</i>	Tanah laut, Kalimantan Selatan	1	Sapi
<i>R. pilans</i>	Sukabumi, Jawa Barat	1	Sapi
Total spesimen		17	

Tabel 2. Susunan basa primer, *annealing* dan *melting temperature* primer BOO2F dan BOO2R

Primer	Susunan basa	ΣBasa	Tm (°C)	Ta (°C)
BOO2F	5' GTC TGA GGG TCG GAT CAC AT 3'	20	60.5	55
BOO2R	5' CTA CTC GGG GAA TCC CTG TT 3'	20	60.5	55

Keterangan BOO2F = primer *forward*  
BOO2R= Primer *reverse*

Tm= *Temperature melting*  
Ta= *Temperatur annealing*

(*elongation*); amplifikasi dilakukan sebanyak 35 siklus kemudian diakhiri lima menit pada 72°C. Produk PCR dideteksi dengan cara dimigrasikan pada gel agarosa 1,2% dengan buffer TBE. Pengamatan dilakukan dengan bantuan sinar UV ( $\lambda = 260$  nm) setelah gel diwarnai dengan *cybersave*. Penanda DNA dengan ukuran 100 pb digunakan sebagai penunjuk bobot pasangan basa. Produk PCR hasil amplifikasi dikirim ke Macrogen, Korea untuk diketahui urutan basa penyusun sekuen ITS2.

Tabel 3. Nomer akses (*Accession Number*) sekuen internal transcriber spacer-2 (ITS2) caplak dari *GeneBank* yang digunakan sebagai pembanding penyejajaran runutan nukleotida

Spesies	Nomer Akses Genbank	Asal
<i>R.microplus</i>	KC503265	Palu Sulawesi
<i>R.microplus</i>	KC503266	Palu Sulawesi
<i>B.microplus</i>	U97715	Afrika Selatan
<i>B.microplus</i>	U97714	Brazil
<i>B.microplus</i>	JX974346	India
<i>R. microplus</i>	U97713	Kenya
<i>R. microplus</i>	JF758640	Henan Cina
<i>R.microplus</i>	KC503272	Cambodia
<i>R.microplus</i>	KC503277	Laos
<i>R.Australis</i>	Kc503268	Australia
<i>R. australis</i>	JQ412216	Australia
<i>R. evertsi</i>	U97701	Kenya
<i>R. sanguineus</i>	JQ625707	Cina
<i>R. appendiculatus</i>	U97707	Zimbabwe

Hasil perunutan nukleotida diedit secara manual berdasarkan kromatogram. *Alignment* (penyejajaran) runutan nukleotida yang sudah diedit dengan beberapa runutan seken ITS2 genus *Rhipicehalus* yang terdapat pada *GenBank* dengan menggunakan Clustal W yang

terintergrasi dalam *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA 6) (Tamura et al., 2013). Deskripsi perbandingan runutan nukelotida dan analisis rekonstruksi filogeni menggunakan metode *Neighbor-Joining*, berdasarkan model substitusi *Kimura-2-paramater* dengan *bootstrap* sebanyak 1000 ulangan.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Letak penempelan primer BOO2F berada di daerah 5,8 S dan pada sebagian sekuen dari ITS2, penempelan primer BOO2R ada di daerah 28 SRNA. Amplifikasi fragmen rDNA *R. microplus* dengan teknik PCR menggunakan primer BOO2F dan BOO2R menghasilkan ukuran sekitar 1240 bp. Fragmen sepanjang 1099 bp diperoleh dari hasil penjajaran berganda nukleotida *R. microplus* dengan caplak pembanding. Jumlah nukleotida *R. microplus* total menurut data nukleotida di *Genebank*, bervariasi antara 1144-1151 nt (*Genebank accession no.* U97712-5), sehingga daerah ITS2 yang teramplifikasi dalam penelitian ini merupakan sekuen parsial.

Kepekaan regio ITS sebagai marka molekuler telah dibuktikan untuk membedakan dan menganalisis hubungan kekerabatan antar spesies, populasi dari subfamili *Rhipicephalianae* (Barker 1998) dan caplak *Ixodes* (Fukunaga, 2000). Gaps menunjukkan adanya insersi dan delesi, perbedaan nukleotida di antara caplak *R. microplus* antara 0-12 nukleotida (Tabel 4). Sampel dari Banjarmasin1, Tanah Toraja (kerbau), Tanah Laut, Riau dan Bengkulu tidak memiliki perbedaan nukleotida, mirip dengan spesimen *R. microplus* dari : Palu, Sulawesi KC 503266, Afrika Selatan dan China. Sampel dari Kupang 3 memiliki beda tujuh nukleotida, yaitu dengan Riau, Makassar, Bengkulu, Tanah Laut, Palu Sulawesi, dan Banjarmasin. Jika dibandingkan dengan *R. microplus* dari

*GeneBank* perbedaan terbesar adalah 12 nukleotida, yaitu antara *R. microplus* asal Kenya dengan Kupang.

Penentuan jarak genetik menggambarkan kedekatan genetik antar spesies maupun intraspecies (Tabel 5). Persentase jarak genetik dapat digunakan untuk mengetahui status spesies, spesies yang sama atau berbeda spesies. Jarak genetik antara sampel dan *out group* yang terkecil (0%) menunjukkan tidak adanya perbedaan urutan nukleotidanya. Jarak genetik terbesar terdapat pada sampel *R. microplus* dari Kupang (Kb) dengan Kenya sebesar 1,2 % (0,012). Sampel dari Riau, Banjarmasin 2, dan Bengkulu memiliki jarak genetik terkecil dengan India dan Laos yaitu sebesar 0%, yang menunjukkan kekerabatan yang sangat dekat. Sampel dari Banjarmasin 1, dan Tanah Toraja memiliki kekerabatan paling dekat dengan isolat Afrika Selatan dan spesimen Cina. Jarak genetik ini sesuai dengan penelitian Barker (1998), berdasarkan sekuen ITS2 di antara populasi *R. microplus* perbedaannya sebesar 0,8-1,1%. Jarak genetik antara spesies *R. microplus* dengan *R. annulatus* antara 5-6%, sedangkan dengan *R. decoloratus* antara 0,90-0,95%. Perbedaan jarak genetik semakin besar jika dibandingkan dengan spesies yang dikelompokkan dalam sub genus *Rhipicephalus* (*Rhipicephalus*), jarak genetik *R. microplus* dan *R. sanguineus* antara 12,7-13,5%.

Pengelompokan taksa dalam satu klaster menggambarkan kedekatan kekerabatannya. Semakin tinggi kemiripan urutan nukleotidanya, semakin tinggi similitasnya menyebabkan posisinya ada dalam percabangan pohon filogeni menjadi berdekatan. Filogram pada Gambar 2. menunjukkan cabang utama pertama adalah Genus *Rhipicephalus* (A) terbagi menjadi dua subcabang, yaitu subcabang pertama (B) yang berisi spesies sub genus *Rhipicephalus* (*Boophilus*), dengan sub cabang yang terdiri dari spesies *R. microplus*, *R. annulatus*, dan *R. decoloratus*. Cabang C adalah Subgenus *Rhipicephalus* (*Rhipicephalus*) dengan spesies-spesiesnya.

Caplak *R. Boophilus* dalam filogram berdasarkan sekuen nukleotida ITS2 terpisah menjadi dua kelompok/klaster (Gambar 2). Masing-masing klaster terdiri dari sub cabang. Sub genus *Rhipicephalus* (*Boophilus*) (B) menunjukkan monofiletik dengan dukungan kuat nilai *bootstrap* (100%). Sub genus *Rhipicephalus* (*Boophilus*) terdiri dari enam spesies yaitu: *R. microplus*, *R. annulatus*, *R.*

*australis*, *R. decoloratus*, *R. geigy*, dan *R. kohlsi* (dua spesies terakhir ini tidak dicantumkan dalam filogram). Filogram menunjukkan caplak *R. microplus* lebih dekat dengan *R. annulatus* daripada *R. decoloratus*.

Klaster pertama *R. microplus* terdiri atas subcabang yang terdiri dari *R. australis* BMU 97712, *R. microplus* Brasil, Kenya, dan *R. australis* KC503268. Kedudukan *R. australis* didukung nilai *bootstrap* 71%, sehingga masih bisa berubah posisinya dalam pohon filogenetik. Sampel Kupang (1,2,3, kb), Bali, Sukabumi, Lombok, Banjarmasin (Kb) dan Papua berada dalam satu kelompok dengan *R. australis* BMU97712. Cabang kedua terdiri atas *R. microplus* Riau, Bengkulu, dan Banjarmasin 2, berada dalam satu kelompok dengan caplak India, Laos, dan Kamboja.

Klaster kedua *R. microplus* terdiri dari caplak asal Afrika Selatan dan China. Caplak asal Tanah Toraja (kerbau), Banjarmasin, Papua, Makasar dan Tanah Laut berada dalam satu kelompok dengan caplak asal Afrika dan China. Klaster kedua ini lebih rendah nilai *bootstrapnya* daripada klaster pertama, sehingga dalam filogram kedudukannya sangat lemah.

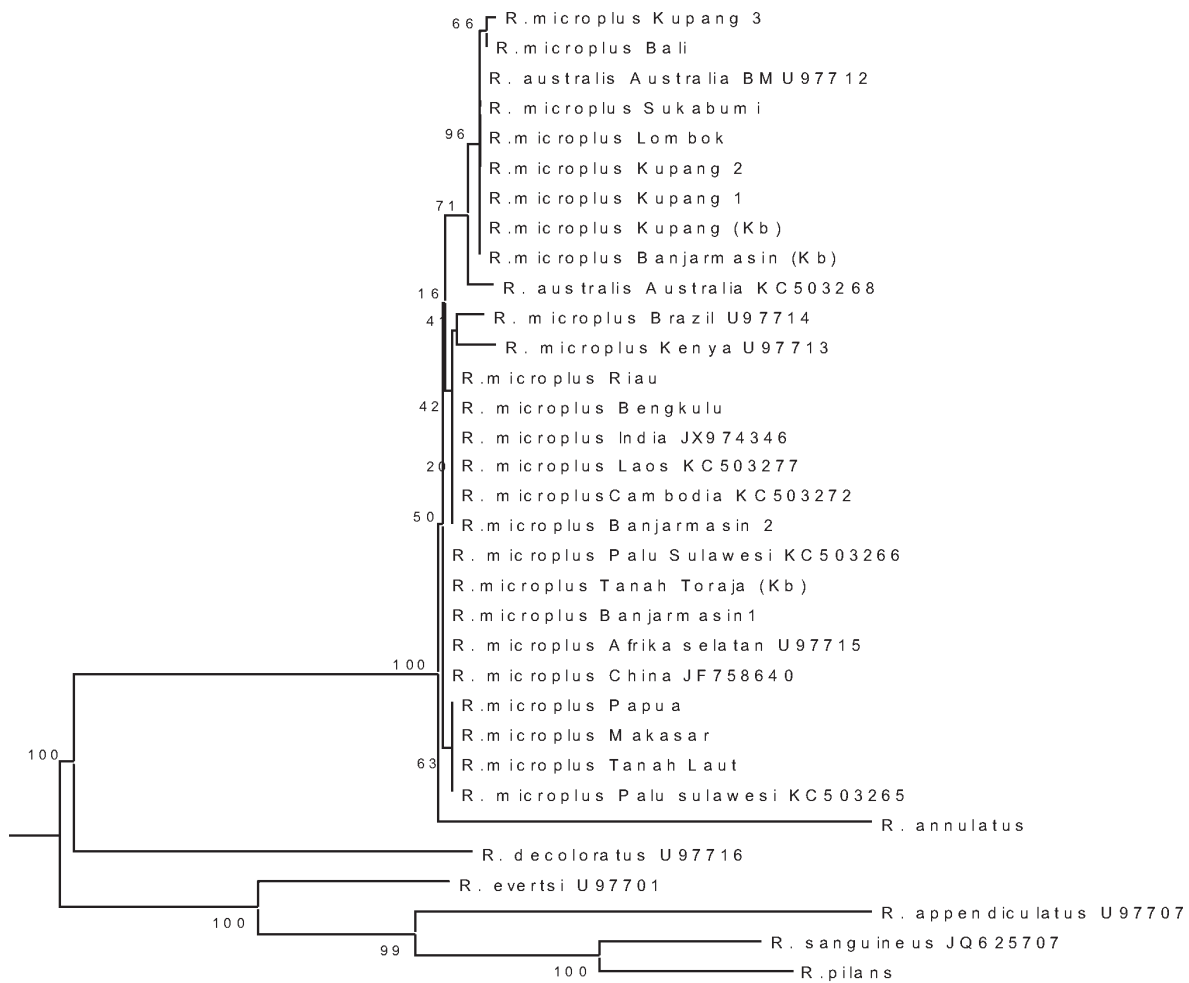
Caplak tersebut diperoleh dari ternak sapi dan kerbau, namun antara caplak yang berenang sapi ataupun kerbau tidak membentuk klaster tersendiri, perbedaan inang tidak berpengaruh terhadap beragamnya urutan DNA, sedangkan kedudukan caplak *R. pilans* tampak berkerabat dekat dengan *R. sanguineus*, didukung dengan nilai *bootstrap* 100%

Burger (2014) mengungkapkan berdasarkan analisis sekuen ITS2, gen sitokrom oksidase I dan 16S RNA, *R. microplus* adalah kompleks spesies. Kompleks spesies merupakan spesies-spesies yang mirip sehingga tidak dapat dibedakan secara morfologi, namun dapat diidentifikasi melalui pendekatan biologi dan molekuler. Pada Gambar 2 diperlihatkan *R. microplus*, *R. australis* dan *R. annulatus* berada dalam satu kelompok, didukung nilai *bootstrap* 100%. Beberapa caplak telah berhasil diidentifikasi sebagai kompleks spesies yaitu caplak anjing *R. sanguineus* (Liu *et.al.*, 2013). Anggota spesies kompleks mempunyai biologi, bio-ekologi, habitat, penyebaran, dan kerentanan terhadap agen infeksi yang tidak sama.

Caplak tersebar sangat luas di berbagai wilayah di Indonesia, dengan ragam klimatologi, biogeografi, dan faktor lingkungan sangat

Tabel 4. Matriksperbedaan nukleotida ITS2 *R. microplus* dan spesies pembanding

No		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24			
1	<i>R. microplus</i> Paki Satewa KCS0266																											
2	<i>R. microplus</i> Riau	1																										
3	<i>R. microplus</i> Kupang_1	0	7																									
4	<i>R. microplus</i> Balikpapan_1(M)	4	5	2																								
5	<i>R. microplus</i> Kupang_MH	4	5	2	0																							
6	<i>R. microplus</i> Tarut, Tarut_1(N)	0	1	0	4	4																						
7	<i>R. microplus</i> Papua	1	2	7	5	5	1																					
8	<i>R. microplus</i> Bengkulu	1	0	7	5	5	1	2																				
9	<i>R. microplus</i> Makassar	1	2	7	5	5	1	0	2																			
10	<i>R. microplus</i> Bali	5	6	1	1	1	5	0	0	0																		
11	<i>R. microplus</i> Balikpapan1	0	1	0	4	4	0	1	1	1	5																	
12	<i>R. microplus</i> Kupang_1	4	5	2	0	0	4	5	6	5	1	4																
13	<i>R. microplus</i> Kupang_2	4	5	2	0	0	4	5	5	5	1	4	0															
14	<i>R. microplus</i> Lombok	4	5	2	0	0	4	5	5	5	1	4	0	0														
15	<i>R. microplus</i> Sukadana	4	5	2	0	0	4	5	5	5	1	4	0	0	0													
16	<i>R. microplus</i> Taliabu Lail	1	2	7	5	5	1	0	2	0	0	1	5	5	5	5												
17	<i>R. microplus</i> Anjerabo BMU97712	4	5	2	0	0	4	5	5	5	1	4	0	0	0	0	5											
18	<i>R. microplus</i> Anjerabo KCS0266	6	7	0	4	4	0	7	7	7	5	0	4	4	4	4	7	4										
19	<i>R. microplus</i> Anja, Solatun, U32735	0	1	0	4	4	0	1	1	1	5	0	4	4	4	4	1	4	0									
20	<i>R. microplus</i> Biak, U32714	5	4	11	9	0	5	0	4	0	10	5	0	0	0	0	0	0	7	5								
21	<i>R. microplus</i> Citaru, JF35460	0	1	0	4	4	0	1	1	1	5	0	4	4	4	4	1	4	0	0	5							
22	<i>R. microplus</i> Kuba, J302430	7	0	7	5	5	1	2	0	2	0	1	5	5	5	5	2	5	7	1	4	1						
23	<i>R. microplus</i> Koyu, U32733	0	5	12	10	10	0	7	5	7	11	0	10	10	10	10	7	10	12	0	4	0	5					
24	<i>R. microplus</i> Lusi, KCS0277	1	0	7	5	5	1	2	0	2	0	1	5	5	5	5	2	5	7	1	4	1	0	5				
25	<i>R. microplus</i> Paki Satewa KCS0266	1	2	7	5	5	1	0	2	0	0	1	5	5	5	5	0	5	7	1	4	1	2	7	2			
26	<i>R. microplus</i> Candi, KCS0272	1	0	7	5	5	1	2	0	2	0	1	5	5	5	5	2	5	7	1	4	1	0	5	0			
27	<i>R. microplus</i> Balikpapan_2	1	0	7	5	5	1	2	0	2	0	1	5	5	5	5	2	5	7	1	4	1	0	5	0			
28	<i>R. microplus</i>	49	50	55	51	53	49	50	50	50	54	49	51	53	53	51	50	51	55	49	54	49	50	55	50			
29	<i>R. microplus</i> U32710	44	44	40	48	46	44	45	44	45	40	44	46	46	46	48	45	46	46	44	44	44	44	44	44	44	44	
30	<i>R. microplus</i> U32709	127	127	133	131	133	127	128	127	128	132	127	131	131	131	131	128	131	133	127	131	127	127	131	127	131	127	
31	<i>R. microplus</i> U32701	45	45	41	49	40	45	46	45	45	50	45	49	49	40	40	46	49	41	45	40	45	45	45	45	45	45	
32	<i>R. microplus</i> JG25202	110	110	120	116	118	110	117	110	117	110	110	118	118	118	118	117	118	120	110	120	110	110	110	110	110	110	
33	<i>R. microplus</i>	119	119	125	123	123	119	119	119	119	124	119	123	123	123	120	119	123	125	119	122	119	119	120	119	119	119	



Gambar 2. Filogram sekuen ITS 2 *R. microplus* dan out group dari *GeneBank* menggunakan metode *Neighbor-Joining* dengan *bootstrap* 1000 kali. Angka yang terdapat pada cabang pohon menunjukkan nilai *Bootstrap*.  
 A=Genus *Rhipicephalus* grup; B=subgenus *Rhipicephalus* (*Boophilus*); C=sub genus *Rhipicephalus* (*Rhipicephalus*); kb= kerbau

mungkin menimbulkan terjadinya pola struktur genetik yang berbeda pada populasi caplak yang ada di wilayah tersebut. Isolasi geografi merupakan salah satu penyebab awal suatu spesiasi, yang merupakan contoh dari keragaman genetik. Spesiasi pada organisme disebabkan karena faktor ekologi dan biografi diikuti oleh isolasi reproduksi. Fenomena tersebut telah diamati terjadi pada persilangan antara caplak strain *Boophilus microplus* Afrika Selatan dengan strain dari Australia yang menghasilkan keturunan steril (Labruna *et al.*, 2009). Caplak *R. microplus* asal Australia dinyatakan berbeda berdasarkan genetik maupun reproduksi dengan caplak asal Amerika, Afrika, dan Asia. Caplak *R. microplus* yang ada di Australia dinyatakan

bukan spesies *R. microplus*, melainkan spesies *R. australis* (Angus, 1996).

Hasil penelitian ini memperlihatkan adanya posisi hubungan filogenetik antara beberapa spesies *R. microplus* dari wilayah yang berbeda ataupun dari tempat yang sama. Perbedaan genetik mungkin terdapat antar individu dalam populasi, antar populasi di dalam daerah yang sama atau daerah geografi yang berbeda. Sekuen ITS dapat digunakan untuk membedakan caplak secara individual maupun dalam populasi dari berbagai lokasi geografis yang berbeda (Wesson *et al.*, 1993; Brahma *et al.*, 2013). Diversitas genetik diperlukan bagi suatu populasi atau spesies untuk menghadapi perubahan lingkungan. Variasi genetik dalam populasi dapat terjadi karena adanya aliran gen

Tabel 5. Jarak genetik nukleotida ITS2 *R. microplus* dan spesies pembanding

No		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27			
1	<i>R. microplus</i> Peta Sulawesi KC50326																														
2	<i>R. microplus</i> Bali	0.001																													
3	<i>R. microplus</i> Bontolug	0.006	0.007																												
4	<i>R. microplus</i> Balikpapan (B)	0.004	0.005	0.042																											
5	<i>R. microplus</i> Klaten (K)	0.004	0.005	0.002	0.000																										
6	<i>R. microplus</i> Tanah Toraja (T)	0.000	0.001	0.006	0.004	0.004																									
7	<i>R. microplus</i> Papua	0.001	0.002	0.007	0.005	0.005	0.001																								
8	<i>R. microplus</i> Bengkulu	0.001	0.000	0.007	0.005	0.005	0.001	0.002																							
9	<i>R. microplus</i> Maluku	0.001	0.002	0.007	0.005	0.005	0.001	0.000	0.002																						
10	<i>R. microplus</i> Bali	0.005	0.006	0.001	0.001	0.002	0.005	0.006	0.006	0.006																					
11	<i>R. microplus</i> Balikpapan	0.000	0.001	0.006	0.004	0.004	0.000	0.001	0.001	0.001	0.005																				
12	<i>R. microplus</i> Maluku_1	0.004	0.005	0.002	0.000	0.000	0.004	0.005	0.005	0.005	0.001	0.004																			
13	<i>R. microplus</i> Maluku_2	0.004	0.005	0.002	0.000	0.000	0.004	0.005	0.005	0.005	0.001	0.004	0.000																		
14	<i>R. microplus</i> Lombok	0.004	0.005	0.002	0.002	0.000	0.004	0.005	0.005	0.005	0.001	0.004	0.000	0.000																	
15	<i>R. microplus</i> Sukabumi	0.004	0.005	0.002	0.002	0.000	0.004	0.005	0.005	0.005	0.001	0.004	0.000	0.000	0.000																
16	<i>R. microplus</i> Tanah Jawa	0.001	0.002	0.007	0.005	0.005	0.001	0.000	0.002	0.000	0.006	0.001	0.005	0.005	0.005	0.005															
17	<i>R. microplus</i> Australia_BMU17212	0.004	0.005	0.002	0.000	0.000	0.004	0.005	0.005	0.005	0.001	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000															
18	<i>R. microplus</i> Australia_KC50328	0.006	0.007	0.006	0.004	0.004	0.006	0.007	0.007	0.007	0.005	0.006	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004														
19	<i>R. microplus</i> Afrika_sulawesi_U1715	0.000	0.001	0.006	0.004	0.004	0.000	0.001	0.001	0.001	0.005	0.000	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004													
20	<i>R. microplus</i> Brazil_U1714	0.005	0.004	0.011	0.009	0.009	0.005	0.006	0.004	0.006	0.010	0.005	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001												
21	<i>R. microplus</i> China_U173646	0.000	0.001	0.006	0.004	0.004	0.000	0.001	0.001	0.001	0.005	0.000	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004											
22	<i>R. microplus</i> Italia_U174481	0.001	0.000	0.007	0.005	0.005	0.001	0.002	0.000	0.002	0.000	0.001	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005										
23	<i>R. microplus</i> Kenya_U1713	0.006	0.005	0.012	0.010	0.010	0.006	0.007	0.005	0.007	0.011	0.006	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010										
24	<i>R. microplus</i> Laos_KC50327	0.001	0.000	0.007	0.005	0.005	0.001	0.002	0.000	0.002	0.000	0.001	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005										
25	<i>R. microplus</i> Peta Sulawesi_KC50325	0.001	0.002	0.007	0.005	0.005	0.001	0.000	0.002	0.000	0.006	0.001	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005									
26	<i>R. microplus</i> Carolina_KC50322	0.001	0.000	0.007	0.005	0.005	0.001	0.002	0.000	0.002	0.000	0.001	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005									
27	<i>R. microplus</i> U1710	0.002	0.000	0.006	0.004	0.004	0.000	0.001	0.000	0.001	0.005	0.000	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004									
28	<i>R. microplus</i> U17107	0.140	0.140	0.147	0.145	0.145	0.140	0.141	0.140	0.141	0.140	0.140	0.145	0.145	0.145	0.145	0.145	0.145	0.145	0.145	0.145	0.145	0.145	0.145	0.145	0.145	0.145	0.145	0.145	0.145	
29	<i>R. microplus</i> U17101	0.006	0.000	0.007	0.005	0.005	0.000	0.002	0.000	0.002	0.000	0.001	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	



ke dalam dan ke luar populasi ( Morjan dan Rieseberg, 2004). Hal tersebut didukung dengan adanya mobilitas /lalulintas perdagangan ternak antar pulau dan adanya persilangan ternak, yang bertindak sebagai inang caplak.

Caplak *R. microplus* awalnya berasal dari Asia menyebar ke berbagai benua melalui ternak sapi. Caplak tersebut menyebar di Amerika Selatan dan Amerika Tengah, termasuk Meksiko, dan menimbulkan permasalahan yang besar di Brasil (Evans, 1992). Hal tersebut juga terjadi di sebagian besar Asia Selatan dan juga di Cina. Di Afrika Selatan, penyebaran caplak dimulai dari Madagaskar melalui pengiriman sapi-sapi yang berasal dari Asia Selatan. (Spicket dan Fivaz, 1992). Caplak kemudian menyebar ke pesisir Mozambik, Kenya, Tanzania, Zambia, Zimbabwe dan Afrika Timur. Kemiripan sekuen DNA ITS2 caplak *R. microplus* yang ada di wilayah Indonesia dengan caplak asal negara lain disebabkan adanya persilangan sapi lokal dengan sapi impor untuk perbaikan genetik dan adanya kebutuhan daging. Masuknya ternak sapi tersebut ke wilayah Indonesia juga disertai dengan ektoparasitnya. Filogram yang terbentuk dapat memperjelas terjadinya pemisahan dan pengelompokan individu caplak yang berasal dari populasi dengan kondisi geografi yang berbeda, meskipun dengan jarak genetik yang kecil.

### SIMPULAN

Filogram caplak *R. (Boophilus) microplus* berdasarkan urutan sekuen nukleotida ITS2, dapat membedakan inter dan intra spesies. Caplak *R. microplus* asal Indonesia adalah kompleks spesies. Jarak genetik populasi caplak *R. microplus* adalah 0-1,2%, dengan rata-rata 0,05%. Caplak-caplak *R. microplus* yang ditemukan di wilayah Indonesia berkerabat dekat dengan caplak *R. microplus* asal India, Afrika Selatan, Laos, China, Kamboja dan *R. australis* asal Australia.

### SARAN

Diperlukan pendekatan komprehensif dengan memadukan analisis morfometrik dengan analisis genetik menggunakan penanda molekuler lainnya untuk menentukan posisi *R. microplus* yang ada di Indonesia. Penelitian lebih lanjut dengan menggunakan penanda genetik lainnya seperti sekuen DNA mitokondria

yang didukung data morfologi atau morfometrik diperlukan, sehingga dapat dipakai sebagai landasan yang kuat untuk mengungkap adanya diversitas genetik dan alifiasi *R. microplus* intra spesies maupun inter spesies.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih penulis sampaikan kepada Dikti melalui Bantuan Beasiswa Pascasarjana sehingga penelitian ini dapat dilakukan.

### DAFTAR PUSTAKA

- Anastos G. 1950. The Scutate Ticks, or Ixodidae of Indonesia. *Entomologica Americana* 30: 1-144.
- Angus BM. 1996. The history of the cattle tick *Boophilus microplus* in Australia and achievements in its control. *International J Parasitol* 26(12): 1341-1355.
- Barker CS. 1998. Distinguishing Species and Populations of Rhipicephaline Ticks with ITS 2 Ribosomal RNA. *J Parasitol* 84 (5): 887-892.
- Beati L, Keirans JE. 2001. Analysis of the systematic relationships among ticks of the genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequences and morphological characters. *J Parasitol* 87(1): 32- 48.
- Bock R, Jackson L, De Vos AJ, Jorgensen W. 2008. Babesiosis of cattle. In: *Ticks: Biology, Disease and Control*. Bowman AS, Nuttall PA Eds. Cambridge. Cambridge University Press. Pp 281–307.
- Brahma RK, Dixit V, Sangwan AK, Doley R. 2013. Identification and characterization of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *Haemaphysalis bispinosa* ticks (Acari: Ixodidae) of North East India by ITS2 and 16S rDNA sequences and morphological analysis. *Exp Appl Acarol* 9732-9734
- Burger TD, Shao R, Barker SC. 2014. Phylogenetic analysis of mitochondrial genome sequences indicates that the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, contains a cryptic species. *Mol Phylogenetic Evol* 76: 241-253

- Cooley RA. 1946. *The genera Boophilus, Rhipicephalus, and Haemaphysalis (Ixodidae) of The World*. Nat Inst of Hlth Bull **Washington DC**.187: 54 pp
- De la Fuente, Estrada-pena A, Venzal JM, Sonenshine DE. 2008. Overview: Ticks as vectors of pathogen that cause disease in humans and animals. *Frontiers in Biosciences* 13: 6938-6946
- Evans DE. 1992. Tick infestation of livestock and tick control methods in Brazil: a situation report. *Insect Science and its Application* 13(4): 629-643
- Fukunaga M, Yabuki M, Hamase A, Oliver Jr, Nakao M. 2000. Molecular Phylogenetic Analysis of Ixodid Ticks Based on the Ribosomal DNA Spacer, Internal Transcribed Spacer 2, Sequences. *J Parasitol* 86 (1): 38-43
- Hillis DM, Dixon MT. 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Quart Rev of Biol* 66: 411– 453
- Hillis DM, Moritz C, Mable BK. 1996. *Molecular Systematic* 2<sup>nd</sup> ed. Sunderland. Sinauer Associates
- Hoogstraal A, Aeschlimann. 1982. Tick–Host Specificity. *Bull Soc Entomol Suisse* 55: 5-32
- Hwang WU, Kim W. 1999. General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics. *Korean J Parasitol* 37(4): 215-228.
- Kolonin GV. 2009. Fauna of Ixodid Ticks of The World (acari: Ixodidae) Moscow. www.kolonin.org
- Labruna MB, Naranjo V, Mangold A, Thompson C Estrada-pena A, Gugliemone AA, Jongenjan F, De la Fuente J. 2009. Allopatric speciation in ticks: genetic and reproductive divergence between geographic strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *BMC Evolutionary Biology* 9: 46
- Liu GH, Chen F, Chen YZ, Song HQ, Lin RQ, Zhou DH, Zhu XQ. 2013. Complete mitochondrial genome sequence data provides genetic evidence that the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) represents a species complex. *Int J Biol Sci* 9(4): 361-369.
- Morjan CL, Rieseberg LH. 2004. How species evolve collectively: implications of gene flow and selection for the spread of advantageous alleles. *Mol Ecol* 13(6): 1341-1356.
- Murrell A, Campbell NJ, Barker SC. 2000. Phylogenetic analyses of the rhipicephaline ticks indicate that the genus *Rhipicephalus* is paraphyletic. *Mol Phylogenet Evol* 16(1): 1-7.
- Murrell A, Barker SC. 2003. Synonymy of *Boophilus Curtice*, 1981 with *Rhipicephalus* och, 1844 (Acari: Ixodidae). *Sys Parasitol* 56(3): 169-172
- Nava S, Guglielmono AA, Mangold AJ. 2009. An overview of systematics and evolution of ticks. *Frontiers in Biosciences* 14: 2857-2877
- Peter RJ, Bossche P, Penzhorn BL, Sharp B. 2005. Ticks, fly, and mosquito control—lesson from the past, solution for the future. *Vet Parasitol* 132: 205-215
- Rumer L, Sheshukova O, Dautel H, Mantke OD, Niedrig M. 2011. Differentiation of medically important Euro-Asian tick species *Ixodes ricinus*, *Ixodes persulcatus*, *Ixodes hexagonus*, and *Dermacentor reticulatus* by polymerase chain reaction Vector-Borne and Zoo Dis 11(7): 899-905.
- Sigit HS, Partosoedjono S, Akib SM. 1983. *Inventarisasi dan Pemetaan Parasit Indonesia*. Laporan Penelitian Tahap pertama: Ektoparasit Proyek Peningkatan dan Pengembangan Perguruan Tinggi. Bogor. Intitut Pertanian Bogor. Hal 25-26
- Spickett AM, Fivaz BH 1992. A survey of cattle tick control practices in the eastern Cape Province of South Africa. *Onderst J Vet Res* 59(3): 203-210
- Sukanto IP, Payne RC, Partoutomo P. 1993. Bovine babesiosis in Indonesia. *Prev Vet Med* 16(2): 151-156.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Bio and Evol* 30: 2725-2729.
- Wesson DM, McLain DK, Oliver JH, Piesman J, Collins FH. 1993. Investigation of the validity of species status of *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae) using rDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 10221-10225.