

RINGKASAN

Salah satu satwa liar endemik di Indonesia yang harus dilindungi dan diselamatkan baik jumlah maupun jenisnya adalah kuskus. Ektoparasit pada kuskus adalah infestasi caplak *Ixodes*. Caplak adalah ektoparasit pengisap darah pada mamalia ataupun hewan lain. Secara langsung menyebabkan kehilangan darah dan iritasi kulit secara tidak langsung dapat menyebarkan penyakit bakteri, virus dan protozoa. Metode konvensional identifikasi caplak, sering kali tidak mudah diterapkan. Kendala yang sering ditemui adalah: proses koleksi dan penanganan sampel yang merusak struktur caplak, tidak nampaknya struktur permukaan tubuh pada betina yang kenyang darah, adanya kemiripan antar spesies (kriptik spesies) serta minimnya perbedaan morfologi stadium-stadium yang ada dalam daur siklus hidupnya.

Sangat minimnya penelitian caplak pada kuskus mengakibatkan pentingnya informasi mengenai ektoparasit ini. Identifikasi dan penentuan hubungan filogenetik spesies memerlukan integrasi pendekatan morfologi. Pengukuran karakter morfometrik dan pengamatan ultra struktur morfologi menggunakan *Scanning Electron Microscopic* (SEM) telah banyak digunakan untuk mengetahui karakter morfologi dari beberapa spesies yang berbeda, dan atau spesies yang sama dari populasi yang berbeda. Penggunaan marka genetik DNA ribosomal pada region *Internal Transcribed Spacer* (ITS2) dan sekuen gen 16S rRNA memiliki tingkat keberhasilan yang tinggi untuk analisis kekerabatan spesies dan asal usul spesies pada organisme tingkat tinggi maupun rendah.

Penelitian ini bertujuan untuk: (1) menganalisis infestasi *Ixodes cordifer* pada kuskus pulau Ambon, Wetar, Seram dan Romang, (2) mengkaji karakter morfologi *I. cordifer* berdasarkan pengamatan morfometrik dan gambaran ultra struktur, dan (3) mengkaji karakter molekuler *I. cordifer* yang dilakukan untuk mengetahui keragaman dan kekerabatan genetik berdasarkan urutan basa nukleotida penyusun sekuen ITS2 dan gen 16s rRNA.

Koleksi caplak diperoleh dari jenis kuskus putih, kuskus cokelat, kuskus totol, dan kuskus kelabu. Komponen morfologi yang diamati berdasarkan pengamatan morfometrik dan gambaran morfologi ultrastruktur dan urutan sekuen DNA. Data morfometrik dan gambaran morfologi ultrastruktur dianalisis secara deskriptif. Selanjutnya dilakukan isolasi deoxyribonucleic acid (DNA), amplifikasi dengan menggunakan program MEGA versi X. Jarak genetik dianalisis menggunakan Kimura 2 parameter, dan konstruksi filogenetik dilakukan menggunakan metode *Neighbor Joining* dengan *bootstrap* 1000x.

Hasil pengamatan infestasi caplak *I. cordifer* yang ditemukan pada tubuh kuskus di pulau Ambon, Wetar, Seram, dan Romang menunjukkan bahwa tidak semua kuskus yang berhasil tertangkap terinfestasi caplak *I. cordifer*. Hal ini menunjukkan bahwa tingkat infestasi *I. cordifer* pada kuskus memiliki tingkat infestasi yang rendah. Hasil pengamatan infestasi caplak *I. cordifer* yang ditemukan pada kuskus asal Maluku menunjukkan bahwa caplak *I. cordifer* yang berhasil dikoleksi memiliki intensitas rata-rata 1,06%. Kisaran intensitas rata-rata *Ixodes* yang ditemukan pada kelompok marsupial asal Maluku maupun Australia relatif sama. Hal ini menunjukkan bahwa caplak *I. cordifer* yang ditemukan pada kuskus baik di Pulau Ambon, Wetar, Seram dan Romang sangat berkaitan dengan biologi kuskus pada saat mencari makan maupun beraktivitas pada malam hari. Prevalensi kuskus asal pulau di Maluku yang terinfestasi *I. cordifer* antara 14,28 % sampai dengan 16,67 %. Kisaran prevalensi masing-masing

pulau yang diteliti menunjukkan prevalensi dengan kisaran relatisama. Hal ini berkaitan dengan kesamaan tipe habitat dan perilaku.

Berdasarkan karakter morfologi, terdapat satu jenis yaitu *I. cordifer* yang terdiri dari *I. cordifer* jantan dan betina. Sebanyak 20 individu *I. cordifer* yang ditemukan, diketahui terdapat 2 *I. cordifer* jantan dan 18 *I. cordifer* betina. Secara morfologi *I. cordifer* yang ditemukan memiliki ciri-ciri yaitu: tidak memiliki mata, mempunyai struktur skutum yang keras, tidak memiliki feston, memiliki hypostome dan memiliki struktur celicerae yang panjang. Spesies *Ixodes* yang ditemukan pada penelitian ini juga memiliki spurs pada bagian coxa I-IV, memiliki pregenital plate antara coxa II dan memiliki susunan gigi 2:2. Kunci determinasi ini menunjukkan bahwa anggota *Ixodes* yang ditemukan adalah spesies *I. cordifer*. *I. cordifer* jantan memiliki tubuh berbentuk oval memanjang, dengan skutum menutupi seluruh bagian dorsal, sedangkan *I. cordifer* betina berbentuk oval besar dengan skutum menutupi hanya sebagian anterior dorsalnya. *I. cordifer* betina dapat mengalami perbesaran ketika kenyang darah.

Ukuran morfometrik *I. cordifer* jantan lebih kecil dibandingkan *I. cordifer* betina. Ukuran panjang tubuh *I. cordifer* jantan yang ditemukan pada kuskus Maluku berkisar (3-3,2 μm), sedangkan lebarnya berkisar (1,93-2 μm). Ukuran panjang tubuh *I. cordifer* betina yang ditemukan pada kuskus Maluku berkisar (3,11-10 μm), sedangkan lebarnya berkisar (1,8-8 μm). Analisis morfometrik digunakan untuk mendeskripsikan bagian struktur tubuh caplak secara detail dan pengelompokkan persamaan dan perbedaan antar spesies caplak.

Berdasarkan hasil analisis runutan nukleotida region ITS2 pada sampel *Ixodes* asal Maluku, menunjukkan bahwa jarak genetik berdasarkan region ITS2 antar spesies lebih tinggi dibandingkan dengan gen 16S rRNA. Nukleotida sampel *Ixodes* berdasarkan region ITS2 memiliki komponen G+C lebih banyak dibandingkan komponen A+T. Nukleotida sampel *Ixodes* berdasarkan gen 16S rRNA komponen A+T lebih banyak dibandingkan dengan komponen G+C.

Jarak genetik berdasarkan region ITS2 pada spesies yang sama menunjukkan jarak terkecil sebesar 0%, sedangkan jarak genetik antar spesies mampu membedakan hingga 151%. Region ITS2 mampu membedakan antar spesies dengan parameter nilai jarak genetik terbesar. Komposisi nukleotida *Ixodes* berdasarkan region ITS2 menunjukkan bahwa komponen G+C lebih besar dibandingkan A+T.

Analisis karakter Gen 16S rRNA pada spesies *Ixodes* asal Maluku menunjukkan bahwa gen 16S rRNA mampu membedakan antar spesies *Ixodes* pada level nukleotida maupun jarak genetik. Gen 16S rRNA dapat mengungkapkan variasi intraspesifik diantara *Ixodes* yang ditemukan di Pulau Ambon, Romang, Wetar dan Seram. Analisis jarak genetik sekuen sekuen ITS2 antara sampel *Ixodes* asal Maluku tidak memiliki perbedaan sebesar 0%, sedangkan jarak genetik sekuen gen 16S rRNA antara sampel *Ixodes* asal Maluku memiliki jarak genetik berkisar 0,002 (0,2%) sampai 0,005 (0,5%). Hal ini menunjukkan bahwa sekuen gen *Ixodes* asal Maluku merupakan satu spesies yang termasuk dalam spesies *I. cordifer*.

Berdasarkan karakter morfologi *Ixodes* yang ditemukan pada kuskus asal Maluku adalah *I. cordifer*. Hasil BLAST maupun analisis filogenetik, menunjukkan bahwa *Ixodes* yang ditemukan memiliki kekerabatan dengan *I. holocyclus*. Karakter molekuler *Ixodes* yang ditemukan pada kuskus asal Maluku menunjukkan bahwa sekuen *Ixodes* asal Maluku setelah dianalisis, merupakan spesies *Ixodes* yang belum pernah dilaporkan sebelumnya. Fakta penelitian ini membuktikan bahwa spesies *Ixodes* asal Maluku merupakan spesies *Ixodes cordifer* berdasarkan karakter yang dideskripsikan oleh Neuman (1908) dan Schuzle (1935). Fakta membuktikan bahwa

tidak ditemukan data molekuler sekuen ITS2 dan 16S rRNA di database Genbank untuk spesies *I. cordifer*, hal ini berdampak pada proses rekonstruksi filogenetik dan analisis kekerabatan genetik spesies ini, sehingga berdasarkan hasil BLAST terhadap sekuen ITS2 maupun 16S rRNA spesies *Ixodes* asal Maluku menunjukkan memiliki kekerabatan yang paling dekat dengan *I. holocyclus* asal Australia.

Penelitian karakter morfologi dan molekuler caplak *I. cordifer* yang menginfestasi pada kuskus dapat menjadi data dasar yang mendukung kesuksesan usaha preventif terhadap kemungkinan munculnya infeksi patogen pada kuskus yang disebabkan melalui vektor caplak. Hal ini menjadi salah satu strategi pelestarian kuskus dan pemanfaatannya akan lebih terarah dan berhasil guna apabila status ektoparasit caplak pada satwa ini dapat diketahui dengan pasti.

Kata kunci: infestasi, *Ixodes cordifer*, karakter molekuler, karakter morfologi, kuskus



SUMMARY

One of the endemic wildlife in Indonesia that must be protected and saved both in number and variety is the cuscus. Ectoparasites on cuscus are infestations of the *Ixodes* tick. Ticks are blood-sucking ectoparasites of mammals or other animals. irectly cause blood loss, skin irritation and can indirectly spread bacterial, viral and protozoal diseases. Conventional methods of tick identification are often not easy to implement. Constraints that are often encountered include: the process of collecting and handling samples that damage the structure of the tick, the lack of visible body surface structure in blood-filled females, the similarity between species (*cryptic* species) and the lack of morphological differences in the stages in their life cycle.

The research for *Ixodes cordifer* on cuscus are limited, the importance of information about this ectoparasite. Identifying and determining the phylogenetic relationships of species requires the integration of morphological approaches. Measurement of morphometric characters and observations of morphological ultrastructure using *Scanning Electron Microscope* (SEM) are often used to determine the morphological characters of several different species, or the same species from different populations. The use of ribosomal DNA genetic markers in the *Internal Transcribed Spacer* (ITS2) regionn and 16S rRNA gene sequences has a high success rate for use in the analysis of species kinship and species origin in high and low levels of organisms.

This study aimed to know: (1) the infestation of *Ixodes cordifer* in cuscus of Ambon, Wetar, Seram and Romang island, (2) study the morphological characters of *I. cordifer* based on morphometric observations and ultra-structural descriptions, and (3) the molecular character of *I. cordifer* which was carried out to determine genetic diversity and kinship based on sequence of nucleotide bases that compose the sequence of ITS2 and 16s rRNA genes.

The tick collection consisted of white cuscus, brown cuscus, spotted cuscus, and gray cuscus. The observed morphological components were based on morphometric observations and ultrastructural morphology and DNA sequences. The morphometric data and the ultrastructural morphology were analyzed descriptively. Then, deoxyribonucleic acid (DNA) was isolated, amplified by polymerase chain reaction (PCR) technique, and sequencing. The results of the stratification were analyzed using the MEGA version X program. Genetic distance was analyzed using Kimura 2 parameters, and phylogenetic construction was carried out using the Neighbor joining method with 1000x bootstrap.

The results of observations of *I. cordifer* tick infestations found on cuscus bodies on Ambon island, Wetar island, Seram island, and Romang island showed that not all cuscus caught were infested with *I. cordifer* ticks. This indicates that the level of *I. cordifer* infestation in cuscus has a low level of infestation. The results of the observation of the *I. cordifer* tick infestation found in cuscus from Maluku showed that the *I. cordifer* tick that had been collected had an average intensity of 1.06%. The range of *Ixodes* mean intensity found in groups of marsupials from Maluku and Australia is relatively the same. This indicates that the tick *I. cordifer* found on cuscus both on the islands of Ambon, Wetar, Seram and Romang, Maluku Province, is closely related to the biology of the cuscus during foraging and activities at night. The prevalence range of cuscus from the island in Maluku that was infested with *I. cordifer* was between 14.28% and 16.67%. The prevalence range of each island studied shows

the prevalence with the same relative range. This is related have the same habitat and behavior.

Based on morphological characters, there is one species of tick *I. cordifer* consisting of male and female *I. cordifer*. As many as 20 *I. cordifer* were found, only 2 male *I. cordifer* and 18 female *I. cordifer* were found. Morphologically, *I. cordifer* was found to have the following characteristics: no eyes, hard skutum structure, no feston, hypostome and long celicerae structure. The *Ixodes* species found in this study also had spurs on coxa I-IV, had a pregenital plate between coxa II and had a 2:2 tooth arrangement. These indicate that this *Ixodes* is *I. cordifer*.

The male *I. cordifer* has an elongated oval body, with the skutum covering the entire dorsal part. While the female *I. cordifer* is large oval in shape with the skutum covering only the anterior dorsal portion. *I. cordifer* female can be engorged when full of blood. Morphological description of the dorsal and ventral parts of male and female *I. cordifer* using SEM is clearer and more detailed.

The morphometric size of male *I. cordifer* is smaller than that of female *I. cordifer*. The body length of male *I. cordifer* found in Maluku cuscus ranged from (3-3.2 μm), while the width ranged from (1.93-2 μm). The body length of female *I. cordifer* found in Maluku cuscus ranged from (3.11-10 μm), while the width ranged (1.8-8 μm). Morphometric analysis was used to describe the body structure of ticks in detail and classify the similarities and differences between tick species.

Based on the results of the ITS2 region nucleotide sequence analysis in *Ixodes* samples from Maluku, it was shown that the genetic distance based on the ITS2 region between species was much higher than that of the 16S rRNA gene. *Ixodes* sample nucleotides based on the ITS2 region had more G+C components than A+T components. *Ixodes* sample nucleotides based on the A+T component of 16S rRNA gene were more than those of the G+C component. The genetic distance based on the ITS2 region in the same species shows the smallest distance of 0%, while the genetic distance between species is able to distinguish up to 151%. The ITS2 region was able to distinguish between species with the largest genetic distance value parameter. The nucleotide composition of *Ixodes* based on the ITS2 region shows that the G+C component is larger than A+T.

Character analysis of the 16S rRNA gene in *Ixodes* species from Maluku showed that the 16S rRNA gene was able to differentiate between *Ixodes* species at the nucleotide level and genetic distance. The 16S rRNA gene can express intraspecific variation among *Ixodes* found on Ambon, Romang, Wetar and Seram islands. The genetic distance analysis of ITS2 sequences between *Ixodes* samples from Maluku did not have a difference of 0%, while the genetic distance of 16S rRNA gene sequences between *Ixodes* samples from Maluku had a genetic distance ranging from 0.002 (0.2%) to 0.005 (0.5%). This indicates that the *Ixodes* gene sequence from Maluku is a species belonging to the *I. cordifer* species.

Based on the morphological character of *Ixodes* found in cuscus from Maluku, *I. cordifer*, although the results of BLAST and phylogenetic analysis, showed that it was related to *I. holocyclus*. The molecular character of *Ixodes* found in cuscus from Maluku indicates that the *Ixodes* sequence from Maluku after analysis, is an *Ixodes* species that has not been previously reported. The fact of this study proves that the *Ixodes* species from Maluku is the *I. cordifer* species based on the characters described by Neuman (1908) and Schuzle (1935). The fact proves that no molecular data of ITS2 and 16S rRNA sequences were found in the Genbank database for the *I. cordifer* species, this has an impact on the phylogenetic reconstruction process and analysis of genetic relationship of this species, so that based on BLAST results on ITS2 and 16S

rRNA sequences, *Ixodes* species from Maluku showed that they had genetic relationship to *I. holocyclus* from Australia.

Research on the morphological and molecular characters of the tick *I. cordifer* that infests cuscus can be used as basic data that supports the success of preventive efforts against the possibility of infection in cuscus. The cuscus conservation strategy and its utilization will be more focused and effective if the ectoparasite status of this animal can be known with certainty.

Keywords: cuscus, infestation, *Ixodes cordifer*, molecular characters, morphological characters

