



**DIVERSITAS GENETIK VEKTOR DENGUE *Aedes aegypti* (L)  
BERDASARKAN DNA PENGKODE *INTERNAL*  
*TRANSCRIBED SPACER 2* (ITS2)**

**SKRIPSI**

Oleh

**Zakiyatul Khoiriyah**

**NIM 111810401038**

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

**2016**



**DIVERSITAS GENETIK VEKTOR DENGUE *Aedes aegypti* (L)  
BERDASARKAN DNA PENGKODE *INTERNAL*  
*TRANSCRIBED SPACER 2 (ITS2)***

**SKRIPSI**

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

Oleh

**Zakiyatul Khoiriyah**

**NIM 111810401038**

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

**2016**

## PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Ibu Supini dan Abah Zumar Khoirudin (alm.) yang telah mencurahkan kasih sayang, doa yang tulus, pengorbanan, bimbingan, dukungan, semangat serta kepercayaannya hingga saya bisa menyelesaikan studi ini dengan baik;
2. Kakak Nur Azizah Khoiriyah dan Adik Moh. Halim M.M yang telah memberi motivasi untuk terus belajar dan mengejar cita-cita;
3. Para guru yang telah memberi ilmu, motivasi serta pengalaman dari sekolah dasar hingga perguruan tinggi dengan penuh kesabaran;
4. Almamater Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

**MOTTO**

“...Allah akan meninggikan orang-orang yang beriman diantara kamu dan orang-orang yang diberi ilmu pengetahuan beberapa derajat.”

(terjemahan surat *Al-Mujadalah* 11)<sup>\*)</sup>

“...belajar tidaklah melulu untuk mengejar dan membuktikan sesuatu, namun belajar itu sendiri, adalah perayaan dan penghargaan pada diri sendiri.”

(Andrea Hirata)<sup>\*\*)</sup>

---

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

<sup>\*\*)</sup> Hirata, Andrea. 2011. *Padang Bulan*. Yogyakarta: Bentang Pustaka.

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

nama : Zakiyatul Khoiriyah

NIM : 111810401038

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Diversitas Genetik Vektor *Dengue Aedes aegypti* berdasarkan DNA Pengkode *Internal Transcribed Spacer 2 (ITS 2)*” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang telah saya sebutkan sumbernya, belum pernah di ajukan pada institusi mana pun dan bukan karya jiplakan. 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 mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember,

Yang menyatakan,

Zakiyatul Khoiriyah

NIM. 111810401038

**SKRIPSI**

**DIVERSITAS GENETIK VEKTOR DENGUE *Aedes aegypti* (L)  
BERDASARKAN DNA PENGKODE *INTERNAL*  
*TRANSCRIBED SPACER 2 (ITS2)***

Oleh:

Zakiyatul Khoiriyah

NIM 111810401038

Pembimbing

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

Dosen pembimbing Anggota : Dr. Rike Oktarianti, M.Si

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “Diversitas Genetik Vektor *Dengue Aedes aegypti* (L) berdasarkan DNA Pengkode *Internal Transcribed Spacer 2* (ITS 2)” telah diuji dan disahkan pada:

Hari, tanggal :

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

**Tim Penguji:**

Ketua,

Sekretaris,

Dr. rer. nat. Kartika Senjarini  
NIP 197509132000032001

Dr. Rike Oktarianti, M. Si.  
NIP 196310261990022001

Anggota I,

Anggota II,

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

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

Mengesahkan

Dekan,

Drs. Sujito, Ph. D.  
NIP 196102041987111001

## RINGKASAN

**Diversitas Genetik Vektor Dengue *Aedes aegypti* (L.) Berdasarkan DNA Pengkode *Internal Transcribe Spacer 2* (TS 2);** Zakiyatul Khoiriyah, 111810401038; 2016: 55 halaman: Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Demam Berdarah Dengue (DBD) merupakan salah satu masalah kesehatan di Indonesia, khususnya di wilayah Jember. DBD merupakan penyakit yang disebabkan oleh Virus Dengue (DENV) dengan vektor utamanya adalah *Ae. aegypti* (L). Pengendalian terhadap kasus DBD telah diusahakan, yakni secara simptomatis untuk mengobati rasa sakit akibat infeksi virus dan juga pengendalian vektor secara mekanis seperti gerakan 3M, pemanfaatan *ovitrap*, abatisasi, dan *fogging*. Namun usaha tersebut kurang efektif karena kurangnya partisipasi masyarakat dan rendahnya monitoring dari pemerintah sehingga kasus DBD masih menjadi masalah. Terdapat tiga faktor yang menyebabkan persebaran DBD tinggi, yaitu lingkungan, sistem imun masyarakat dan kepadatan vektor. Vektor yang mempunyai diversitas yang tinggi maka mempunyai toleransi terhadap lingkungan juga tinggi, sehingga vektor lebih adaptif dan mempunyai kemampuan untuk bertahan hidup lebih besar jika dibandingkan dengan vektor dengan diversitas rendah. Pengamatan diversitas secara genetik dapat menunjukkan identifikasi yang lebih spesifik dan lebih akurat jika dibandingkan pengamatan diversitas secara konvensional. Sehingga pada penelitian ini dilakukan untuk mengetahui diversitas genetik terhadap vektor *Dengue* dari 3 Kecamatan di Jember (Sumbersari, Patrang, dan Tempurejo) berdasarkan sekuen DNA pengkode ITS 2.

Alur penelitian yang dilakukan pada penelitian ini adalah *landing collection* pada tiga kecamatan yang dilanjutkan *rearing* skala lab, pengamatan morfologi, isolasi DNA genom, amplifikasi sekuen pengkode ITS2 dengan PCR menggunakan



primer 5,8 F dan 28 R, sekuensing hasil produk PCR yang sudah dipurifikasi, alignment sekuen data hasil sekuensing dengan database sekuen *Ae. aegypti* ITS 2 dengan menggunakan BLAST *online software*.

Hasil penelitian ini morfologi larva dan imago *Ae. aegypti* Kecamatan Sumbersari, Patrang dan Tempurejo menunjukkan karakter yang sama. Larva mempunyai *siphon* pendek dengan rambut yang terletak di ujung posterior tubuhnya dan terdapat rambut pada bagian abdomen dan kepalanya. Imagonya memiliki ciri pada dorsal thoraxnya terdapat dua garis putih yang diapit oleh sepasang garis lengkung. Imago betina memiliki antena tipe *pilose* dengan mulut tipe penusuk-penghisap, sedangkan imago jantan memiliki antena tipe *plumose* dengan mulut tipe penghisap. Hasil analisis sekuen DNA pengkode ITS 2 menunjukkan presentase kemiripan antara *Ae. aegypti* Kecamatan Sumbersari dengan *Ae. aegypti* Strain Rockefeller sebesar 94%, sedangkan *Ae. aegypti* Kecamatan Patrang dengan *Ae. aegypti* Strain Rockefeller sebesar 99%. Sekuen *Ae. aegypti* Kecamatan Sumbersari dengan *Ae. aegypti* Kecamatan Patrang menunjukkan kemiripan presentase sebesar 94%. Data hasil sekuensing *Ae. aegypti* Kecamatan Tempurejo tidak bisa dilakukan analisis karena hasil sekuensing jelek. Karakter morfologi *Ae. aegypti* Kecamatan Sumbersari, Patrang dan *Ae. aegypti* Strain Rockefeller memiliki karakter yang sama, namun terdapat satu perbedaan yakni sisik pada abdomennya berwarna emas.

## PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah Swt. Atas limpahan rahmat-Nya penulis bisa menyelesaikan skripsi yang berjudul “Diversitas Genetik Vektor *Dengue Aedes aegypti* (L) berdasarkan DNA Pengkode *Internal Transcribed Spacer 2* (ITS 2)”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat 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 pada:

1. Dr. rer.nat Kartika Senjarini, M. Si selaku Ketua “*TBV-BE Research Group*” yang telah meluangkan waktu untuk mendukung serta memberi ijin penulis untuk bergabung di grup riset. Serta selaku dosen pembimbing yang dengan sabar memberikan bimbingan, motivasi dan memberikan arahan serta saran kepada penulis dalam menyelesaikan tugas akhir ini;
2. Dr. Rike Oktarianti, M.Si selaku Dosen Pembimbing dan pemilik proyek yang telah meluangkan waktu untuk memberikan bimbingan dan arahan dengan penuh kesabaran;
3. Dra.Dwi Setyati, M.Si selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan bimbingan dan motivasi selama masa perkuliahan;
4. Prof. Dr. Bambang Sugiharto, S. Si, M. Agr.Ph.D dan Dr. Hidayat Teguh Wiyono, M. Pd. selaku Dosen Penguji yang telah memberikan kritik dan saran yang membangun dalam penulisan skripsi ini;
5. Purnama Okviandari S.P., M.P selaku teknisi Laboratorium Bioteknologi dan Dipl.-Ing. Marlies Witte yang telah banyak membantu dan memberikan nasihat selama penelitian;
6. Bapak dan Ibu dosen serta seluruh staf di Fakultas Ilmu Pengetahuan Alam atas keikhlasannya membantu penilus selama masa perkuliahan;

7. kedua malaikat tanpa sayapku, Abah Zumar Khoirudin (alm) dan Ibu Supini yang telah memberikan kasih sayang, pengorbanan, dukungan dan doa tulus yang tidak terputus;
8. Kakak Nur Azizah Khoiriyah dan Adik Moh. Halim M.M. yang telah memberikan dukungan, doa dan motivasi untuk terus mengejar cita-cita;
9. teman-teman seperjuangan di “*TBV-BE Research Group*” Izzay Afkarina, Dewi Masrurroh, Amatullah Sholihah, Hasa Bella, Suci Ummi R.Q., kakak-kakak: Dwi Esti F, Dewi Riskha, Washilul Arham, Ajeng Maharani S.P., M. Mirza Nuryady, Renam Putra A., Elisa Nurmariana, adik-adik: Nur Hayati, Ika Wahyuni, Weni P., Febri R., Habib, Imro terimakasih atas bantuan, motivasi, dan persaudaraan yang telah terjalin selama ini;
10. teman-teman angkatan 2011, Yuvi, Eriani, Wulan, Retna, Lutfita, Amin, Syafiq, Anis, dan semua teman-teman seperjuangan dan sepenanggungan di Ampibi 2011 terimakasih atas kebersamaan dan persaudaraan yang terjalin selama ini;
11. teman-teman di Pesantren Al-husna, Hilya, Yuni, mbak Wilda, Qoyim, Mahmudah, Ika, Diah, Indri, dan mbak Mia terima kasih atas persaudaraan yang terjalin dan kebersamaan saat suka maupun duka;
12. dan semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu persatu.

Semoga Allah menjaga, melimpahkan rahmat, dan karunia-Nya dan hanya Allah sebaik-baik pembalas kebaikan.

Jember,

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PERSEMBAHAN .....	ii
HALAMAN MOTTO .....	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN.....	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>
<b>1.1 Latar Belakang.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Rumusan Masalah .....</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Tujuan.....</b>	<b>3</b>
<b>1.4 Batasan Masalah .....</b>	<b>3</b>
<b>1.4 Manfaat .....</b>	<b>3</b>
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Diversitas Genetik <i>Ae. aegypti</i> .....</b>	<b>4</b>
<b>2.2 Vektor <i>Dengue</i>.....</b>	<b>6</b>
<b>2.3 <i>Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2)</i> .....</b>	<b>9</b>
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN.....</b>	<b>11</b>
<b>3.1 Tempat dan Waktu Penelitian .....</b>	<b>11</b>
<b>3.2 Alat dan Bahan .....</b>	<b>11</b>

3.2.1 Alat.....	11
3.2.2 Bahan .....	11
<b>3.3 Prosedur Penelitian .....</b>	<b>11</b>
3.3.1 Isolasi DNA Genom .....	12
3.3.2 Amplifikasi ITS 2 .....	12
3.3.3 Purifikasi DNA Hasil PCR .....	13
3.3.4 Sekuensing dan Analisis Sekuen DNA Pengkode ITS 2.....	14
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>15</b>
4.1 Karakter Morfologi <i>Aedes aegypti</i> .....	15
4.2 Karakter Molekuler berdasarkan DNA Pengkode ITS2 .....	19
4.3 Analisis Urutan Nukleotida <i>Ae. aegypti</i> Berdasarkan DNA Pengkode ITS 2.....	21
<b>BAB 5. PENUTUP.....</b>	<b>29</b>
5.1 Kesimpulan.....	29
5.2 Saran .....	29
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>30</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>34</b>

**DAFTAR TABEL**

	Halaman
Tabel 4.1 Kode huruf untuk menginterpretasikan sekuen DNA.....	24
Tabel 4.2 Perbandingan karakter morfologi <i>Ae. aegypti</i> betina Kecamatan Patrang, Sumbersari dan <i>Ae. aegypti clone</i> Aeaeg USA Rs 3_2_2 atau <i>Ae. aegypti</i> strain Rockefeller.....	27
Tabel 4.3 Perbandingan karakter molekuler <i>Ae. aegypti</i> Kecamatan Patrang dan Sumbersari dengan <i>Ae. aegypti clone</i> Aeaeg USA Rs 3_2_2 atau <i>Ae. aegypti</i> strain Rockefeller .....	28

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2. 1 Siklus hidup nyamuk <i>Ae. aegypti</i> .....	7
2. 2 Antena nyamuk jantan dan betina <i>Ae. aegypti</i> .....	8
2. 3 Karakteristik <i>Ae. aegypti</i> dan <i>Ae. albopictus</i> .....	9
4. 1 Larva <i>Ae. aegypti</i> .....	15
4. 2 Thorax bagian dorsal A. <i>Ae. aegypti</i> .....	16
4. 3 Antena dan <i>proboscis</i> <i>Ae. aegypti</i> .....	16
4. 4 Nyamuk Jantan <i>Ae. aegypti</i> .....	17
4. 5 Nyamuk Betina <i>Ae. aegypti</i> .....	17
4. 6 Antena dan <i>proboscis</i> Jantan <i>Ae. aegypti</i> .....	18
4. 7 Antena dan <i>proboscis</i> Betina <i>Ae. aegypti</i> . .....	18
4. 8 Sayap kanan <i>Ae. aegypti</i> .....	18
4. 9 Hasil isolasi genom larva <i>Ae. aegypti</i> .....	19
4.10 Produk PCR ITS2 genom larva <i>Ae. aegypti</i> .....	20
4.11 Daftar spesies dengan sekuen yang memiliki kemiripan dengan sekuen DNA <i>Ae. aegypti</i> Kecamatan Patrang (atas) dan Sumpersari (bawah) berdasarkan data basa nukleotida DNA pengkode ITS 2 pada <i>gene bank database</i> .....	21
4.12 Pensejajaran sekuen DNA <i>Ae. aegypti</i> Kecamatan Sumpersari, Patrang dengan <i>Ae. aegypti clone</i> Aeaeg USA Rs 3_2_2, <i>Ae. aegypti clone</i> Aeaeg USA Rs 3_2_1 dan <i>Ae. aegypti clone</i> Aeaeg F_NC1_2_3.....	22
4.13 Pohon filogeni kedekatan <i>Ae. aegypti</i> Kecamatan Sumpersari, Patrang dengan <i>Ae. aegypti clone</i> Aeaeg USA Rs 3_2_2, <i>Ae. aegypti clone</i> Aeaeg USA Rs 3_2_1 dan <i>Ae. aegypti clone</i> Aeaeg F_NC1_2_3.....	25

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Alur Penelitian.....	34
B. Komposisi Bahan .....	35
C. Sekuen Utuh Hasil Amplifikasi Sekuen DNA Pengkode ITS 2 <i>Ae. aegypti</i> Kecamatan Sumpalsari, Patrang Dan Tempurejo Dengan Primer 5,8 F – 28 R .....	36
D. Hasil pensejajaran Sekuen DNA Pengkode ITS 2 <i>Ae. aegypti</i> Kecamatan Sumpalsari, Patrang Dan Rockefeller Strain.....	37
E. Rumus regresi dan perhitungan manual berat molekul DNA produk PCR	38



## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Virus *Dengue* (DENV) merupakan virus yang menyebabkan penyakit infeksi Demam Berdarah *Dengue* (DBD). Virus ini memiliki empat *serotype* yang berbeda yaitu DEN- 1, DEN- 2, DEN- 3 dan DEN- 4 yang berasal dari genus *Flavivirus*, famili *Flaviridae* (Sembel, 2009). Virus *Dengue* ditularkan melalui vektor nyamuk *Aedes aegypti* (L) (Widyawati *et al.*, 2011). Nyamuk *Ae. aegypti* merupakan vektor primer penularan virus *Dengue* ke manusia karena bersifat antropofilik (Taib, 2006).

Selama ini pengendalian DBD dilakukan dengan cara pengendalian vektor yang bersifat mekanis seperti gerakan 3M menguras, menutup, dan mengubur, pemanfaatan *ovitrap*, abatisasi dan pengasapan dengan pestisida (*fogging*) sudah pernah diprogramkan oleh pemerintah (Nurhayati, 2005). Usaha tersebut belum memberikan hasil yang maksimal karena kurangnya partisipasi dari masyarakat serta lemahnya monitoring dari Dinas Kesehatan. Selain itu, penggunaan pestisida secara terus-menerus menyebabkan nyamuk resisten. Nyamuk yang resisten mempunyai kemampuan menularkan virus *Dengue* lebih tinggi (Hon & Arisanty, 2013).

Ada tiga faktor yang menyebabkan tingginya persebaran DBD, yakni kepadatan vektor, keadaan lingkungan dan imunitas penduduk (Munif *et al.*, 2011). Keragaman genetik pada setiap individu terkait erat dengan kemampuan adaptasi vektor dengan lingkungan sehingga sangat berpengaruh terhadap kepadatan vektor. Suatu organisme dengan keanekaragaman genetik yang tinggi maka semakin tinggi pula kemampuan beradaptasinya (Tabchnick & William, 1998). Hal ini sangat menunjang peningkatan suatu populasi karena organisme dengan keanekaragaman genetik yang tinggi lebih mudah lulus hidup dan berkembangbiak dibandingkan organisme dengan keanekaragaman genetik rendah.

Populasi nyamuk *Ae. aegypti* di Chiang Mai mempunyai keragaman genetik yang tinggi (Urdaneta & Failloux, 2011), begitu juga populasi nyamuk *Ae. aegypti* di Sumatera Selatan (Munif *et al.*, 2011) dan Sumatera Barat (Hon & Arisanty, 2013). Populasi vektor *Dengue Ae. aegypti* yang berasal dari daerah yang berbeda menunjukkan kapasitas vektorial dan kerentanannya terhadap virus *Dengue* juga berbeda (Hon & Arisanty, 2013). Perbedaan ini disebabkan adanya keragaman genetik pada vektor *Dengue*. Keragaman genetik pada setiap individu mempunyai korelasi dengan adaptasinya, sehingga semakin tinggi keragaman genetiknya maka semakin tinggi pula kemampuan beradaptasinya (Munif *et al.*, 2011). Adanya keragaman genetik pada Nyamuk *Ae. aegypti* berpengaruh dalam pengendalian DBD.

Keragaman genetik pada *Ae. aegypti* dapat diketahui melalui struktur genetik, aliran gen dan diferensiasi antar dan inter populasi. Keragaman genetik dapat diketahui dengan menggunakan beberapa marker, diantaranya adalah *matK1*, *rbcL*, *Cytochrome c-Oxydase subunit I* (COI), dan ITS (Chen *et al.*, 2010). ITS merupakan salah satu marker yang digunakan untuk mengetahui keragaman genetik pada makhluk hidup eukariotik. Daerah DNA pengkode ITS dibagi menjadi ITS1 yang berada di ribosom sub unit kecil dan 5,8S rRNA, dan ITS2 yang berada di ribosom sub unit besar dan 5,8S rRNA (Miao *et al.*, 2008).

ITS2 sering digunakan dalam rekonstruksi pohon filogenetik pada tingkat genus dan spesies karena mempunyai sekuen pendek dan relatif mudah untuk diamplifikasi. ITS 2 mempunyai struktur sekunder yang bisa dibandingkan dari karakteristik homologi serta dapat melihat adanya kesalahan yang biasanya disebabkan oleh struktur sekundernya (Miao *et al.*, 2008). Marker molekuler dalam studi keragaman genetik berperan penting dalam upaya melihat adanya karakteristik gen yang berhubungan dengan kompetensi vektor, resistensi terhadap insektisida, dan adaptasi ekologi (Maria, *et al.*, 2011).

Terdapat tiga kecamatan di daerah Jember yang merupakan daerah endemik DBD. Hingga saat ini belum ada penelitian mengenai diversitas genetik berdasarkan

ITS 2 dari vektor *Dengue* yang sebenarnya sangat penting dalam strategi penanggulangan vektor. Dengan demikian, studi mengenai keragaman genetik ini mempunyai kontribusi yang besar dalam pengembangan penanggulangan DBD khususnya di daerah Jember.

## 1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana diversitas genetik *Ae. aegypti* pada tiga kecamatan Kabupaten Jember sebagai daerah endemik DBD berdasarkan DNA pengkode ITS 2?

## 1.3 Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui diversitas genetik pada vektor *Dengue Ae. aegypti* dari tiga kecamatan di Kabupaten Jember berdasarkan DNA pengkode ITS2.

## 1.4 Batasan Masalah

Analisis diversitas genetik dari vektor *Dengue Ae. aegypti* dari tiga kecamatan di Kabupaten Jember pada penelitian ini didasarkan pada DNA pengkode ITS2.

## 1.5 Manfaat

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai diversitas genetik dari vektor *Dengue Ae. Aegypti* Kabupaten Jember dalam penanggulangan vektor DBD.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Diversitas Genetik *Ae. aegypti*

Diversitas genetik merupakan variasi gen pada tingkat spesies yang menimbulkan variasi individu. Adanya variasi ini memungkinkan adanya perubahan spesies seiring dengan perubahan lingkungan (Pratiwi, 2012). Tingginya tingkat diversitas genetik memungkinkan suatu individu mempunyai kemampuan adaptasi yang lebih tinggi terhadap perubahan lingkungan. Besarnya diversitas genetik pada spesies tergantung pada jumlah individu, sistem perkawinan, tingkat isolasi dari populasi dan persebaran spesies (Lowe *et al.*, 2006).

Komposisi genetik dalam populasi ditentukan oleh sistem perkawinan individu, karena hal ini menentukan frekuensi genotip individu generasi berikutnya. Sistem perkawinan juga mempunyai pengaruh besar dalam distribusi dan variasi genetik inter dan antar populasi (Pratiwi, 2012). Sistem perkawinan terarah akan meningkatkan ekspresi alel yang baik, sedangkan sistem perkawinan acak menurunkan frekuensi alel karena bersifat heterozigot (Yatim, 2003).

Spesies mempertahankan hubungan genetiknya melalui aliran gen dalam populasi. Tanpa adanya aliran gen, maka akan terjadi penyimpangan yang dapat mengakibatkan spesiasi (Pratiwi, 2012). Tingkat dan sifat aliran gen tergantung pada modus reproduksi, mobilitas individu dan mekanisme penyebaran gamet dan zigot (Lowe *et al.*, 2006). Keragaman genetik pada vektor *dengue* menyebabkan adanya perbedaan urutan basa nukleotida yang memungkinkan menyandikan protein yang berbeda (Hon & Arisanty, 2013). Sehingga hal ini menyebabkan penampakan fenotip yang berbeda baik dari segi morfologi maupun fisiologi.

Keragaman genetik yang tinggi pada suatu organisme memungkinkan organisme tersebut bertahan hidup dalam waktu yang lebih lama dan adaptif (Hoelzoeel, 1994). Kemampuan yang adaptif ini membuat vektor *Dengue* dapat

bertahan hidup lebih lama dan berkembang biak. Hal tersebut mengakibatkan populasi nyamuk *Ae. aegypti* tinggi dan stabil di alam, yang mendukung persebaran virus *Dengue* sehingga kejadian DBD tetap tinggi.

Wayan (2008) menyatakan bahwa ada dua subspecies nyamuk *Ae. aegypti*, yaitu *Ae. aegypti queenslandensis* dan *Ae. aegypti formosus*. Hasil penelitian Huber *et al.* (2008) menunjukkan bahwa ada dua bentuk morfologi dari nyamuk *Ae. aegypti* di Kedougou (Afrika), yaitu tipe liar yang gelap dan tipe domestik yang terang. Tipe domestik memiliki sisik pucat pada tergit abdomen pertama, sedangkan pada tipe liar tidak.

DNA genom nyamuk *Ae. aegypti* yang diekstraksi oleh Beebe & Cooper (2005) berasal dari berbagai negara Asia Tenggara dan Laut Barat Daya Pasifik. Hasil analisis 46 sampel menggunakan CO1 menunjukkan adanya delapan *haplotype* dengan urutan terpisah. Hasil analisis lima spesimen yang dikoleksi dari Indonesia menunjukkan ada dua *haplotype* yang salah satunya sama dengan *haplotype* yang ada di Vietnam.

Hasil analisis isozim yang dilakukan oleh Huber *et al.* (2008) menunjukkan bahwa 10 lokus isozim pada *Ae. aegypti* yang diteliti merupakan polimorfisme yang menunjukkan 39 alel. Hal yang sama juga terlihat pada hasil penelitian Maria *et al.* (2011), dari 18 lokus isozim yang diteliti tujuh diantaranya menunjukkan polimorfisme. Keragaman genetik yang tinggi juga terlihat pada analisis menggunakan RAPD (*Rapid Amplification Polimorfic DNA*), terdapat 52 penanda pada empat populasi yang diteliti menunjukkan keragaman dari ukuran 300 – 2070 bp (*base pair*).

Hasil penelitian Wesson (1992) menggunakan marker ITS1 dan ITS2 menunjukkan adanya keragaman genetik yang cukup tinggi pada *Ae. aegypti*. Sekuen ITS1 menunjukkan adanya homologi dengan *Drosophilla melanogaster* pada 18S dan 5,8S dan adanya perbedaan susunan basa nitrogen pada tiga sekuen yang berbeda. Sedangkan sekuen ITS2 menunjukkan adanya perbedaan intraspesifik pada *Ae.*

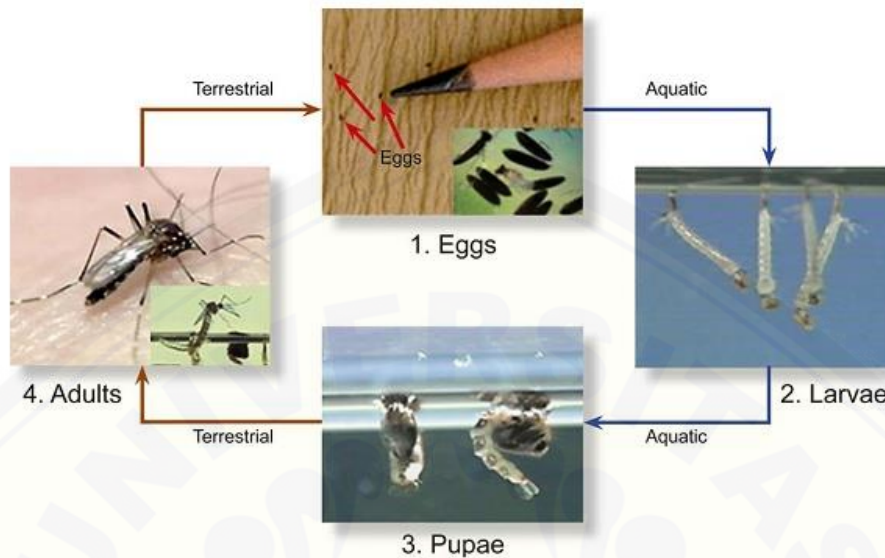
*aegypti* dan *Aedes simpsoni*, perbedaan terjadi pada empat sekuen berbeda. Perbedaan ini disebabkan adanya delesi dan insersi basa nukleotida pada sekuen pengkode ITS.

Kemungkinan adanya keragaman genetik berdasarkan marker molekuler memberikan alasan yang kuat untuk mempelajari dan mengetahui keragaman genetik nyamuk *Ae. aegypti* di daerah Jember karena berpotensi sebagai pendekatan yang baik dalam upaya pengendalian vektor DBD yang hingga saat ini masih menjadi masalah kesehatan dunia.

## 2.2 Vektor *Dengue*

Virus *dengue* merupakan virus yang menyebabkan penyakit DBD. Virus *dengue* ditularkan melalui vektor nyamuk *Ae. aegypti* (Widyawati *et al.*, 2011). Nyamuk *Ae. aegypti* merupakan vektor primer penularan virus *dengue* sedangkan *Aedes albopictus* adalah vektor sekundernya (Taib, 2006). Nyamuk *Ae. aegypti* mengalami metamorfosis sempurna (*holometabola*) yang meliputi empat stadium yaitu telur, larva, pupa dan *imago* (dewasa). Stadium telur hingga pupa berlangsung di dalam air, sedangkan stadium dewasa berada di lingkungan darat dan udara (Wayan, 2008). Siklus hidup *Ae. aegypti* dapat dilihat pada Gambar 2.1. Klasifikasi *Ae. aegypti* menurut Borror *et al.* (1992) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Arthropoda
Kelas	: Insecta
Ordo	: Diptera
Familia	: Cuculidae
Genus	: <i>Aedes</i>
Spesies	: <i>Aedes aegypti</i> L.



Gambar 2.1 Siklus hidup nyamuk *Ae. aegypti* (Sumber: Urdaneta & Failloux, 2011).

Telur *Ae. aegypti* berbentuk elips dan mempunyai permukaan yang *polygonal* dan mempunyai ukuran 0.7 mm yang dibungkus oleh tiga lapisan kulit (Hasyimi, 1993). Nyamuk *Ae. aegypti* betina meletakkan telurnya secara terpisah pada dinding perindukan yang lembab, gelap dan basah, seperti pada bak mandi, pot bunga, ban bekas, tempayan dan barang bekas yang dibuang sembarangan dan dapat menampung air hujan. Seekor nyamuk betina dapat meletakkan rata-rata seratus butir telur tiap sekali bertelur (Ishartadiati, 2010).

Telur *Ae. aegypti* akan menetas menjadi larva jika terendam dalam air. Larva *Ae. aegypti* mengalami empat tahapan perkembangan yang disebut *instar*. Perubahan pada *instar* disebabkan adanya pergantian kulit adat biasa disebut *ecdysis* atau *moulting* (Veriswan, 2006). Keempat tahapan instar diselesaikan dalam waktu empat hingga sembilan hari, kemudian larva akan berubah menjadi pupa. Pupa akan menjadi nyamuk dewasa setelah melewati waktu satu sampai dua hari (Sivanathan, 2006).

Nyamuk *Ae. aegypti* secara morfologi mempunyai gambaran lira (*lire-form*) sepasang pada bagian tengah permukaan dorsal toraks yang berwarna putih. Abdomen umumnya berwarna cokelat hingga hitam dan terkadang memiliki sisik

putih (Ishartadiati, 2010). Setiap segmen tarsal pada kaki belakang memiliki pita basal putih yang membentuk seperti garis-garis (Carpenter & La casse, 1955).

Nyamuk *Ae. aegypti* jantan dan betina dapat dibedakan secara morfologi. Ukuran nyamuk betina umumnya lebih besar dibanding nyamuk jantan. Selain itu terdapat rambut tebal pada antena nyamuk jantan. Antena nyamuk *Ae. aegypti* jantan memiliki tipe *plumose* (rambut tebal) dan pada betina memiliki tipe *pilose* (rambut jarang). Antena nyamuk jantan dan betina *Ae. aegypti* dapat dilihat pada Gambar 2.2.



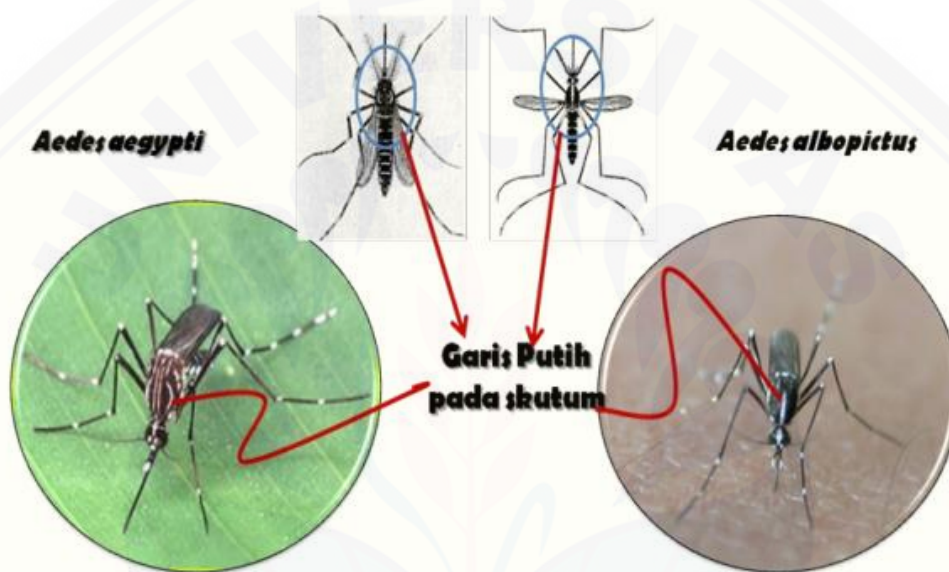
Gambar 2.2. Antena nyamuk jantan dan betina *Ae. aegypti*. Keterangan: A. Antena nyamuk jantan. B. Antena nyamuk betina (Sumber: Ishartadiati, 2010).

Taib (2006) menyatakan bahwa nyamuk *Ae. aegypti* merupakan vektor primer penularan virus *dengue* sedangkan *Ae. albopictus* adalah vektor sekundernya. Keduanya secara morfologi sangat mirip, namun dapat dibedakan dari garis putih yang terdapat pada bagian skutumnya. Skutum *Ae. aegypti* berwarna hitam dan terdapat dua garis lurus putih yang diapit oleh garis lengkung putih. Sedangkan pada *Ae. albopictus* hanya terdapat satu strip putih tebal pada bagian dorsalnya. Karakteristik *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* dapat dilihat pada Gambar 2.3. (Wayan, 2008).

Nyamuk jantan dan betina pada stadium dewasa memanfaatkan gula sebagai sumber energi untuk mempertahankan hidupnya. Namun, nyamuk betina selain membutuhkan sumber energi juga membutuhkan protein yang digunakan dalam produksi dan proses pematangan telurnya (Wayan, 2008). Protein pada darah merupakan sumber protein utama untuk pembentukan dan pematangan telur, oleh karena itu hanya nyamuk betina yang bersifat *haematophagus* (menghisap darah) (Arca *et al.*, 2005).



Hasil penelitian Jirakanjanakit *et al.* (2007) menunjukkan bahwa *Ae. aegypti* hampir sepenuhnya menghisap darah manusia, sedangkan *Ae. albopictus* menghisap darah manusia, kelinci, tikus, anjing, rusa, lembu, sapi, kucing dan burung. Kisaran inang dan preferensinya terhadap inang menentukan status spesies tersebut sebagai vektor utama DBD.



Gambar 2.3 Karakteristik *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* (Wayan, 2008).

### 2.3 Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2)

Sekuen DNA pengkode ITS dapat melepaskan diri pada proses *intron splicing* dari prekursor rRNA (Maroteaux *et al.*, 1985). Daerah pengkode ITS dibagi menjadi ITS1 yang berada pada ribosom sub unit kecil dan 5,8 rRNA dan ITS2 yang berada pada sub unit besar dan 5,8 rRNA. Sekuen ITS2 banyak digunakan dalam rekonstruksi pohon filogenetik karena memperlihatkan perbedaan yang relatif tinggi (Miao *et al.*, 2008). ITS2 mempunyai struktur inti yang terkonservasi, terdiri dari empat heliks, yang mana heliks ketiga adalah yang terpanjang. ITS2 mempunyai struktur sekunder yang dapat membandingkan karakteristik homologi (Colleman, 2003).

Data molekuler yang dianalisis menggunakan *Random Amplified Polymorphic DNA-fingerprint* (RAPD) dan *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) menimbulkan kebingungan dalam analisisnya karena banyak pita DNA yang harus dibandingkan (Miao *et al.*, 2008). Analisis menggunakan CO1 sekuen 693 bp (Waiho, *et al.* (2013), lebih panjang dibandingkan sekuen pengkode ITS2 sehingga data yang perlu dibandingkan juga lebih banyak.

Hasil penelitian Chen *et al.* (2010) menunjukkan tingkat keberhasilan yang tinggi menggunakan marker ITS2, yaitu antara 90,3 % hingga 99,8 % dibandingkan marker molekuler yang lain seperti *psbA-tmH*. Daerah DNA pengkode ITS2 merupakan sekuen yang pendek yakni 120-360 bp, relatif mudah untuk diamplifikasi menggunakan sepasang primer universal (Chen *et al.*, 2010). Coleman (2003) juga menyatakan bahwa ITS2 mempunyai banyak keuntungan, diantaranya adalah sekuennya pendek sehingga mudah dianalisis, perbandingan hubungan dari subspecies hingga tingkat ordo, dan melihat adanya kemungkinan kesalahan yang disebabkan oleh struktur sekunder marker molekuler lain.

## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada Bulan Desember 2014 sampai Maret 2016 di Laboratorium Bioteknologi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

### 3.2 Alat dan Bahan

#### 3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah beaker glass, gelas ukur, eppi *stander*, *freezer*, oven, *sentrifuge*, desikator, mikropipet, tip, eppendorf 1,5 ml, vortex, mesin elektroforesis, UV Iluminator, dan mesin PCR.

#### 3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan yaitu *Homogenizing buffer*, SDS 20%, NaCl 6 M, Buffer TAE (*Tris Acetic EDTA*) 1x, EtBr (*Ethidium Bromide*), 1% gel Agarose, aquadest, ddH<sub>2</sub>O (*double destilate H<sub>2</sub>O*), Isopropanol, Ethanol 70%, Loading dye, 2x Master Mix (Intron), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM (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*, 1,25 µl forward primer 5,8F (5 pmol/µl, konsentrasi akhir 0,25 pmol/µl), 1,25 µl reverse primer 28R (5 pmol/µl, konsentrasi akhir 0,25 pmol/µl) dan 2 µl ekstrak DNA, DNA ladder 100bp dan DNA ladder 1kb sebagai marker, 200 µl buffer NT, buffer NT3, 15-50 µl buffer NE (5 mM Tris/HCL, pH 8.5).

### 3.3 Prosedur Penelitian

Larva nyamuk *Ae. aegypti* yang digunakan dalam penelitian ini yaitu larva nyamuk *isofemale* (berasal dari satu induk) yang berasal dari tiga Kecamatan di Jember yaitu Sumbersari, Tempurejo dan Patrang.

### 3.3.1 Isolasi DNA Genom

Metode yang digunakan untuk isolasi DNA Genom larva nyamuk *Ae. aegypti* adalah metode *Salt Extraction*. Prinsip dari metode ini adalah dengan cara menghomogenkan larva nyamuk *Ae. aegypti* dengan menggunakan buffer dan kemudian disentrifus hingga mendapatkan DNA Genom larva nyamuk *Ae. aegypti* (Aljanabi & Martinez, 1997).

Sebanyak lima larva nyamuk *Ae. aegypti* dimasukkan dalam tabung eppendorf 1,5 ml dan disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  selama 10 menit. Larva beku diekstraksi dengan cara ditambahkan 500  $\mu\text{l}$  *homogenizing buffer* dan dihomogenkan menggunakan mikropistil. Kemudian ditambahkan 40  $\mu\text{l}$  SDS 20 % dan 8  $\mu\text{l}$  dari 20 mg/ml proteinase K dan diinkubasi pada  $65^{\circ}\text{C}$  *overnight*. Suspensi tersebut ditambahkan 300  $\mu\text{l}$  NaCl 6M, divortex kecepatan maksimum lalu disentrifus selama 30 menit,  $4^{\circ}\text{C}$ , 12.000 rpm. Supernatan dipindahkan kedalam tube baru dan ditambahkan isopropanol *equal volume* lalu inkubasi  $-20^{\circ}\text{C}$  selama satu jam. Kemudian disentrifus selama 20 menit,  $4^{\circ}\text{C}$ , 12.000 rpm dan supernatan dibuang. Pellet yang mengandung DNA dicuci menggunakan *ethanol* 70 %. Selanjutnya pellet dikeringkan menggunakan desikator dan di rehidrasi dengan ddH<sub>2</sub>O. Kemudian dilakukan running DNA genom, atau dapat disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ .

DNA genom dapat dilihat melalui proses elektroforesis, yaitu dengan menambahkan 2  $\mu\text{l}$  *loading dye* pada 5  $\mu\text{l}$  sample DNA, selanjutnya dimasukkan ke sumuran gel agarose yang mengandung EtBr. DNA ladder 1kb digunakan sebagai marker. Elektroforesis dilakukan pada 100 V selama 30 menit menggunakan buffer TAE sebagai *running buffer*. Selanjutnya divisualisasi menggunakan UV-Illuminator untuk melihat ada tidaknya pita DNA Genom.

### 3.3.2 Amplifikasi ITS2

DNA ITS2 diamplifikasi menggunakan primer DNA pengkode ITS2 yaitu 5.8F (5' TGT GAA CTG CAG GAC ACA TG 3') dan 28R (5' ATG CTT AAA TTT AGG GGG TA 3'). Konsentrasi dari reaktan adalah 0,2  $\mu\text{M}$  untuk setiap primer, 200

$\mu\text{M}$  dNTP, 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 20 mM  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ , 75 mM Tris-HCl (pH 8,8) dan 0,01% satu unit *Thermoprime Plus DNA Polymerase* (Walton *et al.*, 2007).

Amplifikasi PCR dalam 25  $\mu\text{l}$  campuran yang berisi 2  $\mu\text{l}$  DNA template, 8  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O steril, 12,5  $\mu\text{l}$  PCR Master Mix (Intron), 2,5  $\mu\text{l}$  primer ITS2 (10 pmol/ $\mu\text{l}$ , konsentrasi akhir 10 pmol/ $\mu\text{l}$ ). Gradien temperatur 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 1 menit dan 72 °C selama 1 menit yang diikuti oleh *final extension* selama 5 menit (Walton *et al.*, 2007). Produk PCR sebanyak 5  $\mu\text{l}$  dirunning pada 1 % gel *agarose* yang telah ditambahkan EtBr untuk mengetahui kualitas DNA sebelum dilakukan pemurnian. DNA ladder 1 kb sebagai marker. Elektroforesis dilakukan pada 80 V selama 60 menit menggunakan buffer TAE sebagai *running buffer*. Selanjutnya divisualisasi menggunakan UV-Illuminator.

### 3.3.3 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 ditimbang sebanyak 100 mg, kemudian dimasukkan tabung eppendorf 1,5 ml 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 1 menit sehingga cairan pada kolom akan berpindah ke tabung koleksi, yang nantinya dibuang, dan kolom NucleoSpin Extract II diletakkan kembali pada tabung koleksi. Selanjutnya ditambahkan 700  $\mu\text{l}$  buffer NT3 (buffer pencuci) dan di sentrifugasi 12.000 rpm selama dua menit untuk mencuci sampel. Penghilangan sisa *ethanol* dilakukan dengan inkubasi 70 °C selama 2-5 menit. Kemudian dan kolom NucleoSpin Extract II dipindahkan ke tabung eppendorf steril 1,5 ml. Sampel DNA pada kolom dielusi menggunakan 15-50  $\mu\text{l}$  buffer NE dan diinkubasi pada suhu ruang selama 1 menit.

Sentrifugasi dilakukan pada 12.000 rpm selama 1 menit untuk mendapatkan DNA murni.

#### 3.3.4 Sekuensing dan Analisis Sekuen DNA Pengkode ITS 2

Sekuensing dilakukan dengan mengirimkan DNA hasil purifikasi dari produk PCR ke First Base Singapore. Selanjutnya dilakukan *editing* dan analisis menggunakan Bioedit software (Tom Hall, Ibit Therapeutics) terhadap data kasar yang didapat. Setelah diketahui *alignment* sekuen DNA pengkode ITS 2 dari masing-masing sampel maka sekuennya dibandingkan dengan *database* gen pengkode ITS 2 di Gene Bank menggunakan BLAST online software yang diakses melalui [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Hubungan kekerabatan dapat dilihat dari domain struktur, posisi, jumlah pasangan basa nitrogen, dan jumlah pasangan basa G-C yang dibandingkan dengan data base lalu dianalisis. Analisis dilakukan dengan cara komputasi yakni menggunakan software Mega6 yang akan menghasilkan pohon filogeni.

## BAB 5. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Morfologi larva dan nyamuk (imago) *Ae. aegypti* Kecamatan Patrang, Sumpersari dan Tempurejo menunjukkan karakter yang sama. Sekuen pengkode ITS 2 pada *Ae. aegypti* Kecamatan Patrang dan Kecamatan Sumpersari menunjukkan kemiripan dengan *Ae. aegypti* Strain Rockefeller dengan presentase kemiripan sebesar 99% dan 94% secara berurutan. Sedangkan diversitas genetik *Ae. aegypti* Kecamatan Patrang dengan Kecamatan Sumpersari cukup tinggi dengan presentase kemiripan hanya 94%. Sekuen Kecamatan Sumpersari menunjukkan adanya 9 basa nitrogen yang tidak sama, insersi 6 basa nitrogen dan 2 basa nitrogen delesi jika dibandingkan dengan Kecamatan Patrang. Adanya perbedaan genetik sekuen pengkode ITS2 pada kedua kecamatan ini memungkinkan adanya pengendalian vektor yang berbeda.

### 5.2 Saran

Hendaknya dilakukan sekuensing kembali terhadap sampel dari Kecamatan Tempurejo agar dapat dilakukan analisis kekerabatannya. Penelitian ini dapat dilanjutkan dengan menganalisis *Ae. aegypti* pada Kecamatan lain sehingga didapatkan informasi kekerabatan utuh.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Aljanabi, S. M., Martinez, I., Rural, S., Norte, W. C. P., & Brasilia, C. E. P. 1997. *Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques*, 25(22), 4692–4693.
- Arca, B., Lombardo, F. Valenzuela, J. G., Fransiscehetti, I. M. B., Marinoutti, O., Coluzzi, M., & Riberio, J. M. 2005. An Updated Catalogue of Salivary Gland Transkripts in the Adult Female Mosquito, *Anopheles gambiae*. *The Journal of Experimental Biology*. Vol. 208:3971-3986.
- Arensburger, P., Hice, R., Wright, J., Craig, N., Atkinson, P. 2011. *The Mosquito Aedes aegypti has a Large Genome Size and High Transposable Element Load But Contains A Low Proportion of Transposon-Spesific PiRNAs*. *BMC Genomics* 12:606. <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/12/606>.
- Banarjee, A. K., Arora, N., Murty, U., 2007. How Far is ITS 2 Reliable as A Marker for The Mosquito Genera?. *Electronic Journal of Biology* 2007. vol3 (3):61-68.
- Bechet, M. B. 2000. *Bacterial Genome Structure: Genome Size*. France: Lyoni University.
- Beebe, N. W., Whelan, P. I., van den Hurk, A., Ritchie, S., & Cooper, R. D. 2005. Genetic diversity of the dengue vector *Aedes aegypti* in Australia and implications for future surveillance and mainland incursion monitoring. *Communicable Diseases Intelligence Quarterly Report*, 29(3), 299–304. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16220869>.
- Boror, D, J., C. A. Triphehom, N. F. Johnson. 1992. *Pelajaran Pengenalan Serangga*. Yogyakarta: UGM Press.
- Budowle, B. DiZinno, J.A., Wirsol, M.R. 2000. *Interpretation Guidelines for Mitochondrial DNA Sequencing*. Washington: Scientific Analysis Section FBI Academy.
- Carpenter, S. J, & La casse, W. J. 2005. *Mosquitoes of North America (North of Mexico)*. California: University of California Press Berkeley, CA. 360 pp.
- Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C., Song, J., Shi, L., & Zhu, Y. 2010. *Validation of the ITS2 Region as a Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant Species*, 5(1), 1–8. doi:10.1371/journal.pone.0008613.



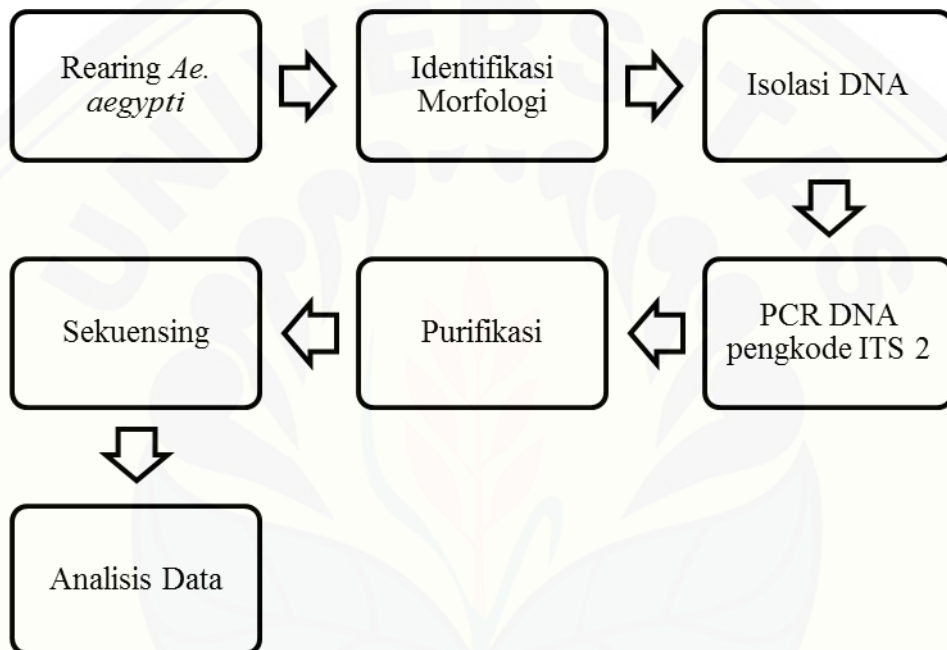
- Colleman, P. G, Alphey, L. 2003. *Genetic Control of Vector Population: an imminent prospect*. Trop Med. Int. Health 9: 433-437.
- Craig G.B. Jr., & Vandehey, R.C., 1962. Genetic Variability in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) I Mutation Affecting Color Pattern. *Ann Entomol Soc Am.* 1962; 55: 47-58.
- Hasyimi, O. M. 1993. *Aedes aegypti sebagai Vektor Demam Berdarah Dengue Berdasarkan Pengamatan di Alam, III(02)*, 16–18.
- Hon, D., & Arisanty, D. 2013. *Characterization of vector DNA microsatellite Dengue Hemorrhagic Fever ( DHF ) Aedes aegypti with Enrichment Method*, 347–356.
- Hoelzel, A.R. 1994. *Molecular Genetic Analysis of Population. A Practical Approach*, IRL. Press. Oxford University Press:71-74.
- 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. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 79 (2), 218 – 219. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18689628>
- Ishartadiati, K. 2010. *Aedes Aegypti sebagai Vektor Demam Berdarah Dengue*. Surabaya: Fakultas Kedokteran Universitas Wijaya Kusuma.
- Jirakanjanakit, N, S. Saengtharapip, P. Rongkoparut, S. Duchon, C. Bellec, S. Yoksan. 2007. Trend of Temephos Resistance in *Aedes (stegomyia)* Mosquitos in Thailand During 2003-2005. *Environ. Entomol.* 36 (3): 506-511.
- Lowe, A. S. Haris, P. Asthon. 2006. *Ecological Genetics (Design Analysis and Application)*. Singapore: Blackwell Publishing.
- Maria, J., Fraga, E. C., Maia, J. F., & Tadei, W. P. 2011. *Genetic Diversity in Dengue Mosquito , Aedes aegypti ( Diptera : Culicidae ) from Amazon Region : Comparative Analysis with Isozymes and RAPD Loci*, 11–19.
- Maroteaux L, Herzog M, & Soyer-Gobillard M.O. 1985. Molecular organization of dinoflagellate ribosomal DNA: evolutionary implications of the deduced 5.8S rRNA secondary structure. *Biosystems* 18: 307—319
- Miao, M., Warren, A., Song, W., Wang, S., Shang, H., & Chen, Z. 2008. *Analysis of the Internal Transcribed Spacer 2 ( ITS2 ) Region of Scuticociliates and Related Taxa ( Ciliophora , Oligohymenophorea ) to Infer their Evolution and Phylogeny*, 159(October). doi:10.1016/j.protis.2008.05.002

- Munif, A., Aryati, Y., & Hasyimi, M. 2011. *Karakteristik Kemiripan Genetik Nyamuk Aedes aegypti di Daerah Endemis Demam Berdarah Dengue di Kota Palembang, Provinsi Sumatera Selatan*. Prov, 93–102.
- Nene, V., Wortman, J., Lawson, D., Hass, B., Hass, D., Kodra, C., Tujzhijian, Loftus, B. 2007. *Genome Sequence of Aedes aegypti, a Major Arbovirus Vector*. Vol. 316, Issue 5832. 22 June 2007. Sciecemag.
- Nurhayati, S. 2005. *Prospek pemanfaatan radiasi dalam pengendalian vektor penyakit demam berdarah dengue*, 17–23.
- Prakash, V., Green, R.D., Ranade, S.P., Saravanan, S., Prakash, N., Venkitachalam, R., Cutberth, R., Rahmani, A. R., Cunningham, A. A., 2007. Recent Changes in Population of Resident Gyps Vultures in India. *Journal of the Bombay Natural History Society*, 104 (2) May-Aug (2007).
- Pratiwi, P. 2012. *Analisis Variasi Genetik Beberapa Populasi Globba leucantha Miq. di Sumatera Barat dengan Random Amplified Polimorphic DNA (RAPD)*. Sumatera Barat: Universitas Andalas.
- Schenkel C. D., & Mathis, A. 2013. *Loop Mediated amplification for the Identification of Invasive Aedes mosquitoes*. Unpublished Journal. Zurich: University of Zurich, Parasitology Department.
- Sembel, D. T. 2009. *Entomologi Kedokteran*. Yogyakarta: UGM Press.
- Sivanathan, M. M. 2006. *"The Ecology and Biology of Aedes aegypti (L.) and Aedes albopictus (skuse) (Diptera : Culicidae) and the Resistance Status of Aedes albopictus (Field Strain) Against Organophosphates in Penang Malaysia"*. Thesis. Penang: University Sains Malaysia Penang.
- Taib, B. 2006. Penyakit Demam Berdarah Dengue pada Anak. *Majalah Ilmiah Unimus*. Vol. 1 (1): 50-56.
- Tabachnick W. J., & William C. B., 1998. Population Genetics in Vector Biology. Paper Training Course. *The Biology of Disease Vector*. New Dehli 417-437.
- The gene pool. 2009. *Sanger Sequencing Troubleshooting Guide*. UK.
- Urdaneta-marquez, L., & Failloux, A. 2011. Population genetic structure of Aedes aegypti , the principal vector of dengue viruses. *"Infection, Genetics and Evolution"*, 11(2), 253–261. doi:10.1016/j.meegid.2010.11.020

- Veriswan, I. 2006. "Perbandingan Efektivitas Abate dengan Papain dalam Menghambat Pertumbuhan Larva *Aedes aegypti*". Tidak diterbitkan. Artikel Ilmiah. Semarang: Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
- Verna, T. N. & Munstermann, L. E., 2011. Morphological Variants of *Aedes aegypti* Collected From The Leeward Island of Antigua. NIH Public Access. *J. Ann Mosq Control Assoc.* 2011. September: 27 (3): 308-311.
- Waiho, K., Fazhan, H., Shahreza, M. S., & Zaleha, K. 2013. Isolation and Characterization of Partial Mitochondrial CO1 Gene from Harpacticoid Copepod *Leptocaris canariensis* (Lang, 1965). *African Journal of Biotechnology.* Vol 12 (50). pp. 6091-6906, 11 Desember 2013. DOI: 10.5897/AJB11.2064.
- Walker, K. 2006. *Asian Tiger Mosquito (Aedes albopictus) Pest and Disease Image Library*. Update on 29/08/2006.
- Wallis, G. P. & Tabachnick, W. J. 1990. Genetic Analysis of Rock Hole and Domestic *Aedes aegypti* on The Caribbean Island of Anguilla. *J Am Mosq Control Assoc.* 1990; 6: 625-630.
- Walton, C., Somboon, P., O'Loughlin, S. M., Zhang, S., Harbach, R. E., Linton, Y. M., Butlin, R. K. 2007. Genetic diversity and molecular identification of mosquito species in the *Anopheles maculatus* group using the ITS2 region of rDNA. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 7(1), 93–102. doi:10.1016/j.meegid.2006.05.001.
- Wayan, S. I. 2008. *Pengendalian Terpadu Vektor Virus Demam Berdarah Dengue Aedes aegypti (Linn.) dan Aedes albopictus (Diptera: Culicidae)*. Tidak diterbitkan. Artikel Ilmiah. Bali: Universitas Udayana.
- Wesson, D. M., Charles, H.P. & Frank, H.P. 1992. Sequence and Secondary Structure Comparisons of ITS rDNA in Mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Molecular phylogenetics and Evolution.* Vol 1. No 4 December. Pp. 253-269.
- Widyawati., Irene, F., Syarifah, S., Rudy, P., Tambunan., Tri, E. B & Soesilo.. 2011. Penggunaan Sistem Informasi Geografi Efektif Memprediksi Potensi Demam Berdarah di Kelurahan Endemik. *Makar Kesehatan.* Vol. 15 (1): 21-30.
- Yatim, W. 2003. *Genetika*. Bandung: Tarsito.

LAMPIRAN

Lampiran A. Alur Penelitian



**Lampiran B. Komposisi Bahan**

## B1. Komposisi Larutan

No	Nama Larutan	Bahan	Komposisi	Keterangan
1.	Homogenizing Buffer (per 50 ml)	Tris-Cl 1 M	0,5 ml	
		EDTA 0,5 M	0,2 ml	
		NaCl 0,4 M	1,16 gr	
		Aquadest	± 45 ml	
2.	SDS 20 % (per 10 ml)	SDS	2 gr	
		Aquadest	10 ml	
3.	NaCl 6M (per 10 ml)	NaCl	17,4 gr	
		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	10 ml	
		Xylenecianol	1 ujung	
		Bromophenol Blue	tusuk gigi	
6.	EDTA 0,5 M (per 100 ml)	EDTA	14,6 gr	
		NaOH	2 gr	
		Aquadest	100 ml	
7.	TAE 50 X (per 100 ml)	Tris-Base	24,2 gr	
		Asam Acetat Glacial	5,71 ml	PH = 8,0
		0,5 M EDTA	10 ml	
		Aquadest	± 70 ml	
8.	Agarose 1,5 % (per 80 ml)	Agarose	1,2 gr	
		TAE 1X	80 ml	

**Lampiran C. Sekuen Utuh Hasil Amplifikasi Sekuen DNA Pengkode ITS 2 *Ae. aegypti* Kecamatan Sumpalsari, Patrang Dan Tempurejo Dengan Primer 5,8 F – 28 R**

**C1. Kecamatan Sumpalsari**

TTTTGAAATGCAGGACACACGAACACAGACACGTTGAACGCATATTGCAC  
ATCGTACTACCAGTAYGATGTACACATTTTTGAGTGCCTATATTTATCCAT  
TCAAMTATACGCGCCGCCCGCGGCGCGTATGYGTAGTGATGTTTTCCCGC  
STTCAGTGCGCGGTAAAACAYTGAAGATAGTCAGACGTGGGTGGTGACAC  
ACCCCGCGGKTGATGAATACATCCCCTAGGCGCGCTCGCTCGCCTTGTG  
TGGTGTATTCCATCATTCACTAACTAACTAGCTAACTCTCTA

**C2. Kecamatan Patrang**

TTGTGAACTGCAGGACACATGAACACCGACACGTTGAACGCATATTGCAC  
ATCGTACTACCAGTACGATGTACACATTTTTGAGTGCCTATATTTATCCAT  
TCAACTATACGCGCCGCCCGCGGCGCGTATGCGTAGTGATGTTTTCCCGC  
CTTCAGTGCGCGGTAAAACATTGAAGATAGTCAGACGTGGTGTGGTGACA  
CACCGCGGTTGAWGAATACATCCCCTATGGCGCGCTCGCTCGCCTTGTG  
TTGTATTCCATCATTCACTAACTAACTAGCTAACTCTCTATAGTAGGCCTC  
AAATAATGTGTGACTACCCCTAAATTTAAGCATA

**C3. Kecamatan Tempurejo**

TTGTGTTGTGCAGTGCACGACAACACAGACACGTTGASTACGSATATTRY  
ACACCRTACTACAGTACRATGYACWCATTTYTGAGTGSMTWTATTTTATC  
YATTCAAAYTSWRCWCGGCCAAGCCCGKGYAMGSGTAGKGACGCKTTTCY  
TKGCGWCAGTAMAAAYRTWMAAKATAGTCWRAYGYGGCGCGCCGGGMC  
GTWCGCYGGACGCSGCGGTTTSRTGARTACAWYCCATACGCGACMYACCC  
ATACGTGTGTCSTTGTGTTGATTCCRTSATCCATGCCATGCCATGCCATGCCT  
CCTATCAGAKMGRTGAGGYTMGCCTCAGATGAGGCGACACTACAACTA  
AATTATAGCATA

**Lampiran D. Hasil pensejajaran Sekuen DNA Pengkode ITS 2 *Ae. aegypti* Kecamatan Summersari, Patrang Dan Rockefeller Strain.**

D1. Hasil pensejajaran sekuen DNA pengkode ITS 2 *Ae. aegypti* Kecamatan Summersari dengan Rockefeller Strain

Range 1: 1 to 291 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
457 bits(247)	7e-125	278/295(94%)	6/295(2%)	Plus/Plus
Query 1	TTTTGAAATGCAGGACACACGAACACAGACACGTTGAACGCATATTGCACATCGTACTAC			60
Sbjct 1	TTGTGAACTGCAGGACACATGAACACCGACACGTTGAACGCATATTGCACATCGTATTAC			60
Query 61	CAGTAYGATGTACACATTTTTGAGTGCCTATATTTATCCATTCAAMTATACGCGCGCCC			120
Sbjct 61	CAGTACGATGTACACATTTTTGAGTGCCTATATTTATCCATTCAACTATACGCGCGCCC			120
Query 121	GCGGCGCGTATGYGTAGTGATGTTTTCCCGCSTTCAGTGCGCGGTAAAACAYTGAAGATA			180
Sbjct 121	GCGGCGCGTATGCGTAGTGATGTTTTCCCGCCTTCAGTGCGCGGTAAAACATTGAAGATA			180
Query 181	GTCAGACGTGG-GTGGTGACACACCCCGCGKGTGATGAATACATCCCCTA-GGCGCGCT			238
Sbjct 181	GTCAGACGTGGTGTGGTGACACA--CCGCGTTGATGAATACATCCCCTATGGCGCGCT			238
Query 239	CGCTCGCCTTGTGTGGTGTATTCCATCATTCACTAACTAACTAGCTAACTCTCTA			293
Sbjct 239	CGCTCGCCTTGTGT--TGTATTCCATCATTCACTAACTAACTAGCTAACTCTCTA			291

D2. Hasil pensejajaran sekuen DNA pengkode ITS 2 *Ae. aegypti* Kecamatan Patrang dengan Rockefeller Strain

Range 1: 1 to 335 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
610 bits(330)	6e-171	333/335(99%)	0/335(0%)	Plus/Plus
Query 1	TTGTGAACTGCAGGACACATGAACACCGACACGTTGAACGCATATTGCACATCGTACTAC			60
Sbjct 1	TTGTGAACTGCAGGACACATGAACACCGACACGTTGAACGCATATTGCACATCGTATTAC			60
Query 61	CAGTACGATGTACACATTTTTGAGTGCCTATATTTATCCATTCAACTATACGCGCGCCC			120
Sbjct 61	CAGTACGATGTACACATTTTTGAGTGCCTATATTTATCCATTCAACTATACGCGCGCCC			120
Query 121	GCGGCGCGTATGCGTAGTGATGTTTTCCCGCCTTCAGTGCGCGGTAAAACATTGAAGATA			180
Sbjct 121	GCGGCGCGTATGCGTAGTGATGTTTTCCCGCCTTCAGTGCGCGGTAAAACATTGAAGATA			180
Query 181	GTCAGACGTGGTGTGGTGACACACCGCGGTTGAWGAATACATCCCCTATGGCGCGCTCG			240
Sbjct 181	GTCAGACGTGGTGTGGTGACACACCGCGGTTGATGAATACATCCCCTATGGCGCGCTCG			240
Query 241	CTCGCCTTGTGTGTATTCCATCATTCACTAACTAACTAGCTAACTCTCTATAGTAGGCC			300
Sbjct 241	CTCGCCTTGTGTGTATTCCATCATTCACTAACTAACTAGCTAACTCTCTATAGTAGGCC			300
Query 301	TCAAATAATGTGTGACTACCCCTAAATTTAAGCA		335	
Sbjct 301	TCAAATAATGTGTGACTACCCCTAAATTTAAGCA		335	

D3. Hasil pensejajaran sekuen DNA pengkode ITS 2 *Ae. aegypti* Kecamatan Sumpersari dengan Patrang

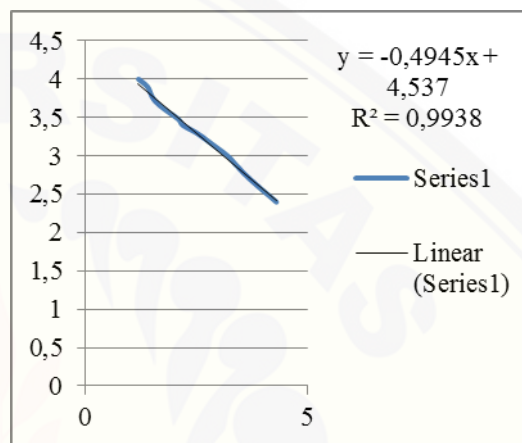
Range 1: 1 to 291 [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
459 bits(248)	6e-134	278/295(94%)	6/295(2%)	Plus/Plus
Query 1	TTTTGAAATGCAGGACACACGAACACAGACACGTTGAACGCATATTGCACATCGTACTAC			60
Sbjct 1	TTGTGAACTGCAGGACACATGAACACCGACACGTTGAACGCATATTGCACATCGTACTAC			60
Query 61	CAGTAYGATGTACACATTTTTGAGTGCCTATATTTATCCATTCAAMTATACGCGCCGCC			120
Sbjct 61	CAGTACGATGTACACATTTTTGAGTGCCTATATTTATCCATTCAACTATACGCGCCGCC			120
Query 121	GCGGCGCGTATGYGTAGTGATGTTTTCCCGCSTTCAGTGCGCGGTAAAACAYTGAAGATA			180
Sbjct 121	GCGGCGCGTATGCGTAGTGATGTTTTCCCGCCTTCAGTGCGCGGTAAAACATTGAAGATA			180
Query 181	GTCAGACGTGG-GTGGTGACACACCCCGCGGKTGATGAATACATCCCCTA-GGCGCGCT			238
Sbjct 181	GTCAGACGTGGTGTGGTGACACA--CCGCGGTTGAWGAATACATCCCCTATGGCGCGCT			238
Query 239	CGCTCGCCTTGTGTGGTGATTCATCATTCACTAACTAACTAGCTAACTCTCTA			293
Sbjct 239	CGCTCGCCTTGTGT--TGTATTCCATCATTCACTAACTAACTAGCTAACTCTCTA			291



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

Ukuran marker	Jarak (cm)	LOG ukuran marker
10000	1,2	4
8000	1,4	3,903089987
6000	1,5	3,77815125
5000	1,6	3,698970004
4000	1,8	3,602059991
3000	2,1	3,477121255
2500	2,2	3,397940009
2000	2,5	3,301029996
1500	2,8	3,176091259
1000	3,2	3
750	3,4	2,875061263
500	3,7	2,698970004
250	4,3	2,397940009



1. Patrang =  $(-0,4945 \times 3,9) + 4,537$   
 = 2,60845  
 BM = Antilog (2,60845)  
 = 405,928926 pb
2. Sumbersari =  $(-0,4945 \times 3,9) + 4,537$   
 = 2,60845  
 BM = Antilog (2,60845)  
 = 405,928926 pb
3. Tempurejo =  $(-0,4945 \times 3,8) + 4,537$   
 = 2,6579  
 BM = Antilog (2,6579)  
 = 454,883307 pb

