



**IDENTIFIKASI VEKTOR POTENSIAL MALARIA ASAL  
BANGSRING BANYUWANGI BERDASARKAN MARKA  
MOLEKULER *INTERNAL TRANSCRIBED SPACER 2 (ITS2)***

**SKRIPSI**

Oleh

**Lailly Nur Uswatul Hasanah**

**NIM 141810401006**

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

**2018**



**IDENTIFIKASI VEKTOR POTENSIAL MALARIA ASAL  
BANGSRING BANYUWANGI BERDASARKAN MARKA  
MOLEKULER *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

**Lailly Nur Uswatul Hasanah**

**NIM 141810401006**

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

**2018**

## PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Kedua orang tua tercinta Bapak Mafakir dan Ibu Susanti yang telah memberikan kasih sayang, doa'a, semangat dan pengorbanan yang tak terhitung jumlahnya;
2. Guru-guru dan dosen yang telah memberikan dan menularkan ilmu dan pengetahuannya dengan ikhlas;
3. Almamater Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

**MOTTO**

“Optimislah jangan putus asa dan menyerah tanpa usaha. Berbaik sangkalah kepada Rabb. Dan, tunggulah segala kebaikan dan keindahan dari-Nya”

(Al-Qorni, 2004)<sup>\*</sup>



---

\* Al-Qorni, 'A. 2004. *La Tahzan*. Jakarta : Qisthi Press.

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Lailly Nur Uswatul Hasanah

NIM : 141810401006

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah berjudul “Identifikasi Vektor Potensial Malaria Asal Bangsring Banyuwangi Berdasarkan Marka Molekuler *Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2)*” 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

Lailly Nur Uswatul Hasanah  
NIM 14181040100

**SKRIPSI**

**IDENTIFIKASI VEKTOR POTENSIAL MALARIA ASAL  
BANGSRING BANYUWANGI BERDASARKAN MARKA  
MOLEKULER *INTERNAL TRANSCRIBED SPACER 2 (ITS2)***

Oleh

Lailly Nur Uswatul Hasanah  
NIM 141810401006

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dr.rer.nat. Kartika Senjarini, S.Si. M.Si.  
Dosen Pembimbing Anggota : Syubbanul Wathon, S.Si. M.Si.

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “Identifikasi Vektor Potensial Malaria Asal Bangsring Banyuwangi Berdasarkan Marka Molekuler *Internal Transcribed Spacer 2* (ITS2)”, karya Lailly Nur Uswatul Hasanah 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

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

Aanggota II

Anggota III

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

Mukhamad Su’udi, S.Si., M.Sc., Ph.D.  
NIP. 760016788

Mengesahkan  
Dekan,

Drs. Sujito, Ph.D  
NIP. 102041987111001

## RINGKASAN

Identifikasi Vektor Potensial Malaria Asal Bangsring Banyuwangi Berdasarkan Marka Molekuler *Internal Transcribed Spacer 2* (ITS2); Lailly Nur Uswatul Hasanah ; 141810401006; 2018; 43 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Malaria merupakan penyakit yang disebabkan oleh Plasmodium dan ditransmisikan oleh nyamuk Anopheles betina ketika *blood feeding*. Kasus malaria banyak terjadi di negara-negara tropis termasuk Indonesia. Salah satu daerah di Indonesia yang dinyatakan sebagai daerah endemik malaria adalah Desa Bangsring kecamatan Wongsorejo Kabupaten Banyuwangi. Anopheles memiliki keanekaragaman tinggi. Terdapat sekitar 460 spesies Anopheles di seluruh dunia, namun hanya beberapa yang dinyatakan sebagai vektor malaria. Salah satu spesies Anopheles yang dinyatakan sebagai vektor potensial malaria adalah *Anopheles vagus*. Berdasarkan penelitian sebelumnya, *An. vagus* merupakan spesies Anopheles yang mendominasi di desa Bangsring Banyuwangi. Selain itu, berdasarkan karakteristik morfologi ditemukan variasi intraspesies *An. vagus* dan dikategorikan sebagai subspecies *An. vagus*. Subspecies *An. vagus* tersebut adalah *An. vagus vagus* dan *An. vagus limosus*.

Pengumpulan nyamuk (*landing collection*) Anopheles di desa Bangsring Banyuwangi dilakukan tiga kali. Seluruh spesies Anopheles dipisahkan berdasarkan karakter morfologinya. Dua subspecies *An. vagus* diidentifikasi berdasarkan karakter morfologi. Pedoman identifikasi spesies Anopheles asal Bangsring Banyuwangi yaitu buku kunci determinasi (Reid, 1978). Identifikasi morfologi dua subspecies *An. vagus* difokuskan pada bagian proboscis dan *prehumeral* sayap. Nyamuk *An. vagus vagus* dan *An. vagus limosus* sebagian dijadikan insektarium dan dikonfirmasi di Balai B2P2VRP Salatiga: Balai Besar Litbang Vektor dan Reservoir Penyakit untuk dilakukan konfirmasi.

Hasil tiga kali *landing collection* Anopheles di desa Bangsring Banyuwangi, spesies *An. vagus* merupakan spesies dengan jumlah terbanyak yaitu 584 dari 684 total spesies Anopheles yang ditemukan. Secara morfologi *An. vagus vagus* dan *An. vagus limosus* asal Bangsring Banyuwangi memiliki perbedaan di



bagian proboscis dan *prehumeral* sayap. Proboscis *An. vagus vagus* memiliki gelang pucat di bagian ujung (setelah labelum) sedangkan *An. vagus limosus* proboscis hitam seluruhnya. Adapun bagian *prehumeral* sayap kedua spesies ini juga tampak berbeda yaitu *prehumeral* sayap *An. vagus vagus* terdapat sisik putih, sedangkan *An. vagus limosus* seluruhnya hitam tanpa sisik putih.



## PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Identifikasi Vektor Potensial Malaria Asal Bangsring Banyuwangi Berdasarkan Marka Molekuler *Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2)*”. 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.

Penyusun skripsi ini tidak lepas dari bantuan dan do’a dari berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

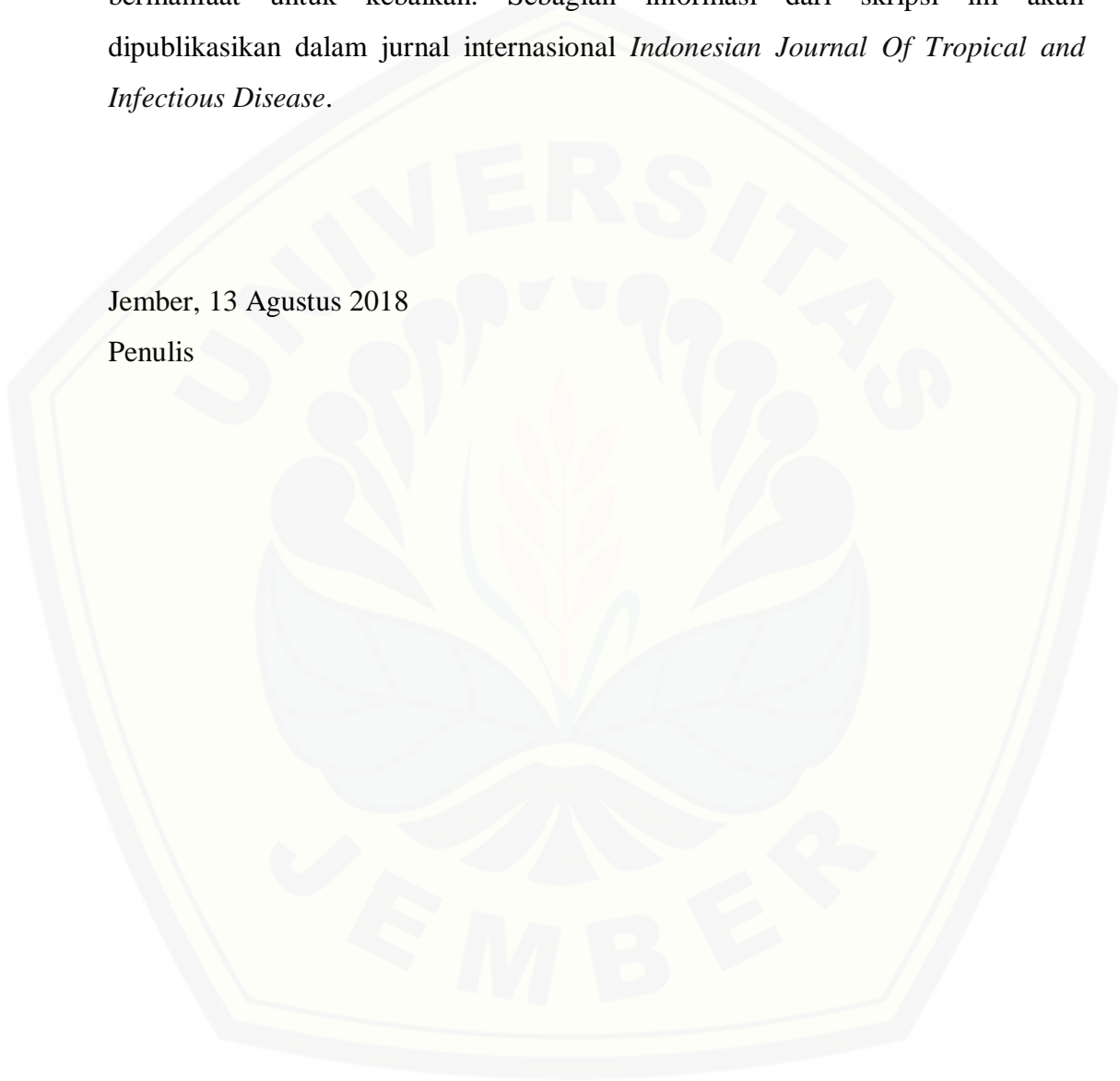
1. Ibu Dr.rer.nat. Kartika Senjarini, S.Si., M.Si. selaku Dosen Pembimbing Utama dan Bapak Syubbanul Wathon, S.Si., M.Si. selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran dan perhatian guna memberika bimbingan demi terselesainya penulisan skripsi ini;
2. Ibu Dr. Dra. Rike Oktarianti, M.Si. dan Bapak Mukhamad Su’udi, S.Si., M.Sc., Ph.D. selaku Dosen Penguji I dan II yang banyak memberikan saran demi kesempurnaan skripsi ini;
3. Ibu Dr. Dra. Retno Wimbaningrum, M.Si. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberika bimbingan akademik serta do’a selama menempuh masa kuliah;
4. Seluruh Dosen jurusan Biologi atas nasihat, bimbingan, dan pengetahuan yang telah dibagikan selama penulis menjadi mahasiswa;
5. Ibu Dina Fitria, Ibu Endang, Ibu Evi dan Ibu Ulfa selaku teknisi laboratorium jurusan Biologi;
6. Kakak tingkat anggota Kelompok Riset Vektor Biologi, Kakak Aisyah, Kakak Fitria, Kakak Esti, Kakak Dewi dan Kakak Ika yang membantu dalam proses penelitian;
7. Fianda Deviyastuti, Iis Maghfiroh, Aria Fransisca B.S, Nur Amalina Fauziah, Ratna Safitri dan Iffah Ali Maziun yang telah memberi semangat, do’a dan bantuan selama proses penelitian;
8. Teman-teman satu angkatan Biologi 2014 atas dukungan dan do’a;

9. 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. Sebagian informasi dari skripsi ini akan dipublikasikan dalam jurnal internasional *Indonesian Journal Of Tropical and Infectious Disease*.

Jember, 13 Agustus 2018

Penulis



DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	ii
<b>HALAMAN MOTTO</b> .....	iii
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	iv
<b>HALAMAN PEMBIMBING</b> .....	v
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	vi
<b>RINGKASAN</b> .....	vii
<b>PRAKATA</b> .....	ix
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xi
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xiii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xiv
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xv
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	2
1.3 Tujuan.....	3
1.4 Batasan Masalah.....	3
1.5 Manfaat Penelitian.....	3
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	4
2.1 Malaria dan Distribusinya.....	4
2.2 Pengendalian Vektor Malaria .....	6
2.3 Diversitas Vektor Malaria.....	8
2.4 Marka Molekuler DNA .....	10
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN</b> .....	12
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian .....	12
3.2 Alat dan Bahan.....	12
3.2.1 Alat.....	12
3.2.2 Bahan.....	12
3.3 Prosedur Penelitian.....	13
3.3.1 Peparasi alat dan bahan .....	13
3.3.2 Landing collection <i>An. vagus vagus</i> dan <i>An. vagus</i> <i>limosus</i> .....	13
3.3.3 Isolasi DNA genom.....	13
3.3.4 Elektroforesis hasil isolasi DNA genom .....	14
3.3.5 Amplifikasi sekuen ITS2 <i>An. vagus vagus</i> dan <i>An. vagus</i> <i>limosus</i> menggunakan <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	14
3.3.6 Pemurnian DNA hasil PCR .....	15
3.3.7 Sekuensing dan analisis sekuen <i>ITS2</i> .....	16

<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	18
4.1 Karakter Morfologi <i>An. vagus vagus</i> dan <i>An. vagus limosus</i> .....	18
4.2 Karakterisasi <i>An. vagus vagus</i> dan <i>An. vagus limosus</i> Berdasarkan Marka Molekuler ITS2 . <b>Error! Bookmark not defined.</b>	
<b>BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....	29
5.1 Kesimpulan .....	29
5.2 Saran .....	29

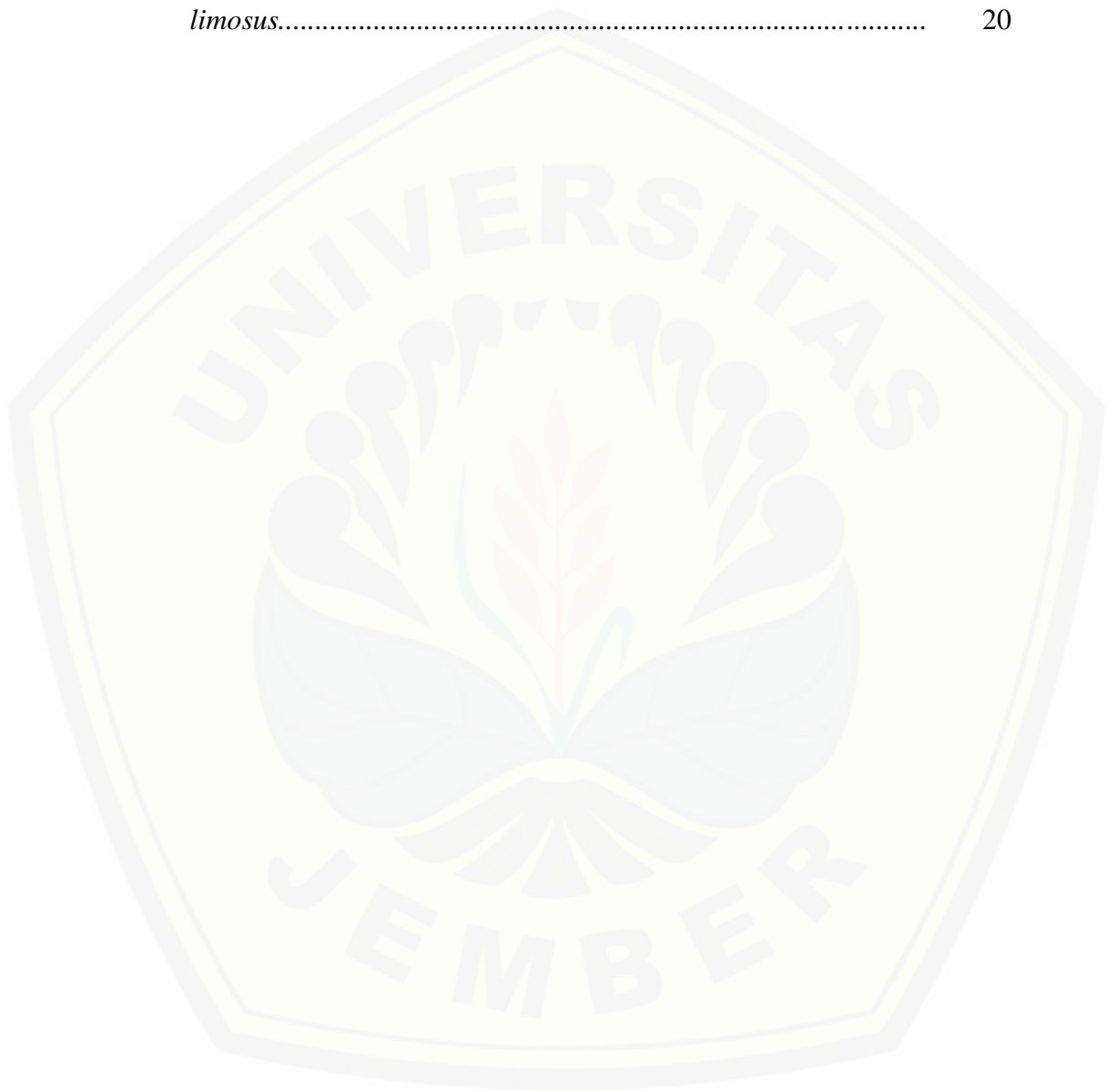
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	30
-----------------------------	----

<b>LAMPIRAN</b> .....	39
-----------------------	----

- A. Komposisi bahan dalam satu reaksi PCR **Error! Bookmark not defined.**
- B. Pengaturan gradien suhu pada alat PCR **Error! Bookmark not defined.**
- C. Informasi primer ITS2 yang digunakan **Error! Bookmark not defined.**
- D. Komposisi Larutan .....
- E. Komposisi spesies *Anopheles* hasil *landing collection* di  
Bangsring Banyuwangi..... 39
- F. Sekuen Utuh Hasil Amplifikasi ITS2 . **Error! Bookmark not defined.**
- G. Hasil pensejajaran sekuen ITS2 *An. vagus vagus* dan *limosus*  
dengan sekuen ITS2 di GeneBank..... **Error! Bookmark not defined.**

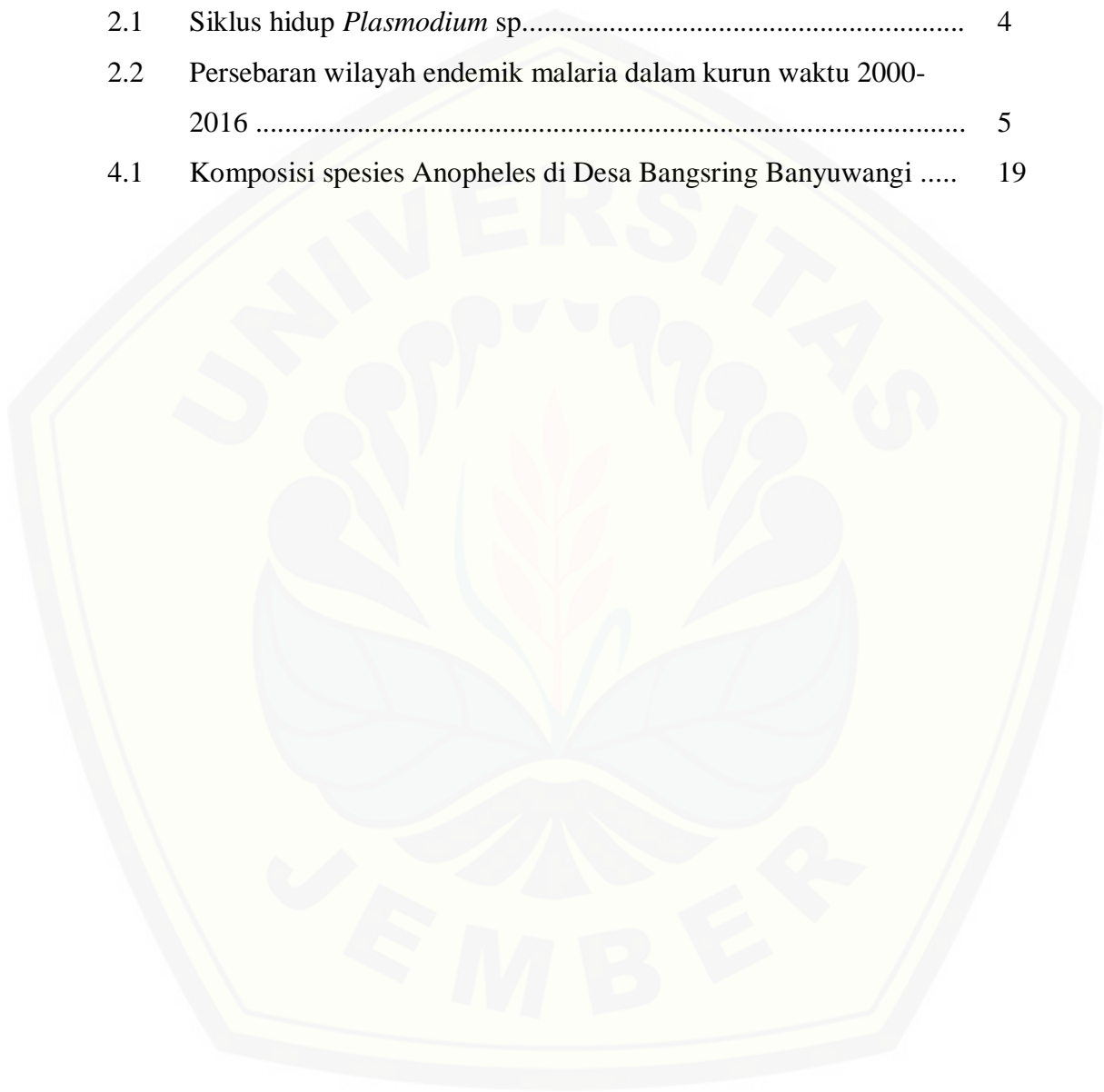
**DAFTAR TABEL**

	Halaman
4.1 Perbandingan karakter morfologi <i>An. vagus vagus</i> dan <i>An. vagus limosus</i> .....	20



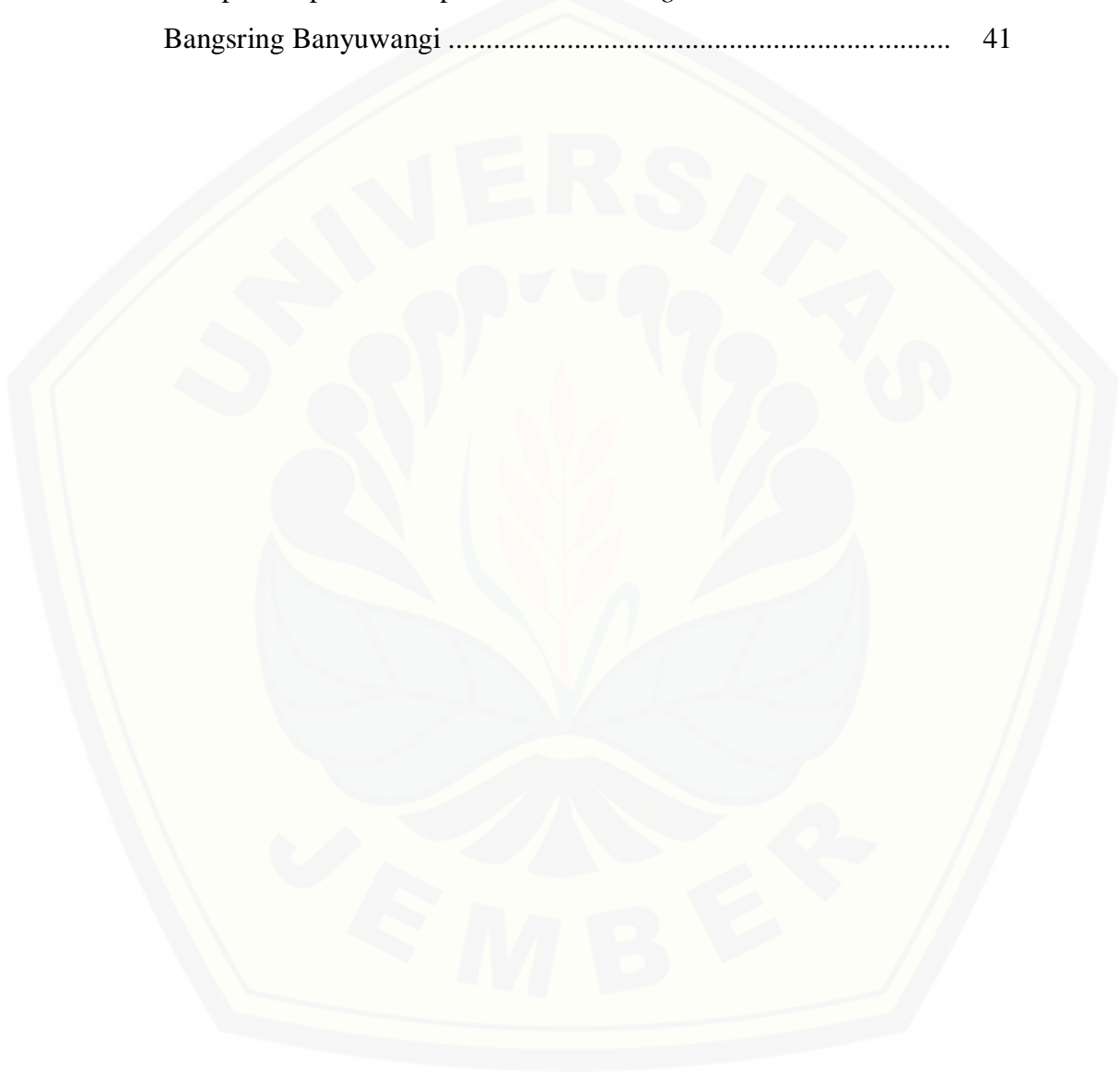
**DAFTAR GAMBAR**

	Halaman
2.1 Siklus hidup <i>Plasmodium</i> sp.....	4
2.2 Persebaran wilayah endemik malaria dalam kurun waktu 2000- 2016 .....	5
4.1 Komposisi spesies Anopheles di Desa Bangsring Banyuwangi .....	19



**DAFTAR LAMPIRAN**

	Halaman
A. Komposisi spesies Anopheles hasil <i>landing collection</i> di Bangsring Banyuwangi .....	41





## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Malaria merupakan *vector borne disease* yang disebabkan oleh Plasmodium dan ditransmisikan ke tubuh inang dalam fase *sporozoit* (Aly, *et.al.*, 2009). Terdapat lima spesies Plasmodium penyebab malaria diantaranya *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* dan *P. knowlesi* (Autino *et.al.*, 2012 ; Barber, *et.al.*, 2017). Sampai saat ini malaria masih menjadi masalah kesehatan dunia, khususnya di daerah endemik yang banyak tersebar di daerah tropis. *World Health Organization* dalam *World Malaria Report 2016* menyebutkan bahwa jumlah kasus dan daerah endemik malaria terus mengalami penurunan sejak tahun 2000-2016. Hal yang sama juga terjadi di Indonesia, dimana angka *annual parasite incidence* (API) juga terus mengalami penurunan dalam kurun waktu 2011-2015 (Kementerian Kesehatan, 2016). Namun demikian, hingga tahun 2016 Indonesia masih dinyatakan sebagai negara endemik malaria. Salah satu daerah di Indonesia yang menjadi daerah endemik malaria adalah Banyuwangi, tepatnya di desa Bangsring kecamatan Wongsorejo.

Nyamuk *Anopheles* yang dapat mentransmisikan Plasmodium ke tubuh manusia. Sebagian kecil dari spesies *Anopheles* merupakan vektor malaria. Di Indonesia, sebanyak 22 spesies dinyatakan sebagai vektor malaria (Bonne, 1953). *Anopheles vagus* merupakan salah satu spesies yang potensial sebagai vektor malaria dan sejak tahun 2014 *An. vagus* merupakan spesies yang mendominasi populasi *Anopheles* di desa Bangsring. *An. vagus* mempunyai dua subspecies yaitu *An. vagus vagus* dan *An. vagus limosus* (Reid, 1968; Cagampang & Darsie, 1970).

Di beberapa daerah endemik malaria ditemukan spesies sibling *Anopheles*. Spesies sibling merupakan spesies-spesies yang mempunyai kemiripan ciri morfologi serta terjadi isolasi reproduksi dalam satu populasi (Sukowati, *et.al.*, 2005). Identifikasi spesies sibling sangat penting karena antar spesies sibling mempunyai perbedaan kapasitas vektorial. Spesies sibling sangat

sulit dibedakan secara morfologi, sehingga identifikasi secara morfologi tidak cukup. Teknik identifikasi saat ini sudah merambah ke ranah molekuler menggunakan sekuen tertentu dari genom untuk mengidentifikasi suatu organisme atau yang disebut *DNA barcoding*. Sekuen DNA yang umum digunakan untuk identifikasi nyamuk adalah *Internal Transcribed Spacer 2 (ITS 2)* (Walton, *et.al.*, 2007), *cytochrome c oxidase subunit I (CO1)*, *cytochrome c oxidase subunit II (COII)* (Dusfour, *et.al.*, 2004) dan *third domain (D3)* dari gen 28S (Alam, *et.al.*, 2006). Identifikasi organisme berbasis molekuler tidak hanya dapat lebih spesifik dalam menentukan spesies tetapi juga dapat memprediksikan tingkat kekerabatan antar spesies berdasarkan similaritas sekuen DNA (Norris & Norris 2015).

Marka molekuler yang digunakan untuk mengidentifikasi spesies *An. vagus* adalah sekuen *internal transcribed spacer 2 (ITS2)* yang merupakan *nuclear DNA* (nrDNA). ITS2 merupakan *noncoding region* yang terletak diantara gen 5.8S pengkode sub-unit kecil ribosomal RNA (rRNA) dengan gen 28S pengkode sub-unit besar rRNA (Norris & Norris, 2015). Penggunaan ITS2 sebagai DNA marker memiliki keuntungan sekuen berukuran pendek sehingga mudah diamplifikasi menggunakan PCR, dapat menunjukkan tingkat kekerabatan dekat antar spesies (Norris & Norris, 2015), mempunyai tingkat variabilitas tinggi interspesies dan terkonservasi intraspesies, serta dapat menentukan spesies sibling (Fang, *et.al.*, 2017). Oleh karena *An. vagus* memiliki sibling spesies yang sulit dibedakan dengan hanya menggunakan ciri morfologi maka diperlukan identifikasi secara molekuler. Identifikasi molekuler sibling spesies *An. vagus* dilakukan menggunakan marka molekuler ITS2.

## 1.2 Rumusan Masalah

Bagaimanakah karakteristik molekuler *An. vagus vagus* dan *An. vagus limosus* asal Desa Bangsring Banyuwangi berdasarkan marka molekuler DNA pengkode *Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2)*?

### 1.3 Tujuan

Tujuan penelitian ini adalah mengidentifikasi dua sub-spesies *An. vagus* yaitu *An. vagus vagus* dan *limosus* asal Bangsring Banyuwangi berdasarkan marka molekuler DNA pengkode *Internal Transcribed Spacer 2* (ITS2)

### 1.4 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah identifikasi difokuskan pada vektor potensial malaria dua sub-spesies *Anopheles vagus* yaitu *An. vagus vagus* dan *An. vagus limosus* asal Bangsring Banyuwangi. Perbedaan karakter morfologi akan dikorelasikan dengan kemungkinan perbedaan karakter molekuler berdasarkan DNA pengkode ITS2.

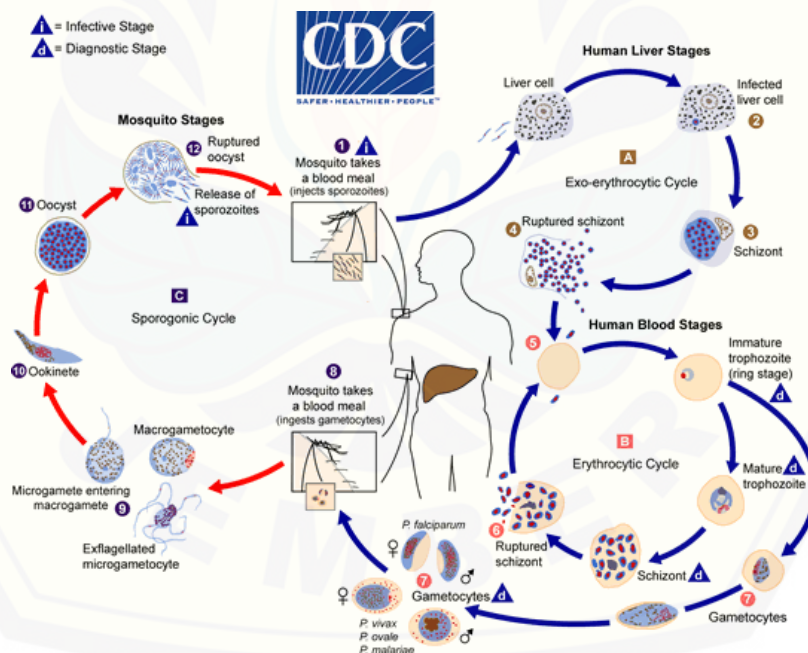
### 1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah informasi mengenai karakteristik morfologi dan molekuler dua sub-spesies *Anopheles vagus* yaitu *An. vagus vagus* dan *An. vagus limosus*. Ketepatan identifikasi vektor potensial dapat meningkatkan efisiensi pengendalian vektor malaria.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Malaria dan Distribusinya

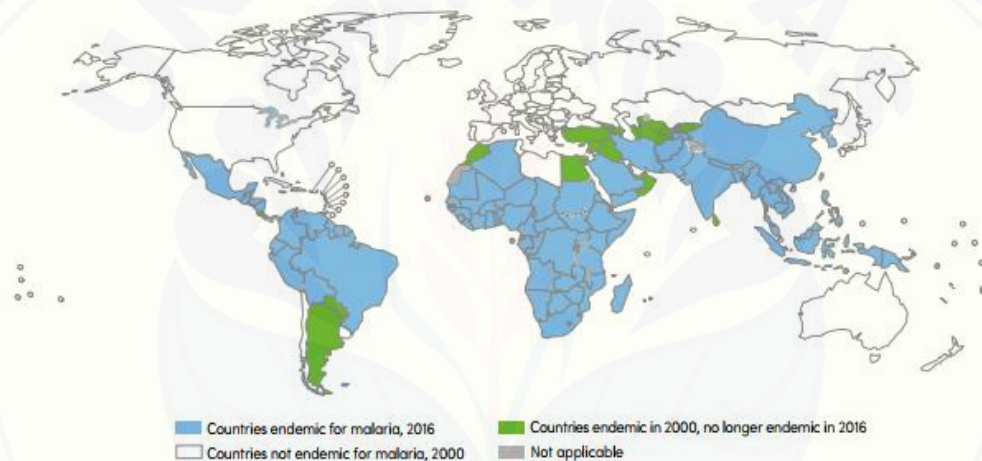
Malaria merupakan penyakit yang disebabkan oleh protozoa genus *Plasmodium*. Terdapat lima spesies yang dinyatakan sebagai parasit penyebab malaria yaitu *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* (Amanfo *et.al.*, 2016) dan *P. knowlesi* (Lubis, *et.al.*, 2017). *Plasmodium* yang banyak menyebabkan malaria di Indonesia adalah *P. falciparum*, *P. vivax* (Elyazar, *et.al.*, 2011) dan *P. knowlesi* (Lubis, *et.al.*, 2017). *Plasmodium* dalam fase *gametocyte* hingga *oocyst* hidup dalam *midgut* *Anopheles* betina, kemudian *oocyst* berkembang menjadi *sporozoite* dan bermigrasi pada kelenjar saliva dan ditransmisikan ke tubuh manusia ketika *blood feeding* (Hillyer, *et.al.*, 2007).



Gambar 2. 1 Siklus hidup *Plasmodium* sp.  
(Centers for Disease Control and Prevention : CDC)

Malaria banyak terjadi di daerah endemik malaria yang tersebar di wilayah tropis (Gunathilaka, *et.al.*, 2015), akan tetapi beberapa kasus malaria dilaporkan juga terjadi di daerah non-endemik seperti yang terjadi di Berlin, Jerman. Kasus

tersebut terjadi pada orang yang pernah melakukan *traveling* ke Columbia (Zoller, *et.al.*, 2009) dan Rodríguez, *et.al.* (2011) menyatakan bahwa Columbia merupakan daerah endemik malaria. Kasus malaria di daerah non-endemik dapat terjadi melalui infeksi malaria non-vektorial diantaranya *congenital malaria*, *human travelling*, *transfusion-transmitted malaria*, *post-transplant malaria*, dan *parenteral transmission* (Velasco, *et.al.*, 2017). *Congenital malaria* yaitu infeksi malaria yang terjadi pada bayi karena ibunya positif malaria (Rai, *et.al.*, 2015). Kasus malaria yang disebabkan oleh *human travelling* ke daerah endemik malaria atau daerah yang beresiko malaria dapat terjadi melalui dua cara yaitu *airport malaria* dan *introduced malaria* (Velasco, *et.al.*, 2017).



Gambar 2. 2 Persebaran wilayah endemik malaria dalam kurun waktu 2000-2016 (WHO, 2016)

Menurut Autino *et.al.*, (2012) endemisitas suatu daerah ditentukan oleh beberapa faktor yang terkait dengan parasit, vektor, lingkungan, serta interaksi antara manusia dengan vektor. Daerah tropis mempunyai temperatur lingkungan yang ideal untuk perkembangbiakan *Anopheles* (Afrane, *et.al.*, 2012). Perkembangan, distribusi dan tingkat survavilitas Arthropoda sangat ditentukan oleh temperatur lingkungan (Lindsay, *et.al.*, 1996), sebagai contoh *Anopheles* tidak survive di dataran tinggi Afrika karena temperatur lingkungan yang rendah, berbeda dengan dataran rendah di Afrika yang mempunyai temperatur lingkungan yang hangat sehingga mendukung perkembangbiakan *Anopheles* (Afrane, *et.al.*,

2007). Temperatur di wilayah tropis dan sub tropis tidak hanya mendukung perkembangbiakan *Anopheles* sebagai vektor malaria, tetapi juga Plasmodium sebagai parasit penyebab malaria, sehingga kasus malaria banyak terjadi di daerah tropis dan subtropis (Beck-Johnson, *et.al.*, 2013).

Pada tahun 2016 sebagian besar negara-negara di Afrika, Amerika, Mediterania, Asia, Pasifik Barat masih dinyatakan sebagai daerah endemik malaria (WHO, 2016). Diantara negara-negara di Asia, Indonesia termasuk ke dalam negara dinyatakan endemik malaria. Hampir seluruh daerah di Indonesia menjadi daerah endemik malaria (Elyazar *et.al.*, 2011). Desa Bangsring kecamatan Wongsorejo Kabupaten Banyuwangi merupakan salah satu daerah endemik malaria di Jawa Timur (Mardiana *et.al.*, 2003).

## 2.2 Pengendalian Vektor Malaria

Tercatat awal tahun 2016 negara endemik malaria mengalami penurunan dari 108 menjadi 98. Penurunan jumlah daerah endemik memberikan dampak positif terhadap jumlah kasus infeksi malaria yang juga mengalami penurunan. Sejak tahun 2000-2015 kasus infeksi malaria di dunia menurun hingga 62% (WHO, 2016). Meskipun demikian, malaria tetap menjadi perhatian dunia. Penurunan jumlah negara endemik dan kasus infeksi malaria tidak lepas dari upaya-upaya pengendalian vektor (Hemingway, *et.al.*, 2016).

Pengendalian vektor malaria menjadi salah satu fokus dalam upaya pengendalian malaria. Upaya pengendalian vektor merupakan upaya meminimalisir kontak vektor-manusia dan menekan populasi vektor malaria di suatu daerah dengan menekan populasi larva ataupun nyamuk dewasa yang dapat dilakukan secara kimiawi dan biologi. Secara kimiawi pemberantasan larva *Anopheles* dilakukan dengan pemberian larvasida di tempat perindukan *Anopheles*. Secara biologi larva *Anopheles* dapat ditekan populasinya dengan pembiakan *microbial insecticides* seperti *Bacillus thuringiensis* yang mempunyai senyawa toksik sehingga menyebabkan kematian larva, selain itu agen biologis lain yang dapat digunakan untuk menekan populasi larva *Anopheles* adalah

membiarkan *larvivorous fish*. Adapun Anopheles dewasa dapat ditekan populasinya dengan *indor residual spraying (IRS)* dan *cattle shelter indoor residual spraying*. Upaya meminimalisir kontak vektor-manusia dapat dilakukan dengan perlindungan secara fisik (penggunaan lotion anti nyamuk, baju panjang dll.), penggunaan *insecticide-treated mosquito net (ITN)*, *house screening*, dan *zooprophylaxis* (Elyazar, *et.al.*, 2011).

Beberapa jenis insektisida yang sering digunakan untuk membasmi nyamuk Anopheles adalah *Dichloro Diphenyl Trichloroethane (DDT)*, *Pyrethroids*, *Malathion* (Collins, *et.al.*, 2000), *carbamate* dan *organophosphat* (WHO, 2016). Penggunaan insektisida dapat menekan populasi Anopheles dewasa akan tetapi telah dilaporkan bahwa penggunaan insektisida jenis *Pyrethroid* secara berlebihan memicu terjadinya resistensi vektor, seperti *An. gambiae*, *An. arabiensis*, *An. funestus* di sebagian besar negara Afrika dilaporkan resisten terhadap *Pyrethroid* (Ranson, *et.al.*, 2011). Berdasarkan data tahunan WHO (2016), *Phyrethroid* merupakan jenis insektisida yang paling tinggi menyebabkan resistensi vektor di wilayah Afrika, *Eastern mediterania*.

*Repellent* adalah bahan-bahan kimia yang mempunyai kemampuan untuk menjauhkan serangga dari manusia sehingga dapat dihindari gigitan serangga atau gangguan oleh serangga terhadap manusia (Wilson, *et.al.*, 2014). *N,N-diethyl-m-toluamide (DEET)* adalah salah satu contoh *repellent* yang tidak berbau, akan tetapi menimbulkan rasa terbakar jika mengenai mata, luka atau jaringan membranous (Chen-Hussey, *et.al.*, 2013). Selain menggunakan *Repellent*, upaya meminimalisir kontak nyamuk dengan manusia adalah tidur menggunakan kelambu anti nyamuk atau yang lebih dikenal *Long Lasting Insecticidal Nets (LLINs)* (Ntuku, *et.al.*, 2017).

Menurut WHO (2016) dalam *Guideline for Laboratory and Field Testing of Long LLINs* adalah kelambu berinsektisida (kelambu yang sudah dilapisi racun serangga) mampu menurunkan tingkat mortalitas yang disebabkan malaria. Meskipun *LLINs* dapat mengurangi insiden dan mortalitas malaria pada beberapa daerah endemi malaria, beberapa hasil penelitian lain menunjukkan bahwa di daerah malaria dengan endemisitas yang lebih tinggi (*hiperendemi* dan *holo-*

*endemi*) penggunaan kelambu anti nyamuk memberikan hasil yang tidak signifikan dan justru menimbulkan resistensi terhadap jenis insektisida yang menempel pada kelambu (*Djèntonin, et.al., 2009*).

### 2.3 Diversitas Vektor Malaria

*Anopheles* sp. merupakan serangga yang masuk ke dalam ordo Diptera, family Culicidae (Gunathilaka et.al., 2015). Terdapat lebih dari 460 spesies *Anopheles* yang ditemukan di seluruh dunia, namun hanya sekitar 100 spesies yang dilaporkan sebagai vektor malaria (Kamareddine, 2012). Terdapat 68 jenis *Anopheles* di Indonesia, tetapi yang dinyatakan sebagai vektor hanya sekitar 22 spesies (Bonne, 1953). Spesies *Anopheles* yang sering ditemukan di daerah endemik di Indonesia antara lain *An. sudaicus*, *An. aconitus*, *An. balabacensis*, *An. maculatus*, *An. subpictus* (Sumatri & Iskandar, 2009). Berikut adalah sistematika *Anopheles* sp.

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).

Spesies *Anopheles* yang ditemukan disuatu daerah tidak semuanya berperan sebagai vektor malaria. Spesies *Anopheles* dinyatakan sebagai vektor malaria apabila diketahui sering kontak dengan manusia, dominasinya tinggi, umurnya panjang serta telah dikonfirmasi di tempat lain sebagai vektor malaria (Kazwaini dan Mading, 2014). Berdasarkan preferensi dalam aktivitas *blood-*



*feeding*, terdapat tiga tipe *Anopheles* sp. yaitu *Anopheles* yang bersifat zoofilik, antropofilik dan zoo-antropofilik (Norris & Norris, 2015). *Anopheles* yang bersifat antropofilik berpotensi sebagai vektor primer karena kontak langsung dengan manusia. *Anopheles* yang bersifat zoofilik berpotensi sebagai vektor sekunder malaria (Sukowati, *et.al.*, 2005). Preferensi dalam aktivitas *blood feeding* suatu spesies di wilayah berbeda dapat menunjukkan karakteristik yang berbeda (Norris & Norris, 2015) sehingga status vektorial spesies di suatu wilayah juga dapat berbeda dengan wilayah lain.

Spesies yang ditemukan di Bangsring, Banyuwangi adalah *An. sundaicus*, *An. vagus*, *An. subpictus*, *An. flavirostris*, *An. barbirotris*, *An. annularis*, dan *An. indefinitus* (Shinta, *et.al.*, 2003). Spesies *Anopheles* yang ditemukan merupakan vektor bagi penularan malaria. Status *An. subpictus* dan *An. barbirotris* yang ditemukan di pantai utara kabupaten Manggarai Flores Barat telah dikonfirmasi merupakan vektor primer malaria (Lee *et.al.*, 1983). *An. barbirotris* merupakan salah satu spesies yang mempunyai distribusi luas di seluruh kepulauan di Indonesia, kendati demikian *An. barbirotris* hanya berperan sebagai vektor malaria di daerah Sulawesi dan Flores (Horsfall, 1955) sedangkan di daerah Sulawesi, Timor dan Flores menjadi vektor *filariasis* (Reid, *et.al.*, 1979). Di Jawa dan Sumatera *An. barbirotris* tidak berperan sebagai vektor malaria (Ramachandra, 1984).

*An. vagus* merupakan spesies *Anopheles* yang umum ditemukan pada semua tempat perkembangbiakan dan telah ditetapkan sebagai vektor malaria di Bangladesh (Beier *et.al.*, 1987). Adapun status *An. vagus* telah dikonfirmasi sebagai vektor sekunder malaria di Kabupaten Sukabumi (Munif *et.a.*, 2008). Spesies *Anopheles* lain yang juga berpotensi sebagai vektor malaria yaitu *An. sundaicus*. Spesies ini ditetapkan sebagai vektor malaria yang potensial di beberapa tempat termasuk Jawa, Bali, Sumatera, Kalimantan, Sulawesi serta Nusa Tenggara Timur (Lee *et.al.*, 1983).

Identifikasi *Anopheles* penting dalam proses penentuan strategi pengendalian vektor malaria. Identifikasi secara morfologi dan pengamatan perilaku *blood feeding* tidak cukup untuk mengidentifikasi secara tepat dan

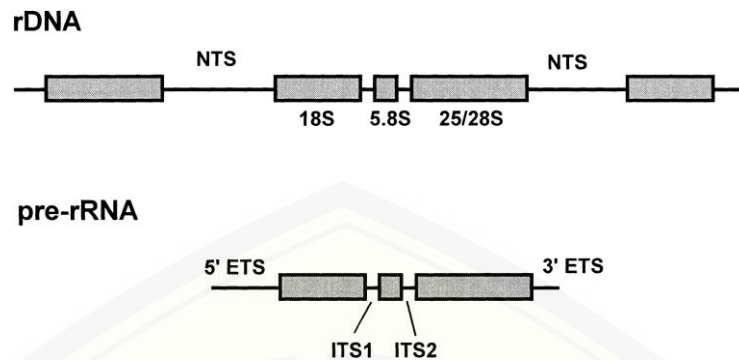
akurat. Metode identifikasi yang lebih modern, lebih tepat dan akurat adalah berdasarkan identifikasi molekuler. Hasil identifikasi spesies *Anopheles* yang dilakukan secara tepat dan akurat dapat dijadikan sebagai dasar penentuan strategi pengendalian vektor malaria di suatu daerah (Weeraratne *et.al.*, 2017).

#### 2.4 Marka Molekuler DNA

Saat ini identifikasi organisme tidak terbatas pada aspek morfologi saja, tetapi telah berkembang identifikasi secara molekuler. Identifikasi secara morfologi mempunyai beberapa keterbatasan diantaranya adanya plastisitas fenotip dan keragaman genetik dapat menimbulkan kesalahan dalam proses identifikasi, adanya beberapa sibling spesies yang sulit dibedakan, serta kunci determinasi morfologi yang terbatas pada tahapan perkembangan tertentu (*life stage*) dari suatu organisme (Jarman & Elliott, 2000). Identifikasi secara molekuler dilakukan dengan metode *DNA barcode* yaitu mengidentifikasi organisme berdasarkan sekuen pendek DNA (Waugh, 2007).

Sekuen DNA yang dapat dijadikan barkode harus bersifat universal, mempunyai variasi tinggi antar-spesies dan terkonservasi intra-spesies, mudah diamplifikasi (Hebert, *et.al.*, 2003) serta berukuran pendek berkisar antara 400-800 bp (Vijayan & Tsou, 2010). Beberapa sekuen yang digunakan untuk identifikasi molekuler nyamuk adalah *Internal Transcribed Spacer 2 (ITS 2)* (Walton, *et.al.*, 2007), *cytochrome c oxidase subunit I (COI)*, *cytochrome b (Cyt-b)* (Dusfour, *et.al.*, 2004) dan *domain-3 (D3)* (Alam, *et.al.*, 2006).

ITS2 merupakan salah satu sekuen Hasil penelitian Yao *et.al.* (2010) menunjukkan ITS2 mampu mengidentifikasi 12.221 sampel hewan hingga 91,9%. Dengan demikian ITS2 potensial digunakan sebagai marker untuk identifikasi hewan. Sekuen ITS2 juga telah banyak digunakan dalam proses identifikasi nyamuk, termasuk *Anopheles* (Gómez, *et.al.*, 2015). *ITS2* merupakan *nuclear DNA (nrDNA)* yang terletak di daerah *noncoding region* antara gen 5.8S pengkode sub-unit kecil ribosomal RNA (rRNA) dengan gen 28S pengkode sub-unit besar rRNA (Norris & Norris, 2015).



Gambar 2. 3 Struktur rDNA and Pre-rRNA Eukariotik (Brown & Shaw, 1998)

ITS2 banyak digunakan dalam proses identifikasi molekuler *Anopheles* karena sekuen pendek yang memudahkan dalam proses amplifikasi menggunakan PCR, dapat menunjukkan tingkat kekerabatan dekat antar spesies (Norris & Norris, 2015), mempunyai tingkat variabilitas tinggi interspesies dan tekonservasi intraspesies, serta dapat menentukan spesies sibling (Fang, *et.al.*, 2017). Variabilitas tinggi interspesies yang memperlihatkan perbedaan ukuran pita DNA hasil PCR menggunakan primer ITS2 dari lima spesies *Anopheles* yaitu *An. peditaeniatus* (96 bp), *An. hyrcanus* (189 bp), *An. lesteri* (364 bp), *An. pullus* (428 bp), dan *An. sinensis* (514 bp).

### BAB 3. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari sampai Juni 2018 di Dusun Paras Putih Desa Bangsring Banyuwangi dan 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 aspirator, *paper cup*, mikroskop stereo (Olympus, Jepang), kamera mikroskop (Optilab, Indonesia), mesin elektroforesis DNA, mesin PCR (Biometra Thermocycler T-Gradient ThermoBlock, USA), UV-Transilluminator (Bio-Rad, USA), desikator, *freezer* - 20°C, *micro centrifuge* (Hettich Mikro 200R, UK), pH meter (CyberScan pH 510, USA), oven, neraca analitik dan digital, *magnetic stirer*, fortek, *beaker glass*, gelas ukur, PCR *microtube*, *micropipet* volume 10-1000 µL (Socorex, Swiss), tip volume 10-1000 µL, *tube* 1.5 ml.

##### 3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan yaitu *An. vagus vagus* dan *limosus* betina, *homogenizing buffer*, SDS 20%, 20 mg/ml Proteinase-K (Thermo Fisher, USA), NaCl 6 M, isopropanol (Sigma, Germany), etanol 70%, ddH<sub>2</sub>O steril, agarose (Nacalai, USA), Etidium Bromide (Bio-Rad, USA), 6X Loading dye (iNtRon, Korea), Tris-Acetic-EDTA (TAE 1x), DNA ladder 3000 *base pair* (GeneOn, Germany), 2 x PCR Master mix solution (i-Taq) (iNtRon, Korea), primer ITS2 (IDT, USA), Kit purifikasi DNA Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA).

### 3.3 Prosedur Penelitian

#### 3.3.1 Peparasi alat dan bahan

Alat-alat yang berbahan *glassware* dan *plasticware* disterilkan menggunakan *autoclave* suhu 120 °C selama 30 menit. Sebelum memulai pekerjaan meja kerja disterilkan dengan etanol 70%, serta mengenakan *handglove* dan masker ketika bekerja.

#### 3.3.2 Landing collection *An. vagus vagus* dan *An. vagus limosus*

*Landing collection* dilakukan untuk mengumpulkan nyamuk *Anopheles* habitatnya yaitu daerah pesisir pantai desa Bangsring Kecamatan Wongsorejo Kabupaten Banyuwangi. Pengambilan dilakukan pada jam aktif nyamuk yaitu mulai pukul 18.00 hingga 04.00 WIB menggunakan aspirator. Nyamuk *Anopheles* yang telah terkumpul kemudian diidentifikasi morfologinya menggunakan buku *Anopheline Mosquitoes of Malaya and Borneo* (Reid, 1968).

#### 3.3.3 Isolasi DNA genom

DNA genom diekstraksi dari sepuluh nyamuk betina *Anopheles* menggunakan metode *salt-out extraction*. Sebelum diekstraksi sampel dimasukkan dalam *tube* 1.5 ml dan disimpan dalam -20 °C selama 10 menit. Ekstraksi genom dilakukan menggunakan *homogenizing buffer* (Tris-Cl 10 mM, EDTA 2 mM, NaCl 0,4 M) dan dihomogenkan dengan mikropistil, kemudian ditambahkan 40 µL SDS 20% dan 8 µL dari 20 mg/ml Proteinase-K kemudian diinkubasi 65 °C selama satu jam. Setelah diinkubasi, suspensi tersebut ditambahkan 300 µL NaCl 6 M dihomogenkan dan *disentrifuse* selama 30 menit dengan suhu 4 °C 10.000 rpm (*rotation permenit*). Komposisi bahan untuk isolasi genom dapat dilihat pada tabel 3.4. Supernatan dipindahkan ke dalam *tube* baru lalu ditambah isopropanol lalu disimpan dalam freezer -20 °C selama satu jam. Setelah disimpan dalam freezer -20 °C kemudian disentrifuse selama 20 menit dengan suhu 4 °C, 10.000 rpm dan supernatan dibuang. Pellet yang mengandung DNA dicuci menggunakan etanol 70% kemudian dikeringkan menggunakan desikator dan direhidrasi dengan ddH<sub>2</sub>O.

### 3.3.4 Elektroforesis hasil isolasi DNA genom

Hasil isolasi DNA genom divisualisasi melalui elektroforesis dengan menggunakan gel agarose sedangkan buffer yang digunakan untuk melarutkan agarose dan untuk *running* elektroforesis adalah TAE 1x. Konsentrasi gel agarose yang digunakan adalah 0.8 % dan ditambahkan *Etidium Bromide* sebanyak 2  $\mu$ L. Sampel hasil isolasi genom diambil 5  $\mu$ L dan dicampur dengan 1  $\mu$ L *loading dye*. Sampel DNA genom yang telah bercampur dengan *loading dye* kemudian dimasukkan dalam sumuran gel agarose, selanjutnya DNA ladder 3000 bp sebanyak 5  $\mu$ L juga dimasukkan dalam sumuran gel agarose. Setelah semua sampel dan DNA ladder dimasukkan dalam sumuran kemudian elektroforesis diberi arus listrik dengan voltase konstan 100 volt selama 30 menit. Setelah elektroforesis selesai gel agarose divisualisasi menggunakan UV-transilluminator untuk mengetahui apakah muncul pita DNA.

### 3.3.5 Amplifikasi sekuen ITS2 *An. vagus vagus* dan *An. vagus limosus* menggunakan Polymerase Chain Reaction (PCR)

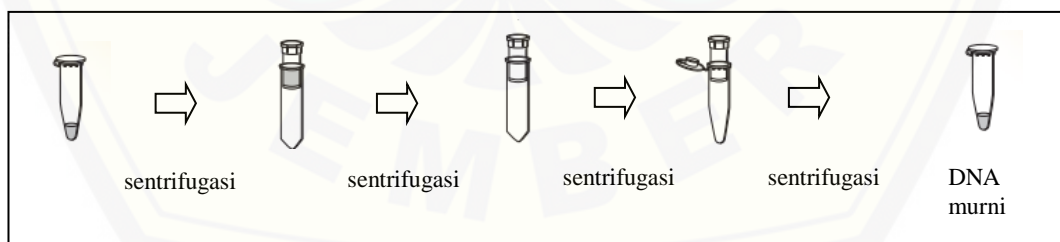
Amplifikasi sekuen ITS2 *An. vagus vagus* dan *limosus* dilakukan secara *in vitro* menggunakan mesin PCR. Reaksi PCR dilakukan menggunakan primer ITS2 5,8F (5'TGT GAA CTG CAG GAC ACA TG 3') dan 28R (5' ATG CTT AAA TTT AGG GGG TA 3'). Informasi mengenai primer ITS2 yang digunakan dapat dilihat pada lampiran C. 2 x PCR Master mix solution (i-Taq) dengan komposisi *thermostable taq polimerase* DNA asal *Thermus aquaticus*, dNTPs, *reaction buffer*, *stabilizer and enhancer* dan *gel loading buffer*. Komposisi satu reaksi PCR disajikan dalam lampiran A.

Amplifikasi sekuen ITS2 *An. vagus vagus* dan *An. vagus limosus* dilakukan sebanyak 30 kali siklus yang terdiri dari tiga tahapan yang berulang yaitu *denaturation*, *annealing* dan *extention*. Lima kali siklus yang pertama menggunakan suhu *annealing* 45°C, sedangkan dua puluh lima siklus yang kedua menggunakan suhu *annealing* 51°C. Pengaturan gradien temperatur mesin PCR secara rinci disajikan dalam lampiran B. Setelah proses amplifikasi selesai, untuk mengetahui apakah PCR berhasil maka produk PCR dikonfirmasi menggunakan elektroforesis. Konsentrasi gel agarose yang digunakan untuk mengkonfirmasi

hasil PCR yaitu 1.5% yang dilarutkan dalam TAE 1X. Sebanyak 5 $\mu$ L produk PCR dimasukkan dalam sumuran gel agarose. *Running buffer* yang digunakan yaitu TAE 1X. Elektroforesis dilakukan dengan voltase konstan yaitu 100 volt selama 45 menit.

### 3.3.6 Pemurnian DNA hasil PCR

Gel agarose yang mengandung pita DNA dipotong dan dimurnikan dengan kit pemurnian DNA yaitu Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System. Kit ini terdiri dari *SV minicolumn* dan *collection tube*, *membran binding solution*, *membran washing solution* dan *nuclease free water*. Pemurnian DNA meliputi tiga tahap yaitu *gel dissolving*, *washing*, *DNA elution*. Pemurnian DNA *SV minicolumn* merupakan kolom yang dilengkapi membran silika untuk dapat berikatan dengan DNA dengan adanya larutan katostropik. *Membran binding solution* merupakan larutan yang dapat melarutkan gel agarose dan bersifat katostropik sehingga DNA dapat berikatan dengan membran silika pada *SV minicolumn*. *Membran washing solution* melarutkan materi-materi selain DNA yang masih melekat di membran silika. *nuclease free water* merupakan air yang bebas nuklease yang digunakan untuk melarutkan DNA yang berikatan dengan membran silika pada *SV minicolumn* oleh karena sifat DNA yang larut dalam air. Tahapan purifikasi DNA hasil PCR dijelaskan pada gambar 3.1.



Gambar 3. 1 Tahapan-tahapan purifikasi DNA hasil PCR menggunakan kit purifikasi DNA Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega : USA)

Potongan gel agarose yang mengandung DNA dilarutkan dengan memberikan *membrane binding solution*. Volume yang ditambahkan disesuaikan dengan massa potongan gel agarose. Sebanyak 10 $\mu$ l *membrane binding solution*

untuk melarutkan 10mg potongan agarose. Gel diinkubasi pada suhu 50 - 65 °C selama 10 menit. Gel yang telah larut kemudian dimasukkan dalam *SV minicolumn* dan disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Cairan yang terkumpul dalam *collection tube* dibuang. Tahap selanjutnya adalah *washing* yang dilakukan dengan menambahkan 700 µl *membrane wash solution* kemudian disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Cairan yang terkumpul dalam *collection tube* dibuang. *Washing* dilakukan dua kali, volume *membrane wash solution* yang ditambahkan pada *washing* kedua kedua adalah 500 µl dan disentrifugasi selama 5 menit. DNA yang berikatan dengan membran silika pada *SV minicolumn* dilarutkan menggunakan *nuclease free water* sebanyak 50 µl dan diinkubasi pada suhu ruang kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 1 menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Cairan yang terkumpul dalam tube merupakan DNA yang telah dimurnikan.

#### 3.3.7 Sekuensing dan analisis sekuen *ITS2*

Sekuen *ITS2* yang telah diamplifikasi dan dimurnikan kemudian disekuensing melalui jasa ke 1<sup>st</sup> BASE Singapore menggunakan metode *sanger sequencing*. Metode sekuensing sanger merupakan sekuensing DNA berdasarkan penggabungan selektif rantai-terminating dideoksi oleh *polimerase* DNA selama replikasi *in vitro* DNA. Metode ini dikembangkan oleh Frederick Sanger pada tahun 1977 (Allison, 2007). Setelah data sekuen didapatkan, tahap selanjutnya adalah *editing* dan analisis menggunakan *Software* Bioedit. Hasil sekuensing dari setiap sampel diedit menggunakan *software* Bioedit dengan melakukan pensejajaran antara hasil sekuensing *foward* dan *reverse*. Setelah disejajarkan kemudian untuk mendapatkan sekuen *ITS2* yang utuh harus melakukan *consensus sequence*. Setelah diketahui sekuen konsensus dari kedua sub spesies *Anopheles* yaitu *An. vagus vagus* dan *An. vagus limosus* maka sekuen dibandingkan dengan *database* sekuen *ITS2* di *GeneBank* menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) *online software* ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) dan akan muncul deretan isolat yang mempunyai sekuen yang mirip dengan yang diinput dalam sistem BLAST. Kemudian dari beberapa sekuen yang memiliki kemiripan tersebut dikonstruksi pohon filogenik. Konstruksi pohon filogenetik menggunakan *Software*



Mega6. Adapun metode konstruksi pohon filogenetik yang digunakan yaitu *Neighbour Joining* (NJ). Metode NJ merupakan metode statistika yang umum digunakan untuk merekonstruksi pohon filogenetik berdasarkan tingkat similaritas atau homogenitas sekuen DNA (Saitou & Nei, 1987). Keuntungan menggunakan metode NJ yaitu pohon filogenetik yang berhasil dikonstruksi menampilkan jarak evolusi serta dapat digunakan analisis data dalam jumlah banyak (Pavlopoulos, *et.al.*, 2010).



## BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Hasil tiga kali *landing collection* Anopheles di desa Bangsring Banyuwangi, spesies *An. vagus* merupakan spesies dengan jumlah terbanyak yaitu 584 dari 684 total spesies Anopheles yang ditemukan. Morfologi *An. vagus vagus* dan *limosus* berbeda pada bagian proboscis dan *prehumeral* sayap. Proboscis *An. vagus vagus* terdapat gelang putih sedangkan *An. vagus limosus* tidak terdapat gelang putih. *Prehumeral* sayap *An. vagus vagus* terdapat sisik putih sedangkan *An. vagus limosus* seluruhnya hitam.

### 5.2 Saran

Dua subspecies *An. vagus* memiliki karakter morfologi yang berbeda, akan tetapi perlu diperhatikan ketika identifikasi morfologi *An. vagus limosus* mirip dengan morfologi *An. indefinitus* sehingga perlu ketelitian dalam identifikasi.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Alam, M. T., Das, M. K., Ansari, M. A., & Sharma, Y. D. 2006. Molecular Identification of *Anopheles (Cellia) sundaicus* From the Andaman and Nicobar Islands of India. *Acta tropica*, 97(1), 10-18.
- 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.
- Allison, L.A. 2007. *Fundamental Molecular Biology*. Malden, MA: Blackwell Publishing.
- Aly, A. S., Vaughan, A. M., & Kappe, S. H. 2009. Malaria Parasite Development in the mosquito and infection of the mammalian host. *Annual review of microbiology*, 63, 195-221.
- Amanfo, S. A., Mduluza, T., Midzi, N., Cavanagh, D. R., & Mutapi, F. 2016. Seroepidemiology of Plasmodium Species Infections in Zimbabwean Population. *Malaria journal*, 15(1), 267.
- Autino, B., Noris, A., Russo, R., & Castelli, F. 2012. Epidemiology of Malaria in Endemic Areas. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 4(1), 287.
- Barber, B. E., Rajahram, G. S., Grigg, M. J., William, T., & Anstey, N. M. 2017. World Malaria Report: Time to Acknowledge *Plasmodium knowlesi* Malaria. *Malaria journal*, 16(1), 135.

Beck-Johnson, L. M., Nelson, W. A., Paaajmans, K. P., Read, A. F., Thomas, M. B., & Bjørnstad, O. N. 2013. The Effect of Temperature on Anopheles Mosquito Population Dynamics and the Potential for Malaria Transmission. *PLOS one*, 8(11), 276.

Beier, J. C., Perkins, P. V., Wirtz, R. A., Whitmire, R. E., Mugambi, M., & Hockmeyer, W. T. 1987. Field Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for *Plasmodium Falciparum* Sporozoite Detection in *Anopheline* Mosquitoes From Kenya. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 36(3), 459-468.

Bonne-Wepster, J. 1953. The *Anopheline* Mosquitoes of the Indo-Australian Region. *The Anopheline Mosquitoes of the Indo-Australian Region*.

Brown, J. W., & Shaw, P. J. 1998. Small Nucleolar RNAs And Pre-RNA Processing in Plants. *The Plant Cell*, 10(5), 649-657.

Cagampang, A. & Darsie, R.F. 1970. *Illustrated Key to the Anopheles Mosquitoes of the Philippine Island*. Malaria Eradication Training Center: Manila, Philippine.

Chen-Hussey, V., Carneiro, I., Keomanila, H., Gray, R., Bannavong, S., Phanalasy, S., & Lindsay, S. W. 2013. Can Tropical Insect Repellents Reduce Malaria? A cluster-randomised Controlled Trial of the Insect Repellent N, N-diethyl-m-toluamide (DEET) in Lao PDR. *PloS one*, 8(8), 664.

Coleman, A.W. 2003. ITS2 is a Double-Edged Tool for Eukaryote Evolutionary Comparisons. *Trends Genet.* 19: 370-375.

Depkes RI. 2007. *Modal 1 Epidemiologi Malaria*, Jakarta, Dirjen PPM & PL, Dcpkes RI.

Dusfour, I., Linton, Y. M., Cohuet, A., Harbach, R. E., Baimai, V., Trung, H. D., & Manguin, S. (2004). Molecular evidence of speciation between island and continental populations of *Anopheles (Cellia) sundaicus* (Diptera: Culicidae), a principal malaria vector taxon in Southeast Asia. *Journal of medical entomology*, 41(3), 287-295.

Elyazar, I. R., Hay, S. I., & Baird, J. K. 2011. Malaria Distribution, Prevalence, Drug resistance and Control in Indonesia. *Advances in parasitology*, 74, 41.

Fang, Y., Shi, W. Q., & Zhang, Y. 2017. Molecular Phylogeny of *Anopheles hyrcanus* group Members Based on ITS2 rDNA. *Parasites & vectors*, 10(1), 417.

Ghatee, M. A., Sharifi, I., Mirhendi, H., Kanannejad, Z., & Hatam, G. 2013. Investigation of Double-band Electrophoretic Pattern of ITS-rDNA region in Iranian Isolates of *Leishmania tropica*. *Iranian journal of parasitology*, 8(2), 264.

Gómez, G. F., Bickersmith, S. A., González, R., Conn, J. E., & Correa, M. M. 2015. Molecular Taxonomy Provides New Insights into *Anopheles* species of the Neotropical *Arribalzagia* Series. *PloS one*, 10(3), 488.

Gunathilaka, N., Abeyewickreme, W., Hapugoda, M., & Wickremasinghe, R. 2015. Species Composition and Diversity of Malaria Vector Breeding Habitats in Trincomalee District of Sri Lanka. *BioMed research international*, 2015.

- 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.
- Hemingway, J., Shretta, R., Wells, T. N., Bell, D., Djimdé, A. A., Achee, N., & Qi, G. 2016. Tools and Strategies for Malaria Control and Elimination: What Do We Need to Achieve a Grand Convergence in Malaria?. *PLoS biology*, 14(3), 380.
- 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.
- 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.
- Horsfall, W. E. 1955. Mosquitoes: Their Bionomics and Relation to Disease. *Mosquitoes. Their Bionomics and Relation to Disease*.
- Jarman, S. N., & Elliott, N. G. 2000. DNA Evidence for Morphological and Cryptic Cenozoic Speciations in the Anaspididae, 'living fossils' from the Triassic. *Journal of Evolutionary Biology*, 13(4), 624-633.
- Kamareddine, L. (2012). The Biological Control of the Malaria Vector. *Toxins*, 4(9), 748-767.

- Kazwaini, M., & Mading, M. 2014. Jenis dan Status *Anopheles Spp.* Sebagai Vektor Potensial Malaria Di Pulau Sumba Provinsi Nusatenggara Timur. *Jurnal Ekologi Kesehatan*, 13(4), 298-307.
- Kementerian Kesehatan. 2011. Epidemiologi Malaria di Indonesia. ISSN 2088-270X.
- Lee, V. H., Atmosoedjono, S., Dennis, D. T., Suhaepi, A., & Suwarta, A. 1983. The *Anopheline* (Diptera: Culicidae) Vectors of Malaria and Bancroftian Filariasis in Flores Island, Indonesia. *Journal of medical entomology*, 20(5), 577-578.
- Lindsay, S. W., & Birley, M. H. 1996. Climate Change and Malaria Transmission. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 90(5), 573-588.
- Lubis, I. N., Wijaya, H., Lubis, M., Lubis, C. P., Divis, P., 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.
- Mardiana, M., Wigati, W., & Suwaryono, T. 2003. Aktivitas Menggigit *Anopheles sundaicus* di Kecamatan Wongsorejo, Kabupaten Banyuwangi, Jawa Timur. *Media Penelitian dan Pengembangan Kesehatan*, 13(2), 471-472.
- Munif, A., Rusmiarto, S., Aryati, Y., Andris, H., & Stoops, C. A. 2008. Konfirmasi Status *Anopheles vagus* sebagai Vektor Pendamping saat Kejadian Luar Biasa Malaria di Kabupaten Sukabumi Indonesia. *Jurnal Ekologi Kesehatan*, 7(1),186-189.

- Norris, L.C. dan Norris D.E. 2015. Phylogeny of *Anopheline* (Diptera: Culicidae) Species in Southern Africa, Based on Nuclear and Mitochondria Genes. *Journal of Vector Ecology*, 40(1):16-27.
- Ntuku, H. M., Ruckstuhl, L., Julo-Réminiac, J. E., Umesumbu, S. E., Bokota, A., Tshefu, A. K., & Lengeler, C. 2017. Long-Lasting Insecticidal Net (LLIN) Ownership, Use and Cost of Implementation After a Mass Distribution Campaign in Kasai Occidental Province, Democratic Republic Of Congo. *Malaria journal*, 16(1), 22.
- Pavlopoulos, G. A., Soldatos, T. G., Barbosa-Silva, A., & Schneider, R. 2010. A Reference Guide for Tree Analysis and Visualization. *BioData mining*, 3(1), 1.
- Rai, P., Majumdar, K., Sharma, S., Chauhan, R., & Chandra, J. 2015. Congenital Malaria in a Neonate: Case Report with a Comprehensive Review on Differential Diagnosis, Treatment and Prevention in Indian Perspective. *Journal of Parasitic Diseases*, 39(2), 345-348.
- Ramachandra, R. T. 1984. The Anopheline of India (revised edition). *Indian Council of Medical Research, New-Delhi*, 23-72.
- Ranson, H., N'Guessan, R., Lines, J., Moiroux, N., Nkuni, Z., & Corbel, V. 2011. Pyrethroid Resistance in African Anopheline Mosquitoes: What are the Implications for Malaria Control?. *Trends in parasitology*, 27(2), 91-98.
- Reid, J. A., Harrison, B. A., & Atmosoedjono, S. 1979. Variation and Vector Status in *Anopheles barbirostris*. *Mosquito systematics*.



- Reid, J.A. 1968. *Anopheline Mosquitoes of Malaya and Borneo*. Kuala Lumpur : Institute for Medical Research.
- Rodríguez, J. C. P., Uribe, G. Á., Araújo, R. M., Narváez, P. C., & Valencia, S. H. 2011. Epidemiology and Control of Malaria in Colombia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106, 114-122.
- Roux, K. H. 2009. Optimization and Troubleshooting in PCR. *Cold Spring Harbor Protocols*, 9(4), 66.
- 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. *Tropical Biomedicine*, 28(1): 181–187.
- Saitou N. and Nei M. 1987. The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(2), 406-425.
- Shinta, S., Supratman, S., & Mardiana, M. 2003. Komposisi Spesies dan Dominasi Nyamuk *Anopheles* Di Daerah Pantai Banyuwangi, Jawa Timur. *Media Penelitian Dan Pengembangan Kesehatan*, 13(3), 23-25.
- Sukowati, S., Andris, H., Sondakh, J., & Shinta, S. 2005. Penelitian Spesies Sibling Nyamuk *Anopheles barbirostris* Van Der Wulp Di Indonesia. *Jurnal Ekologi Kesehatan*, 4(1) : 172-180.
- Sumatri, R. A., & Iskandar, D. T. 2009. Kajian Keberagaman Genetik Nyamuk *Anopheles barbirostris* dan *An. vagus* di dua Daerah Endemik Penyakit Malaria Di Jawa Barat. *Jurnal Matematika & Sains*, 10(2), 37-44.

- Velasco, E., Gomez-Barroso, D., Varela, C., Diaz, O., & Cano, R. 2017. Non-Imported Malaria in Non-endemic Countries: a Review of Cases in Spain. *Malaria journal*, 16(1), 260.
- Vijayan, K., & Tsou, C. H. 2010. DNA Barcoding in Plants: Taxonomy in a New Perspective. *Current Science*, 1530-1541.
- Walton, C., Somboon, P., O'Loughlin, S. M., Zhang, S., Harbach, R. E., Linton, Y. M., & Vythilingum, I. 2007. Genetic Diversity and Molecular Identification of Mosquito Species in the *Anopheles maculatus* Group Using the ITS2 Region of rDNA. *Infection, Genetics and Evolution*, 7(1), 93-102.
- Waugh, J. (2007). DNA Barcoding in Animal Species: Progress, Potential and Pitfalls. *BioEssays*, 29(2), 188-197.
- Weeraratne, T. C., Surendran, S. N., Reimer, L. J., Wondji, C. S., Perera, M. D. B., Walton, C., & Karunaratne, S. P. 2017. Molecular Characterization of Anopheline (Diptera: Culicidae) Mosquitoes from Eight Geographical Locations of Sri Lanka. *Malaria journal*, 16(1), 234.
- Wilson, A. L., Chen-Hussey, V., Logan, J. G., & Lindsay, S. W. 2014. Are Topical Insect Repellents Effective Against Malaria in Endemic Populations? A Systematic Review And Meta-Analysis. *Malaria journal*, 13(1), 446.
- World Health Organization. 2016. *World malaria report 2015*. World Health Organization.
- Yao, H., Song, J., Liu, C., Luo, K., Han, J., Li, Y. & Chen, S. 2010. Use of ITS2 Region as the Universal DNA Barcode for Plants and Animals. *PLoS one*, 5(10).

Zarowiecki, M., Walton, C., Torres, E., McAlister, E., Htun, P. T., Sumrandee, C., & Linton, Y. M. 2011. Pleistocene Genetic Connectivity in a Widespread, Open-habitat-adapted Mosquito in the Indo-Oriental region. *Journal of biogeography*, 38(7), 1422-1432.

Zoller, T., Naucke, T. J., May, J., Hoffmeister, B., Flick, H., Williams, C. J., & Mockenhaupt, F. P. 2009. Malaria Transmission in Non-endemic Areas: Case Report, Review of the Literature and Implications for Public Health Management. *Malaria journal*, 8(1), 71.

Zomuanpuii, R., Ringngheti, L., Brindha, S., Gurusubramanian, G., & Kumar, N. S. 2013. ITS2 characterization and Anopheles species Identification of the Subgenus *Cellia*. *Acta tropica*, 125(3), 309-319.

LAMPIRAN

**A. Komposisi spesies Anopheles hasil *landing collection* di Bangsring Banyuwangi**

Spesies	Jumlah individu yang ditemukan saat landing collection ke-		
	1	2	3
<i>An. vagus vagus</i>	202	284	62
<i>An. vagus limosus</i>	18	12	6
<i>An. subpictus</i>	6	13	29
<i>An. indefinitus</i>	16	30	-
<i>An. aconitus</i>	-	1	1
<i>An. kochi</i>	3	1	-

