



**IDENTIFIKASI VEKTOR POTENSIAL DENGUE
BERDASARKAN DNA PENGKODE
*INTERNAL TRANSCRIBED SPACER 2 (ITS2)***

SKRIPSI

Oleh
Nur Amalina Fauziyah
NIM 141810401041

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2018**



**IDENTIFIKASI VEKTOR POTENSIAL DENGUE
BERDASARKAN DNA PENGKODE
*INTERNAL TRANSCRIBED SPACER 2 (ITS2)***

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi Biologi (S1) dan mencapai gelar Sarjana Sains

Oleh
Nur Amalina Fauziyah
NIM 141810401041

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2018**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini penulis persembahkan kepada :

1. Ayahanda Nuril Latif, S.Pd., M.Pd.I. dan Ibunda Nur Rohmawati, S.Pd.I. tercinta, yang selalu mendukung, mendoakan dan memberik kasih sayang serta pengorbanan selama ini;
2. Adik-adikku Aidatul Fakhirah dan Muhammad Nabil Maulana Albar yang selalu memberikan semangat dan motivasi;
3. Guru-guru saya sejak taman pendidikan al-quran, taman kanak-kanak sampai dengan perguruan tinggi;
4. Almamater Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember.

MOTO

Dia mengetahui apa yang dihadapan mereka dan apa yang dibelakang mereka, dan mereka tidak mengetahui sesuatu apa pun tentang ilmu-Nya melainkan apa yang Dia kehendaki. Kursi-Nya meliputi langit dan bumi. Dan Dia tidak merasa berat memelihara keduanya dan Dia Mahatinggi, Mahabesar ((Q.S. Al-Baqarah: 255)*)

Allah tidak membebani seseorang melainkan sesuai dengan kesanggupannya ((Q.S. Al-Baqarah: 286)*)

Maka sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan. Sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan ((Q.S. Al-Insyirah: 5-6)*)

* Departemen Agama RI. 2010. Mushaf Aisyah Al-Qur'an dan Terjemah untuk Wanita. Jakarta:

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Nur Amalina Fauziyah

NIM : 141810401041

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Identifikasi Vektor Potensial Dengue Berdasarkan DNA Pengkode *Internal Transcribed Spacer 2* (ITS2)” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Penelitian ini merupakan bagian dari proyek penelitian Dr. rer. nat. Kartika Senjarini, S.Si., M. Si., Dr. Dra. Rike Oktarianti, M.Si., dan Syubbanul Wathon, S.Si., M.Si. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 24 Juli 2018

Yang Menyatakan,

Nur Amalina Fauziyah
NIM 141810401041

SKRIPSI

**IDENTIFIKASI VEKTOR POTENSIAL DENGUE BERDASARKAN
DNA PENGKODE *INTERNAL TRANSCRIBED SPACER 2 (ITS2)***

Oleh

Nur Amalina Fauziyah
NIM 141810401041

Pembimbing :

Dosen Pembimbing Utama : Dr. Dra. Rike Oktarianti, M.Si.

Dosen Pembimbing Anggota : Syubbanul Wathon, S.Si., M.Si.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Identifikasi Vektpor Potensial Dengue Berdasarkan DNA Pengkode *Internal Transcribed Spacer 2* (ITS2)” telah diuji dan disahkan pada hari, tanggal :

tempat : Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Tim Penguji:

Ketua,

Anggota I,

Dr. Dra. Rike Oktarianti, M.Si.
NIP196310261990022001

Syubbanul Wathon, S.Si., M.Si.
NRP 760016783

Anggota II,

Anggota III,

Dr. rer.nat.Kartika Senjarini, S.Si., M.Si.
NIP 197509132000032001

Mukhamad Su’udi, Ph.D
NRP 760016788

Mengesahkan,
Dekan,

Drs. Sujito., Ph.D
NIP 196102041987111001

RINGKASAN

Identifikasi Vektor Potensial Dengue Berdasarkan DNA Pengkode *Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2)*; Nur Amalina Fauziyah, 141810401041, 2018: 53 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Demam Berdarah Dengue (DBD) merupakan salah satu masalah kesehatan yang terus terjadi setiap tahunnya di Indonesia. Virus dengue merupakan penyebab penyakit DBD yang ditularkan oleh nyamuk. *Aedes aegypti* merupakan vektor primer, sedangkan *Aedes albopictus* sebagai vektor sekunder. Pemberantasan vektor virus dengue telah dilakukan tetapi kasus DBD masih cukup tinggi. Tingginya kasus DBD diduga adanya resistensi terhadap vektor virus dengue, sehingga menyebabkan diversitas vektor virus dengue. Analisis diversitas meliputi dua macam identifikasi, yaitu identifikasi morfologi dan identifikasi molekuler. Identifikasi morfologi merupakan metode konvensional untuk mengidentifikasi spesies berdasarkan karakteristik eksternal. Adanya keterbatasan dalam identifikasi morfologi seperti subjektivitas peneliti terhadap ciri-ciri morfologi yang ada maka perlu dilakukan identifikasi molekuler yaitu dengan menggunakan metode *DNA barcoding* untuk memudahkan identifikasi spesies dan juga untuk mendukung metode identifikasi nyamuk berdasarkan morfologi. Identifikasi molekuler menggunakan marka molekuler ITS2 yang terletak diantara gen ribosomal (rRNA) 5,8S dan 28S. Pentingnya identifikasi secara morfologi dan molekuler untuk mengetahui keterkaitan antara diversitas genetik *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* dengan pengendalian vektor potensial virus dengue, maka penelitian ini dilakukan untuk mendukung upaya strategi pengendalian vektor potensial dengue secara tepat.

Metode penelitian meliputi *landing collection* larva *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* asal kecamatan Sumbersari Kabupaten Jember. Kemudian dilanjutkan dengan *rearing* nyamuk *isofemale* di *Animal Care Unit* Laboratorium Zoologi Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Jember. Setelah itu, dilakukan identifikasi morfologi terhadap vektor potensial virus dengue. Setelah dilakukan

identifikasi morfologi, dilanjutkan dengan identifikasi molekuler meliputi isolasi DNA genom larva *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* dengan menggunakan metode *salt-extraction*. Kemudian dilanjutkan amplifikasi PCR dengan menggunakan primer ITS2. Setelah dilakukan amplifikasi, DNA yang didapatkan kemudian dipurifikasi sehingga diperoleh DNA murni. Setelah itu, dilanjutkan dengan analisis sekuensing melalui jasa 1st base (Singapore) dan hasil yang diperoleh kemudian dianalisis dan dibuat rekonstruksi pohon filogenetik menggunakan *software* Mega6.

Identifikasi morfologi *Ae. aegypti* Sumpersari dan *Ae. albopictus* Sumpersari menunjukkan perbedaan, pada *Ae. aegypti* pada bagian *thorax* terdapat garis seperti *lyre* dengan dua garis lengkung dan dua garis lurus, sedangkan pada *Ae. albopictus* pada bagian *thorax* memiliki satu garis putih lurus. Identifikasi molekuler berdasarkan DNA pengkode ITS2, panjang basa nukleotida pada *Ae. aegypti* sekitar 331 pb dan memiliki kemiripan 100% dengan *Ae. aegypti* isolate (KY382418,1). *Ae. albopictus* Sumpersari memiliki panjang basa nukleotida sekitar 550 pb dan 400 pb. *Ae. albopictus* dengan panjang basa nukleotida 550 pb memiliki kemiripan 94% dengan *Ae. albopictus* isolate Varazze (JX679395,1). Pohon filogenik terhadap kedua spesies menunjukkan kedua spesies tersebut berada pada cabang yang berbeda.

PRAKATA

Puji syukur panjatkan kehadiran Allah Yang Maha Esa yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya kepada penulis, sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi yang berjudul “*Identifikasi Vektor Dengue Berdasarkan DNA Pengkode Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2)*”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu prasyarat dalam menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bimbingan, bantuan, dan dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan rasa hormat dan terima kasih kepada:

1. Dr. rer. nat. Kartika Senjarini, S.Si., M.Si., selaku Dosen Pembimbing yang telah dengan sabar dan senang hati meluangkan waktunya untuk memberikan bimbingan serta petunjuk sehingga selesainya skripsi ini dan sebagai ketua riset TBV yang telah mengizinkan penulis untuk bergabung dengan tim riset TBV;
2. Dr. Dra. Rike Oktarianti, M.S.i., selaku Dosen Pembimbing Utama yang dengan sabar dan banyak meluangkan waktunya untuk memberikan bimbingan serta motivasi sehingga selesainya skripsi ini;
3. Syubbanul Wathon, S.Si., M.Si., selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah dengan sabar membimbing dan banyak meluangkan waktunya untuk memberikan bimbingan serta motivasi sehingga selesainya skripsi ini;
4. Mukhamad Su’udi, Ph.D., selaku Dosen Penguji II yang telah memberikan bimbingan dalam ujian skripsi guna kesempurnaan skripsi ini;
5. Prof. Dr. Sudarmadji, M.A., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan bimbingan dan motivasi dalam masa perkuliahan sampai dengan penyelesaian penyusunan skripsi ini;
6. Dina Fitriyah, S.Si., M.Si. selaku teknisi Laboratorium Bioteknologi yang telah banyak membantu dan memberikan nasihat selama penelitian;

7. bapak dan ibu dosen serta seluruh staf di lingkungan FMIPA Universitas Jember, atas segala ketulusan dan keikhlasannya dalam membantu penulis selama masa perkuliahan;
8. Ayahanda Nuril Latif dan ibunda Nur Rohmawati yang selalu memberikan dukungan, do'a, semangat serta motivasi, dan alasan utama penyelesaian penyusunan skripsi ini;
9. adik-adikku yang selalu menjadi motivasi agar penyusunan skripsi ini cepat terselesaikan;
10. teman-teman seperjuangan, Ratna Safitri, Lailly Nur, Aria Fransisca, dan Iffa Ali atas segala kerjasama dan bantuan semasa penelitian hingga penulisan skripsi ini;
11. kakak-kakak TBV, Dewi Masruroh, Ika Wahyuni, Fitria M. Fauzi, Aisyah Prihandana, M. Guhtar Wibisono, dan Novita Amalia yang telah memberikan ilmunya semasa penelitian dan telah memberikan motivasi;
12. teman-teman Biologi angkatan 2014 yang saling memberikan motivasi dan semangat;
13. sahabat-sahabatku, Jefrinka Nelza, Icha Atika, Eliza Nazillah, Ana Maghfirah, dan Ratna Safitri yang selalu ada baik suka maupun duka, dan yang telah menjadi *moodbooster* selama penyusunan skripsi;
14. semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah banyak membantu semasa penelitian maupun penyusunan skripsi ini.

Semoga amal kebaikan dan bantuannya mendapat balasan dari Allah Yang Maha Kuasa. Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Penulis berharap, skripsi ini dapat bermanfaat bagi yang memerlukannya.

Jember, Juli 2017

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	iii
HALAMAN MOTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN.....	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN.....	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan.....	3
1.4 Batasan Masalah	3
1.5 Manfaat.....	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Vektor Potensial Dengue	5
2.2 Pengendalian Vektor DBD	8
2.3 Diversitas Genetik <i>Aedes</i>	9
2.4 <i>Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2)</i>.....	11
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	13
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	13
3.2 Alat dan Bahan.....	13
3.2.1 Alat.....	13
3.2.2 Bahan	13
3.3 Prosedur Penelitian.....	13
3.3.1 <i>Landing Collection</i>	13
3.3.2 Rearing Nyamuk <i>Isofemale</i>	14
3.3.3 Identifikasi Morfologi Vektor Potensial Dengue.....	15
3.3.4 Identifikasi Molekuler Vektor Potensial Dengue	15
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	18
4.1 Identifikasi Morfologi Vektor Potensial Dengue	18
4.1.1 Nyamuk Dewasa <i>Ae. aegypti</i> dan <i>Ae. albopictus</i>	18
4.1.2 Larva <i>Ae. aegypti</i> dan <i>Ae. albopictus</i>	19
4.2 Identifikasi Molekuler Vektor Potensial Dengue	20
4.3 Analisis Nukleotida Vektor Dengue	23

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	29
5.1 Kesimpulan	29
5.2 Saran	29
DAFTAR PUSTAKA	30
LAMPIRAN	36



DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1 Hasil BLAST sekuen DNA <i>Ae. aegypti</i> pada NCBI.....	24
Tabel 4.2 Hasil BLAST sekuen DNA <i>Ae. albopictus</i>	24

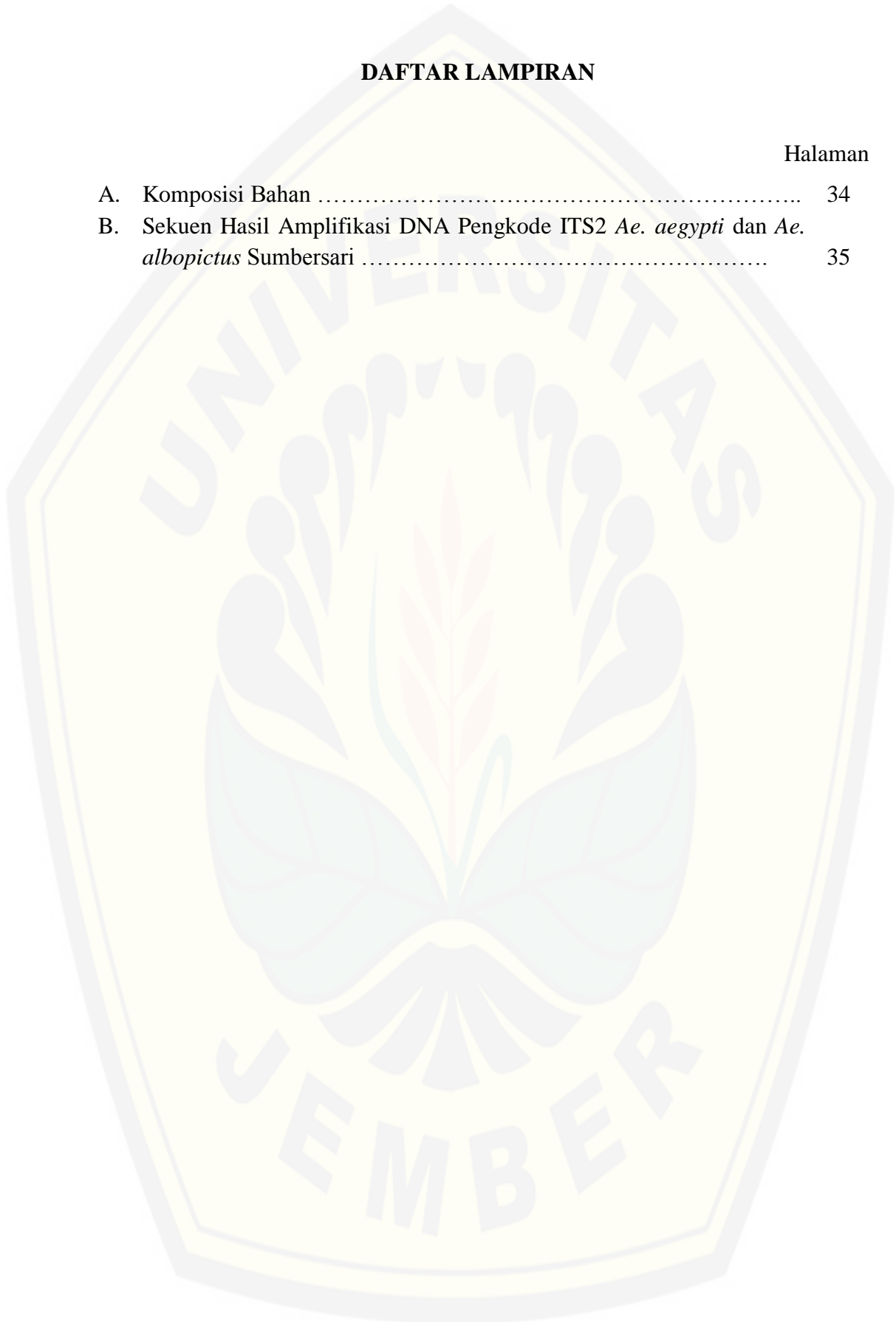


DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Siklus hidup <i>Ae. aegypti</i>	5
Gambar 2.2 Perbedaan skutum <i>Ae. aegypti</i> dan <i>Ae. albopictus</i>	7
Gambar 2.3 Perbedaan mesonotum dan kaki <i>Ae. aegypti</i> dan <i>Ae. albopictus</i>	8
Gambar 2.4 Peta wilayah gen pengkode ITS2	12
Gambar 4.1 Morfologi nyamuk dewasa	19
Gambar 4.2 Larva <i>Ae. aegypti</i> (A) dan Larva <i>Ae. albopictus</i> (B).....	19
Gambar 4.3 Perbedaan <i>comb scale</i> larva <i>Ae. aegypti</i> dan <i>Ae. albopictus</i>	20
Gambar 4.4 Visualisasi DNA genom larva.....	21
Gambar 4.5 Visualisasi produk amplifikasi PCR dengan Primer ITS2	21
Gambar 4.6 Visualisasi hasil purifikasi DNA pengkode ITS2	22
Gambar 4.7 Pensejajaran sekuen DNA <i>Ae. aegypti</i> (A), <i>Ae. albopictus</i> (B)	26
Gambar 4.8 Pohon filogeni <i>Ae. aegypti</i> dan <i>Ae. albopictus</i>	28

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Komposisi Bahan	34
B. Sekuen Hasil Amplifikasi DNA Pengkode ITS2 <i>Ae. aegypti</i> dan <i>Ae. albopictus</i> Sumbersari	35



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Demam Berdarah Dengue (DBD) merupakan penyakit infeksi dengan distribusi penyebaran di wilayah tropis dan subtropis (Bhatt *et. al.*, 2013). Di Indonesia, DBD merupakan salah satu masalah kesehatan yang terus terjadi setiap tahunnya (Kemenkes, 2010). Hal ini dikarenakan mobilitas penduduk yang tinggi, wilayah perkotaan yang mengalami perkembangan begitu cepat, perubahan iklim, perubahan kepadatan dan distribusi penduduk serta faktor-faktor epidemiologi lainnya (Kemenkes, 2016).

Virus dengue merupakan penyebab DBD yang ditularkan oleh nyamuk dan penularannya terjadi sangat cepat. *Ae. aegypti* merupakan vektor primer, sedangkan *Ae. albopictus* merupakan vektor sekunder dari penyakit DBD. Virus dengue memiliki empat *serotype* yaitu DEN-1, DEN-2, DEN-3, dan DEN-4 (WHO, 2014). Virus dengue merupakan virus dari famili *Flaviviridae* genus *Flavivirus* yang penularannya dilakukan oleh serangga sehingga dikenal dengan istilah arbovirus (*arthropod borne virus*) (Supartha, 2010). *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* merupakan vektor virus dengue lebih menyukai menghisap darah manusia dari pada hewan (Komariah dkk., 2010). Virus dengue ditransmisikan ke dalam tubuh manusia melalui gigitan nyamuk betina. Seseorang yang telah terinfeksi virus dengue dapat menjadi sumber infeksi bagi nyamuk betina lain yang belum terinfeksi virus dengue (WHO, 2014).

Sejauh ini, pengendalian vektor DBD ini sangat sulit dilakukan karena *Ae. aegypti* memiliki adaptasi yang baik terhadap lingkungan yang ekstrem. Selain itu, *Ae. aegypti* mampu berkembang dengan cepat meskipun telah dilakukan pemberantasan baik oleh manusia maupun terjadi bencana alam (Tyagi *et al.*, 2017). Pengendalian *Ae. aegypti* yang telah dilakukan menggunakan kombinasi antara insektisida kimia dan sanitasi lingkungan. Terdapat beberapa insektisida yang menyebabkan resistensi terhadap nyamuk, sehingga mengganggu proses pengontrolan *Ae. aegypti* sebagai vektor utama DBD. Brazil merupakan salah satu contoh dari negara yang menggunakan insektisida dalam proses pengendalian *Ae.*

aegypti dewasa maupun larva. Insektisida yang digunakan yaitu jenis *organophosphate* dan *pyrethroids*. Penggunaan *organophosphate* tidak hanya menyebabkan resistensi terhadap nyamuk dewasa saja, melainkan juga menyebabkan resistensi terhadap larva. Selain itu, penggunaan insektisida jenis *pyrethroids* di Rio de Janeiro juga menyebabkan resistensi terhadap *Ae. aegypti* (Bona *et al.*, 2012).

Kabupaten Jember merupakan salah satu wilayah dengan kasus DBD cenderung fluktuatif (Departemen Kesehatan RI, 2014). Berdasarkan laporan Kemenkes RI (2015), Kabupaten Jember pada tahun 2014 termasuk ke dalam 10 kabupaten/kota dengan jumlah kasus DBD terbanyak mencapai 199 kasus. Menurut profil kesehatan Kabupaten Jember tahun 2016, kasus DBD di Kabupaten Jember mencapai 1.298 kasus (Dinas Kesehatan Kabupaten Jember, 2017). Salah satu upaya pengendalian vektor DBD di Kabupaten Jember yaitu dengan dilakukannya *Fogging*. Akan tetapi, angka kasus DBD di Kabupaten Jember masih terbilang tinggi (Anita dkk., 2016). Selain *fogging*, Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Timur juga telah menyediakan larvasida dan insektisida untuk pengendalian vektor, namun masih saja terjadi kasus DBD di berbagai daerah di Jawa Timur khususnya di Kabupaten Jember (Kemenkes RI, 2015). Tingginya angka DBD di Kabupaten Jember, diduga adanya resistensi vektor terhadap insektisida yang digunakan. Resistensi vektor dengue terhadap insektisida dan kemampuan adaptasi ekologis yang baik dikarenakan adanya mutasi baru dan rekombinasi materi genetik dari vektor. Adanya mutasi baru dan rekombinasi materi genetik pada vektor dengue dapat menyebabkan diversitas pada vektor dengue (Sousa *et. al.*, 2017).

Analisis diversitas vektor potensial dengue meliputi dua macam identifikasi, yaitu identifikasi morfologi dan molekuler. Identifikasi morfologi merupakan metode konvensional untuk mengidentifikasi spesies nyamuk berdasarkan karakteristik eksternal. Adanya keterbatasan dalam identifikasi morfologi seperti subjektivitas peneliti terhadap ciri-ciri morfologi yang ada maka perlu dilakukan identifikasi molekuler yaitu dengan menggunakan metode *DNA*

barcoding untuk memudahkan identifikasi spesies dan juga untuk mendukung metode identifikasi nyamuk berdasarkan morfologi (Chan *et al.*, 2014).

DNA barcoding merupakan teknik identifikasi spesies secara modern yang digunakan untuk membedakan morfologi spesies yang relatif dekat (Botovska *et al.*, 2016). *DNA barcoding* yang dapat digunakan untuk analisis diversitas genetik vektor potensial dengue salah satunya yaitu ITS2. ITS2 memiliki daerah desain primer universal ((Yao *et al.*, 2010), (Chan *et al.*, 2014)). Analisis diversitas genetik menurut Neto *et al.* (2017) dengan menggunakan marker ITS2 yang terletak diantara gen ribosomal (rRNA) 5,8S dan 28S dapat digunakan sebagai identifikasi spesies, sehingga memungkinkan untuk menganalisis karakteristik molekuler DNA *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus*. Pentingnya identifikasi secara morfologi dan molekuler untuk mengetahui keterkaitan antara diversitas genetik *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* dengan pengendalian vektor potensial dengue, maka penelitian ini dilakukan untuk mendukung upaya strategi pengendalian vektor potensial dengue secara tepat.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana karakteristik morfologi dan molekuler *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* berdasarkan DNA pengkode ITS2 serta bagaimana hubungan filogenetik antara *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus*?

1.3 Tujuan

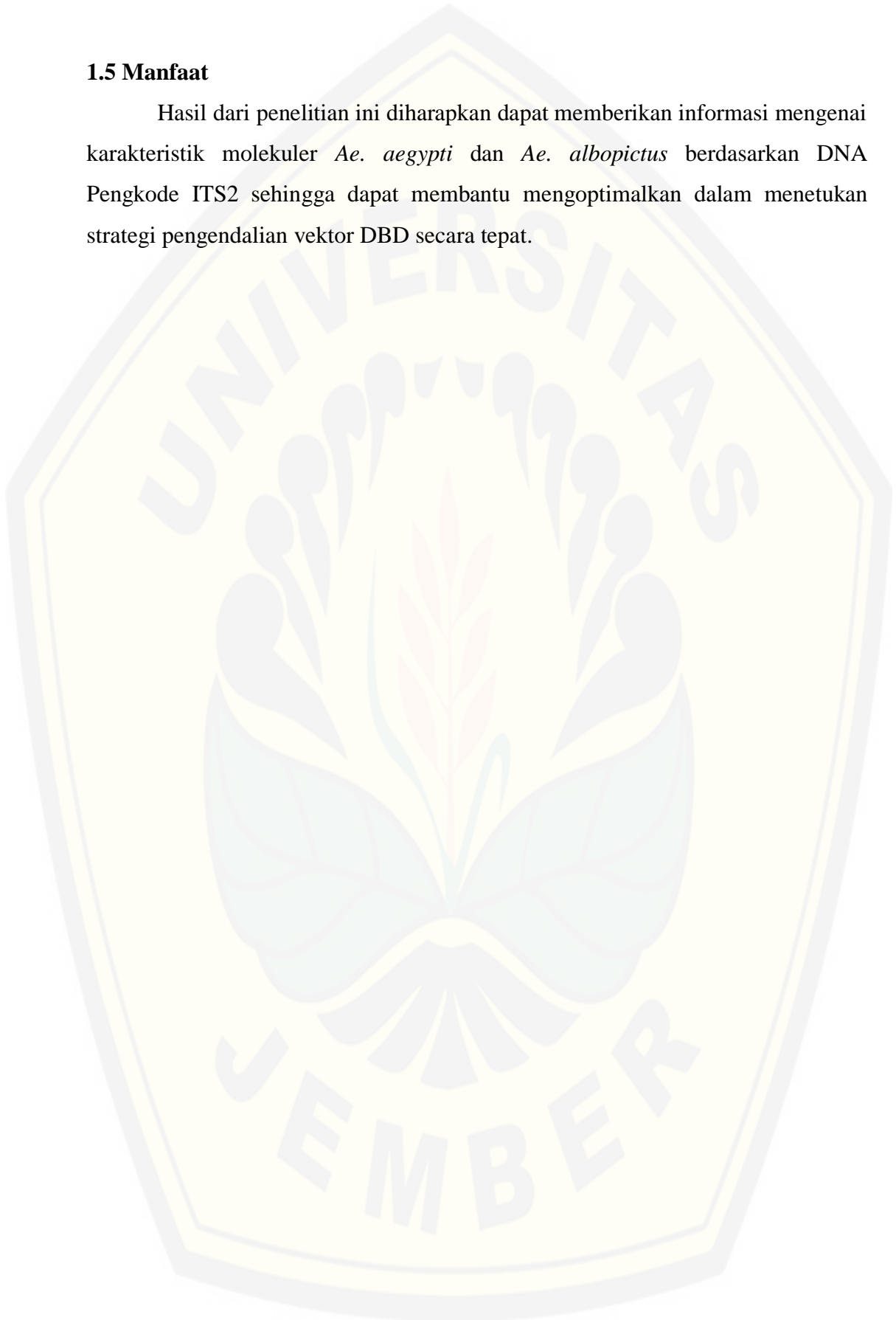
Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi karakteristik secara morfologi dan molekuler *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* berdasarkan DNA pengkode ITS2 dan mengetahui hubungan filogenetik *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus*.

1.4 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini yaitu analisis karakteristik molekuler *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* asal kecamatan Sumpersari berdasarkan DNA pengkode ITS2.

1.5 Manfaat

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai karakteristik molekuler *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* berdasarkan DNA Pengkode ITS2 sehingga dapat membantu mengoptimalkan dalam menentukan strategi pengendalian vektor DBD secara tepat.

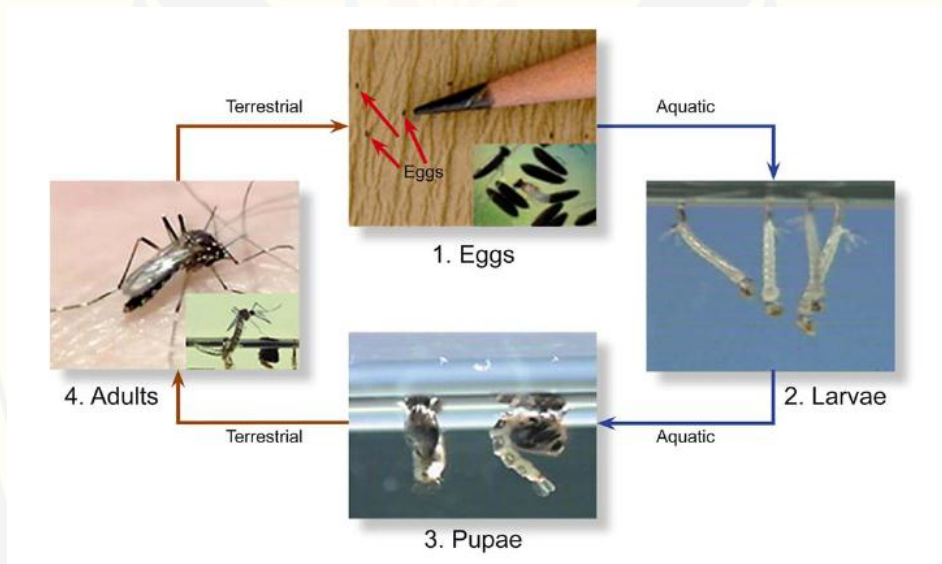


BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Vektor Potensial Dengue

Ae. aegypti merupakan vektor primer dan *Ae. albopictus* merupakan vektor sekunder dari virus dengue (WHO, 2014). Adapun klasifikasi dan karakteristik dari *Ae. aegypti* sebagai berikut.

Filum : Arthropoda
Kelas : Insecta
Ordo : Diptera
Sub Ordo : Nematocera
Famili : Culicidae
Sub Famili : Culicinae
Genus : Aedes
Spesies : *Aedes aegypti*
(Christophers, 1960).



Gambar 2.1 Siklus hidup *Ae. aegypti* (Urdaneta-Marquez and Failloux, 2011)

Siklus hidup *Ae. aegypti* yaitu meliputi telur, larva, pupa, dan kemudian menjadi nyamuk dewasa. *Ae. aegypti* betina dewasa mampu menghasilkan telur sebanyak 100 sampai 200 butir perhari. Telur *Ae. aegypti* mampu bertahan dalam

kondisi kering selama berbulan-bulan dan akan menetas setelah telur terendam air (Zettel and Kaufman, 2009). Telur yang telah menetas akan berubah menjadi larva atau jentik. Setelah 6-8 hari jentik akan berubah menjadi pupa dan akan menetas menjadi nyamuk setelah berumur 1-2 hari. *Ae. aegypti* bersifat *anthropophilik* yaitu lebih suka hidup disekitar manusia. *Ae. aegypti* jantan dapat mencapai umur \pm 1 minggu, sedangkan betina dapat mencapai umur 2-3 bulan (Suyanto dkk., 2011). Siklus hidup *Ae. aegypti* dapat dilihat pada Gambar 2.1.

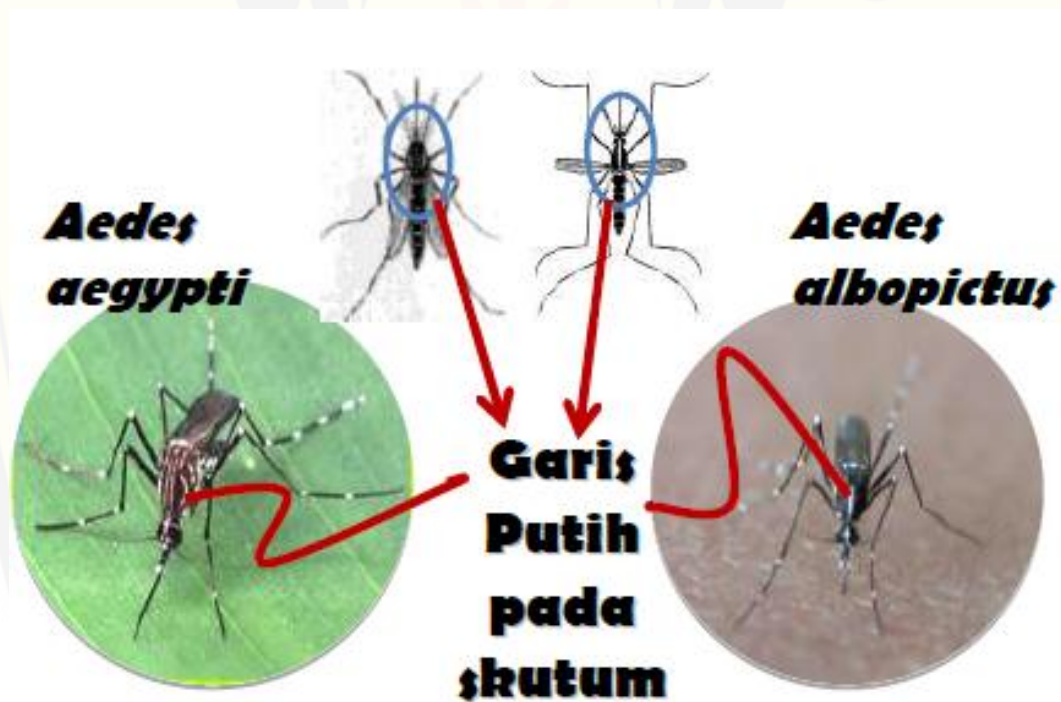
Adapun klasifikasi dan karakteristik dari *Ae. albopictus* sebagai berikut.

Filum : Arthropoda
Kelas : Insecta
Ordo : Diptera
Famili : Culicidae
Sub Famili : Culicinae
Genus : Aedes
Sub Genus : Stegomyia
Spesies : *Aedes albopictus*
(Jupp, 1996).

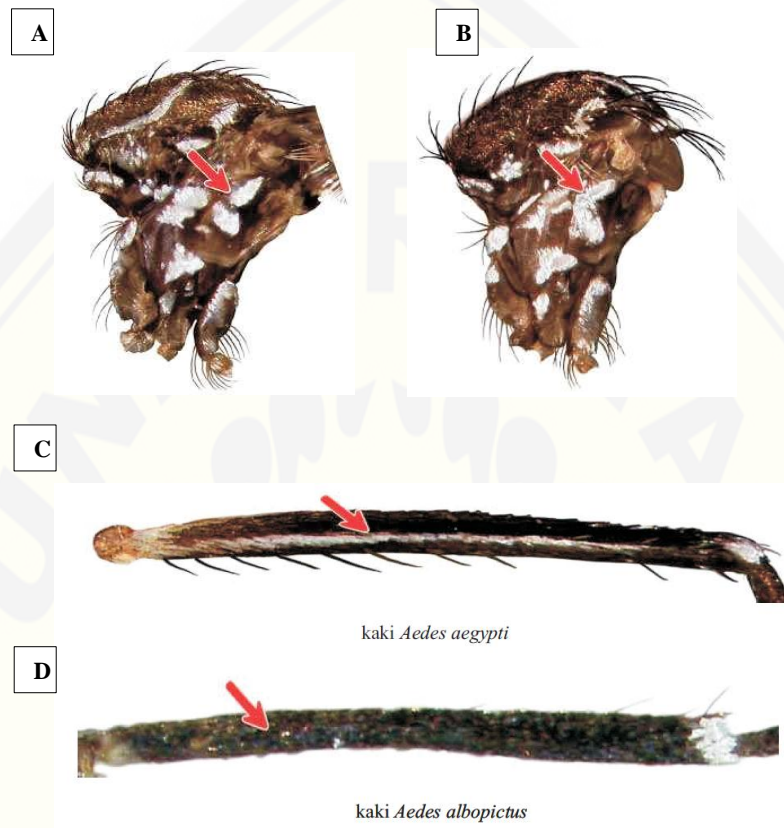
Siklus hidup *Ae. albopictus* secara keseluruhan sama seperti *Ae. aegypti*. *Ae. albopictus* memiliki telur berwarna hitam dan berukuran lebih besar dari ukuran telur *Ae. aegypti* (Bova *et al.*, 2014). Telur dapat bertahan dalam kondisi kekeringan sampai satu tahun (Rios and Maruniak, 2004). Setelah telur menetas, akan berubah menjadi larva dengan bentuk kepala bulat silindris, memiliki antena pendek dan halus dengan rambut-rambut berbentuk sikat di bagian depan kepala, sedangkan pada ruas abdomen VIII terdapat gigi sisir yang khas dan tanpa duri pada bagian lateral *thorax* (Sivanathan, 2006). Setelah itu, larva akan berkembang menjadi pupa. Tahap perkembangan terakhir yaitu menjadi nyamuk dewasa. *Ae. albopictus* dewasa memiliki tubuh berwarna hitam dengan garis putih pada dorsal. Kaki *Ae. albopictus* memiliki bercak hitam putih. *Ae. albopictus* betina akan bertelur setelah empat atau lima hari melakukan *blood feeding* (CDC, 2012).

Morfologi *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* secara makroskopis terlihat hampir sama, tetapi morfologi keduanya dapat dibedakan melalui bagian

skutumnya. Garis putih pada bagian skutum menjadi kunci penting untuk membedakan antara spesies *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* (Supartha, 2008). Skutum *Ae. aegypti* terdiri dari dua garis putih sejajar di bagian dorsal tengah *thorax* yang diapit oleh dua garis lengkung berwarna putih. Sedangkan skutum *Ae. albopictus* hanya memiliki satu garis putih di bagian tengah *thorax* (Sivanathan, 2006). Perbedaan skutum antara *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* dapat dilihat pada Gambar 2.2. Secara mikroskopis juga dapat dibedakan dari bagian mesopimeron pada mesonotumnya dan perbedaannya juga dapat di lihat dari bagian anterior kaki (Gambar 2.3). Anterior kaki *Ae. aegypti* bagian femur kaki tengah terdapat strip putih memanjang sedangkan pada *Ae. albopictus* tidak terdapat strip putih memanjang (Rahayu dan Ustiawan, 2013).



Gambar 2.2 Perbedaan skutum *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* (Supartha, 2008)



Gambar 2.3 Perbedaan mesonotum dan kaki *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* (Mesonotum *Ae. aegypti* (A), *Ae. albopictus* (B), kaki *Ae. aegypti* (C), *Ae. albopictus* (D)) (Rahayu dan Ustiawan, 2013)

2.2 Pengendalian Vektor DBD

Virus dengue setiap tahunnya menginfeksi sekitar 50 juta orang diseluruh dunia (WHO, 2009). Pada tahun 2015, di Indonesia tercatat terdapat 126.675 kasus DBD dengan 1.229 orang diantaranya meninggal dunia. Jumlah kasus tersebut lebih tinggi dibandingkan tahun 2014 yang mencapai 100.347 kasus dengan jumlah penderita meninggal mencapai 907 (Kemenkes, 2016). Tahun 2016, kasus tertinggi DBD di Indonesia terjadi di Provinsi Bali dengan angka kesakitan 519,90 per 100.000 penduduk (Kemenkes RI, 2017).

DBD menjadi KLB (Kejadian Luar Biasa) pada tahun 2010 di Kabupaten Jember (Departemen Kesehatan RI, 2014). Tahun 2016, jumlah kasus DBD di Kabupaten Jember mencapai 1.298 kasus dengan jumlah kasus terbanyak terjadi di kecamatan Patrang sejumlah 99 kasus dan kecamatan Sumpersari menempati

posisi ketiga dengan jumlah mencapai 56 kasus (Dinkes Kabupaten Jember, 2017).

Berbagai upaya telah dilakukan untuk memberantas dan menurunkan jumlah populasi vektor DBD. Salah satu kegiatan pemberantasan vektor yang dilakukan oleh Kemenkes RI (2010) yaitu PSN (pemberantasan sarang nyamuk) yang dilakukan secara berkala dengan pesan inti 3M plus. Selain itu, Kemenkes RI juga melakukan upaya pengendalian jentik dengan pembentukan Jumentik (Juru Pemantau Jentik) agar diharapkan penularan dan penyebaran penyakit DBD dapat dicegah atau dikurangi. Pengendalian vektor secara konvensional seperti penggunaan insektisida kimiawi juga kurang efektif, dikarenakan penggunaan pestisida kimiawi dapat mencemari lingkungan, membunuh flora atau fauna non target dan dapat menimbulkan resisten terhadap vektor (Nurhayati, 2005). Menurut Lutz (2000), pengendalian larva dapat dilakukan dengan penggunaan senyawa bakteri *Bacillus thuringiensis israeliensis* (Bti) yang diketahui efektif mengendalikan larva.

Selain cara konvensional, juga telah dilakukan upaya radiasi untuk menghasilkan *Ae. aegypti* jantan mandul. Radiasi menghasilkan jantan mandul yang dikenal dengan istilah TSM (Teknik Serangga Mandul). Prinsip dari TSM yaitu membunuh serangga dengan serangga itu sendiri. TSM dilaporkan merupakan teknik yang efektif untuk memberantas vektor DBD karena bersifat spesies spesifik (Nurhayati dkk., 2010). Vektor DBD sulit untuk diberantas karena vektor DBD dapat berkembangbiak baik di dalam rumah seperti bak mandi ataupun diluar rumah seperti di lubang pohon, kaleng bekas atau genangan air lainnya. Larva nyamuk dapat berkembangbiak dengan volume air yang setara dengan satu sendok teh (Supartha, 2008). Selain itu, telur dari vektor DBD dapat bertahan dalam kekeringan dan akan menetas apabila telur sudah terendam air (Zettel and Kaufman, 2009).

2.3 Diversitas Genetik *Aedes*

Diversitas genetik merupakan variasi genetik pada setiap individu termasuk diversitas nukleotida, insersi dan delesi (Qi *et al.*, 2014). Tingkat

diversitas genetik pada nyamuk mampu mempengaruhi kemampuannya untuk menularkan suatu penyakit. Selain itu, adanya diversitas genetik dapat juga mempengaruhi terhadap respon insektisida yang digunakan untuk pemberantasan nyamuk. Semakin tinggi tingkat diversitas genetik suatu organisme, semakin tinggi pula penyesuaian diri organisme tersebut terhadap lingkungannya. (Mulyaningsih, 2004).

Diversitas genetik pada vektor memiliki pengaruh terhadap kapasitas vektorial yaitu angka yang menunjukkan terjadinya transmisi dan memiliki pengaruh terhadap kemampuan vektor dalam menularkan penyakit (Munif dkk., 2004). Di Venezuela terjadi diversitas genetik *Ae. aegypti* sehingga menyebabkan kerentanan terinfeksi virus dengue. Diversitas genetik *Ae. aegypti* di Venezuela di analisis menggunakan *Single Strand Conformation Polymorphism* (SSCP). Hal tersebut sesuai dengan informasi yang diberikan oleh dinas kesehatan Venezuela, DBD telah menjadi endemik di beberapa wilayah di Venezuela (Herrera *et al.*, 2006). Paduan *et al.* (2006) menyebutkan bahwa di Brazil *Ae. aegypti* memiliki keragaman genetik antar populasi. Keragaman genetik tersebut sangat signifikan dan menunjukkan bahwa populasi *Ae. aegypti* memiliki perbedaan genetik yang tinggi.

Menurut Mulyaningsih (2004), diversitas genetik *Ae. albopictus* juga terjadi di Indonesia. Analisis diversitas genetik *Ae. albopictus* dilakukan dengan metode *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) menggunakan primer tunggal dan sampel diambil dari beberapa populasi nyamuk yang berbeda yang berasal dari daerah Padang, Yogyakarta, Banjar dan Timika. Daerah Yogyakarta memiliki tingkat diversitas genetik *Ae. albopictus* tertinggi dibandingkan dengan daerah lainnya. Diversitas yang tinggi menunjukkan tingkat keanekaragaman genetik yang tinggi pula. (Munif dkk., 2011). Tinggi rendahnya suatu tingkat diversitas individu dalam populasi dapat dipengaruhi oleh adanya seleksi alam, yaitu oleh faktor ekologi. Selain itu, terdapat beberapa faktor penyebab terjadinya variasi genetik yaitu variabel lingkungan dari habitat nyamuk, dan tempat perkembangbiakan nyamuk yang akan menentukan distribusi dan persebaran nyamuk *Ae. albopictus* (Adilla-amranudin, 2016).

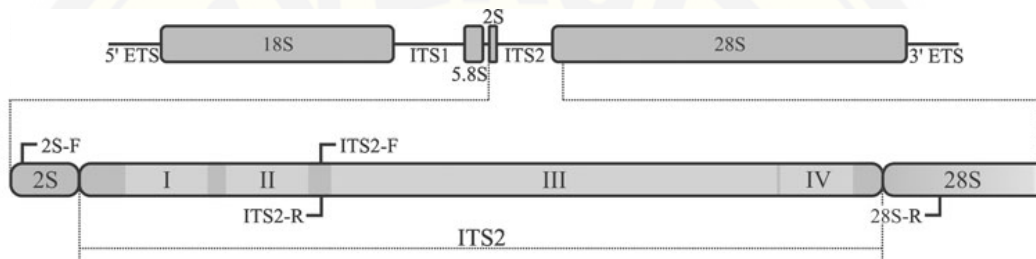
Berdasarkan penelitian Sousa *et al.* (2017), daerah yang melakukan pemberantasan vektor menggunakan insektisida memiliki diversitas genetik yang tinggi. Selain itu, keragaman genetik intraspesifik vektor yang diperkuat oleh adanya mutasi baru dan rekombinasi materi genetik menyebabkan spesies maupun populasi dari vektor mampu menghadapi perubahan lingkungan. Diversitas genetik pada vektor potensial dengue dapat dilakukan dengan analisis menggunakan *DNA barcoding*. *DNA barcoding* yang dapat digunakan dalam analisis diversitas genetik pada vektor potensial dengue yaitu salah satunya ITS2. ITS2 diketahui memiliki daerah desain primer universal (Yao *et al.*, 2010) (Chan *et al.*, 2014).

2.4 Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2)

Internal transcribed spacer 2 (ITS2) terletak di dalam DNA ribosomal (rDNA) diantara gen ribosomal (rRNA) 5.8S dan 28S yang berfungsi dalam regulasi dari transkripsi subunit aktif ribosomal. Klasifikasi taksonomi secara cepat dapat menggunakan marka molekuler ITS2 (Feng *et al.*, 2015). Marka molekuler ITS2 merupakan fitur penting yang dapat digunakan sebagai marker untuk identifikasi spesies serta studi populasi dan filogenetik (Neto *et al.*, 2017). ITS2 memiliki peranan penting dalam pematangan pre-ribosomal RNA (pre-rRNA) sebagai struktur sekunder, yang diperoleh sesaat setelah transkripsi. Struktur sekunder ini mengenali motif oleh kompleks enzimatik yang berperan dalam proses dari pre-rRNA (Marinho *et al.*, 2013).

Daerah ITS2 lebih terkonservasi pada organisme eukariot, dari yeast sampai mamalia (Marinho *et al.*, 2011). Analisis menggunakan ITS2 telah berhasil dilakukan oleh Yao (2010) yaitu tingkat keberhasilan identifikasi pada tanaman di level genus mencapai 97%, sedangkan pada hewan di level spesies mencapai 91,1%. Struktur ITS2 yang terkonservasi dapat memberikan manfaat sebagai informasi biologis untuk *alignment*. Selain itu, ITS2 juga dapat digunakan untuk mengetahui karakteristik morfologi molekular sebagai proses identifikasi spesies. ITS2 yang terletak di dalam ribosomal DNA digunakan sebagai penanda atau marker dari taksonomi nyamuk. Spesies yang memiliki kekerabatan dekat

dapat dibedakan menggunakan marka molekuler ITS2. Pada genus *Aedes*, ITS2 menunjukkan ukuran yang relatif lebih kecil yaitu berkisar dari 196-373 pb dibandingkan dengan genus *Anopheles* yang berkisar 374-572 pb. Wilayah ITS2 pada *Aedes* lebih terkonservasi dibandingkan pada *Anopheles* (Banerjee *et al.*, 2007). Berikut ini gambar peta wilayah gen pengkode ITS 2.



Gambar 2.4 Peta wilayah gen pengkode ITS2 (Marinho *et al.*, 2013).

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada Bulan Januari 2018 sampai Mei 2018 di Laboratorium Bioteknologi dan Laboratorium Zoologi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah aspirator, mikroskop stereo, kandang nyamuk, *tray*, kertas pupasi, kapas, pipet plastik, gelas plastik, gelas beaker, gelas ukur, *microtube*, *freezer*, oven, *sentrifuge*, mikropipet, mikrotip, vortex, *vacuum dry*, *hot plate*, mesin elektroforesis, UV Illuminator dan mesin PCR.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan yaitu sukrosa 10%, tikus wistar, *homogenizing buffer*, SDS 20%, NaCl 6M, Buffer TAE 1x, EtBr, 1% dan 1,5% gel agarose, isopropanol, etanol 70%, proteinase K, trisbase, asam asetat glasial, EDTA 0,5M, *loading dye*, primer ITS2 (SIGMA, Jerman), DNA template, ddH₂O steril, 2x PCR Master Mix (Intron, Korea), Marker DNA 1kpb dan 3000pb (GeneOn, Jerman), *membrane binding solution*, *wash solution*, *nuclease free water*, dan aquades steril.

3.3 Prosedur Penelitian

Nyamuk yang digunakan dalam penelitian ini yaitu nyamuk *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* hasil koleksi dari kecamatan Sumbersari Kabupaten Jember.

3.3.1 Landing Collection

Landing collection dilakukan untuk mengumpulkan larva *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* dari Kecamatan Sumbersari, Kabupaten Jember untuk selanjutnya

dilakukan *rearing*. *Landing collection* larva *Ae. aegypti* dilakukan dengan mencari larva di kontainer air dekat dengan pemukiman penduduk, sedangkan *Ae. albopictus* dilakukan dengan mencari larva diluar rumah seperti di lubang pohon, kaleng bekas, atau penampungan air lainnya. Hal tersebut dikarenakan *Ae. albopictus* lebih menyukai tempat di luar rumah (Supartha, 2008). Larva diambil dengan menggunakan pipet dan dikumpulkan di wadah plastik. Kemudian larva yang telah terkumpul diletakkan di dalam *tray* dikandang.

3.3.2 Rearing Nyamuk *Isofemale*

Rearing Ae. aegypti dan *Ae. albopictus isofemale* dilakukan di *Animal Care Unit* Laboratorium Zoologi Jurusan Biologi FMIPA Universitas Jember. *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus isofemale* diperoleh dari masing-masing lima ekor nyamuk betina *gravid* yaitu nyamuk betina yang telah siap untuk bertelur baik *Ae. aegypti* maupun *Ae. albopictus* asal kecamatan Sumbersari, kemudian diletakkan didalam kandang yang terpisah sehingga diperoleh keturunan *isofemale*. kandang nyamuk diperlukan untuk *rearing Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus isofemale* sebagai tempat nyamuk dewasa baik jantan maupun betina serta digunakan tikus Wistar untuk *blood feeding* nyamuk betina dan larutan sukrosa 10% untuk nyamuk jantan. Nyamuk betina melakukan *blood feeding* untuk memperoleh nutrisi, sedangkan larutan sukrosa 10% digunakan sebagai sumber nutrisi nyamuk jantan.

Nyamuk *direaring* mulai tahap larva sampai menjadi nyamuk dewasa. Larva *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* diperoleh dari hasil *landing collection* dari tempat penampungan air, bak kamar mandi, dan tangki penampungan air. Larva yang telah didapat diletakkan dalam *tray* yang telah berisi air sebanyak $\frac{3}{4}$ volume dari *tray*. Larva kemudian diberi makan pelet ikan sebagai sumber nutrisinya. Larva yang telah berubah menjadi pupa kemudian dipindahkan ke gelas plastik dan diletakkan di dalam kandang nyamuk supaya ketika berubah menjadi nyamuk dewasa dapat memperoleh nutrisi. Nyamuk dewasa meletakkan telur di kertas pupasi yang telah disediakan pada wadah plastik yang berisi air di dalam kandang, karena nyamuk akan meletakkan telurnya tepat dibatas garis air. Kertas pupasi

yang dipenuhi telur kemudian dipindah ke *tray* baru dan telur menetas selama 1-2 hari. Larva yang baru muncul kemudian di *rearing* hingga menjadi nyamuk dewasa.

3.3.3 Identifikasi Morfologi Vektor Potensial Dengue

Identifikasi vektor potensial dengue dilakukan berdasarkan karakteristik morfologi nyamuk dewasa *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus*. Bagian yang diamati meliputi *proboscis*, *thorax*, dan antena dari *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus*. Identifikasi dilakukan menggunakan mikroskop stereo dan optilab. Kemudian kedua sampel nyamuk tersebut dilihat perbedaan morfologinya. Identifikasi morfologi menggunakan jurnal yang berjudul *Morphology and Morphometry of Aedes aegypti Adult Mosquito* (Andrew and Bar, 2013), *Identifikasi Aedes aegypti dan Aedes albopictus* (Rahayu dan Ustiawan, 2013), dan *The Subgenus Stegomyia of Aedes in Southeast Asia I. The Scutellaris Group of Species* (Huang, 1972).

3.3.4 Identifikasi Molekuler Vektor Potensial Dengue

a. Isolasi DNA Genom

Isolasi DNA genom *Ae. aegypti*, dan *Ae. albopictus*. menggunakan metode *salt-extraction*. Prinsip dari metode ini yaitu menghomogenkan jaringan larva *Ae. aegypti*, dan *Ae. albopictus* dengan menggunakan buffer ekstraksi dan disentrifus hingga mendapatkan DNA genom *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* (Aljanabi dan Martinez, 1997).

Sebanyak tujuh ekor larva *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* diekstraksi dengan 400 µl *homogenizing buffer* (10mM Tris-Cl, 2mM EDTA, 0,4M NaCl pH 8,0) dan kemudian digerus menggunakan mikropistil. Setelah itu ditambahkan 40 µl SDS 20% dan 8 µl proteinase K. Setelah itu, sampel diinkubasi pada suhu 65°C selama 1 jam atau *overnight*. Kemudian ditambahkan 300 µl NaCl 6M. Kemudian sampel di vortex selama 30 detik. Lalu, sampel disentrifus pada kecepatan 10.000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C. Setelah disentrifus, diambil supernatan dari sampel dan dipindah ke *microtube* yang baru. Setelah itu, ditambahkan isopropanol *equal volume* dan dicampur. Sampel kemudian diinkubasi pada suhu

-20 °C selama 1 jam. Setelah diinkubasi sampel disentrifus selama 20 menit, 4 °C, 10.000 rpm. Setelah disentrifus kemudian diambil pelletnya dan ditambahkan 70% etanol, kemudian dikeringkan menggunakan *vacuum dry* dan direhidrasi dengan 50 µl ddH₂O. Setelah itu sampel DNA dapat dianalisis dengan metode elektroforesis DNA atau dapat juga disimpan pada suhu -20 °C.

b. Elektroforesis DNA

Proses elektroforesis dilakukan untuk melihat DNA genom yaitu dengan menggunakan 5 µl sampel DNA dan ditambahkan 1 µl *loading dye*. Setelah itu, diresuspensi dan dimasukkan kedalam sumuran gel agarose yang telah mengandung EtBr. Marker yang digunakan yaitu DNA ladder 1kb. *Running buffer* yang digunakan yaitu TAE 1x (Tris-base, Asam Asetat Glasial dan dan EDTA 0,5M) elektroforesis dilakukan selama 30 menit pada tegangan 100V. Visualisasi DNA genom dilakukan dengan menggunakan UV-Illuminator untuk melihat ada tidaknya pita DNA genom.

c. Amplifikasi DNA Pengkode ITS 2

Amplifikasi DNA ITS2 menggunakan primer 5.8F (5'-TGT GAA CTG CAG GAC ACA TG-3') dan 28R (5'-ATG CTT AAA TTT AGG GGG TA-3'), 2x PCR *master mix solution* [*i-taq*], ddH₂O steril dan DNA template. Setelah itu sampel dipanaskan pada suhu 94 °C selama 5 menit sebelum 35 siklus amplifikasi pada suhu 94 °C selama 1 menit, kemudian proses *annealing* pada suhu 55 °C selama 30 detik dan 72 °C selama 30 detik dan dilanjutkan *final extension* selama 5 menit pada suhu 72 °C. Selanjutnya produk PCR sebanyak 5 µl di *running* pada 1,5% gel agarose yang telah ditambahkan EtBr (*Etidium Bromide*). Marker menggunakan DNA ladder 3000 pb. Proses elektroforesis menggunakan buffer TAE 1x sebagai *running buffer* yang dilakukan pada 100 V selama 45 menit. Proses terakhir yaitu visualisasi menggunakan UV-Illuminator.

d. Purifikasi DNA

Purifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan produk hasil PCR pada 1,5% gel agarose yang dimurnikan dengan mengikuti prosedur PCR *clean-up system promega*. Purifikasi dilakukan dengan cara memotong gel agarose yang mengandung pita DNA. Gel agarose dipotong dan ditimbang, setelah itu dimasukkan ke dalam *microtube* 1,5 ml dan ditambahkan *membrane binding buffer*. Kemudian sampel diinkubasi pada suhu 55 °C sampai gel larut dan selanjutnya divortex. Sampel kemudian dimasukkan ke dalam *minicolumn* yang sebelumnya telah ditempatkan pada *collection tube*. Sampel kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama satu menit. Sampel selanjutnya disentrifus pada kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit sehingga cairan pada *minicolumn* berpindah ke *collection tube*, yang nantinya dibuang, dan *minicolumn* diletakkan kembali pada *collection tube*. *Wash solution* sebanyak 700 µl ditambahkan pada sampel dan disentrifus pada kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit untuk mencuci sampel. Setelah itu larutan yang berada di *collection tube* dibuang dan ditambahkan kembali 500 µl *wash solution* kedalam sampel dan dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit. Larutan yang berada di *collection tube* dibuang dan dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit. Selanjutnya pindahkan *minicolumn* ke dalam tabung *microtube* steril 1,5 ml. Sampel DNA selanjutnya ditambah dengan 50 µl *nuclease free water* dan diinkubasi pada suhu ruang selama 1 menit. DNA murni didapatkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit.

e. Sekuensing dan Analisis Sekuen DNA Pengkode ITS 2

Sekuensing dilakukan melalui jasa 1st BASE (Singapore). Setelah itu, tahapan selanjutnya yaitu data sekuen yang diperoleh dilakukan *editing* dan analisis menggunakan aplikasi BioEdit. *Alignment* sekuen DNA pengkode ITS2 yang telah diketahui dari masing-masing sampel maka sekuennya dibandingkan dengan database gen pengkode ITS2 di *gene bank* menggunakan BLAST *online* yang dapat diakses melalui NCBI. Selanjutnya analisis dilakukan dengan menggunakan aplikasi Mega6 yang akan menghasilkan konstruksi pohon filogeni.

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Identifikasi morfologi *Ae. aegypti* Sumpersari dan *Ae. albopictus* Sumpersari menunjukkan perbedaan, pada *Ae. aegypti* pada bagian *thorax* terdapat garis seperti *lyre* dengan dua garis lengkung yang mengapit dorsal, sedangkan pada *Ae. albopictus* pada bagian *thorax* memiliki satu garis putih lurus. Identifikasi secara molekuler berdasarkan DNA pengkode ITS2, panjang basa nukleotida pada *Ae. aegypti* sekitar 331 pb dan memiliki kemiripan 100% dengan *Ae. aegypti isolate* (KY382418.1). *Ae. albopictus* Sumpersari memiliki panjang basa nukleotida sekitar 550 pb dan 400 pb. *Ae. albopictus* dengan panjang basa nukleotida 550 pb memiliki kemiripan 94% dengan *Ae. albopictus isolate* Varazze (JX679395.1). Pohon filogenik terhadap kedua spesies menunjukkan kedua spesies tersebut berada pada cabang yang berbeda.

5.2 Saran

Penelitian selanjutnya analisis hubungan filogenetik perlu dilakukan dengan menggunakan *software* lain untuk dibandingkan dengan hasil rekonstruksi pohon filogeni dengan *software* Mega.

DAFTAR PUSTAKA

- Adilah-Amranudin, N., M. Hamsidi, N. Ismail, R. Ismail, N.C.Dom *et al.* 2016. Genetic Polymorphism of *Aedes albopictus* Population Inferred From ND5 Gene Variabilities in Subang Jaya, Malaysia. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 32(4).
- Aljanabi, S. M. and Martinez. 1997. Universal and Rapid Salt-Extraction of High Quality Genomic DNA for PCR-Based Techniques. *Nucleic Acids Research*. 25(22).
- Andrew, J. and A. Bar. 2013. Morphology and Morphometry of *Aedes aegypti* Adult Mosquito. *Annual Review & Research in Biology*. 3(1).
- Anita, A. Khoiri dan D.K. Indriaswati. Evaluasi Program Pengendalian Penyakit Demam berdarah Dengue Tahun 2015 (Perbandingan Antara Puskesmas Patrang dan Puskesmas Rambipuji Kabupaten Jember). *Jurnal IKESMA*. 12.
- Banerjee, A.K., N. Arora, and U.S.N. Murty. 2007. How Faris ITS2 Reliable as Phylogenetic Marker for the Mosquito Genera?. *Electronic Journal of Biology*. 3(3).
- Batovska, J.,M.J. Blacket, K. Brown and S.E. Lynch. 2016. Molecular Identification of Mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Southeastern Australia. *Ecology and Evolution*. 6(9).
- Bhatt, S., P.W.Gething, O.J. Brady, *et al.* 2013. The Global Distribution and Burden of Dengue. *Nature*. 49.
- Bova, J.E., S.L.P. Chair, C.C. Brewster, D.M. Hawley. 2014. *Morphological Differentiation of Eggs and Comparative Efficacy of Oviposition and Gravid Traps for Aedes Vectors at Different Habitats*. Blacksburg.
- CDC. 2012. *Dengue and The Aedes albopictus Mosquito*. Puerto Rico.
- Chan, A., L.P. Chiang, H.C.Hapuarachchi, C.H. Tan, S.C. Pang,R. Lee, K.S.Lee, L.C. Ng,and S.G.L.Phua. 2014. DNA Barcoding: Complementing Morphological Identification of Mosquito Species in Singapore. *Parasites and vectors*.
- Chen, X., X. Jiang, J. Gu *et al.* 2015. Genome Sequence of the Asian Tiger Mosquito, *Aedes albopictus*, Reveals Insights Into Its Biology, Genetics, and Evolution. *PNAS PLUS*.

- Christophers, S.R. 1960. *Aedes aegypti (L.) the Yellow Fever Mosquito: Its Life History, Bionomics and Structure*. London: The Syndics of the Cambridge University Press.
- Departemen Kesehatan RI. 2014. *Profil Kesehatan Kabupaten Jember Tahun 2014*.
- Dharmayanti, I. 2011. Filogenetika Molekuler: Metode Taksonomi Organisme Berdasarkan Sejarah Evolusi. *Wartazoa*. 22(1).
- Dinas Kesehatan Kabupaten Jember. 2017. *Profil Kesehatan Kabupaten Jember Tahun 2016*.
- Estrada-Franco, J.G., and G.B. Craig. 1995. *Biology, Disease Relationships, and Control of Aedes albopictus*. Washington, D.C.: PAN American Health Organization.
- Feng, S., Y. Jiang, S. Wang, M. Jiang, Z. Chen, Q. Ying, and H. Wang. 2015. Molecular Identification of *Deondrobium* Species (*Orchidaceae*) Based on the DNA Barcode ITS2 Region and Its Application for Phylogenetic Study. *International Journal of Molecular Sciences*. 16(1).
- Hall, B.G. 2001. *Phylogenetic Trees Made Easy: A How-To Manual for Molecular Biologist*. Massachusetts, USA: Sinauer Associates, Inc. Sunderland.
- Hillis, D. M., and Bull, J. J. 1993. An Empirical Test Of Bootstrapping As A Method For Assessing Confidence In Phylogenetic Analysis. *Systematic Biology*. 42(2).
- Herrera, F., L. Urdaneta, J. Rivero, N. Zoghbi, J. Ruiz, G. Carrasquel, J.A.Martinez, M. Pernalete, P. Villegas, A. Montoya, Y. Rubio-Palis, and E. Rojas. 2006. Population Geneti Structure of the dengue mosquito *Aedes aegypti* in Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 101(6).
- Huang, H. M. 1972. The Subgenus *Stegomyia* of *Aedes* in Southeast Asia I. The *Scutellaris* Group of Species. *Contribution of the American Entomological Institute*. 9(1): 108.
- Jupp, P.G. 1996. *Mosquitoes of Southern Africa: Culicinae and Toxorhynchitinae*. Afrika Utara: Ekogilde Publisher.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2010. Demam Berdarah Dengue. *Buletin Jendela Epidemiology*. 2.

- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2015. *Laporan Peningkatan Kasus DBD di Jawa Timur*.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2016. Situasi DBD di Indonesia. *Infodatin Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI*.
- Kemertian Kesehatan Republik Indonesia. 2017. *Profil Kesehatan Indonesia Tahun 2016*. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Komariah, S. Pratita dan T. Malaka. 2010. Pengendalian Vektor. *Jurnal Kesehatan Bina* . 6(1).
- Lutz, N. 2000. A North Carolina Summer Pest The Asian Tiger Mosquito *Aedes albopictus*. *Eco Access*.
- Mattingly, P.F. 1974. Eggs of some subgenera of *Aedes* with a Further note on *Haemagogus*. *Mosquito systematics*. 6(1).
- Marinho, M.A.T., A.C.M. Janqueira, and A.M.L. Azeredo-Eospin. 2011. Evaluation of the Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) As A Molecular Marker For Phylogenetic Interference Using Sequence and Secndary Structure Information in Below Flies (Diptera: Calliphoridae). *Genetica*. 139.
- Marinho, M. A. T., A. M. L. Azeredo-Espin, and N.I.T. Zanchin. 2013. Structural Characterization of the Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) of the Ribosomal DNA (rDNA) Cluster in Calypttratae (Diptera: Schizophora) and its Implications for Molecular Phylogenetic Analyses. *Journal Molecular Evolution*. 76(1).
- Muliansyah, dan T. Baskoro. 2016. Analisis Pola Sebaran Demam Berdarah *Dengue* Terhadap Penggunaan Lahan Dengan Pendekatan Spasial di Kabupaten Banggai Provinsi Sulawesi Tengah Tahun 2011-2013. *Journal of Information Systems for Public Health*. 1(1).
- Mulyaningsih, B. 2004. Diferensiasi dan Identifikasi *Aedes albopictus* Skuse dari Beberapa Populasi di Indonesia Berdasarkan Polimorfisme Genetik. *Berkala Ilmu Kedokteran*. 36(1).
- Munif A., Y. Aryati, dan M. Hasyim. 2011. Karakteristik Kemiripan Genetic Nyamuk *Aedes Aegypti* Daerah Endemik Demam Berdarah Dengue di Kota Palembang, Provinsi Sumatera Selatan. *Jurnal Ekologi Kesehatan*. 10(2).
- Munif, A., M. Sudomo, S. Soelaksonao, R. Maelita,, dan D.P. Agus. 2004. Polimorfisme Genetik dari *Anopheles barbirostris* Kaitannya dengan

- Prevelensi Malaria di Kecamatan Cineam, Kabupaten Tasikmalaya. *Buletin Panel Kesehatan*. 32(1).
- Neto, M.S.R., R.P. Barros, M. A. J. Morais, V.Q. Balbino, and V. Loreto. 2017. ITS2 As A Molecular Marker for the Identification of *Diatraea saccharalis* and *D. flavipennella* and Possible Infection with *Cotesia* spp. *Genetics and Molecular Research*. 16(3).
- Nurhayati, S. 2005. Prospek Pemanfaatan Radiasi dalam Pengendalian Vektor Penyakit Demam Berdarah Dengue. *Buletin Alara*. 7(1&2).
- Nurhayati, S., B. Santoso, dan A. Rahayu. 2010. Pengendalian Populasi Nyamuk *Aedes aegypti* dan *Anopheles* sp. Sebagai Vektor Demam Berdarah Dengue (DBD) dan Malaria dengan Teknik Serangga Mandul (TSM). *Seminar Nasional Keselamatan Kesehatan dan Lingkungan VI*.
- Paduan, K.S., J.P. Araujo-Junior, and E.M. Ribolla. 2006. Genetic Variability in Geographical Populations of *Aedes aegypti* (Diptera, Culiidae) in Brazil Elucidated by Molecular Markers. *Genetics and Molecular Biology*. 29(2).
- Pangemanan, H.C., R. Kundre, dan J. Lolong. 2016. Hubungan Tindakan Pemberantasan Sarang Nyamuk (PSN) dengan Kejadian Demam Berdarah Dengue (DBD) di Desa Watutumou I, II, dan III Wilayah Kerja Puskesmas Kolongan. *E-journal Keperawatan (e-Kp)*. 4(2).
- Patsoula, E., A. Samanidou-Voyadjoglou, G. Spanakos, J. Kremastinou, G. Nasioulas, and N. C. Vakalis. 2006. Molecular and Morphological Characterization of *Aedes albopictus* in Northwestern Greece and differentiation from *Aedes cretinus* and *Aedes aegypti*. *Journal of Medical Entomology*. 43(1).
- Qi, J., Y. Chen, G.P. Copenhaver, and H. Ma. 2014. Detection of Genomic Variations and DNA Polymorphisms and Impact on Analysis of Meiotic Recombination and Genetic Mapping. *PNAS*. 111(27).
- Rahayu, D. F., dan A. Ustiawan. 2013. Identifikasi *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus*. *Balaba*. 9(1).
- Rios, L., and J.E. Maruniak. 2004. Asian Tiger Mosquito, *Aedes albopictus* (Skuse) (Insecta: Diptera: Culicidae). *IFAS Extension University of Florida*.
- Ruiz-Villalba, A., E.V. Pelt-Verkuil, Q.D. Gunst, J.M. Ruijter, and M.J.Hoff. 2017. Amplification of nonspecific products in quantitative polymerase chain reactions (qPCR). *Biomolecular Detection and Quantification*. 14.

- Sanger F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating Inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Scie. USA*. 74(12).
- Shaikevich, E., and A. Talbalaghi. 2013. Molecular Characterization of the Asian Tiger Mosquito *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) in Northern Italy. *ISRN Entomology*.
- Shenghe, C., S. Wei, Z. Zhaoxi, L. jingyang, D. Minjie, and S. Haiyan. 2016. A Weird DNA Band in PCR and Its Cause. *Journal of Plant Science & Molecular Breeding*. 5(2).
- Sivanathan, M.M.A.P. 2006. The Ecology and Biology of *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera : Culicidae) and The Resistance Status of *Aedes albopictus* (Filed Strain) Against Organophosphates In Penang, Malaysia. *Thesis*.
- Supartha, I.W. 2008. Pengendalian Terpadu Vektor Virus Demam Berdarah Dengue, *Aedes aegypti*(Linn.) dan *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae). *Seminar DiesUnud 2008 Universitas Udayana, Denpasar*.
- Sousa, A.A., E. Fraga., I. Sampaio, H. Schneider, and M.C. Barros. 2017. Genetic Differentiation in Populations of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) Dengue Vector From the Brazilian State of Maranhao. *Revista Brasileira de Entomologi*. 61.
- Tyagi, V., A. K. Sharma, and V. Veer. 2017. Evidence of Genetic Polymorphism in *Aedes aegypti* Population from Delhi, India. *International Journal of Mosquito Research*. 4(4).
- Ubaidillah, R. dan Sutrisno H. 2009. *Pengantar Biosistemik: Teori dan Praktikum*. Jakarta: LIPI Press.
- Urdaneta-Marquez, L. and A. Failloux. 2011. Population Genetic Structure of *Aedes aegypti*, the Principal Vector of Dengue Viruses. *Infection, Genetics and Evolution*. 11.
- Walton, C., P. Somboon, S.M. O'Loughlin, S. Zhang, R.E. Harbach, Y.M. Linton, B. Chen, K. Nolan, S. Duong, M.Y. Fong, I. Vythilingum, Z.D. Mohammed, H.D. Trung and R.K. Butlin. 2007. Genetic Diversity and Molecular Identification of Mosquito Species in the *Anopheles maculatus* Group Using the ITS2 Region of rDNA. *Infection, Genetics and Evolution*. 7.
- Warren, A.M. and J.M. Crampton. 1991. The *Aedes aegypti* Genome: Complexity and Organization. *Genet. Res., Comb*. 58.

- Weeraratne, T.C., S.N Surendan, and S.H.P.P. Karunaratne. 2018. DNA Barcoding of Morphologically Characterized Mosquitoes Belonging to the Subfamily Culicinae From Sri Lanka. *Parasites and Vectors*. 11:266.
- World Health Organization. 1975. *Manual on Practical Entomology in Malaria Part II Methods and Techniques*. Geneva: WHO Division of Malaria and Other Parasitic Diseases.
- World Health Organization. 2009. *Dengue Guidelines For Diagnosis, Treatment, Prevention and Control*. Geneva.
- World Health Organization. 2014. *A Global Brief on Vector-Borne Diseases*. Geneva: WHO Press, World Health Organization.
- Yao, H., J.Song, C. Liu, K. Luo, J. Han, Y. Li, X. Pang, H. Xu, Y. Zhu, P. Xiao, and S. Chen. 2010. Use of ITS2 Region as the Universal DNA Barcode for Plants and Animals. *Plus ONE*. 5(10).
- Zettel, C., and P Kaufman. 2009. Yellow Fever Mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Insecta: Diptera: Culicidae). *IFAS Extension University of Florida*.

LAMPIRAN

Lampiran A. Komposisi Bahan

No	Nama Larutan	Bahan	Komposisi	Ket.
1.	<i>Homogenizing Buffer</i> (50 ml)	Tris-Cl 1 M	0,5 ml	
		EDTA 0,5 M	0,2 ml	
		NaCl 0,4 M	1,16 gr	
		<i>Aquadest steril</i>	±48 ml	
2.	SDS 20% (10 ml)	SDS	2 gr	
		<i>Aquadest steril</i>	10 ml	
3.	NaCl 6M (25 ml)	NaCl	8,766 gr	
		<i>Aquadest steril</i>	25 ml	
4.	EDTA 0,5 M (50 ml)	Na ₂ EDTA	9,305 gr	pH 8
		NaOH	1 gr	
		<i>Aquadest steril</i>	50 ml	
5.	TAE 10X (250 ml)	<i>Tris-Base</i>	12,1 gr	pH 8
		Asam asetat Glasial	2,855 ml	
		EDTA 0,5M	5 ml	
		<i>Aquadest steril</i>	±257 ml	
7.	<i>Agarose</i> 1% (50 ml)	<i>Agarose</i>	0,5 gr	
		TAE 1x	50 ml	
8.	<i>Agarose</i> 1,5% (50 ml)	<i>Agarose</i>	0,75 gr	
		TAE 1x	50 ml	
9.	Loading Dye 6X	Gliserol	40%	
		<i>Xylenecyanol</i>	0,01 gr	
		<i>Bromfenol Blue</i>	0,01 gr	

Lampiran B. Sekuen Hasil Amplifikasi DNA Pengkode ITS2 *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* Summersari

B1. *Ae. aegypti* Summersari (331 pb)

GCAGGACACATGAACACCGACACGTTGAACGCATATTGCACATCGTAC
TACCAGTACGATGTACACATTTTTGAGTGCCTATATTTATCCATTCAAC
TATACGCGCCGCCCGCGGCGCGTATGCGTAGTGATGTTTTCCCGCCTTC
AGTGCGCGGTAAAACATTGAAGATAGTCAGACGTGGTGTGGTGACAC
ACCGCGGTTGATGAATACATCCCCTATGGCGCGCTCGCTCGCCTTGT
GTTGTATTCCATCATTCACTAACTAACTAGCTAACTCTCTATAGTAGGC
CTCAAATAATGTGTGACTACCCCTAAATTTAA

B2. *Ae. albopictus* Summersari (550 pb)

GCACATCGTACCTCCAGTACGATGTACACATTTTTGAGTGCCTATATTT
ATACATTCAACTATACGTGTGCCTCCCTCTCGGGGGTGTGCGCGCACG
TATGCATAGTGATGTTTTCCCGCCTTCGGTGCGCGGTAAAACATTCAA
GATAGTCAGACGCGACGGTGGCCGGCGTGCCAGTCGTCGTCGTGGTTG
ATGAGTACATCCCAAACCGAGTCTCAGTGGCAGTGAGCTAGTACCCCC
GTGTGTGAGTTGTGCGGTGCGGTGTCGTGGAATTAGGCGGTGCGGGGG
AGCACACCCGCGGCGGGGCGGGGCTTTTTTCTCCACACCCAAAACACC
CGCAACGACGACCCACCCCGGCGGGGGGAAAAGTCACCTGAACTA
TCAGTGTGCTCCATCACATCAGCCCAGCATAGTAGCAAGTATGAAAAA
TCA