



**KLONING DNA PENGKODE *CYTOCHROME C OXIDASE*  
*SUBUNIT 1 (COI)* PADA pTA2 SEBAGAI DASAR  
IDENTIFIKASI VEKTOR MALARIA *Anopheles vagus***

**SKRIPSI**

Oleh

**Alfin Putri Nahdiyatin**

**NIM 151810401047**

**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS JEMBER  
2019**



**KLONING DNA PENGKODE *CYTOCHROME C OXIDASE*  
*SUBUNIT 1 (COI)* PADA pTA2 SEBAGAI DASAR  
IDENTIFIKASI VEKTOR MALARIA *Anopheles vagus***

**SKRIPSI**

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

Oleh

**Alfin Putri Nahdiyatin**

**NIM 151810401047**

**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS JEMBER  
2019**

## PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Kedua orang tua tercinta, Ayahanda Drs. Marsuki dan Ibunda Lilik Mukholifah yang selalu memberikan dukungan, doa tiada henti, dan cinta kasih selama ini;
2. Guru-guru sejak taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi yang telah memberikan dan menurunkan ilmu pengetahuannya tanpa balas jasa;
3. Almamater Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

**MOTTO**

“Manusia dihargai atas karya dan kadar manfaatnya bagi sekitarnya. Semakin besar manfaat yang bisa kita berikan, semakin besar pula sejarah akan menghargai kita. Begitu pun sebaliknya, kehinaan manusia tidak lain disebabkan kezalimannya terhadap sesamanya”

(Rif'an, 2017)<sup>\*</sup>



---

\* Rif'an, A. Rifa'i. 2017. *Ketika Tuhan Tak Lagi Dibutuhkan*. Jakarta : Gramedia.

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Alfin Putri Nahdiyatin

NIM : 151810401047

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah berjudul “Kloning DNA Pengkode *Cytochrome c Oxidase Subunit 1 (COI)* Pada pTA2 Sebagai Dasar Identifikasi Vektor Malaria *Anopheles vagus*” adalah benar-benar karya ilmiah sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya dan belum pernah diajukan pada instansi manapun, serta bukan karya jiplakan. Penelitian ini merupakan bagian dari proyek penelitian Dr.rer.nat. Kartika Senjarini, S.Si., M.Si., Dr. Dra. Rike Oktarianti, M.Si. dan Syubbanul Wathon, S.Si., M.Si. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember,  
Yang menyatakan

Alfin Putri Nahdiyatin  
NIM 151810401047

**SKRIPSI**

**KLONING DNA PENGKODE *CYTOCHROME C OXIDASE*  
*SUBUNIT 1 (COI)* PADA pTA2 SEBAGAI DASAR  
IDENTIFIKASI VEKTOR MALARIA *Anopheles vagus***

Oleh

Alfin Putri Nahdiyatin  
NIM 151810401047

Pembimbing

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

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “Kloning DNA Pengkode *Cytochrome c Oxidase Subunit I (COI)* Pada pTA2 Sebagai Dasar Identifikasi Vektor Malaria *Anopheles vagus*”, karya Alfin Putri Nahdiyatin telah diuji dan disahkan pada:

Hari, tanggal :

Tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas  
Jember

Tim Penguji,

Ketua,

Anggota I,

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

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

Anggota II

Anggota III

Syubbanul Wathon, S.Si., M.Si.  
NIP. 199009062019031014

Mukhamad Su'udi, Ph.D.  
NRP. 760016788

Mengesahkan  
Dekan,

Drs. Sujito, Ph.D  
NIP. 102041987111001

## PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Kloning DNA Pengkode *Cytochrome c Oxidase Subunit 1 (COI)* Pada pTA2 Sebagai Dasar Identifikasi Vektor Malaria *Anopheles vagus*”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan dan do'a dari berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan rasa hormat dan ucapan terima kasih kepada:

1. Ibu Dr.rer.nat. Kartika Senjarini, S.Si., M.Si. selaku Dosen Pembimbing Utama dan Ibu Dr. Dra. Rike Oktarianti, M.Si. selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah sabar dan ikhlas meluangkan waktu, pikiran dan perhatian guna memberikan bimbingan demi terselesainya penulisan skripsi ini;
2. Bapak Syubbanul Wathon, S.Si., M.Si. dan Bapak Mukhamad Su'udi, Ph.D. selaku Dosen Penguji I dan II yang banyak memberikan saran demi kesempurnaan skripsi ini;
3. Bapak Rendi Setiawan, S.Si., M.Si. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan bimbingan akademik, motivasi serta do'a selama masa perkuliahan hingga penyelesaian penyusunan skripsi ini;
4. Seluruh Dosen jurusan Biologi atas nasihat, bimbingan, dan pengetahuan yang telah dibagikan selama penulis menjadi mahasiswa;
5. Ibu Dina Fitriyah, Ibu Endang, Ibu Evi dan Ibu Ulfa selaku teknisi laboratorium jurusan Biologi;
6. Kakak tingkat anggota Kelompok Riset Vektor Biologi, Kakak Laily, Kakak Dewi, Kakak Ika, Kakak Aria dan Kakak Amalina yang membantu dan menasehati dalam proses penelitian;

7. Sahabatku Dwi Alfiana, Elisa Erni, Miatin Alvin, Rochmatul Nuryu, Risa Charisatin, Muhammad Khoirudin, serta Deni Rizki Damara yang telah memberi semangat, keceriaan, do'a dan bantuan selama proses penelitian;
8. Hamdani Rifki Putra yang telah menjadi tempat berkeluh kesah dan memberikan dukungan selama proses penelitian;
9. Teman-teman satu angkatan Biologi 2015 atas motivasi dan do'a;
10. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu-persatu yang telah memberikan bantuan, semangat, dan dorongan agar skripsi ini segera selesai.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari berbagai pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhir kata, penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat untuk kebaikan.

Jember, Juni 2019

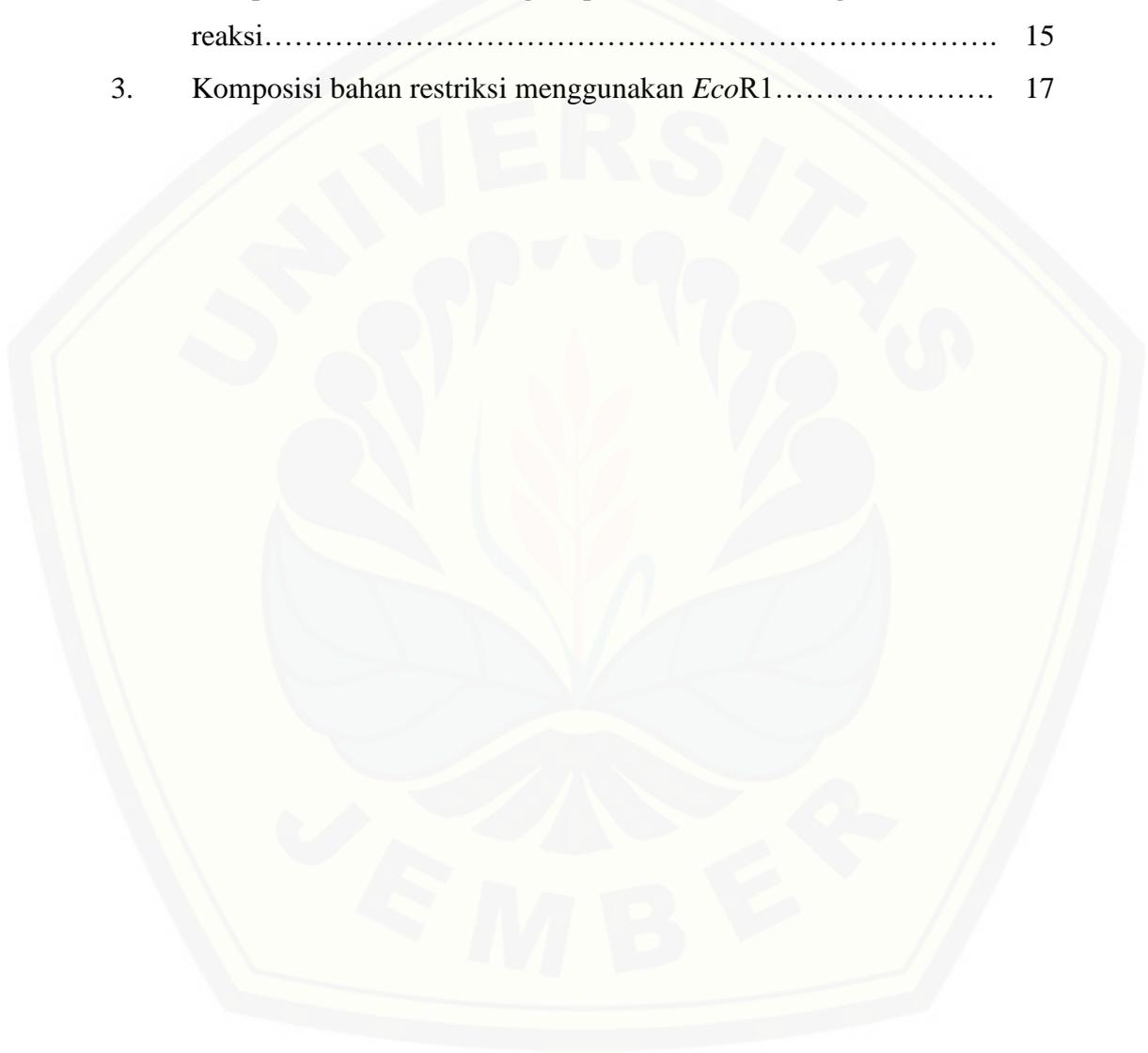
Penulis

**DAFTAR ISI**

HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PERSEMBAHAN .....	ii
HALAMAN MOTTO.....	iii
HALAMAN PERNYATAAN .....	iv
HALAMAN PEMBIMBING.....	v
HALAMAN PENGESAHAN .....	vi
RINGKASAN .....	vii
PRAKATA.....	ix
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR .....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
<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 Penelitian .....	3
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>4</b>
2.1 Epidemiologi Malaria .....	4
2.2 Vektor Potensial Malaria .....	6
2.3 Identifikasi Molekuler.....	7
2.4 Plasmid pTA2 Sebagai Vektor Kloning .....	9
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>10</b>
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	10
3.2 Alat dan Bahan.....	10
3.2.1 Alat.....	10
3.2.2 Bahan.....	10

**DAFTAR TABEL**

	Halaman
1. Komposisi bahan amplifikasi sekuen <i>COI</i> dalam satu reaksi.....	13
2. Komposisi bahan reaksi ligasi pTA2 vektor kloning dalam satu reaksi.....	15
3. Komposisi bahan restriksi menggunakan <i>EcoR</i> 1.....	17



## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Malaria merupakan penyakit yang menjadi perhatian global dan sering menimbulkan Kejadian Luar Biasa (KLB). Tercatat 200 sampai 500 juta kasus klinis malaria dan 1.5-2.7 juta jiwa mengalami kematian akibat malaria, 75% terjadi pada anak-anak di Afrika yang berumur kurang dari 5 tahun (Shetty *et al.*, 2006; WHO, 2005). Berdasarkan data Riset Kesehatan Dasar tahun 2013 menunjukkan bahwa insiden malaria di Indonesia tahun 2013 adalah 1.9% menurun dibanding tahun 2007 yaitu 2.9%. Prevalensi malaria yang terjadi pada tahun 2013 yaitu 6.0% (Riskesdas, 2013). Malaria dikategorikan sebagai salah satu penyakit yang berbahaya di dunia. Malaria disebabkan oleh infeksi parasit yaitu suatu protozoa obligat intraseluler yang berada dalam darah. Protozoa tersebut berasal dari filum Apicomplexa, kelas Sporozoa, sub kelas Coccidida, ordo Eucoccidides, sub ordo Haemosporidiidea, family Plasmodiidae, genus *Plasmodium* (Wijayanti, 2012). Infeksi *Plasmodium* ditransmisikan ke manusia melalui nyamuk *Anopheles* betina (Shetty *et al.*, 2006).

*Anopheles* dapat dikatakan sebagai vektor malaria di suatu daerah apabila terbukti positif mengandung *sporozoit* dan atau *oocyt* (Elyazar *et al.*, 2013; WHO, 2003). Setiap daerah endemik malaria, biasanya ditemukan satu atau paling banyak tiga spesies *Anopheles* yang berperan penting dalam transmisi patogen (Wijayanti, 2012). Terdapat sekitar 400 spesies *Anopheles* tetapi hanya 67 spesies yang bertindak sebagai vektor dan 24 diantaranya ditemukan di Indonesia. *Anopheles vagus* dilaporkan mendominasi di desa Bangsring kabupaten Banyuwangi pada tahun 2017 dan diduga menjadi vektor malaria di Bangladesh, Sri Lanka (Verhaeghen *et al.*, 2010; Wibisono, 2017). Diantara sekian banyak spesies *Anopheles*, terdapat beberapa spesies yang menunjukkan kesamaan morfologi namun secara genetik memiliki perbedaan. Spesies yang demikian disebut sebagai *sibling species* (Harwin *et al.*, 1969; Sukowati *et al.*, 2005). *Sibling species* menunjukkan perilaku yang berbeda seperti kebiasaan menggigit,

distribusi, dan kapasitas vektorial yang berbeda. Oleh karena itu identifikasi secara morfologi saja tidak cukup. Metode yang dapat digunakan untuk mendapatkan informasi yang akurat mengenai identitas vektor yaitu identifikasi molekuler (Weeraratne *et al.*, 2017).

Identifikasi molekuler mengacu pada konsep bahwa setiap spesies memiliki identitas genetik yang unik. Identifikasi molekuler dapat dilakukan dengan metode DNA *barcoding*. DNA *barcoding* merupakan pendekatan molekuler untuk mengidentifikasi spesies dengan menggunakan urutan DNA pendek yang memiliki sedikit variasi intra spesies (Batovska *et al.*, 2016). Urutan DNA pendek yang telah distandarisasi dan dapat digunakan sebagai penanda genetik untuk identifikasi spesies disebut DNA *barcode*. Studi awal DNA *barcode* menggunakan *Internal Transcribe Spacer 2*, *Cytochrome b Oxidase*, *12s rRNA* sebagai gen target. Saat ini gen *Cytochrome c Oxidase Subunit 1 (COI)* banyak digunakan untuk identifikasi spesies hewan (Chan *et al.*, 2014). Sekuen 600-710 *basepair* (bp) gen *COI* merupakan sekuen yang dapat digunakan sebagai DNA *barcode* untuk identifikasi spesies hewan termasuk nyamuk (Hebert *et al.*, 2004; Chan *et al.*, 2014; Vrijenhoek *et al.*, 1994).

DNA hasil amplifikasi sekuen *COI* di sekuensing untuk mengetahui urutan basa nukleotida. Namun urutan basa nukleotida di awal dan di akhir sering kali tidak terbaca dengan jelas, sehingga urutan basa bagian awal dan akhir dihilangkan kurang lebih 50 bp untuk mendapatkan piktogram yang akurat. Hal tersebut dapat mengurangi basa nukleotida sehingga hasil yang diperoleh bukan merupakan *full length DNA barcoding target*. Oleh karena itu perlu dilakukan kloning agar diperoleh *full length DNA barcoding target*. Kloning DNA adalah penyisipan potongan DNA dari sumber lain ke dalam plasmid yang telah di isolasi dari sel bakteri (Campbell *et al.*, 2008). pTA2 merupakan plasmid linear yang memiliki 3' terminal *thymidine* tunggal pada bagian ujung yang disebut *T-overhang* (Toyobo, 2009). Adanya *T-overhang* memudahkan kloning hasil amplifikasi DNA. Proses ligasi hasil amplifikasi sekuen *COI* dengan ujung basa adenin dan pTA2 pada daerah *T-overhang* menggunakan enzim ligase membentuk plasmid rekombinan (Sanjaya, 2016).

## 1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana karakteristik molekuler *Anopheles vagus* berdasarkan DNA pengkode *COI* yang dikonstruksikan pada plasmid pTA2 serta hubungan filogenetik dengan vektor potensial malaria lainnya?

## 1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah mengidentifikasi karakteristik molekuler *Anopheles vagus* berdasarkan DNA pengkode *COI* yang dikonstruksikan pada plasmid pTA2 serta mengetahui hubungan filogenetik dengan vektor potensial malaria lainnya.

## 1.4 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah identifikasi molekuler vektor potensial malaria dari Desa Bangsring Kabupaten Banyuwangi berdasarkan DNA pengkode *COI*.

## 1.5 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai profil genetik vektor potensial malaria *Anopheles vagus* berdasarkan DNA pengkode *COI* dan hubungan filogenetik dengan vektor potensial malaria lainnya sehingga dapat memaksimalkan pengendalian vektor malaria.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

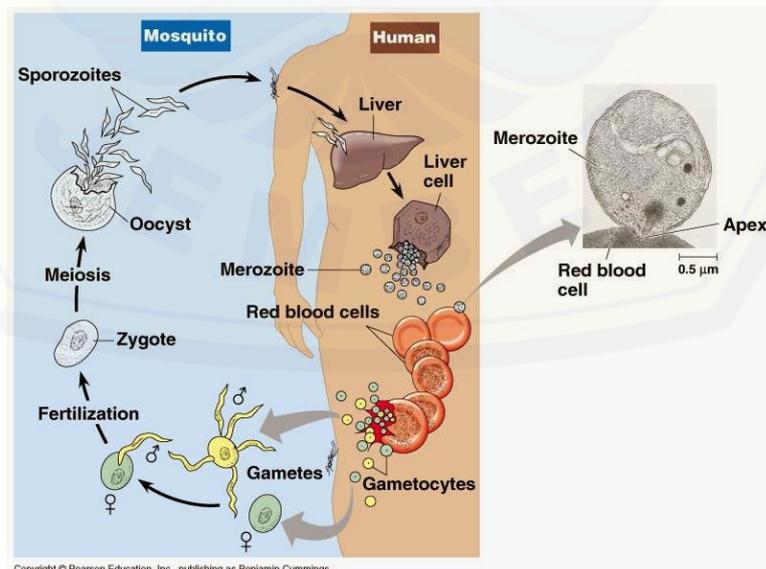
### 2.1 Epidemiologi Malaria

Malaria merupakan suatu masalah kesehatan di dunia yang dominan di daerah tropis dan sub tropis. Malaria memiliki area persebaran yang luas yaitu antara garis lintang 60° lintang utara dan 40° lintang selatan yang mencakup lebih 100 negara beriklim tropis dan sub tropis (Tulangow *et al.*, 2018). Secara global setiap tahunnya diperkirakan terdapat 200-500 kasus malaria dan mengakibatkan 1.5-2.7 juta kematian. Tercatat 75% kematian pada anak dibawah umur 5 tahun di Sub-Saharan Afrika. Sedangkan di Amerika Selatan dan wilayah Eropa terjadi sekitar 1000 dan 7000 kasus malaria setiap tahunnya. Sebagian besar kasus malaria di Amerika Selatan dan Eropa dibawa oleh orang yang sering bepergian ke negara endemik malaria tanpa menggunakan kemoprofilaksis. Malaria juga menjadi penyebab utama anemia pada anak-anak dan ibu hamil, berat badan lahir rendah, kelahiran prematur dan kematian bayi (Fisher dan Bialek, 2002; Shetty *et al.*, 2006; WHO, 2005). Insiden malaria pada penduduk Indonesia pada tahun 2007 adalah 2.9% dan terjadi penurunan pada tahun 2013 yaitu 1.9%. Lima provinsi yang memiliki nilai insiden dan prevalansi tertinggi yaitu Papua, Nusa Tenggara Timur, Papua Barat, Sulawesi tengah, dan Maluku. Sedangkan provinsi Jawa-Bali memiliki nilai prevalensi yang rendah dibandingkan dengan provinsi lain (Riskesdas, 2013).

Malaria disebabkan karena infeksi oleh satu atau lebih dari spesies *Plasmodium*. Terdapat lima spesies utama plasmodium yang menyebabkan malaria yaitu *P. falciparum* (*plasmodium falciparum*), *P. malariae*, *P. ovale* dan *P. vivax*. *P. knowlesi*. *P. falciparum* merupakan parasit yang paling banyak menyebabkan kematian di daerah tropis (Lubis *et al.*, 2017; WHO, 2003). *P. falciparum* juga merupakan *Plasmodium* yang paling umum di Indonesia. Keberadaan *P. falciparum* di Indonesia pertama kali dilaporkan oleh Robert Koch pada tahun 1900 di Ambarawa, Ungaran, dan Tanjung Priok. Setelah *P. falciparum*, *P. vivax* juga banyak ditemukan di beberapa wilayah seperti Asia,

dan Afrika. *P. ovale* banyak ditemukan di Afrika khususnya di Afrika barat, sedangkan di Indonesia *P. ovale* ini banyak ditemukan di wilayah timur Indonesia. *P. malariae* ditemukan di berbagai negara dan merupakan jenis parasit malaria yang hanya menginfeksi manusia (Elyazar *et al.*, 2011). *P. knowlesi* ada pada monyet ekor panjang (*Macaca fascicularis*), namun ditemukan pula menginfeksi manusia (Lubis *et al.*, 2017). Infeksi *Plasmodium* ditransmisikan ke manusia melalui nyamuk *Anopheles* betina (Shetty *et al.*, 2006).

*Anopheles* betina memiliki lumen *midgut* yang menjadi tempat pembentukan zigot *Plasmodium* dan perkembangan *ookinete*, *oocyst* dan sporogeni disisi *basal midgut*. Sporozoit bermigrasi melalui *haemocoel* dan menginvasi kelenjar ludah. Proses tersebut dinamakan dengan sporogeni. Proses sporogeni sangat penting karena dari satu *oocyst* akan menghasilkan ribuan sporozoit. Sporozoit selanjutnya masuk ke dalam peredaran darah manusia saat *blood feeding* (Hillyer *et al.*, 2007). Sporozoit bermigrasi ke hati membentuk trophozoit hati, lalu berkembang menjadi skizon hati yang terdiri dari 10.000-30.000 merozoit hati. Merozoit dari skizon hati yang pecah akan masuk ke peredaran darah kemudian menginfeksi sel darah merah normal. Parasit akan berkembang di dalam sel darah merah normal dari stadium trophozoit sampai skizon yang disebut dengan siklus skizogeni (Depkes RI, 2005).



Gambar 2.1 Siklus Hidup Plasmodium

(<http://wanenoor.blogspot.com/2014/11/penyakit-malaria-dan-siklus-hidup.html>)

## 2.2 Vektor Potensial Malaria

Spesies *Anopheles* yang dikategorikan sebagai vektor potensial malaria yaitu spesies yang selalu melakukan kontak dengan manusia, tingginya dominasi spesies, umur spesies panjang, dan dikonfirmasi sebagai vektor di daerah lain (Kazwaini *et al.*, 2014). Berdasarkan *biting preference* populasi nyamuk dibedakan menjadi zoofilik, anthropofilik, dan anthropozoofilik. *Anopheles* yang bersifat zoofilik lebih tertarik melakukan *blood feed* pada hewan, sedangkan *Anopheles* yang bersifat anthropofilik dapat bertindak sebagai vektor (Sukowati *et al.*, 2005). Beberapa spesies yang dinyatakan sebagai vektor di Indonesia yaitu *An. aconitus* (*Anopheles aconitus*), *An. balabacensis*, *An. bancroftii*, *An. barbirostris*, *An. farauti*, *An. flavirostris*, *An. koliensis*, *An. leucosphyrus*, *An. maculatus*, *An. nigerrimus*, *An. sondaicus*, *An. sinensis*, *An. subpictus* (Permadi *et al.*, 2014). *An. barbirostris*, *An. sondaicus*, *An. subpictus*, *An. minimus* dilaporkan menjadi vektor malaria di provinsi NTT (Kazwaini dan Mading, 2014). *An. subpictus* dan *An. barbirostris* diketahui berperan sebagai vektor malaria dan filiaris di Sulawesi, Timor, dan Flores, tetapi di daerah lain seperti Jawa dan Sumatra tidak berperan sebagai vektor (Marwoto *et al.*, 1992; Sukowati *et al.*, 2005), *An. maculatus* dilaporkan sebagai vektor malaria di Jawa dan Sumatra (Marwoto *et al.*, 1992). Sedangkan di daerah pantai Banyuwangi Jawa Timur ditemukan *An. sondaicus*, *An. vagus*, *An. subpictus*, *An. flavirostris*, *An. anularis*, *An. barbirostris*, *An. definitus* (Shinta *et al.*, 2003).

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Arthropoda
Class	: Insecta
Order	: Diptera
Sub Order	: Nematocera
Family	: Culicidae (mosquitoes)
Sub family	: Anophelinae
Genus	: <i>Anopheles</i>
Sub genus	: <i>Anopheles</i>
	<i>Cellia</i> (Reid, 1968).

*An. vagus* dan *An. annularis* diduga sebagai vektor malaria yang penyebarannya di seluruh pulau Sumba. *An. vagus* banyak ditemukan di Flores baik di daerah pantai maupun pedalaman dan dilaporkan cenderung bersifat anthrofilik (Marwoto *et al.*, 1992). Sedangkan di Sukabumi Jawa barat dan kecamatan Kokap Jawa Tengah, *An. vagus* dilaporkan sebagai vektor malaria di karena ditemukan sporozoit *P. falciparum*. Selain itu, *An. vagus* ditemukan dengan kepadatan tinggi dan endemik di beberapa daerah. Terdapat penelitian bahwa *An. vagus* di Vietnam memiliki habitat di air payau dan dilaporkan bahwa *P. falciparum* tidak dapat berkembang. Penelitian lain yang dilakukan di Thailand menunjukkan bahwa *P. falciparum* dan *P. vivax* dapat berkembang pada *An. vagus* dengan habitat air tawar. Kemungkinan kejadian ini dikarenakan adanya perbedaan strain atau *sibling species* akibat perbedaan ekologi dan distribusi geografi. Pengaruh perbedaan habitat juga terjadi pada *An. subpictus* ternyata menunjukkan adanya perbedaan genetik. Spesies yang memiliki genetik berbeda namun memiliki morfologi yang sangat mirip merupakan *sibling species* (Alfiah dan Mujiyono, 2014).

*Sibling species* sulit untuk dibedakan karena morfologi yang sangat mirip sehingga sering terjadi kesalahan dalam identifikasi. *Sibling species* sering menunjukkan perilaku makan yang berbeda, kebiasaan menggigit, kompetensi vektor, distribusi, dan kapasitas vektorial yang berbeda. Oleh karena itu, pengamatan secara morfologi saja tidak cukup akurat. Identifikasi molekuler merupakan cara yang akurat karena berbasis genetik yang dimiliki suatu spesies (Weeraratne *et al.*, 2017).

### 2.3 Identifikasi Molekuler

Identifikasi spesies menjadi sangat penting dalam studi biologi. Terdapat dua pendekatan utama yang digunakan dalam identifikasi spesies yaitu karakter morfologi dan DNA *barcoding*. Sistem taksonomi modern telah mengembangkan DNA *barcoding* yang didasarkan pada teknik molekuler yang berpotensi memberikan hasil dengan ketepatan dan akurasi tinggi dalam waktu yang singkat. Sehingga banyak digunakan dalam mengkonservasi keanekaragaman hayati

palpus, dan sayap. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop *stereo* dan pengambilan gambar dilakukan dengan menggunakan optilab.

#### 3.3.4 Isolasi DNA Genom

Isolasi DNA genom *An. vagus* menggunakan metode *Salting Out Extraction*. Sampel *An. vagus*. DNA genom di ekstraksi dari *whole body* nyamuk *An. vagus* yang dimasukkan ke dalam *tube* 1.5 ml. Kemudian ditambahkan 400 µl *homogenizing buffer* lalu dihomogenkan menggunakan mikropistil. Langkah selanjutnya adalah menambahkan 40 µl 20% SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) dan 8 µl proteinase K. Sampel di resuspensi sebelum diinkubasi. Inkubasi dilakukan menggunakan *thermo shaker* pada suhu 65 °C selama dua jam. Setelah di inkubasi, suspensi ditambah 300 µl NaCl (*Natrium Chloride*) jenuh 6 M lalu di *swirling* secara perlahan dan di sentrifugasi dengan suhu 4 °C kecepatan 10000 rpm (*rotation per minute*) selama 30 menit. Setelah itu diambil supernatan sebanyak 300 µl dan dipindahkan ke dalam *tube* baru. Supernatan ditambahkan isopropanol *equal volume* lalu di inkubasi pada suhu -20 °C selama satu jam. Setelah inkubasi, sampel disentrifugasi suhu 4 °C kecepatan 10000 rpm selama 20 menit. Pelet yang diperoleh di cuci menggunakan etanol 70% kemudian di sentrifugasi dengan suhu 4 °C kecepatan 10000 rpm selama 5 menit. Pelet yang mengandung DNA dikeringkan menggunakan *vacum dry* dan direhidrasi dengan 50 µl ddH<sub>2</sub>O steril. Selanjutnya sampel dapat dianalisis atau dapat di simpan pada suhu -20 °C.

#### 3.3.5 Elektroforesis DNA Genom

Elektroforesis DNA merupakan cara untuk melihat pita DNA yang di visualisasikan menggunakan UV transluminator. Proses ini memerlukan agarose untuk pembuatan gel agarose dan buffer TAE 1x (*Tris Acetate EDTA*) untuk melarutkan agarose sekaligus untuk running elektroforesis. Konsentrasi agarose yang digunakan yaitu 0.8% dan ditambahkan EtBr (*Ethidium Bromide*) sebanyak 1 µl. Genom yang diperoleh saat isolasi di ambil sebanyak 5 µl dan dicampur dengan *loading dye* 1 µl. Sampel kemudian dimasukkan ke dalam sumuran pada

DAFTAR PUSTAKA

- Alfiah, S., & Mujiyono, M. (2014). Variasi Morfologi *Anopheles vagus* Donitz, 1902 (Diptera: Culicidae) dari Habitat Air Tawar dan Air Payau. *Vektora: Jurnal Vektor dan Reservoir Penyakit*. 6(2). 59-67.
- Aljanabi, S. M., & Martinez, I. 1997. Universal and Rapid Salt-extraction of High Quality Genomic DNA for PCR-based Techniques. *Nucleic acids research*. 25(22). 4692-4693.
- Batovska, J., Blacket, M. J., Brown, K., & Lynch, S. E. 2016. Molecular Identification Of Mosquitoes (Diptera: Culicidae) In Southeastern Australia. *Ecology and Evolution*. 6(9): 3001-3011.
- Cagampang, A. & Darsie, R.F. 1970. *Illustrated Key to the Anopheles Mosquitoes of the Philippine Island*. Malaria Eradication Training Center: Manila, Philippine.
- Campbell, Neil A., Jane B. R., Lisa A. U., Michael L. C., Seteven A. W., Peter V. Minorsky., Robert B. J. 2008. *Biologi*. Jakarta: Erlangga.
- Chan, A., Chiang, L. P., Hapuarachchi, H. C., Tan, C. H., Pang, S. C., Lee, R., & Lam-Phua, S. G. 2014. DNA Barcoding: Complementing Morphological Identification Of Mosquito Species In Singapore. *Parasites & Vectors*. 7(1): 569.
- Elyazar, I. R., Hay, S. I., & Baird, J. K. 2011. Malaria Distribution, Prevalence, Drug Resistance And Control In Indonesia. In *Advances In Parasitology* 74: 41-175. Academic Press.
- Fischer, P. R., & Bialek, R. (2002). Prevention of malaria in children. *Clinical infectious diseases*. 34(4). 493-498.
- Folmer, O., M. Black., W. Hoeh., R. Lutz., R. Vrijenhoek. 1994. DNA Primers For Amplification Of Mitochondrial Cytochrome C Oxidase Subunit I From Diverse Metazoan Invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol*. 3(5): 294-9.

- Hagström, Å., Pinhassi, J., & Zweifel, U. L. (2000). Biogeographical Diversity Among Marine Bacterioplankton. *Aquatic Microbial Ecology*. 21(3). 231-244.
- Harwin, R. M. 1969. The Concept Of Sibling Species. *Ostrich*. 40(S1): 27-32.
- Hebert, P. D., Cywinska, A., & Ball, S. L. 2003. Biological Identifications Through DNA Barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 270(1512): 313-321.
- Hebert, P. D., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H., & Hallwachs, W. 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 101(41): 14812-14817.
- Hillyer, J. F., Barreau, C., & Vernick, K. D. (2007). Efficiency Of Salivary Gland Invasion By Malaria Sporozoites Is Controlled By Rapid Sporozoite Destruction In The Mosquito Haemocoel. *International Journal For Parasitology*. 37(6). 673-681.
- Hintermann, G., Fischer, H. M., Cramer, R., & Hütter, R. (1981). Simple Procedure For Distinguishing CCC, OC, And L Forms Of Plasmid DNA By Agarose Gel Electrophoresis. *Plasmid*. 5(3). 371-373.
- Holt, R. A., Subramanian, G. M., Halpern, A., Sutton, G. G., Charlab, R., Nusskern, D. R., & Salzberg, S. L. 2002. The Genome Sequence of the Malaria Mosquito *Anopheles gambiae*. *Science*. 298(5591). 129-149.
- Kazwaini, M., & Mading, M. 2014. Jenis Dan Status *Anopheles* Spp. Sebagai Vektor Potensial Malaria Di Pulau Sumba Provinsi Nusatenggara Timur. *Jurnal Ekologi Kesehatan*, 13: 298-307.
- Kementrian Kesehatan, R. I. 2013. *Riset kesehatan dasar (Riskesdas) 2013*. Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.

- Leffler, E. M., Band, G., Busby, G. B., Kivinen, K., Le, Q. S., Clarke, G. M., & Bougouma, E. C. (2017). Resistance To Malaria Through Structural Variation Of Red Blood Cell Invasion Receptors. *Science*. 356.
- Lobo, N. F., Laurent, B. S., Sikaala, C. H., Hamainza, B., Chanda, J., Chinula, D., ... & Boldt, H. L. 2015. Unexpected Diversity Of *Anopheles* Species In Eastern Zambia: Implications For Evaluating Vector Behavior And Interventions Using Molecular Tools. *Scientific Reports*. 5: 17952.
- Lubis, I. N., Wijaya, H., Lubis, M., Lubis, C. P., Divis, P. C., Beshir, K. B., & Sutherland, C. J. 2017. Contribution Of *Plasmodium knowlesi* To Multispecies Human Malaria Infections In North Sumatera, Indonesia. *The Journal Of Infectious Diseases*. 215(7): 1148-1155.
- Marwoto, H. A., Atmosoedjono, S., & Dewi, R. M. 1992. Penentuan Vektor Malaria Di Flores. *Buletin Penelitian Kesehatan*. 20.
- Permadi, I., & Wibowo, T. 2014. *Anopheles vagus* Sebagai Tersangka Vektor Di Indonesia. *Spirakel*. 6(1): 33-36.
- Rahayu, A. R., Kusumaningrum, H. P., & Budiharjo, A. (2016). Pelacakan Gen Sitokrom Oksidase Subunit 1 (*COI*) DNA Mitokondria Pada Itik Tegal (*Anas sp.*). *Bioma: Berkala Ilmiah Biologi*. 18(2). 114-122.
- Ratnasingham, S., & Hebert, P. D. 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular Ecology Notes*. 7(3): 355-364.
- Reid, J.A. 1968. *Anopheline Mosquitoes of Malaya and Borneo*. Kuala Lumpur : Institute for Medical Research.
- Rueda, L. M., Pecor, J. E., & Harrison, B. A. (2011). Updated Distribution Records For *Anopheles Vagus* (Diptera: Culicidae) In The Republic Of Philippines, And Considerations Regarding Its Secondary Vector Roles In Southeast Asia. *Walter Reed Army Inst of Research Silver Spring Md Dept of Entomology*.