



**KARAKTERISASI MORFOLOGI DAN MOLEKULER  
VEKTOR *DENGUE Aedes aegypti* (L) ASAL KECAMATAN  
PUGER, ARJASA, TEMPUREJO dan KALIWATES**

**SKRIPSI**

Oleh:  
**Nur Hayati**  
**NIM 121810401071**

**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS JEMBER  
2017**



**KARAKTERISASI MORFOLOGI DAN MOLEKULER  
VEKTOR *DENGUE Aedes aegypti* (L) ASAL KECAMATAN  
PUGER, ARJASA, TEMPUREJO dan KALIWATES**

**SKRIPSI**

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

Oleh:  
**Nur Hayati**  
**NIM 121810401071**

**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS JEMBER  
2017**

## PERSEMBAHAN

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala berkah, rahmat, hidayah dan nikmat yang dianugerahkan, shalawat serta salam senantiasa tercurahkan kepada Nabi Muhammad SAW, dengan hati yang tulus skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Ayahanda M. Sholeh dan Ibunda Hartini tersayang, kuucapkan terima kasih sebesar-besarnya atas segala kasih sayang, motivasi, perhatian, dukungan dan doa yang senantiasa diberikan selama ini;
2. Keluarga yang telah memberi semangat dan dorongan selama ini;
3. Guru-guru yang penuh keikhlasan telah mendidik dan memberikan berbagai ilmu pengetahuan baik secara formal maupun informal;
4. Almamater Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

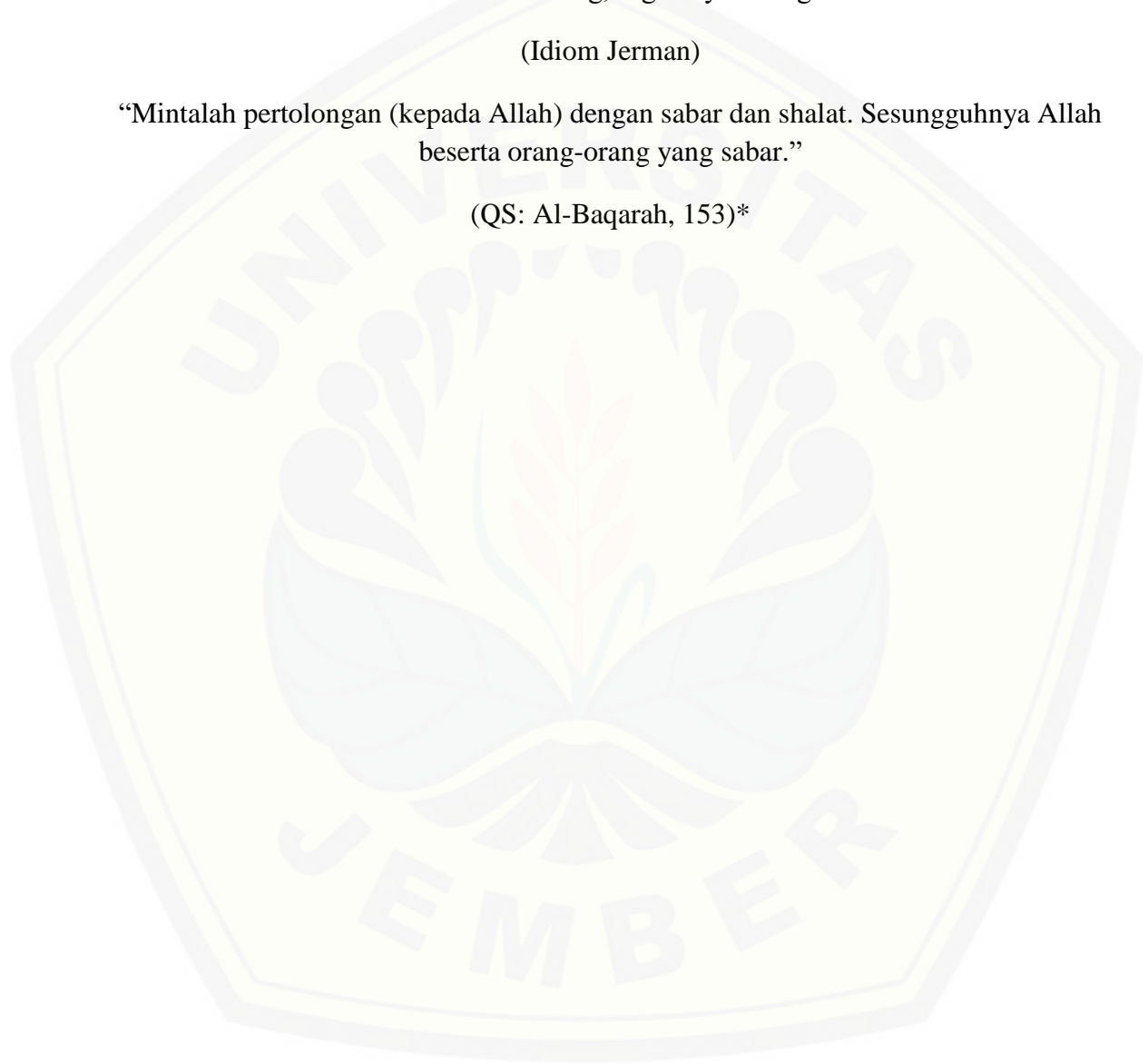
**MOTTO**

“Harta hilang, sedikit yang hilang. Kehormatan hilang, banyak yang hilang.  
Keberanian hilang, segalanya hilang.”

(Idiom Jerman)

“Mintalah pertolongan (kepada Allah) dengan sabar dan shalat. Sesungguhnya Allah beserta orang-orang yang sabar.”

(QS: Al-Baqarah, 153)\*



---

\*<sup>)</sup> Departemen Agama Republik Indonesia, Lajnah Pentashih Mushaf Alquran. 2004. *Al-Qur'an dan terjemahannya*. Bandung: Penerbit Jumanatul Ali-Ar

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Nur Hayati

NIM : 121810401071

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “Karakterisasi Morfologi dan Molekuler Vektor *Dengue Aedes aegypti* (L) asal kecamatan Puger, Arjasa, Kaliwates dan Tempurejo” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum diajukan pada instansi manapun, serta bukan karya jiplakan. Penelitian ini dibiayai oleh Program Hibah Pasca jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam atas nama Dr. rer.nat. Kartika Senjarini, 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 dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 31 Mei 2017

Yang menyatakan,

Nur Hayati

NIM 121810401071

**SKRIPSI**

**KARAKTERISASI MORFOLOGI DAN MOLEKULER VEKTOR *DENGUE*  
*Aedes aegypti* (L) ASAL KECAMATAN PUGER, ARJASA, TEMPUREJO dan  
KALIWATES**

Oleh:  
**Nur Hayati**  
**NIM 121810401071**

**Pembimbing**

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

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “Karakterisasi Morfologi dan Molekuler Vektor *Dengue Aedes aegypti* (L) asal kecamatan Puger, Arjasa, Kaliwates dan Tempurejo” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Jember pada:

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Tim Penguji:

Ketua,

Sekretaris,

Dr. Dra. Rike Oktarianti, M.Si.  
NIP 196310261990022001

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

Anggota I,

Anggota II,

Dr. Hidayat Teguh Wiyono, M. Pd.  
NIP 195805281988021002

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

Mengesahkan

Dekan,

Drs. Sujito, Ph.D.  
NIP 196102041987111001



## RINGKASAN

**Karakterisasi Morfologi dan Molekuler Vektor *Dengue Aedes aegypti* (L) asal kecamatan Puger, Arjasa, Kaliwates dan Tempurejo**, Nur Hayati, 121810401071; 2017; 46 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember

Demam Berdarah *Dengue* (DBD) merupakan penyakit menular yang sebagian besar terjadi di Negara berkembang salah satunya ialah Indonesia. Kasus ini terjadi di sebagian besar wilayah Jawa Timur salah satunya Kabupaten Jember. DBD merupakan penyakit infeksi oleh virus *Dengue* (DENV) yang ditularkan melalui vektor primer yaitu nyamuk *Aedes aegypti* betina melalui proses *bloodfeeding*. Pencegahan dan pengontrolan virus *Dengue* tergantung pada pengendalian terhadap vektor nyamuk tersebut. Pengendalian terhadap vektor *Dengue* telah dilakukan dengan berbagai cara salah satunya *fogging* yang menggunakan insektisida. Penggunaan insektisida yang terus menerus telah menyebabkan nyamuk menjadi resisten. Jika nyamuk telah resisten maka kemampuan beradaptasinya semakin tinggi. Resistensi pada nyamuk kemungkinan besar terjadi karena mutasi pada struktur genetik *Aedes aegypti* yang dapat mempengaruhi keanekaragaman. Semakin tinggi tingkat keanekaragaman genetik organisme, maka semakin dapat menyesuaikan diri terhadap perubahan lingkungan. Populasi *Aedes aegypti* tinggi menunjukkan keanekaragaman genetiknya juga tinggi. Sehingga pengendalian dengan cara apapun tidak akan efisien. Pada penelitian ini dilakukan Karakterisasi morfologi dan molekuler dari *Aedes aegypti* asal kecamatan Puger, Arjasa, Tempurejo dan Kaliwates.

Alur penelitian yang dilakukan pada penelitian ini antara lain *landing* larva nyamuk *Aedes aegypti* pada masing-masing kecamatan Puger, Arjasa, Tempurejo dan Kaliwates. Koleksi dan *rearing* skala laboratorium, karakterisasi morfologi dan



identifikasi spesies nyamuk dewasa *Aedes aegypti*, ekstraksi DNA genom dari larva *isofemale* instar IV, dan amplifikasi PCR DNA ITS2 *Aedes aegypti*.

Hasil penelitian menunjukkan karakter morfologi larva dan nyamuk dewasa *Aedes aegypti* asal keempat kecamatan menunjukkan hasil yang sama. Larva *Aedes aegypti* memiliki karakter morfologi yaitu terdapat sepasang rambut pada bagian kepala (*cephal*), terdapat duri yang panjang pada dada, dan bagian perut (abdomen) mempunyai corong udara (*siphon*) yang terdapat sepasang rambut pada segmen terakhir. Kemudian karakter morfologi nyamuk *Aedes aegypti* yaitu pada bagian skutum terdapat dua garis putih sejajar di bagian dorsal tengah yang diapit oleh dua garis lengkung putih, dan pada bagian anterior kaki *Aedes aegypti* di bagian femur kaki tengah terdapat strip putih yang memanjang. Vektor *Dengue Aedes aegypti* betina memiliki sepasang antena *pilose* (berambut panjang), ukuran *palpus maxilaris* lebih pendek dari pada proboscisnya dan memiliki sayap yang lebih panjang daripada sayap *Aedes aegypti* jantan. Sedangkan karakter molekuler yaitu berdasarkan marker molekuler sekuen DNA pengkode ITS2 (*Internal Transcribed Spacer 2*) nyamuk *Aedes aegypti* asal keempat kecamatan tersebut memiliki ukuran yang sama yaitu perkiraan sebesar ~380 pb.

## PRAKATA

Puji Syukur kehadiran Allah S.W.T yang telah memberikan limpahan rahmat, nikmat serta hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyusun dan menyelesaikan skripsi yang berjudul “Karakterisasi Morfologi dan Molekuler Vektor *Dengue Aedes aegypti* (L) asal kecamatan Puger, Arjasa, Kaliwates dan Tempurejo”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penyusunan Skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis menyampaikan terimakasih kepada :

1. Dr. rer.nat Kartika Senjarini, S.Si., M.Si selaku Ketua *research group* TBV sekaligus Dosen Pembimbing yang selalu memberikan nasihat, bimbingan dan motivasi kepada penulis;
2. Dr. Dra. Rike Oktarianti, M.Si Selaku Dosen Pembimbing Utama dan pemilik proyek yang selalu memberikan arahan dan bimbingan dengan penuh kesabaran;
3. Prof. Dr. Bambang Sugiharto, S.Si, M.AgrSc dan Dr. Hidayat Teguh Wiyono, M.Pd selaku Dosen Penguji yang telah memberikan kritik dan saran dalam penulisan skripsi ini;
4. Dra. Eva tyas utami, M.Si dan Esti Utarti, S.P., M.Si selaku bunda di kampus Universitas Jember yang telah banyak memberikan nasihat dan dukungan penulis selama ini;
5. Bapak dan Ibu tersayang di rumah, atas dukungan semangat, doa dan material yang telah diberikan selama ini;
6. Teman-teman grup riset TBV, protein grup (whenny, alfan dan febri), Anopheles grup (Habib, Imro’atul, MbK subel, MbK dewi, Mbak esty, Bu

dyah), DNA grup (Mbak Zaky & Mbak Ama) atas bantuan, semangat dan kebersamaannya yang tak terlupakan;

7. Personil kontrakan Bidadari Putri Y, Dwi Erlinda, Didin khab, Umi W atas kekocakan dan kekompakan yang selalu menghibur penulis;
8. Semua teman seangkatan 2012 BIOZVA, atas dukungan dan kekompakannya selama ini, 2012 Te O Pe lah!!!!
9. Tiga abang dan keluarganya serta adik cowok yang selalu mendukung dan memberi semangat “4 5” pada penulis dimanapun berada.
10. Semua sahabat yang selalu berproses mencari pengalaman,

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 31 Mei 2017

Penulis

Nur Hayati

DAFTAR ISI

	Halaman
PERSEMBAHAN.....	iii
MOTTO .....	iv
PERNYATAAN.....	v
SKRIPSI.....	vi
PENGESAHAN.....	vii
RINGKASAN .....	viii
PRAKATA .....	x
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
<b>BAB 1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Tujuan.....	3
1.4 Batasan Masalah.....	3
1.5 Manfaat.....	4
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>5</b>
2.1 DBD dan Virus <i>Dengue</i> .....	5
2.2 Karakteristik Morfologi Vektor nyamuk <i>Aedes aegypti</i> .....	7
2.3 Keanekaragaman Genetik <i>Aedes aegypti</i> (L) .....	11

2.4	ITS2 Sebagai Marker Molekuler Filogeni Insekta .....	12
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN.....</b>		<b>14</b>
3.1	Tempat dan Waktu Penelitian .....	14
3.2	Alat dan Bahan .....	14
3.3	Prosedur Penelitian.....	14
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>		<b>18</b>
4.1	Karakter morfologi <i>Aedes aegypti</i> dengan nyamuk vektor lain .....	18
4.2	Karakter molekuler <i>Aedes aegypti</i> .....	24
<b>BAB 5. PENUTUP.....</b>		<b>27</b>
5.1	Kesimpulan.....	27
5.2	Saran .....	27
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>		<b>28</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>		<b>32</b>
Lampiran A. Komposisi Bahan .....		32
Lampiran B. Rumus regresi dan perhitungan manual berat molekul DNA produk PCR .....		33

DAFTAR GAMBAR

	<b>Halaman</b>
Gambar 2.1 Distribusi global pada serotip virus <i>Dengue</i> .....	6
Gambar 2.2 Morfologi bagian dorsal nyamuk dewasa <i>Aedes aegypti</i> betina .....	8
Gambar 2.3 Perbedaan skutum pada punggung dan kaki nyamuk <i>Aedes aegypti</i> dan <i>Aedes albopictus</i> .....	9
Gambar 2.4 Struktur kepala nyamuk .....	9
Gambar 2.5 Siklus hidup nyamuk <i>Aedes aegypti</i> .....	10
Gambar 2.6 Konstruksi sekuen pengkode ITS 2 .....	12
Gambar 4.1 Morfologi Larva <i>Aedes aegypti</i> .....	19
Gambar 4.2 Perbedaan skutum <i>Aedes aegypti</i> dan <i>Aedes albopictus</i> .....	19
Gambar 4.3 Perbedaan antena, proboscis dan palpus maksilaris <i>Aedes aegypti</i> jantan dan <i>Aedes aegypti</i> betina.....	20
Gambar 4.4 Sayap dan kaki <i>Aedes aegypti</i> .....	21
Gambar 4.5 Antena, proboscis, palpus maksilaris dan sayap <i>Aedes aegypti</i> betina .....	22
Gambar 4.6 Antena, proboscis dan palpus maksilaris <i>Aedes aegypti</i> jantan .....	23
Gambar 4.7 Hasil isolasi DNA Genom <i>Aedes aegypti</i> .....	24
Gambar 4.8 Amplifikasi PCR gen ITS2 <i>Aedes aegypti</i> .....	25



## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Demam Berdarah *Dengue* (DBD) merupakan penyakit menular yang sebagian besar terjadi di Negara berkembang. DBD telah menjadi masalah yang muncul setiap tahun di Indonesia (Depkes, 2005). Kasus ini terjadi di sebagian besar wilayah Jawa Timur salah satunya Kabupaten Jember. Data Dinas Kesehatan (Dinkes) Jember melaporkan bahwa Kejadian Luar Biasa (KLB) akibat penyakit DBD terjadi tiap tahunnya. Tahun 2015 penderita DBD mencapai 228 orang dengan lima diantaranya meninggal. Sedangkan tahun 2016 sebanyak 197 pasien positif DBD dan 3 Orang diantaranya meninggal dunia. Penderita positif DBD berasal dari kecamatan Sumbersari, Patrang, Kaliwates, Puger, Kencong dan Gumukmas ([www.republika.co.id/berita/nasional/daerah](http://www.republika.co.id/berita/nasional/daerah)).

DBD merupakan penyakit infeksi oleh virus *Dengue* (DENV) (Wijayanti *et al.*, 2016). Virus *Dengue* tergolong dalam genus flavivirus famili flaviridae dan diklasifikasikan kedalam 4 serotip yaitu DENV 1, DENV 2, DENV 3 dan DENV 4 (Kyle dan Haris, 2008). Penularan virus *Dengue* terjadi melalui vektor primer yaitu nyamuk *Aedes aegypti* (Bhatt *et al.*, 2013) dan vektor sekunder yaitu nyamuk *Aedes albopictus* (Rahan, 2016). Oleh karena itu, pencegahan dan pengontrolan virus *Dengue* tergantung pada pengendalian terhadap vektor nyamuk tersebut (Louise *et al.*, 2015).

Pengendalian terhadap vektor *Dengue* telah dilakukan dengan berbagai cara seperti gerakan 3M (Menutup, menguras dan men gubur), pemberantasan jentik dengan cara abatisasi dan pengasapan masal (*fogging*). Namun pengendalian tersebut masih kurang efektif karena kurangnya kesadaran masyarakat dan monitoring dari Departemen Kesehatan, serta efeknya dapat mengakibatkan flora maupun fauna non target mati dan timbulnya resistensi terhadap nyamuk. Setiap pengendalian dengan



kurangnya efisiensi strategi maka tingginya vektor *Dengue* masih terjadi setiap tahunnya.

Penggunaan insektisida yang terus menerus telah menyebabkan nyamuk menjadi resisten. Jika nyamuk telah resisten maka kemampuan beradaptasinya semakin tinggi. Resistensi pada nyamuk kemungkinan besar terjadi karena mutasi pada struktur genetik *Aedes aegypti* yang dapat mempengaruhi keanekaragaman. Hasil temuan dari Huber (2008) diketahui bahwa faktor yang dapat mempengaruhi struktur genetik *Aedes aegypti*, antara lain kondisi lingkungan, kepadatan vektor (populasi nyamuk) dan aktivitas manusia.

Keterkaitan antara keanekaragaman genetik dengan adaptasi untuk lulus hidup sangat menunjang peningkatan suatu populasi organisme. Semakin tinggi tingkat keanekaragaman genetik organisme, maka semakin dapat menyesuaikan diri terhadap perubahan lingkungan (Munif *et al.*, 2011). Sehingga *Aedes aegypti* mempunyai pertahanan hidup yang lebih tinggi dibandingkan dengan organisme yang memiliki keanekaragaman genetik yang rendah. Hal tersebut menyebabkan Populasi *Aedes aegypti* semakin tinggi dan kemampuan mentransmisikan patogen (DENV) terhadap manusia juga semakin tinggi karena adanya kontak secara langsung antara nyamuk dengan manusia (Sim *et al.*, 2013).

Karakterisasi molekuler *Aedes aegypti* dapat dilakukan dengan menggunakan marker. Metode berbasis marker molekuler yang biasa digunakan pada analisis genetik nyamuk *Aedes aegypti* diantaranya adalah *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), metode *Enrichment* (Ashraf, Zahoor, Nasir, Naz, & Zahoor, 2015). *12 well-established microsatellite loci* (Monteiro *et al.*, 2014), *Single-Nucleotide Polymorphism* (SNP) (Evans *et al.*, 2015). Amplifikasi DNA pengkode *mitochondrial cytochrome oxidase 1* (CO1) (Beebe *et al.*, 2005) dan ITS2 (S. Chen *et al.*, 2010).

*Internal Transcribed Spacer2* (ITS2) adalah marker filogenetik yang digunakan untuk klasifikasi pada tingkat umum bahkan khusus dengan penyusunan sekuennya yang komparabel pada eukaryotik (Schultz *et al.*, 2006). Marker ITS2 digunakan karena mempunyai sekuen yang pendek, sehingga relative mudah untuk

diampilifikasi serta struktur sekundernya dapat dibandingkan dengan karakter homologinya dan dapat diketahui kesalahannya (Miao *et al*, 2008).

Kecamatan Puger, Arjasa, Tempurejo dan Kaliwates merupakan daerah endemik DBD. Adanya peningkatan pasien positif DBD di daerah tersebut dapat diketahui bahwa pengendalian vektor *Dengue* masih belum efisien, sedangkan resistensi vektor semakin tinggi akibat paparan insektisida membuat keanekaragaman genetiknya juga semakin tinggi. Karakterisasi morfologi dan molekuler dilakukan untuk mengetahui keterkaitan antara keanekaragaman genetik *Aedes aegypti* dengan pengendalian vektor *Dengue* di kecamatan tersebut, sehingga dapat berkontribusi dalam upaya evaluasi efisiensi pengendalian vektor secara tepat.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Karakterisasi morfologi dan molekuler vektor *Dengue Aedes aegypti* asal kecamatan Puger, Arjasa, Tempurejo dan Kaliwates belum ada publikasi. Sementara itu, data tersebut sangat penting untuk evaluasi terkait efisiensi strategi pengendalian vektor. Resistensi vektor *Dengue Aedes aegypti* terbukti dipengaruhi oleh keanekaragaman morfologi dan molekuler.

## **1.3 Tujuan**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakter morfologi dan molekuler vektor *Dengue Aedes aegypti* asal kecamatan Puger, Arjasa, Tempurejo dan Kaliwates.

## **1.4 Batasan Masalah**

Penelitian karakterisasi molekuler vektor *Dengue Aedes aegypti* asal kecamatan Puger, Arjasa, Tempurejo dan Kaliwates dilakukan menggunakan marker molekuler *Internal Transcribed Spacer 2* (ITS2).

### **1.5 Manfaat**

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi data keanekaragaman genetik berbasis marker molekuler, yang dapat dijadikan dasar dalam pengendalian vektor *Dengue* khususnya di Kabupaten Jember.



## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 DBD dan Virus *Dengue*

DBD merupakan salah satu masalah kesehatan masyarakat dan sering menimbulkan Kejadian Luar Biasa (KLB) dengan kematian yang besar. Berdasarkan pernyataan WHO (2009) sebanyak 1,8 miliar (lebih dari 70 %) dari populasi dunia beresiko terkena demam berdarah. Beberapa Negara yang menanggung hampir 75 % dari beban penyakit ini adalah Asia tenggara dan pasifik barat dengan laporan kasus tingkat kematian untuk dua daerah tersebut sekitar 1%, namun di India, Indonesia dan Myanmar, wabah lokal jauh dari daerah perkotaan telah melaporkan kasus fatalitas mencapai 3-5 %.

Di Asia Tenggara termasuk Indonesia, epidemi DBD merupakan penyebab utama morbiditas dan mortalitas pada anak-anak. Hasil studi epidemiologi menunjukkan penyakit ini terutama dijumpai pada umur antara 2 – 15 tahun dan tidak ditemukan perbedaan signifikan dalam kerentanan terhadap serangan DBD antar *gender*. Di masa yang akan datang, peluang penyebaran DBD masih terus meningkat sehubungan dengan kendala pemberantasan vektor (*Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus*) dan mobilitas manusia yang semakin tinggi antar Negara (Ata Maran, Nurjazuli, & Suhartono, 2013).

Peningkatan mortalitas penduduk hingga menjadi Kejadian Luar Biasa (KLB) akibat penyakit DBD tidak lepas dari peran beberapa faktor. Hal ini berkaitan dengan banyak faktor, antara lain : yang pertama adalah faktor virologis yaitu virus *Dengue* sebagai agen penyakit. Faktor yang kedua adalah manusia sebagai *host*. Faktor ini sangat dipengaruhi oleh kepadatan populasi, mobilitas, imunitas dan proporsi viremik. Faktor ketiga yang mempengaruhi KLB DBD adalah faktor vektor. Kepadatan dan bionomik nyamuk *Aedes* spp. sangat berpengaruh dalam KLB DBD. Keempat adalah faktor lingkungan (klimatologis) yaitu ketinggian dari permukaan laut, curah hujan, angin, kelembaban dan musim (Prasetyowati & Astuti, 2010).



Gambar 2.1 Distribusi global pada serotip virus *Dengue* (Gubler, 2011).

Virus *Dengue* merupakan anggota genus *Flavivirus* dan famili *Flaviridae*. Virus *Dengue* tergolong dalam kelas IV yaitu virus dengan genom asam ribonukleat (RNA) positif. Virus *Dengue* dibagi menjadi 4 serotipe, antara lain DENV 1, DENV 2, DENV 3 dan DENV 4 (Gubler, 1997). Pada tahun 1970-an virus *Dengue* mulai dikenal di Asia. DENV 1 dikenal pada tahun 1977, diikuti oleh DENV 2 dan-4 pada tahun 1981, dan DENV 3 tahun 1994. Kemudian beberapa strain masing-masing serotipe diperkenalkan hingga keempat serotip menjadi endemik. Akhirnya epidemi DBD muncul dan saat ini mempengaruhi sebagian besar wilayah. Peta geografi dari sebaran virus *Dengue* 1,2,3 dan 4. Distribusi global *Dengue* dapat dilihat pada gambar 2.1.

Virus *Dengue* masuk ke dalam tubuh manusia lewat *bloodfeeding* nyamuk betina *Aedes aegypti* atau *Aedes Albopictus*. Organ sasaran dari virus adalah organ RES (*Retikulo-Endotelial System*) meliputi sel kuffer hepar, endotel pembuluh darah, nodus limfaticus, sumsum tulang serta paru-paru. Data dari berbagai penelitian menunjukkan bahwa sel-sel monosit dan makrofag mempunyai peranan besar pada infeksi ini. Dalam peredaran darah, virus tersebut akan difagosit oleh sel monosit perifer. Virus DEN mampu bertahan hidup dan mengadakan multifikasi di dalam sel tersebut. Infeksi virus *Dengue* dimulai dengan menempelnya virus genom masuk ke



dalam sel dengan bantuan organel organel sel, genom virus membentuk komponen-komponennya, baik komponen perantara maupun komponen struktural virus. Setelah komponen struktural dirakit, virus dilepaskan dari dalam sel. Proses perkembangan biakan virus DEN terjadi di sitoplasma sel (Soegijanto, 2004).

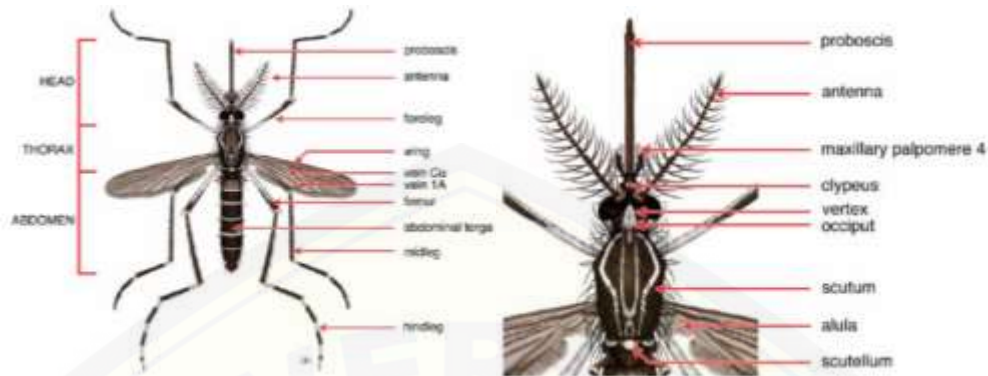
## 2.2 Karakteristik Morfologi Vektor nyamuk *Aedes aegypti*

Karakteristik morfologi Nyamuk *Aedes aegypti* L. dewasa memiliki ukuran sedang (panjang 3 – 4 mm) dengan tubuh berwarna hitam kecoklatan. Tubuh dan tungkainya ditutup sisik dengan garis-garis putih keperakan. Dibagian punggung (dorsal) tubuhnya tampak dua garis melengkung vertikel di bagian kiri dan kanan yang menjadi ciri species ini. Sisik pada tubuh nyamuk pada umumnya mudah terlepas sehingga menyulitkan identifikasi pada nyamuk dewasa (Rueda, 2004).

Adapun kedudukan taksonomi *Aedes aegypti* sebagai berikut :

Kerajaan	: Animalia
Filum	: Arthropoda
Kelas	: Insecta
Ordo	: Diptera
Familia	: Culicidae
Subfamilia	: Culicinae
Genus	: Aedes
Spesies	: <i>Aedes aegypti</i> L. (Borror <i>et al.</i> , 1992)

Ukuran dan warna nyamuk jenis ini sering berbeda antar populasi, tergantung dari kondisi lingkungan dan nutrisi yang diperoleh nyamuk selama mengalami perkembangan. Nyamuk jantan dan betina pada dasarnya tidak memiliki perbedaan, dalam hal ukuran nyamuk jantan umumnya lebih kecil dari pada nyamuk betina. Nyamuk jantan mempunyai rambut tebal pada antena (Nugroho, 2013). Morfologi bagian dorsal nyamuk dewasa *Aedes aegypti* betina dapat dilihat pada gambar 2.2



Gambar 2.2 Morfologi bagian dorsal nyamuk dewasa *Aedes aegypti* betina (Rueda, 2004).

*Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus* termasuk ke dalam Genus *Aedes* dari Famili Culicidae. *Aedes* Secara morfologis keduanya sangat mirip, namun dapat dibedakan dari strip putih yang terdapat pada bagian skutumnya. Skutum *Aedes aegypti* berwarna hitam dengan dua strip putih sejajar di bagian dorsal tengah yang diapit oleh dua garis lengkung berwarna putih. Sedangkan skutum *Aedes albopictus* yang juga berwarna hitam hanya berisi satu garis putih tebal di bagian dorsalnya. Sedangkan anterior pada kaki *Aedes aegypti* bagian femur kaki tengah terdapat strip putih memanjang dan pada *Aedes albopictus* tanpa strip putih memanjang. Morfologi perbedaan skutum dorsal dan kaki pada *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus* dapat dilihat pada gambar 2.3 (Rahayu & Ustiawan, 2013).



(a) Skutum *Aedes aegypti*; (b). Skutum *Aedes Albopictus*; (c) Kaki *Aedes aegypti*; (d) Kaki *Aedes albopictus*

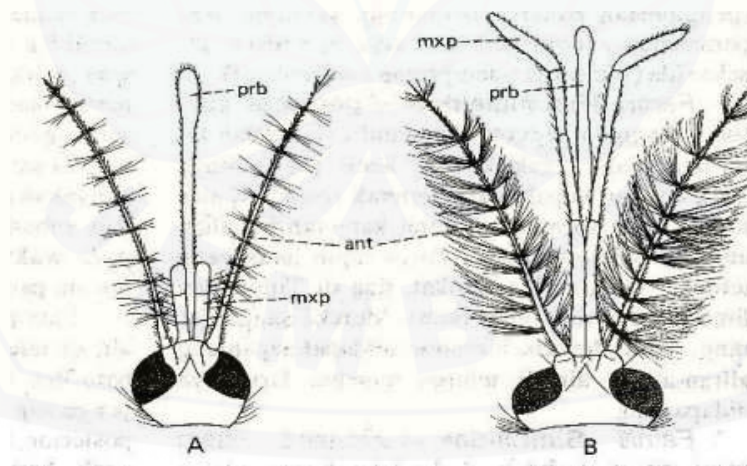
Gambar 2.3 Perbedaan skutum pada punggung dan kaki nyamuk *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus* (Rahayu & Ustiawan, 2013)



Nyamuk betina memiliki sayap lebih besar dan bervariasi dibandingkan dengan sayap laki-laki (Jirakanjanakit *et al.*, 2008). Pada bagian kepala terdapat sebuah *proboscis*, sepasang antena yang terdiri dari 15 segmen, sepasang *palpus maxilaris* yang terdiri dari 4 segmen, sepasang mata majemuk dan bulu *clypeus proboscis* berfungsi untuk alat menghisap darah pada betina, sedangkan pada nyamuk jantan berfungsi untuk menghisap cairan sukrosa (Rahayu & Ustiawan, 2013).

Untuk membedakan antara jantan dan betina dilihat dari sepasang antenanya. Pada nyamuk jantan terdapat antena *plumous* (berambut lebar) sedangkan pada nyamuk betina terdapat antena *pilose* (berambut panjang). Selain itu dapat dilihat pada ukuran *palpus maxilaris*. Pada nyamuk betina lebih pendek dari pada proboscisnya, dan pada nyamuk jantan lebih panjang proboscisnya. Struktur kepala pada nyamuk *Aedes aegypti* dapat dilihat pada gambar 2.4

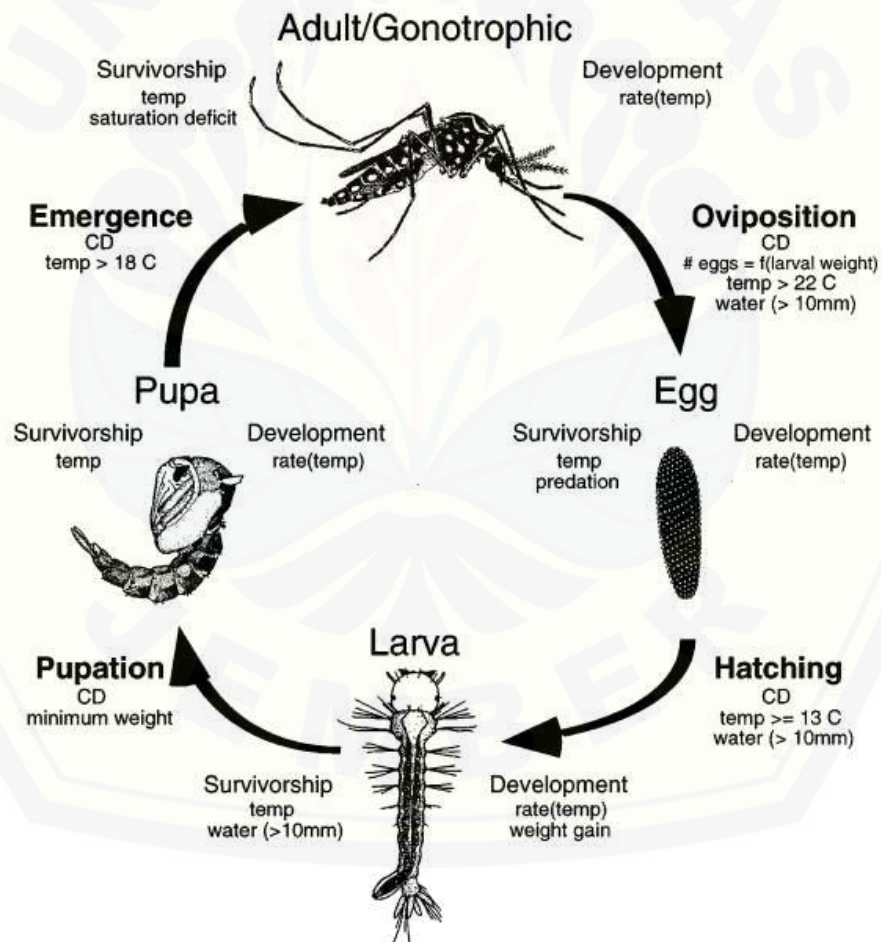
Semua jenis serangga yang termasuk dalam famili Culicidae membutuhkan air untuk kelangsungan hidup karena larva-larva nyamuk melanjutkan hidupnya di air dan hanya bentuk dewasa yang hidup di darat. Nyamuk betina biasanya memilih tipe air tertentu untuk meletakkan telurnya (Sembel, 2009).



(A) *Aedes aegypti* betina; (B) *Aedes aegypti* jantan; *ant* : antena, *mxp* : palpus maksilaris, *prb* : proboscis

Gambar 2.4 Struktur kepala nyamuk (Borror *et al*, 1992).

Menurut Baharuddin (2015) karakteristik *breeding places*, kepadatan nyamuk dan pertumbuhan larva nyamuk *Aedes aegypti* tidak hanya pada air bersih saja, namun larva nyamuk dapat tumbuh pada beberapa jenis air seperti air hujan, air sumur gali, air selokan dan air PAM. Telur nyamuk menetas dalam air dan menjadi larva atau jentik. Larva-larva nyamuk hidup dengan memakan organisme-organisme kecil. Setelah dewasa nyamuk betina harus menghisap darah manusia atau hewan lain seperti kuda, sapi, babi, dan burung dalam jumlah yang cukup untuk perkembangan telurnya yang dapat diamati pada gambar 2.7. Bila tidak mendapatkan cairan darah yang cukup, nyamuk betina ini akan tidak memproduksi telur (Sembel, 2009).



Gambar 2.5 Siklus hidup nyamuk *Aedes aegypti* (Hopp dan faley, 2001).

Perilaku *Aedes aegypti* mengisap darah lebih banyak di dalam rumah pada pukul 10:00-11:00 dan pukul 16:00- 17:00. Kondisi tersebut terjadi karena nyamuk *Aedes aegypti* bersifat antropofilik dan endofagik (Fadilla, Hadi, & Setiyaningsih, 2015). Nyamuk *Aedes* spp. memiliki perilaku menghisap darah lebih dari satu orang (*multiple bite*), sehingga perilaku ini dapat meningkatkan keefektifan penyebaran virus *Dengue* (WHO 2004). Nyamuk *Aedes aegypti* dominan di daerah perkotaan dan hidup di dalam rumah (Perich *et al.*, 2010).

### 2.3 Karakterisasi Molekuler *Aedes aegypti* (L)

Karakterisasi molekuler pada *Aedes aegypti* dapat dilakukan dengan beberapa metode yaitu metode RAPD (*Random Amplified polymorphic DNA*), *microsatellites* dan DNA mitokondria (CO1 dan ND4). Hasil analisis menggunakan metode RAPD oleh Ashraf *et al* (2015) bahwa populasi *Aedes aegypti* koleksi kota Faisalabad dan Lahore dianalisis oleh RAPD-PCR yang menggunakan 10 primer oligonukleotida menghasilkan pola struktur genetik yang berbeda. Namun terdapat beberapa daerah dari kedua kota tersebut menunjukkan kesamaan genetik. Hal tersebut dipengaruhi oleh aktivitas transportasi manusia.

Costa-da-Silva, Capurro, & Bracco (2005) menemukan perbedaan pola genetik pada populasi *Aedes aegypti* di Peru menggunakan DNA mitokondria. Heterogenitas populasi *Aedes aegypti* yang menggunakan penanda mikrosatelit di Myanmar, Kamboja, Thailand, Sri Lanka dan Nigeria memiliki variasi genetik dalam jarak 500 m dan kesamaan genetik di lokasi yang jauh pada daerah pengamatan (Hlaing *et al.*, 2010).

Berdasarkan karakterisasi molekuler dapat diketahui keanekaragaman genetik *Aedes aegypti*. Keanekaragaman genetik merupakan gambaran tingkat keragaman dalam suatu populasi dan banyak digunakan untuk melakukan studi kekerabatan diantara spesies (Soemantri, *et al.*, 2001). *Aedes aegypti* adalah serangga yang hidup di iklim tropis dan subtropis. Nyamuk ini merupakan salah satu vektor yang paling

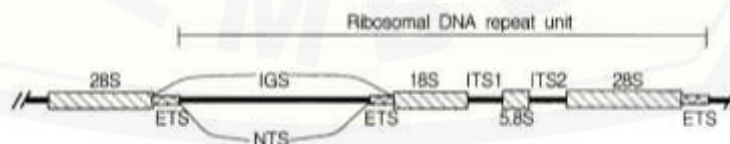
efisien untuk arbovirus, karena nyamuk bersifat antropofilik dan hidup dekat manusia dan banyak ditemukan di dalam rumah (World Health Organization, 2009).

Nyamuk *Aedes aegypti* mempunyai dua subspecies yaitu *Aedes aegypti queenslandensis* dan *Aedes aegypti formosus*. Subspecies pertama hidup bebas di Afrika, sedangkan subspecies kedua hidup di daerah tropis yang dikenal efektif menularkan virus DBD. Subspecies kedua lebih berbahaya dibandingkan subspecies pertama (Knowlton *et al.*, 2009).

Keanekaragaman genetik nyamuk *Aedes aegypti formosus* di Afrika diketahui lebih tinggi populasinya dibandingkan dengan nyamuk domestik tropis *Aedes aegypti*. Hal tersebut dipengaruhi oleh habitat manusia yang memberikan dasar ekologi nyamuk untuk menjadi subspecies yang sangat invasif. Aktivitas manusia mendukung terjadinya invasi *Aedes aegypti* di seluruh dunia baik daerah tropis maupun subtropis (Brown *et al.*, 2015).

#### 2.4 ITS2 Sebagai Marker Molekuler Filogeni Insekta

Internal Transcribed spacer 2 (ITS2) adalah bagian dari eukariotik rDNA cistron yang terletak di antara 5.8S dan 28S rRNA. Sekuen yang menunjukkan divergenitas tinggi antar spesies. Sehingga marker tersebut dapat digunakan penanda untuk analisis filogenetik tingkat rendah. Namun, ketika membandingkan struktur molekul RNA ini, ITS 2 dapat ditemukan antara spesies yang berbeda mulai dari vertebrata, fungi, ganggang hijau dan tanaman tinggi (Joseph, N *et al.*, 1999). Berikut adalah konstruksi sekuen pengkode ITS 2,



IGS= *Intergenic spacer*

NTS= *non transcriber spacer*

ETS = *External transcriber spacer*

ITS = *Internal transcriber spacer*

Gambar 2.6 Konstruksi sekuen pengkode ITS 2 (Hwang & Kim, 1999).



Pada gambar 2.8 rDNA inti eukariot terdapat sekuen gen yang *conserved* yaitu gen penyandi untuk komponen RNA ribosom 18S, 5.8S dan 28S. Di antara sekuen penyandi tersebut dipisahkan oleh spacer (pembatas), yaitu daerah yang disebut *Internal Transcribed Spacer* (ITS1 dan ITS2) Sekuen rDNA daerah ITS berkembang lebih cepat dan memungkinkan terjadinya keragaman diantara spesies maupun populasi (Ana *et al.*, 2015).

Menurut Banerjee, Arora, & Murty (2007) hasil analisis keanekaragaman genetik berdasarkan sekuen DNA pengkode ITS2 pada nyamuk *Aedes* dan *Anopheles* tidak berbeda jauh. Perbedaan dijumpai pada tingkat sekuen dan bagian eksterior loop. Sedangkan persamaan kedua nyamuk tersebut terletak pada struktur sekunder dan bagian interior loop. *Aedes* memiliki struktur genetik lebih lestari (*conserved*) dibandingkan *Anopheles*. Oleh karena itu *Aedes* lebih bervariasi dan lebih mudah beradaptasi.

Sekuan DNA pengkode (*Barcoding area*) yang ideal adalah sekuen yang pendek. Analisis yang telah dilakukan pada tanaman menggunakan sekuen DNA pengkode ITS2 yang dibandingkan dengan sekuen DNA pengkode ITS memiliki variabilitas sekuen yang tinggi yaitu 12861 sampel dari 8313 spesies. Sehingga sekuen DNA pengkode ITS2 direkomendasikan sebagai DNA barcode yang umum (*universal DNA barcode*) (S. Chen *et al.*, 2010).

Studi polimorfisme menggunakan sekuen pengkode ITS 2 pada *yeast* menunjukkan keakuratan hingga 99% dengan jumlah 40 spesies (Y. C. Chen *et al.*, 2001). ITS 2 pada seluruh eukariotik ditemukan lebih dari 5000 urutan dengan struktur inti ITS 2, yang dapat disejajarkan secara otomatis. Oleh karena itu, marker ITS 2 menjadi sumber yang penting untuk studi filogenetik lanjut dan dapat digunakan untuk marker filogenetik pada tingkat mega sistematik (Schultz *et al.*, 2005).

## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni 2016 sampai April 2017 dan dilaksanakan di laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

### 3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain tray, pipet nyamuk, autoklaf, Erlenmeyer, mikroskop stereo, gelas ukur, eppendorf 1,5 ml, mikropipet (20 $\mu$ l, 200 $\mu$ l, 1000 $\mu$ l), mikropistol, beaker glass, vortek, neraca analitik, pH meter, sentrifuge berpendingin, freezer -20 $^{\circ}$ C, microtube 1,5 ml, UV gel transilluminator, mesin PCR, dan mesin sekuensing.

Adapun bahan-bahan yang digunakan antara lain larva nyamuk *Aedes aegypti*, 500  $\mu$ l *Homogenizing buffer*, 40  $\mu$ l SDS 20 %, 8 $\mu$ l dari 20 mg/ml Proteinase-K, 300  $\mu$ l dari 6M NaCl, isopropanol *equal volume*, 70% ethanol, ddH<sub>2</sub>O, loading dye, 2  $\mu$ l DNA Template, 8  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O steril, 12,5  $\mu$ l PCR master mix (intron), 2,5  $\mu$ l primer ITS 2 (10 pmol/  $\mu$ l, konsentrasi akhir 10 pmol/  $\mu$ l), 1% agarose gel electrophoresis, SDS 20 %, Buffer TAE (Tris Acetid EDTA) 1x, EtBr (Ethidium Bromide), 1 % gel agarose, Aquadest, 0,01 % satu unit *thermoprime plus DNA polymerase*, 1,25  $\mu$ l forward dan reverse primer 5,8f (5 pmol/  $\mu$ l, konsentrasi akhir 0,25 pmol/  $\mu$ l) dan 2  $\mu$ l ekstrak DNA, DNA ladder 1kb sebagai marker, 200  $\mu$ l buffer NT, buffer NT3, dan 15-50  $\mu$ l buffer NE (5 mM Tris/HCL, pH 8,5).

### 3.3 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian yang dilakukan sebagai berikut :

#### 3.3.1 Preparasi Alat dan Bahan

Alat-alat yang berbahan *glassware* dan *plasticware* disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 120°C selama 30 menit. Sebelum memulai pekerjaan seluruh lingkungan seperti meja kerja, tangan dan jas lab dalam keadaan bersih dan steril.

### 3.3.2 Koleksi Sampel Larva dan Rereang nyamuk *Aedes aegypti*

Koleksi sampel larva nyamuk *Aedes aegypti* di lakukan di kecamatan Puger, Arjasa, Kaliwates dan Tempurejo. Pengambilan sampel dilakukan pada habitat nyamuk *Aedes aegypti* yaitu di tempat perindukan (*breeding places*). Tempat perindukan yang banyak ditemukan larva nyamuk *Aedes aegypti* yaitu di tempat penampungan air untuk keperluan sehari-hari dan barang-barang lain yang memungkinkan air tergenang dan tidak beralaskan tanah, misalnya bak mandi/WC, tempayan, drum, tempat minum burung, vas bunga/pot tanaman air, dan lain-lain (Baharuddin dan Rahman, 2015). Koleksi larva dibesarkan (*rearing*) skala laboratorium sampai keturunan *isofemale*.

### 3.3.3 Identifikasi larva dan nyamuk dewasa *Aedes aegypti*

Larva nyamuk *Aedes aegypti* diperoleh dari kecamatan Puger, Kaliwates, Arjasa dan Tempurejo diidentifikasi pada saat instar IV yang berdasarkan pada Zootaxa : *Pictorial keys for the identification of mosquitoes (Diptera : Culicidae) associated with Dengue Virus Transmission* (Rueda, 2004).

### 3.3.4 Ekstraksi DNA Genom nyamuk *Aedes aegypti*

DNA diekstraksi dari nyamuk menggunakan metode *Salting out Extraction*. Prinsip dasar dari metode ini adalah melisis sel *whole body* nyamuk, membuang protein, dan presipitasi DNA Genom *Aedes aegypti* (Maurya, Kumar, & Sundar, 2013). Sebanyak lima larva nyamuk *Aedes aegypti* dimasukkan dalam tabung eppendorf 1,5 ml dan disimpan pada suhu -20°C selama 10 menit. Larva beku diekstraksi dengan cara ditambahkan 500 µl *homogenizing buffer* dan dihomogenkan menggunakan mikropistil, ditambahkan 40 µl SDS 20 % dan 8 µl dari 20 mg/ml



proteinase K dan diinkubasi pada 65°C *overnight*. Kemudian suspensi ditambahkan 300 µl NaCl 6 M, lalu divortex kecepatan maksimum lalu disentrifugasi selama 30 menit, 4°C, 12.000 rpm. Supernatan dipindahkan ke dalam tube baru dan ditambahkan isopropanol *equal volume* lalu inkubasi -20°C selama satu jam. Kemudian disentrifugasi selama 20 menit, 4°C, 12.000 rpm dan supernatant dibuang. Pellet yang mengandung DNA dicuci menggunakan *ethanol* 70%. Selanjutnya pellet dikeringkan menggunakan desikator dan rehidrasi dengan ddH<sub>2</sub>O. kemudian dilakukan *running* DNA genom, atau dapat disimpan pada suhu -20°C (Aljanabi & Martinez, 1997).

DNA genom dapat dilihat melalui proses *running* menggunakan elektroforesis, dengan cara menambahkan 5 µl sampel DNA pada 2 µl *loading dye*, kemudian dimasukkan ke sumuran *gel agarose* 1,5 % yang mengandung EtBr. Marker yang digunakan adalah DNA ladder 1 Kb. *Running* dilakukan pada 100 V selama 35 menit dengan TAE buffer sebagai *running buffer*. Tahap terakhir adalah hasil elektroforesis divisualisasi menggunakan UV-illuminator.

### 3.3.5 PCR DNA Pengkode ITS 2

DNA pengkode ITS 2 diamplifikasi menggunakan primer 5,8 f (5'TGT GAA CTG CAG GAC ACA TG 3') dan 28 R (5'ATG CTT AAA TTT AGG GGG TA 3'). Konsentrasi dari reaktan adalah 0,2 µM untuk setiap primer, 200 µM dNTP, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 nM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>, 75 mM Tris-HCL (pH 8,8) dan 0,01% satu unit *thermoprime plus* DNA Polymerase.

Amplifikasi PCR dalam 25µl campuran yang berisi 2 µl DNA Template, 8 µl ddH<sub>2</sub>O steril, 12,5 µl PCR master mix (intron), 2,5 µl primer ITS 2 (10 pmol/ µl, konsentrasi akhir 10 pmol/ µl). *Gradient temperature* yang digunakan adalah sampel DNA didenaturasi pada suhu 94°C selama 5 menit sebelum 35 siklus amplifikasi pada 94°C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 62°C selama 30 detik dan 72 °C selama 1 menit yang diikuti oleh *final extension* selama 5 menit. *Running* produk PCR 5 µl pada 1% gel agarose yang telah ditambahkan EtBr untuk mengetahui kemurniannya. Elektroforesis dilakukan pada voltase 80 V dengan waktu 60 menit dengan TAE

*buffer* sebagai *running buffer*. Tahap terakhir adalah hasil elektroforesis divisualisasi menggunakan UV-illuminator.

### 3.3.6 Purifikasi DNA Hasil PCR

Produk PCR pada gel agarose 1% dimurnikan dengan mengikuti prosedur PCR clean-up gel extraction nucleospin® Extract II. Purifikasi dilakukan dengan cara memotong gel agarose dan dimasukkan ke dalam tabung eppendorf 1,5 ml kemudian ditimbang dan ditambahkan buffer NT. Sampel diinkubasi pada 50°C selama 5-10 menit, kemudian divortex hingga homogen. Selanjutnya sampel dimasukkan dalam kolom nucleospin® Extract II yang sebelumnya telah ditempatkan pada tabung koleksi. Sentrifugasi pada 12.000 rpm. Selama 30 detik sehingga cairan pada kolom akan berpindah ke tabung koleksi, yang nantinya dibuang dan kolom nucleospin® Extract II diletakkan kembali pada tabung koleksi. Selanjutnya ditambahkan 600µl buffer NT3 (buffer pencuci) dan disentrifugasi 12.000 rpm selama 30 detik untuk mencuci sampel, penghilangan sisa ethanol dilakukan dengan inkubasi 70°C selama 2-5 menit, kemudian kolom nucleospin® Extract II dipindahkan ke tabung eppendorf steril 1,5 ml. sampel DNA pada kolom dielusi menggunakan 15-50 µl buffer NE dan diinkubasi pada suhu ruang selama 1 menit. Sentrifugasi dilakukan pada 12.000 rpm selama 30 detik untuk mendapatkan DNA murni.

## BAB 5. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Karakter morfologi larva dan nyamuk dewasa *Aedes aegypti* asal empat kecamatan (Puger, Arjasa, Tempurejo dan Kaliwates) menunjukkan hasil ciri morfologi yang sama. Larva *Aedes aegypti* memiliki karakter morfologi yaitu terdapat sepasang rambut pada bagian kepala (*chepal*), terdapat duri yang panjang pada dada, dan bagian perut (abdomen) mempunyai corong udara (siphon) yang terdapat sepasang rambut pada segmen terakhir. Karakter morfologi nyamuk *Aedes aegypti* yaitu pada bagian skutum terdapat dua garis putih sejajar di bagian dorsal tengah yang diapit oleh dua garis lengkung putih, dan pada bagian anterior femur kaki tengah *Aedes aegypti* terdapat strip putih yang memanjang. Berdasarkan karakter molekuler menggunakan marker sekuen DNA pengkode ITS2 larva *Aedes aegypti* asal empat kecamatan tersebut memiliki ukuran sama yaitu perkiraan sebesar ~ 380 pb.

### 5.2 Saran

Proses sekuensing tidak dilakukan karena DNA ITS2 tidak berhasil dipurifikasi. Sebaiknya dilakukan pengulangan PCR DNA ITS2 dengan volume produk yang lebih banyak, sehingga dapat dilakukan tahap purifikasi yang hasilnya dapat digunakan untuk sekuensing dan analisis. Kemudian dapat diperoleh keanekaragaman genetik vektor *Dengue Aedes aegypti* asal kecamatan Puger, Arjasa, Tempurejo dan Kaliwates.

DAFTAR PUSTAKA

- Aljanabi, S. M., & Martinez, I. 1997. Universal and rapid *salting*-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25(22), 4692–4693. <http://doi.org/10.1093/nar/25.22.4692>
- Ana Sahara, Joko Prastowo, Rini Widayanti, Kurniasih, W. N. 2015. Kekerabatan Genetik Caplak Rhiphicephalus (Boophilus) microplus Asal Indonesia Berdasarkan Sekuen Internal Transcribed Spacer-2. *Jurnal*, 16(15), 310–319.
- Ashokan, K. V, Pillai, M. M., & Vishwambhar, V. B. 2017. genes in *Dengue* virus vector mosquito ' s variants, (January 2011).
- Ashraf, H. M., Zahoor, M. K., Nasir, S., Naz, H., & Zahoor, S. 2015. Original Article Genetic Analysis of *Aedes aegypti* using Random Amplified Polymorphic DNA ( RAPD ) Markers from *Dengue* Outbreaks in Pakistan.
- Ata Maran, A., Nurjazuli, N., & Suhartono, S. 2013. Studi Deskriptif Kejadian Demam Berdarah *Dengue* (DBD) Dengan Pendekatan Spasial Di Kota Kupang (Analisis Data sekunder Tahun 2010-2011). *Jurnal Kesehatan Lingkungan Indonesia*, 11(2), 114 – 122.
- Baharuddin, A. 2015. Karakteristik Breeding Places Dan Pertumbuhan Larva. 1(2), 61–71.
- Banerjee, A. K., Arora, N., & Murty, U. S. N. 2007. How Far is ITS2 Reliable as a Phylogenetic Marker for the Mosquito genera ?, 3(3), 61–68.
- Bhatt, S., Gething, P. W., Brady, O. J., Messina, J. P., Farlow, A. W., Moyes, C. L., ... Hay, S. I. 2013. The global distribution and burden of *Dengue*. *Nature*, 496(7446), 504–507. <http://doi.org/10.1038/nature12060>
- Brown, J. E., Evans, B. R., Wei, Z., Vanessa, O., Barrera Martinez, L., Egizi, A., ... Powell, J. R. 2015. NIH Public Access. *National Institute of Health Author Manuscript*, 68(2), 514–525. <http://doi.org/10.1111/evo.12281>.
- Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C., Song, J., Shi, L., ... Leon, C. 2010. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS ONE*, 5(1), 1–8. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0008613>



- Chen, Y. C., Eisner, J. D., Kattar, M. M., Rassouljian-barrett, S. L., Lafe, K., Bui, U., ... Sara, L. 2001. Polymorphic internal transcribed spacer region 1 DNA sequences identify medically important yeasts. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(11), 4042–4051. <http://doi.org/10.1128/JCM.39.11.4042>
- Costa-da-Silva, A. L. Da, Capurro, M. L., & Bracco, J. E. 2005. Genetic lineages in the yellow fever mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) from Peru. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(October), 539–544. <http://doi.org/10.1590/S0074-02762005000600007>
- Dimond, B. J. B., & Hahnert, W. F. 1953. The Amino Acids Required for Egg Production in *Aedes aegypti*.
- Ditjen, PPM dan PL. 2004. *Pedoman Ekologi dan Aspek Vektor Perilaku Vektor*. Jakarta : Departemen Kesehatan.
- Dixit, R., Bihani, A., & Gupta, L. 2016. Molecular identification of *Aedes aegypti* mosquitoes from Pilani region of, (June), 149–155.
- Evans, B. R., Gloria-Soria, A., Hou, L., McBride, C., Bonizzoni, M., Zhao, H., & Powell, J. R. 2015. A Multipurpose High Throughput SNP Chip for the *Dengue* and Yellow Fever Mosquito, *Aedes aegypti*. *G3; Genes/Genomes/Genetics*, 5(May), 711–718.
- Fadilla, Z., Hadi, U. K., & Setiyaningsih, S. 2015. Bioekologi vektor demam berdarah *Dengue* (DBD) serta deteksi virus *Dengue* pada *Aedes aegypti* ( Linnaeus ) dan *Ae . albopictus* (Skuse) (Diptera : Culicidae) di kelurahan endemik DBD Bantarjati , Kota Bogor. *Jurnal Entomologi Indonesia*, 12(1), 31–38.
- Gubler, D. J. 1997. Epidemic *Dengue* / *Dengue* Haemorrhagic Fever : A Global Public Health Problem in the 21st Century. *Dengue Bulletin*, 21, 1–14.
- Gubler, D. J. 2011. *Dengue*, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21(st) Century. *Tropical Medicine and Health*, 39(4 Suppl), 3–11. <http://doi.org/10.2149/tmh.2011-S05>
- Harrington, L. C., Edman, J. D., & Scott, T. W. 2001. Why Do Female *Aedes aegypti* ( Diptera : Culicidae ) Feed Preferentially and Frequently on Human Blood ?, (1905), 411–422.

- Hlaing, T., Tun-Lin, W., Somboon, P., Socheat, D., Setha, T., Min, S., ... Walton, C. 2010. Spatial genetic structure of *Aedes aegypti* mosquitoes in mainland Southeast Asia. *Evolutionary Applications*, 3(4), 319–339. <http://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2009.00113.x>
- Huber, K., Ba, Y., Dia, I., Mathiot, C., Sall, A. A., & Diallo, M. 2008. *Aedes aegypti* in Senegal: Genetic diversity and genetic structure of domestic and sylvatic populations. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 79(2), 218–229. <http://doi.org/79/2/218> [pii]
- Hwang, U.-W., & Kim, W. 1999. General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DAN commonly used in molecular systematics. *The Korean Journal of Parasitology*, 37(4), 215–228. <http://doi.org/10.3347/kjp.1999.37.4.215>
- Jirakanjanakit, N., Leemingsawat, S., & Dujardin, J. P. 2008. The geometry of the wing of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* in isofemale lines through successive generations. *Infection, Genetics and Evolution*, 8(4), 414–421.
- Knowlton, K., Solomon, G., Rotkin-Ellman, M., & Council, N. R. D. 2009. Fever pitch: mosquito-borne *Dengue* fever threat spreading in the Americas. *NRDC Issue Paper, July*(July), 1–16.
- Louise, C., Vidal, P. O., & Suesdek, L. 2015. Microevolution of *Aedes aegypti*. *PLoS ONE*, 10(9), 1–16. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0137851>
- Maurya, R., Kumar, B., & Sundar, S. 2013. Evaluation of *salting-out* method for the isolation of DNA from whole blood : a pathological approach. *Int J Life Sci Bt & Pharm Res*, 2(2), 53–57.
- Monteiro, F. A., Shama, R., Martins, A. J., Gloria-Soria, A., Brown, J. E., & Powell, J. R. 2014. Genetic Diversity of Brazilian *Aedes aegypti*: Patterns following an Eradication Program. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(9), 1–10. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003167>
- Nugroho, A. 2013. Kematian Larva *Aedes aegypti* Setelah Pemberian Abate Di bandingkan Dengan Pemberian Serbuk Serai. *Jurnal Kesehatan Masyarakat*, 8(2), 113–120. <http://doi.org/ISSN 1858-1196>
- Prasetyowati, H., & Astuti, E. P. 2010. Serotipe Virus *Dengue* di Tiga Kabupaten / Kota Dengan Tingkat Endemisitas DBD Berbeda di Propinsi Jawa Barat. *Aspirator*, 2(2), 120–124.

- Rahayu, D. F., & Ustiawan, A. 2013. Identifikasi *Aedes aegypti* Dan *Aedes. Balaba*, vol. 9(01), 7–10.
- Rastogi, R. P., Kumar, A., Tyagi, M. B., & Sinha, R. P. 2010. Molecular Mechanisms of Ultraviolet Radiation-Induced DNA Damage and Repair, 2010. <http://doi.org/10.4061/2010/592980>
- Rueda, L. M. 2004. Pictorial keys for the identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) associated with *Dengue* virus transmission. *Zootaxa* (Vol. 589).
- Samaroo, S. K. 2015. *Aedes aegypti* ( Yellow Fever Mosquito ). *Ecology. The Online Guide to the Animals of Trinidad and Tobago*.
- Schultz, J., Maisel, S., Gerlach, D., Muller, T., Wolf, M., Müller, T., & Müller, T. 2005. A common core of secondary structure of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) throughout the Eukaryota. *Rna*, 11(4), 361–364.
- Schultz, J., Müller, T., Achtziger, M., Seibel, P. N., Dandekar, T., & Wolf, M. 2006. The internal transcribed spacer 2 database - A web server for (not only) low level phylogenetic analyses. *Nucleic Acids Research*, 34(WEB. SERV. ISS.), 704–707. <http://doi.org/10.1093/nar/gkl129>
- Sim, S., Jupatanakul, N., Ramirez, J. L., Kang, S., Romero-Vivas, C. M., Mohammed, H., & Dimopoulos, G. 2013. Transcriptomic Profiling of Diverse *Aedes aegypti* Strains Reveals Increased Basal-level Immune Activation in *Dengue* Virus-refractory Populations and Identifies Novel Virus-vector Molecular Interactions. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(7). <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002295>
- Soegijanto, Sugeng. 2004. *Demam Berdarah Dengue*. Surabaya : Airlangga University Press.
- Vogelstein, B., & Gillespie, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose, 76(2), 615–619.
- Wijayanti, S. P. M., Sunaryo, S., Suprihatin, S., McFarlane, M., Rainey, S. M., Dietrich, I., ... Kohl, A. 2016. *Dengue* in Java, Indonesia: Relevance of Mosquito Indices as Risk Predictors. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10(3), e0004500. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004500>
- World Health Organization. 2009. *Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases*, x, 147.



## LAMPIRAN

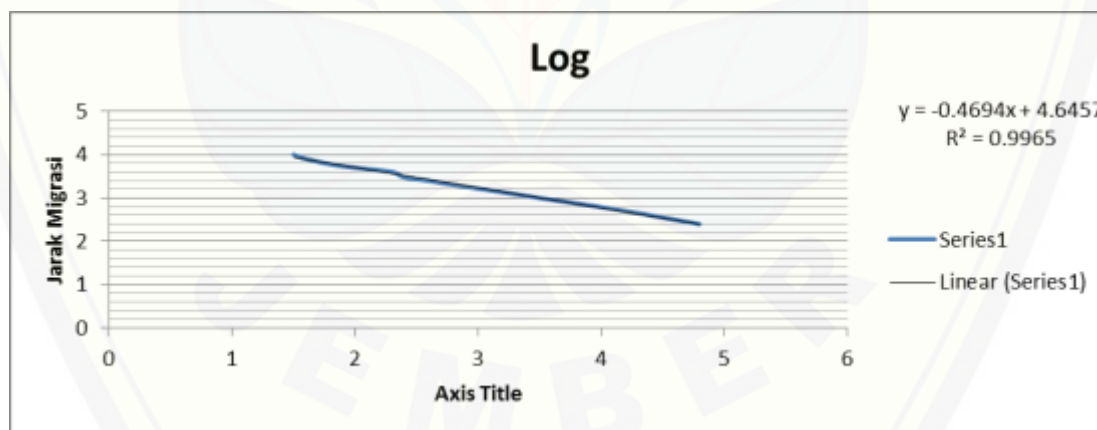
## Lampiran A. Komposisi Bahan

## A1. Komposisi larutan

No	Nama Larutan	Komposisi	Bahan	Keterangan
1.	Homogenizing Buffer (per 50 ml)	Tris-HCL 1M	0,5 ml	
		EDTA 0,5 M	0,2 ml	
		NaCl 0,4 M	1,16 gram	
		Aquadest	±45 ml	
2.	SDS 20 % (per 10 ml)	SDS	2 gram	
		Aquadest	3 10 ml	
3.	NaCl 6M (per 10 ml)	NaCl	17,4 gram	
		Aquadest	10 ml	
4.	Proteinase-K 20 mg/ml (per 1 ml)	Proteinase -K	20 mg	
		Aquadest	1 ml	
5.	Loading Buffer (per 10 ml)	60% Gliserol (steril)	10 ml	
		Xylenecianol	1 ujung tusuk gigi	
		Bromophenol Blue	1 tusuk ujung gigi	
6.	EDTA 0,5 M (per 50 ml)	EDTA	7,3 gram	
		NaOH	1 gram	
		Aquadest	50 ml	
7.	TAE 50x (per 100 ml)	Tris-Base	24,2 gram	pH = 8
		Asam Acetat Glacial	5,71 ml	
		0,5 M EDTA	10 ml	
		Aquadest	±70 ml	
8.	Agarose 1 % (per 40 ml)	Agarose	0,4 gram	
		TAE 1X	40 ml	
9.	EtBr		1,5 µl	

**Lampiran B. Rumus regresi dan perhitungan manual berat molekul DNA produk PCR**

Jarak Migrasi (cm)	Log Ukuran marker	Ukuran Marker (pb)
1.5	4	10000
1.6	3.903089987	8000
1.8	3.77815125	6000
2	3.698970004	5000
2.3	3.602059991	4000
2.4	3.477121255	3000
2.6	3.397940009	2500
2.8	3.301029996	2000
3.1	3.176091259	1500
3.5	3	1000
3.8	2.875061263	750
4.2	2.698970004	500
4.8	2.397940009	250



Kecamatan	Jarak Migrasi (cm)	Hasil ( $y = -0.4694x + 4.6457$ )	Ukuran molekul (pb)
Puger	4.4	2.58034	380.4871551
Arjasa	4.4	2.58034	380.4871551
Tempurejo	4.4	2.58034	380.4871551
Kaliwates	4.4	2.58034	380.4871551