LAPORAN PENELITIAN

"Keanekaragaman Genetik Nyamuk Vektor Filariasis *Culex* quinquefasciatus Say, 1823 (Diptera: Culicidae) di Kota dan Kabupaten Pekalongan Dengan Metode PCR-RAPD"



Oleh:

Anindita Riesti Retno Arimurti 0705048903

LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SURABAYA
2017

LAPORAN PENELITIAN

"Keanekaragaman Genetik Nyamuk Vektor Filariasis *Culex*quinquefasciatus Say, 1823 (Diptera: Culicidae) di Kota dan Kabupaten
Pekalongan Dengan Metode PCR-RAPD"

Oleh:

Anindita Riesti Retno Arimurti 0705048903

LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SURABAYA
2017

HALAMAN PENGESAHAN

Judul Penelitian Keanekaragaman Genetik Nyamuk Vektor

Filariasis Culex quinquefasciatus Say, 1823 (Diptera: Culicidae) di Kota dan Kabupaten

Pekalongan Dengan Metode PCR-RAPD

Nama Lengkap : Anindita Riesti Retno Arimurti, S.Si., M.Si.

NIDN : 0705048903 Jabatan Fungsional : Tenaga Pengajar

Perguruan Tinggi Asal : Universitas Muhammadiyah Surabaya

Alamat Institusi : Jl. Sutorejo No.59, Surabaya

Telepon/Fax/Email : 081216140525

Anggota Peneliti (1)

Nama Lengkap **NIDN** Jabatan Fungsional Perguruan Tinggi Asal

Alamat Institusi

Total Biaya : Rp. 8.250.000,00

Surabaya,

Mengetahui

Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan

Dr. Mundakir S.Kep, Ns., M.Kep

NIP. 1975.0323.2005.01.1.002

Anindita Riesti R. A., S.Si., M.Si. NIP. 012.05.1.1989.16.221

Peneliti

Menyetujui

PPM UMSurabaya

Sujinah, M.Pd.

NIP. 012.02.1.1965.90.004

DAFTAR ISI

COVER	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
DAFTAR ISI	iii
ABSTRAK	1
BAB I	
PENDAHULUAN	2
BAB II	
TINJAUAN PUSTAKA	4
BAB III	
TUJUAN PENELITIAN	14
MANFAAT PENELITIAN	14
BAB IV	
METODE PENELITIAN	15
BAB V	
HASIL	22
LUARAN YANG DICAPAI	33
BAB VI	
RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA	34
BAB VII	
SIMPULAN DAN SARAN	35
DAFTAR PUSTAKA	36
LAMPIRAN	
1. Lampiran Keuangan	41
2. Lampiran Jadwal Penelitian	42

ABSTRAK

Nyamuk *Culex quinquefasciatus* merupakan vektor cacing nematoda *Wuchereria bancrofti* yang merupakan penyebab penyakit filariasis di negara tropis dan subtropis. Distribusi *Cx. quinquefasciatus* yang luas di wilayah Indonesia dengan perbedaan letak geografis, mengakibatkan adanya adaptasi terhadap lingkungan sehingga dimungkinkan terjadinya variasi yang tinggi, baik variasi fenotip (morfologi) maupun genotip (genetik).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keanekaragaman genetik nyamuk *Cx. quinquefasciatus* yang merupakan vektor filariasis di Kota dan Kabupaten Pekalongan. Karakterisasi genetik dilakukan dengan metode PCR-RAPD menggunakan tiga *primer*, yaitu OPA-11, OPA-12, dan OPA-15. Data dianalisis dengan algoritme UPGMA dan koefisien *Simple Matching* untuk disajikan dalam bentuk dendrogram. Hasil menunjukkan adanya keanekaragaman genetik yang tinggi dengan polimorfisme mencapai 100% pada populasi sampel nyamuk *Cx. quinquefasciatus* dari Kota dan Kabupaten Pekalongan.

Kata kunci: Culex quinquefasciatus, vektor, filariasis, PCR-RAPD

BABI

PENDAHULUAN

Nyamuk *Culex quinquefasciatus* merupakan vektor cacing nematoda *Wuchereria bancrofti* yang merupakan penyebab penyakit filariasis di negara tropis dan subtropis (Barbosa *et al.*, 2007). Nyamuk ini memiliki aktivitas pada malam hari. Pada malam hari, mikrofilaria cacing *W. bancrofti* aktif berada di darah tepi tubuh penderita. Saat nyamuk *Cx. quinquefasciatus* menggigit, maka mikrofilaria dari penderita tersebut akan pindah dari tubuh manusia ke nyamuk. Di tubuh nyamuk, mikrofilaria akan memendek, menjadi L-1. Kemudian menembus mukosa usus menuju thoraks dan berkembang menjadi L-2. Selanjutnya akan menuju ke kelenjar ludah (di bagian kepala) dan menjadi L-3. Jika nyamuk tersebut menggigit manusia lagi, maka nyamuk memindahkan larva (L-3) *W. bancrofti* sehingga manusia sehat akan terinfeksi *W. bancrofti*. Menurut data WHO di tahun 1984, lebih dari 90 juta orang diseluruh dunia terinfeksi penyakit filariasis (Maheswaran *et al.*, 2008). Habitat nyamuk *Cx. quinquefasciatus* adalah genangan air hujan, drainase yang terhambat, dan tempat – tempat dengan genangan air yang kotor.

Filariasis merupakan salah satu penyakit menular yang dapat menimbulkan cacat menetap dan menahun berupa pembesaran kaki, lengan dan/atau alat kelamin (Khomsah, 2009). Penyakit ini bukanlah penyakit yang mematikan, namun bagi penderita mungkin menjadi sesuatu yang dirasakan memalukan dan dapat mengganggu aktifitas sehari - hari. Penyakit filariasis terkait dengan kemiskinan, karena kebanyakan kasus ditemukan pada masyarakat pedesaan dan perkotaan yang kumuh (Sabin Vaccine Institute, 2000).

Filariasis merupakan masalah kesehatan masyarakat di Indonesia, khususnya didaerah endemik seperti Pekalongan, Jawa Tengah. Berdasarkan data Depkes RI, jumlah penderita filariasis kronis hingga Oktober 2009 mencapai 11.699 kasus, tersebar di 386 kabupaten atau kota di Indonesia (DEPKES, 2009). Oleh karena itu harus dicegah terjadinya penularan hingga munculnya kecacatan akibat filariasis melalui pengobatan massal di wilayah endemik, menghindarkan

diri dari gigitan nyamuk, juga membersihkan lingkungan yang menjadi tempat perindukan nyamuk.

Distribusi *Cx. quinquefasciatus* yang luas di wilayah Indonesia dengan perbedaan letak geografis, mengakibatkan adanya adaptasi terhadap lingkungan sehingga menyebabkan terjadinya variasi yang tinggi, baik variasi fenotip (morfologi) maupun genotip (genetik) (Ellegren, 2009). Variasi ini dapat disebabkan oleh seleksi, rekombinasi, dan mutasi (Frankham *et al.*, 2002).

Penanda molekuler merupakan suatu analisis dengan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) yang efektif untuk mengetahui variasi genetik. Contoh penanda molekuler yang banyak digunakan antara lain RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), SSR (*Simple Sequence Repeat*), ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), dan RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Penanda RAPD merupakan pengembangan teknik PCR dan banyak digunakan untuk analisis variasi genetik pada serangga. Penanda RAPD telah digunakan dalam analisis variasi genetik nyamuk *Cx. quinquefasciatus* dari India (Sharma *et al.*, 2009). Hasil penelitian tersebut menunjukkan penanda RAPD dapat mendeteksi variasi antara individu dalam suatu populasi dan variasi antar populasi yang berbeda letak geografisnya.

Sejauh ini belum masih sangat terbatas informasi mengenai penelitian yang mengungkap variasi genetik nyamuk *Cx. quinquefasciatus* di Indonesia, khususnya di Kota dan Kabupaten Pekalongan, sehingga perlu dilakukan penelitian ini.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Filariasis

a. Definisi dan Penyebabnya

Filariasis adalah penyakit zoonosis yang disebabkan infeksi oleh sekelompok cacing nematoda parasit yang tergabung dalam familia Filarioidea. Anggota familia Filaroidea hidup di jaringan limfoid, jaringan tubuh, dan rongga badan (Sandjaja, 2007). Gejala umum yang terlihat adalah terjadinya elefantiasis, berupa membesarnya tungkai bawah (kaki) dan kantung zakar (skrotum), sehingga penyakit ini secara awam dikenal sebagai penyakit kaki gajah. Nematoda penyebab filariasis antara lain *Wuchereria bancrofti, Brugia malayi*, dan *Brugia timori* (Gandahusada *dkk.*, 2003).

Prinsip patologis penyakit filariasis bermula dari inflamasi saluran limfe akibat dilalui cacing filaria dewasa (bukan mikrofilaria). Cacing dewasa merusak saluran limfe aferen atau sinus-sinus limfe sehingga menyebabkan dilatasi limfe pada tempat-tempat yang dilaluinya. Dilatasi ini mengakibatkan banyaknya cairan plasma yang terisi dari pembuluh darah sehingga menyebabkan penebalan pembuluh darah di sekitarnya. Akibat kerusakan pembuluh, akan terjadi infiltrasi sel-sel plasma, eosinofil, serta makrofag di dalam dan sekitar pembuluh darah yang terinfeksi. Kemudian menyebabkan terjadinya proliferasi jaringan (Majalah Farmacia, 2006).

Infeksi filarial ini dimulai saat ada nyamuk yang membawa larva cacing filarial, kemudian nyamuk tersebut menggigit manusia sehingga larva cacing berpindah ke manusia dan berkembang di jaringan limfe. Pada awal infeksi tidak terdapat gejala klinis (asymptoms). Setelah beberapa tahun, gejala filariasis akan nampak, seperti lymphadema pada tangan, kaki, dan/atau alat genital (Gambar 1.) (Pratiwi *dkk.*, 2010). Lymphadema terjadi karena adanya dilatasi saluran limfe. Dilatasi ini mengakibatkan banyaknya cairan limfe yang mengisi saluran sehingga terjadi pembengkakan saluran limfe (Zulkoni, 2010).

Berdasarkan lama infeksinya, filariasis dapat dibedakan menjadi tiga stadium, yaitu :

- 1. Stadium asymptoms, belum ada gejala
- 2. Stadium akut, ditandai dengan peradangan pada saluran kelenjar limfe
- 3. Stadium kronis (menahun), disertai pembengkakan tungkai, buah zakar, vulva, lengan, dan payudara (Gandahusada *dkk.*, 2003)



Gambar 1. Penderita filariasis (Anomin¹, 2010)

b. Penyebaran Filariasis di Indonesia

Penyakit filariasis disebarkan oleh anggota Kelas Insecta Ordo Diptera, yaitu berbagai jenis nyamuk. Jenis nyamuk yang berpengaruh terhadap penyebaran filariasis di Indonesia diantaranya adalah *Cx. quinquefasciatus*. Nyamuk ini memindahkan mikrofilaria dari manusia penderita filariasis ke manusia lainnya.

Filariasis merupakan masalah kesehatan yang hampir ada di setiap negara di dunia ini (Gambar 2.). Hampir seluruh wilayah Indonesia merupakan wilayah endemik filariasis. Bekasi, Bogor, Banjarmasin, Semarang, Padang, dan Papua Barat merupakan contoh daerah endemik filariasis di Indonesia. Filariasis dikatakan endemik jika (Anonim³, 2010):

- Ditemukan mikrofilaria rate ≥ 1% pada sampel darah penduduk di sekitar kasus filariasis → diobati massal selama 5 tahun berturut - turut
- 2. Ada 2 atau lebih kasus disuatu wilayah pada jarak terbang nyamuk yang mempunyai riwayat menetap bersama atau berdekatan selama lebih dari setahun

Kasus filariasis di Indonesia lebih dari 70%. Mayoritas kasus filariasis terjadi di desa dengan kondisi lingkungan yang kumuh dan kotor. Terdapat beberapa cara untuk menghindari dan mencegah penularan penyakit ini, antara lain pengobatan penderita filariasis dan sekitarnya, pengendalian vektor, memberikan informasi dan penyuluhan pada masyarakat. Menurut Brown² (1979) kegiatan pengendalian vektor yang dapat dilakukan antara lain

1. Fisik – mekanik

Menggunakan dan memanfaatkan faktor iklim, kelembaban, suhu, dan cara memperoleh makanan

2. Fisiologis

Merupakan suatu cara pengendalian vektor dan binatang pengganggu dengan memanipulasi bahan, menarik atau menolak vektor

3. Pengelolaan Lingkungan

Mengubah kondisi sementara sehingga tidak cocok untuk perkembangbiakan vektor. Atau dapat dengan mengatur lingkungan dengan cara drainase dan perpipaan

4. Biologis

Memanfaatkan tumbuhan air, hewan, predator, dan bakteri

5. Khemis

Menggunakan pestisida

Selain itu deteksi mikrofilaria pada nyamuk sebagai vektor juga perlu dilakukan, terutama di daerah endemik filariasis. Salah satu metode yang dikembangkan untuk mendeteksi mikrofilaria yang ada pada nyamuk yaitu dengan cara PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (Astuti *dkk.*, 2004).



Gambar 2. Wilayah endemik filariasis di dunia (Anomin, 2008)

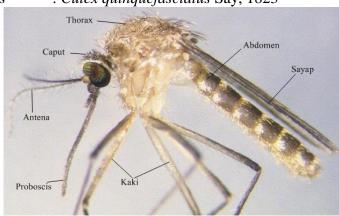
B. Culex quinquefasciatus

a. Klasifikasi

Klasifikasi nyamuk *Cx. quinquefasciatus* menurut Sirivanakarn dan White (1978) sebagai berikut :

Kingdom : Animalia Phylum : Arthropoda Subphylum : Hexapoda Class : Insecta Subclass : Pterygota : Neoptera Infraclass Order : Diptera Suborder : Nematocera Infraorder : Culicomorpha Familia : Culicidae : Culicinae Subfamilia Tribe : Culicini Genus : Culex

Species : Culex quinquefasciatus Say, 1823



Gambar 3. Morfologi Cx. quinquefasciatus Say (Russell, 1996)

b. Morfologi dan Daur Hidup

Serangga punya peranan yang penting di lingkungan dan dibidang kesehatan. Peranan tersebut ada yang menguntungkan, tetapi dapat juga merugikan. Di bidang kesehatan, serangga lebih bersifat merugikan. Salah satu contoh serangga yang merugikan dibidang kesehatan adalah nyamuk.

Nyamuk termasuk Ordo Diptera yang artinya hanya mempunyai satu pasang sayap sejati yang bersifat membraneus dan sepasang sayap yang mereduksi, yang menjadi alat keseimbangan yang disebut halter (Romoser dan Stoffolano, 1998). Bagian tubuh nyamuk dapat dibedakan menjadi tiga bagian, yaitu caput, thorax, dan abdomen (Gambar 3.). Nyamuk merupakan ektoparasit karena menghisap darah host-nya di permukaan kulit. Adapun jenis nyamuk yang menyebarkan penyakit di Indonesia, yaitu *Aedes* menyebarkan virus demam berdarah, *Anopheles* menyebarkan protozoa penyebab malaria, dan *Culex* menyebarkan cacing filariasis (Brown¹, 1979). Salah satu nyamuk *Culex* yang menyebarkan filariasis di Indonesia adalah *Cx. quinquefasciatus*.

Nyamuk mengalami metamorphosis sempurna, dimulai dari telur, larva, pupa, dan imago (dewasa). Perkembangan dari larva menjadi pupa berlangsung selama 6-8 hari. Masa pupa hanya 2–3 hari setelah itu berkembang menjadi imago. Nyamuk dewasa betina dapat bertahan hidup selama 4–5 bulan. Akan tetapi pada saat musin kemarau, nyamuk dewasa betina hanya dapat bertahan hidup 2 minggu, sedangkan nyamuk jantan 1 minggu (Anonim, 2009).

Larva *Cx. quinquefasciatus* banyak ditemukan di genangan air kotor, seperti got, saluran pembuangan air, sumur, dan tempat penampungan air lainnya. *Cx. quinquefasciatus* tersebar hampir di seluruh negara di dunia. Nyamuk ini merupakan vektor filariasis di Indonesia, terutama di wilayah Pulau Jawa dan Kalimantan (Gandahusada *dkk.*, 2003). Nyamuk sebagai vektor filariasis turut menentukan pernyebaran penyakit dan munculnya daerah endemik filarial. Nyamuk *Cx. quinquefasciatus* dinyatakan sebagai vektor filariasis bila (Anonim³, 2010):

 Presentase spesies nyamuk liar yang mengandung larva tinggi (dengan pembedahan)

- 2. Sifat nyamuk yang menggigit orang pada malam hari dapat meningkatkan jumlah infeksi
- 3. Umur nyamuk lebih panjang, sehingga larva filaria dapat berkembang menjadi infektif dalam tubuh nyamuk
- 4. Dominansi spesies nyamuk vektor yang tinggi dalam daerah endemik
- 5. Mudah tersedianya tempat perindukan nyamuk vektor di lokasi endemik

Tidak semua nyamuk menjadi vektor suatu penyakit. Adapun syarat spesifik untuk menjadi vektor suatu penyakit antara lain :

- 1. Memiliki kondisi yang berpotensi untuk pertumbuhan dan perkembangan parasit
- 2. Memiliki kemampuan untuk berkembang pesat
- 3. Memiliki potensi yang tinggi untuk melakukan transmisi (Read and Chandler, 1961)
- 4. Tidak adanya hambatan secara geografis, fisik, ekologis, fisiologis, maupun imunologis (Noble and Noble, 1989)

Cx. quinquefasciatus dewasa mempunyai ciri — ciri morfologi : tubuhnya ramping dan kecil (4–13 mm), kakinya panjang, antena pada nyamuk jantan lebih berbulu dan bertipe plumose, sedangkan pada nyamuk betina bulunya lebih sedikit dan bertipe pilose, tubuh berwarna kecokelatan, *proboscis* halus dan panjang. Pada nyamuk jantan, *proboscis* digunakan untuk menghisap sari buah sedangkan pada nyamuk betina, *proboscis* digunakan untuk menghisap darah hospesnya (Gandahusada *dkk.*, 2003). Darah mengandung serotonin dan adrenalin yang merangsang sekresi hormone gonadotropin yang penting untuk proses ovulasi (Brown², 1979), proboscis berwarna gelap seluruhnya, mesepimeron dengan 1-2 bulu kasar, tergit pada abdomen dengan gelang basal yang sempit, integumen dari pleuron berwarna pucat merata. Menurut Barror *et al.* (1995), ujung abdomen *Culex* betina tumpul.

C. Deskripsi Wilayah Kajian

Pekalongan merupakan salah satu dari 35 Kabupaten atau Kota di Provinsi Jawa Tengah, yang berada di daerah Pantura bagian barat sepanjang pantai utara Laut Jawa memanjang ke selatan dengan Kota Kajen sebagai Ibu Kota, pusat pemerintahan. Secara geografis terletak diantara: 6° - 7' 23" Lintang Selatan dan antara 109° - 109' 78" Bujur Timur. Secara topografis, Kabupaten Pekalongan merupakan perpaduan antara wilayah datar di wilayah bagian utara dan sebagian merupakan wilayah dataran tinggi/pegunungan di wilayah bagian selatan, yaitu diantaranya adalah Kecamatan Petungkriyono dengan ketinggian 1.294 meter diatas permukaan laut. Curah hujan pada tahun 2009 rata-rata per tahun 2.415 mm dengan rata-rata hari hujan 47 hari. Curah hujan tertinggi terjadi di Kecamatan Lebakbarang, rata-rata per tahun 6.246 mm, terendah Kecamatan Kedungwuni rata-rata per tahun 1.307 mm dengan rata-rata hari hujan 133 hari. Luas daerah Kabupaten Pekalongan adalah 83.613,068 Ha (Anonim², 2010).

D. Variabilitas Genetik

Variabilitas genetik atau variasi genetik adalah kecenderungan satu spesies memiliki genotip yang berbeda dalam suatu populasi. Mutasi, rekombinasi, dan seleksi alam menentukan tingkat variasi genetik (Ellegren, 2009).

1. Mutasi

Mutasi adalah perubahan urutan nukleotida. Mutasi dapat menyebabkan keanekaragaman dengan munculnya gen – gen mutan dan akan diwariskan ke keturunannya (Campbell *et al.*, 2002).

2. Rekombinasi

Kombinasi susunan gen dari parental yang bereproduksi secara seksual, menyebabkan keanekaragaman individu dalam satu spesies yang terjadi secara alami (Indrawan *dkk.*, 2007).

3. Seleksi alam

Perubahan kondisi lingkungan menuntut organisme beradaptasi. Adaptasi inilah yang menyebabkan perbedaan – perbedaan pada individu dalam suatu spesies, sehingga adanya variasi genetik (Sofro, 1994).

Variasi genetik menyebabkan individu – individu dalam satu dalam suatu spesies tidak pernah bersifat identik. Variasi genetik dapat diketahui dengan adanya perbedaan urutan nukleotida pada suatu DNA dan ditentukan banyaknya

gen polimorfik (Indrawan *et al.*, 2007). Tingginya variasi genetik dalam suatu populasi tertentu menunjukkan bahwa populasi tersebut memberikan respon adaptif terhadap perubahan lingkungan.

Metode yang digunakan untuk mengetahui variasi genetik pada tingkat DNA, antara lain yaitu *Random Amplified Polymorfic DNA* (RAPD), *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), atau yang lainnya, yang merupakan pengembangan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Arisuryanti dan Daryono, 2007). Diantara banyaknya metode pengembangan PCR, teknik RAPD-lah yang sering digunakan. Selain mudah, teknik RAPD sering digunakan karena teknik ini sangat cepat, sederhana, menghasilkan polimorfisme pita DNA dalam jumlah banyak, dan produk dari PCR berupa DNA *fingerprinting* yang akan dianalisis dengan elektroforesis (Nuchprayoon, 2007).

E. Isolasi DNA

DNA (*Deoxyribo Nucleic Acid*) adalah senyawa kimia yang membawa informasi genetik pada tiap individu dan akan diturunkan keketurunannya. DNA berbentuk untaian ganda (*double helix*). DNA terdapat di nukleus, mitokondria, dan kloroplas. Menurut Suryo (2004), DNA merupakan polimer dari asam nukleat yang terdiri dari tiga molekul, yaitu:

- 1. Gula pentosa, yaitu gula deoksiribosa
- 2. Gugus fosfat
- 3. Basa nitrogen, yang dapat dibedakan menjadi Purin dan Pirimidin. Purin terdiri dari Adenin (A) dan Guanin (G). Sedangkan Pirimidin terdiri dari Timin (T) dan Sitosin/Cytosine (C)

Isolasi DNA adalah suatu metode yang digunakan untuk mendapatkan DNA tanpa debris sel. Metode ini diawali dengan perusakan dinding sel, yang dapat dilakukan baik dengan cara mekanis, fisik, maupun dengan cara enzimatis seperti pemberian lisozim. Langkah berikutnya adalah melisis sel dengan cara mencampurkan senyawa garam dan detergen. Tahap terakhir adalah presipitasi DNA.

F. Amplifikasi DNA dengan Metode PCR-RAPD

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan metode melipatgandakan suatu sekuen nukleotida tertentu yang dilakukan diluar tubuh organisme (*in vitro*). Teknik ini merupakan suatu proses enzimatis, karena dalam prosesnya memerlukan *Taq* Polimerase. Keuntungan dari metode PCR, yaitu menghasilkan DNA dalam jumlah banyak dalam waktu relatif singkat. Menurut Surzycki (2000), ada empat komponen utama dalam metode PCR, yaitu:

- 1. *Template* DNA, yaitu fragmen DNA yang sebagai tempat terjadinya sintesis protein.
- 2. *Primer*, konsentrasi *primer* yang optimal digunakan dalam PCR berkisar 0.1 1.0 pmol.
- 3. Deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP), yaitu reagen yang terdiri dari dATP, dCTP, dGTP, dan dDTP.
- 4. DNA *polymerase*, adalah enzim yang mengkatalis reaksi sintesis rantai DNA. Contoh DNA *polymerase* adalah *Taq polymerase*.

Menurut Sambrook dan Russel (2001), PCR terdiri dari tiga tahap utama, yaitu :

- 1. *Denaturasi*, merupakan proses pemisahan untai ganda DNA *template* menjadi untai tunggal. Suhu yang dipakai pada proses denaturasi 95°C.
- 2. Annealing, merupakan penempelan *primer* yang berupa oligonukleotida pada sekuens target di untai tunggal DNA *template*. Suhu optimal annealing tiap spesies berbeda beda dan juga dipengaruhi oleh *primer* yang digunakan. Suhu yang digunakan yaitu 35-60 °C.
- 3. *Elongasi*, adalah pemanjangan *primer* yang menempel pada DNA *template*. Suhu yang digunakan yaitu 72 °C.

PCR dilakukan berulang selama beberapa siklus. Tiap siklus, terdiri dari ketiga tahapan utama diatas. Selain ketiga tahapan utama PCR tersebut, ada juga tahap pre-denaturasi, yaitu tahap awal sebelum denaturasi dan post-elongasi, yaitu tahap sesudah elongasi.

Apabila genom individu yang diisolasi belum diketahui maka dapat menggunakan penanda genetik RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*).

RAPD adalah metode untuk mendeteksi polimorfisme suatu genom organisme. Metode ini merupakan salah satu pengembangan teknik PCR.

RAPD banyak digunakan untuk mengidentifikasi keragaman pada tingkat intraspesies maupun antarspesies (Adam *et al.*, 2002). Metode ini mendeteksi polimorfisme ruas nukleotida pada DNA dengan menggunakan sebuah *primer* tunggal yang memiliki rangkaian nukleotida acak. Pada metode ini, sebuah *primer* menempel pada DNA genom pada tempat berbeda. Umumnya masing-masing *primer* menyebabkan amplifikasi beberapa lokus (Welsh dan McClelland, 1990). Salah satu keuntungan metode RAPD tidak memerlukan informasi awal mengenai urutan DNA genom organisme yang diuji (Williams *et al.*, 1990).

Prinsip RAPD adalah amplifikasi DNA melalui reaksi PCR sehingga menghasilkan banyak salinan segmen DNA. Produk amplifikasi DNA ini akan dipisahkan menggunakan metode elektroforesis gel agarosa dengan pewarnaan ethidium bromide (EtBr) (Bardakci, 2001).

G. Elektroforesis

Elektroforesis dapat digunakan untuk analisis protein, RNA, dan DNA. Teknik elektroforesis memerlukan gel. Ada banyak zat yang digunakan untul gel elektroforesis, antara lain poliakrilamid, PDA (*Potato Dextrose Agar*), dan agarose. Penggunaan jenis gel disesuaikan dengan tujuan yang akan dicapai (Sulandari dan Zein, 2003). Media yang umumnya digunakan adalah gel agarose, karena gel agarose mempunyai kandungan sulfat rendah, gel yang bening, dan merupakan polisakarida yang netral (tidak bermuatan).

Elektroforesis merupakan teknik pemisahan molekul DNA berdasarkan berat molekulnya. Fragmen DNA didalam gel yang direndam dalam larutan buffer akan bermigrasi kutub negatif ke kutub positif (Yuwono, 2006). Fragmen DNA yang berat molekulnya lebih kecil akan bermigrasi lebih cepat daripada fragmen DNA yang berat molekulnya besar.

Setelah proses elektroforesis, gel agarose direndam di EtBr (*Ethidium bromide*), untuk visualisasi DNA. EtBr akan menyisip kedalam DNA sehingga akan nampak pita atau band pada gel jika dilihat dengan UV (*UltraViolet*).

BAB III TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keanekaragaman genetik nyamuk vektor filariasis *Cx. quinquefasciatus* di Kota dan Kabupaten Pekalongan berdasarkan penanda RAPD.

3.2. Manfaat Penelitian

Adapun manfaat yang didapat dari penelitian ini antara lain, yaitu : memberikan informasi mengenai keanekaragaman genetik nyamuk *Cx. quinquefasciatus* di Kota dan Kabupaten Pekalongan.

BAB IV

METODELOGI PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini adalah observasional yang bertujuan untuk mengetahui keanekaragaman genetik nyamuk vektor filariasis *Cx. quinquefasciatus* di Kota dan Kabupaten Pekalongan berdasarkan penanda RAPD.

4.2 Populasi dan Sampel penelitian

4.2.1 Populasi penelitian

Populasi pada penelitian ini adalah nyamuk *Cx. quinquefasciatus* yang berasal dari kota dan kabupaten Pekalongan

4.2.2 Sampel penelitian

Sampel penelitian ini adalah sebanyak 28 ekor nyamuk *Cx. quinquefasciatus* yang berasal dari kota dan kabupaten Pekalongan

4.3. Variabel Penelitian

Variabel penelitian ini adalah band atau pita DNA yang dihasilkan dari proses PCR RAPD.

4.3.1 Definisi Oprasional Variabel

Band atau pita DNA yang diamati berasal dari sampel yang sudah diproses dengan metode PCR RAPD kemudian dilakukan visualisasi menggunakan elektroforesis dengan menggunakan gel agarosa.

4.4 Pengumpulan dan Pengolahan Data

4.4.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Pengambilan sampel nyamuk *Cx. quinquefasciatus* dilakukan pada tanggal 20 – 21 Agustus 2011 di Kelurahan Simbang Kulon, Kecamatan Buaran, Kabupaten Pekalongan dan tanggal 21 – 22 Agustus 2011 di Kelurahan Pasir Sari, Kecamatan Pekalongan Barat, Kota Pekalongan. Pengambilan sampel nyamuk *Cx. quinquefasciatus* di rumah warga penderita filariasis kronik dan sekitarnya. Isolasi DNA dimulai pada bulan Oktober 2011.

Identifikasi sampel nyamuk dilakukan di Laboratorium Parasitologi pada bulan Agustus sampai September 2011. Isolasi DNA nyamuk *Cx. quinquefasciatus* dilakukan di Laboratorium Genetika pada bulan Oktober sampai November 2011. Optimasi suhu *annealing*, PCR, dan visualisasi produk PCR dilakukan di *Plant Breeding and Gen Lab*, Fakultas Pertanian UGM dan Laboratorium Biokimia, Fakultas Biologi UGM pada bulan November 2011 sampai April 2012.

4.4.2 Bahan dan Alat Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah nyamuk Cx. quinquefasciatus betina dari wilayah Kota dan Kabupaten Pekalongan, Jawa Tengah (Tabel 1).

Bahan yang digunakan saat sampling nyamuk *Cx. quinquefasciatus* antara lain kloroform untuk membius nyamuk dan kertas label.

Sedangkan bahan yang digunakan untuk analisis variasi genetik meliputi: Kit isolasi DNA ®Fermentas : *GeneJET Genomic DNA Purification Kit*, gel agarosa 1,75 %, *buffer* TBE 1X, dan etidium bromide (EtBr), *primer* RAPD, yaitu OPA-11, OPA-12, OPA-15, PCR Kit ®Fermentas (*DreamTaq*TM *Green PCR Master Mix* (2x)), ethanol 70%, PBS, akuabides (water nukleasefree), akuades steril, alumunium foil, dan *ladder DNA* (marker) 100 – 3000 bp ®Vivantis.

Tabel 1. Sampel nyamuk Cx. quinquefasciatus yang digunakan dalam penelitian

Kode Sampel	Lokasi Sampling
KT/BB/IN/3/003	
KT/BR/IN/3/001	
KT/CR/IN/3/003	
KT/AB/IN/6/002	Kota Pekalongan
KT/AR/IN/2/001	
KT/CB/IN/6/002	
KT/AR/OUT/3/001	
KT/AB/OUT/3/001	
KT/BB/OUT/4/001	
KT/BR/OUT/4/001	

	<u> </u>
KT/CR/OUT/4/001	
KT/CB/OUT/4/001	
KB/AB/IN/3/001	
KB/AR/IN/3/001	
KB/BB/IN/3/001	
KB/BR/IN/3/001	
KB/AB/IN/4/001	
KB/AR/IN/2/001	Kabupaten Pekalongan
KB/AR/IN/6/001	
KB/BB/IN/4/003	
KB/BR/IN/2/001	
KB/CB/OUT/1/001	
KB/CR/OUT/3/003	
KB/BB/OUT/4/001	
KB/BR/OUT/2/004	
KB/CB/OUT/6/001	
KB/CR/OUT/2/001	
KB/CR/OUT/5/002	

A. Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini dibedakan menjadi dua macam, yaitu :

- 1. Alat untuk sampling nyamuk *Cx. quinquefasciatus* antara lain *sweep net* untuk menjaring nyamuk, aspirator, *paper cup* yang ditutup kain kasa, mikroskop dan buku identifikasi untuk mengidentifikasi jenis nyamuk yang didapatkan.
- 2. Sedangkan untuk analisis polimorfisme DNA digunakan mortar dan pestel, *ultracentrifuge* (Gyrozen Co., Ltd.), *vortex mixer*, *refrigerator*, pipet mikro (*eppendorf pippet*) P2, P100, dan P1000, *Thermal cycler PCR Machine* (Boeco), elektroforator (*Mini Run Gel Electrophoresis System GE-100*), *UV transilluminator* (BioRad), *ice box, microwave*, inkubator, *autoclave* dan kamera digital untuk memfoto hasil elektroforesis.

4.4.3 Prosedur Pengumpulan Data

1. Sampling Nyamuk Cx. quinquefasciatus

Penangkapan dilakukan tiap dua jam sekali, dimulai pukul 18.00 – 06.00. Selama 40 menit pertama dilakukan penangkapan nyamuk saat nyamuk sedang menggigit manusia (biting) dengan aspirator. Kemudian 10 menit berikutnya dilakukan penangkapan nyamuk saat istirahat (resting) disekitar lokasi dengan menggunakan sweep net. Penangkapan nyamuk dilakukan di dalam dan di luar rumah secara bersamaan. Nyamuk – nyamuk yang tertangkap dikumpulkan dalam paper cup dan diberi label sesuai dengan tempat dan waktu penangkapan. Lalu dibawa ke Laboratorium Parasitologi UGM untuk diidentifikasi.

Identifikasi nyamuk menggunakan mikroskop dan buku identifikasi yaitu Borror (1992) dan Stojanovich *et al.*, (1965), berdasarkan karakter morfologi tiap nyamuk. Identifikasi dilakukan dengan mengamati persamaan antara bentuk antena, panjang *proboscis* dan palpus, dan warna abdomen. Nyamuk yang digunakan sebagai sampel penelitian adalah nyamuk *Cx. quinquefasciatus* betina.

2. Analisis Variasi Genetik

a. Isolasi DNA

Isolasi DNA nyamuk *Cx. quinquefasciatus* menggunakan Kit isolasi *GeneJET Genomic DNA Purification Kit* ®Fermentas dengan prosedur kerja sesuai dengan prosedur dari *GeneJET Genomic DNA Purification Kit* ®Fermentas. Seluruh tubuh nyamuk digerus. Setelah itu, ditambahkan 200μl PBS kemudian dimasukkan ke *microcentrifuge tube*. Selanjutnya ditambah 180 μl *Digestion solution* dan 20 μl proteinase-K lalu di-*vortex*,di-*spindown*, dan diinkubasi pada 56°C dengan menggunakan inkubator selama 3 jam. Kemudian sampel dikeluarkan dan ditambahkan 20 μl *RNase* A, lalu di-*vortex* dan diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit. Kemudian ditambahkan 200 μl *Lysis solution* dan di-*vortex* selama 15 detik, lalu ditambahkan 400 μl 50% ethanol dan di-*vortex*.

Selanjutnya suspensi dipindahkan ke *column*, disentrifuge 6600 rpm selama 1 menit. Supernatant diluar *column* dibuang. Kemudian ditambahkan 500 µl *wash buffer I*, lalu disentrifuge 8800 rpm selama 1 menit. Supernatan diluar *column* dibuang lagi. Kemudian ditambahkan 500 µl *wash buffer II* lalu

disentrifuge 13200 rpm selama 3 menit. *Column* dipindahkan ke *microcentrifuge tube* dan ditambahkan 200µl *Elution buffer*. Kemudian diinkubasi selama 2 menit pada suhu ruang, lalu disentrifuge selama 1 menit dengan kecepatan 8800 rpm. DNA dalam *Elution buffer* pada *microcentrifuge tube* diluar *column* disimpan pada suhu -20°C. DNA yang diperoleh digunakan dalam proses PCR-RAPD selanjutnya.

b. PCR dengan Metode RAPD

DNA nyamuk *Cx. quinquefasciatus* yang telah diisolasi dikeluarkan dari freezer -20°C lalu di-*thawing* menggunakan tangan lalu di-*vortex* dan *spindown*. DNA nyamuk *Cx. quinquefasciatus* akan digunakan sebagai *template* DNA. Tahap selanjutnya dibuat *mix* ramuan untuk PCR dengan komposisi seperti pada Tabel 2.

Tabel 2. Komposisi Reaksi PCR

Komposisi dalam Reaksi PCR	Volume yang Digunakan
Master Mix dream Taq	12,5 μl
Primer RAPD (10 pmol/ μl)	1,5 μl
DNA template (0,2 pg – 20 ng/ µl)	1 μl
dH2O	10 μl
Volume total	25 μl

Semua komponen tersebut disiapkan dalam PCR *tube*. Setelah tercampur semua, PCR *tube* tersebut di-*vortex* dan di-*spindown* dengan kecepatan 3000 rpm. Kemudian PCR *tube* dimasukkan ke *Thermal cycler PCR Machine*. Tahapan PCR yang dilakukan sesuai pada Tabel 3.

Tabel 3. Tahapan PCR

Tahap	Suhu (°C)	Waktu
Pre denaturation	94°C	3 menit
Denaturation	94°C	30 detik
Annealing	36°C	1 menit
Elongasi	72°C	2 menit
Post Elongasi	72°C	5 menit
Endless	4°C	∞

(Tiwari et al., 2004).

Total siklus PCR diatas adalah 45 siklus. Setelah proses PCR selesai, dilanjutkan dengan proses elektroforesis menggunakan agarosa 1,75% dalam buffer TBE 1x dan digunakan *DNA ladder* sebagai acuan pita-pita DNA yang tervisualisasi.

c. Pembuatan buffer TBE 1x

Sebanyak 50 ml *buffer* TBE 10x diambil dan dimasukkan dalam labu ukur 500 ml. Kemudian ditambahkan akuades sampai batas tanda, lalu digojog sampai tercampur homogen.

d. Pembuatan gel agarosa

Agarosa sebanyak 1,75 gram dilarutkan kedalam 100 ml TBE 1X. Setelah itu dipanaskan dengan *microwave* dengan suhu 120°C selama 2 menit dan sampai larut. Lalu didinginkan sampai kurang lebih 60°C. Setelah itu, larutan gel agarosa dituangkan secara perlahan ke cetakan dan dijaga agar tidak terdapat gelembung udara. Lalu diletakkan sisir sumuran di bagian atas cetakan. Ditunggu hingga menjendal. Setelah menjendal, gel agarosa disimpan dalam larutan TBE 1x.

e. Visualisasi hasil PCR dengan elektroforesis

TBE 1x dituangkan ke elektroforesis kit sampai batas pertama. Kemudian gel agarosa yang telah menjendal ditaruh di bagian tengah kit. Lalu hasil PCR sebanyak 5µl dimasukkan ke sumuran gel agarosa. Sumuran pertama diisi dengan *ladder DNA* sebagai penanda dan sumuran selanjutnya diisi hasil PCR. TBE 1x dituangkan sampai batas kedua elektroforator. Selanjutnya gel di-*running* dengan voltase 50V, selama 60 menit. Kemudian elektroforator dimatikan dan gel agarosa direndam dalam etidium bromide (EtBr) selama 30 menit. Setelah 30 menit, gel agarosa kemudian dipindahkan pada *UV transiluminator* untuk dilihat hasilnya dan difoto dengan kamera digital.

Etidium bromide (EtBr) yang digunakan dalam proses *staining* mempunyai konsentrasi 0,5 μg/ml dalam TBE 1x.

B. Analisis Hasil

Hasil penelitian berupa foto *band* hasil elektroforesis DNA. *Band* yang muncul pada hasil elektroforesis ditulis sebagai angka 1 sedangkan bila tidak ada dituliskan 0. Matrik data dibuat dengan program Excell. Setelah data sudah dirapikan maka data dimasukkan kedalam tabel *NTedit*. Lajur/*Rows* diisi dengan

karakter yang di miliki oleh masing-masing individu. Sedangkan kolom/*Coloum* diisi dengan label masing-masing individu yang digunakan.

Langkah selanjutnya, data disimpan sebagai data I, data tersebut merupakan data dasar untuk menganalisis hubungan dan sifat-sifat yang dimiliki antar individu yang di teliti. Selanjutnya, program NTSYS dijalankan. Langkah pertama, dipilih *Similarity* pada program NTSYS. *Similarity* merupakan bagian program dari NTSYS yang digunakan untuk menghitung similaritas yang dimiliki oleh individu satu dengan individu yang lain. Pada *Similarity* data *input* yang digunakan adalah data I yang berupa matrik 0-1 yang disimpan pada *NTedit*. Data output disimpan sebagai data II. Selanjutnya dipilih *Clustering* (SAHN), pada kotak *input* diisi dengan data II, dan data yang dihasilkan disimpan sebagai data III. Data III tersebut merupakan data mentah yang digunakan untuk membuat pohon filognetik. Langkah selanjutnya, yaitu pembuatan dendogram similaritas. Pada tampilan NTSYS dipilih *Graphics* (*TreePlots*). Hasil dari langkah ini adalah dendogram similaritas dalam bentuk gambar dalam file berbentuk *.png*.

Dendogram yang terbentuk digunakan untuk mengetahui similaritas nyamuk *Cx. quinquefasciatus* dari Kota dan Kabupaten Pekalongan dengan melihat koefisien similaritas dan pengelompokkan yang terjadi.

BAB V

HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

5.1. Hasil

a. Identifikasi Cx. quinquefasciatus

Lokasi pengambilan sampel nyamuk baik di Kota maupun Kabupaten Pekalongan cenderung sama, dicirikan dengan banyaknya saluran air menggenang, sangat kotor, dan penuh sampah. Setelah diamati menunjukkan populasi larva nyamuk yang banyak. Pada penelitian ini, hanya dikoleksi nyamuk dewasa yang diambil pada tiga titik sampling, yaitu titik A, B, dan C di rumah warga penderita filariasis dan sekitarnya. Pengambilan sampel nyamuk dilakukan saat nyamuk menggigit atau *biting* (B) maupun terbang bebas atau *resting* (R). Selain itu dibedakan juga antara didalam ruangan (*indoor*) maupun diluar ruang (*outdoor*). Hasil sampling kemudian diidentifikasi. Beberapa sampel nyamuk *Cx. quinquefasciatus* betina kemudian dianalisis genotipnya.

b. Seleksi Primer dan Optimasi Suhu Annealing

Tahap terpenting dari penelitian ini adalah seleksi *primer* yang akan digunakan dalam proses PCR-RAPD dan penentuan suhu optimum *annealing*. Seleksi *primer* RAPD dilakukan karena tidak semua *primer* RAPD memiliki sekuens yang homolog dengan sekuens tertentu pada utas DNA sampel. Pada penelitian ini diseleksi sembilan *primer* yaitu OPA 1, OPA 2, OPA 8, OPA 9, OPA 11, OPA 12, OPA 15, OPA 16, dan OPA 20. *Primer* yang dipilih adalah *primer* yang dapat menghasilkan pita yang jelas (Wilkerson *et al.*, 1993) serta banyaknya perbedaan dan variasi genetik yang dapat dianalisis (Haymer, 1994). Dari kesembilan *primer* tersebut diperoleh tiga primer, yaitu OPA 11, OPA 12, dan OPA 15.

Suhu optimum untuk *annealing* pada penelitian ini adalah 37°C untuk semua *primer*. Nilai Tm (*Temperatur melting*) (Tabel 4.) pada masing-masing *primer* digunakan sebagai landasan optimasi suhu *annealing*. Suhu optimum dapat diperoleh dengan cara nilai Tm dikurangi 5. Namun, optimasi ini dapat diperoleh antara suhu yang sama dengan nilai Tm hingga Tm-5 tergantung masing – masing organisme.

Seleksi *primer* perlu dilakukan untuk menentukan profil DNA yang dihasilkan. Sedangkan optimasi suhu *annealing* sangat diperlukan karena jika suhu *annealing* terlalu tinggi atau terlalu rendah menyebabkan daerah yang teramplifikasi tidak spesifik (Harini *et. al.*, 2008).

Reaksi PCR-RAPD dilakukan selama 45 siklus yaitu siklus maksimal untuk metode PCR-RAPD. Pemilihan siklus ini diharapkan dapat memaksimalkan jumlah amplikon yang dihasilkan, sehingga sekuens nukleotida yang diamplifikasi dapat lebih banyak. Semakin banyak sekuens nukleotida yang diamplifikasi, semakin mudah menganalisis hasil amplifikasi.

Tabel 4. Nilai Tm masing – masing *primer* yang digunakan

Jenis Primer	Urutan Basa Nitrogen (3- 5-)	Tm (°C)
OPA-11	CAA TCG CCGT	39,5
OPA-12	TCG GCG ATAG	39,5
OPA-15	TTC CGA ACCC	39,5

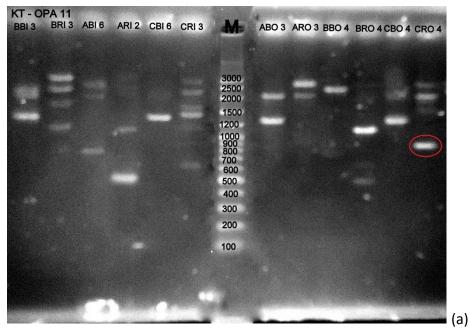
c. Analisis Hasil Amplifikasi dengan PCR-RAPD

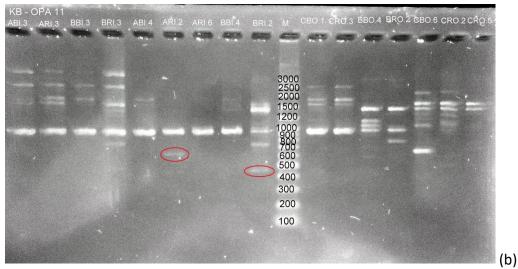
Penelitian keanekaragaman genetik ini dengan metode PCR-RAPD dilakukan berdasarkan ada dan tidaknya pita (*fragmen*) DNA pada gel elektroforesis. Pita DNA yang muncul pada semua individu sampel disebut pita monomorfik, sedangkan pita yang muncul pada beberapa individu tetapi tidak muncul pada individu lainnya disebut pita polimorfik (Grosberg *et al.*, 1996).

Menurut Grosberg *et al.* (1996), jumlah pita yang teramplifikasi oleh *primer* tergantung pada genom individu. Perbedaan ini dapat terjadi karena tiap – tiap individu memiliki urutan nukleotida yang berbeda – beda, sehingga beberapa pita DNApada suatu individu teramplifikasi dan pada individu lainnya tidak. Pita DNA dengan ukuran yang berbeda dari satu *primer* diasumsikan dari lokus yang berbeda, sehingga variasi munculnya pita DNA dapat digunakan sebagai dasar analisis keanekaragaman genetik (Williams *et al.*, 1990).

Pita – pita DNA yang diamplifikasi berulang kali akan terlihat jelas dan tebal, sedangkan pita DNA yang hanya diamplifikasi beberapa kali saja akan terlihat tipis. Akan tetapi tebal tipisnya pita DNA tidak berpengaruh pada hasil

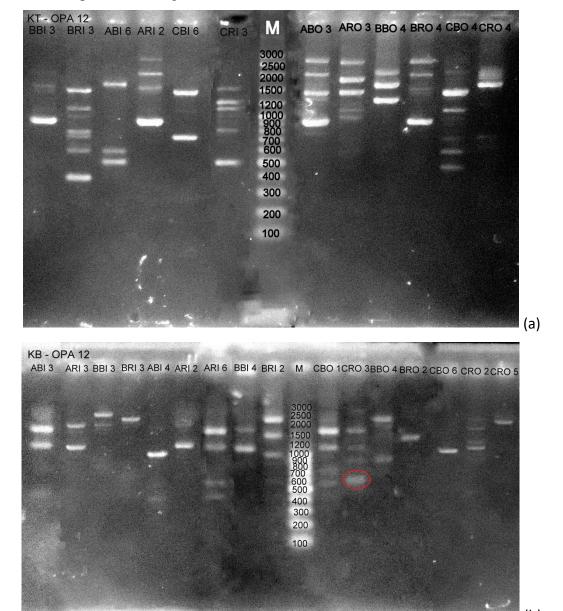
amplifikasi, karena hasil metode PCR-RAPD dipengaruhi ada atau tidaknya pita DNA. Pemisahan pita – pita DNA mengguakan gel agarose dengan prinsip dasar perbedaan berat molekul. Pita DNA dengan berat molekul terbesar terletak paling dekat dengan sumuran gel. Sedangkan pita DNA dengan berat molekul terkecil berada paling jauh dari sumuran gel. Hal ini dapat terjadi karena, molekul yang lebih besar bergerak lebih lambat dalam gel elektroforesis (Grosberg *et al.*, 1996). Hasil amplifikasi pita DNA semua sampel ditunjukkan pada Gambar 4 – 6.





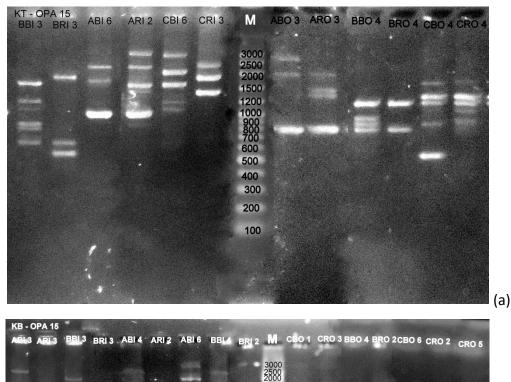
Gambar 4. Hasil amplifikasi DNA Nyamuk *Cx. quinquefasciatus* dengan *primer* OPA-11. (a) DNA nyamuk *Cx. quinquefasciatus* dari Kota Pekalongan dan (b) DNA nyamuk dari Kabupaten Pekalongan

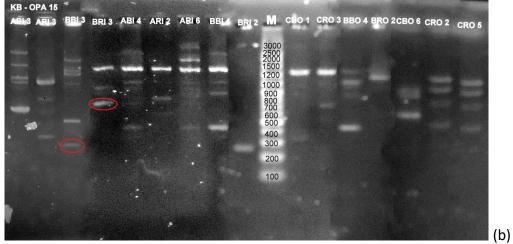
Dari Gambar 4. diatas, hasil amplifikasi nyamuk *Cx. quinquefasciatus* pada kedua lokasi dengan *primer* OPA-11 diperoleh 132 pita DNA polimorfik. Pita DNA pada ukuran 900 bp merupakan pita DNA spesifik karena hanya muncul pada sampel CRO 4 dari Kota Pekalongan. Selain itu ada juga pita DNA spesifik pada ukuran 600 bp pada sampel ARI 2 dan 450 bp pada sampel BRI 2 dari Kabupaten Pekalongan.



Gambar 5. Hasil amplifikasi DNA Nyamuk *Cx. quinquefasciatus* dengan *primer* OPA-12. (a) DNA nyamuk *Cx. quinquefasciatus* dari Kota Pekalongan dan (b) DNA nyamuk dari Kabupaten Pekalongan

Dari Gambar 5. diatas, hasil amplifikasi nyamuk *Cx. quinquefasciatus* pada kedua lokasi dengan *primer* OPA-12 diperoleh 139 pita DNA polimorfik. Pita DNA pada ukuran 650 bp merupakan pita DNA spesifik karena hanya muncul pada sampel CRO 3 dari Kabupaten Pekalongan.





Gambar 6. Hasil amplifikasi DNA Nyamuk *Cx. quinquefasciatus* dengan *primer* OPA-15. (a) DNA nyamuk *Cx. quinquefasciatus* dari Kota Pekalongan dan (b) DNA nyamuk dari Kabupaten Pekalongan

Dari Gambar 6. diatas, hasil amplifikasi nyamuk *Cx. quinquefasciatus* pada kedua lokasi dengan *primer* OPA-15 diperoleh 163 pita DNA polimorfik. Pita DNA pada ukuran 750 bp merupakan pita DNA spesifik karena hanya

muncul pada sampel BRI 3 dan pita ukuran 350 bp pada sampel BBI 3 dari Kabupaten Pekalongan.

Berdasarkan Gambar 4-6. diatas, ketiga primer yang digunakan, yaitu OPA-11, OPA-12, dan OPA-15 menghasilkan pita spesifik, sehingga primer tersebut optimal untuk spesies Cx. quinquefasciatus. Pita spesifik adalah pita yang muncul pada sampel tertentu dengan primer tertentu juga. Dengan adanya pita DNA spesifik pada individu tertentu, kemungkinan merupakan variasi genetik individu tersebut.

Variasi genetik dalam suatu spesies seringkali dipengaruhi oleh perilaku reproduksi individu – individu dalam populasi tersebut (Indrawan *dkk.*, 2007). Hal ini berkaitan dengan pemilihan individu yang akan dijadikan pasangannya dan pemilihan ini berlangsung secara acak sehingga terjadi perkawinan acak (*random mating*). Menurut Frankham *et al.* (2002), populasi – populasi besar yang secara alami melakukan perkawinan acak, dapat memiliki variasi genetik yang tinggi karena keturunan akan menerima kombinasi gen – gen dari parentalnya. Adanya aliran gen (*gen flow*) disebabkan individu pada suatu lokasi tertentu dapat melakukan perkawinan dengan individu yang datang pada lokasi tersebut, sehingga terjadi perbedaan induk dan dapat menimbulkan variasi genetik.

Selain itu faktor seleksi alam, yaitu adanya perubahan kondisi lingkungan juga mendukung terjadinya variasi genetik, karena dengan adanya perubahan lingkungan maka nyamuk akan melakukan adaptasi lingkungan, kemudian menyebabkan perubahan fenotip dan kelamaan akan mempengaruhi genotipnya. Menurut Frankham et al. (2002), individu dengan genotip yang sama dapat memiliki fenotip berbeda, dan sebaliknya individu dengan fenotip sama dapat memiliki genotip yang berbeda. Hal ini disebabkan adanya interaksi antara genotip dengan faktor lingkungan sehingga menyebabkan perbedaan ekspresi genotip menjadi fenotip akibat pengaruh lingkungan. Faktor – faktor mempengaruhi kemampuan nyamuk (serangga) beradaptasi dengan lingkungannya (Rismayadi, 2005):

 Ukuran tubuh dan habitat yang efektif
 Sebagian besar serangga vektor penyakit berukuran kecil, sehingga mempunya relung ekologis luas, sebab mampu mengeksploitasi berbagai jenis habitat. Kemampuan mengeksploitasi habitat inilah yang menyebabkan serangga dijumpai dimana – mana (cosmopolitan)

2. Kemelimpahan dan laju reproduksi

Kemelimpahan serangga dapat dikatakan tinggi pada suatu luasan tertentu dan mampu mencapai usia dewasa dengan cepat untuk bereproduksi. Kedua faktor ini mendukung serangga untuk beradaptasi dengan lingkungannya

3. Kemampuan adaptasi

Serangga merupakan hewan yang sangat toleran terhadap perubahan lingkungan. Kemampuan beradaptasi dengan lingkungan dapat menyebabkan terjadinya variasi pada serangga tersebut

4. Hewan penutup tubuh

Penutup tubuh serangga tersusun dari kitin yang memiliki fleksibilitas namun secara periodik terkelupas dan digantikan jaringan baru seiring pertumbuhan serangga

5. Kemampuan untuk terbang

Serangga merupakan hewan pertama yang mengembangkan kemampuan untuk terbang dan kemampuan ini sangat berperan dalam kesuksesan berkompetisi dengan predator (salah satunya adalah manusia)

d. Analisis Polimorfisme DNA

Polimorfisme pita DNA dengan ketiga primer pada kedua lokasi sampling nyamuk *Cx. quinquefasciatus* disajikan pada Tabel 5 dan 6.

Tabel 5. *Primer* dan Karakteristik Produk Amplifikasi DNA Nyamuk *Cx. quinquefasciatus* dari Kota Pekalongan

Primer	Jumlah	Fragmen	Fragmen	Persentase
	Fragmen	Polimorfik	Monomorfik	Polimorfisme
	Teramplifikasi			(%)
OPA 11	56	56	0	100
OPA 12	78	78	0	100
OPA 15	63	63	0	100
Jumlah	197	197	0	100

Tabel 6. *Primer* dan Karakteristik Produk Amplifikasi DNA Nyamuk *Cx. quinquefasciatus* dari Kabupaten Pekalongan

Primer	Jumlah	Fragmen	Fragmen	Persentase
	Fragmen	Polimorfik	Monomorfik	Polimorfisme
	Teramplifikasi			(%)
OPA 11	76	76	0	100
OPA 12	61	61	0	100
OPA 15	100	100	0	100
Jumlah	237	237	0	100

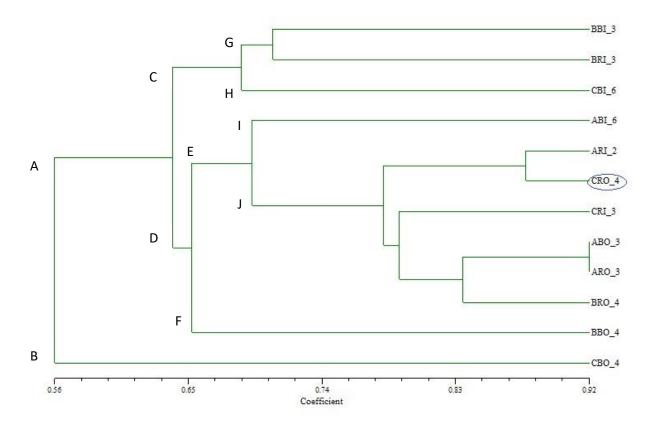
Hasil amplifikasi DNA populasi nyamuk *Cx. quinquefasciatus* baik dari Kota dan Kabupaten Pekalongan, menunjukkan tingkat polimorfisme DNA yang sama, yaitu 100%. Hal ini menunjukkan bahwa tingkat keanekaragaman genetik keduanya tinggi, sejalan dengan hal tersebut disampaikan bahwa menurut Qun-Liu *et al.* (2010), persentase polimorfik diatas 50% menunjukkan keanekaragaman genetik yang tinggi. Adanya keanekaragaman genetik ini mempengaruhi tingkat kemampuan individu tersebut beradaptasi dengan perubahan lingkungan (Frankham *et al.*, 2002).

Perbedaan letak pengambilan sampel nyamuk secara geografis, dapat mempengaruhi siklus hidup nyamuk tersebut, yaitu dengan melakukan penyesuaian perkembangan tanpa mengubah urutan rangkaian dalam siklus hidup (Gullan and Craston, 2000). Perubahan lama siklus hidup pada serangga merupakan salah satu fenomena plastisitas fenotip yang diatur melalui regulasi gen (Braendle et al., 2005; Whitman and Agrawal, 2009) dan kemungkinan dipengaruhi oleh aktivitas transposon. Menurut Yuwono (2005), transposon merupakan elemen genetik yang dapat berpindah dari satu lokus kromosom ke bagian lain kromosom maupun ke lokus kromosom lain. Adanya transposon ini mengubah nukleotida pada individu, urutan genom sehingga memungkinkan terjadinya variasi genetik.

e. Analisis Similaritas Cx. quinquefasciatus

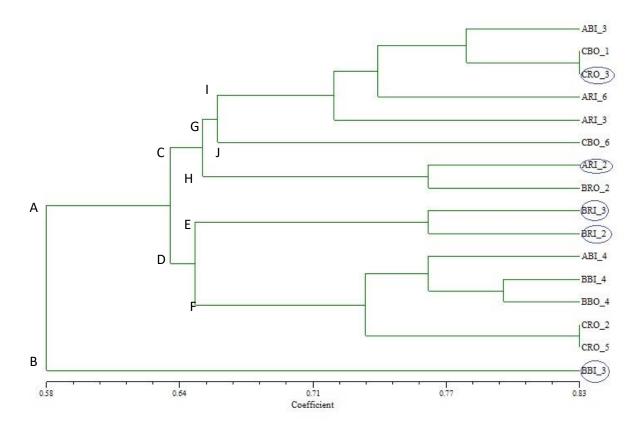
Hasil amplifikasi semua sampel DNA nyamuk *Cx. quinquefasciatus* dianalisi menggunakan *software* NTSYSpc. 21 dan disajikan dalam bentuk dendogram berdasarkan koefisien similaritas, yaitu nilai yang menunjukkan kesamaan genetik sehingga dapat dikelompokkan menggunakan UPGMA.

Berdasarkan analisis similaritas karakter genetis dengan koefisien *Simple Matching* (SM) terhadap sampel DNA nyamuk *Cx. quinquefasciatus* dari Kota dan Kabupaten Pekalongan, maka dapat disajikan seperti pada Gambar 7 - 9.



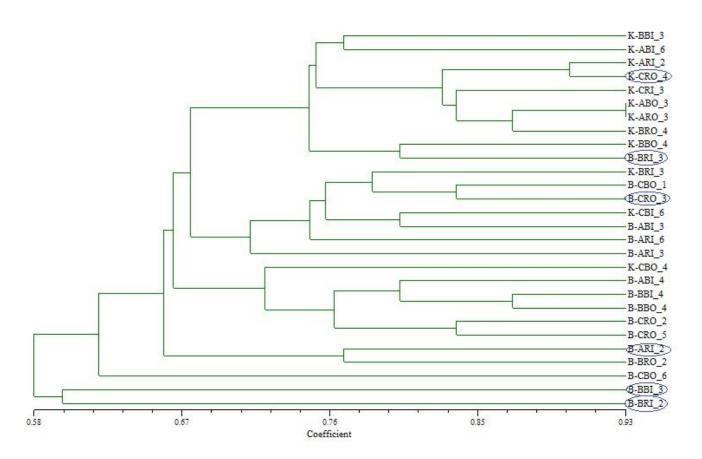
Gambar 7. Dendrogram Similaritas (Fenetik) Karakter Genetis Nyamuk dari Kota Pekalongan dengan Koefisien SM. Keterangan : = sampel dengan pita DNA spesifik.

Dari Gambar 7. dapat diketahui sampel nyamuk *Cx. quinquefasciatus* dari Kota Pekalongan dibagi menjadi dua kluster besar, yaitu A dan B dengan koefisien similaritas 0,56. Pada kluster A tampak hampir semua sampel nyamuk *Cx. quinquefasciatus* mengelompok, sedangkan pada kluster B hanya terdiri dari satu sampel saja, yaitu CBO 4. Hal ini kemungkinan terjadi karena sampel CBO 4 tersebut mempunyai variasi genetik yang sangat tinggi. Sedangkan individu dengan pita spesifik, yaitu CRO 4, mengelompok dengan sampel ARI 2 dengan koefisien similaritas 0,87. Individu dengan koefisien similaritas tertinggi adalah ABO 3 dan ARO 3, yaitu sebesar 0,92.



Gambar 8. Dendrogram Similaritas (Fenetik) Karakter Genetis Nyamuk dari Kabupaten Pekalongan dengan Koefisien SM. . Keterangan : = sampel dengan pita DNA spesifik.

Dari Gambar 8. dapat diketahui sampel nyamuk *Cx. quinquefasciatus* dari Kabupaten Pekalongan dibagi menjadi dua kluster besar, yaitu A dan B dengan koefisien similaritas 0,58. Pada kluster A tampak hampir semua sampel nyamuk *Cx. quinquefasciatus* mengelompok, sedangkan pada kluster B hanya terdiri dari satu sampel saja, BBI 3. Hal ini kemungkinan terjadi karena sampel BBI 3 tersebut mempunyai variasi genetik yang sangat tinggi atau ada kemungkinan bukan nyamuk nyamuk *Cx. quinquefasciatus*, karena sampel ini juga mempunyai pita spesifik. Sedangkan individu dengan pita spesifik, yaitu CRO 3, mengelompok dengan sampel CBO 1 dengan koefisien similaritas 0,83. Sampel lain yang mempunyai pita spesifik, yaitu BRI 3 mengelompok dengan BRI 2, ARI 2 mengelompok dengan BRO 2 dan kedua kelompok tersebut mengelompok dengan koefisien similaritas 0,75. Individu dengan koefisien similaritas tertinggi adalah CRO 2 dan CRO 5, yaitu sebesar 0,83.



Gambar 9. Dendrogram Similaritas (Fenetik) Karakter Genetis Nyamuk dari Kota dan Kabupaten Pekalongan dengan Koefisien SM. Keterangan :

= sampel dengan pita DNA spesifik,

Keanekaragaman genetik nyamuk *Cx. quinquefasciatus* dari Kota dan Kabupaten Pekalongan hampir sama, terbukti dari Gambar 9., ada 11 sampel dari kota dan kabupaten yang mengelompok menjadi satu. Hal ini dapat terjadi karena jarak antara Kota dan Kabupaten Pekalongan sangat dekat dan tidak ada batas khusus, sehingga dimungkinkan adanya mobilitas nyamuk dari Kota ke Kabupaten Pekalongan dan sebaliknya. Adanya mobilitas ini, menyebabkan adanya interaksi dan *breeding* antara nyamuk *Cx. quinquefasciatus* dari Kota dan Kabupaten Pekalongan. *Breeding* yang terjadi adalah *outbreeding*. Terjadinya *outbreeding* dapat meningkatkan nilai heterozigositas, sehingga variasi genetiknya semakin tinggi.

Hasil penelitian keanekaragaman genetik nyamuk *Cx. quinquefasciatus* di Kota dan Kabupaten Pekalongan ini dapat dijadikan *database* ataupun acuan Dinas Kesehatan sebagai informasi mengenai kondisi nyamuk *Cx.*

quinquefasciatus di Kota dan Kabupaten Pekalongan. Penelitian ini harus dilakukan secara berkala. Jika pada penelitian selanjutnya terdapat perbedaan hasil, kemungkinan populasi nyamuk telah mengalami mutasi. Sehingga perlu dilakukan perbaruan atau inovasi baik cara pencegahan maupun pengobatan. Karena dengan adanya mutasi tersebut, menandakan nyamuk telah resisten dengan cara pencegahan dan pengobatan yang ada.

Berdasarkan hasil diatas, maka hipotesis "keanekaragaman sampel nyamuk *Cx. quinquefasciatus* sebagai vektor filariasis dari Kota dan Kabupaten Pekalongan tinggi yang mencapai 100% polimorfisme" dapat diterima.

5.2.Luaran Yang Dicapai

Publikasi ilmiah pada jurnal Nasional ber-ISSN dan ESSN

BAB VI

RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA

1. Rencana jangka pendek:

Publikasi ilmiah pada jurnal nasional ber-ISSN dan ESSN

2. Rencana jangka panjang:

Melakukan sampling dan identifikasi keanekaragaman genetic nyamuk Culex quinqifasciatus di daerah endemic filariasis di Indonesia.

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

Keanekaragaman genetik nyamuk *Cx. quinquefasciatus* dari Kota dan Kabupaten Pekalongan tinggi. Genotip nyamuk *Cx. quinquefasciatus* kota dan kabupaten hampir sama.

7.2. Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dalam bidang genetika molekuler mengenai genotip nyamuk yang membawa larva cacing *W. bancrofti* dan yang tidak. Selain itu perlu juga diteliti mengenai deteksi larva cacing penyebab filariasis dalam nyamuk *Cx. quinquefasciatus* dan di sampel darah penderita filariasis.

DAFTAR PUSTAKA

- Adam, R.P., C. Hsieh, J. Murata, R.N. Pandey. 2002. Systematics of Juniperus from eastern Asia based on Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs). *Biochem. Sys. Ecol.* 30: 231–241
- Anonim. 2008. Lymphatic filariasis. http://www.google.co.id/imgres?imgurl = http://www.cartercenter.org/images/LF_endemicCountries_s.jpg&imgre furl=http://dreadfuldiseases.blogspot.com/2008/06/lymphatic-filariasis .html&usg=__R5xDJgNsI70Hd8sWrS85BuBnJxs=&h=377&w=571&sz=97&hl=id&start=7&zoom=1&um=1&itbs=1&tbnid=-GHr_VqinF7UYM: &tbnh=88&tbnw=134&prev=/search%3Fq%3Dpeta%2Bfilariasis%2Bdi%2Bindonesia%26um%3D1%26hl%3Did%26client%3Dfirefox-a%26sa%3DN%26rls%3Dorg.mozilla:en-S:official%26biw%3 D1024%26bih%3D648%26ndsp%3D20%26tbm%3Disch&ei=DcqJTuaHE7CSiAeVndmvDw. Diakses tanggal 3 Oktober 2011, pukul 22.10
- Anonim. 2009. Medical Entomology. http://medent.usyd.edu.au/photo s/culex%20quinquefasciatus.htm. Diakses tanggal 7 Oktober 2011, pukul 21.53
- Anonim¹. 2010. Surohmat, 15 Tahun Hidup dengan Kaki Gajah. http://magelangimages.wordpress.com/2010/10/03/surohmat-15-tahun-hidup-dengan-kaki-gajah/. Diakses tanggal 7 Oktober 2011, pukul 21.36
- Anonim². 2010. Kondisi Umum Geografis. http://www.pekalongankab.go.id/selayang-pandang/deskripsi-wilayah/kondisi-geografis.html. Diakses tanggal 8 Oktober 2011, pukul 06.11
- Anonim³. 2010. Cacing filarial dan kaki gajah. http://www.etalaseilmu.wordpress.com/2009/11/23/cacing-filaria-dan-kaki-gajah.htm. Diakses tanggal 22 Juni 2012, pukul 15.33
- Arisuryanti, T. dan Budi S. D. 2007. *Buku Ajar Genetika Populasi*. Fakultas Biologi. Universitas Gadjah Mada. Pp : 48 50
- Astuti, U. N. W., Taniawati S., Soleha S., Sumedi S. 2004. *Polymerase Chain Reaction for Detecting of Brugia malayi Larvae Infection Mosquitoes*. Eijkman Symposium. Fakultas Biologi. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta
- Barbosa, R. M. R., Antonio S., Alvaro E. E., and Leda R. 2007. Laboratory and Field Evaluation of An Oviposition Trap for *Culex quonquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 102(5): 523 529
- Bardakci, F. 2001. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. *Turkish Journal of Biology*. 25: 185 – 196

- Borror, D. J., L. A. Triplehorn, dan N. F. Johnson. 1995. *Pengenalan Pelajaran Serangga*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta
- Braendle, C., Friebe I., Caillaud M. C., Strein D. L. 2005. Genetic Variation for An Aphid Wing Polyphenism is Genetically Linked to a Naturally Occurring Wing Polymorphism. *Proceedings of The Royal Society B*. 272: 657 664
- Brown¹, H. W. 1979. Dasar Parasitologi Klinis (terjemahan). Gramedia. Jakarta
- Brown², A. W. A. 1979. *Insect control by chemicals*. John willey & sons. Usa. Pp: 306
- Campbell, A., Reece J. B., dan Mitchell L. G. *Biologi* Jilid 2. Alih bahasa Wasmen Manalu. Erlangga. Jakarta. Hal : 27 29
- DEPKES. 2009. Penderita Filariasis Tersebar di 386 Kabupaten/Kota. http://www.depkes.go.id/index.php/berita/press-release/453-penderita-filariasis-tersebar-di-386-kabupatenkota.html. Diakses tanggal 29 September 2011
- Ellegren, H. 2009. Is Genetic Diversity Really Higher in Large Populations? Journal of Biology, 8:41
- Frankham, R., J. D. Ballou, and D. A. Briscoe. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge: Cambridge University Press
- Gandahusada, S., Herry D. I., Wita P. 2003. *Parasitologi Kedokteran*. Balai Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta. Pp : 35 40, 230 234
- Grosberg, R. K., Levitan, D. R., and Cameron, B. B. 1996. Characterization of Genetic Structure and Genealogies Using RAPD-PCR Marker: A Random Primer for the Novice and Nervous. In Ferraris, J. D., Palumbi, S. R. (EDs) *Molecular Biology: Advances, Strategies, and Protocols*. John Wiley&Sons, Inc. Publication, New York. Pp: 67 132
- Gullan, P. J. and Craston, P. S. 2010. *The Insect : An Outline of Entomology*. Fourth Edition. John Willey and Sons. UK. Pp : 156 158
- Haymer, D. S. 1994. Arbitary (RAPD) Primer Sequences Use in Insect Studies. Insect Molecular Biology. 3(3): 191 – 194

- Harini, S. S., Leelambika, M., Kameshwari, M. N. S., and Sathyanarayana, N. 2008. Optimization of DNA Isolation and PCR-RAPD Method for Molecular Analysis of Urginea indica Kunth. *International Journal of Integrative Biology*. 2(2): 138 144
- Indrawan, M., Primack, R. B., Supriatna, J. 2007. *Biologi Konservasi*. Edisi Revisi. Yayasan Obor Indonesia. Jakarta. Hal : 23 25
- Khomsah. 2009. Penyakit Kaki Gajah (Filariasis atau Elephantiasis). http://www.infopenyakit.com/2009/01/penyakit-kaki-gajah-filariasis-atau.html. Diakses tanggal 29 September 2011
- Maheswaran, R., S. Sathish, and S. Ignacimuthu. 2008. Larvicidal Activity of Leucas aspera (Willd.) Against The Larvae of *Culex quinquefasciatus* Say and *Aedes aegypti* L. *International Journal of Integrative Biology*. 2(3): 214-217
- Majalah Farmacia. 2006. Filariasis Limfatik di Indonesia. http://www.majalah-farmacia.com/rubrik/one_news.asp?IDNews=75. Diakses tanggal 2 Oktober 2011, pukul 15.15 WIB
- Noble, E.R., Noble, G.A. 1989. *Parasitologi : Biologi Parasit Hewan*. Edisi Kelima. Diterjemahkan oleh drh. Wardiarta. UGM Press : Yogyakarta. Pp : 630
- Nuchprayoon, S., Alisa J., and Yong P. 2007. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) for Differentiation between Thai and Myanmar Strains of *Wuchereria bancrofti. Filaria Journal.* 6:6 (doi:10.1186/1475-2883-6-6)
- Pratiwi, Q., Very R., Yuli A., Arifatun N., Sapta D. S., *dkk.* 2010. *Pengendalian Vektor Penyakit Filariasis*. Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Surakarta. Surakarta. Pp: 1 5
- Qun-Liu, Y., Li Qini, Ping Li, Y., Wang, H., Run-XiXi, Hong Qi, Y., Sheng Li, X. 2010. Comparative Genetic Diversity and Genetic Structure of Three Chinese Silkworm Species *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae), *Antheraea pernyi* Guerin-Meneville and *Samia Cynthia ricini* Donovan (Lepidoptera: Saturniidae). *Neotropical Entomology*. 39(6): 967 976
- Read, C.P., Chandler, A.C. 1961. *Introduction to Parasitology. Wiley International Edition.* Japan. Pp: 17-24

- Rismayadi, Y. 2005. *Ekosistem Pemukiman dan Keberadaan vektor penyakit*. Diakses tanggal 22 Juni, pukul 16.53
- Romoser, W. S. and John G. S. 1998. *The Science of Entomology*. McGraw-Hill Companies. New York
- Russell, R. C. 1996. Culex quinquefasciatus. http://www.arbovirus.health. nsw.gov.au/mosquit/culexquinquefasciatus.htm. Diakses tanggal 3 Oktober 2011, pukul 22.20
- Sabin Vaccine Institute. 2000. Lymphatic Filariasis. http://www.sabin.org/news-resources/fact-sheets/lymphatic-filariasis. Diakses tanggal 29 September 2011
- Sambrook, J. and D. W. Rusell. 2001. *Moleculer Cloning a Laboratory Manual Volume 2*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York
- Sandjaja, B. 2007. *Parasitologi Kedokteran Buku II Helmintologi Kedokteran*. Prestasi Pustaka Publisher. Jakarta
- Sharman, A. K., M.J. Mendki, S.N. Tikar, K. Chandel, D. Sukumaran, B.D. Parashar, Vijay Veer, O.P. Agarwal, and Shri Prakash. 2009. Genetic Variability in Geographical Populations of Culex quinquefasciatus Say (Diptera: Culicidae) from India Based on Random Amplified Polymorphic DNA Analysis. *Acta Tropica, Science Direct*. 112(1): 71-76
- Sirivanakarn, S. and Graham B. W. 1978. *Neotipe Designation of Culex quinquefasciatus Say (Diptera : Culicidae)*. Proceedings of The Entomological Society of Washington. USA
- Soedarto, Prof. Dr. DTM&H, Ph.D. 2011. *Buku Ajar Parasitologi Kedokteran*. CV. Sagung Seto. Jakarta. Pp : 217 224
- Sofro, A. S. M. 1994. *Keanekaragaman Genetik*. Penerbit Andi. Yogyakarta. Hal: 5 9
- Sulandari, S. dan M. S. A. Zein. 2003. *Panduan Praktis Laboratorium DNA*. Bidang Zoologi Pusat Penelitian Biologi. Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. Jakarta. Hal: 77-85, 87, 97, 98
- Suryo. 2004. *Genetika Strata 1*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. Pp: 57 63
- Surzycki, S. 2000. *Basic Techniques in Moleculer Biology*. Springer Lab Manual. New York. Pp : 406 414

- Tiwari, P., R. Arya, L. M. Tripathi, S. M. Bhattacharya, and V. M. L. Srivastava. 2004. Genetic Variation among Filarial Spesies as Detected by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). *Journal of Parasitic Diseases*. 28(2): 73-77
- Welsh J, McClelland M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acid Res.* 18: 7213-7218
- Whitman, D. W. and Agrawal, A. 2009. *Phenotype Plasticity of Insect: What is Phenotype Plasticity and Why is it important?* Science Publishers, Inc. Enfield, NH. www.insect.htm. Diakses tanggal 22 Juni 2012 pukul 19.31
- Wilkerson, R. C., Parson, T. J., Albright, D. G., Klein, T. A., and Braun, M. J. 1993. Random Amplifies Polymorphic DNA (RAPD) Markers Readily Distinguish Cryptic Mosquito Spesies (Diptera: Culicidae: *Anopheles*). *Insect Molecular Biology*. 1(4): 205 211
- Williams, J.G.K, A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski, S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535
- Yuwono, T. 2005. Bilogi Molekuler. Erlangga. Jakarta. Pp: 245
- Yuwono, T. 2006. Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction. ANDO. Yogyakarta
- Zulkoni, A. 2010. *Parasitologi*. Muha Medika. Yogyakarta. Pp: 65

LAMPIRAN

1. Laporan keuangan

Bahan Habis Pakai

No	Bahan Habis Pakai	Jumlah	Harga	Total
1	Kit isolasi DNA Fermentas	1	Rp 3.000.000	Rp 3.000.000
2	Primer RAPD	3	Rp 500.000	Rp 1.500.000
3	Dream Taq PCR	1	Rp 1.000.000	Rp 1.000.000
4	Marker DNA Vivantis	1	Rp 1.000.000	Rp 1.000.000
5	Gel Agarose	1	Rp 500.000	Rp 500.000
6	handscoon dan masker	1	Rp 100.000	Rp 100.000
7	Sewa laboratorium	1	Rp 450.000	Rp 450.000
8	Fotokopi dan ATK	1	Rp 20.000	Rp 20.000
	TOTAL			Rp 7.570.000

Honorarium

No	Honorarium	Jumlah		Harga	,	Total
1	pembantu peneliti	1	Rp	280.000	Rp	280.000

Publikasi

No	Publikasi	Jumlah		Harga	,	Гotal
1	Jurnal	1	Rp	400.000	Rp	400.000
	TOTAL				Rp	400.000

	TOTAL LAPORAN KEUANGAN(100 %)				
1	Bahan Habis Pakai	Rp	7.570.000		
2	Honorarium (pembantu peneliti)	Rp	280.000		
3	Publikasi	Rp	400.000		
	TOTAL	Rp	8.250.000		

2. Lampiran Jadwal Penelitian

	Bulan											
Kegiatan	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Mengadakan pertemuan awal antara												
ketua dan anggota tim												
Menetapkan rencana jadwal kerja &												
Menetapkan pembagian kerja												
Menetapkan desain penelitian &												
Menentukan instrument penelitian												
Menyusun proposal & Mengurus												
perijinan penelitian												
Mempersiapkan dan menyediakan												
bahan dan peralatan penelitian &												
Melakukan Penelitian												
Melakukan pemantauan atas												
pengumpulan data, Menyusun dan												
mengisi format tabulasi, Melakukan												
analisis data, Menyimpulkan hasil												
analisis, Membuat tafsiran dan												
kesimpulan hasil serta membahasnya												
Menyusun konsep laporan												
	Mengadakan pertemuan awal antara ketua dan anggota tim Menetapkan rencana jadwal kerja & Menetapkan pembagian kerja Menetapkan desain penelitian & Menetukan instrument penelitian Menyusun proposal & Mengurus perijinan penelitian Mempersiapkan dan menyediakan bahan dan peralatan penelitian & Melakukan Penelitian Melakukan pemantauan atas pengumpulan data, Menyusun dan mengisi format tabulasi, Melakukan analisis data, Menyimpulkan hasil analisis, Membuat tafsiran dan kesimpulan hasil serta membahasnya	Mengadakan pertemuan awal antara ketua dan anggota tim Menetapkan rencana jadwal kerja & Menetapkan pembagian kerja Menetapkan desain penelitian & Menentukan instrument penelitian Menyusun proposal & Mengurus perijinan penelitian Mempersiapkan dan menyediakan bahan dan peralatan penelitian & Melakukan Penelitian Melakukan Penelitian Melakukan pemantauan atas pengumpulan data, Menyusun dan mengisi format tabulasi, Melakukan analisis data, Menyimpulkan hasil analisis, Membuat tafsiran dan kesimpulan hasil serta membahasnya	Mengadakan pertemuan awal antara ketua dan anggota tim Menetapkan rencana jadwal kerja & Menetapkan pembagian kerja Menetapkan desain penelitian & Menetapkan instrument penelitian Menyusun proposal & Mengurus perijinan penelitian Mempersiapkan dan menyediakan bahan dan peralatan penelitian & Melakukan Penelitian Melakukan pemantauan atas pengumpulan data, Menyusun dan mengisi format tabulasi, Melakukan analisis data, Menyimpulkan hasil analisis, Membuat tafsiran dan kesimpulan hasil serta membahasnya	Mengadakan pertemuan awal antara ketua dan anggota tim Menetapkan rencana jadwal kerja & Menetapkan pembagian kerja Menetapkan desain penelitian & Menentukan instrument penelitian Menyusun proposal & Mengurus perijinan penelitian Mempersiapkan dan menyediakan bahan dan peralatan penelitian & Melakukan Penelitian Melakukan pemantauan atas pengumpulan data, Menyusun dan mengisi format tabulasi, Melakukan analisis data, Menyimpulkan hasil analisis, Membuat tafsiran dan kesimpulan hasil serta membahasnya	Mengadakan pertemuan awal antara ketua dan anggota tim Menetapkan rencana jadwal kerja & Menetapkan pembagian kerja Menetapkan desain penelitian & Menetapkan instrument penelitian Menyusun proposal & Mengurus perijinan penelitian Mempersiapkan dan menyediakan bahan dan peralatan penelitian & Melakukan Penelitian Melakukan Penelitian Melakukan pemantauan atas pengumpulan data, Menyusun dan mengisi format tabulasi, Melakukan analisis data, Menyimpulkan hasil analisis, Membuat tafsiran dan kesimpulan hasil serta membahasnya	Mengadakan pertemuan awal antara ketua dan anggota tim Menetapkan rencana jadwal kerja & Menetapkan pembagian kerja Menetapkan desain penelitian & Menentukan instrument penelitian Menyusun proposal & Mengurus perijinan penelitian Mempersiapkan dan menyediakan bahan dan peralatan penelitian & Melakukan Penelitian Melakukan pemantauan atas pengumpulan data, Menyusun dan mengisi format tabulasi, Melakukan analisis data, Menyimpulkan hasil analisis, Membuat tafsiran dan kesimpulan hasil serta membahasnya	Kegiatan Mengadakan pertemuan awal antara ketua dan anggota tim Menetapkan rencana jadwal kerja & Menetapkan pembagian kerja Menetapkan desain penelitian & Menyusun proposal & Mengurus perijinan penelitian Mempersiapkan dan menyediakan bahan dan peralatan penelitian & Melakukan Penelitian Melakukan Penelitian Melakukan pemantauan atas pengumpulan data, Menyusun dan mengisi format tabulasi, Melakukan analisis data, Menyimpulkan hasil analisis, Membuat tafsiran dan kesimpulan hasil serta membahasnya	Kegiatan I 2 3 4 5 6 7 Mengadakan pertemuan awal antara ketua dan anggota tim Menetapkan rencana jadwal kerja & Menetapkan pembagian kerja Menetapkan desain penelitian & Menyusun proposal & Mengurus perijinan penelitian Mempersiapkan dan menyediakan bahan dan peralatan penelitian & Melakukan Penelitian Melakukan Penelitian Melakukan pemantauan atas pengumpulan data, Menyusun dan mengisi format tabulasi, Melakukan analisis data, Menyimpulkan hasil analisis, Membuat tafsiran dan kesimpulan hasil serta membahasnya	Kegiatan I 2 3 4 5 6 7 8 Mengadakan pertemuan awal antara ketua dan anggota tim Menetapkan rencana jadwal kerja & Menetapkan pembagian kerja Menetapkan desain penelitian & Menyusun proposal & Mengurus perijinan penelitian Mempersiapkan dan menyediakan bahan dan peralatan penelitian & Melakukan Penelitian Melakukan Penelitian Melakukan pemantauan atas pengumpulan data, Menyusun dan mengisi format tabulasi, Melakukan analisis data, Menyimpulkan hasil analisis, Membuat tafsiran dan kesimpulan hasil serta membahasnya	Kegiatan123456789Mengadakan pertemuan awal antara ketua dan anggota timMenetapkan rencana jadwal kerja & Menetapkan pembagian kerjaMenetapkan pembagian kerjaMenetapkan desain penelitian & Menetapkan desain penelitianMenetapkan desain penelitianMenetapkan desain penelitianMenetapkan desain penelitianMenyusun proposal & Mengurus perijinan penelitianMenetapkan dan menyediakan bahan dan peralatan penelitian & Melakukan PenelitianMelakukan PenelitianMelakukan pemantauan atas pengumpulan data, Menyusun dan mengisi format tabulasi, Melakukan analisis data, Menyimpulkan hasil analisis, Membuat tafsiran dan kesimpulan hasil serta membahasnyaMelakukan dan dan dan dan dan dan dan dan dan d	Kegiatan 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 Mengadakan pertemuan awal antara ketua dan anggota tim Menetapkan rencana jadwal kerja & Menetapkan pembagian kerja Menetapkan desain penelitian & Menyusun proposal & Mengurus perijinan penelitian Mempersiapkan dan menyediakan bahan dan peralatan penelitian & Melakukan Penelitian Melakukan Penelitian Melakukan pemantauan atas pengumpulan data, Menyusun dan mengisi format tabulasi, Melakukan analisis data, Menyimpulkan hasil analisis, Membuat tafsiran dan kesimpulan hasil serta membahasnya	Kegiatan I 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 Mengadakan pertemuan awal antara ketua dan anggota tim Menetapkan rencana jadwal kerja & Menetapkan pembagian kerja Menetapkan desain penelitian & Menyusun proposal & Mengurus perijinan penelitian Mempersiapkan dan menyediakan bahan dan peralatan penelitian & Melakukan Penelitian Melakukan Penelitian Melakukan pemantauan atas pengumpulan data, Menyusun dan mengisi format tabulasi, Melakukan analisis data, Menyimpulkan hasil analisis, Membuat tafsiran dan kesimpulan hasil serta membahasnya