



**PENGGUNAAN MARKER *DNA BARCODING ITS2* DAN *COI*  
UNTUK ANALISIS POLIMORFISME GENETIK NYAMUK  
*ANOPHELES* ASAL DESA BANGSRING BANYUWANGI**

**TESIS**

Oleh  
**Dewi Masrurroh**  
**NIM 161820401004**

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



**PENGGUNAAN MARKER DNA *BARCODING ITS2* DAN *COI*  
UNTUK ANALISIS POLIMORFISME GENETIK NYAMUK  
*ANOPHELES* ASAL DESA BANGSRING BANYUWANGI**

**TESIS**

**diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat  
untuk menyelesaikan Program Magister Biologi (S2)  
dan mencapai gelar Magister Sarjana Sains**

Oleh  
**Dewi Masrurroh  
NIM 161820401004**

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

## PERSEMBAHAN

Tesis ini saya persembahkan kepada:

1. Ibu Siti Halimah Sadiyah dan Bapak Abdul Halim yang telah memberikan doa, dukungan, bimbingan, kasih sayang, pengorbanan, dan seluruh perjuangannya;
2. Umi Nur Jannah dan kakak Fuadul Ichsan Fauzi yang telah memberi dukungan dan motivasi dalam menempuh pendidikan;
3. para guru sejak sekolah dasar hingga perguruan tinggi yang telah memberi bimbingan, ilmu yang bermanfaat dengan penuh kesabaran;
4. Almamater Universitas Jember.

## MOTO

“Sesungguhnya Allah tiada segan membuat perumpamaan berupa nyamuk atau yang lebih rendah dari itu. Adapun orang-orang yang beriman, maka mereka yakin bahwa perumpamaan itu benar dari Tuhan mereka, tetapi mereka yang kafir mengatakan: "Apakah maksud Allah menjadikan ini untuk perumpamaan?". Dengan perumpamaan itu banyak orang yang disesatkan Allah, dan dengan perumpamaan itu (pula) banyak orang yang diberi-Nya petunjuk. Dan tidak ada yang disesatkan Allah kecuali orang-orang yang fasik,”

(Terjemahan Qs Al Baqarah ayat 26)<sup>\*)</sup>

“Janganlah menginginkan ilmu sementara kamu meninggalkan kepayahan”<sup>\*\*)</sup>

---

<sup>\*)</sup>Departemen Agama Republik Indonesia. 2010. *Terjemah dan Tafsir Al Qur'an*. Bandung: Safa Jabal Raudah.

<sup>\*\*)</sup> Haris, Abdul. 2017. *Teori Dasar Nahwu & Sharaf*. Jember : Pustaka Albidayah.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Dewi Masrurroh, S.Si

NIM : 161820401004

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah saya yang berjudul Penggunaan Marker *DNA Barcoding* ITS2 dan COI Untuk Analisis Polimorfisme Genetik Nyamuk *Anopheles* Asal Desa Bangsring Banyuwangi adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang telah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. Penelitian ini dibiayai oleh DRPM Ristek Dikti Hibah Penelitian Pascasarjana 2017-2018 atas nama Dr. rer.nat. Kartika Senjarini, M.Si. Saya bertanggungjawab 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 pernyataan ini dikemudian hari tidak benar.

Jember, 24 Juli 2018  
Yang menyatakan,



Dewi Masrurroh  
NIM 161820401004

**TESIS**

**PENGGUNAAN MARKER DNA *BARCODING ITS2* DAN *COI*  
UNTUK ANALISIS POLIMORFISME GENETIK NYAMUK  
*ANOPHELES* ASAL DESA BANGSRING BANYUWANGI**

Oleh  
**Dewi Masrurroh**  
**NIM 161820401004**

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dr.rer.nat. Kartika Senjarini, M.Si  
Dosen Pembimbing Anggota : Dr. Rike Oktarianti, M.Si

PENGESAHAN

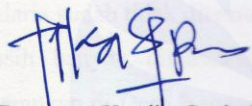
Skripsi berjudul “Penggunaan Marker *DNA Barcoding ITS2* Dan *ITS2* Untuk Analisis Polimorfisme Genetik Nyamuk *Anopheles* Asal Desa Bangsring Banyuwangi ” karya Dewi Masrurroh telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : KAMIS 27 JUN 2019

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember

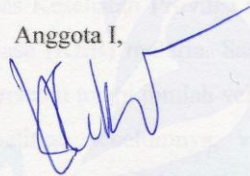
Tim Penguji:

Ketua,



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

Anggota I,



Dr. Rike Oktarianti, M.Si  
NIP 196310261990022001

Anggota II,



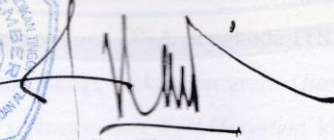
Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M.Agr.Sc  
NIP 195510221982121001

Anggota III,



Mukhamad Su'udi, Ph.D  
NIDN 760016788

Mengesahkan  
Dekan,



Drs. Sujito, Ph.D  
NIP 196102041987111001

## RINGKASAN

**Penggunaan Marker DNA *Barcoding* ITS2 dan COI Untuk Analisis Polimorfisme Genetik Nyamuk *Anopheles* Asal Desa Bangsring Banyuwangi ;**  
Dewi Masrurroh, 1618104010104; 2018: 53 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Banyuwangi merupakan salah satu daerah endemik malaria di Jawa Timur. Pada tahun 2011 terdapat 173 kasus malaria di Banyuwangi. Dari jumlah tersebut, 90 kasus diantaranya merupakan kasus *indigeneous* (setempat) di Desa Bangsring Kecamatan Wongsorejo. Oleh karena itu, Dinas Kesehatan Provinsi menyatakan Banyuwangi termasuk dalam kejadian luar biasa (KLB) malaria. Saat ini kasus malaria sudah tidak ditemukan lagi di daerah tersebut tetapi jumlah vektor malaria masih banyak ditemukan. Berdasarkan penelitian sebelumnya, vektor yang ditemukan di Desa Bangsring yaitu *An. annularis*, *An. sundaicus*, *An. indefinitus*, *An. subpictus*, *An. vagus*, dan *An. barbirostris*. Identifikasi vektor dan siblingnya merupakan salah satu dasar yang penting untuk pengendalian vektor malaria. Sampai saat ini belum ada penelitian lebih lanjut mengenai vektor malaria di daerah tersebut. Oleh karena itu pada penelitian ini dilakukan analisis polimorfisme genetik nyamuk *Anopheles* asal Desa Bangsring dengan menggunakan *DNA barcoding Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2)* dan *Cytochrome c Oxidase subunit I (COI)*.

Penelitian ini dilakukan dengan mengamplifikasi sekuen ITS2 dan COI dengan menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Sekuen yang didapatkan dibandingkan dengan sekuen DNA pengkode ITS2 dan COI yang ada di *GenBank sequence database* dengan menggunakan program (*Basic Local Alignment Search Tool*) *BLAST online software* dan *BOLD system* khusus untuk sekuen COI.

Hasil dari penelitian ini yaitu berdasarkan identifikasi dengan menggunakan karakter morfologinya didapatkan 3 spesies nyamuk yaitu *An. vagus*, *An.*



*indefinitus*, dan *An. subpictus*. Identifikasi berdasarkan sekuen ITS2 dari spesies *An. vagus* dan *An. indefinitus* menunjukkan bahwa kedua spesies tersebut memiliki kemiripan dengan *An. vagus* (*Accession number* FJ654649.1) dengan presentase kemiripan 99%. *An. vagus* (FJ654649.1) merupakan nyamuk yang dikoleksi dari Halmahera, Maluku Utara. Hasil analisis sekuen ITS2 spesies *An. subpictus* menunjukkan bahwa spesies tersebut memiliki kemiripan dengan spesies *An. subpictus* (GQ870328.1) dengan presentase kemiripan 99%. *An. subpictus* (GQ870328.1) merupakan *Anopheles* yang dikoleksi dari Kepulauan Flores. Hasil rekonstruksi pohon filogeni berdasarkan sekuen ITS2 dari ketiga spesies tersebut dengan sekuen yang ada di *GenBank* menunjukkan bahwa *An. vagus*, *An. indefinitus* dan *An. vagus* (FJ654649.1) terletak dalam satu cabang. Sedangkan *An. subpictus* yang diteliti dengan *An. subpictus* (GQ870328.1) membentuk cabang tersendiri. Dari penelitian ini menunjukkan bahwa identifikasi secara morfologi saja tidak cukup sebagai dasar untuk identifikasi suatu spesies dengan akurat tetapi perlu dilakukan identifikasi berdasarkan karakter molekuler. Polimorfisme genetik intra-spesies pada sekuen ITS2 *An. vagus* lebih tinggi daripada sekuen COI.

## PRAKATA

Segala puji bagi Allah atas rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul “Penggunaan Marker *DNA Barcoding* ITS2 dan COI Untuk Analisis Polimorfisme Nyamuk *Anopheles* Asal Desa Bangsring Banyuwangi”. Tesis ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan magister (S2) Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penyusunan tesis ini tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terimakasih kepada:

1. Dr.rer.nat. Kartika Senjarini, M.Si selaku dosen pembimbing utama dan pembimbing akademik, serta Dr. Rike Oktianti, M.Si selaku dosen pembimbing anggota yang telah meluangkan waktu dan perhatiannya untuk membimbing dengan penuh kesabaran.
2. Prof.Bambang Sugiharto, M.Agr.,Sc dan Mukhamad Su’udi, Ph.D selaku dosen penguji yang telah memberikan kritik dan saran yang membangun dalam penulisan skripsi ini;
3. Dina Fitriayah, M.Si selaku teknisi Laboratorium Bioteknologi dan Ir.Endang S. selaku teknisi Laboratorium Mikrobiologi yang telah banyak membantu dan memberi nasihat selama penelitian;
4. bapak dan ibu dosen serta seluruh staf di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam atas keikhlasan membantu penulis selama masa perkuliahan;
5. semua keluarga atas do’a serta dukungan yang telah diberikan;
6. Bapak KH. Hammam serta Ibu Isniyatul Ulya atas bimbingan serta ilmu yang telah diberikan, serta kepada teman-teman mahasantri PPM. Al Husna yang telah memberikan warna baru selama di pondok.
7. rekan-rekan kerja riset “*TBV Bacteria Research Group*”: kakak-kakak: Mbak Dwi Esti F., Renam Putra A., adik-adik: Ika Wahyuni, Ahmad Jauharil H., Novita Amalia, M. Gunawan Wibisono, Nur Amalina, Lailly Nur U.H., Ratna

Safitri, Iffah Ali M., Aria F.B.S. terimakasih atas bantuan, motivasi, dan persaudaraan yang telah terjalin selama ini;

8. sahabat-sahabat Wulan Nursyam Ningtyas, Izzay Afkarina, Suci Umami R.Q., Hasa Bella, Zakiyatul Kh., Retna Hermawati, Amatullah Sholihah atas dukungan motivasi dan do'anya;
9. rekan-rekan Magister Biologi Fakultas MIPA 2016: Arminatul Jannah, Fragaria Vesca, Zainal Ali M., Syafiq Ubaidillah, Siti Fathiyah, Siti Maymuna dan yang telah berbagi kebersamaan selama kuliah.
10. dan kepada semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Semoga Allah senantiasa melimpahkan rahmat dan karunia-Nya dan hanya Allah jualah sebaik-baik pembalas kebaikan.

**Jember, Juli 2018**

**Penulis**

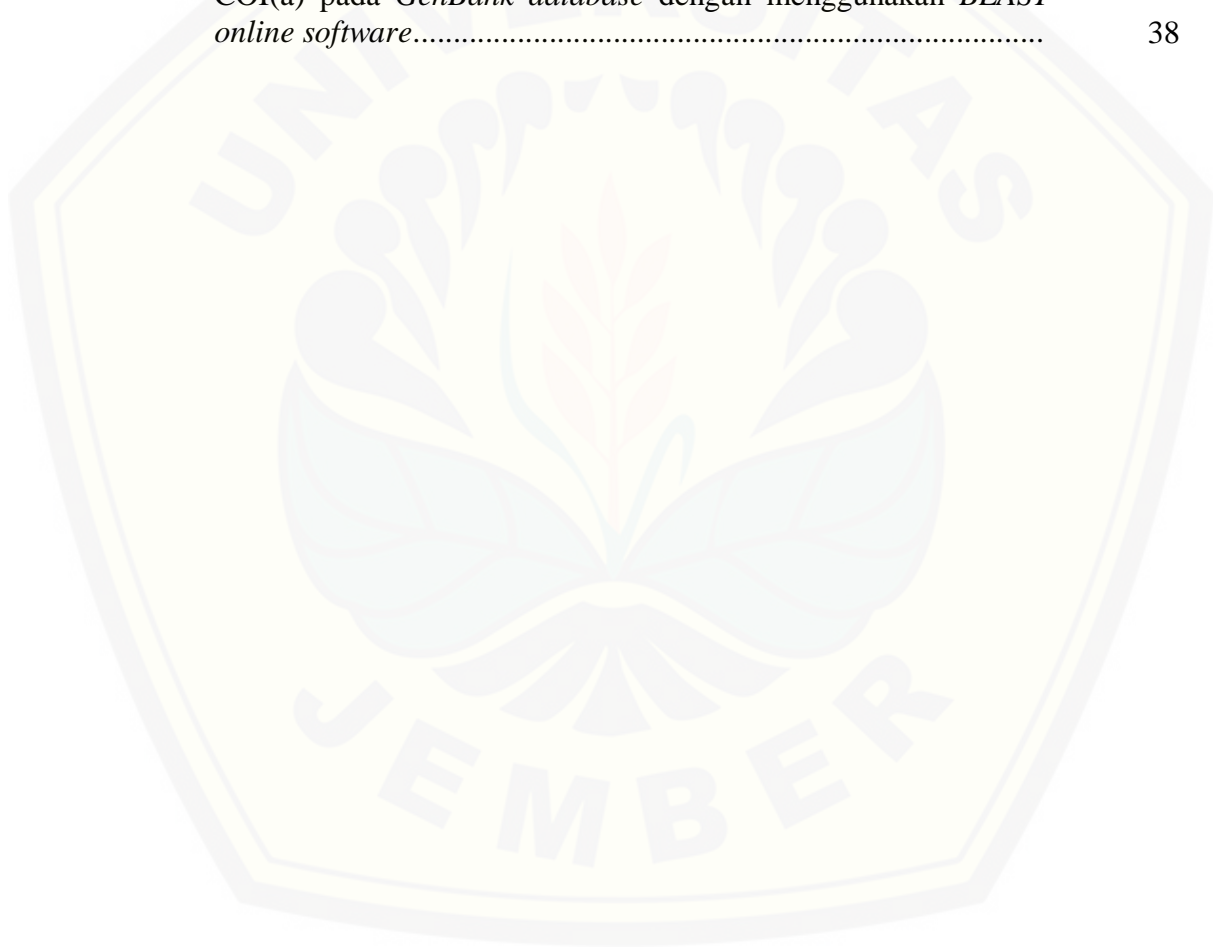
## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
<b>HALAMAN SAMPUL</b> .....	i
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	ii
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	iii
<b>HALAMAN MOTO</b> .....	iv
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	v
<b>HALAMAN PEMBIMBINGAN</b> .....	vi
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	vii
<b>RINGKASAN</b> .....	viii
<b>PRAKATA</b> .....	x
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xiv
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xv
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xvii
<b>BAB I. PENDAHULUAN</b> .....	1
<b>1.1 Latar Belakang</b> .....	1
<b>1.2 Rumusan Masalah</b> .....	2
<b>1.3 Batasan Masalah</b> .....	3
<b>1.4 Tujuan</b> .....	3
<b>1.5 Manfaat</b> .....	4
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	4
<b>2.1 Distribusi Nyamuk <i>Anopheles</i> di Indonesia</b> .....	4
<b>2.2 DNA Barcoding</b> .....	6
2.2.1 <i>Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2)</i> .....	7
2.2.2 <i>Cytochrome oxidase subunit I (COI)</i> .....	8
<b>2.3 Diversitas Genetik <i>Anopheles</i></b> .....	9
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN</b> .....	11

<b>3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....</b>	<b>11</b>
<b>3.2 Alat dan Bahan.....</b>	<b>11</b>
<b>3.3 Prosedur Penelitian.....</b>	<b>11</b>
3.3.1 Pengambilan Sampel Nyamuk <i>Anopheles</i> .....	11
3.3.2 Identifikasi Morfologi Nyamuk <i>Anopheles</i> .....	12
3.3.3 Isolasi DNA Genom Nyamuk.....	12
3.3.4 <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	13
3.3.5 Purifikasi DNA Produk PCR.....	14
3.3.6 Analisis Data.....	15
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>17</b>
<b>4.1 Identifikasi <i>Anopheles</i> Berdasarkan Karakter Morfologi dan Penanda DNA Barcoding ITS2.....</b>	<b>17</b>
4.1.1 <i>An. vagus</i> .....	17
4.1.2 <i>An. indefinitus</i> .....	21
4.1.3 <i>An. subpictus</i> .....	22
<b>4.2 Perbandingan Hasil Identifikasi <i>Anopheles</i> dengan Menggunakan ITS2 dan COI.....</b>	<b>27</b>
<b>4.3 Perbandingan Hasil Amplifikasi Sekuen COI dengan Menggunakan Primer COI(a) dan COI(b).....</b>	<b>37</b>
<b>BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>40</b>
<b>5.1 KESIMPULAN.....</b>	<b>40</b>
<b>5.2 SARAN.....</b>	<b>40</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>41</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>49</b>

**DAFTAR TABEL**

	Halaman
3.1 Primer DNA yang digunakan untuk mengamplifikasi sekuen DNA ITS2 dan COI.....	13
4.1 Hasil penjajaran dengan sekuen pada <i>GenBank</i> dengan menggunakan <i>BLAST online software</i> .....	26
4.2 Hasil analisis sekuen ITS2 dan COI pada <i>GenBank</i> dengan menggunakan <i>BLAST online software</i> dan pada <i>BOLD system</i> untuk sekuen COI.....	34
4.3 Hasil homologi sekuen COI yang di amplifikasi dengan primer COI(a) pada <i>GenBank database</i> dengan menggunakan <i>BLAST online software</i> .....	38

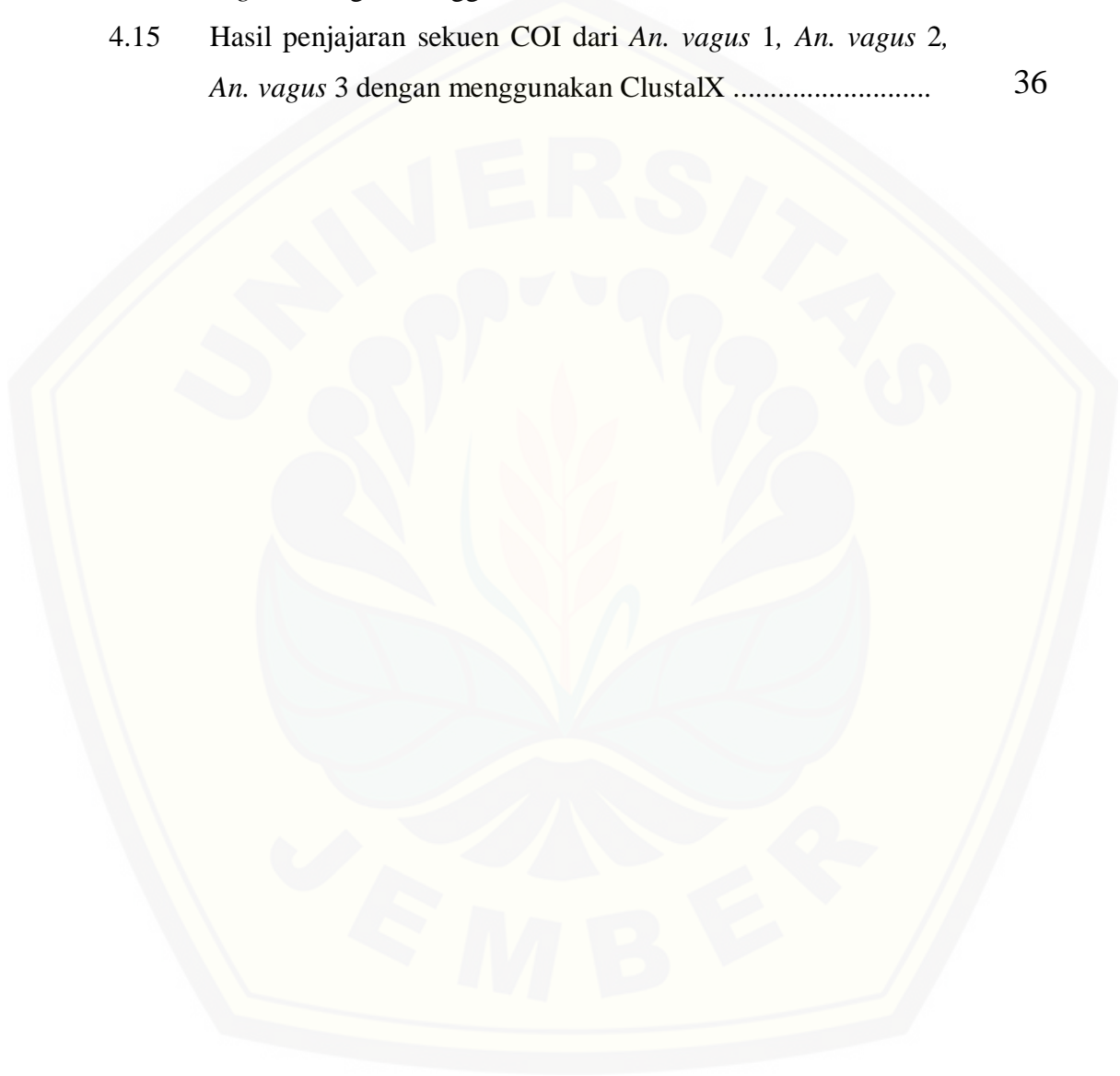


## DAFTAR GAMBAR

	Halaman	
2.1	Distribusi <i>Anopheles</i> di Indonesia.....	4
2.2	Letak sekuen ITS2 pada DNA ribosomal.....	7
2.3	Komplit sekuen DNA mitokondria yang ada di <i>GenBank</i> dari tahun 2003 sampai tahun 2014.....	9
4.1	Karakter morfologi <i>An. vagus</i> .....	18
4.2	Homologi sekuen <i>An. vagus (query)</i> dengan <i>An. vagus</i> (HQ873039.1) dengan menggunakan BLAST <i>online software</i> ..	19
4.3	Homologi sekuen <i>An. vagus (query)</i> dengan <i>An. vagus</i> (FJ654649.1) dengan menggunakan BLAST <i>online software</i> ....	20
4.4	Karakter morfologi <i>An. indefinitus</i> .....	21
4.5	Homologi sekuen <i>An. indefinitus (query)</i> dengan <i>An. vagus</i> (FJ654649.1) dengan menggunakan BLAST <i>online software</i> ....	22
4.6	Karakter morfologi <i>An. subpictus</i> .....	23
4.7	Homologi sekuen <i>An. subpictus (query)</i> dengan <i>An. subpictus</i> (GQ870328.1) dengan menggunakan BLAST <i>online software</i> ..	24
4.8	Visualisasi hasil amplifikasi sekuen ITS2 dengan menggunakan primer ITS2(a).....	25
4.9	Hasil rekonstruksi pohon filogeni dengan menggunakan metode <i>neighbour joining tree</i> .....	27
4.10	Visualisasi hasil amplifikasi sekuen ITS2 dengan menggunakan primer ITS2(a).....	29
4.11	Visualisasi hasil amplifikasi sekuen COI dengan menggunakan primer COI(b).....	29
4.12	Homologi sekuen <i>An. vagus (query)</i> dengan <i>An. vagus</i> (HQ873039.1) dengan menggunakan BLAST <i>online software</i> ..	30
4.13	Homologi sekuen <i>An. indefinitus (query)</i> dengan <i>An. vagus</i> (FJ654649.1) dengan menggunakan BLAST <i>online software</i> ....	31

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
4.14 Hasil penjajaran sekuen ITS2 <i>An. vagus 1</i> , <i>An. vagus 2</i> , <i>An. vagus 3</i> dengan menggunakan ClustalX .....	35
4.15 Hasil penjajaran sekuen COI dari <i>An. vagus 1</i> , <i>An. vagus 2</i> , <i>An. vagus 3</i> dengan menggunakan ClustalX .....	36





**DAFTAR LAMPIRAN**

	Halaman
3.1 Komposisi Bahan Pembuatan Larutan .....	50
4.1 Visualisasi Hasil Isolasi DNA Genom .....	51
4.2 Perbandingan Morfologi <i>An. vagus vagus</i> , <i>An. vagus limosus</i> , <i>An. indefinitus</i> dan <i>An. subpictus</i> Berdasarkan Buku <i>Illustrated Keys to The Anopheles Mosquitoes of The Philiphine Island</i> (Cagampang-Ramos & Darsie, 1970).....	52
4.3 Daftar nama sekuen <i>An. vagus</i> dari <i>GenBank</i> yang memiliki kemiripan dengan <i>An. vagus</i> dari Bangsring berdasarkan sekuen ITS2.....	53
4.4 Daftar nama sekuen <i>An. vagus</i> yang memiliki kemiripan dengan <i>An. vagus</i> dari Bangsring berdasarkan sekuen COI.....	54

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

*Anopheles* merupakan vektor parasit protozoa dari genus *Plasmodium* yang menyebabkan penyakit malaria. Genus *Anopheles* terdiri dari sekitar 400 spesies, 30-40 spesies merupakan vektor malaria (Norris & Norris, 2016). Di Indonesia, khususnya Pulau Jawa terdapat 3 spesies vektor primer malaria yaitu *Anopheles* (*An.*) *aconitus*, *An. maculatus*, *An. sundaicus* (Stoops *et al.*, 2009). Salah satu daerah yang menjadi daerah endemik di Pulau Jawa yaitu Banyuwangi, Jawa Timur (Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Timur, 2013).

Berdasarkan data dari Dinas Kesehatan Kabupaten Banyuwangi, penyebaran malaria di daerah setempat (*indigeneous*) dimulai pada tahun 2011 dengan jumlah kasus malaria sebanyak 173 kasus. Dari jumlah tersebut, 90 kasus diantaranya merupakan kasus *indigeneous* di Desa Bangsring Kecamatan Wongsorejo. Oleh karena itu, Dinas Kesehatan Provinsi menyatakan Banyuwangi termasuk dalam kejadian luar biasa (KLB) malaria. Berbagai upaya dilakukan pemerintah dalam mengatasi KLB diantaranya yaitu pemberantasan sarang nyamuk dengan melakukan pembersihan lagun yang merupakan tempat perindukan nyamuk (Dinas Kesehatan Kabupaten Banyuwangi, 2015). Sejak tahun 2012 kejadian malaria sudah menurun. Penurunan kasus malaria terjadi seiring dengan menurunnya jumlah *An. sundaicus* sebagai vektor primer yang ditemukan di desa tersebut. Berdasarkan penelitian terdahulu di Desa Bangsring ditemukan *An. annularis*, *An. sundaicus*, *An. indefinitus*, *An. subpictus*, *An. vagus*, dan *An. barbirostris* (Nuryady *et al.*, 2017).

Beberapa nyamuk *Anopheles* termasuk dalam *species complex* yang mana sulit untuk dibedakan dengan hanya menggunakan karakter morfologi. *Species complex* ini dapat terdiri spesies vektor dan non vektor malaria (Marrelli *et al.*, 2006). Contohnya seperti *An. funestus* dan *An. parensis* yang termasuk dalam *An. funestus complex*. *An. funestus* merupakan salah satu vektor primer di Sub-Sahara Afrika. Sedangkan *An. parensis* belum pernah diketahui positif sebagai

vektor malaria (Spillings *et al.*, 2009). Identifikasi vektor dan siblingnya, bersama dengan informasi pemetaan persebarannya secara geografik merupakan dasar yang penting untuk pengendalian vektor malaria (Marrelli *et al.*, 2006).

Identifikasi berdasarkan karakter morfologi yang disertai dengan identifikasi molekuler menjadikan hasil identifikasi spesies lebih akurat (López-rubio *et al.*, 2016). Molekuler marker yang sering digunakan dalam taksonomi nyamuk yaitu *internal Transcribed Spacer 2* (ITS2) (Marrelli *et al.*, 2006) dari DNA nuklear dan *Cytochrome c Oxidase subunit I* (COI) dari DNA mitokondria (Lv *et al.*, 2014;).

Sekuen ITS2 dapat digunakan sebagai marker untuk membedakan antar spesies yang relatif dekat (Marrelli *et al.*, 2006; Kronefeld *et al.*, 2012). Marker ITS2 telah banyak digunakan untuk mengidentifikasi nyamuk *Anopheles*, diantaranya yaitu nyamuk *Anopheles* yang terdapat di daerah Jayapura, India, dan Sri Lanka (Laurent *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2013; Surendran *et al.*, 2010). Sekuen COI dikenal sebagai *DNA barcoding* yang dapat digunakan untuk identifikasi spesies yang belum diketahui spesiesnya (Smith, 2016). Salah satu penelitian penggunaan marker COI yaitu untuk mengidentifikasi nyamuk *Anopheles* di daerah endemik dari 70 lokasi yang berbeda di daerah perairan Pasifik Selatan dan bagian Barat Kolombia (Ahumada *et al.*, 2016).

Meskipun kasus malaria di Desa Bangsring telah menurun, jumlah vektor malaria yang ditemukan masih tinggi. Oleh karena itu pada penelitian ini dilakukan analisis polimorfisme genetik nyamuk *Anopheles* asal Desa Bangsring dengan menggunakan *DNA barcoding* ITS2 dan COI. Sehingga harapannya informasi yang didapatkan berguna dalam studi pengendalian vektor malaria.

## 1.2 Rumusan Masalah

Nyamuk *Anopheles* merupakan vektor protozoa parasit penyebab penyakit malaria dari genus *Plasmodium*. Informasi mengenai diversitas genetik *Anopheles* berperan penting dalam pengendalian vektor *Anopheles*. Oleh karena itu pada penelitian ini dilakukan analisis diversitas genetik nyamuk *Anopheles*

dari Desa Bangsring dengan menggunakan marker DNA pengkode ITS2 dan ITS2.

### **1.3 Batasan Masalah**

Analisis diversitas genetik nyamuk *Anopheles* dilakukan pada nyamuk yang dikoleksi dari Desa Bangsring Kecamatan Wongsorejo Banyuwangi. Analisis dilakukan terhadap 3 jenis spesies yang paling banyak ditemukan.

### **1.4 Tujuan**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui diversitas genetik nyamuk *Anopheles* yang terdapat di Desa Bangsring Banyuwangi berdasarkan sekuen DNA pengkode ITS2 dan COI.

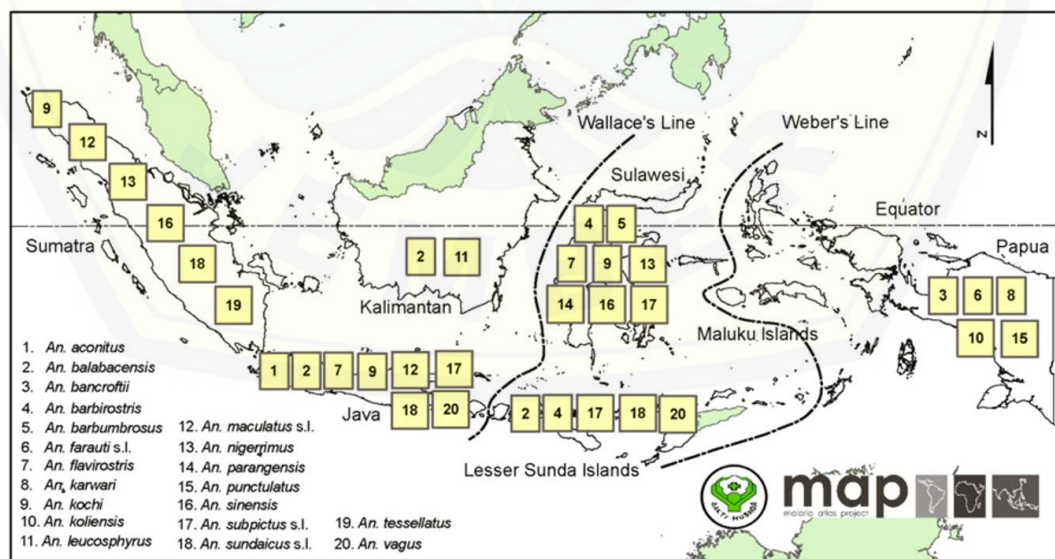
### **1.5 Manfaat**

Hasil dari penelitian ini diharapkan mampu memberikan informasi baru yang berguna dalam pengendalian malaria berbasis vektor.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Distribusi Nyamuk *Anopheles* di Indonesia

*Anopheles* merupakan vektor parasit protozoa dari genus *Plasmodium* yang menyebabkan penyakit malaria. Jenis *Plasmodium* yang dapat menyebabkan malaria pada manusia yaitu *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, dan *P. Ovale* (Koekemoer *et al.*, 2002). Di Indonesia terdapat 29 spesies *Anopheles*. 20 spesies diantaranya telah terkonfirmasi sebagai vektor primer dan vektor sekunder malaria. 9 spesies yang lain negatif *Plasmodium*, tetapi 4 diantaranya yaitu *An. annularis*, *An. hyrcanus*, *An. indefinitus* dan *An. umbrosus* diduga menjadi vektor malaria di Indonesia. 20 spesies vektor tersebut tersebar di seluruh kepulauan di Indonesia. Pulau yang memiliki jumlah spesies *Anopheles* tertinggi yaitu Pulau Jawa dan Sulawesi, sebanyak 8 spesies. Jenis *Anopheles* yang ada di Pulau Jawa yaitu *An. aconitus*, *An. balabacensis*, *An. falvirostris*, *An. kochi*, *An. maculatus*, *An. subpictus s.l.*, *An. sundaicus*, dan *An. vagus* (Gambar 2.1) (Elyazar *et al.*, 2013).



Gambar 2.1 Distribusi *Anopheles* di Indonesia (sumber: Elyazar *et al.*, 2013)

Salah satu daerah endemik malaria di Pulau Jawa yaitu Desa Bangsring Kecamatan Wongsorejo Kabupaten Banyuwangi. Berdasarkan penelitian terdahulu, vektor *Anopheles* yang ditemukan di Desa Bangsring yaitu *An. sundaicus*, *An. indefinitus*, *An. subpictus*, *An. vagus*, dan *An. barbirostris*. (Nuryady *et al.*, 2017).

*An. sundaicus* merupakan *species complex* yang termasuk dalam kelompok *Pyretophorus* subgenus *Cellia*. *An. sundaicus complex* ditemukan 5 *cytotype* (bentuk) yaitu A, B, C, D dan E. *An. sundaicus* A, B, dan C pertama kali ditemukan oleh Sukowati *et al.*, (1999), *Anopheles* tersebut dibedakan berdasarkan analisis sitogenetika dan enzimatik. Ketiga *Anopheles* tersebut dikoleksi dari tempat yang berbeda. *An. sundaicus* A dikoleksi dari daerah perairan di Sumatra dan Jawa, *An. sundaicus* B dikoleksi dari habitat air tawar di Tapanuli Selatan dan habitat air payau di Purworejo, Jawa Tengah. *An. sundaicus* C dikoleksi dari daerah pantai Asahan, Sumatera. Berdasarkan analisis dengan menggunakan DNA mitokondria, tidak ada perbedaan genetik dari *An. sundaicus* yang diakoleksi dari habitat air tawar dan payau. Ketiganya merupakan spesies yang sama. Perbedaan ekologi habitat nyamuk tersebut disebabkan karena hasil dari adaptasi (Dusfour *et al.*, 2004). *An. sundaicus* D dikoleksi dari Pulau Nicobar, Samudera India. Kemudian ditemukan *An. sundaicus* E yang dikoleksi dari Sumatera dan Jawa. Berdasarkan analisis DNA mitokondrianya, spesies ini memiliki perbedaan genetik dengan *An. sundaicus* A, B, dan C. Sehingga dapat disimpulkan bahwa *An. sundaicus* E merupakan *sibling species* baru (Dusfour *et al.*, 2007).

*An. indefinitus* merupakan nyamuk yang hidup di habitat dekat dengan ladang padi berbukit bukit di Jawa. Seperti yang telah disebutkan sebelumnya bahwa spesies ini masih diduga sebagai vektor malaria tetapi belum ada konfirmasi atau penelitian yang menunjukkan adanya *Plasmodium* pada *An. indefinitus* (Ndoen *et al.*, 2012).

*An. vagus* merupakan vektor malaria yang termasuk dalam kelompok *Pyretophorus*. Spesies ini termasuk dalam salah satu vektor malaria penting. Hal ini karena *An. vagus* tersebar di seluruh kepulauan utama di Indonesia kecuali

Papua (46%; 311 tempat) dan memiliki rentang habitat yang luas yaitu mulai dari daerah pantai hingga ladang berbukit bukit. *An. vagus* juga tersebar luas di wilayah Asia lain sehingga memungkinkan adanya *species complex*. *An. vagus* telah dikonfirmasi sebagai vektor malaria di Purworejo, Jawa Tengah dan Kupang (Elyazar *et al.*, 2013).

*An. subpictus s.l.* termasuk dalam kelompok Pyrethophorus, sub-genus Cellia. Spesies ini tersebar dari Sumatera hingga Papua. Berdasarkan penelitian mengenai *An. subpictus* yang dilakukan di India, *An. subpictus* termasuk *species complex* yang terdiri dari 4 *sibling species*, yaitu A, B, C, dan D. Spesies A, B, dan D ditemukan di habitat air tawar, sedangkan spesies C ditemukan di habitat air payau. *An. subpictus* diketahui sebagai vektor malaria pertama kali pada tahun 1920, dengan ditemukannya sporozoit pada 164 *An. subpictus* yang dikoleksi (Chatterjee & Chandra, 2000)

*An. barbirostris* termasuk dalam kelompok Barbirostris, sub-genus *Anopheles*. Spesies ini juga merupakan *species complex* yang terdiri dari 3 sampai 5 *sibling species*. *An. barbirostris* pertama kali dilaporkan sebagai vektor malaria pada tahun 1939 oleh Machsoes yang menguji 1.041 nyamuk di Sulawesi Selatan. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa 30 individu nyamuk mengandung sporozoit. Selain itu, *An. barbirostris* juga menjadi vektor filariasis di Sulawesi (Elyazar *et al.*, 2013).

## 2.2 DNA Barcoding

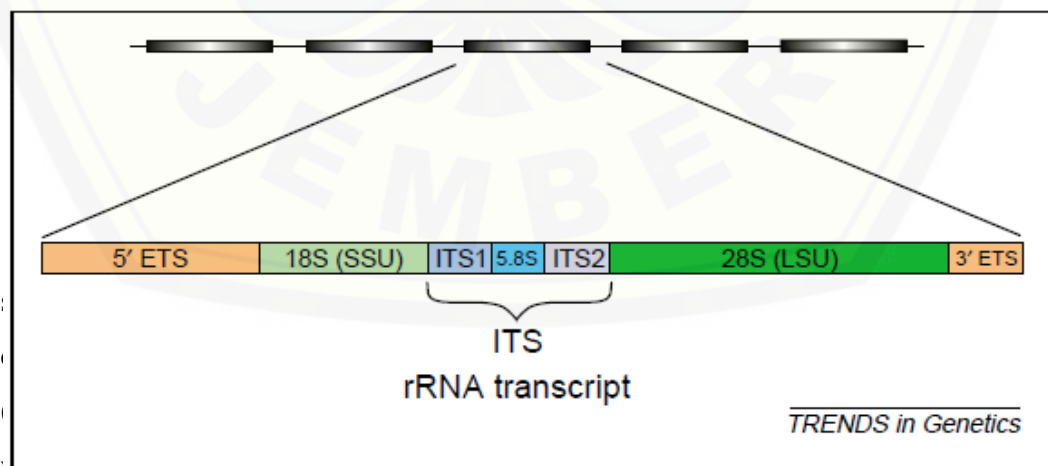
*DNA barcoding* merupakan metode molekuler yang digunakan untuk identifikasi spesies berdasarkan urutan basa nukleotida pada sekuen DNA. Metode ini didasarkan pada konsep bahwa setiap spesies mempunyai identitas genetik yang unik (Chan *et al.*, 2014). Istilah *DNA barcoding* diperkenalkan pertama kali oleh Paul D.N. Hebert pada tahun 2003. *DNA barcodes* yang digunakan merupakan sekuen pendek DNA dengan panjang berkisar antara 400 hingga 800 *bp* (*base pair*). Tujuan utama dari penggunaan *DNA barcoding* yaitu untuk mengidentifikasi spesimen baru hingga tingkat spesies dan meningkatkan penemuan spesies baru melalui identifikasi khususnya pada *sibling species*,

mikroskopik atau organisme yang mempunyai morfologi kompleks sehingga sulit untuk diidentifikasi. Herbert *et al.* (2003) menyatakan bahwa sistem *DNA barcoding* pada hewan dapat didasarkan pada diversitas sekuen COI. Diversitas sekuen asam amino yang dikode oleh gen mitokondria ini dapat dipercaya sebagai dasar identifikasi spesies hingga tingkat taksa yang lebih tinggi (dari filum hingga ordo). Mereka juga menemukan bahwa diversitas sekuen nukleotida pada daerah gen yang sama dapat membedakan spesies yang berkerabat dari Lepidoptera (Hebert *et al.*, 2003). Selain sekuen DNA COI, *internal transcribed spacer 2* (ITS2) juga sering digunakan sebagai molekuler marker untuk identifikasi suatu spesies (D.K. *et al.*, 2012; Ahumada *et al.*, 2016)

### 2.2.1 Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2)

ITS2 merupakan bagian dari rDNA nuklear. Sekuen ini merupakan sekuen *non coding DNA* yang terletak antara subunit 5,8S dan subunit 28S. DNA ribosom terdiri dari sekuen *External Transcribed spacer* (ETS), subunit 18S, ITS1, subunit 5,8, ITS2 dan 28S (Gambar 2.2).

Sekuen ITS2 memiliki variabilitas *interspecific* dan homogenitas *intraspecific* yang tinggi sehingga dapat digunakan sebagai marker identifikasi spesies yang berkerabat dekat (Wilkerson & Reinert, 2004). ITS2 telah digunakan



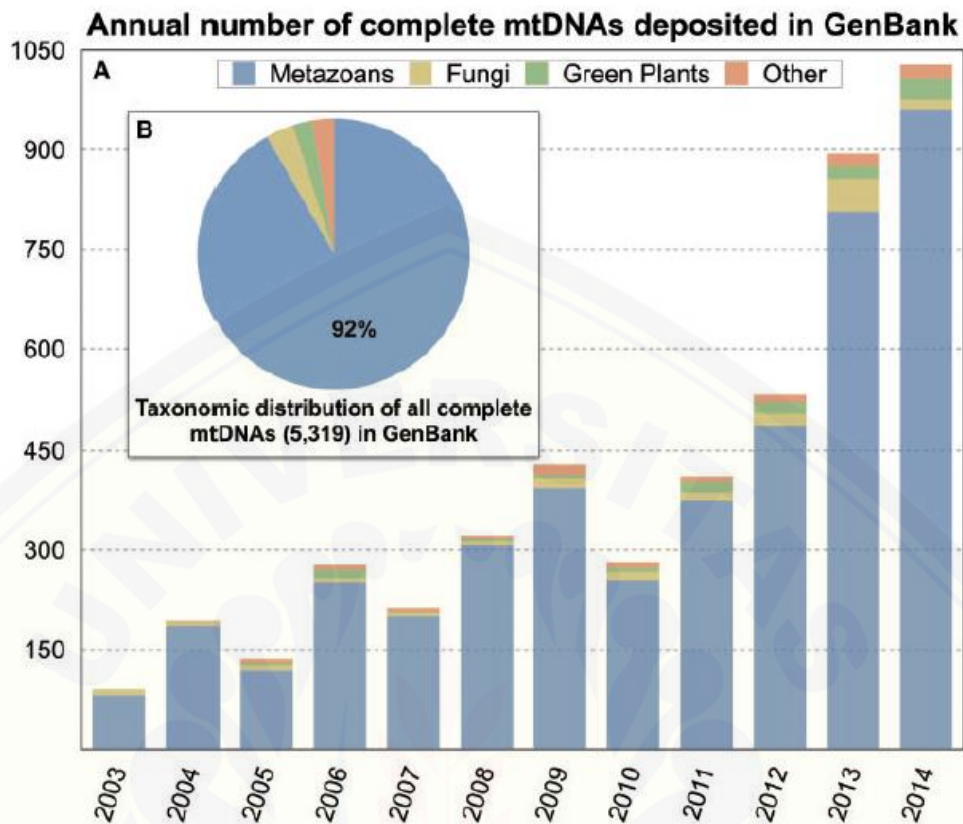
gen tinggi, selain itu sekuen ITS2 memiliki daerah konservatif sehingga dapat digunakan untuk rekonstruksi filogenetik (Wang *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2017).



### 2.2.2 Cytochrome oxidase subunit I (COI)

*Cytochrome c oxidase* merupakan enzim *respiratory* yang terlibat dalam proses transport elektron. Protein ini dibentuk oleh 13 subunit. *Cytochrome c oxidase* subunit I, II, dan III dikode oleh DNA mitokondria. Subunit lainnya dikode oleh DNA nuklear yang kemudian akan dikirim ke mitokondria melalui sitosol (David *et al.*, 2012). DNA mitokondria memiliki beberapa perbedaan dengan DNA nuklear yaitu: 1) memiliki kecepatan evolusi 5-10 kali lebih cepat daripada DNA nuklear; 2) DNA mitokondria merupakan *haplotype* (gen yang berasal dari parental yang sama) sehingga tidak ada tahapan kloning sebelum sekuensing. Sedangkan DNA nuklear membutuhkan tahapan kloning terlebih dahulu sebelum sekuensing; 3) DNA mitokondria mempunyai banyak salinan sehingga lebih mudah untuk diamplifikasi (Fang *et al.*, 2017).

Penggunaan DNA mitokondria COI sebagai marker molekuler untuk mengidentifikasi suatu organisme semakin meningkat sejak diperkenalkan sebagai *DNA Barcoding* oleh Herbert *et al.*, (2003). Pada tahun 2014, lebih dari 1.000 DNA mitokondria yang dimasukkan dalam *GenBank database*. Jumlah ini meningkat dua kali lebih banyak daripada tahun 2012 (Gambar 2.3). Sekuen COI tidak hanya digunakan sebagai marker untuk identifikasi metazoans tetapi juga digunakan untuk identifikasi fungi, dan tanaman. Analisis DNA nuklear yang disertai dengan analisis DNA mitokondria dapat mengarahkan terhadap pemahaman yang mendalam tentang hubungan antara *cytonuclear* dengan ko-evolusi (Smith, 2016).



Gambar 2.3 Komplit sekuen DNA mitokondria yang ada di *GenBank* dari tahun 2003 sampai tahun 2014 (sumber : Smith, 2016).

### 2.3 Diversitas Genetik *Anopheles*

Diversitas genetik (polimorfisme genetik) merupakan variasi dalam sekuen DNA antara individu yang berbeda atau kromosom pada tingkat spesies atau populasi. Diversitas genetik penting bagi spesies untuk bertahan hidup, melanjutkan evolusi bagi spesies baru dan adaptasi terhadap perubahan lingkungan (Ellegren & Galtier, 2016)

Dari data *allozyme* telah diketahui bahwa diversitas genetik diantara spesies sangat berbeda dan penelitian ini telah dikonfirmasi dengan data sekuen DNA. Misalnya pada lalat buah (*Drosophila melanogaster*) yang mempunyai variasi rata-rata 3% dari genomnya sedangkan pada DNA genom manusia hanya 0,1% yang menunjukkan variasi. Polimorfisme juga terjadi pada tingkat lokus dan

kromosom seperti yang telah ditemukan pada beberapa spesies tanaman, fungi dan hewan (Ellegren & Galtier, 2016). Secara teori, diversitas genetik dapat diduga sebagai refleksi keseimbangan antara muncul dan tidaknya variasi gen (alel). Munculnya alel baru pada setiap generasi dengan cara mutasi spontan karena adanya kesalahan replikasi DNA atau mutagen yang menginduksi kerusakan DNA (Hodgkinson & Eyre-Walker, 2011)

Suatu populasi dengan diversitas genetik yang tinggi mempunyai kemampuan untuk mempertahankan diri dari perubahan lingkungan yang ekstrim sehingga lebih adaptif dan mampu melangsungkan hidup dalam waktu yang lebih lama (Rosero *et al.*, 2012). Nilai diversitas genetik pada suatu populasi tergantung pada keberhasilan sistem reproduksi pada populasi tersebut. Diversitas genetik dapat dipertahankan apabila tidak terjadi perkawinan kerabat (*inbreeding*) (Markert *et al.*, 2010).

Penelitian mengenai diversitas genetik *Anopheles* telah banyak dilakukan. Analisis diversitas genetik yang dilakukan berdasarkan sekuen COI dan ITS2 menunjukkan bahwa *An. triannulatus* s.l. dari Colombia bagian barat dan Colombia bagian selatan mempunyai diversitas yang tinggi (Rosero *et al.*, 2012). Hasil penelitian yang dilakukan oleh Sum *et al.* (2014) dari total 133 spesies *Anopheles* yang terdiri dari 6 spesies yang berbeda yang diambil dari delapan lokasi di Panisular Malaysia menunjukkan bahwa hasil amplifikasi sekuen ITS2 dari 6 spesies tersebut memiliki ukuran yang berbeda. Spesies *An. sinensis*, salah satu spesies yang diteliti menunjukkan dua kelompok populasi yang berbeda. Hal ini menunjukkan adanya spesiasi allopatrik.

Identifikasi anggota *species complex An. barbirostris* yang diambil dari Jawa, Sulawesi, Flores, Thailand, dan China berdasarkan sekuen ITS2 menunjukkan adanya 4 spesies dalam populasi *An. barbirostris* yang diteliti yang diberi nama *An. barbirostris* spesies W, X, Y dan Z. Keempat spesies tersebut memiliki panjang ampikon yang berbeda yaitu 339bp, 247bp, 165bp, dan 157bp (Satoto, 2012).

## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari 2018 sampai dengan bulan Juli 2018 bertempat di Laboratorium Bioteknologi FMIPA Universitas Jember.

### 3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan yaitu alat-alat standar identifikasi morfologi nyamuk, alat standar isolasi DNA, PCR, serta alat standar purifikasi DNA yang disebutkan dalam prosedur penelitian.

Sampel yang digunakan yaitu nyamuk *Anopheles* yang diambil dari daerah endemik Desa Bangsring, Kecamatan Wongsorejo Banyuwangi. Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu akuades, *homogenizing buffer*, SDS 20%, proteinase K, larutan NaCl 6M, isopropanol, etanol 70%, RNase, larutan 0,5 M etilene diamine tetraasetat acid (EDTA), Etidium Bromide (EtBr), ddH<sub>2</sub>O, buffer TAE (*Tris Acetic EDTA*) pH 8,0, bubuk agarose, *loading dye*, 2x PCR Master mix (Promega), pasangan primer ITS2, primer COI, DNA ladder 1 kb dan 100 bp (*GeneON GmbH, Germany*) sebagai marker, kit purifikasi DNA *Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean UP syetem*. Komposisi bahan pembuatan larutan dapat dilihat pada Lampiran 3.1.

### 3.3 Prosedur Penelitian

#### 3.3.1 Pengambilan Sampel Nyamuk *Anopheles*

Pengambilan sampel *Anopheles* dilakukan di Desa Bangsring Kecamatan Wongsorejo, Banyuwangi, Jawa Timur. Pemilihan lokasi pengambilan sampel didasarkan pada adanya kandang ternak yang terletak dekat dengan lagun. Hal ini karena lagun merupakan tempat perindukan berbagai *Anopheles* sp. Nyamuk *Anopheles* betina ditangkap dengan menggunakan aspirator. Penangkapan

nyamuk dilakukan pada malam hari antara pukul 20.00-23.00 WIB di sekitar kandang ternak.

### 3.3.2 Identifikasi Morfologi Nyamuk *Anopheles*

Identifikasi nyamuk *Anopheles* dilakukan dengan mengamati ciri morfologi pada bagian palpus, probosis, sayap, toraks, abdomen serta bagian kaki. Identifikasi dilakukan dengan menggunakan mikroskop stereo berdasarkan buku Kunci Bergambar Nyamuk *Anopheles* Dewasa di Indonesia dan Bergambar Jentik *Anopheles* di Indonesia (O' Connor & Soepanto, 2013), buku Cagampang-Ramos & Darsie (1970) dan buku *Anopheline Mosquitoes of Malaya and Borneo* (Reid, 1968). Nyamuk yang telah diidentifikasi ditempatkan pada *microtube* dan dilabel menurut jenisnya.

### 3.3.3 Isolasi DNA Genom Nyamuk

Isolasi DNA genom dilakukan dengan menggunakan metode *salting out* (Aljanabi, 1997). Langkah-langkah dalam isolasi DNA genom yang pertama yaitu 5 individu nyamuk dari masing-masing spesies yang ditemukan dimasukkan dalam tube steril kemudian ditambahkan 450  $\mu$ l *homogenizing buffer* kemudian digerus dengan menggunakan tusuk gigi steril. Setelah itu ditambahkan 20  $\mu$ l SDS 20 % dan 8  $\mu$ l proteinase K. Kemudian diinkubasi pada suhu 65 °C selama 2 jam. Setelah inkubasi, campuran ditambahkan larutan NaCl 6M dan diresuspensi. Kemudian disentrifus dengan kecepatan 11.000 rpm (*rotations per minute*) selama 30 menit. Supernatan yang didapatkan diambil dan dipindahkan ke dalam *tube* steril baru. Supernatan ditambah dengan 350  $\mu$ l isopropanol dan diinkubasi pada suhu -20 °C selama 2 jam. Penambahan isopropanol bertujuan untuk mempresipitasi DNA genom. Setelah inkubasi, campuran disentrifus dengan kecepatan 11.000 rpm pada suhu 4°C selama 20 menit. Pelet yang didapatkan dicuci dengan 350  $\mu$ l etanol 70%. Kemudian disentrifus dengan kecepatan 11.000 rpm, pada suhu 4 °C selama 5 menit.

Kualitas DNA genom dianalisis dengan elektroforesis. DNA genom yang diperoleh diambil 5µl dan ditambahkan dengan 2 µl *loading dye* kemudian dimasukkan ke dalam sumuran pada gel agarose yang mengandung EtBr. 5 µl *DNA ladder* 1 kb dimasukkan dalam sumuran lain sebagai marker. Elektroforesis dilakukan selama 45 menit pada *voltage* 100 Volt dengan buffer TAE sebagai *running buffer*. Setelah elektroforesis, *gel* divisualisasi dengan menggunakan *UV illuminator* untuk melihat ada tidaknya DNA genom.

### 3.3.4 PCR

Segmen DNA ITS2 dan COI diampilifikasi dengan PCR menggunakan primer yang tertulis pada Tabel 3.1. Langkah awal yang dilakukan dalam teknik PCR yaitu mempersiapkan bahan-bahan yang dibutuhkan dalam PCR diantaranya yaitu DNA genom yang telah diisolasi sebagai *DNA template*, 2x PCR Master Mix, primer *forward*, primer *reverse*. Kemudian dilakukan pencampuran dengan komposisi 2,5 µl primer *forward* ditambah dengan 2,5 µl primer *reverse* (konsentrasi primer 0,5 µM dalam 50 µl reaksi), 19 µl aquabidest steril, 25 µl 2x PCR Master mix dan 1 µl *DNA template*.

Tabel 3.1 Primer DNA yang digunakan untuk mengamplifikasi sekuen DNA ITS2 dan COI

Pasangan Primer (1)	<i>Forward</i> (2)	<i>Reverse</i> (3)	Panjang Sekuen (3)	Sekuen DNA target (4)
ITS2 (a)	5'TGT GAA CTG CAG GAC ACA TG3'	5' ATG CTT AAA TTT AGG GGG TA 3' (Koekemoer <i>et al.</i> , 2002)	480-847 bp	ITS2
ITS2 (b)	5'TGT GAA CTG CAG GAC ACA T3'	5' TAT GCT TAA ATT CAG GGG GT 3' (Surendran <i>et al.</i> , 2011)	480-847 bp	ITS2
COI (a)	(5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3')	(5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3') (Folmer <i>et al.</i> , 1994)	700 bp	COI
COI (b)	5' GAT TTG GAA ATT GAT TAG TTC CTT-3'	5' AAA AAT TTT AAT TCC AGT TGG AAC AGC 3' (Kumar <i>et al.</i> , 2007)	700 bp	COI

Kondisi PCR yang digunakan untuk mengamplifikasi sekuen ITS2 yaitu *initial denaturation* pada 95 °C selama 5 menit, *denaturation* 95 °C selama 30 detik, *annealing* 51 °C selama 30 detik, *extention* 72 °C selama 45 detik dengan 30 siklus, *final extention* 72 °C selama 7 menit.

Kondisi PCR yang digunakan untuk mengamplifikasi sekuen COI (a) dan COI (b) yaitu *initial denaturation* pada 94 °C selama 5 menit, *denaturation* 94 °C selama 40 detik, *annealing* 43 °C selama 1 menit, *extention* 72 °C selama 1 menit 30 detik sebanyak 5 siklus, kemudian dilanjutkan dengan *denaturation* 94 °C selama 40 detik, *annealing* 51 °C selama 1 menit, *extention* 72 °C selama 1 menit 30 detik sebanyak 30 siklus, *final extention* 72 °C selama 5 menit. Kualitas DNA hasil PCR dianalisis secara langsung dengan elektroforesis. Produk hasil PCR disimpan pada suhu -20 °C.

### 3.3.5 Purifikasi DNA Produk PCR

Purifikasi dilakukan untuk memurnikan DNA produk PCR. Produk PCR dimurnikan dengan mengikuti prosedur *Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean UP syetem*. Tahap awal purifikasi DNA yaitu memotong *gel agarose* yang mengandung pita DNA hasil PCR. Kemudian pita-pita yang telah dipotong dimasukkan ke dalam *tube* dan ditimbang beratnya. Setelah itu ditambahkan *binding buffer* 100 µl/100 mg *gel* yang mengandung DNA. Setelah itu dimasukkan dalam *thermo-shaker* dengan kondisi suhu 55 °C selama 10 menit dan dijentik-jentikkan (*tap the tube*) setiap 3 menit. Setelah *gel* mencair dan larut, sampel dimasukkan ke dalam *minicolumn* yang ditempatkan pada tabung koleksi (2 mL) dan disentrifus dengan kecepatan 15.000xg selama 1 menit. Cairan di dalam tabung koleksi dibuang kemudian ditambahkan dengan 700 µl *washing buffer* dan disentrifus dengan kecepatan 15.000xg selama 1 menit. Cairan di dalam tabung dibuang kemudian ditambahkan kembali dengan 500 µl *washing buffer* dan disentrifus dengan kecepatan 15.000xg selama 5 menit. Cairan dalam tabung koleksi dibuang setelah itu disentrifuse kembali pada kecepatan 15.000xg selama 1 menit untuk menghilangkan *washing buffer*. Cairan di dalam tabung

koleksi dibuang. Setelah itu kolom dipindah ke *tube* 1,5 ml steril. DNA pada kolom dielusi dengan 50  $\mu$ l *nuclease-free water* dan diinkubasi pada suhu ruang selama 1 menit. Kemudian disentrifus dengan kecepatan 15.000xg selama 1 menit. DNA yang telah dimurnikan disimpan pada suhu -20°C.

### 3.3.6 Analisis Data

Hasil purifikasi DNA genom disekuensing untuk mengetahui urutan basa nukleotidanya. Sekuensing dilakukan dengan mengirimkan sekuen DNA target hasil purifikasi ke *Ist Base Laboratories*. Data hasil sekuensing DNA diedit dengan menggunakan program *Bioedit Sequence Alignment Editor* untuk mendapatkan sekuen utuh.

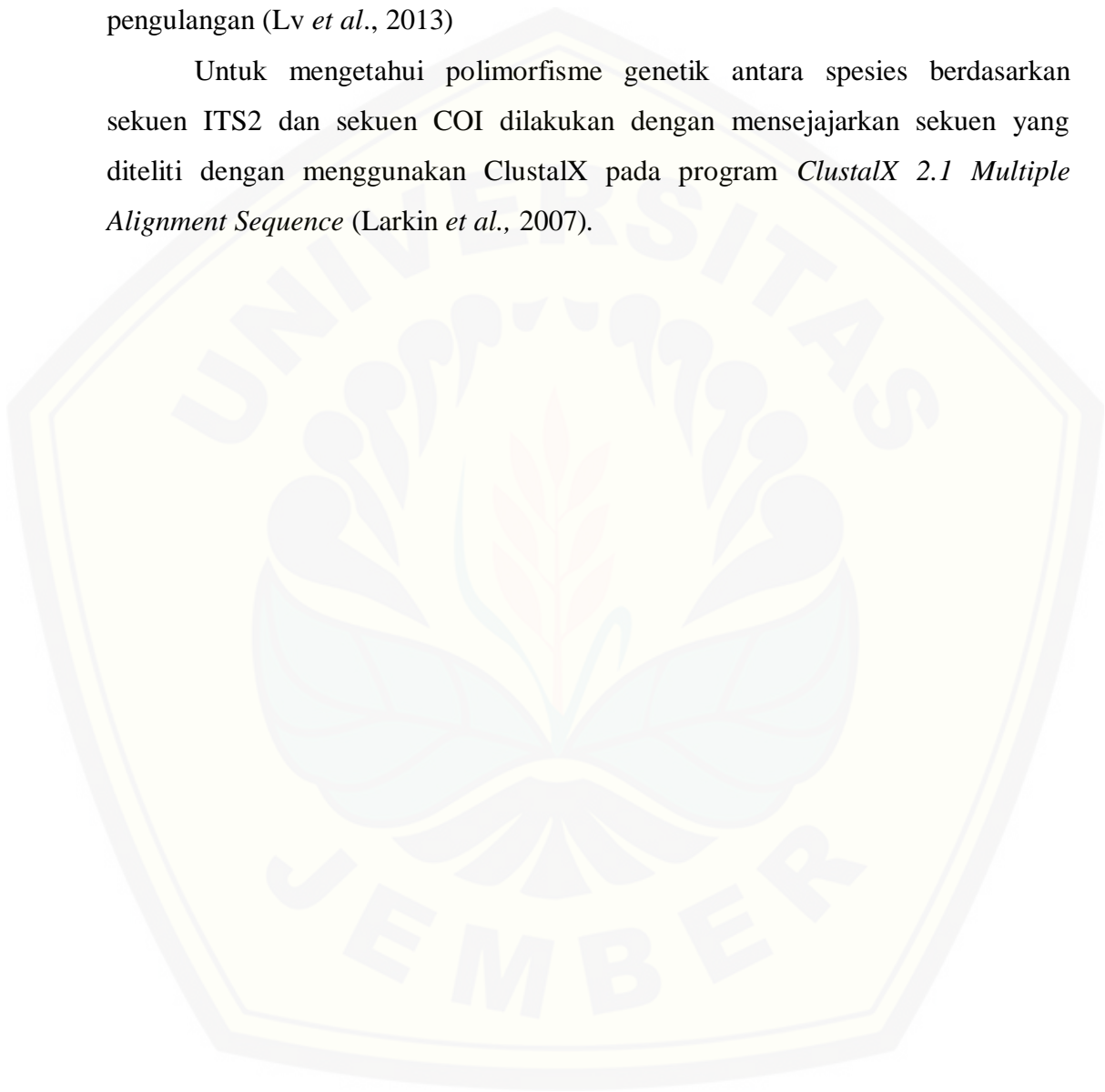
Verifikasi identitas sekuen *Anopheles* dilakukan dengan membandingkan urutan basa nukleotida hasil sekuensing dengan sekuen DNA pengkode ITS2 dan COI yang ada di *GenBank database* dengan menggunakan program *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) online software* (Ye *et al.*, 2006) dan *The Barcode of Life Data (BOLD) system* khusus untuk sekuen COI. Informasi yang didapatkan dari pencarian sekuen akan menghasilkan beberapa *Anopheles* yang mempunyai kemiripan dengan sekuen yang dianalisis dan disertai dengan informasi meliputi nilai *alignment* tertinggi (*Max score*) dari sekuen database, nilai *alignment* total (*Total score*) dari semua *alignment* segmen, presentase *query covered*, nilai *Expect value (E value)*, presentase nilai kemiripan (*Max Ident*) dari semua *query-subject alignment*, dan *accession number* dari sekuen *GenBank*. Perbandingan sekuen bertujuan untuk menentukan tingkat kekerabatan *Anopheles* yang diteliti dengan *Anopheles* yang telah diidentifikasi sebelumnya (Leblond-Bourget *et al.*, 1996). Jika derajat kesamaan sekitar 99-100% mengindikasikan spesies yang sama, 97-98 % mengindikasikan spesies yang berbeda tetapi dalam satu genus, dibawah 97 % mengindikasikan spesies baru (Xiao *et al.*, 2010).

Sekuen ITS2 dan COI dari *Anopheles* yang memiliki kekerabatan dekat diunduh dari *GenBank database* di NCBI. Data sekuen yang telah diunduh dan sekuen hasil sekuensing disejajarkan dengan menggunakan ClustalW (Thompson



*et al.*, 1994) dengan menggunakan software *The Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA) versi 6 (Tamura *et al.*, 2013). Rekonstruksi pohon filogeni dilakukan dengan menggunakan metode jarak *Neighbour-joining tree* dan *Kimura two parameter* (K2P) (Collins *et al.*, 2012) dengan Bootstrapp 10.000 pengulangan (Lv *et al.*, 2013)

Untuk mengetahui polimorfisme genetik antara spesies berdasarkan sekuen ITS2 dan sekuen COI dilakukan dengan mensejajarkan sekuen yang diteliti dengan menggunakan ClustalX pada program *ClustalX 2.1 Multiple Alignment Sequence* (Larkin *et al.*, 2007).



## BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Identifikasi berdasarkan karakter morfologi didapatkan 3 spesies nyamuk yaitu *An. vagus*, *An. indefinitus*, *An. subpictus*. Identifikasi berdasarkan karakter molekuler spesies *An. vagus* dan *An. indefinitus* tersebut menunjukkan spesies yang sama yaitu *An. vagus* (*Accession number* FJ654649.1). Identifikasi berdasarkan karakter molekuler spesies *An. subpictus* menunjukkan spesies *An. subpictus* (GQ870328.1). Hasil ini juga didukung dengan hasil rekonstruksi pohon filogeni dari ketiga spesies tersebut dengan sekuen dari *GenBank*. Identifikasi berdasarkan karakter molekuler penting untuk dilakukan untuk melengkapi identifikasi berdasarkan karakter morfologi. Polimorfisme genetik Intra-spesies pada sekuen ITS2 lebih tinggi daripada sekuen COI. Keberhasilan identifikasi suatu spesies juga dipengaruhi oleh urutan sekuen primer yang digunakan. Pada penelitian ini urutan primer COI(b) menghasilkan hasil amplifikasi yang lebih baik daripada primer COI(a).

### 5.2 Saran

Pemahaman mengenai karakter morfologi spesies *Anopheles* dan pelatihan mengidentifikasi berdasarkan karakter morfologi merupakan hal penting sebelum memulai penelitian. Sehingga hal ini dapat mengurangi kesalahan dalam identifikasi selama proses penelitian.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Ahumada, Martha, Lorena I.O., Paula X. P., Marcela C., Diana M.C., Eliana F.G., Jorge A.L., John C.B., Socrates H. dan Martha L.Q. 2016. Spatial Distributions Of *Anopheles* Species In Relation To Malaria Incidence At 70 Localities In The Highly Endemic Northwest And South Pacific Coast Regions Of Colombia. *Malar. J.*(15):407.
- Aljanabi, S. .1997. Universal and Rapid Salt-Extraction of High Quality Genomic DNA for PCR- Based Techniques. *Nucleic Acids Research*, 25(22):4692–4693. doi: 10.1093/nar/25.22.4692.
- Baldauf, Sandra L.2013. Review: Phylogeny For the Faint of Heart. *Elsevier*. 19(6): 345-351.
- Bock DG, Zhan A, Lejeune C, MacIsaac HJ, dan Cristescu ME . 2011 . Looking at Both Sides of The Invasion: Patterns of Colonization in The Violet Tunicate *Botrylloides violaceus*. *Mol Ecol*. 20:503–516.
- Cagampan-Ramos, A. dan Darsie, R. F. 1970. Illustrated Keys to the *Anopheles* Mosquitoes of the Philippine Islands. *Mosquito Systematics*. 2(3):1–49.
- Chan, A. Lee-Pei Chiang, Hapuarachige C H., Cheong Huat Tan, Sook-Cheng Pang, Ruth Lee, Kim-Sung Lee, Lee-Ching Ng, dan Sai-Gek Lam Phua. 2014. DNA Barcoding: Complementing Morphological Identification of Mosquito Species in Singapore. *Parasite & Vectors*. 7: 569.
- Chatterjee, S. dan Chandra, G. 2000. Role of *Anopheles subpictus* as a Primary Vector of Malaria in an Area in India. *Japanese Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 28(3):177–181. doi: 10.2149/tmh1973.28.177.
- Coleman, A. W. 2003. ITS2 is a Double-edged Tool for Eukaryote Evolutionary Comparisons. *Trends in Genetics*, 19(7):370–375. doi: 10.1016/S0168-9525(03)00118-5.
- Collins, R. A. Laura M. Boykin, Robert H. Cruickshank dan Karen F. Armstrong 2012. Barcoding's Next Top Model: An Evaluation of Nucleotide Substitution Models for Specimen Identification. *Methods in Ecology and Evolution*. 3(3):457–465. doi: 10.1111/j.2041-210X.2011.00176.x.

- D.K., Sarma, A., Prakash, S.M., O'Loughlin, D.R., Bhattacharyya, P.K., Mohapatra, K., Bhattacharjee, K., Das, S., Singh, N.P., Sarma, G.U., Ahmed C., dan Walton. 2012. Genetic Population Structure of The Malaria Vector *Anopheles baimai* in North-East India Using Mitochondrial DNA. *Malaria J.*
- David U. Mick, Thomas D. Fox, dan Peter R. 2012. Inventory Control: Cytochrome Oxidase Assembly Regulates Mitochondrial Translation. *NIH Public Access*, 12(1):14–20. doi: 10.1038/nrm3029.Inventory.
- Dhiman, Sunil, Yadav K., Rabha B., Goswami, D. Hazarika, dan S Tyagi, V. 2016. Evaluation of Insecticides Susceptibility and Malaria Vector Potential of *Anopheles annularis* s . l . and *Anopheles vagus* in Assam. *PLoS ONE*. 1–13. doi: 10.1371/journal.pone.0151786.
- Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Timur. 2013. Profil Kesehatan Profinsi Jawa Timur Tahun 2012. Surabaya: DINKES Profinsi Jawa Timur.
- Dinas Kesehatan Kabupaten Banyuwangi . 2015 . Profil Kesehatan Kabupaten Banyuwangi Tahun 2014. Banyuwangi: DINKES Kabupaten Banyuwangi.
- Dusfour, I., Blondeau, J., Harbach, R. E., Vythilingham, I. Baimai, V. Trung, Ho, Sochantana, T., Bangs, M., dan Manguin, S. 2004. Molecular Evidence Of Speciation Between Island and Continental Populations of *Anopheles* (*Cellia*) *sundaicus* (Diptera: Culicidae), A Principal Malaria Vector Taxon in Southeast Asia. *J. Med. Entomol.* 41(3):287–95. doi: Doi 10.1603/0022-2585-41.3.287.
- Dusfour. I., J. Blondeau, R.E. Harbach, I. Vythilingham, V. Baimai, H.D. Trung, T. Sochantana, M.J. Bangs, S. Manguin. 2007. Polymerase Chain Reaction Identification of Three Members of the *Anopheles sunaicus* (Diptera: Culicidae) Complex, Malaria Vectors in Southeast Asia. *J. Med. Entomol.* 44(5): 723-731.
- Ellegren, H. dan Galtier, N. 2016. Determinants of Genetic Diversity. *Nature Reviews Genetics*. 17(7): 422–433. doi: 10.1038/nrg.2016.58.
- Elyazar, I. R. F. Marianne E. Sinka, Peter W. Gething, Siti N. Tarmidz, Asik Surya, Rita Kusriastuti, Winarno, J. Kevin Baird, Simon I. Hay, Michael J. Bangs Eijkman-Oxford. 2013. The Distribution and Bionomics of Anopheles Malaria Vector Mosquitoes in Indonesia. 1st edn, *Advances in Parasitology*. 1st edn. Elsevier Ltd. doi: 10.1016/B978-0-12-407705-

8.00003-3.

- Fang, Y., Shi, W. Q. dan Zhang, Y. 2017. Molecular Phylogeny Of *Anopheles Hyrcanus* Group (Diptera: Culicidae) Based On mtDNA COI. *Infectious Diseases of Poverty*. 6(1):1–10. doi: 10.1186/s40249-017-0273-7.
- Feng, Xinyu, Libin H., Lin L., Manni Y., dan Yajun M. 2017. Genetic Diversity and Population Structure of The Primary Malaria Vector *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae) in China inferred by COX1 Gene. *Parasite & Vectors*. 10(75).
- Folmer, O. O, M. Black, W. Hoeh, R. Lutz, dan R. Vrijenhoek.. 1994. DNA Primers for Amplification Of Mitochondrial Cytochrome C Oxidase Subunit I From Diverse Metazoan Invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 3(5):294–299. doi: 10.1371/journal.pone.0013102.
- Han, J. Yingjie Zhu, Xiaochen Chen, Baoshen Liao, Hui Yao, Jingyuan Song, Shilin Chen, and Fanyun Meng. 2013. The Short ITS2 Sequence Serves as an Efficient Taxonomic Sequence Tag in Comparison With The Full-Length ITS. *BioMed Research International*. 3–10. doi: 10.1155/2013/741476.
- Hebert, P. D. N., Alina C., Shelley L. Ball dan Jeremy R. deWaard . 2003. Biological Identifications Through DNA Barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(1512): 313–321. doi: 10.1098/rspb.2002.2218.
- Hodgkinson, A. dan Eyre-Walker, A. 2011. Variation in The Mutation Rate Across Mammalian Genome. *Nature Reviews Genetics*. 12(11):756–766. doi: 10.1038/nrg3098.
- Koekemoer, L.L, L. Kamau, R.H. Hunt, & M. Coetzee. 2002. A Cocktail Polymerase Chain Reaction Assay Identify Members Of The *Anopheles Funestus* (Dipter: Culicidae) Group. *Am. J. Trap. Med. Hyg.* (6): 804-811.
- Kronefeld, M., M. Dittmann, D. Zielke, D. Warner, dan H. Kampen. 2012. Molecular Confirmation of The Occurrence in Germany of *Anopheles daciae* (Diptera, Culicidae). *Parasites & Vectors*. 5(250). <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-250>.
- Kumar, N. P., Rajavel, A. R., Natarajan, R., Jambulingam, P. 2007. DNA Barcodes Can Distinguish Species of Indian Mosquitoes ( Diptera : Culicidae ). *Molecular Ecology Resources*. pp. 1–7.

- Larkin M.A., G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J.D. Thompson, T.J. Gibson and D.G. Higgins. 2007. Clustal W and Clustal X Version 2.0. *Bioinformatics*. 23 no. 21 (2947–2948).
- Laurent, B.S., S. Supratman, P.B.S. Asih, D. Bretz, J. Mueller, H.C. Miller, A. Baharuddin, Shinta, A. Surya, M. Ngai, F. Laihad, D. Syafruddin, W.A. Hawley, F.H. Collins, dan N.F. Lobo. 2016. Behaviour and molecular identification of *Anopheles* malaria vectors in Jayapura district, Papua province, Indonesia. *Malaria Journal*. 15(192):1-8.
- Leblond-Bourget, N. Herve P., Irene M., dan Bernard D. 1996. 16S rRNA and 16S to 23S Internal Transcribed Spacer Sequence Analyses Reveal Inter- and Intraspecific Bifidobacterium Phylogeny. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 46(1): 102–111.
- Lobo, N. F. Brandyce, St. L., Chadwick H. S., Busiku H., Javan C., Dingani C., Sindhu M. K., Jonathan D. M., Nicholas A. D., Quynh T. H., Heather L. B., Julie T., Jennifer S., Aklilu S. dan Frank H. C. 2015. Unexpected Diversity Of *Anopheles* Species in Eastern Zambia: Implications for Evaluating Vector Behavior and Interventions Using Molecular Tools. *Nature Publishing Group*. pp. 1–10. doi: 10.1038/srep17952.
- López-rubio, A. Juan S., Paula L M., Natalia R., Lorenzo C., Charles P., dan Sandra U. A. 2016. Use of DNA Barcoding To Distinguish The Malaria Vector *Anopheles Neivai* in Colombia. *HHS Public Access*. 4175(4): 377–389.
- Lv, J. S. W., Yongning Z., Tianyi Z., Chunyan F., Guangle J., dan Xiangmei L. 2014. Development of a DNA Barcoding System for The Ixodida (Acari: Ixodida). *Mitochondrial DNA*, 25(2): 142–149. doi: 10.3109/19401736.2013.792052.
- Marrelli, M. T., Sallum, M. A. M. dan Marinotti, O. 2006. The Second Internal Transcribed Spacer Of Nuclear Ribosomal DNA as a tool for Latin American *Anopheline* Taxonomy - A critical review', *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101(8): 817–832. doi: 10.1590/S0074-02762006000800002.

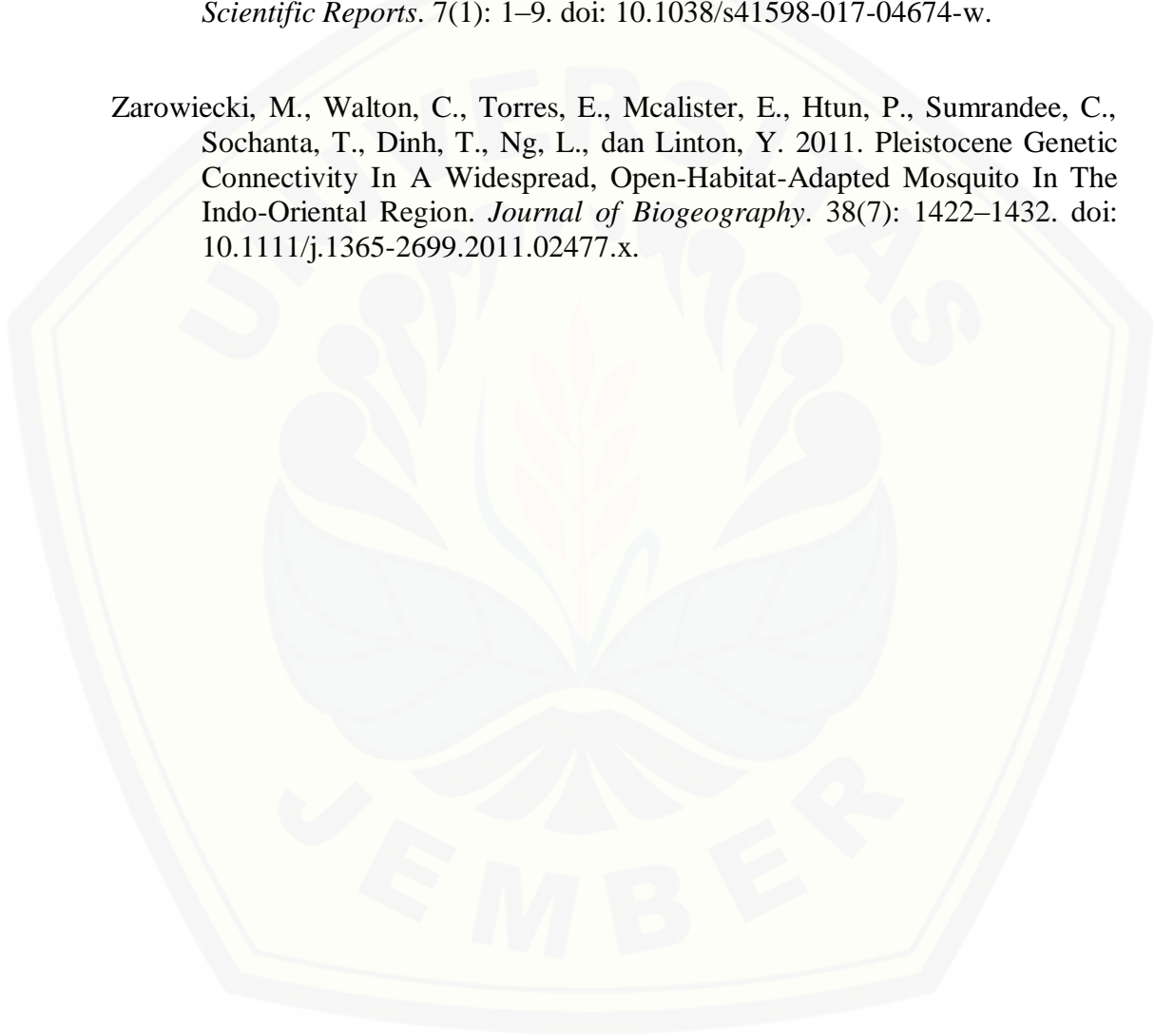
- Merget, B. , Koetschan, C., Hackl, T., Förster, F., Dandekar, T., Müller, T., Schultz, J., dan Wolf, M. 2012. The ITS2 Database. *Journal of Visualized Experiments*, (61): 1–5. doi: 10.3791/3806.
- Ndoen, E. ClydeWild, PatDale, Neil Sipe, dan MikeDale. 2012. Mosquito Longevity, Vector Capacity, and Malaria Incidence in West Timor and Central Java, Indonesia. *ISRN Public Health*, pp. 1–5. doi: 10.5402/2012/143863.
- Norris, L. C., Norris, D. E. dan Hopkins, J. 2016. Phylogeny of Anopheline (Diptera: Culicidae) Species In Southern Africa, Based On Nuclear and Mitochondrial Genes. *Int. Sch. Research. Net.* 40(1), pp. 16–27. doi: 10.1111/jvec.12128.Phylogeny.
- Nuryady, M. M. , Utomo, S.S., Armiyanti, Y., Mumpuni, S, dan Senjarini, K. 2017. Analysis of Human Immune Response against Salivary Glands Protein Extract of *Anopheles sundaicus* . L in Malaria Endemic Are., *Microbiology Indonesia*.11(1): 23–27. doi: 10.5454/mi.11.1.4.
- O' Connor, C.T. dan Soepanto, A. 2013. Kunci Bergambar Nyamuk *Anopheles* Dewasa di Indonesia dan Bergambar Jentik *Anopheles* di Indonesia. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Penandat, J. A., Denise MC., Ruth G., Jason S. G., Anne K., Thomas JMcGreevy Jr, Annette R., Mark J. B. dan Diane E N. 2010. Population Genetic Diversity And Fitness In Multiple Environments. *BMC Evolutionary Biology*, 10: 5–9. doi/10.1186/1471-2148-10-205.
- Prakash, A., Walton, C., Bhattacharyya, D. R., Loughlin, Samantha O., Mohapatra, P. K., dan Mahanta, J. 2006. Molecular Characterization and Species Identification of The *Anopheles dirus* and *An. minimus* Complexes In North-East India Using r-DNA ITS-2. *Acta Tropica*. 100(1–2): 156–161. doi: 10.1016/j.actatropica.2006.09.009.
- Ratnasingham, S. dan Hebert, P. D. N. 2007. Barcoding, Bold : The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes*. pp. 355–364. doi: 10.1111/j.1471-8286.2006.01678.x.

- Rosero, Doris A., Jaramillo, Luz M., Gutiérrez, Lina A., Conn, Jan E., dan Correa, Margarita M. 2012. Genetic Diversity of *Anopheles triannulatus* s.l. (Diptera: Culicidae) from Northwestern and Southeastern Colombia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 87(5): 910–920. doi: 10.4269/ajtmh.2012.12-0285.
- Satoto, T. B. T. 2012. Molecular Penanda Confirmation for Member of *Anopheles barbirostris* Van Der Wulp 1884 in Different Localities. *Indonesia Journal of Biotechnology*, 17(2): 163–168.
- Sharma, P. dan Tsuyoshi Kobayashi. 1990. Are "Universal" DNA Primers Really Universal?. *J Appl Genetics*. DOI 10.1007/s13353-014-0218-9
- Smith, D. R. 2016. The Past, Present And Future Of Mitochondrial Genomics: Have We Sequenced Enough mtDNAs. *Briefings in Functional Genomics*, 15(1): 47–54. doi: 10.1093/bfpg/elv027.
- Spillings, Belinda L, Brooke, Basil D, Koekemoer, L., Chipwanya, J., Coetzee, M., dan Hunt, Ri. H . 2009 . A New Species Concealed by *Anopheles funestus* Giles Major Malaria Vector in Africa. 81: 510–515.
- Stoops, Craig A., Rusmiarto, S., Susapto, D., Munif, A., Andris, H., Barbara, K., dan Sukowati, S. 2009. Bionomics of *Anopheles* spp. (Diptera: Culicidae) in a Malaria Endemic Region of Sukabumi, West Java, Indonesia. *Journal of Vector Ecology*, 34(2): 200–207. doi: 10.1111/j.1948-7134.2009.00027.x.
- Suguna, S.G., K.G. Rathinam, A.R. Rajavel, dan V. Dhanda. 1994. Morphological and Chromosomal Descriptions of New Species in the *Anopheles subpictus* complex. *Med. Vet. Entomol.* 8(1):88 - 94.
- Sukowati, S. Sukowati, S.Baimai, V., Harun, S., Dasuki, Y., Andris, H., dan Efriwati, M. 1999. Isozyme Evidence For Three Sibling Species in The *Anopheles sundaicus* Complex from Indonesia. *Medical and Veterinary Entomology*, 13(4): 408–414. doi: 10.1046/j.1365-2915.1999.00197.x.
- Sum, J.-S. um, Jia-Siang, Lee, W., Amir, A., Braima, K., Jeffery, Jo., Abdul-Aziz, N., Fong, M., dan Lau, Y. 2014. Phylogenetic Study of Six Species of *Anopheles* Mosquitoes in Peninsular Malaysia Based On Inter-Transcribed Spacer Region 2 (ITS2) of Ribosomal DNA', *Parasites & Vectors*, 7(1): 309. doi: 10.1186/1756-3305-7-309.



- Surendran, S.N., O.P. Singh, P.J. Jude, R. Ramasamy. 2010. Genetic Evidence for Malaria Vectors of The *Anopheles sundaicus complex* in Sri Lanka With Morphological Characteristic Attributed to *Anopheles subictus* species B. *Malaria Journal*. 9(343): 1-9.
- Surendran, S. N. , Gajapathy, K., Kumaran, V., Tharmatha, T., Jude, P., Ramasamy, R. 2011. Molecular Evidence For The Presence of Malaria Vector Species A of The *Anopheles Annularis* Complex in Sri Lanka. *Parasites & Vectors*. BioMed Central Ltd, 4(1): 239. doi: 10.1186/1756-3305-4-239.
- Tamura, K. , Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., dan Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0<sup>7</sup>, *Molecular Biology and Evolution*. 30(12): 2725–2729. doi: 10.1093/molbev/mst197.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. dan Gibson, T. J. 1994. Clustal-W-Improving The Sensitivity Of Progressive Multiple Sequence Alignment Through Sequence Weighting, [Position-Specific *Gap* Penalties And Weight Matrix Choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22): 4673–4680.
- Wang, X. C. Wang, Xin Cun, Liu, C., Huang, L., Bengtsson-Palme, J., Chen, H., Zhang, J., Cai, D., dan Li, J. 2015. ITS1: A DNA Barcode Better Than ITS2 in Eukaryotes. *Molecular Ecology Resources*. 15(3): 573–586. doi: 10.1111/1755-0998.12325.
- Wilkerson, R. C. dan Reinert, J. F. 2004. Ribosomal DNA ITS2 Sequences Differentiate Six Species in the *Anopheles crucians* Complex ( Diptera : Culicidae )'. *J. Med. Entomol*. 41(3):392-401.
- Xiao, M., Kong, F., Sorrell, T., Cao, Y., Lee, O., Liu, Y., Sintchenko, V., Chen, S. C.A. 2010. Identification of Pathogenic *Nocardia* Species by Reverse Line Blot Hybridization Targeting The 16S rRNA and 16S-23S rRNA Gene Spacer Regions. *J. Clin. Microbiol*. 48(2): 503–511. doi: 10.1128/JCM.01761-09.
- Yao, H. , Song, J., Liu, C., Luo, K., Han, J., Li, Y., Pang, X., Xu, H., Zhu, Y., Xiao, P., dan Chen, S. 2010. Use of ITS2 Region As The Universal DNA Barcode for Plants and Animals. *PLoS ONE*, 5(10). doi: 10.1371/journal.pone.0013102.

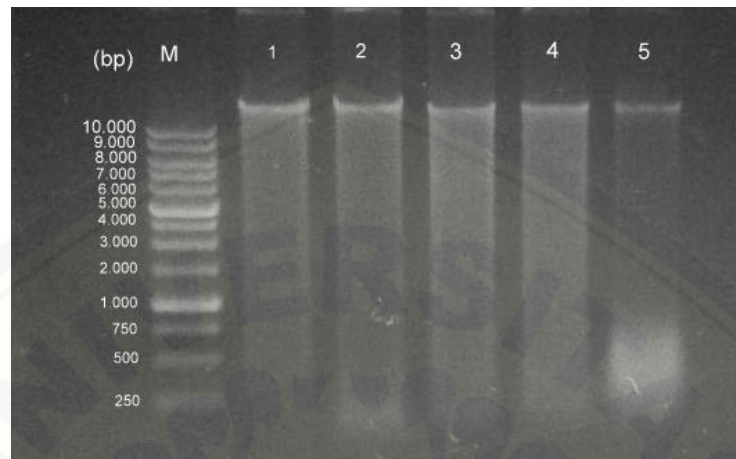
- Ye, J., McGinnis, S. dan Madden, T. L. . 2006. 'BLAST: Improvements For Better Sequence Analysis. *Nucleic Acids Research*. 34: 6–9. doi: 10.1093/nar/gkl164.
- Yu, N. , Wei, Y., Zhang, X., Zhu, N., Wang, Y., Zhu, Y., Zhang, H., Li, Fe. Lan, Sun, J., dan Sun, A. 2017. Barcode ITS2: A Useful Tool for Identifying *Trachelospermum Jasminoides* and a Good Monitor for Medicine Market. *Scientific Reports*. 7(1): 1–9. doi: 10.1038/s41598-017-04674-w.
- Zarowiecki, M., Walton, C., Torres, E., Mcalister, E., Htun, P., Sumrandee, C., Sochanta, T., Dinh, T., Ng, L., dan Linton, Y. 2011. Pleistocene Genetic Connectivity In A Widespread, Open-Habitat-Adapted Mosquito In The Indo-Oriental Region. *Journal of Biogeography*. 38(7): 1422–1432. doi: 10.1111/j.1365-2699.2011.02477.x.



LAMPIRAN

Lampiran 3.1 Komposisi Bahan Pembuatan Larutan

No.	Nama larutan	Bahan	Komposisi
1.	Larutan EDTA 0,5 M (per 100 ml)	EDTA	14,6 gr
		NAOH	2 gr
		Akuades	100 ml
2.	Larutan TAE 5x (per 500 mL)	Tris Base	12,1 gr
		Acetic Acid	2,88 ml
		Glacial	
		EDTA 0,5 M	50 mL
		Akuades	± 450 ml
3.	Gel Agarose 1% (per 100 mL)	Agarose	1 gr
		Akuades	100 ml
		EtBr	2 µl
4.	<i>Homogenizing Buffer</i> (per 50 mL)	EDTA 2 mM	0,2 ml
		NaCl 0,4 M	1,16 gr
		Tris-Cl 10 mM	0,5 ml
5.	Proteinase K 20 mg/ml	Proteinase K	20 mg
		Akuabides	1 ml

**Lampiran 4.1 Visualisasi Hasil Isolasi DNA Genom**

Gambar 4.1 Visualisasi hasil isolasi DNA genom *Anopheles*. (M) Marker DNA 1kb; (1-2) DNA genom *An. vagus*; (3-4) DNA genom *An. indefinitus*; (5) DNA genom *An. subpictus* (sumber: dokumentasi pribadi. Difoto dengan menggunakan kamera Samsung J1 Ace)

**Lampiran 4.2 Perbandingan Morfologi *An. vagus vagus*, *An. vagus limosus*, *An. indefinitus* dan *An. subpictus* Berdasarkan Buku *Illustrated Keys to The Anopheles Mosquitoes of The Philippine Island* (Cagampang-Ramos & Darsie, 1970)**

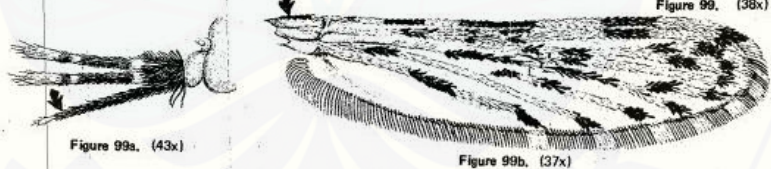
32(28). Subapical dark band of palpi narrow, usually less than one-third as long as apical pale band (Fig. 94); preapical dark spot of wings narrower than pale spots on either side (Fig. 95)\* . . . . . 33

Subapical dark band of palpi usually one-third or more as long as apical pale band (Fig. 96); preapical dark spot of wings broader than pale spots on either side, or if narrower, then presector dark spot on vein R one-half or more as long as that on costa (Fig. 97) . . . . . 34



33(32). Proboscis with subapical pale area (Fig. 98); prehumeral area of costal wing vein with pale scales (Fig. 99) . . . . . *vagus vagus*

Proboscis without subapical pale area (Fig. 99a); prehumeral area of costa all dark scaled (Fig. 99b) . . . . . *vagus limosus*



\*Second character does not apply to most of *vagus vagus* examined.

34(32). Subapical pale band of palpi one-third or less as long as subapical dark band (Fig. 99c) . . . . . *subpictus*

Subapical pale band of palpi usually one-half or more as long as subapical dark band (Fig. 99d) . . . . . *indefinitus*



Figure 99c. (30x)

**Lampiran 4.3 Daftar nama sekuen *An. vagus* dari GenBank yang memiliki kemiripan dengan *Anopheles* dari Bangsring berdasarkan sekuen ITS2**

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<a href="#">Anopheles vagus isolate HT5 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA</a>	1227	1227	98%	0.0	99%	<a href="#">HQ873039.1</a>
<a href="#">Anopheles vagus isolate va5 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA</a>	1214	1214	97%	0.0	99%	<a href="#">EU919718.2</a>
<a href="#">Anopheles vagus 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA</a>	1210	1210	93%	0.0	99%	<a href="#">FJ654649.1</a>
<a href="#">Anopheles vagus genes for 5.8S ribosomal RNA, ITS1, 28S ribosomal RNA, partial sequence, and internal transcribed spacer 2</a>	1192	1192	93%	0.0	99%	<a href="#">AB731658.1</a>
<a href="#">Anopheles vagus 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA</a>	1182	1182	93%	0.0	99%	<a href="#">FJ654648.1</a>
<a href="#">Anopheles sp. MYJ-3 voucher SMMU2003KS23 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA</a>	1177	1177	97%	0.0	98%	<a href="#">AY737080.1</a>
<a href="#">Anopheles vagus 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA</a>	1022	1022	81%	0.0	99%	<a href="#">KT716079.1</a>
<a href="#">Anopheles vagus 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA</a>	998	998	76%	0.0	100%	<a href="#">GQ500122.1</a>

(a)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<a href="#">Anopheles vagus 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA</a>	1110	1110	99%	0.0	99%	<a href="#">FJ654649.1</a>
<a href="#">Anopheles vagus genes for 5.8S ribosomal RNA, ITS1, 28S ribosomal RNA, partial sequence, and internal transcribed spacer 2</a>	1083	1083	99%	0.0	99%	<a href="#">AB731658.1</a>
<a href="#">Anopheles vagus 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA</a>	1083	1083	99%	0.0	99%	<a href="#">FJ654648.1</a>
<a href="#">Anopheles vagus isolate va5 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA</a>	1083	1083	99%	0.0	99%	<a href="#">EU919718.2</a>
<a href="#">Anopheles vagus isolate HT5 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA</a>	1077	1077	99%	0.0	99%	<a href="#">HQ873039.1</a>
<a href="#">Anopheles sp. MYJ-3 voucher SMMU2003KS23 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA</a>	1057	1057	99%	0.0	98%	<a href="#">AY737080.1</a>
<a href="#">Anopheles vagus 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA</a>	998	998	88%	0.0	100%	<a href="#">GQ500122.1</a>

(b)

Gambar 4.3 (a) Daftar nama sekuen *An. vagus* yang memiliki kemiripan dengan *An. vagus* (*query*) dan *An. subpictus* (*query*); (b) Daftar nama sekuen *An. vagus* yang memiliki kemiripan dengan *An. indefinitus* (*query*)

**Lampiran 4.4 Daftar nama sekuen *An. vagus* yang memiliki kemiripan dengan *Anopheles* dari Bangsring berdasarkan sekuen COI**

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<a href="#">Anopheles vagus voucher NSK18 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochon</a>	1127	1127	97%	0.0	97%	<a href="#">JQ915196.1</a>
<a href="#">Anopheles vagus voucher EHI/01-100510 cytochrome c oxidase subunit 1 (COX1) gene, partial cds</a>	1107	1107	98%	0.0	96%	<a href="#">KF564691.1</a>
<a href="#">Anopheles vagus voucher EHI/03-100510 cytochrome c oxidase subunit 1 (COX1) gene, partial cds</a>	1074	1074	95%	0.0	96%	<a href="#">KF564693.1</a>
<a href="#">Anopheles rangeli isolate MPC06-19 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitoch</a>	944	944	99%	0.0	91%	<a href="#">HM022394.1</a>
<a href="#">Anopheles rangeli isolate MG30-1 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochon</a>	944	944	99%	0.0	91%	<a href="#">HM022390.1</a>
<a href="#">Anopheles rangeli isolate MG32-1 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochon</a>	944	944	99%	0.0	91%	<a href="#">HM022391.1</a>
<a href="#">Anopheles rangeli clone AC01_10 mitochondrion, complete genome</a>	939	939	99%	0.0	91%	<a href="#">NC_037786.1</a>
<a href="#">Anopheles rangeli voucher COL182-2 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitoc</a>	939	939	99%	0.0	91%	<a href="#">JX205120.1</a>

(a)

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Subspecies	Similarity (%)	Status
Arthropoda	Insecta	Diptera	Culicidae	<i>Anopheles</i>	<i>vagus</i>		99.11	Private
Arthropoda	Insecta	Diptera	Culicidae	<i>Anopheles</i>	<i>vagus</i>		99.11	Private
Arthropoda	Insecta	Diptera	Culicidae	<i>Anopheles</i>	<i>vagus</i>		99.11	Private
Arthropoda	Insecta	Diptera	Culicidae	<i>Anopheles</i>	<i>vagus</i>		99.11	Private
Arthropoda	Insecta	Diptera	Culicidae	<i>Anopheles</i>	<i>vagus</i>		96.49	Published <a href="#">🔗</a>
Arthropoda	Insecta	Diptera	Culicidae	<i>Anopheles</i>	<i>vagus</i>		95.83	Early-Release
Arthropoda	Insecta	Diptera	Culicidae	<i>Anopheles</i>	<i>vagus</i>		95.73	Published <a href="#">🔗</a>
Arthropoda	Insecta	Diptera	Culicidae	<i>Anopheles</i>	<i>vagus</i>		95.73	Published <a href="#">🔗</a>

(b)

Gambar 4.4 (a) Daftar nama *An. vagus* yang memiliki kemiripan dengan *An. vagus*, *An. indefinitus*, dan *An. subpictus* berdasarkan sekuen DNA pengkode COI pada *GenBank database* ; (b) Daftar nama *An. vagus* yang memiliki kemiripan dengan *An. vagus*, *An. indefinitus*, dan *An. subpictus* (*query sequence*) berdasarkan sekuen DNA pengkode COI pada *BOLD system*