

Variasi Isozim dan Morfologi pada *Anopheles subpictus* Grassi Vektor dan Nonvektor Malaria

Variations of isozyme and morphological characters of malaria vector and non-vector *Anopheles subpictus* Grassi

RUBEN DHARMAWAN^{*}, DARUKUTNI, SATIMIN HADIWIDJAJA, ADI PRAYITNO

Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret (UNS), Surakarta 57126

Diterima: 25 April 2005. Disetujui: 1 Juli 2005.

ABSTRACT

The aim of the study was to show genetic variations of malaria vector *Anopheles subpictus* in East Flores, East Nusa Tenggara Province and non-vector in Banjarnegara, Central Java Province by isozyme electrophoresis and refined morphological examinations as isozymes and morphological characters are known as gene influenced factors. *An. subpictus* females were collected by using animal and human bait collection and reared individually in the laboratory. Progenies were used as materials for electrophoretic examination after eggs and larvae were morphologically confirmed as the species investigated. Each progeny was run on horizontal starch electrophoresis in a separate well according to Green *et al.* (1990), Sukowati *et al.* (1999) and Dharmawan *et al.* (2002) with modification. The visualized isozymes were malate dehydrogenase (*Mdh*), lactate dehydrogenase (*Ldh*), alkaline phosphatase (*Alp*), alpha esterase (α *Est*), beta esterase (β *Est*), malic enzyme (*Me*), leucine aminopeptidase (*Lap*), and acid phosphatase (*Acp*). Zymograms showed that *Mdh*, *Ldh*, *Alp*, α *Est* and *Me* had been varied between vector and non-vector species. Refined morphological examination on larvae showed different number of branches of their inner clypeal hairs and observation on eggs revealed different size and ridge numbers. We concluded that *An. subpictus* in East Flores was genetically and morphologically different from Banjarnegara and suggested that the two variants might be members of *An. subpictus* species complex.

© 2005 Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta

Key words: isozyme, morphology, *Anopheles subpictus* complex, Banjarnegara, East Flores.

PENDAHULUAN

Anopheles subpictus merupakan salah satu vektor utama malaria di daerah pantai kawasan Indonesia Timur seperti Sulawesi, Nusa Tenggara Timur (Arbani, 1992) dan Nusa Tenggara Barat (Siregar, 1995). Di pedalaman pulau Jawa, *An. subpictus* bukan merupakan vektor malaria walaupun di daerah pantai nyamuk ini merupakan vektor malaria sekunder (Utari *et al.*, 2002). Tempat perindukan *An. subpictus* bervariasi, larva dapat hidup di air jernih maupun air keruh, di air tawar maupun air payau. Larva *An. subpictus* sering ditemukan bersama dengan larva *An. sundaicus* di laguna dan bersama *An. aconitus* di persawahan. Di beberapa daerah pantai Bali *An. subpictus* dan *An. sundaicus* sering ditemukan di kolam ikan buatan (Soekirno *et al.*, 1983). Di Sulawesi, walaupun sering terdapat bersama-sama, jumlah larva *An. subpictus* selalu jauh lebih banyak daripada *An. sundaicus*. Di daerah endemik malaria Lombok dan Sumbawa, Nusa Tenggara Barat, *An. subpictus* merupakan spesies yang dominan sepanjang tahun (Siregar, 1995).

Perbedaan kemampuan *An. subpictus* bertindak sebagai vektor malaria dan variasi tempat perindukannya di

Indonesia mendukung hipotesis bahwa *An. subpictus* memiliki variasi genetik dan morfologi. Variasi tersebut dapat diuji antara lain dengan teknik elektroforesis isozim dan pemeriksaan morfologi secara rinci (*refined morphological examination*). Berdasarkan hal tersebut maka penelitian ini bertujuan untuk mengetahui variasi isozim sebagai ekspresi gen dan perbedaan morfologi *An. subpictus* dari Flores Timur, Nusa Tenggara Timur (NTT) yang diketahui sebagai vektor utama malaria dan dari Banjarnegara, Jawa Tengah yang non vektor malaria.

BAHAN DAN METODE

Nyamuk *An. subpictus* diperoleh dari (i) Tanjung Bunga, Flores Timur, NTT sebagai nyamuk vektor malaria dan (ii) Banjarnegara, Banjarnegara, Jawa Tengah sebagai nyamuk non vektor. Nyamuk ditangkap dengan cara *animal bait collection* menggunakan umpan hewan besar (sapi atau kerbau) mengikuti metode Sukowati *et al.* (1999), serta *human bait collection* di dalam dan di luar rumah. Penangkapan dilakukan pada bulan Juli 1998 dan Agustus 1999. Nyamuk hasil tangkapan dibiakan sebagai koloni induk tunggal, kemudian dijadikan bahan elektroforesis isozim dan pemeriksaan morfologi.

Bahan untuk elektroforesis berasal dari nyamuk alam dan filial 1 (F1). Setiap sampel diberi nomor atau kode sesuai dengan nomor koloni hingga dapat diketahui hubungan antara hasil elektroforesis isozim dengan asal

▼ Alamat korespondensi:

Jl. Ir. Sutami 36A, Surakarta 57126
Tel. & Fax.: +62-271-664178.
e-mail: rubendharmawan@yahoo.com

bahan. Semua materi yang akan digunakan untuk elektroforesis harus disimpan dalam suhu sangat rendah (-70°C). Proses penyediaan sampel dan pembuatan gel poliakrilamid serta elektroforesis isozim secara horisontal mengikuti metode Green *et al.* (1990), Sukowati *et al.* (1999), dan Dharmawan *et al.* (2002) dengan modifikasi. Identifikasi elektrogram dilakukan terhadap pita (*band*) dari spesimen *An. subpictus* non vektor dan vektor secara berdampingan pada satu gel. Perbedaan pola pita tersebut merupakan variasi isozim pada masing-masing populasi *An. subpictus*.

Pemeriksaan morfologi dilakukan terhadap telur dan larva stadium IV dari F1 koloni induk tunggal. Pemeriksaan dilakukan dengan mikroskop binokuler. Pada telur dicari perbedaan morfologi yang meliputi ukuran dan bentuk serta sisir pelampung, sedang pada larva dicari perbedaan morfologi meliputi ukuran dan bentuk serta jumlah cabang pada bulu, rambut atau duri, dan antena. Ciri spesifik morfologi yang ditemukan didokumentasikan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Elektroforesis

Dari delapan isozim yang diperiksa secara elektroforesis didapatkan lima isozim yang memiliki pita yang berbeda antara *An. subpictus* dari Banjarnegara dengan Flores Timur, yaitu, *Mdh*, αEst , *Alp*, *Ldh*, dan *Me*, sedang βEst , *Lap*, dan *Aat* tidak menunjukkan perbedaan pita. Zymogram kelima isozim tersebut ditunjukkan pada Gambar 1-5.

Malate dehydrogenase

An. subpictus yang digunakan sebagai sampel berjumlah 32 ekor nyamuk vektor dari Flores Timur dan 35 ekor nyamuk non vektor dari Banjarnegara. Hasil elektroforesis diperlihatkan pada Gambar 1. Isozim *Mdh* berjalan ke arah anoda dengan memberikan 3 pita, satu pita memanjang dengan intensitas warna yang berbeda dan dua pita pendek. Pita *An. subpictus* vektor dari Flores Timur tampak pada nilai R_f 0,04, 0,30 dan 0,35. Sedangkan pita *An. subpictus* non vektor dari Banjarnegara terlihat pada nilai R_f 0,07, 0,30 dan 0,35. Dengan demikian isozim *Mdh* menunjukkan variasi antara kedua *An. subpictus*.

Alpha esterase

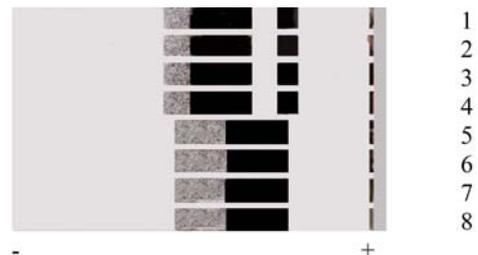
Elektroforesis dilakukan terhadap 30 ekor nyamuk *An. subpictus* vektor dari Flores Timur dan 30 ekor nyamuk non vektor dari Banjarnegara. Hasil elektroforesis diperlihatkan pada Gambar 2. *Alpha esterase* berjalan ke arah anoda dan menunjukkan 2 pita. *An. subpictus* vektor dari Flores Timur menampilkan satu pita panjang pada R_f 0,30 dengan dua intensitas warna yang berbeda. Sedangkan pita *An. subpictus* non vektor dari Banjarnegara memberikan 2 pita, yaitu pada R_f 0,25 yang berupa pita pendek dan 0,40 berupa pita panjang dengan 2 intensitas warna yang berbeda. Isozim αEst juga menunjukkan variasi antara *An. subpictus* dari Banjarnegara dan Flores Timur.

Alkaline phosphatase

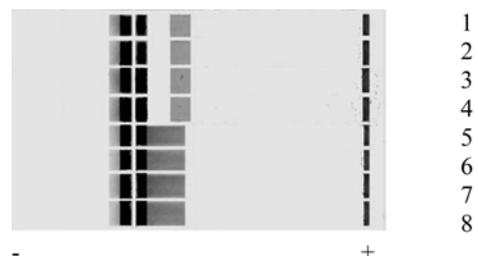
Sampel yang digunakan berjumlah 30 ekor nyamuk *An. subpictus* vektor dari Flores Timur dan 30 ekor nyamuk non vektor dari Banjarnegara. Hasil elektroforesis diperlihatkan pada Gambar 3. Isozim *Alp* berjalan menuju ke arah anoda. Pada nyamuk *An. subpictus* dari Flores Timur tampak 2 pita pada R_f 0,65 dan 0,70, keduanya menunjukkan perbedaan intensitas warna. Sedangkan pada nyamuk dari



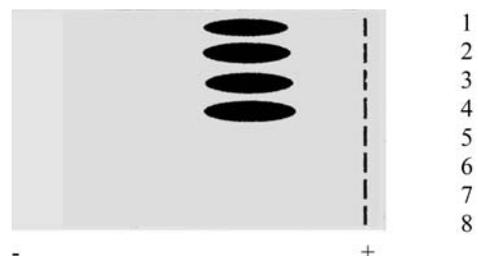
Gambar 1. Zymogram *malate dehydrogenase*. Keterangan: no. 1-4 *An. subpictus* non vektor dari Banjarnegara; no. 5-8 *An. subpictus* vektor dari Flores Timur. Elektroforesis berjalan dari katoda (+) menuju anoda (-).



Gambar 2. Zymogram *Alpha esterase*. Keterangan: no. 1-4 *An. subpictus* non vektor dari Banjarnegara; no. 5-8 *An. subpictus* vektor dari Flores Timur. Elektroforesis berjalan dari katoda (+) menuju anoda (-).



Gambar 3. Zymogram *alkaline phosphatase*. Keterangan: no. 1-4 *An. subpictus* non vektor dari Banjarnegara; no. 5-8 *An. subpictus* vektor dari Flores Timur. Elektroforesis berjalan dari katoda (+) menuju anoda (-).



Gambar 4. Zymogram *lactate dehydrogenase*. Keterangan: no. 1-4 *An. subpictus* non vektor dari Banjarnegara; no. 5-8 *An. subpictus* vektor dari Flores Timur. Elektroforesis berjalan dari katoda (+) menuju anoda (-).



Gambar 5. Zymogram *malic enzyme*. Keterangan: no. 1-4 *An. subpictus* non vektor dari Banjarnegara; no. 5-8 *An. subpictus* vektor dari Flores Timur. Elektroforesis berjalan dari katoda (+) menuju anoda (-).

Banjarnegara tampak 3 pita yaitu pada Rf 0,57, 0,65 dan 0,70, dengan pita terakhir memiliki 2 intensitas warna yang berbeda. Perbedaan isozim *Alp* ini menunjukkan adanya variasi di antara kedua *An. subpictus*.

Lactate dehydrogenase

Elektroforesis dilakukan terhadap 30 ekor nyamuk *An. subpictus* vektor dari Flores Timur dan 30 non vektor dari Banjarnegara. Hasilnya diperlihatkan pada Gambar 4. Isozim *Ldh* berjalan ke arah anoda. Pada nyamuk dari Banjarnegara terbentuk pita memanjang berbentuk elips mulai dari Rf 0,25, sedang pada nyamuk dari Flores Timur tidak menampakkan pita. *Ldh* pada nyamuk Flores Timur kemungkinan jumlahnya amat sedikit, sehingga tidak terdeteksi atau memang tidak terekspresikan. Pola isozim *Ldh* ini menunjukkan variasi pada *An. subpictus*.

Malic enzyme

Nyamuk *An. subpictus* yang digunakan sebagai sampel adalah 40 ekor nyamuk F1 dari Flores Timur yang merupakan vektor malaria dan 40 ekor nyamuk F1 non vektor dari Banjarnegara. Hasil elektroforesis diperlihatkan pada Gambar 5. Isozim *Me* berjalan ke arah anoda. Pada nyamuk dari Flores Timur terdapat 2 pita. Pita pertama tampak jelas pada Rf 0,17, pita kedua tidak tampak jelas pada Rf 0,44. Sedangkan pita *An. subpictus* non vektor dari Banjarnegara tidak tampak, hal ini kemungkinan karena konsentrasinya amat rendah sehingga tidak terdeteksi dengan teknik ini atau memang *Me* tidak terekspresikan. Walaupun demikian, *Me* termasuk isozim yang bervariasi pada *An. subpictus*.

Hasil elektroforesis di atas ditabulasikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Macam dan deskripsi variasi elektromorf lima isozim pada *An. subpictus* Banjarnegara dan Flores Timur.

Macam Isozim	Jumlah sampel		<i>An. subpictus</i> Flores Timur	<i>An. subpictus</i> Banjarnegara
	B	F		
1. <i>Mdh</i>	32	35	Menuju anoda, memiliki 3 pita di Rf 0,04, 0,30 dan 0,35.	Menuju anoda, memiliki 3 pita di Rf 0,07, 0,30 dan 0,35.
2. α <i>Est</i>	30	30	Menuju anoda, memiliki 1 pita pada Rf 0,30.	Menuju anoda, memiliki 2 pita pada Rf 0,25 dan 0,40
3. <i>Alp</i>	30	30	Menuju anoda, memiliki 2 pita di Rf 0,65 dan 0,70	Menuju anoda, memiliki 3 pita di Rf 0,57, 0,65 dan 0,70.
4. <i>Ldh</i>	30	30	Tidak tampak pita	Menuju anoda, pita memanjang mulai Rf 0,25
5. <i>Me</i>	40	40	Menuju anoda, memiliki 2 pita pada Rf 0,17 dan 0,44	Tidak tampak pita

Keterangan: B = Banjarnegara, F = Flores Timur, Rf = *Ratio front* yaitu perbandingan jarak pita dengan jarak tempuh indikator pada akhir elektroforesis.

Pemeriksaan morfologi

Telur

Pengamatan morfologi telur dilakukan terhadap 9 butir telur *An. subpictus* vektor dari Flores Timur dan 44 butir telur non vektor dari Banjarnegara. Bentuk morfologi hasil pengamatan disajikan pada Gambar 6. Morfologi telur tersebut dapat dideskripsikan sebagai berikut: rata-rata ukuran panjang telur *An. subpictus* dari Banjarnegara adalah 700 μ m, sedang panjang telur dari Flores Timur 600 μ m. Keduanya memiliki rata-rata lebar sekitar 300 μ m. *Exochorion* tampak sama. *Deck* keduanya tidak dapat

diamati dengan jelas. *Frill* tampak *opalescent*. Tampak perbedaan jumlah sisir pelampung (*float ridges*) yaitu 17 helai untuk telur dari Flores Timur dan 23 helai untuk telur dari Banjarnegara.

Larva

Larva yang diperiksa adalah larva stadium IV dari F1 hasil kolonisasi induk tunggal *An. subpictus* dari Banjarnegara dan Flores Timur. Setelah dibuat preparat, larva diperiksa di bawah mikroskop cahaya. Pemeriksaan dilakukan dalam dua tahap yaitu pertama untuk identifikasi spesies *An. subpictus* berdasarkan rujukan buku *Kunci Bergambar Jentik Anopheles di Indonesia* (O'Connor dan Soepanto, 1999) dan yang kedua dilakukan pencarian ciri-ciri morfologi yang dapat membedakan *An. subpictus* dari Banjarnegara dengan Flores Timur; bentuk morfologi bulu bahu disajikan pada Gambar 6. Morfologi larva secara keseluruhan dapat dideskripsikan sebagai berikut: berbentuk jentik dengan ukuran lebar sekitar 2 mm dan panjang 10 mm yang terdiri atas 3 bagian yaitu kepala, dada, dan perut. Kepala berbentuk segi empat membulat, agak pipih ke arah dada-punggung, berukuran lebih kecil dibandingkan dada dan perut. Pada kepala terdapat mata, antena dan mulut, serta bulu-bulu yang penting untuk identifikasi spesies. Dada berbentuk segi empat dengan sisi lebar lebih besar daripada panjang, pipih ke arah dada-punggung. Di dada juga terdapat ruas-ruas dan bulu-bulu. Perut memiliki 10 ruas tersusun silindris agak mengerucut ke arah ekor. Pada perut terdapat sifon untuk bernafas, alat pengayuh, lempeng punggung, dan juga bulu-bulu. Kunci identifikasi *An. subpictus* terletak pada bulu bahu bagian dalam (*inner clypeal hairs*) (O'Connor dan Soepanto, 1999).

Pembahasan

Pemeriksaan isozim terhadap *An. subpictus* belum pernah dilakukan sebelumnya, sehingga penelitian ini merupakan usaha yang pertama. Macam-macam isozim yang diperiksa dalam penelitian ini dipilih berdasarkan pertimbangan kemungkinan terbesar diperoleh zymogram dengan aktivitas isozim yang cukup kuat untuk divisualisasikan disamping perhitungan ekonomis. Hasilnya ternyata cukup baik dan menunjukkan variasi elektromorf yang nyata pada 5 dari 8 isozim yang diperiksa. Dibandingkan dengan penelitian Adak *et al.* (1994) yang memperoleh variasi pada satu macam isozim setelah memeriksa 9 isozim lain pada *An. culicifacies* maka penelitian ini dapat dikatakan berhasil baik.

Perbedaan elektrogram pada *Ldh* terjadi karena *An. subpictus* dari Banjarnegara menampakkan pita, sedang dari Flores Timur tidak menampakkan pita. Hal ini mungkin terjadi karena memang tidak terdapat enzim tersebut atau aktivitasnya amat lemah sehingga tidak muncul. Sedangkan *Me* pada *An. subpictus* dari Banjarnegara tidak terlihat adanya pita tetapi pada *An. subpictus* dari Flores Timur terlihat. Di sini kemungkinan tidak ada enzim *Me* pada *An. subpictus* dari Banjarnegara atau konsentrasinya amat rendah. Sebenarnya perlu dilakukan pula pemeriksaan *Alp*, *Ldh* dan *Me* pada stadium perkembangan yang lain, misalnya stadium larva. Hal lain yang perlu dipertimbangkan adalah jumlah sampel, walaupun sudah cukup memadai, tetapi akan lebih baik apabila sampel yang diperiksa lebih banyak. Adak *et al.* (1994) menggunakan sampel antara 100-300 nyamuk tetapi disini hanya dipergunakan 30-40 ekor. Walaupun demikian adanya variasi elektromorf pada *An. subpictus* tidak diragukan, terlebih lagi karena didukung variasi morfologi telur dan larva yang nyata.

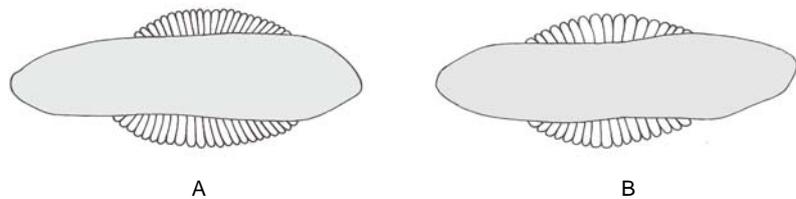
Variasi morfologi telur pada telur *An. subpictus* Banjarnegara dan Flores Timur yang tampak adalah jumlah sisir pelampung dan ukuran telur. Jumlah sisir pelampung pada *An. subpictus* dari Banjarnegara 23 dengan panjang telur 700 mikron sedang *An. subpictus* dari Flores Timur memiliki 17 sisir pelampung dengan panjang telur rata-rata 600 mikron. Hasil pemeriksaan bulu bahu dalam pada larva F1 juga menunjukkan perbedaan jumlah cabang antara *An. subpictus* Banjarnegara dan Flores Timur. Jumlah cabang bulu bahu dalam *An. subpictus* dari Banjarnegara berkisar antara 13-16 sedang *An. subpictus* dari Flores Timur hanya antara 6-8. Perbedaan morfologi telur dan larva ini tidak mengandung *overlapping* sehingga dapat dipakai untuk memilah secara meyakinkan. Walaupun demikian hasil penelitian ini sebaiknya dikembangkan dengan sampel yang jauh lebih banyak dan sampel dari lapangan. Pemeriksaan sampel dari lapangan memang diperlukan karena kadang-kadang terjadi variasi morfologi antara lapangan dan koloni, walaupun dalam penelitian ini dipergunakan F1 yang dipercaya masih memiliki segala sifat-sifat genetik yang sama dengan induknya dari lapangan. Pertimbangan lainnya adalah apabila benar secara morfologis *An. subpictus* Banjarnegara identik dengan *An. subpictus* B dari India dan *An. subpictus* Flores Timur identik dengan *An. subpictus* D (Subbarao, 1998), maka Suguna (1984) menunjukkan adanya sebagian kecil larva *An. subpictus* B memiliki morfologi yang sama dengan *An. subpictus* D dalam hal jumlah cabang bulu nomor 4. Artinya terdapat sedikit *overlapping* antara morfologi larva *An. subpictus* B dengan D yang tidak tampak dalam penelitian ini.

KESIMPULAN

Pemeriksaan elektroforesis isozim dan morfologi secara rinci menunjukkan adanya variasi isozim *malate dehydrogenase*, *alpha esterase*, *alkaline phosphatase*, *lactate dehydrogenase* dan *malic enzyme* serta variasi morfologi sisir pelampung dan ukuran telur dan jumlah cabang bulu bahu dalam larva pada *An. subpictus* vektor Flores Timur dengan non vektor Banjarnegara. Variasi ini bermanfaat sebagai alat pemilah antara keduanya. Hasil kedua pemeriksaan tersebut membuktikan telah terjadinya spesiasi yaitu separasi genetik dan morfologis pada *An. subpictus* Flores Timur dan Banjarnegara yang berarti mereka adalah varian dengan kemungkinan besar merupakan anggota dari *An. subpictus* complex.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini mendapat dana dari Risbin Iptekdok III tahun 1 dan 2. Ucapan terima kasih disampaikan kepada Prof. Dr. A.A. Loedin dan Prof. Dr. dr. J.B. Suparyatmo, SpPK (K) yang telah membimbing dan meningkatkan wawasan peneliti serta Dr. Admadi Soeroso, Sp.M, MARS



Gambar 6. Skema telur *An. subpictus*. A. Banjarnegara (40x). B. Flores Timur (40x).



Gambar 7. Skema bulu bahu pada larva *An. subpictus*. A. Banjarnegara bercabang 13-16. (100 x). B. Flores Timur bercabang 6-8. (100 x).

dan Dr. Suroto, Sp.S. sebagai Pembina dari Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta. Kepada Dr. Supratman Sukowati, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Jakarta disampaikan rasa terima kasih secara khusus atas segala bantuannya, serta Sdr. Christian Adi Dharmawan atas gambar skematis telur dan bulu bahu.

DAFTAR PUSTAKA

- Adak T., S.K. Subbarao, V.P. Sharma, dan S.R.V. Rao. 1994. Lactate dehydrogenase allozyme differentiation of species in the *Anopheles culicifacies* complex. *Medical and Veterinary Entomology* 8: 137-40.
- Arbani P.R. 1992. Malaria control in Indonesia. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 23 (Suppl. 4): 29-37.
- Dharmawan, R, Suyono, and Yudhayana. 2002. Isozyme markers for the development of *Plasmodium falciparum* in the body of *Anopheles barbirostris* malaria vector species complex. *Programme & Abstract of International Seminar on Parasitology and the 9th Congress of the Indonesian Parasitic Disease Control Association*. Bogor, Indonesia, 11-12 September 2002.
- Green, C.A., R.F. Gass, L.E. Munsterman, and V. Baimai. 1990. Population genetics evidence for two species in *Anopheles minimus* in Thailand. *Medical and Veterinary Entomology* 4: 25-34.
- O'Connor C.T. dan A. Soepanto. 1999. *Kunci bergambar Jentik Anopheles di Indonesia*. Edisi 3. Jakarta: Direktorat Jendral Pemberantasan Penyakit Menular dan Penyehatan Lingkungan Pemukiman, Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Sukowati, S., V. Baimai, S. Harun, Y. Dasuki, H. Andris, and M. Efriwati. 1999. Isozyme evidence for three sibling species in the *Anopheles sundaicus* complex from Indonesia. *Medical and Veterinary Entomology* 13 (4): 408.
- Siregar, A.A. 1995. *Laporan Survei Entomologi Propinsi Nusa Tenggara Barat Tahun 1994/1995*. Mataram: Sub Dinas Pencegahan Penyakit, Dinas Kesehatan Propinsi Daerah Tingkat I Nusa Tenggara Barat.
- Soekirno, M., Y.H. Bang, M. Sudomo, Tj.P. Pemayun, and G.A. Fleming 1983. Bionomic of *Anopheles sundaicus* and other anophelines associated with malaria in coastal areas of Bali, Indonesia. *World Health Organization Document. WHO/VBC/83. 885*. Geneva: WHO.
- Suguna, S.G. 1984. Cytological and morphological evidence for sibling species in *Anopheles subpictus* Grassi. *Journal of Communicable Diseases* 14: 1-8.
- Subbarao, S.K. 1998. Anopheline species complexes in South-East Asia. Technical Publication, SEARO No. 18. *World Health Organization Regional Office for South-East Asia*. New Delhi: WHO.
- Utari, C.S., F.A. Sudjadi, and N. Gesriantuti. 2002. Genetic analysis of *Anopheles subpictus* Grassi and *Anopheles aconitus* (Diptera: Culicidae) around Yogyakarta using RAPD-PCR. *Programme & Abstract of International Seminar on Parasitology and the 9th Congress of the Indonesian Parasitic Disease Control Association*. Bogor, Indonesia, 11-12 September 2002.