



**KLONING *INTERNAL TRANSCRIBED SPACER 2 (ITS2)* PADA
pTA2 SEBAGAI DASAR IDENTIFIKASI VEKTOR MALARIA
*Anopheles vagus***

SKRIPSI

Oleh

Dwi Alfiana

NIM 151810401027

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



**KLONING *INTERNAL TRANSCRIBED SPACER 2 (ITS2)* PADA
pTA2 SEBAGAI DASAR IDENTIFIKASI VEKTOR MALARIA
*Anopheles vagus***

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat menyelesaikan program studi S1 (Biologi) dan meraih gelar Sarjana Sains

Oleh
Dwi Alfiana
NIM 151810401027

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

PERSEMBAHAN

Skripsi ini dipersembahkan untuk:

1. Kedua orang tua tercinta, Ayah Heru Sarsono dan Ibunda Umi Mubarokah yang telah memberikan dukungan penuh serta doa terbaiknya.
2. Bapak/Ibu Dosen Pembimbing dan Penguji, Dr. rer.nat. Kartika Senjarini, S.Si., M.Si., Dr. Rike Oktarianti, M.Si., Syubbanul Wathon, S.Si., M.Si., serta Mukhamad Su'udi, Ph.D. yang telah meluangkan waktu serta memberikan dukungan dan bimbingan dengan sepenuh hati.
3. Guru-guru serta jajaran Dosen di Biologi FMIPA Universitas Jember yang memberikan motivasi dan menularkan ilmu dengan ikhlas.
4. Almamater jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Jember.

MOTTO

“Bersabarlah kamu dan kuatkanlah kesabaranmu dan tetaplah bersiap siaga dan bertaqwalah kepada Allah supaya kamu menang (Q.S. Al-Imron : 200)”.



Alqur'an dan Terjemah, Penerbit Darul Haq Jakarta*

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Dwi Alfiana

NIM : 151810401027

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah berjudul “Kloning *Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2)* pada pTA2 Sebagai Dasar Identifikasi Vektor Malaria *Anopheles vagus*” adalah benar-benar karya ilmiah sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya dan belum pernah diajukan pada instansi manapun, serta bukan karya jiplakan. Penelitian ini merupakan bagian dari proyek penelitian Dr.rer.nat. Kartika Senjarini, S.Si., M.Si., Dr. Dra. Rike Oktarianti, M.Si. dan Syubbanul Wathon, S.Si., M.Si. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 10 Juni 2019

Yang menyatakan

Dwi Alfiana

NIM 151810401027

SKRIPSI

**KLONING *INTERNAL TRANSCRIBED SPACER 2* (ITS2) PADA
pTA2 SEBAGAI DASAR IDENTIFIKASI VEKTOR MALARIA *Anopheles*
*vagus***

Oleh

Dwi Alfiana

NIM 151810401027

Pembimbing

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

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

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Kloning *Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2)* pada pTA2 Sebagai Dasar Identifikasi Vektor Malaria *Anopheles vagus*”, telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal :

tempat : Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Ketua,

Anggota I,

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

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

Aanggota II

Anggota III

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

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

Mengesahkan
Dekan,

Drs. Sujito, Ph.D
NIP. 102041987111001

RINGKASAN



PRAKATA

Puji Syukur kehadiran Allah SWT atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Kloning *Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2)* pada pTA2 Sebagai Dasar Identifikasi Vektor Malaria *Anopheles vagus*” dengan tepat waktu. Karya ini ditulis guna memenuhi tugas akhir dan syarat menyelesaikan strata satu (S1) di Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember. Penulis tidak lepas dari berbagai dukungan dan doa oleh seluruh pihak yang selama ini telah berperan didalamnya. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada:

1. Ibu Dr. rer.nat. Kartika Senjarini, S.Si., M.Si., selaku pembimbing utama yang telah meluangkan waktu, pikiran, tenaga, dan motivasi, serta dengan sabar membimbing dan memberikan ilmu sehingga penelitian ini bisa terselesaikan.
2. Ibu Dr. Rike Oktarianti, M.Si., selaku dosen pembimbing anggota sekaligus dosen wali akademik yang telah banyak memberikan waktu, dukungan, bimbingan, serta ilmu yang bermanfaat baik selama penelitian maupun selama kuliah.
3. Bapak Syubbanul Wathon, S.Si., M.Si., selaku penguji pertama serta bapak Mukhamad Su’udi, Ph.D. selaku penguji kedua yang telah meluangkan waktu serta memberikan dukungan dan bimbingan dengan sepenuh hati.
4. Saudara-saudara tercinta di rumah, Lindi Ayu Utari dan Alfan Fadhilah.
5. Teknisi laboratorium Dina Fitriyah, S.S.i., M.Si. serta kakak-kakak tercinta Dewi Masruroh, Ika Wahyuni, Lailly Nur, Aria Fransisca, dan Amalina yang telah memberi motivasi dan dukungan.
6. Sahabat-sahabat seperjuangan dan tim kerja laboratorium, Rochmatul Nuryu, Elisa Erni, Alfin Putri, Miatin Alvin, dan Deni Rizky Damara.
7. Sahabat-sahabat tercinta Yova Gresi, Ayu Ismi, Eka Mardika, dan lain-lain yang telah memberikan semangat sepenuh hati.

8. Teman-teman biologi angkatan 2015 yang telah mendukung dan memberikan semangat.
9. Adik-adik laboratorium, Ahmad Tosin, Khalid Abdullah, Azizah, Intan Indrasari, Yasir, Riana Agatha, Nadya Risma, dan Ratis Nour yang senantiasa memberikan semangat dan dukungan.
10. Segenap pihak lainnya yang membantu terlaksananya penelitian kami.

Penulis menyadari bahwa karya ini masih jauh dari kesempurnaan, kritik dan saran dari berbagai pihak sangat diperlukan. Akhir kata, semoga karya ini bermanfaat untuk kebaikan. Amiin..

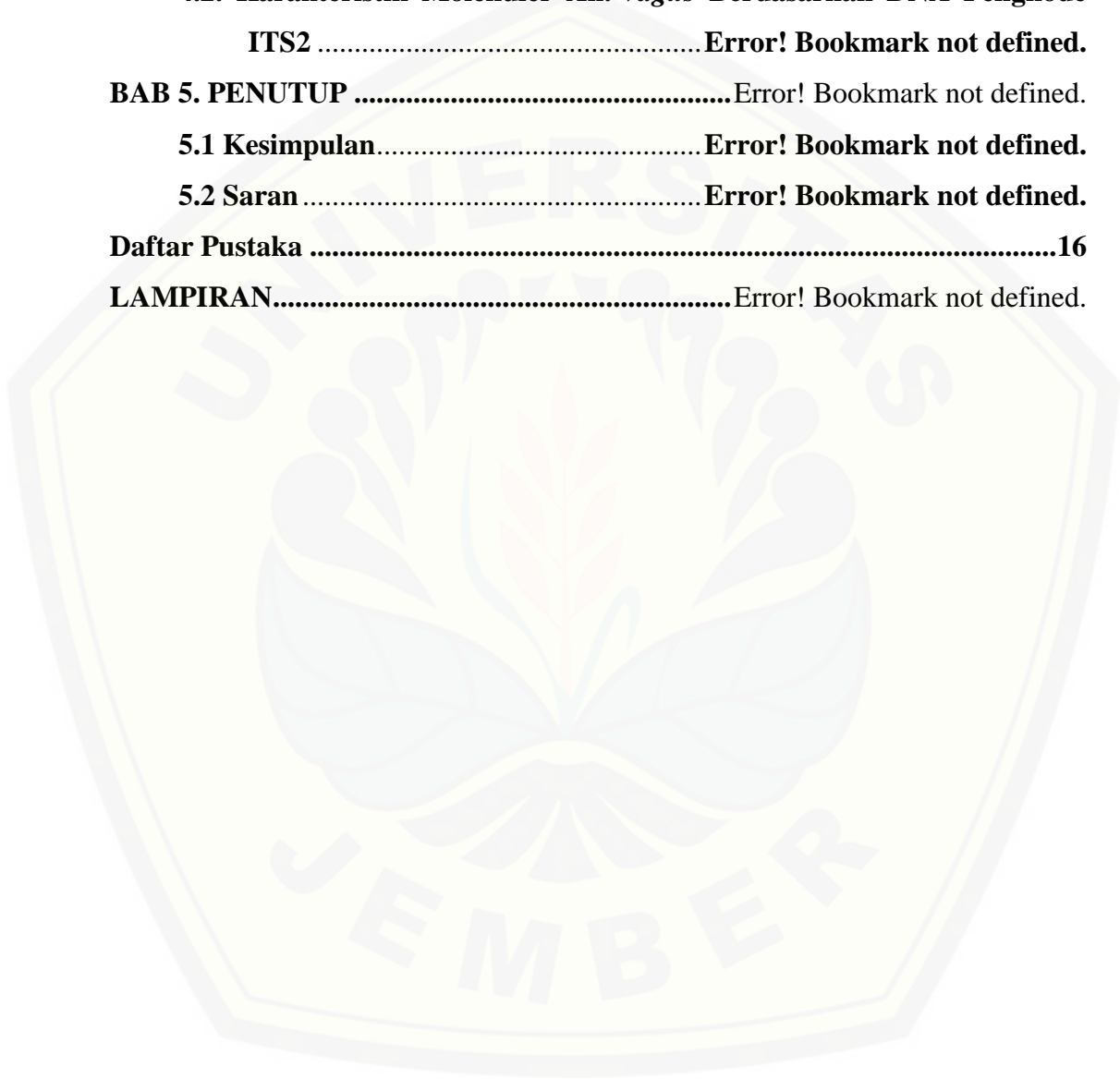
Jember, 10 Juni 2019

Penulis

DAFTAR ISI

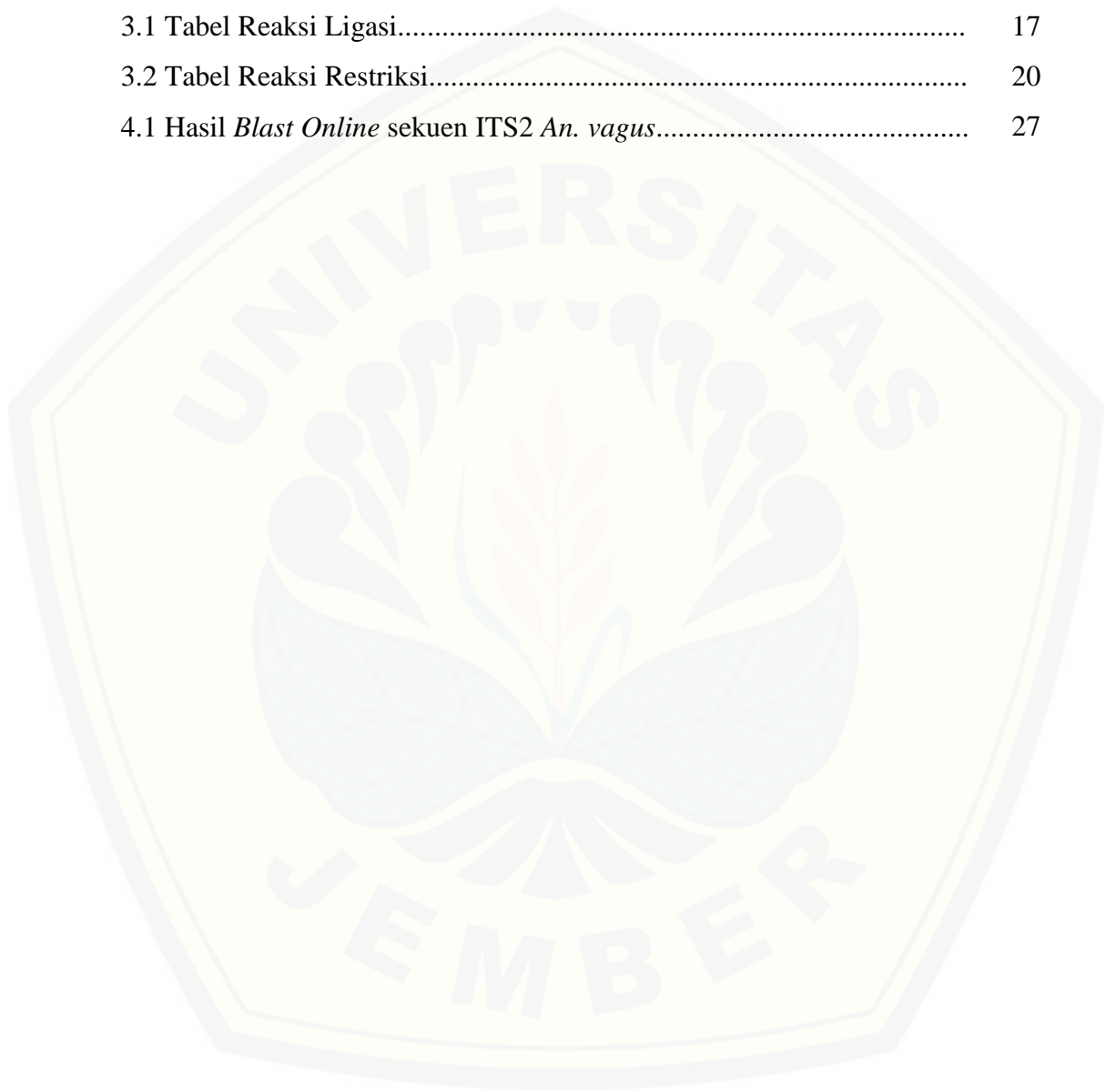
HALAMAN SAMPUL.....	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBING	vi
HALAMAN PENGESAHAN.....	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA.....	ix
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah	3
1.4 Tujuan Penelitian	3
1.5 Manfaat Penelitian.....	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Epidemiologi dan Pengendalian Vektor Malaria	5
2.2. Diversitas <i>Anopheles</i>	8
2.3 Teknik DNA Barcoding.....	9
2.4 DNA Pengkode <i>Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2)</i>	10
2.5 Vektor Kloning pTA2.....	11
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	13
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	13

3.2 Alat dan Bahan	13
3.3 Prosedur Penelitian	14
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	Error! Bookmark not defined.
4.1. Karakteristik Morfologi <i>An. vagus</i>	Error! Bookmark not defined.
4.2. Karakteristik Molekuler <i>An. vagus</i> Berdasarkan DNA Pengkode ITS2	Error! Bookmark not defined.
BAB 5. PENUTUP	Error! Bookmark not defined.
5.1 Kesimpulan.....	Error! Bookmark not defined.
5.2 Saran	Error! Bookmark not defined.
Daftar Pustaka	16
LAMPIRAN.....	Error! Bookmark not defined.



DAFTAR TABEL

	Halaman
3.1 Tabel Reaksi Ligasi.....	17
3.2 Tabel Reaksi Restriksi.....	20
4.1 Hasil <i>Blast Online</i> sekuen ITS2 <i>An. vagus</i>	27



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Peta Kejadian Malaria 2000-2015.....	6
2.2 Struktur rDNA dan Pre-rRNA pada Eukariotik.....	10
2.3 Peta vektor pTA2.....	11
3.1 Aspirator dan <i>paper cup</i>	14
4.1 Karakter morfologi <i>An.vagus</i>	21
4.2 Hasil isolasi DNA genom, amplifikasi dan purifikasi ITS2.....	23
4.3 Hasil <i>Streak Plate</i> sampel ITS2 pada plasmid pTA2.....	24
4.4 Hasil isolasi plasmid dan reaksi restriksi.....	25
4.5 Hasil <i>alignment An. vagus</i> dengan <i>An. vagus</i> (FJ654649.1).....	28
4.6 Pohon filogeni <i>An. vagus</i> dengan vektor lainnya.....	29

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Hasil <i>Landing collection</i>	40
B. Komposisi bahan dalam reaksi PCR.....	40
C. Komposisi larutan.....	40
D. <i>Whole construct</i> ITS2 pada pTA2.....	41
E. Sekuen <i>insert</i> ITS2.....	43
F. Pohon Filogeni (<i>Full tree</i>).....	44

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Identifikasi merupakan salah satu tahapan penting dalam mempelajari karakteristik suatu makhluk hidup yang dapat dilakukan secara morfologi maupun molekuler. Secara konvensional, identifikasi spesies dapat dilakukan melalui pendekatan morfologi (Chan *et al.*, 2014). Terdapat beberapa kekurangan dalam identifikasi secara morfologi seperti membutuhkan waktu yang relatif lama serta kesulitan untuk membedakan spesies yang mirip (Jinbo *et al.*, 2011). Selain secara konvensional, dalam mengidentifikasi spesies dapat dilakukan melalui pendekatan molekuler. Metode molekuler merupakan metode yang menjanjikan dan lebih cepat untuk proses identifikasi. Metode ini didasarkan pada profil genetik rangkaian basa nukleotida dari DNA sehingga muncullah suatu teknik yang dikenal sebagai DNA *barcoding* (Hebert *et al.*, 2003).

DNA *barcoding* merupakan teknik pendekatan secara molekuler yang dapat digunakan untuk identifikasi spesies. Teknik ini didasarkan pada sekuen pendek dari DNA yang memiliki variasi rendah pada *intra-spesies* dan memiliki variasi tinggi *inter-spesies* (Batovska *et al.*, 2016). Teknik DNA *Barcoding* menggunakan sekuen pendek DNA sebagai *genetic marker* (penanda genetik) untuk identifikasi spesies, hal ini didasarkan adanya konsep bahwa terdapat diversitas genetik yang unik pada setiap spesies (Chan *et al.*, 2014; Hebert *et al.*, 2003). Beberapa penanda genetik yang sering digunakan dalam teknik DNA *barcoding* antara lain *Cytochrome Oxidase 1* (CO1) (Shen *et al.*, 2013), 12S rRNA (Vences *et al.*, 2005), *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Dehydrogenase* (Rach *et al.*, 2008), serta salah satu penanda genetik yang sering digunakan yaitu *Internal Transcribed Spacer Sub Unit 2* (ITS2) (Merget *et al.*, 2012).

Internal Transcribed Spacer Sub Unit 2 (ITS2) telah digunakan sebagai penanda genetik selama lebih dari dua dekade. Penelitian mengenai ITS2 terfokus pada urutan ITS2 yang sangat bervariasi, kombinasi dari urutan ITS2 dan struktur sekundernya yang terkonservasi memungkinkan analisis filogenetik pada beberapa

tingkatan taksonomi termasuk penentuan spesies (Merget *et al.*, 2012). Analisis menggunakan ITS2 telah berhasil dilakukan oleh Yao (2010) dengan tingkat keberhasilan identifikasi pada tumbuhan dan hewan di level genus mencapai 97%, sedangkan pada hewan di level spesies mencapai 91,7%. Aplikasi ITS2 juga digunakan untuk mengidentifikasi beberapa kelompok serangga seperti famili Charipidae dari ordo Hymenoptera (Van Veen *et al.*, 2003), famili Eurytomidae (Li *et al.*, 2010), serta banyak digunakan dalam identifikasi serangga ordo Diptera (Sum *et al.*, 2014; Chan *et al.*, 2014). Salah satu anggota dari ordo Diptera yaitu famili Culicidae yang merupakan kelompok nyamuk dengan spesies yang sangat bervariasi. Anggota dari famili Culicidae salah satunya adalah genus *Anopheles* (Reid, 1968).

Penemuan *Anopheles* sebagai vektor eksklusif untuk penularan malaria pada manusia telah banyak dipelajari. Salah satu spesies yang merupakan vektor malaria adalah *Anopheles vagus* yang pernah ditemukan positif sporozoit *Plasmodium* di Sukabumi Jawa Barat (Stoop, *et al.*, 2009). *An. vagus* juga ditemukan dengan kepadatan tinggi di wilayah endemik malaria (Boewono dan Ristiyanto, 2005). Dalam program pengendalian malaria, nyamuk *Anopheles* diketahui memiliki kemampuan mutasi yang tinggi (Stump *et al.*, 2005; Pinto *et al.*, 2007; Boakye *et al.*, 2009). Selain itu, adanya isolasi geografis seperti gunung dan laut menyebabkan munculnya variasi (Krzywinski dan Besanky, 2003), sehingga mencegah pertukaran genetik antara *Anopheles* pada spesies yang sama dari lokasi atau negara yang berbeda. Sehingga dari peristiwa-peristiwa tersebut mendorong munculnya fenomena spesiasi serta munculnya karakteristik biologis yang berbeda dari induknya (Mirabello dan Con, 2006; Kamali *et al.*, 2012). Adanya fenomena spesiasi mengakibatkan meningkatnya variasi dan kompleksitas spesies *Anopheles*, misalnya adanya *sibling species* yang cukup sulit diidentifikasi menggunakan metode konvensional.

Identifikasi vektor penyakit sangat penting dilakukan untuk strategi pengendalian vektor secara tepat (Batovska *et al.*, 2015). Selain identifikasi secara morfologi, identifikasi molekuler juga perlu dilakukan. Meski sudah lama diketahui bahwa beberapa anggota *Anopheles* adalah vektor penting malaria, adanya *sibling*

species terbukti sulit dibedakan dengan identifikasi secara morfologi (Coluzzi, 1970). Kesulitan ini memicu pengembangan metode molekuler untuk identifikasi spesies. Dalam identifikasi secara molekuler diperlukan suatu penanda yang dapat digunakan untuk membedakan antar spesies, salah satu penanda genetik yang dapat digunakan adalah *Internal Transcribed Spacer Sub Unit 2 (ITS2)*. ITS2 dianggap sebagai salah satu kandidat *DNA barcoding* karena memiliki karakteristiknya yang unik, termasuk wilayah yang terkonservasi, mudah diamplifikasi, dan memiliki variabilitas yang dapat digunakan untuk membedakan spesies bahkan spesies yang terkait erat (Yao *et al.*, 2010). Dalam pendekatan secara molekuler, terdapat beberapa kesulitan ketika proses sekuensing (pembacaan urutan basa nukleotida) yaitu terdapat beberapa urutan basa nukleotida yang tidak terbaca, sehingga terdapat beberapa basa nukleotida yang kosong, maka diperlukan pengembangan lebih lanjut. Dalam penelitian ini, sekuen ITS2 dikonstruksikan dengan vektor pTA2 untuk mengetahui rangkaian basa nukleotida secara utuh (*full length*) dan seluruh urutannya dapat terbaca sehingga diharapkan mendapatkan profil genetik dari sekuen ITS2 yang lebih akurat.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana karakteristik molekuler *Anopheles vagus* berdasarkan sekuen ITS2 yang dikonstruksikan dalam vektor pTA2 serta bagaimana hubungan filogenetiknya dengan vektor potensial malaria lainnya?

1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini yaitu spesies yang diteliti merupakan spesies yang berasal dari Desa Bangsring, Kecamatan Wongsorejo, Kabupaten Banyuwangi.

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan Penelitian ini adalah untuk mengetahui karakter molekuler *Anopheles vagus* berdasarkan sekuen ITS2 yang dikonstruksikan dalam vektor pTA2 serta mengetahui hubungan filogenetik dengan vektor potensial malaria lainnya.

1.5 Manfaat Penelitian

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi terkait karakteristik molekuler *Anopheles vagus* sebagai salah satu vektor potensial malaria berdasarkan sekuen ITS2 sebagai upaya untuk menentukan dan mengoptimalkan strategi pengendalian vektor malaria secara tepat.

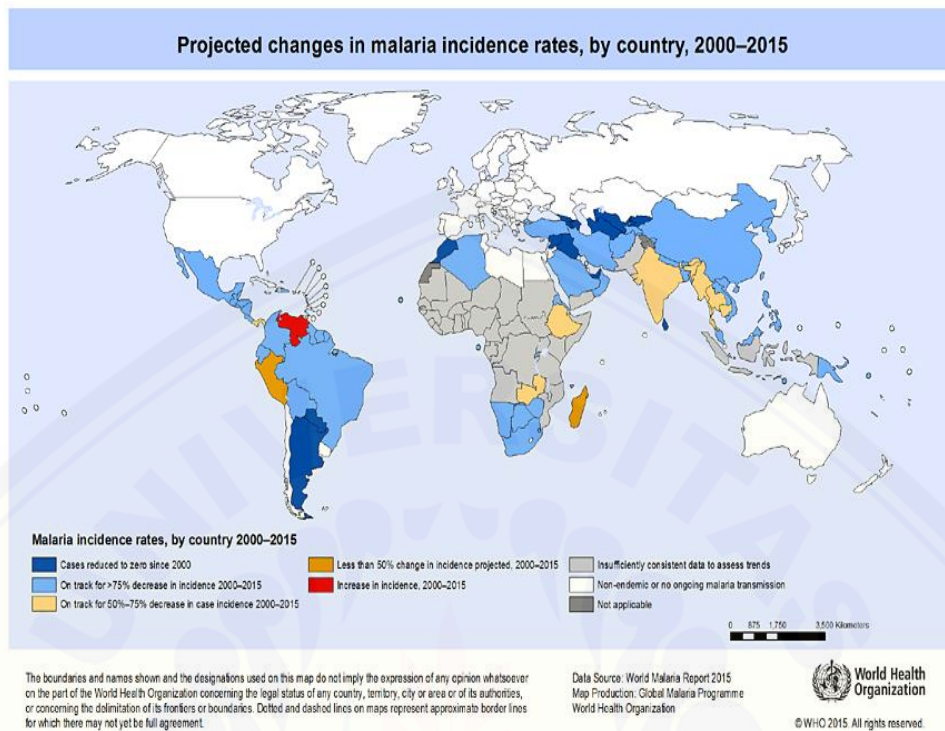


BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Epidemiologi dan Pengendalian Vektor Malaria

Malaria merupakan salah satu penyakit serius di negara berkembang yang menyebabkan tingkat morbiditas dan mortalitas yang tinggi (Laishram *et al.*, 2012). Malaria disebabkan oleh infeksi parasit dari kelompok protozoa yaitu genus *Plasmodium*. Parasit ini ditularkan oleh nyamuk kelompok *Anopheles* betina melalui proses *blood feeding* (Simon *et al.*, 2008). Malaria pada manusia disebabkan oleh 5 jenis parasit genus *Plasmodium* yaitu *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* dan *P. knowlesi*. *Plasmodium* yang banyak menyebabkan malaria di Indonesia adalah *P. falciparum*, *P. vivax* (Elyazar *et al.*, 2011) dan *P. knowlesi* (Lubis *et al.*, 2017). Distribusi *P. falciparum* sangat berlimpah di wilayah tropis afrika, sementara *P. vivax* lebih banyak terdistribusi daripada *P. falciparum* di Amerika Selatan. *P. falciparum* dan *P. vivax* merupakan jenis yang umum ditemui di Asia Tenggara dan Pasifik Barat. Sedangkan *P. malariae* dapat terdistribusi di semua area dengan resiko penularan malaria. *P. ovale* tersebar luas terutama di Indonesia, Afrika tropis sedangkan infeksi *P. knowlesi* terjadi hanya di kawasan hutan tertentu di Asia Tenggara (Autino *et al.*, 2012).

Penyakit ini tersebar di wilayah tropis dan subtropis. Saat ini lebih dari 100 negara yang memiliki resiko penularan malaria (WHO, 2014). Pada tahun 2016, 91 negara melaporkan total 216 juta kasus malaria, terdapat peningkatan 5 juta kasus selama tahun sebelumnya. Penghitungan global kematian akibat malaria mencapai 445.000 kematian (WHO, 2017). 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).



Gambar 2.1 Peta Kejadian Malaria Tahun 2000-2015 (WHO, 2015).

Berdasarkan data dari *World Health Organization* (WHO) tahun 2015 melaporkan bahwa jumlah penderita malaria di dunia mencapai 214 juta jiwa. Data tersebut juga melaporkan bahwa kasus malaria tertinggi terdapat di Afrika (88%), diikuti wilayah ASEAN (10%), dan Mediteranian Timur (2%). Diantara negara-negara di Asia, Indonesia termasuk ke dalam negara dinyatakan endemik malaria. (Elyazar *et.al.*, 2011). Endemisitas malaria dipengaruhi oleh faktor-faktor antara lain faktor interaksi *host-vector* (terjadi melalui kegiatan pertanian, aktivitas malam hari, gerakan migrasi), faktor dari parasit (adanya spesies yang berbeda serta panjang siklus sporogonik) kemudian faktor dari vektor (dapat berupa kepadatan, larva lokasi perkembangbiakan, suhu, dan faktor lingkungan (fisik, biologis, sosio-ekonomi) (Autino *et al.*, 2012).

Upaya pengendalian vektor malaria menjadi salah satu fokus yang terus dikembangkan. Upaya pengendalian vektor merupakan upaya meminimalisir kontak vektor dengan manusia dan 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 bakteri untuk insektisida seperti *Bacillus thuringiensis* yang mempunyai senyawa toksik sehingga menyebabkan kematian larva. Agen biologis lain yang dapat digunakan untuk menekan populasi larva *Anopheles* adalah membiakkan ikan pemakan larva (*larvivorous fish*). Pengendalian untuk *Anopheles* dewasa dapat ditekan populasinya dengan penyemprotan ruangan (*Indoor Residual Spraying*). Upaya meminimalisir kontak vektor-manusia dapat dilakukan dengan perlindungan secara fisik (penggunaan *lotion* anti nyamuk, baju panjang dll.), (Elyazar *et al.*, 2011).

Upaya pengendalian vektor juga memerlukan metode yang cepat dan akurat untuk mengidentifikasi spesies yang penting. Misalnya di negara Australia, diketahui lebih dari 300 spesies nyamuk terdapat di negara ini, dari 300 spesies tersebut banyak yang memiliki potensi vektor patogen penyakit terhadap kesehatan manusia dan hewan (Ehlersm and Alsemgeest, 2011). Upaya pengendalian vektor di Australia bergantung pada identifikasi morfologi menggunakan kunci dikotomi, namun upaya ini mengalami keterbatasan untuk membedakan spesies yang mirip. Dalam mengatasi permasalahan ini, maka *DNA barcoding* merupakan upaya yang dapat diandalkan untuk mengetahui karakteristik vektor penyakit malaria secara cepat dan akurat (Batovska *et al.*, 2014).

Melalui metode *DNA barcoding* sebanyak 29 spesies nyamuk asal Australia bagian tenggara dapat teridentifikasi dan *barcode* dari nyamuk tersebut telah tersedia di *Mosquitoes of the World Campaign* yang dapat membantu program pengendalian vektor. Penelitian terkini telah mengungkapkan potensi *DNA barcoding* dalam mendefinisikan distribusi geografis dan diversitas genetik spesies. Dalam program pengendalian vektor, *DNA barcoding* berperan untuk menghasilkan data molekuler atau perpustakaan *barcode* terkait spesies-spesies yang merupakan vektor penyakit. Perpustakaan *barcode* yang ditargetkan memungkinkan berguna untuk program pengendalian vektor di negara-negara seperti Belgia, Cina, Kanada, India, dan Singapura (Cywinska *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2007; Wang *et al.* 2012; Chan *et al.* 2014; Versteirt *et al.*, 2015).

2.2. Diversitas *Anopheles*

Sekitar 41 genera dan 3500 spesies dan subspecies dari nyamuk ada di seluruh dunia. Meskipun nyamuk sudah dipelajari lebih luas daripada kebanyakan kelompok serangga lainnya karena mereka berperan sebagai vektor penyakit, pengetahuan taksonomi dari serangga ini masih belum lengkap sampai saat ini (Wang *et al.*, 2012). *Anopheles* merupakan salah satu anggota Culicidae yang paling banyak dipelajari, terdapat sekitar 460 spesies *Anopheles* telah diidentifikasi, sebanyak 100 spesies dilaporkan sebagai vektor malaria, dan hanya 30-40 spesies yang dilaporkan membawa parasit *Plasmodium* (Kamareddine, 2012).

Anopheles terdiri dari 2 sub genus yaitu *Cellia* dan *Anopheles*. Spesies dari sub genus *Cellia* diantaranya adalah *An. vagus*, *An. indefinitus*, *An. subpictus*, *An. aconitus*, *An. minimus*, *An. sundaicus*, *An. maculatus*, *An. kochi*, *An. tessellatus*. Spesies dari sub genus *Anopheles* ada yang termasuk ke dalam kelompok spesies: *Anopheles hyrcanus* grup, *Anopheles barbirostris* grup dan *Anopheles umbrosus* grup (Reid, 1968). Salah satu spesies yang dilaporkan merupakan vektor malaria adalah *Anopheles vagus* (Stoop *et al.*, 2009), ditemukan positif sporozoit *Plasmodium falciparum* di berbagai wilayah endemik malaria. *An. vagus* juga ditemukan dengan kepadatan tinggi di beberapa daerah endemik malaria (Boewono dan Ristiyanto, 2005). Habitat *An. vagus* bervariasi, baik di dataran tinggi (air tawar) maupun rendah (pantai) (Ndoen *et al.*, 2008).

Fakta bahwa spesies nyamuk sering ditemukan dalam kelompok-kelompok yang berkerabat dekat serta adanya *sibling species* yang sering disebut spesies 'kompleks' (semuanya isomorfik) yaitu kelompok yang beranggotakan individu-individu dengan morfologi yang hampir mirip sehingga sulit dibedakan apabila diidentifikasi secara morfologi (Beebe, 2018). Misalnya, kasus malaria di Eropa pada awal abad kedua puluh, dengan vektor utamanya adalah *An. maculipennis* yang ternyata bukan merupakan spesies tunggal seperti yang awalnya diasumsikan, tetapi sebenarnya adalah kompleks beberapa spesies dengan karakter morfologi yang tumpang tindih (Hackett, 1937). Anggota kompleks lainnya seperti *An. culicifacies complex* dari India (Subbarao *et al.*, 1998), *An. dirus complex* (Kanda

et al., 1982), *An. funestus complex* (Green & Hunt, 1980), *An. gambiae complex* (Collins, 1996).

2.3 Teknik DNA *Barcoding*

DNA *barcoding* merupakan suatu metode molekuler yang menggunakan sekuen pendek dari DNA sebagai penanda genetik untuk identifikasi spesies (Hebert, *et al.*, 2003; Paz dan Crawford, 2012). Sekuen DNA yang dapat dijadikan penanda harus bersifat universal, mempunyai variasi tinggi *inter-spesies* dan terkonservasi *intra-spesies*, mudah diamplifikasi (Hebert *et al.*, 2003) serta berukuran pendek berkisar antara 400-800 bp. Teknik DNA *barcoding* yang berkembang paling awal yaitu penggunaan *Internal Transcribed Spacer Sub Unit 2* (Merget *et al.*, 2012), diikuti dengan *Cytochrome b Oxidase* (Shen *et al.*, 2013), 12S rRNA (Vences *et al.*, 2005), serta *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Dehydrogenase* (Rach *et al.*, 2008).

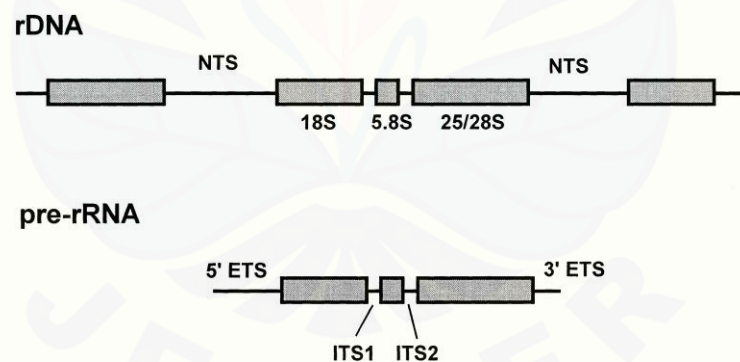
DNA *barcoding* telah diaplikasikan untuk identifikasi beberapa eukariot mulai dari organisme sederhana sampai organisme yang kompleks. Metode ini banyak digunakan untuk identifikasi beberapa spesies tumbuhan, misalnya pada famili Asteraceae, Moraceae, dan famili lainnya (Fahad *et al.*, 2014). selain diaplikasikan pada tumbuhan, metode DNA *barcoding* juga diaplikasikan untuk identifikasi hewan, termasuk kelompok serangga. Salah satu kelompok serangga yang paling banyak dipelajari adalah nyamuk, hal ini dikarenakan nyamuk merupakan vektor beberapa penyakit sehingga lebih banyak dipelajari dibandingkan serangga lain (Wang *et al.*, 2012).

Dalam teknik *barcoding* pada spesies nyamuk, beberapa marker yang dapat digunakan antara lain *Elongation Factor-1 alpha (EF-1a)*, *Acetylcholinesterase 2 (ace-2)*, *Alpha Amylase*, *Zinc Finger*, and *Internal Transcribed Spacer Sub Unit 2 (ITS2)* (Foley *et al.* 2007; Puslednik *et al.* 2012). Penggunaan lebih dari satu marker (*multiple genes*) dapat membantu untuk membedakan anggota spesies kompleks dan *subgroups* yang berkerabat dekat (Foster *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2014). Teknik DNA *barcoding* terbukti lebih akurat untuk identifikasi serta telah menyelesaikan beberapa permasalahan jangka panjang dalam bidang taksonomi

(Herran *et al.*, 2001; Puch, *et al.*, 2003) dan memfasilitasi identifikasi akurat spesies nyamuk, khususnya dalam kelompok *sibling species*. Aplikasi yang pernah dilakukan, misalnya pada *Anopheles anthropophagus* dan *Anopheles sinensis* bisa diidentifikasi lebih mudah, cepat, dan akurat menggunakan *marker* urutan ITS2 (Puch *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2004).

2.4 DNA *Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2)*

Salah satu penanda genetik yang digunakan dalam metode DNA *barcoding* adalah *Internal Transcribed Spacer Sub Unit 2 (ITS2)* yang merupakan bagian dari *nuclear ribosomal DNA* (Sum *et al.*, 2014). *Nuclear ribosomal DNA* (nrDNA) mengandung sejumlah gen antara lain 18S, 5.8S dan subunit 28S dalam organisme eukariotik. Terdapat dua daerah *Internal Transcribed Spacer (ITS)* yaitu ITS1 dan ITS2, ITS1 memisahkan gen 18S dan 5.8S dan ITS2 berada di antara gen 5.8S dan 28S (Fedoroff, 1979). ITS2 digunakan sebagai penanda yang dapat diandalkan untuk klasifikasi taksonomi lintas taksa dan dapat digunakan untuk rekonstruksi filogenetik berdasarkan laju evolusi (Coleman, 2003; Alvarez dan Wendel, 2003).



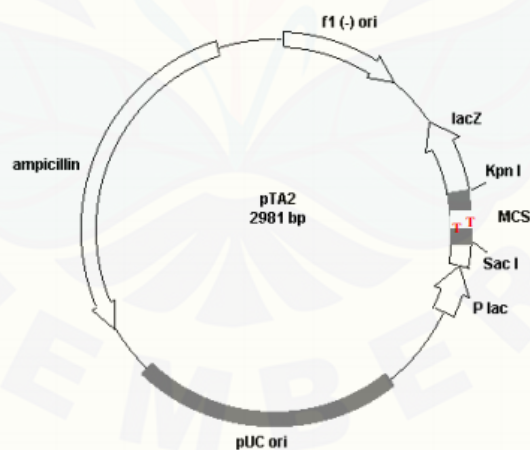
Gambar 2.2 Struktur rDNA and Pre-rRNA Eukariotik (Brown & Shaw, 1998)

Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) telah digunakan sebagai penanda filogenetik selama lebih dari dua dekade. Penelitian mengenai ITS2 terfokus pada urutan ITS2 yang sangat variabel, kombinasi dari urutan ITS2 dan struktur sekundernya yang terkonservasi memungkinkan inferensi filogenetik di beberapa tingkatan taksonomi termasuk penentuan spesies (Merget *et al.* 2012). Aplikasi ITS2 dalam teknik *DNA Barcoding* telah berhasil digunakan untuk

mengidentifikasi anggota kompleks spesies *Anopheles*, seperti *An. hyrcanus group* (Li *et al.*, 2005), *An. dirus group* dan *An. maculatus group* (Walton *et al.*, 1999).

2.5 Vektor Kloning pTA2

Kloning merupakan metode molekuler untuk propagasi suatu gen yang diinsersikan ke dalam suatu molekul DNA sirkuler (plasmid) dan diproduksi secara *in vivo* melalui suatu *host* seperti bakteri (Miles and Wolf, 1989). Keberhasilan metode kloning didasarkan atas reaksi enzimatik dari enzim T4 DNA ligase yang dilakukan dalam proses ligasi. Enzim T4 DNA ligase yang mampu meligasikan sekuens *insert* dengan plasmid. Enzim ini mampu meligasikan DNA dengan mengkatalis ikatan fosfodiester pada ujung *5-phosphate* dan *3-hydroxyl* (Bola, 2005). Dalam metode kloning diperlukan adanya vektor yang akan membawa gen target, vektor yang digunakan berupa molekul DNA ekstrakromosomal yang disebut plasmid. Plasmid umumnya beruntai ganda, molekul sirkuler, dan tertutup secara kuat dengan ikatan kovalen. Plasmid dapat diisolasi dari sel bakteri dalam bentuk superheliks (Sambrook and Russel, 2001).



Gambar 2.3 Peta Vektor pTA2 (Toyobo, 2009)

Salah satu plasmid yang sering digunakan untuk kloning adalah pTA2. Plasmid ini memiliki *single 3'terminal thymidin* di kedua ujungnya. Adanya *T-overhangs* di bagian ujungnya akan meningkatkan efisiensi ligasi produk PCR pada situs penyisipannya serta mencegah terjadinya resirkularisasi (Bola, 2005). Plasmid

ini berukuran 2981 pasang basa dan membawa beberapa gen seperti titik ori, *lacZ*, gen resisten ampisilin, situs restriksi, dan situs penyisipan untuk gen yang akan diperbanyak (Toyobo, 2009). Gen yang terkandung dalam plasmid memberikan keuntungan bagi sel bakteri, seperti resistensi terhadap antibiotik, produksi toksin, dan produksi enzim restriksi (Sambrook and Russel, 2001). Sifat resistensi antibiotik yang dibawa oleh plasmid dapat dimanfaatkan dalam proses kloning gen sebagai penanda seleksi hasil transformasi (Casali and Preston, 2003).

