

186

LIT

Salatiga

LAPORAN AKHIR PENELITIAN

**Studi Keanekaragaman Genetik *Anopheles maculatus*
di Beberapa Daerah di Indonesia**



Oleh :

Dra. Umi Widyastuti, M.Kes

**BALAI BESAR PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN VEKTOR
DAN RESERVOIR PENYAKIT
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
KEMENTERIAN KESEHATAN
2011**

LAPORAN AKHIR PENELITIAN

**Studi Keanekaragaman Genetik *Anopheles maculatus*
di Beberapa Daerah di Indonesia**



Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan
PERPUSTAKAAN

Tanggal : _____

No. Induk : _____

No. Kelas : 186

LIT
Salatiga.

Oleh :

Dra. Umi Widyastuti, M.Kes

**BALAI BESAR PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN VEKTOR
DAN RESERVOIR PENYAKIT
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
KEMENTERIAN KESEHATAN
2011**



KEMENTERIAN KESEHATAN REPUBLIK INDONESIA

BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN

BALAI BESAR PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN VEKTOR DAN RESERVOIR PENYAKIT

Jl. Hasanudin No. 123 PO. BOX 200, Salatiga 50721
Telepon : (0298) 327096 ; 312107, Faksimile : (0298) 322604 ; 312107
E-mail : b2p2vrp@litbang.depkes.go.id

SURAT PERSETUJUAN PELAKSANAAN PENELITIAN

NO. LB. 02.05/III/1357/2011

Persetujuan pelaksanaan penelitian ini diberikan atas dasar ketentuan yang diatur dalam pasal di bawah ini:

B A B I I K H T I S A R

1. Judul penelitian : Studi Keanekaragaman Genetik *Anopheles maculatus* di Beberapa Daerah di Indonesia
2. Tujuan : Mengetahui keanekaragaman genetik nyamuk *An. maculatus* di berbagai daerah fokus malaria di Indonesia dengan teknik berbasis PCR berdasarkan sequence DNA ribosom ITS2 dan menetapkan kompetensi vektorial (deteksi sporozoit dan pakan darah pada nyamuk *An. maculatus* dengan teknik Elisa) yang diharapkan akan dapat membantu memecahkan masalah pengendalian vektor di suatu wilayah
3. Ketua Pelaksana : Dra. Umi Widyastuti, M.Kes
4. Waktu pelaksanaan : 3 Januari 2011 s/d 31 Desember 2011

B A B II B I A Y A

1. Seluruh pembiayaan yang timbul sebagai akibat dari pelaksanaan kegiatan penelitian dibebankan pada Daftar Isian Pelaksanaan Anggaran Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Vektor dan Reservoir Penyakit (DIPA B2P2VRP) Tahun Anggaran 2011 Nomor 0813/024-11.2.01/13/2011 tertanggal 20 Desember 2010.
2. Biaya tersebut diperinci dalam pos pengeluaran sebagai berikut:
 - a. Belanja Bahan : Rp 129.900.000,-
 - b. Honor yang terkait dengan output kegiatan : Rp 25.070.000,-
 - c. Belanja Barang Non Operasional Lainnya : Rp 10.030.000,-
 - d. Belanja Perjalanan Lainnya : Rp 235.000.000,-
 - e. Jumlah seluruhnya : Rp 400.000.000,-
3. Berdasarkan surat revisi DIPA Nomor: 0813/024-11.2.01/13/2011 Revisi Ke-1 tanggal 27 April 2011 anggaran tersebut pada nomor 2 direvisi dengan rincian sebagai berikut:
 - a. Belanja Bahan : Rp 110.785.000,-
 - b. Honor yang terkait dengan output kegiatan : Rp 25.070.000,-
 - c. Belanja Barang Non Operasional Lainnya : Rp 29.145.000,-
 - d. Belanja Perjalanan Lainnya : Rp 235.000.000,-
 - e. Jumlah seluruhnya : Rp 400.000.000,-
4. Penyediaan biaya untuk keperluan penelitian tersebut akan diberikan secara bertahap dan merupakan uang yang harus dipertanggungjawabkan oleh Ketua Pelaksana. Cara pertanggungjawaban harus sesuai dengan peraturan yang berlaku dan atas petunjuk pelaksanaan yang diberikan oleh Kepala.



KEMENTERIAN KESEHATAN REPUBLIK INDONESIA
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
BALAI BESAR PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN VEKTOR DAN RESERVOIR PENYAKIT

Jl. Hasanudin No. 123 PO. BOX 200, Salatiga 50721
Telepon : (0298) 327096 ; 312107, Faksimile : (0298) 322604 ; 312107
E-mail : b2p2vrp@litbang.depkes.go.id

BAB III
PELAKSANAAN

Mengenai pelaksanaan pembiayaan diatur sebagai berikut :

1. Ketua Pelaksana mengajukan Surat Permintaan Pembayaran kepada Kepala melalui Kepala Sub Bagian Tata Usaha.
2. Kepala memberikan persetujuan pembayaran setelah persyaratan yang dikaitkan dengan pengajuan surat permintaan pembayaran dipenuhi secara lengkap oleh Ketua Pelaksana.

BAB IV
PENGAWASAN

1. Pengawasan terhadap pelaksanaan penelitian Tahun 2011 dilakukan oleh Kepala selaku Penanggungjawab yang bertanggung jawab kepada Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
2. Pengawasan dapat dilakukan sewaktu-waktu dan Ketua Pelaksana wajib memberikan kesempatan serta memberikan keterangan yang diminta.
3. Apabila dipandang perlu, Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan dapat melakukan atau menunjuk pejabat lain untuk melakukan pengawasan.

BAB V
PELAPORAN

1. Ketua Pelaksana wajib memberikan laporan pertanggungjawaban keuangan setiap 3 (tiga) bulan dan harus diterima oleh Kepala paling lambat tanggal 5 (lima), bulan berikutnya dan melaporkan kepada Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
2. Ketua Pelaksana wajib memberikan laporan kemajuan penelitian setiap 3 (tiga) bulan dan sesuai dengan ketentuan pelaporan yang berlaku.
3. Ketua Pelaksana wajib membuat laporan akhir penelitian yang terdiri dari:
 - a. Laporan Administrasi
 - b. Laporan Hasil Penelitian
 - c. Abstrak Hasil Penelitian
 - d. *Executive Summary* (ringkasan untuk pengambilan keputusan pimpinan) dan paling lambat diserahkan pada Januari 2012.

BAB VI
PERSYARATAN LAIN

1. Segala penemuan dan hasil penelitian ini menjadi milik Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
2. Hasil penelitian ini harus diterbitkan di dalam "Bulletin Penelitian Kesehatan", apabila naskah ilmiah hendak diajukan ke majalah lain, supaya terlebih dahulu dimintakan persetujuan dari Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
3. Apabila naskah ilmiah tersebut hendak diajukan di dalam suatu pertemuan ilmiah supaya terlebih dahulu dimintakan persetujuan Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.



KEMENTERIAN KESEHATAN REPUBLIK INDONESIA
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
BALAI BESAR PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN VEKTOR DAN RESERVOIR PENYAKIT

Jl. Hasanudin No. 123 PO. BOX 200, Salatiga 50721
Telepon : (0298) 327096 ; 312107, Faksimile : (0298) 322604 ; 312107
E-mail : b2p2vrp@litbang.depkes.go.id

BAB VII
SANKSI

1. Apabila laporan pertanggungjawaban keuangan dan laporan kemajuan penelitian tidak masuk pada waktu yang telah ditentukan, maka tidak akan diberikan uang muka pada bulan berikutnya.
2. Selama Ketua Pelaksana belum menyelesaikan laporan akhir, maka ia tidak akan dipertimbangkan menjadi Ketua Pelaksana untuk penelitian berikutnya.

BAB VIII
KETENTUAN PENUTUP

Apabila penyelesaian penelitian tidak dapat dilaksanakan pada waktunya karena suatu hal yang berada di luar kekuasaan Ketua Pelaksana, Kepala dapat mengusulkan kepada Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan untuk meninjau kembali dan mempertimbangkan kemungkinan perpanjangannya.

28 April 2011

Menerima dan menyetujui
Kepala,

Drs. Bambang Heriyanto, M.Kes
NIP 195406201981101002

Ketua Pelaksana,

Dra. Umi Widyastuti, M.Kes
NIP 196004081989032001

II. KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Mahaesa atas segala rahmat dan karuniaNya yang telah dilimpahkan kepada kami sehingga penulis dan tim telah dapat menyelesaikan kegiatan penelitian dan penulisan laporan akhir penelitian. Laporan akhir penelitian “Studi keanekaragaman genetik *Anopheles maculatus* di beberapa daerah di Indonesia” disusun sebagai pertanggungjawaban ilmiah, administratif dan merupakan dokumen tertulis lengkap atas berakhirnya kegiatan penelitian yang dilakukan pada tahun 2011. Laporan akhir merupakan bagian penting dari proses penelitian yang meliputi antara lain: perencanaan, pelaksanaan, manajemen/ pengelolaan, penulisan laporan, pemanfaatan dan publikasi hasil penelitian.

Penanggulangan malaria masih banyak menemui kendala walaupun berbagai upaya telah dilakukan. Salah satu kendala yang menyulitkan dalam pengendalian vektor adalah adanya sejumlah spesies kompleks pada populasi nyamuk vektor. Spesies kompleks merupakan contoh keanekaragaman genetik. Penanggulangan malaria agar lebih efektif perlu adanya perbaikan dan pendekatan strategi dalam pengendalian vektor, termasuk sangat diperlukan adanya pemahaman terhadap spesies dan bioekologinya. Pemahaman suatu spesies diperlukan identifikasi secara benar dan akurat sehingga tidak terjadi kesalahan dalam menentukan spesies nyamuk yang berperan sebagai vektor. *An. maculatus* secara rasional di Indonesia tersebar di berbagai daerah, endemis dan non endemis, di satu daerah menyebabkan kasus malaria tinggi sedangkan di daerah lain tidak menunjukkan adanya kasus malaria, sehingga diajukan rumusan permasalahan yang merupakan pertanyaan penelitian: 1). Apakah ada perbedaan genetik pada nyamuk *An. maculatus* di Indonesia? (termasuk kecurigaan adanya spesies kompleks pada nyamuk *An. maculatus* di Indonesia), 2). Apakah ada perbedaan kompetensi vektorial (kerentanan nyamuk terhadap parasit *Plasmodium*, perilaku mengisap darah yang menentukan sifat antropofilik/ zoofilik, kepadatan nyamuk, umur nyamuk). Penelitian ini bermaksud mengetahui keanekaragaman genetik nyamuk *An. maculatus* di berbagai daerah non endemis dan endemis tinggi malaria di Indonesia dengan teknik berbasis *PCR* berdasarkan sekuen DNA ribosom ITS2 dan menetapkan kompetensi vektorial yang diharapkan akan dapat menjawab permasalahan tersebut di atas.

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai keanekaragaman genetik *An. maculatus* yang akan bermanfaat untuk dapat membantu dalam memahami epidemiologi malaria dimasa yang akan datang dan agar pengendalian terhadap nyamuk vektor tepat sasaran dan tepat metode. Terdeteksinya spesies kompleks yang merupakan keanekaragaman genetik dan diketahuinya spesies vektor yang berkompeten akan membantu memecahkan masalah pengendalian vektor di suatu wilayah. Terima kasih yang sebesar-besarnya ditujukan kepada:

1. Kepala B2P2VRP selaku koordinator penelitian yang telah memberi kesempatan, arahan dan bimbingan selama penelitian berlangsung.
2. Para Kepala Dinas Kesehatan Kabupaten Kulonprogo, Purbalingga, Cilacap, Belu, ●gan Komerling Ulu Selatan, Nunukan beserta staf P2 malaria dan Kepala Puskesmas di lokasi penelitian yang telah membantu pelaksanaan penelitian di lapangan.
3. Segenap tim peneliti, pembantu peneliti, pembantu administrasi, dan teman-teman di laboratorium Entomologi dan Biologi Molekuler yang telah membantu pelaksanaan penelitian di lapangan dan laboratorium.

Laporan penelitian ini disadari oleh penulis masih jauh dari sempurna, maka segala kritik membangun dan saran-saran demi kesempurnaan sangat diharapkan.

Salatiga, 16 Januari 2012

Penulis,

Dra. Umi Widyastuti, MKes

III. ABSTRAK

Umi Widyastuti, Damar TB, Widiarti, Mujiyono, B. Yuliadi, dan Rina TDA

Penanggulangan malaria masih banyak menemui kendala walaupun berbagai upaya telah dilakukan. Salah satu kendala yang menyulitkan dalam pengendalian vektor adalah adanya sejumlah spesies kompleks pada populasi nyamuk vektor. Spesies kompleks merupakan contoh keanekaragaman genetik. *An. maculatus* dilaporkan sebagai spesies kompleks di berbagai Negara, akan tetapi belum pernah dilaporkan di Indonesia. Penanggulangan malaria agar lebih efektif perlu adanya perbaikan dan pendekatan strategi dalam pengendalian vektor, termasuk sangat diperlukan adanya pemahaman terhadap spesies dan bioekologinya. Pemahaman suatu spesies diperlukan identifikasi secara benar dan akurat sehingga tidak terjadi kesalahan dalam menentukan spesies nyamuk yang berperan sebagai vektor. *An. maculatus* secara rasional di Indonesia tersebar di berbagai daerah, endemis dan non endemis, di satu daerah menyebabkan kasus malaria tinggi sedangkan di daerah lain tidak menunjukkan adanya kasus malaria, sehingga diajukan rumusan permasalahan yang merupakan pertanyaan penelitian: 1). Apakah ada perbedaan genetik pada nyamuk *An. maculatus* di Indonesia? (termasuk kecurigaan adanya spesies kompleks pada nyamuk *An. maculatus* di Indonesia), 2). Apakah ada perbedaan kompetensi vektorial (kerentanan nyamuk terhadap parasit *Plasmodium*, perilaku mengisap darah yang menentukan sifat antropofilik/ zoofilik, kepadatan nyamuk, umur nyamuk). Penelitian ini bertujuan untuk 1). Mengidentifikasi secara molekuler nyamuk *An. maculatus* yang dicurigai sebagai spesies kompleks berdasarkan sekuen ITS2 DNA ribosom dengan PCR, 2). Menetapkan kompetensi vektorial *An. maculatus* meliputi : a). Mendeteksi antigen protein *circum sporozoite* (CS) *P. falciparum* atau *P. vivax* pada nyamuk *An. maculatus* dari daerah endemis malaria dengan teknik Elisa, b). Mengidentifikasi pakan darah pada nyamuk *An. maculatus* dari daerah endemis malaria dan non endemis dengan teknik Elisa, c). Menghitung kepadatan nyamuk *An. maculatus*, dan d). Menghitung angka paritas *An. maculatus*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *An. maculatus* di daerah endemis tinggi berbeda secara genetik dengan daerah non endemis. *An. maculatus* rentan terhadap *P. falciparum* di Bani-bani (Kecamatan Ilo Kufeu, Kabupaten Belu, Nusa Tenggara Timur) dan Berjoko (Kecamatan Sebatik Barat,

Kabupaten Nunukan, serta rentan terhadap *P. vivax*, masing-masing di Panusupan (Kecamatan Rembang, Kabupaten Purbalingga, Jawa Tengah), dan Gunungrego (Kecamatan Kokap, Kabupaten Kulon Progo, Daerah Istimewa Yogyakarta). *An. maculatus* lebih bersifat zoofilik atau hanya sebagian populasi *An. maculatus* bersifat antropofilik dengan HBI sebesar 16,67% masing-masing di Tegiri, Hargowilis, Kabupaten Kulonprogo dan Bani-bani, lo Kufeu, Kabupaten Belu. Angka paritas *An. maculatus* paling tinggi di Purbalingga menunjukkan umur nyamuk yang relatif panjang dan membuka kesempatan adanya penularan malaria. Kepadatan *An. maculatus* paling tinggi ditemukan dari hasil penangkapan nyamuk yang istirahat di sekitar kandang atau tambatan ternak pada malam hari di Tegiri dan Gunungrego, Kabupaten Kulonprogo.

Kata kunci: *An. maculatus*, keanekaragaman genetik, ITS2 DNA ribosom

IV. SUSUNAN TIM PENELITIAN

Ketua Pelaksana	: Dra. Umi Widyastuti, MKes
Peneliti Utama	: DR. Damar Tri Boewono, MS Prof. Dr. Supargiyono, DTMH, SU, Ph.D Dr. Tri Baskoro TS, MSc, Ph.D Dr. Ruben Dharmawan, MSc, Ph.D
Peneliti Madya	: Dra. Widiarti, MKes
Pembantu Peneliti	: Mujiyono B. Yuliadi Rima Tunjungsari DA, AMKL Rumbiyati
Pembantu Administrasi	: Sri Julianingsih, AMd
Koordinator Peneliti	: Drs. Bambang Heriyanto, MKes
Sumber Dana	: DIPA B2P2VRP No. 0813/024-11.2.01/13/20112011
Waktu Penelitian	: Januari – Desember 2011
Penulis Laporan	: Dra. Umi Widyastuti, MKes

V. DAFTAR ISI

	Hal
I. Surat Persetujuan Pelaksanaan Penelitian	i
II. Kata Pengantar	ii
III. Abstrak	iv
IV. Susunan Tim Peneliti	vi
V. Daftar Isi	vii
VI. Daftar Tabel	ix
VII. Daftar Gambar	x
VIII. Daftar Lampiran	xii
IX. PENDAHULUAN	1
X. TUJUAN.....	5
XI. MANFAAT	5
XII. TINJAUAN PUSTAKA	6
A. Bionomik <i>An. maculatus</i>	6
B. Keanekaragaman genetik	8
C. Teknik-teknik pengenalan spesies kompleks	9
D. Amplifikasi PCR DNA ribosom serangga	11
E. Protein circum sporozoit	14
F. Identifikasi pakan darah pada nyamuk <i>An. maculatus</i>	15
XIII. METODE PENELITIAN	17
A. Kerangka Konsep	17
B. Tempat dan waktu penelitian	18
C. Desain Penelitian	19
D. Jenis Penelitian	19
E. Populasi dan Sampel Penelitian	19
F. Estimasi Besar Sampel	19
G. Pengumpulan Data	20
H. Definisi Operasional	23
I. Cara kerja	24
1.1. Bahan penelitian	24

I.2. Alat	24
J. Skema alur pelaksanaan penelitian	26
K. Analisis sampel di laboratorium.	27
K.1. ragam genetik <i>An. maculatus</i>	27
K.1.1. Ekstraksi DNA	27
K.1.2. Amplifikasi DNA ITS2	28
K.1.3. Elektroforesis	29
K.1.4. Sekuensing hasil PCR	31
K.1.5. Analisis hasil	31
K.2. Inkriminasi vektor malaria dengan teknik <i>Elisa</i>	31
K.3. Identifikasi pakan darah pada nyamuk dengan teknik <i>Elisa</i>	34
XIV. Hasil Penelitian	36
XV. Pembahasan.....	54
XVI. Kesimpulan dan Saran	58
XVII. Ucapan Terima Kasih	59
XVIII. Daftar Pustaka	60
XIX. Lampiran.....	66

VI. DAFTAR TABEL

Hal

Tabel 1. Deskripsi daerah penelitian untuk pengambilan sampel <i>An. maculatus</i>	18
Tabel 2. Komposisi reaksi PCR genom ITS2 <i>An. maculatus</i>	28
Tabel 3. Primer-primer untuk mendeteksi <i>An. maculatus</i> group	29
Tabel 4. Jumlah nyamuk <i>Anopheles</i> spp yang tertangkap hinggap pada manusia di dalam rumah.	37
Tabel 5. <i>Anopheles</i> spp yang tertangkap hinggap pada manusia di dalam rumah	38
Tabel 6. Jumlah nyamuk <i>Anopheles</i> spp yang tertangkap istirahat di dalam rumah.....	39
Tabel 7. Jumlah nyamuk <i>Anopheles</i> spp yang tertangkap istirahat di sekitar kandang/ tambatan ternak.	40
Tabel 8. Kepadatan nyamuk <i>An. maculatus</i> menurut lokasi dan metode penangkapan.....	43
Tabel 9. Angka paritas nyamuk <i>An. maculatus</i> menurut lokasi dan metode penangkapan.	44
Tabel 10. Hasil pemeriksaan <i>Elisa</i> circum sporozoit <i>Plasmodium</i> pada nyamuk <i>An. maculatus</i>	44
Tabel 11. Hasil pemeriksaan specimen darah pada <i>An. maculatus</i> di berbagai lokasi.	45
Tabel 12. Hasil amplifikasi ITS2 DNA ribosom <i>An. maculatus</i>	46

VII. DAFTAR GAMBAR

Hal

Gambar 1. Pendekatan interdisiplin bidang ilmu untuk mempelajari sibling spesies nyamuk <i>Anopheles</i>	11
Gambar 2. Struktur DNA ribosom. ITS (<i>Internal Transcribed Spacer</i>), ETS (<i>Eksternal Transcribed Spacer</i>).....	12
Gambar 3. Prosedur ekstraksi DNA dengan menggunakan metode kolom mini.....	28
Gambar 4. Peta lokasi survei <i>An. maculatus</i> di beberapa daerah di Indonesia	36
Gambar 5. <i>Anopheles</i> spp yang tertangkap hinggap pada manusia di dalam rumah	37
Gambar 6. <i>Anopheles</i> spp yang tertangkap hinggap pada manusia di luar rumah	38
Gambar 7. <i>Anopheles</i> spp yang tertangkap istirahat di dalam rumah	39
Gambar 8. <i>Anopheles</i> spp yang tertangkap istirahat di sekitar kandang/ tambatan temak	40
Gambar 9. Fluktuasi <i>An. maculatus</i> yang hinggap pada manusia di dalam rumah menurut lokasi dan waktu penangkapan	41
Gambar 10. Fluktuasi <i>An. maculatus</i> yang hinggap pada manusia di luar rumah menurut lokasi dan waktu penangkapan.....	42
Gambar 11. Fluktuasi <i>An. maculatus</i> yang istirahat di dalam rumah menurut lokasi dan waktu penangkapan.....	42
Gambar 12. Fluktuasi <i>An. maculatus</i> yang istirahat di sekitar kandang/ tambatan temak menurut lokasi dan waktu penangkapan	43
Gambar 13. Hasil amplifikasi ITS2 DNA ribosom nyamuk <i>An. maculatus</i>	47
Gambar 14. Buffer zone sebaran kasus malaria dan habitat perkembangbiakan nyamuk <i>Anopheles</i> di Panusupan, Kabupaten Purbalingga	48
Gambar 15. Buffer zone sebaran kasus malaria dan habitat perkembangbiakan nyamuk <i>Anopheles</i> di Sidareja, Kabupaten Purbalingga	49

Gambar 16. Buffer zone sebaran kasus malaria dan habitat perkembangbiakan nyamuk <i>Anopheles</i> di Tegiri, Hargowilis dan Gunungrego, Hargotirto, Kecamatan Kokap, Kabupaten Kulonprogo	50
Gambar 17. Buffer zone sebaran kasus malaria dan habitat perkembangbiakan nyamuk <i>Anopheles</i> di Bani-bani, Kecamatan Io Kufeu, Kabupaten Belu	51
Gambar 18. Buffer zone sebaran kasus malaria dan habitat perkembangbiakan nyamuk <i>Anopheles</i> di Bandarjaya, Kecamatan Kisam Tinggi, Kabupaten OKU Selatan	52
Gambar 19. Buffer zone sebaran kasus malaria dan habitat perkembangbiakan nyamuk <i>Anopheles</i> di Bani-bani, Kecamatan Io Kufeu, Kabupaten Belu	53

VIII. DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Besar sampel menurut besar populasi	67
Lampiran 2. Pembebasan Persetujuan Etik.....	70

IX. PENDAHULUAN

Malaria merupakan salah satu penyebab utama morbiditas dan mortalitas di negara-negara beriklim tropis, meskipun berbagai macam upaya pengendalian terus menerus dilakukan di seluruh dunia (Harijanto, 1999). Di Indonesia malaria masih menjadi masalah daerah maupun nasional. Lebih dari setengah penduduk Indonesia masih hidup di daerah endemis malaria dan berisiko tertular malaria (Laihaq & Gunawan, 1999).

Annual Parasite Incidence (API) digunakan sebagai dasar dilakukannya stratifikasi wilayah, yaitu Indonesia bagian timur masuk dalam stratifikasi malaria tinggi, stratifikasi sedang terdapat di beberapa wilayah di Kalimantan, Sulawesi dan Sumatera, sedangkan di Jawa-Bali masuk dalam stratifikasi rendah, meskipun masih terdapat desa/fokus malaria tinggi. API dari tahun 2008 – 2009 menurun dari 2,47 per 1000 penduduk menjadi 1,85 per 1000 penduduk. Bila dilihat per provinsi dari tahun 2008 – 2009 provinsi dengan API yang tertinggi adalah Papua Barat, NTT dan Papua terdapat 12 provinsi yang diatas angka API nasional (Pusdatin dan Dit. P2B2, 2011)

Upaya untuk menekan angka kesakitan dan kematian dilakukan melalui program pemberantasan malaria yang kegiatannya antara lain meliputi diagnosis dini, pengobatan cepat dan tepat, surveilans dan pengendalian vektor yang kesemuanya ditujukan untuk memutus mata rantai penularan malaria (Dit. Jen P2&PL, 2009). Penularan malaria diminimalkan dengan melakukan upaya pengendalian terhadap *Anopheles sp* sebagai nyamuk penular dan beberapa upaya pengendalian vektor lain yang dilakukan secara REESAA (*rational, effective, efisien, sustainable, affective dan affordable*) mengingat kondisi geografis Indonesia luas dan bionomik vektor yang beraneka ragam sehingga pemetaan tempat perkembangbiakan dan perilaku nyamuk menjadi sangat penting.

Nyamuk *Anopheles maculatus* merupakan vektor malaria di berbagai daerah di Indonesia seperti Jawa Tengah dan Daerah Istimewa Yogyakarta, terkonsentrasi di kawasan Bukit Menoreh yaitu Kabupaten Magelang, Purworejo, dan Kulon Progo (Barcus *et al*, 2002), Sumatera, Kalimantan, dan Nusa Tenggara Timur (Gunawan, 1999). Nyamuk *An. maculatus* merupakan vektor malaria di Jawa Tengah, selain *An balabacensis* dan *An. aconitus*. Berbagai upaya pengendalian sudah dilakukan di wilayah tersebut akan tetapi penularan malaria masih tetap terjadi dari tahun ke tahun (Dinkes Prop. Jawa Tengah, 2000). Pada tahun 2005 penderita malaria di Jawa Tengah sebanyak 2590 kasus (angka kesakitan malaria 0,08 per 1000 penduduk). Penderita malaria sampai dengan September

2006 ditemukan sebanyak 1.566 orang (angka kesakitan 0,047 per 1000 penduduk). Proporsi penderita malaria import dari tahun 2000-2006 terjadi kecenderungan meningkat, antara lain dari 1,81% pada tahun 2000 menjadi 38% pada tahun 2006. Angka kesakitan malaria tahun 2005 menurun secara bermakna (60%) dibandingkan dengan tahun 2004 atau menurun 96,6% dari tahun 2000. Jumlah desa *HCI* malaria menurun dari 424 desa pada tahun 2002 menjadi 277 desa pada tahun 2003, 109 desa pada tahun 2004 dan 28 desa pada tahun 2005. Penurunan kasus ini merupakan hasil upaya pemberantasan malaria secara komprehensif yang dilaksanakan oleh pemerintah daerah bersama masyarakat melalui gerakan pemberantasan kembali malaria (Gebrak Malaria) yang telah dicanangkan sejak tahun 2000 di mana pada saat itu merupakan puncak kasus malaria tertinggi (Budihardja, 2006).

Agar penanggulangan malaria lebih efektif perlu adanya perbaikan dan pendekatan strategi dalam pengendalian vektor, termasuk sangat diperlukan adanya pemahaman terhadap spesies dan bioekologinya. Pemahaman suatu spesies diperlukan identifikasi secara benar dan akurat sehingga tidak terjadi kesalahan dalam menentukan spesies nyamuk yang berperan sebagai vektor. Usaha untuk pengendalian nyamuk vektor menjadi terkendala oleh kapasitas reproduksi dan fleksibilitas genetiknya. Fleksibilitas genetik terrefleksi oleh karena resistensi nyamuk terhadap insektisida dan adanya sejumlah spesies kompleks yang muncul sebagai akibat perubahan lingkungan yang memungkinkan spesies tersebut beradaptasi (Colluzi, 1985).

Perkembangan strategi pengendalian vektor tergantung pada pengetahuan dasar dari semua aspek bionomik nyamuk vektor mulai dari molekuler sampai level populasi termasuk hubungan antara nyamuk dan patogen yang ditularkannya. Perkembangan terkini dari penelitian nyamuk yang mengacu pada aplikasi teknik biologi molekuler mempunyai peranan besar dalam memecahkan berbagai masalah pengendalian vektor. Aplikasi biologi molekuler (Cytogenetika, Biokimia, dan Imunologi) dalam bidang Entomologi Kesehatan mempunyai peranan memecahkan permasalahan yang berhubungan dengan:

1. Keberadaan spesies kompleks/sub spesies/ strain/ varietas serangga vektor dan patogen/parasit yg ditularkannya.
2. Menentukan kerentanan vektor terhadap patogen/parasit
3. Menentukan faktor perkembangan patogen/parasit menuju pada tahap infeksi di dalam tubuh vektor.

4. Memahami sistem fisiologi tertentu tennasuk resistensi nyamuk terhadap insektisida, mekanisme imun, oogenesis dan salivasi
5. Perkembangan metode pengendalian vektor (Tandon, 1998)

Endemisitas malaria antara lain mungkin disebabkan oleh adanya keanekaragaman genetik pada nyamuk yang dapat mempengaruhi kemampuan nyamuk tersebut untuk menularkan penyakit (kemampuan nyamuk sebagai vektor). Keanekaragaman genetik seperti misalnya spesies kompleks, yaitu nyamuk mempunyai ciri-ciri morfologi yang sama atau amat mirip sehingga sulit/tidak dapat dibedakan satu dengan lainnya akan tetapi secara genetik menunjukkan perbedaan dan terisolasi secara reproduksi. Biasanya di alam memperlihatkan adanya perbedaan dalam hal tingkah laku dan kemampuannya sebagai vektor (Subbarao, 1998; Dharmawan, 1993). Spesies kompleks ini menjadi penting karena terdapat anggota-anggota yang mampu bertindak sebagai vektor. Bilamana vektor dan non vektor tidak dapat dibedakan maka usaha penanggulangan penyakit yang ditularkannya tidak akan berhasil (Dharmawan, 1993). *An. maculatus* selain tersebar di daerah endemis juga dapat ditemukan di daerah non endemis seperti di Kecamatan Dayehluhur, Kabupaten Cilacap. Hal ini menimbulkan kecurigaan adanya spesies kompleks diantara populasi *An. maculatus* di Indonesia. Rattarithikul dan Green, 1986 melaporkan bahwa *An. maculatus* di Thailand sebagai spesies kompleks berdasarkan studi kromosom politen dan kromosom mitotik. Nyamuk tersebut terdistribusi di berbagai negara seperti Bangladesh, Myanmar, China, India, Indonesia, Kamboja, Malaysia, Nepal, Pakistan, Srilanka, Taiwan, Thailand, dan Vietnam (Subbarao, 1998). Berdasarkan studi kromosom mitotik di Desa Sokoagung, Kecamatan Bagelen, Kabupaten Purworejo, Jawa Tengah dilaporkan bahwa *An. maculatus* betina mempunyai 3 variasi (X1, X2, dan X3) dan 2 variasi (Y1 dan Y2) pada *An. maculatus* jantan, namun belum memperlihatkan adanya perbedaan perilaku pada nyamuk *An. maculatus* (Ariati, 2004). *An. maculatus* dikenal mempunyai tendensi kuat mengisap darah binatang (zoofilik) daripada manusia (Reid, 1968; Loong *et al*, 1988; Muenworn *et al*, 2009). Sementara beberapa peneliti juga melaporkan sebaliknya bahwa *An. maculatus* mempunyai perilaku antropofilik kuat (Rattarithikul *et al*, 1996), dan Loong *et al*, 1990 melaporkan bahwa tidak ada perbedaan antara antropofilik dan zoofilik dari populasi *An. maculatus*. Bahkan individu *An. maculatus* yang sama dapat mengisap darah binatang dan manusia.

Keanekaragaman dalam spesies menyebabkan tiap anggota spesies dapat dilihat kedekatan kekerabatannya satu sama lain. Kekerabatan semakin dekat apabila ciri-ciri

yang dimiliki makin banyak persamaannya, sebaliknya makin sedikit persamaan dalam ciri-ciri yang dimiliki makin jauh kekerabatannya. Studi mengenai keanekaragaman genetik ini pada prinsipnya bertujuan untuk mengkaji komposisi genetik individu di dalam atau antar populasi dan untuk mengetahui faktor-faktor yang menyebabkan terjadinya modulasi atau dinamika keanekaragaman genetik dari populasi tersebut. Keanekaragaman genetik dari suatu populasi secara umum dapat terjadi karena gen mengalami mutasi, rekombinasi dan perpindahan (migrasi) sekelompok populasi dari satu tempat ke tempat lain (Griffith, *et al.*, 1996). Struktur genetik populasi dipengaruhi oleh beberapa faktor lain seperti besarnya populasi, cara reproduksi individu yang diteliti, aliran gen (*gene flow*) dan seleksi (Mc. Donal and Mc. Dermont, 1993). Kemajuan dibidang biologi molekuler memungkinkan keanekaragaman genetik populasi nyamuk dapat diamati pada tingkat Keanekaragaman genetik seperti halnya spesies kompleks dapat dideteksi dengan berbagai metode berbasis PCR antara lain dengan menggunakan sekuen tertentu yang spesifik spesies yang merupakan penanda molekuler seperti DNA ribosom ITS2, domain 2 dan 3 (D2 dan D3) DNA ribosom 28S dan Cytochrome Oxidase subunit I dan II (COI dan COII) DNA mitokondria, yang digunakan secara luas selain untuk membedakan spesies nyamuk juga untuk rekonstruksi filogenetik (Ma *et al.*, 2006). Kurangnya variasi intraspesifik dalam sekuen ITS2 secara umum membuat metode identifikasi mungkin akan sangat berguna di area geografis yang luas, seperti di Malaysia, sebagian besar Thailand, Cina, dan kemungkinan di Kamboja, Vietnam dan Taiwan. Daerah ITS2 ini cukup panjang dan dimungkinkan untuk merancang/mendesain primer untuk mendapatkan spesies tambahan. Sebelum metode ini digunakan di daerah baru, dianjurkan untuk menilai spesies yang ada dan memperluas variasi intraspesifik dengan sekuensing ITS2 dari spesimen di daerah tersebut (Walton *et al.*, 2007). Metode berbasis PCR relatif selain cepat juga kompatibel dengan prosedur pengujian lain yang menggunakan sampel nyamuk, seperti analisis sumber pakan darah dan ELISA antigen circum sporozoit malaria (Wirtz *et al.*, 1987; Beier *et al.*, 1988).

Berdasarkan uraian di atas *An. maculatus* secara rasional di Indonesia tersebar di berbagai daerah, endemis dan non endemis, di satu daerah menyebabkan kasus malaria tinggi sedangkan di daerah lain tidak menunjukkan adanya kasus malaria, sehingga diajukan rumusan permasalahan yang merupakan pertanyaan penelitian:

1. Apakah ada perbedaan genetik pada nyamuk *An. maculatus* di Indonesia yang meliputi:
 - a). Apakah nyamuk *An. maculatus* dari berbagai daerah di Indonesia merupakan spesies

kompleks?, b). Bagaimana hubungan kekerabatan genetik *An. maculatus* dari berbagai daerah di Indonesia?

2. Apakah ada perbedaan kompetensi vektorial *An. maculatus* di berbagai daerah di Indonesia (meliputi: kerentanan nyamuk terhadap parasit *Plasmodium*, perilaku mengisap darah yang menentukan sifat antropofilik/ zoofilik, kepadatan nyamuk, dan umur nyamuk).

X. TUJUAN

a. Tujuan Umum

Mengetahui keanekaragaman genetik nyamuk *An. maculatus* di berbagai daerah non endemis dan endemis malaria di Indonesia dengan teknik berbasis *PCR* berdasarkan sekuen DNA ribosom ITS2 dan menetapkan kompetensi vektorial yang diharapkan akan dapat membantu memecahkan masalah pengendalian vektor di suatu wilayah.

b. Tujuan Khusus

1. Mengidentifikasi secara molekuler nyamuk *An. maculatus* yang dicurigai sebagai spesies kompleks berdasarkan sekuen ITS2 DNA ribosom.
2. Menetapkan kompetensi vektorial *An. maculatus* meliputi : a). Mendeteksi antigen protein *circum sporozoite* (CS) *P. falciparum* atau *P. vivax* pada nyamuk *An. maculatus* dari daerah endemis malaria, b). Mengidentifikasi pakan darah pada nyamuk *An. maculatus* dari daerah endemis malaria dan non endemis, c). Menghitung kepadatan nyamuk *An. maculatus*, dan d). Menghitung angka paritas *An. maculatus*

XI MANFAAT

Dari hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai keanekaragaman genetik *An. maculatus* yang akan bermanfaat untuk dapat membantu dalam memahami epidemiologi malaria dimasa yang akan datang agar pengendalian terhadap nyamuk vektor tepat sasaran dan tepat metode. Terdeteksinya spesies spesies kompleks (yang merupakan keanekaragaman genetik) dan diketahuinya spesies vektor yang berkompeten akan membantu memecahkan masalah pengendalian vektor di suatu wilayah.

XII. TINJAUAN PUSTAKA

A. BIONOMIK *An. maculatus*

An. maculatus dilaporkan sebagai spesies kompleks berdasarkan studi kromosom politer dan kromosom mitotik. Rattanarithikul dan Green, 1986 melaporkan bahwa *An. maculatus* terdistribusi di berbagai negara seperti Bangladesh, Myanmar, China, India, Indonesia, Kamboja, Malaysia, Nepal, Pakistan, Srilanka, Taiwan, Thailand, dan Vietnam (Subbarao, 1998).

Nyamuk *Anopheles maculatus* merupakan vektor malaria di berbagai daerah di Indonesia seperti Jawa Tengah dan Daerah Istimewa Yogyakarta, Sumatera, Kalimantan, dan Nusa Tenggara Timur (Gunawan, 1999). *An. maculatus* adalah spesies nyamuk yang sudah dinyatakan sebagai vektor malaria di beberapa daerah pegunungan yang endemis malaria di Jawa Tengah (Purworejo, Wonosobo, Banjarnegara), Daerah Istimewa Yogyakarta (Kulonprogo), dan Jawa Timur (Kediri) (Namru-2, 1997; Sundararaman *et al.*, 1957). Spesies ini juga sudah dinyatakan sebagai vektor filariasis *Wuchereria bancrofti* di Kecamatan Tanjung Bunga, Kabupaten Flores Timur (Barodji, *et al.*, 2003).

A.1. Penyebaran *An. maculatus* di beberapa daerah di Indonesia

Di Indonesia penyebaran *An. maculatus* sangat luas, spesies ini ditemukan baik di daerah pantai sampai ke pedalaman dan di pegunungan (Barodji, *et al.*, 2001; Handayani & Darwin, 2005). Di Kabupaten Flores Timur, *An. maculatus* ditemukan di desa-desa sepanjang pantai Teluk Hading, Kecamatan Tanjung Bunga dan di pedalaman di Kecamatan Boru (Barodji *et al.*, 1993). Di Jawa, *An. maculatus* ditemukan di desa-desa yang terletak dipegunungan seperti kawasan Bukit Menoreh (Handayani dan Darwin, 2005; Barodji *et al.*, 1993), di Kecamatan Borobudur (Boesri *et al.*, 2003) dan Srumbung, Kabupaten Magelang (Boewono dan Ristiyanto, 2005). Di daerah endemis malaria bagian utara Jawa Tengah, *An. maculatus* ditemukan di Kabupaten Jepara dan Pekalongan (Barodji *et al.*, 1992; Barodji *et al.*, 2001).

A.2. Siklus hidup dan tempat berkembang biak

Pengamatan siklus hidup *An maculatus* mulai dari perkembangan telur-jentik-kepompong-nyamuk hampir sama dengan spesies nyamuk *Anopheles* lainnya yang telah berhasil di koloni di laboratorium (Barodji dan Sularto, 1994).

An maculatus berkembang biak pada genangan-genangan air tawar seperti mata air, galian pasir, lubang-lubang batu, kobakan/ genangan air di sepanjang sungai yang terbentuk selama musim kemarau karena air berkurang serta mendapat sinar matahari langsung. Kondisi demikian dapat dijumpai di daerah pantai maupun pegunungan, daerah persawahan maupun non persawahan (Boesri *et al*, 2003).

A.3. Perilaku mengisap darah

An maculatus ditemukan mulai pukul 18.00 sampai menjelang pagi dan banyak tertangkap mulai pukul 21.00 sampai menjelang pagi pukul 04.00 (Handayani dan Darwin, 2005). *An maculatus* ditemukan tertangkap hinggap pada manusia sekitar 0,70-4,04% di dalam rumah dan 1,14-4,04% di luar rumah serta 89,44-97,90% tertangkap di kandang sapi (Barodji dan Suwasono, 2001). *An. maculatus* dikenal mempunyai tendensi mengisap darah binatang (zoofilik) daripada manusia (Reid, 1968; Loong *et al.*, 1988; Muerworn *et al*, 2009). Rattanarithikul *et al*, 1996 melaporkan bahwa *An. maculatus* mempunyai sifat antropofilik yang kuat. Akan tetapi Loong *et al.*, 1990 melaporkan bahwa tidak ada perbedaan antara antropofilik dan zoofilik dari populasi *An. maculatus*. Bahkan individu *An. maculatus* yang sama dapat mengisap darah binatang dan manusia.

A.4. Tempat istirahat

An. maculatus pada siang hari ditemukan istirahat di luar rumah pada tempat teduh dekat kandang ternak (sapi, kerbau) seperti di semak-semak, lubang-lubang di tanah tebing dan lubang tempat pembuangan sampah dan jarang sekali ditemukan . *An. maculatus* istirahat di dalam rumah pada siang hari (Boewono dan Ristiyanto, 2005; Handayani dan Darwin, 2005).

B. KEANEKARAGAMAN GENETIK

Keanekaragaman merupakan fenomena normal pada makhluk hidup, baik dalam kehidupan tumbuhan, hewan maupun manusia. Ciri-ciri fisik luar pada setiap makhluk hidup yang nampak secara visual akan mudah dikenali karena tidak memerlukan alat-alat bantu. Beberapa ciri fisik dalam sampai aras molekuler hanya dapat dikenali dengan alat-alat bantu atau teknik-teknik pemeriksaan laboratorium tertentu yang terkadang memerlukan ketelitian yang tinggi (Sofro, 1992).

Studi mengenai keanekaragaman genetik ini pada prinsipnya bertujuan untuk mengkaji komposisi genetik individu di dalam atau antar populasi dan untuk mengetahui faktor-faktor yang menyebabkan terjadinya modulasi atau dinamika keanekaragaman genetik dari populasi tersebut. Keanekaragaman dapat terjadi karena adanya perubahan urutan sejumlah nukleotida DNA. Perubahan itu mungkin dapat mempengaruhi fenotipe suatu organisme, sehingga dapat dipantau dengan mata telanjang atau dengan melihat perubahan reaksinya terhadap lingkungan tertentu. Apabila variasi genetik tersebut hanya karena perubahan susunan beberapa nukleotida, maka ada kemungkinan kelainan genetik tidak terekspresi secara fenotip. Organisme dapat berbeda dalam bentuk individu (polimorfisme fenotip), bentuk organ, enzim (polimorfisme protein), substansi darah (polimorfisme biokimia) dan pada tingkat DNA dalam hal ini perbedaan dalam urutan nukleotida (polimorfisme DNA) (Passarge dan Color, 1994).

Keanekaragaman genetik dari suatu populasi secara umum dapat terjadi karena gen mengalami mutasi, rekombinasi dan perpindahan (migrasi) sekelompok populasi dari satu tempat ke tempat lain (Griffith, *et al.*, 1996). Struktur genetik populasi dipengaruhi oleh beberapa faktor lain seperti besarnya populasi, cara reproduksi individu yang diteliti, aliran gen (*gene flow*) dan seleksi (Mc. Donal and Mc. Dermont, 1993).

Keanekaragaman genetik pada nyamuk dapat mempengaruhi kemampuan nyamuk tersebut untuk menularkan penyakit. Secara konvensional beberapa jenis nyamuk dapat dibedakan dengan membandingkan secara morfologi seperti: bentuk dan ukuran sayap, ada tidaknya cincin putih pada kaki belakang dan perbedaan morfologi yang lain. Cara-cara tersebut memiliki keterbatasan karena tidak dapat digunakan untuk nyamuk-nyamuk yang berada dalam satu spesies kompleks, spesies sibling atau spesies kembar. Menurut definisinya, spesies kompleks merupakan kelompok spesies yang secara morfologi sangat mirip atau tidak dapat dibedakan satu dengan lainnya tetapi secara genetis berbeda dan

terisolasi secara reproduksi. Biasanya di alam memperlihatkan adanya perbedaan dalam hal tingkah laku dan kemampuannya sebagai vektor (Subbarao, 1998; Dharmawan, 1993).

Kemajuan di bidang biologi molekuler memungkinkan keanekaragaman genetik suatu populasi nyamuk dapat diamati pada tingkat protein (isoenzim) dan tingkat DNA. Analisis isoenzim pada prinsipnya merupakan teknologi pengkajian keragaman berdasarkan variasi asam amino pada protein yang mempunyai fungsi katalitik yang sama, karena itu analisis isoenzim pada akhirnya bertujuan untuk mendeteksi keragaman rantai DNA yang mengkode pembentukan protein tersebut. Teknik ini telah banyak digunakan dalam penelitian berbagai nyamuk vektor seperti penelitian tentang variasi enzim yang terlibat dalam resistensi nyamuk *Aedes aegypti* (Willis, 1984), kajian keberagaman genetik nyamuk *An. barbirostris* dan *An. vagus* di dua daerah endemik malaria di Jawa Barat dengan menggunakan teknik analisis isozim melalui media elektroforesis selulosa asetat (Sumantri dan Iskandar, 2005), identifikasi molekuler anggota-anggota palearctic *An. maculipennis* di Iran bagian utara menggunakan teknik RAPD-PCR (Djadjid *et al*, 2007), penelitian untuk memperkirakan aliran gen di antara populasi *An. maculatus* di Thailand menggunakan analisis mikrosatelit (Rongnoparut *et al.*, 1999), dan struktur genetik populasi *An. maculatus* di Thailand (Rongnoparut *et al*, 2006). Penanda-penanda molekuler (marker) yang digunakan dalam studi identifikasi spesies kompleks, antara lain DNA ribosom (ITS2, domain 2 dan domain 3) dan DNA mitokondria (COI dan COII) diterapkan secara luas pada diskriminasi spesies nyamuk dan rekonstruksi filogenetik (Garos *et al*, 2005; Krzywinski *et al*, 2001; Wilkerson *et al*, 2005 *cit* Ma *et al*, 2006).

C. TEKNIK-TEKNIK PENGENALAN SPESIES KOMPLEKS

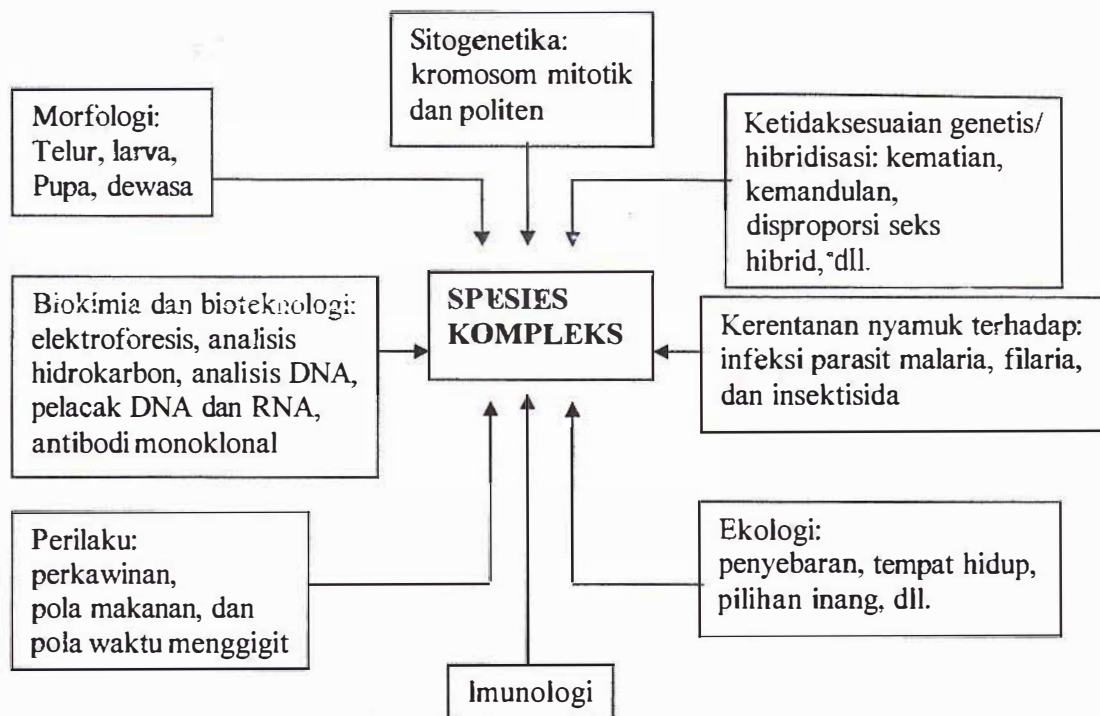
Karakter morfologi yang sering digunakan untuk mengidentifikasi spesies *Anopheles* dewasa sangat terbatas pada unsur sisik, pola dan warna, dan distribusinya. Karakter yang digunakan dalam deskripsi stadium pra dewasa adalah gambaran telur, setasi dan pigmentasi jentik, bentuk pedal/kayuh (*paddle*) dan trompet, dan kaetotaksi pupa. Morfologi spermateka dan spirakuler juga digunakan untuk identifikasi spesies. Morfometrik terbukti sangat berguna untuk mempelajari beberapa spesies kompleks, apabila digunakan dalam kombinasi dengan analisis statistik.

Populasi dalam satu spesies kadang-kadang menunjukkan tanda-tanda perbedaan yang berhubungan dengan habitat istirahat, pilihan makanan terhadap inang, tingkat

perkembangan resistensi terhadap insektisida, kerentanan terhadap infeksi, dan lain-lain. Semua perbedaan mungkin menunjukkan keberadaan spesies isomorfik secara taksonomi, tetapi perbedaan ini tidak dapat memberikan karakteristik status spesies terhadap populasi. Oleh karena itu dibutuhkan teknik genetik yang dapat mendemonstrasikan isolasi reproduksi pada populasi alam. Bukti yang jelas untuk spesies isomorfik atau spesies kriptik diperoleh dari data genetika populasi yang dibangun dari sampel simpatrik. Suatu alasan bahwa variasi kromosomal dan variasi elektroforetik pada loci enzimatik yang memberikan bukti genetika populasi yang bagus, yang sudah digunakan secara luas pada studi pengenalan spesies kompleks (Subbarao, 1998). Teknik-teknik yang digunakan dalam identifikasi spesies kompleks antara lain adalah:

- a. Variasi morfologi
- b. Eksperimen persilangan (*crossing experiments*)
- c. Karyotipe mitotik dan meiotik (variasi struktural dan heterokromatin)
- d. Kromosom politen
- e. Variasi elektroforetik
- f. Profil hidrokarbon kutikula
- g. Pendekatan secara molekuler dengan investigasi DNA dan RNA, seperti *Restriction Fragment Length Polymorphism / RFLP*, *Random Amplified Polymorphic DNA / RAPD-PCR*, *Single Strand Conformational Polymorphism / SSCP* (Subbarao, 1998), dan identifikasi spesies menggunakan penanda molekuler yaitu sekuen tertentu yang spesifik yang terdapat pada DNA ribosom dan inti (Garos *et al*, 2005; Krzywinski *et al*, 2001; Wilkerson *et al*, 2005 *cit* Ma *et al*, 2006).

Spesies kompleks merupakan kumpulan dua atau lebih spesies yang memiliki morfologi yang tidak dapat /sulit dibedakan satu dengan lainnya dan tidak menghasilkan keturunan yang normal bila kawin, tetapi mungkin berbeda dalam perilaku biologis dan pilihan lingkungan hidupnya, serta kemampuannya sebagai vektor. Karena kemiripan morfologi nyamuk tipe yang satu dengan dengan lainnya di bawah nama satu spesies, maka nyamuk-nyamuk tersebut dinamakan sibling spesies (WHO, 1977; Dharmawan, 1993). Berbagai cara untuk dapat mempelajari spesies kompleks sebagai salah satu contoh keanekaragaman genetik pada nyamuk *Anopheles* dapat dilakukan dengan pendekatan berbagai disiplin ilmu (merupakan kerangka teori) yang secara skematis dapat digambarkan sebagai berikut:

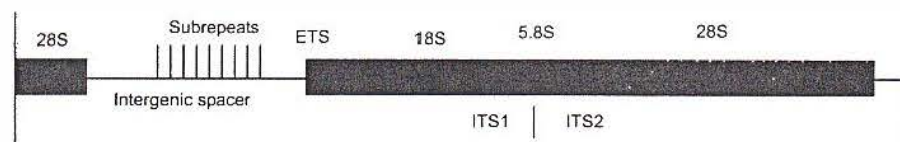


Gambar 1. Pendekatan interdisiplin bidang ilmu untuk mempelajari sibling spesies nyamuk *Anopheles* (modifikasi dari Baimai dan Green, 1988; Dharmawan, 1993)

D. AMPLIFIKASI PCR DNA RIBOSOM SERANGGA

DNA ribosom (rDNA) sudah digunakan secara luas dan sangat efektif untuk analisis filogenetik dan populasi serangga, serta dapat digunakan untuk membedakan antara spesies yang hubungannya dekat maupun jauh (Paskewitz dan Collins, 1997; Wesson *et al*, 1992; Gonzalez *et al*, 1990). Gen rDNA mengkode rRNA, yang terdiri dari 3 komponen utama struktural RNA dari ribosom. Karena RNA mempunyai peranan fundamental dalam translasi mRNA pada semua organisme, porsi rDNA adalah sangat terkonservasi/lestari (*highly conserved*), sama dari bakteri ke manusia (Gerbi, 1986). Porsi konservasi ini memberikan urutan/sekuen yang dapat digunakan sebagai primer untuk mengamplifikasi daerah rDNA dengan PCR dari organisme di mana informasi sekuen DNA sebelumnya tidak diketahui. rDNA mempunyai keuntungan lain sebagai target untuk studi sistematika, termasuk tingkat variabel silang evolusi bagian-bagian yang berbeda dan umumnya jumlah copy (salinan) tinggi dalam suatu genom. rDNA biasanya

diatur dalam gen-gen yang terhubung secara tandem, semua diatur dalam orientasi transkripsi yang sama, dengan jumlah salinan berkisar dari 100 sampai 1000 pada serangga (Beckingham, 1982). Gen rDNA mungkin terjadi dalam satu kelompok yang panjang atau mungkin menyebar ke beberapa loci. Unit transkripsi individual terpisah satu sama lain oleh *intergenic spacer region (IGS)*, juga terkait sebagai *nontranscribed spacer (NTS)*. IGS sering mengandung sub ulangan pendek, daerah di mana mungkin peating dalam transkripsi, dan sub ulangan ini mungkin berubah dalam jumlah dari satu cistron ke yang berikutnya. Pada setiap unit transkripsi, ada 2 daerah pengkode utama, untuk 18S dan 28S RNA ribosom, dan suatu daerah pengkode RNA 5.8S yang terjadi dalam daerah *internal transcribed spacer (ITS)* antara subunit 18S dan 28S (Gambar 2). ITS terbagi menjadi ITS1, terletak antara daerah pengkode 18S dan 5,8S; dan ITS2 terletak antara daerah pengkode 5,8S dan 28S.



Gambar 2. Struktur DNA ribosom. ITS (*Internal Transcribed Spacer*), ETS (*Eksternal Transcribed Spacer*)

Wilayah yang berbeda dari rDNA cukup bervariasi dan diduga pada tingkat urutan polimorfisme intraspesies dan antarspesies. Sebagai contoh, bagian subunit 5.8S, 18S dan 28S sangat terkonservasi, dengan variasi urutan sangat sedikit dapat terdeteksi dalam suatu individu atau spesies, atau antara spesies yang hubungannya erat. Wilayah IGS, di sisi lain, berbeda cukup cepat bahkan antara spesies yang hubungannya sangat erat, dan urutan IGS tertentu, terutama jumlah berbagai sub ulangan, cenderung bervariasi dari satu unit ke unit berikutnya pada organisme individu. Urutan ITS1 dan ITS2 juga mengalami tingkat perbedaan evolusi relatif cepat, meskipun mungkin pada tingkat yang lebih rendah daripada urutan IGS. Secara umum, daerah ITS1 dan ITS2 tidak mengandung urutan sub ulangan panjang yang variabel secara intraspesifik (Paskewitz *et al*, 1993a). Karena ITS ini umumnya jauh lebih pendek daripada urutan IGS, lebih mudah dilakukan kloning dan sekuensing dengan strategi melibatkan PCR. Perlu dicatat, bagaimanapun, bahwa beberapa spesies mungkin memiliki tingkat variasi intraindividual dan intraspesifik pada urutan spacer yang bisa mendekati beberapa persen, dengan demikian rumit menggunakan urutan

tersebut untuk tujuan diagnosa spesies. Ini berbeda tingkat variabilitas urutan dalam dan di antara taksa yang terkait dengan wilayah rDNA yang berbeda menawarkan peluang untuk menggunakan urutan rDNA untuk menyelidiki pertanyaan-pertanyaan di berbagai tingkat kepentingan filogenetik.

Walaupun banyak metode yang telah dirancang untuk mengidentifikasi spesies yang hubungannya erat, diagnostik rDNA-PCR memiliki beberapa keunggulan. Teknik identifikasi berbasis DNA dapat digunakan pada semua tahap dan DNA stabil di bawah kondisi penyimpanan sederhana (termasuk pengawetan dengan etanol). Porsi serangga yang diperlukan sangat kecil, meninggalkan sisa tersedia untuk jenis analisis yang lain. DNA yang cukup biasanya ada dalam beberapa sisik atau segmen kaki (Paskewitz *et al*, 1993a), sehingga memungkinkan museum atau bahkan peninggalan spesimen diidentifikasi dengan kerugian minimal. Akhirnya, rDNA PCR dapat diadaptasi untuk digunakan dengan investigasi lapangan berskala besar. Karena metode untuk menggunakan rDNA PCR untuk mengidentifikasi spesies tertentu sudah tersedia dalam literatur, misalnya *An. gambiae* kompleks (Paskewitz dan Collins, 1990; Scott *et al*, 1993), *An. freeborni* / *hermsi* (Porter dan Collins, 1991), *Culex* spp (Crabtree *et al*, 1995), *An. quadrimaculatus* kompleks (Cornel *et al*, 1995)(Paskewitz dan Collins, 1997), *An. funestus* group (Hackett *et al*, 2000). Koekemoer *et al*, 1999 mengembangkan pengujian PCR-SSCP yang membedakan antara 4 anggota Funestus group, termasuk *An. rivulorum* dan *An. funestus*. Prosedur pengujian menggunakan primer yang mengamplifikasi domain tiga (D3) dalam gen rDNA 28S, tetapi produk tidak menunjukkan perbedaan ukuran spesifik spesies ketika dielektroforesis pada gel agaros (Hackett *et al*, 2000).

Metode berbasis PCR yang relatif cepat ini juga kompatibel dengan prosedur pengujian lain yang menggunakan nyamuk, seperti analisis sumber pakan darah dan ELISA antigen circum sporozoit malaria (Beier *et al*, 1988; Wirtz *et al*, 1987). Lebih lanjut, prosedur seperti analisis pakan darah dan deteksi parasit tersebut dapat diadaptasikan dengan format berbasis PCR menggunakan nyamuk tunggal dalam suatu pengujian multiplex PCR (Paskewitz dan Collins, 1990; Song *et al*, 2009).

Famili gen rDNA memberikan sumber urutan DNA yang bervariasi antara spesies bahkan spesies yang kekerabatannya dekat. rDNA adalah multigen famili yang mengandung daerah pengkodean yang sangat lestari bergantian dengan *intergenic spacer* yang kurang lestari. Daerah yang sangat lestari dapat digunakan untuk menyeleksi klon yang mengandung rDNA secara tepat, sedangkan daerah yang kurang lestari bertugas

sebagai sumber urutan varian. Genom diploid pada setiap nyamuk betina mengandung lebih kurang 700 salinan (Collins *et al*, 1989). Setiap salinan gen memberikan template PCR potensial, fraksi kecil dari DNA yang terekstraksi dari satu nyamuk adalah cukup untuk suatu reaksi. Jumlah tersebut dapat diekstraksi dari kaki nyamuk (Paskewitz dan Collins, 1990). Penanda-penanda molekuler (marker) yang digunakan dalam studi identifikasi spesies kompleks, rDNA ITS2, domain dua dan tiga dari gen rDNA 28S (D2 dan D3), dan cytochrome oxidase sub unit I dan II (COI dan COII) DNA mitokondria, diterapkan secara luas pada diskriminasi spesies nyamuk dan rekonstruksi filogenetik (Garos *et al*, 2005a,b; Krzywinski *et al*, 2001; Wilkerson *et al*, 2005 *cit* Ma *et al*, 2006). ITS2 lebih variabel dibandingkan dengan dua penanda yang lain. Variasi intraspesifik tidak signifikan dibandingkan dengan variasi interspesifik. Panjang ITS2 berkisar dari 328-338 bp dengan kandungan GC 57,69%-59,05%. Spesies dapat dikenali secara sederhana dengan ukuran produk PCR. Pengujian tersebut dapat digunakan sebagai alat praktis untuk identifikasi molekuler yang handal khususnya studi ekologi, genetika populasi dan epidemiologi malaria. (Ma *et al*, 2006).

Telah diketahui bahwa beberapa gen yang mengkode suatu protein mempunyai pola urutan nukleotida yang mirip satu sama lain. Kelompok gen semacam ini disebut sebagai famili gen (multigen), diduga merupakan kelompok gen yang berasal dari gen nenek moyang yang sama. Gen-gen semacam ini dapat berada dalam suatu kelompok pada satu kromosom yang sama, atau tersebar di beberapa kromosom. Gen-gen yang merupakan satu famili pada umumnya mempunyai urutan nukleotida yang mirip dan protein yang dikode mempunyai fungsi yang berkaitan erat atau serupa. Sebagai contoh, gen-gen yang mengkode enzim tripsin, khimotripsin, dan elastrase mempunyai urutan nukleotida yang mirip. Enzim-enzim tersebut mempunyai kemampuan yang serupa yaitu mampu memotong ikatan peptida dan disintesis oleh sel-sel pankreas yang sama (Yuwono, 2005).

E. PROTEIN CIRCUM SOROZOIT

Protein circum sporozoit (CS) merupakan salah satu produk biosintetik utama antigen permukaan sporozoit, berukuran 40-60 KD, tergantung spesiesnya. Protein ini membentuk mantel yang menyelubungi seluruh permukaan sporozoit matang. Karakterisasi imunologis protein CS menunjukkan keberadaan dari epitop dominan sel B

pada daerah asam amino yang berulang-ulang. Determinan ini dikenali oleh semua antibodi monoklonal melawan sporozoit, maupun sebagian besar anti sporozoit antibodi yang ada dalam poliklonal antisera (Melancon-Kaplan *et al*, 1993). Protein CS dari berbagai spesies *Plasmodium* mempunyai struktur dan sifat imunologis yang mirip. Epitop imunodominan yang spesifik untuk masing-masing spesies terletak di bagian tengah dari protein CS, tersusun dari asam amino yang berulang secara berurutan. Urutan tersebut adalah NANP pada *P. falciparum* dan DRADiAGQFAG pada *P. vivax* (Nussenzweig dan Nussenzweig, 1989 *cit.* Lopez-Antunano dan Schmunis, 1993). Repetitif epitop yang sama terjadi pada protein CS berbagai strain *P. falciparum* dari berbagai area geografi yang berbeda (Savala *et al.*, 1985 *cit.* Lopez-Antunano dan Schmunis, 1993).

Elisa dua tapak (a two-site sandwich Elisa dikembangkan untuk mendeteksi adanya antigen sporozoit pada nyamuk yang terinfeksi parasit malaria, dan digunakan sebagai salah satu alat epidemiologi untuk mengidentifikasi nyamuk yang tersangka vektor. Teknik tersebut memungkinkan terdeteksinya sporozoit pada nyamuk tersangka vektor dan mengetahui jenis parasit malaria yang menginfeksi nyamuk *Anopheles* (Bangs, 1989; Burkot *et al.*, 1987; Wirtz, 2009). Metode tersebut menerapkan penggunaan antibodi monoklonal yang spesifik spesies yang dapat mengenali dan menangkap imunodominan repetitif epitop protein CS dan dengan analogi metode tersebut dapat mendeteksi nyamuk yang terinfeksi *P. falciparum*, *P. vivax* (Wirtz *et al.*, 1987; Burkot *et al.*, 1987; Chan, 2001; Povaia *et al.*, 2001; Wirtz *et al.*, 2009), dan *P. malariae* (Povaia *et al.*, 2001)

F. IDENTIFIKASI PAKAN DARAH PADA NYAMUK *An. maculatus*

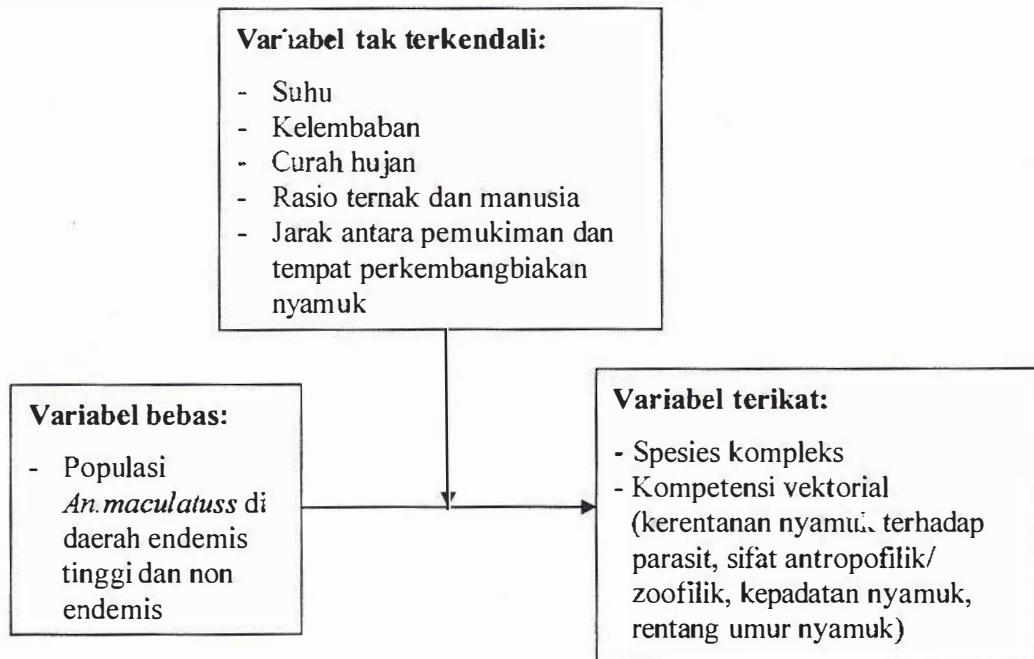
Kemampuan mengidentifikasi inang dari nyamuk pengisap darah merupakan bagian integral dari berbagai penelitian ekologi, dan menjadi hal yang sangat penting dalam studi epidemiologi dikaitkan dengan kepentingan kesehatan manusia atau hewan (Small, 1998a). Pengujian yang dilakukan dengan metode Elisa bertujuan memberikan ketepatan, sensitivitas dan spesifisitas. Pemilihan protein Imunoglobulin G (IgG) dilaporkan sebagai marker yang baik. Variasi IgG antar spesies sudah terdokumentasi dengan baik dan protein ini dapat dipurifikasi secara mudah dengan prosedur yang sudah mapan. Pengujian identifikasi pakan darah dengan Elisa yang paling sensitif dan secara luas digunakan adalah yang sudah dikembangkan pertama kali oleh Voller *et al.*, 1974 dengan berbagai modifikasi seperti yang dilakukan oleh Wirtz *et al.*,

1987. Dalam pengujian, mikroplat polivinil klorida pertama kali di coating dengan anti IgG manusia selama satu malam. Sumuran mikroplat diaspirasi, kemudian dilakukan bloking dengan *blocking buffer*, inkubasi selama 1 jam, sumuran diaspirasi lagi untuk menghilangkan sisa-sisa buffer dan plat siap digunakan. Persiapan sampel darah dilakukan dengan memencet perut nyamuk ke kertas filter (Whatman) yang sudah dibagi menjadi beberapa bagian. Kertas berisi sampel/ apusan darah nyamuk ini dapat disimpan pada suhu 4°C dalam waktu lama sebelum dianalisis. Apabila sampel darah akan diidentifikasi, kertas filter yang sudah apusan darah dipotong sesuai dengan batas/ ukuran yang sudah ditentukan, dimasukkan ke dalam PBS untuk mengelusi protein darah. Aliquot dari eluen tersebut selanjutnya ditempatkan pada sumuran yang berisi anti IgG manusia dan diinkubasikan selama 1 jam untuk memberikan kesempatan penangkapan IgG yang ada dalam darah. Protein-protein yang tidak terikat kemudian dicuci dengan PBS/Tween 20. Anti IgG berlabel peroksidase ditambahkan ke dalam sumuranpiat sehingga akan terjadi perubahan warna, tergantung substrat yang digunakan. Perubahan warna dari kuning ke oranye kecoklatan apabila digunakan substrat Orthophenylene diamine (OPD) dan warna hijau apabila digunakan substrat 2,2-azinodi(3-ethylbenzthiazolin sulfonate 6) (ABTS). Kontrol negatif digunakan nyamuk dengan spesies sama hasil koloni laboratorium yang tidak mengisap darah (baru muncul dari pupa). Apabila sumuran lain terbentuk warna yang lebih gelap dari kontrol negatif dipertimbangkan sebagai hasil yang positif. Kontrol positif digunakan IgG manusia. Perubahan warna dari hasil pengujian ini dapat dibaca secara visual atau dengan menggunakan *Elisa plate reader* (Small, 1998a). Metode *Elisa* (Voller *et al.*, 1974) praktis untuk identifikasi pakan darah pada nyamuk *Anopheles* (Edrissian *et al.*, 1982), lebih unggul dibandingkan dengan uji imunologi yang lain seperti uji presipitin (Beier *et al.*, 1988) radioimmunoassay dan uji haemaglutinasi pasif (*haemagglutination passive test*) dalam hal kesederhanaan, kecepatan, sensitivitas, dan reproduibilitas (Konishi dan Yamanishi, 1984; Beier *et al.*, 1988). Identifikasi pakan darah pernah dilakukan terhadap beberapa spesies nyamuk *Anopheles* dari berbagai daerah, antar lain *An. maculatus* dari Banjarnegara, dengan HBI mencapai 34 % (Widyastuti *et al.*, 2003)

XIII. METODE PENELITIAN

A. Kerangka Konsep

Berdasarkan teori cara-cara mempelajari spesies kompleks pada nyamuk *Anopheles* dengan pendekatan berbagai disiplin ilmu yang telah dikemukakan oleh Baimai dan Green, 1988, disusunlah kerangka konsep sebagai berikut:



Kerangka konsep ini memuat variabel bebas, terikat dan tidak terkendali. Variabel bebas adalah populasi *An. maculatus* yang diambil dari beberapa daerah malaria dengan kriteria sangat berbeda yaitu endemis tinggi dan non endemis. Variabel terikat adalah beberapa kegiatan yang dapat diukur, yang dilakukan sesuai dengan tujuan penelitian. Variabel tidak terkendali merupakan faktor-faktor penting yang harus diperhitungkan karena kemungkinan dapat mempengaruhi hasil penelitian, sehingga pengukuran dan informasi berkenaan dengan hal tersebut perlu diperoleh.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Lokasi penelitian dipilih berdasarkan beberapa kriteria kondisi lingkungan yang berbeda dari masing-masing lokasi antara lain: ekosistem, ketinggian, tempat perkembangbiakan (TP), dan endemisitas. Kriteria daerah penelitian disajikan pada tabel berikut:

Tabel 1. Deskripsi daerah penelitian untuk pengambilan sampel *An.maculatus*

Lokasi	Ekosistem	Macam TP	Ketinggian (meter dpl)	Endemisitas
Panusupan, Purbalingga, Jateng	Perkebunan salak, Persawahan, hutan sekunder	Kobakan batu sepanjang sungai (air jernih), kolam, sawah	329	Endemis tinggi
Sidareja, Purbalingga, Jateng	Persawahan, hutan sekunder	Kobakan berpasir sepanjang sungai, sawah, sumber air (jernih)	159	Endemis tinggi
Dayeuhluhur, Cilacap, Jateng	Hutan sekunder, perkebunan, persawahan	Kobakan berpasir (air jernih), kolam, sawah,	348	Non endemis
Kokap, Kulonprogo, DIY	Hutan sekunder	Kobakan batu sepanjang sungai, sumber air, perigi (jernih)	135	Endemis tinggi
Bani-bani, Belu, NTT	Hutan sekunder, persawahan	Sumber air (jernih), kolam, sawah,	215	Endemis tinggi
Bandarjaya, OKU Selatan	Perkebunan kopi dan karet	Kobakan berpasir, perigi (jernih)	892	Endemis tinggi
Berjoko, Nunukan, Kaltim	Perkebunan kelapa sawit, kopi, dan kakao	Perigi dengan air kotor, bekas tapak kaki manusia dan ternak	218	Endemis tinggi

Hal lain yang dipertimbangkan misalnya Purbalingga 2 tahun terakhir (2010-2011) merupakan daerah malaria tertinggi di Jawa tengah (Dinkes Prov. Jateng, 2011), Berjoko (Desa Sungai Limau, Kabupaten Nunukan, Kalimantan Timur), dan Bani-bani (Kecamatan Ilo Kufeu, Kabupaten Belu, NTT) merupakan kawasan perbatasan lintas negara yang menjadi prioritas pembangunan kesehatan di Indonesia.

Penelitian diselesaikan dalam waktu 1 tahun sesuai dengan tahun anggaran yaitu mulai Januari sampai dengan Desember 2011).

C. Desain Penelitian/ Rancangan Penelitian

Desain penelitian yang digunakan merupakan penelitian observasional analitik dengan rancangan *cross sectional*.

D. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan merupakan penelitian dasar

E. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah nyamuk *An. maculatus* yang memenuhi kriteria ditangkap di daerah endemis dan non endemis seperti tertera pada XIII, bagian B).

2. Sampel

Sampel untuk penelitian ini adalah *An. maculatus* betina. Sampel nyamuk dikoleksi dari lapangan menggunakan alat aspirator dan senter. Nyamuk yang diperoleh dimasukkan ke dalam *paper cup* yang bagian atasnya ditutup kain kasa dan kapas. Cara koleksi nyamuk dewasa (ataupun jentik) sesuai dengan standar WHO, 1992 dan 1994 seperti yang sudah dicantumkan pada XIII, bagian G1.

F. Estimasi besar sampel

Besar kecilnya sampel bukan satu-satunya ukuran untuk menentukan representatif atau tidak representatifnya terhadap populasi. Hal ini tergantung pula pada sifat-sifat populasi yang diwakilinya (Notoatmodjo, 2002). Menurut Pamela L. Alreck dan Robert B. Seetle dalam buku *The Survey Research Handbook* utk populasi yg besar sampel minimum kira-kira 100 responden dan sampel maksimum adalah 1000 responden atau 10% dengan kisaran angka minimum dan maksimum. Secara lebih rinci Jack E. Fraenkel dan Norman E. Wallen menyatakan bahwa minimum sampel adalah 100 untuk studi deskriptif, 50 untuk studi korelasional, 30 per kelompok untuk studi kausal komparatif. L.R Gay dalam buku *Educational Research* menyatakan bahwa untuk riset deskriptif besar sampel 10% dari populasi riset korelasi 30 subyek, riset kausal komparatif 30 subyek per kelompok, dan riset eksperimental 50 subjek per kelompok. Sementara itu Krejcie dan Morgan menyusun ukuran besar sampel dalam bentuk tabel seperti tertera pada Lampiran 1 (<http://blog.re.or.id/cara-menentukan-besarnya-sampel-sample-size.htm>)

Pada penelitian ini, khususnya untuk analisis keanekaragaman genetik dengan PCR digunakan sampel minimal 30, apabila sampel minimal tidak terpenuhi (kurang dari 30) maka dilakukan pemeriksaan semua sampel yang diperoleh. Untuk kompetensi vektorial khususnya pemeriksaan *Elisa* sporozoit dan pakan darah digunakan semua sampel yang diperoleh dari masing-masing lokasi.

G. Pengumpulan Data

Data primer yang dikumpulkan adalah mengenai nyamuk *An. maculatus* dari daerah yang sudah ditentukan dan data sekunder yang dapat diperoleh dari Dinas Kesehatan setempat.

G.1. Cara pengumpulan nyamuk

Nyamuk *An. maculatus* diperoleh dengan melakukan penangkapan di luar rumah dan dalam rumah pada malam dan pagi hari. Metode penangkapan sesuai dengan standar WHO (1992 dan 1994) yaitu a). penangkapan malam hari (18.00-06.00) dengan metode: umpan orang luar dan dalam, tempat istirahat luar dan dalam, b). Penangkapan pada pagi hari (06.00-08.00) di tempat istirahat di habitat asli (sekitar tempat perker..bangbiakan) dan di dalam rumah. Penangkapan nyamuk dilakukan di rumah penduduk yang ditetapkan sebagai tempat untuk mendapatkan sampel. Penangkap nyamuk berjumlah 6 orang. Penangkapan dilakukan pada malam hari mulai pukul 18.00-06.00, setiap jamnya menggunakan metode hinggap pada manusia di dalam rumah (HMD), hinggap pada manusia di luar rumah (HML) masing-masing selama 40 menit, penangkapan nyamuk yang istirahat di dalam rumah (dinding), dan istirahat di luar rumah (sekitar kandang ternak) masing-masing selama 10 menit. Penangkapan nyamuk juga dilakukan pada pagi hari terhadap nyamuk yang istirahat di dalam rumah dan di luar rumah di habitat aslinya. Nyamuk yang tertangkap dimasukkan kedalam *paper cup* untuk diproses lebih lanjut. Selanjutnya nyamuk dimatikan dengan kloroform dan diidentifikasi menurut kunci identifikasi O'Connor dan Soepanto (1989). Nyamuk yang sudah diidentifikasi spesiesnya selanjutnya dibedah kandung telurnya untuk mengetahui paritasnya dengan cara sebagai berikut:

Nyamuk diletakkan di atas kaca benda yang telah ditetesi air. Bagian dada nyamuk ditusuk dengan jarum seksi untuk menahan agar nyamuk tidak bergerak. Dengan menggunakan jarum seksi pula, kedua sisi ujung ruas perut ke VII dirobek sedikit. Selanjutnya ujung abdomen (ruas perut terakhir) ditarik perlahan-lahan ke belakang sampai kandung telur keluar. Kemudian kandung telur dan sisi perut lainnya diperiksa di bawah mikroskop dengan perbesaran 100 kali atau 400 kali. Bagian-bagian kandung telur diperiksa secara teliti. Bila dalam pemeriksaan terlihat bahwa ujung tracheola masih menggulung berarti nyamuk belum pernah bertelur (*nulli-parous*), sebaliknya bila ujung tracheola membuka/ tidak menggulung berarti nyamuk sudah pernah bertelur (*parous*). Nyamuk yang sudah diketahui paritasnya selanjutnya dipisahkan dan dimasukkan ke dalam tabung eppendorf masing-masing: a). dada-kepala (*parous*) untuk pemeriksaan *Elisa* sporozoit, dan b). kaki, sayap, perut untuk ekstraksi DNA, sedangkan c). untuk pemeriksaan *Elisa* pakan darah, darah dari perut nyamuk dipencet pada kertas Whatman yang sudah dibagi menjadi 16 bagian masing-masing untuk 1 ekor nyamuk. Kertas Whatman secara detil diberi label seperti spesies, tanggal, lokasi, metode penangkapan, jam penangkapan dan selanjutnya disimpan kering dalam kantong plastik/ lembar sampai diperlukan untuk pengujian dengan teknik *Elisa*. Tabung eppendorf diberi label seperti: tanggal, lokasi, metode dan jam penangkapan. Bagian-bagian tubuh nyamuk yang sudah dimasukkan ke dalam tabung eppendorf tersebut disimpan dalam kondisi kering dengan cara membuat lobang kecil pada tutup tabung, dan semua tabung yang terkumpul dari masing-masing lokasi dimasukkan ke dalam stoples yang sudah diisi dengan *silica gel* sebagai bahan pengering. Sampel-sampel tersebut dibawa ke laboratorium untuk diproses selanjutnya.

Spesies nyamuk yang tertangkap dari setiap metode penangkapan (HMD, HML, istirahat di dalam rumah (IDR), istirahat sekitar kandang/ tambatan ternak di luar rumah (ISKD) dapat dihitung kepadatannya dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$MHD = \frac{\text{Jml spesies nyamuk } Anopheles \text{ tertangkap}}{\text{Jumlah jam penangkapan} \times \text{jumlah penangkap}}$$

Keterangan:

MHD = *Man Hour Density*

Nyamuk yang sudah dibedah kandung telurnya dapat dihitung angka paritasnya dengan membagi jumlah nyamuk *parous* atau *nulliparous* dengan jumlah nyamuk yang diperiksa.

Untuk kelengkapan data vektor khususnya perilaku berkembangbiak, dilakukan pula penangkapan jentik nyamuk vektor di habitat sekitar lokasi penangkapan. Jentik yang terkumpul selanjutnya dipelihara di laboratorium sampai menjadi nyamuk dan dapat diidentifikasi spesiesnya.

G.2. Pemetaan lokasi pengambilan sampel, tempat berkembangbiakan dan kasus malaria

Cara pemetaan lokasi pengambilan sampel dan lingkungan dimana ditemukan *An. maculatus* digunakan GPS (*Global Positioning Sistem*) untuk menentukan titik koordinat. Selain itu juga dikumpulkan data sekunder berupa data kasus, endemisitas, geografi (ketinggian tempat, tata guna lahan), demografi daerah penelitian, data klimatologis (curah hujan, suhu dan kelembaban), dan data rasio ternak:manusia. Pengumpulan data faktor lingkungan diperoleh dengan melakukan observasi keadaan lingkungan di sekitar kasus/lokasi penangkapan yang meliputi keberadaan kubangan air yang menjadi tempat berkembangbiakan nyamuk, keberadaan tumbuhan air, kolam, semak-semak, kandang ternak di sekitar rumah dan di dalam rumah, adanya kasa ventilasi di rumah tempat tinggal penduduk serta kondisi rumah (dinding utama rumah, lantai rumah, jendela dll).

G.3. Pengelolaan data GPS dan pembuatan peta

- Data titik koordinat yang telah dicatat dalam formulir GPS diolah dalam database dengan menggunakan program Microsoft Excel dan disimpan dalam *file* yang ber-extension *.dbf* atau *.txt*.
- Database titik koordinat dikelompokkan menurut tipe data yang diperlukan dalam masing-masing penelitian.
- Tabel kelompok titik koordinat tersebut dimasukkan dalam program ArcGis V.10 dengan cara mengaktifkan *View/Add Event Theme* dan memasukkan garis bujur (koordinat bidang X) pada kotak *Lon* dan garis lintang (koordinat bidang Y) pada kotak *Lat* dengan menekan perintah OK pada kotak dialog *Add Event Theme*, maka ArcGis akan menampilkan letak titik koordinat sebagai peta pada layar komputer. Masing-masing kelompok tipe data dapat ditampilkan dengan titik (*point*) warna yang berbeda.
- Peta yang telah dibuat di ArcGis dapat dipindah ke program aplikasi lain seperti di MS Word, Power Point dan lain-lain untuk keperluan laporan atau seminar.

H. Definisi Operasional

No	Variabel	Batasan	Skala
1	HCI	Stratifikasi daerah malaria berdasarkan API > 5 / 1000 penduduk	Ordinal
2	MCI	Stratifikasi daerah malaria berdasarkan API > 1-5 / 1000 penduduk	Ordinal
3	LCI	Stratifikasi daerah malaria berdasarkan API < 1 / 1000 penduduk	Ordinal
4	Non endemis	Stratifikasi daerah tanpa kasus malaria berdasarkan API = 0 / 1000 penduduk	Ordinal
5	Keanekaragaman genetik	Komposisi genetik individu di dalam atau antar populasi yang terjadi karena adanya perubahan urutan sejumlah nukleotida DNA (gen mengalami mutasi, rekombinasi dan perpindahan sekelompok populasi dari satu tempat ke tempat lain).	Nominal
6	Uji Elisa sporozoit	Deteksi parasit malaria pada nyamuk dengan menggunakan antibodi monoklonal <i>P. falciparum</i> atau <i>P. vivax</i> dengan teknik Elisa berdasarkan protein circum sporozoit.	Rasio
7	Angka sporozoit	Persentase nyamuk betina yang mengandung sporozoit (nyamuk infeksi)	Rasio
8	Uji Elisa pakan darah	Deteksi IgG dari darah yang diisap oleh nyamuk dengan menggunakan anti IgG manusia.	Rasio
9	Pakan darah	Jenis darah yang diisap oleh nyamuk, berupa darah manusia atau binatang	Nominal
10	HBI	Persentase nyamuk betina yang mengisap darah manusia.	Rasio
11	Unfed	Kondisi perut nyamuk betina tanpa darah	Ordinal
12	Bloodfed	Kondisi perut nyamuk betina penuh darah, mengisi 6 segmen pada bagian ventral perut dan 5 segmen pada bagian dorsal perut.	Ordinal
13	Half gravid	Kondisi perut nyamuk betina berisi separuh darah, mengisi 3-4 segmen perut bagian ventral dan 1-2 segmen perut bagian dorsal.	Ordinal
14	Grafid	Kondisi perut nyamuk betina berisi sebagian kecil darah pada permukaan ventral dan ovarium mengisi sebagian besar segmen perut.	Ordinal
15	Parous	Nyamuk betina yang sudah pernah bertelur, dilihat dengan pembedahan ovarium.	Nominal
16	Nulliparous	Nyamuk betina yang belum pernah bertelur, dilihat dengan pembedahan ovarium.	Nominal

I. Cara Kerja:

I.1. Bahan Penelitian

I.1.1. Sampel *An. maculatus*

Sampel nyamuk dewasa betina yang dikoleksi dari lapangan digunakan sebagai bahan untuk isolasi DNA. Sampel diambil dari berbagai daerah di Indonesia seperti tercantum dalam C.1. Cara koleksi nyamuk dewasa (ataupun jentik) sesuai dengan standar WHO, 1992 dan 1994. Pengambilan sampel dilakukan di daerah/desa yang dapat mewakili daerah endemis dan non endemis masing-masing dengan jarak geografis berbeda.

I.1.2. Bahan Kimia

I.1.2.1. PCR

Bahan kimia yang digunakan adalah : buffer lisis, Proteinase K, FATG1 dan FATG2 (untuk melisiskan sel), bufer pencuci, bufer elusi, etanol absolut, PCR Master mix (buffer, DNA polymerase, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, MgCl₂) primer kit, buffer TAE, akuabides, agarose, loading dye, marker DNA, dan ethidium bromid (EtBr).

I.1.2.2. Elisa sporozoit

Bahan kimia yang diperlukan adalah: PBS (pH 4, Dulbecco' 10 x Sigma Chem.D5773), Blocking buffer, casein, ABTS peroksidase substrat, NP-40, Tween 20, *Mab Pf* and *Mab Pv capture, peroxidase conjugated Mab Pf* dan *Pv*, kontrol positif (*Pf-PC* dan *PV210-PC*) dan bahan-bahan lain untuk penangkapan nyamuk

I.1.2.3. Elisa pakan darah

Bahan kimia yang digunakan adalah: larutan anti IgG manusia (*affinity purified antibody to human IgG H+L*), substrat ABTS, konjugat peroksidase (*peroxidase labelled affinity purified antibody to human IgG H+L*), *Human Immunoglobulin calibrator*, PBS pH 7,4, PBS-Tween20, 2,5 N HCL dan bahan-bahan lain untuk penangkapan nyamuk

I.2. Alat

I.2.1. Koleksi nyamuk di lapangan

Alat yang digunakan adalah: senter, aspirator untuk menangkap nyamuk, paper cup tempat menyimpan sementara nyamuk yang masih hidup, kapas yang dibasahi dengan

larutan sukrosa 10%, karet gelang, kain kasa, handuk lembab, gunting, silica gel, tabung eppendorf, kotak nyamuk, thermohyrometer untuk mengukur suhu maksimum-minimum dan kelembaban relatif, lux meter untuk mengukur intensitas cahaya pada saat koleksi jentik di tempat perkembangbiakan nyamuk.

1.2.2. Identifikasi nyamuk

Proses identifikasi nyamuk memerlukan alat-alat antara lain: jarum seksi, kertas saring, gelas obyek, pinset, pipet Pasteur, loupe, *dissecting* dan *compound microscope*.

1.2.3. PCR

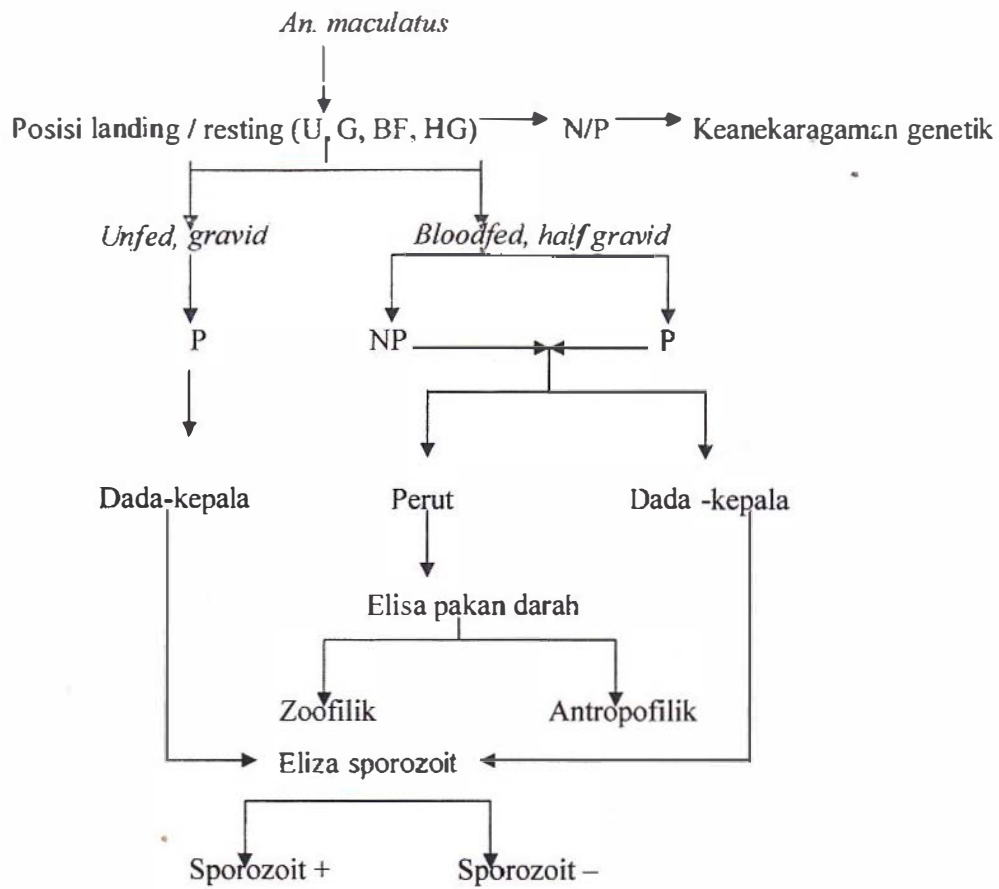
Alat-alat yang digunakan adalah sentrifuge, *heating block*, *thermocycler*, *refrigerator*, *freezer* suhu -80°C dan -20°C , peralatan untuk elektroforesis (gel caster, chamber elektroforesis, power supply), *vortex mixer*, *oven microwave*, pipet mikro dengan kisaran ukuran 0,5-10 μl , 10-50 μl , 40-100 μl dan 200-1000 μl , tabung PCR 0,2 ml, tabung sentrifuge 0,5 ml dan 1,5 ml, tips ukuran 0,1-10 μl , 1-100 μl , 50-1000 μl dan perangkat *gel documentation* lengkap dengan foto.

1.2.4. Elisa untuk deteksi sporozoit dan pakan darah pada nyamuk

Untuk Elisa sporozoit diperlukan alat-alat dan bahan-bahan: pisau pemotong nyamuk, *refrigerator*, inkubator, *microplate reader*, pinset, pipet Pasteur, pipet mikro dengan kisaran ukuran 0,5-10 μl , 10-50 μl , 40-100 μl dan 200-1000 μl , pHmeter, penggerus nyamuk (*electric grinder*), tabung eppendorf, mikroplat dengan dasar bentuk U, stoples, botol kecil dan tabung konikel.

Untuk Elisa pakan darah diperlukan peralatan dan bahan sebagai berikut: pisau pemotong nyamuk, refrigerator, inkubator, microplate reader, pinset, pipet Pasteur, pipet mikro dengan kisaran ukuran 0,5-10 μl , 10-50 μl , 40-100 μl dan 200-1000 μl , pHmeter, kertas Whatman, kertas label, alat tulis, tabung eppendorf, mikroplat dengan dasar rata, stoples, botol kecil dan tabung konikel.

J. Skema alur pelaksanaan penelitian



Keterangan:

NP : Nulli parous

P : Parous

U : *Unfed*

G : *Gravid*

BF : *Bloodfed*

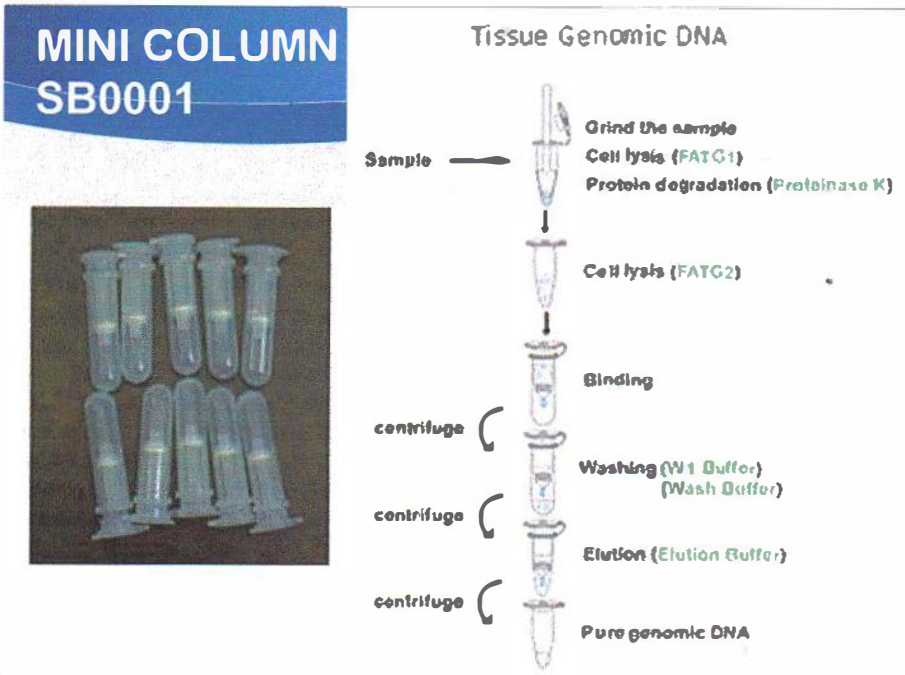
HG : *Half gravid*

K. Analisis sampel di laboratorium

K.1. Ragam genetik *An. maculatus*

K.1.1. Ekstraksi DNA (Genekam Biotechnology, 2010)

Ekstraksi DNA nyamuk *An. maculatus* dilakukan dilakukan menurut prosedur dari Genekam Biotechnology AG, Germany (2010), yaitu menggunakan metode kolom mini (Gambar 3). Sampel nyamuk *An. maculatus* secara individual dihancurkan dengan 300 ul bufer lisis (reagen di tabung A), kemudian ditambahkan kedalamnya 30 ul Proteinase-K (reagen di tabung K). Diinkubasikan pada 56°C selama 1 jam atau semalam, dilakukan vortexing. Diinkubasikan lagi pada suhu 70°C selama 10 menit. Tambahkan 300 ul ethanol dan dilakukan vortexing. Sentrifus dengan kecepatan 11.000 G selama 1 menit Selanjutnya sebanyak 600 ul larutan supernatan yang sudah disiapkan tersebut di atas diambil (usahakan tidak menyentuh endapan) dan dimasukkan kedalam kolom mini yang sudah ditaruh di atas tabung koleksi (2 ml). Centrifuge selama satu menit pada 11000 G. Angkat kolom mini, buang cairan yang tertampung dalam tabung 2 ml lalu letakkan kembali kolom mini di tabung 2 ml tersebut Buang cairan disaring. Tambahkan cairan yang tersisa ke kolom mini dan disentrifuge. Angkat kolom mini, buang cairan yang tertampung dalam tabung 2 ml lalu letakkan kembali kolom mini di tabung 2 ml. Ditambahkan 400 ul buffer pencuci 1 (tabung B) ke kolom mini. Disentrifuge lagi dan membuang cairan ditabung koleksi. Ditambahkan 500 ul buffer pencuci 2 (tabung C) ke kolom mini. Disentrifuge dan membuang cairan ke tabung koleksi. Centrifuge kolom mini untuk melakukan pengeringan. Buang tabung koleksi yang digunakan. Selanjutnya kolom mini (bagian filter) ditempatkan dalam tabung koleksi baru 1,5 ml. Ditambahkan 100 ul buffer elusi (tabung E) ke kolom mini dan dihangatkan pada 70°C. Disimpan pada suhu kamar selama satu menit. Centrifuge pada 11000 G selama satu menit. Cairan yang ada dalam tabung koleksi ini merupakan DNA yang terisolasi dan dapat digunakan untuk melakukan uji yang berbeda. Selanjutnya DNA disimpan pada suhu -20°C untuk aplikasi jangka panjang.



Gambar 3. Prosedur ekstraksi DNA dengan menggunakan metode kolom mini.

K.1.2. Amplifikasi genom ITS2

Genom ITS2 diamplifikasi menggunakan PCR master mix yang telah berisi PCR buffer, DNA polymerase, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dan MgCl₂, sehingga tinggal menambahkan DNA template dan primer dengan komposisi seperti pada Tabel 2:

Tabel 2. Komposisi reaksi PCR genom ITS2 *An. maculatus*

Larutan stok	Volume (µl)
Master mix (Genekam)	10
DNA	2
1-2 pmol Primer (F dan R)	2
dH ₂ O	Hingga 20

Primer yang digunakan adalah *forward primer* yang komplementer dengan 5,8 S untuk semua spesies dari *An. maculatus* group dan *reverse primer* yang berbeda-beda yang komplementer dengan 28S untuk masing-masing spesies. Primer yang akan digunakan dalam penelitian adalah contoh-contoh primer yang pernah digunakan untuk mendeteksi

nyamuk yang tergabung dalam *An. maculatus* group di Cina (Ma *et al*, 2006) dan Thailand (Walton *et al*, 2007) sebagai berikut:

Tabel 3. Primer-primer untuk mendeteksi *An. maculatus* group

Primer	Sekuen	Panjang (bp)
5,8F	5'-TGTGAACTGCAGGACACATG-3'	20
Mac	5'-GACGGTCAGTCTGGTAAAGT-3'	20
Pseu	5'-GCCCGGGGTGTCAAACAG-3'	19
Saw	5'-ACGGTCCCGCATCAGGTGC-3'	19
Drav	5'-GCCTACTTTGAGCGAGACCA-3'	20
Will	5'-CCATAGTGTACCACCATTCG-3'	20

Keterangan: Mac = untuk mendeteksi *An. maculatus*

Pseu = untuk mendeteksi *An. pseudowillmori*

Saw = untuk mendeteksi *An. sawadwongporni*

Drav = untuk mendeteksi *An. dravidicus*

Will = untuk mendeteksi *An. willmori*

Siklus temperatur PCR yang digunakan (atau sesuai dengan hasil optimasi) adalah: denaturasi awal suhu 94°C selama 5 menit dan denaturasi siklus suhu 94°C selama 1 menit, annealing suhu 61°C selama 1/2 menit, polimerisasi siklus suhu 72°C selama 1/2 menit dan polimerisasi akhir suhu 72°C selama 5 menit untuk menghindari adanya DNA yang belum sempurna teramplifikasi. Total siklus yang digunakan adalah 35 siklus. Hasil produk PCR kemudian dielektroforesis (Walton *et al*, 2007).

K.1.3. Elektroforesis

Hasil amplifikasi DNA dipisahkan berdasarkan ukuran pasangan basanya.

A. Pembuatan gel agaros

Proses dimulai dengan membuat bufer elektroforesis TAE 1x, sebanyak 1 liter, dengan melarutkan 100 ml TAE 10x ditambah 900 ml akuabides. Dilanjutkan dengan membuat gel agaros 1%, dengan melarutkan 1 gr agaros dengan 100 ml TAE 1x, dimasak pada microwave atau hotplate dan stirrer sampai larutan menjadi bening dan mendidih. Gel dituang pada gel caster dan disiapkan sisir (comb) untuk

membuat sumuran, dibiarkan hingga terbentuk agar. Gel diletakkan pada chamber elektroforesis dengan posisi sumuran pada muatan – (warna hitam). Selanjutnya dituangkan TAE 1x sehingga gel terendam dalam chamber elektroforesis (tidak melebihi garis batas maksimum bufer).

B. Loading sampel dan marker

Parafilm direkatkan pada wadah mendatar sebagai tempat melakukan pencampuran sampel yang akan diloading. Sebanyak 2 μ l loading dye dipipet diatas parafilm sejumlah sampel yang akan diloading. Dicampurkan antara loading dye dan 5 μ l sampel. Marker DNA dibuat dengan mencampurkan 4 μ l TAE + 1 μ l marker 5X + 1 μ l loading dye (perbandingan 4:1:1). Loading 5 μ l marker DNA pada sumur paling kiri dan atau paling kanan.

C. Running sampel

Chamber elektroforesis ditutup, kabel merah (+) dipasang pada lubang merah dan kabel hitam pada lubang hitam yang terdapat pada power supply (power pac). Tombol ON ditekan, set waktu 30 menit, voltage 100V (setting dapat dirubah sesuai dengan berat sampel yang akan di run yang dapat dilihat dari posisi warna biru dari masing-masing sampel saat running). Tekan tombol RUN.

D. Dokumentasi dengan GelDoc (Biorad).

Membuat larutan EtBr 1x dengan mencampurkan 500 ml air ledeng dan 5 μ l EtBr pada baki plastik. Gel direndam pada larutan EtBr tersebut dalam kondisi gelap selama \pm 10 menit. Gel dicuci dengan air mengalir (air kran) selama 5 menit, selanjutnya gel diletakkan pada GelDoc. Membuka software quantity one atau image lab pada komputer, selanjutnya tekan File>GelDocXR>Epiwhite, untuk melihat posisi gel apakah sudah tepat di tengah kamera. Tekan TransUV>Expose, tunggu sampai muncul band/pita warna putih. Tekan Freeze atau Auto Expose sampai mendapatkan pencahayaan yang tepat, save file quantity one atau image lab (.sds) atau export ke Jpeg.

K.1.4. Sekuensing hasil PCR

Sekuensing fragmen gen hasil PCR dilakukan dengan metode *Dye terminator cycle sequencing* pada *sequencer AB3130 genetic analyser 4 kapiler*. Seluruh proses akan dilakukan di laboratorium rekayasa terapan, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT), Serpong, Tangerang, Banten.

K.1.5. Analisis hasil

Hasil penelitian akan dianalisis secara deskriptif. Sekuen nukleotida pada daerah ITS2 sampel *An. maculatus* dari berbagai daerah di Indonesia hasil sekuensing dibandingkan dengan sekuen *An. maculatus* dari negara lain seperti China, Thailand, Malaysia, Kamboja, dan Filipina. Hasil sekuen nukleotida diposisikan (aligned) menggunakan *Clustal X 1.81* dan *BioEdit 5.0.6*. Untuk selanjutnya, dengan menggunakan *Genedoc 2.6.002*, urutan nukleotida yang telah diposisikan diubah menjadi protein dan divisualisasikan dalam bentuk urutan asam amino. Penomoran nukleotida maupun asam amino dilakukan dengan mengikuti sistem penomoran yang mengacu pada beberapa penelitian sebelumnya.

Analisis filogenetik dilakukan dengan analisis bootstrap replikasi 1000 menggunakan program *Clustal X 1.81* yang kemudian divisualisasikan dengan program *NJPlot*. Hubungan filogenetik ditentukan/disusun dengan *maximum-likelihood (ML)*, *maximum parsimony (MP)* dan *neighbour joining methods*. Parameter jarak Kimura2 dengan ratio transisi/transversi 2 digunakan untuk konstruksi pohon filogenetik menggunakan *neighbour joining methods*. Semua program yang digunakan tergabung dalam *PHYLIP 3.66* (Tuimala, 2006).

K.2. Inkriminasi vektor malaria dengan teknik ELISA (Wirtz, 2009)

Untuk mendeteksi adanya sporozoit pada nyamuk *An maculatus* yang memegang peranan sebagai *agent* malaria dilakukan dengan cara sebagai berikut:

a. Persiapan nyamuk yang diuji

Nyamuk yang diuji adalah nyamuk betina yang berhasil ditangkap baik dengan umpan badan maupun nyamuk istirahat. Nyamuk yang telah diidentifikasi, dipotong menjadi dua bagian dengan menggunakan bantuan pisau dan jarum. Selanjutnya kepala dan

dada nyamuk disimpan di dalam tabung eppendorf. Kemudian disimpan di dalam stoples yang telah diisi dengan *silica gel*. Masing-masing tabung diberi label species nyamuk, lokasi, tanggal penangkapan dan macam penangkapan.

b. Persiapan larutan untuk ELISA sporozoit

Untuk uji ELISA sporozoit *Plasmodium* pada nyamuk, dipersiapkan larutan-larutan sebagai berikut:

- PBS pH 7,4 yang disimpan pada suhu 4°C, diencerkan dengan akuades.
- *Blocking Buffer* (BB) terbuat dari casein. BB casein dibuat dengan komposisi 0,5% casein (2,5 g); 0,1 N NaOH (50,00 ml) dan PBS pH 7,4 (450 ml). Suspensi casein dalam 0,1 N NaOH dididihkan, setelah larut ditambahkan PBS secara perlahan dan dibiarkan sampai dingin, pH diatur dengan menambah HCl.
- *Blocking Buffer/ Nonidet P-40* (BB/NP-40). Larutan ini dipakai untuk menggerus nyamuk yang diuji, terdiri 1 ml BB + 5 µl NP-40, keduanya dicampur sampai NP-40 larut dalam BB.
- Larutan pencuci (PBS/Tween 20). Dimasukkan 0,5 ml Tween 20 ke dalam 1 liter PBS, dicampur sampai homogen.
- Larutan substrat, terdiri dari campuran ABTS dan Hidrogen peroksida dengan perbandingan 1:1 yang digunakan 100 µl/ sumuran
- Kontrol positif, merupakan campuran protein CS rekombinan yang dimurnikan dari *P. falcifarum* (Pf-PC) dan *P. vivax* (Pv10-PC).
- Kontrol negatif. Nyamuk yang dipakai sebagai kontrol negatif adalah nyamuk *Anopheles* hasil kolonisasi laboratorium yang tidak terinfeksi. Nyamuk digerus dalam 50 µl BB/NP-40, diencerkan dengan 200 µl BB/NP-40 (volume total 250 µl), dimasukkan 50 µl/ sumuran kontrol negatif.
- Antibodi monoklonal anti protein CS *P. falcifarum* 0,4 µg/ vial yang diencerkan 1 : 1 dengan akuades (*Mab P.f*) dan *P. vivax* 0,5 µg/ vial (*Mab P.v-210*) serta *peroxidase-conjugated Mab P.f* 0,25 µg dan *peroxidase-conjugated Mab P.v-210* 0,2 µg.

c. Persiapan sampel/ penghancuran nyamuk

Nyamuk yang diuji satu persatu dimasukkan dalam tabung eppendorf berukuran 1,5 ml yang berisi campuran 50 μ l larutan BB dan NP-40. Kemudian nyamuk digerus/ dihancurkan dengan alat penumbuk (pestel) yang digerakkan secara otomatis menggunakan *electric grinder*. Setelah nyamuk hancur, ditambahkan 2 x 125 μ l larutan BB, sehingga volume campuran bahan dalam masing-masing tabung eppendorf menjadi 300 μ l. Homogenat nyamuk disimpan pada suhu -20°C sampai saatnya diuji. Pengujian sporozoit dilakukan pada sumuran mikroplat yang terpisah berdasarkan jenis *Plasmodium* yang digunakan.

d. Uji ELISA sporozoit *Plasmodium* pada nyamuk *An. maculatus*

- Coating mikroplat dengan 50 μ l larutan antibodi monoklonal (*Mab*), dipisahkan berdasarkan species sporozoit yang diuji, yaitu *Mab P.f* 0,1 μ g/ 50 μ l PBS dan *Mab P.v* 210 0,025 μ l/ 50 μ l PBS. Plat ditutup dengan *aluminium* foil dan diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit.
- Sumuran diaspirasi dan diisi dengan BB 200 μ l/sumuran, inkubasi selama 60 menit (tertutup).
- Sumuran diaspirasi, 50 μ l homogenat nyamuk dimasukkan ke dalam sumuran, demikian juga untuk kontrol positif dan negatif. Inkubasi selama 2 jam (tertutup). Selanjutnya sumuran dicuci dengan PBS/Tween 20 sebanyak 2 kali.
- Konjugat (larutan *peroxidase-conjugated Mab*) dimasukkan ke dalam masing-masing sumuran (0,050 μ g/50 μ l BB untuk *Peroxidase-conjugated Mab P.f* dan *Peroxidase-conjugated Mab P.v-210*). Inkubasi 1 jam (tertutup). Selanjutnya sumuran dicuci 3 kali dengan PBS/ Tween 20.
- 100 μ l larutan substrat (campuran ABTS dan H₂O₂) dimasukkan ke dalam masing-masing sumuran, ditutup, diamati hasilnya setelah 30 menit.
- Hasil positif secara visual akan terlihat menunjukkan warna hijau dan secara kuantitatif dapat dibaca dengan ELISA reader pada panjang gelombang 405 nm untuk mengetahui nilai absorben (*Absorbance value /A*). Intensitas warna sebanding dengan kadar antigen CS yang terdapat dalam sampel. Sampel dinyatakan positif apabila AV menunjukkan ≥ 2 kali rata-rata kontrol negatif.

- Angka sporozoit (%) dihitung berdasarkan jumlah nyamuk positif sporozoit dibagi dengan jumlah nyamuk yang diperiksa.

K.3. Identifikasi pakan darah pada nyamuk dengan teknik Elisa (Wirtz, 1987; Small, 1998)

a. Persiapan coating mikroplat

- Menambahkan 100 μ l larutan anti IgG manusia ke dalam sumuran.
- Mikroplat ditutup dengan aluminum foil, inkubasi selama 24 jam pada suhu 4°C
- Sumuran diaspirasi (dikosongkan), 200 μ l BB ditambahkan ke dalam sumuran, inkubasi 1 jam (tertutup).
- Sumuran diaspirasi, plat ditepuk-tepukkan pada tisu untuk menghilangkan sisa-sisa buffer.

b. Persiapan sampel

- Memencet perut nyamuk yang berisi darah ke kertas Whatman yang dibagi sesuai jumlah yang ditentukan. Beri kode, nomor, tanggal koleksi, 1 kertas untuk 1 spesies.
- Apabila akan diuji, kertas filter yang berisi apusan darah dimasukkan dalam 1 ml PBS, minimal 1 jam sebelum diuji atau dapat disimpan dalam keadaan beku untuk pengujian lebih lanjut.
- 100 μ l homogenat dimasukkan ke dalam sumuran sudah dicoating dengan anti IgG manusia dan di blok dengan BB, dengan cara yang sama dikerjakan pula untuk kontrol positif dan negatif.
- Untuk kontrol positif, tambahkan 100 μ l IgG manusia.
- Kontrol negatif menggunakan *An. maculatus* hasil koloni laboratorium yang belum mengisap darah (baru muncul dari pupa).
- Mikroplat ditutup dan diinkubasikan pada suhu kamar selama 2 jam.
- Diaspirasi dan dicuci dengan PBS/Tween 20 dua kali, ditepuk-tepukkan pada tisu.

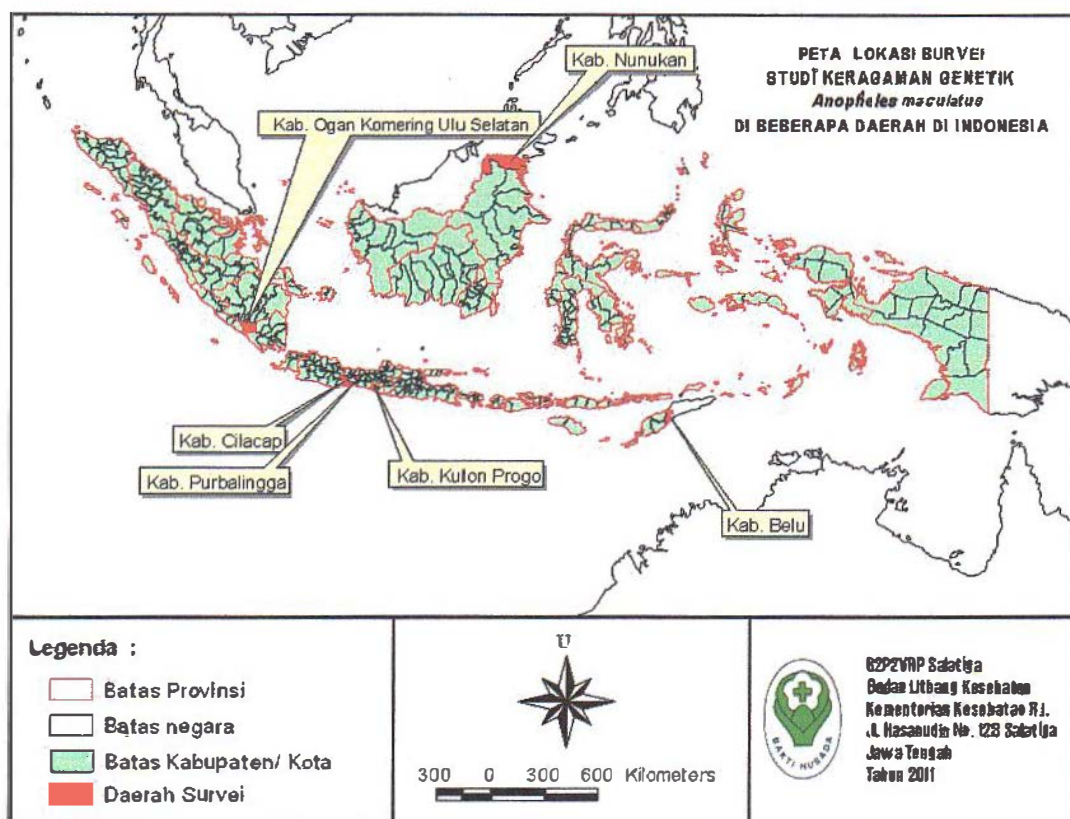
- Tambahkan 100 μ l konjugat peroksidase anti human IgG ke sumuran, inkubasi 1 jam.
- Diaspirasi dan dicuci dengan PBS/Tween 20 tiga kali.
- Tambahkan 100 μ l larutan substrat ABTS. Substrat disiapkan dengan cara mencampurkan ABTS dan H₂O₂ (1:1). Plat ditutup dan ditempatkan di ruang gelap selama 20 menit.
- Tambahkan 1 tetes 2,5 N HCl untuk menghentikan reaksi (Small, 1998; Wirtz, 1987).

c. Pembacaan hasil

- Kontrol positif menunjukkan warna hijau, kontrol negatif tidak berwarna. Selanjutnya penilaian hasil dilakukan secara kuantitatif dengan membaca nilai absorbance (AV) pada Elisa reader pada panjang gelombang 405 nm setelah 20 menit.
- Masing-masing darah yang diuji harus memberikan 1 hasil positif untuk inang yang menjadi sumber pakan darah (manusia atau binatang) dan hasil negatif tidak menunjukkan reaksi silang antara manusia dan binatang.
- *Human Blood Index* (%) dihitung dari jumlah nyamuk yang positif mengisap darah manusia dibagi dengan jumlah nyamuk yang diperiksa.

XIV. HASIL PENELITIAN

A. Daerah penelitian



Gambar 4. Peta lokasi survei *An. maculatus* di beberapa daerah di Indonesia

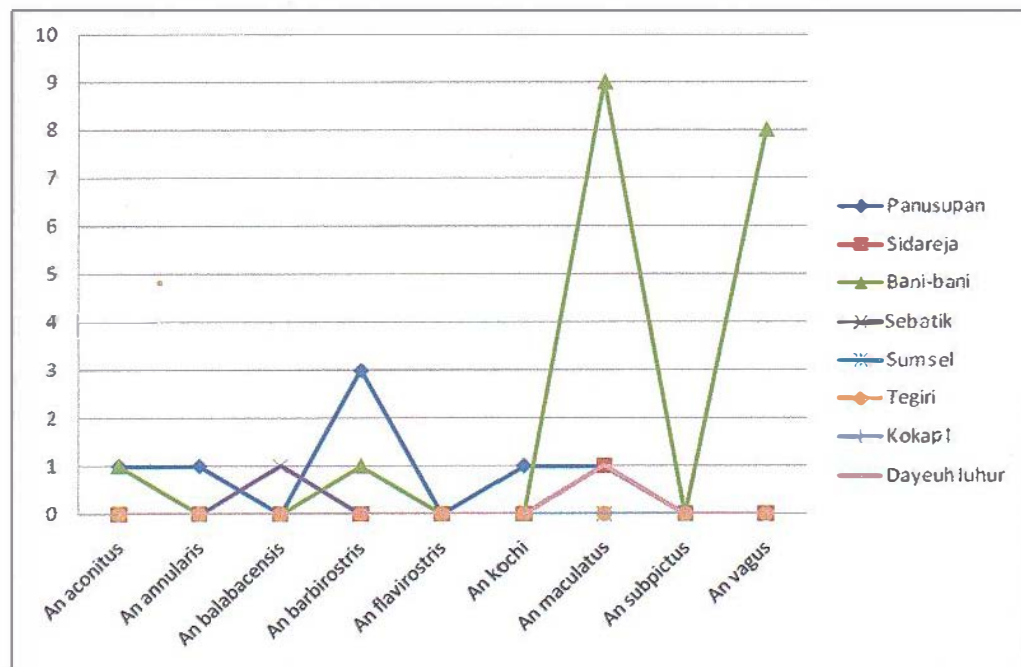
Daerah penelitian dapat dilihat pada Gambar 4 yaitu Kabupaten Purbalingga, Cilacap, Kulonprogo, Belu, OKU Selatan, dan Nunukan. Lokasi tempat pengambilan sampel *An. maculatus* secara rinci sudah dideskripsikan berdasarkan beberapa kriteria seperti yang tercantum pada Tabel 1 (XIII bagian B)

B. Fauna nyamuk *Anopheles spp*

Fauna nyamuk *Anopheles spp* yang tertangkap di berbagai lokasi dengan berbagai metode penangkapan disajikan pada Tabel 4-7, dan secara visual pada Gambar 5-8 sebagai berikut:

Tabel 4. Jumlah nyamuk *Anopheles* spp yang tertangkap hinggap pada manusia di dalam rumah

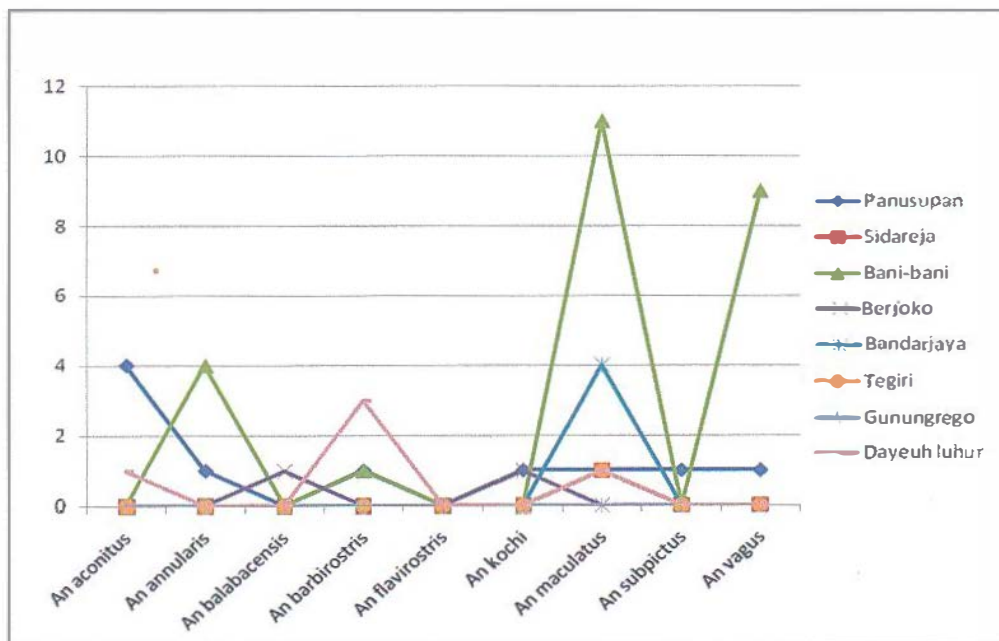
Spesies	Lokasi								Jumlah
	Panusupan	Sidareja	Bani-bani	Berjoko	Bandar-jaya	Tegiri	Gunung rego	Dayeuh luhur	
<i>An aconitus</i>	1	0	1	0	0	0	0	0	2
<i>An annularis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>An balabacensis</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>An barbirostris</i>	3	0	1	0	0	0	0	0	4
<i>An flavirostris</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>An kochi</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>An maculatus</i>	1	1	9	0	0	0	0	1	12
<i>An subpictus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>An vagus</i>	0	0	8	0	0	0	0	0	8



Gambar 5. *Anopheles* spp yang tertangkap hinggap pada manusia di dalam rumah

Tabel 5. Jumlah nyamuk *Anopheles* spp yang tertangkap hinggap pada manusia di luar rumah

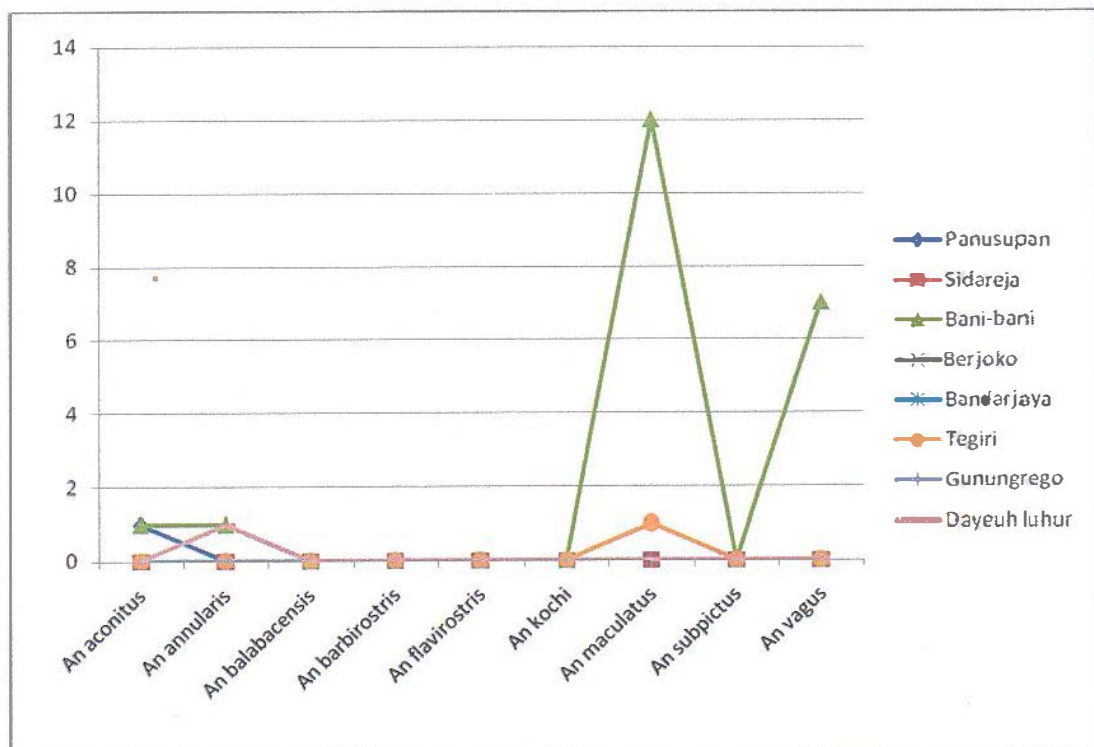
Spesies	Lokasi								Jumlah
	Panusupan	Sidareja	Bani-bani	Berjoko	Bandarjaya	Tegiri	Gunungrego	Dayeuhluhur	
<i>An aconitus</i>	4	0	0	0	0	0	0	1	5
<i>An annularis</i>	1	0	4	0	0	0	0	0	5
<i>An balabacensis</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>An barbirostris</i>	1	0	1	0	0	0	0	3	5
<i>An flavirostris</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>An kochi</i>	1	0	0	1	0	0	0	0	2
<i>An maculatus</i>	1	1	11	0	4	1	0	1	19
<i>An subpictus</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>An vagus</i>	1	0	9	0	0	0	0	0	10



Gambar 6. *Anopheles* spp yang tertangkap hinggap pada manusia di luar rumah

Tabel 6. Jumlah nyamuk *Anopheles* spp yang tertangkap istirahat di dalam rumah

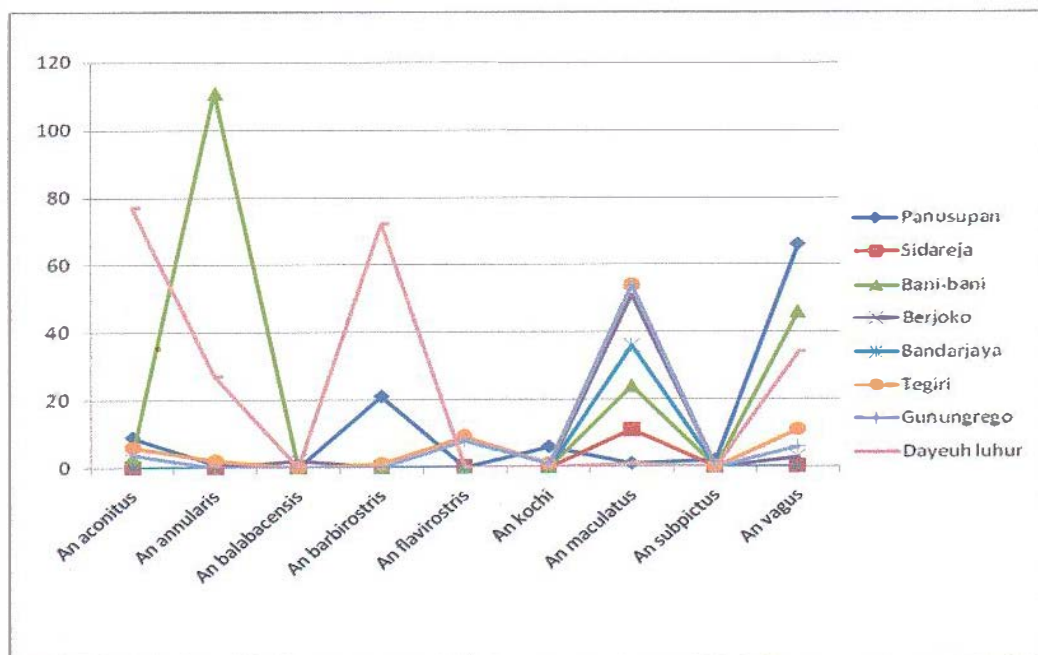
Spesies	Lokasi								Jumlah
	Panusupan	Sida-reja	Bani-bani	Berjoko	Bandarjaya	Tegiri	Gunungrego	Dayeuhluhur	
<i>An aconitus</i>	1	0	1	0	0	0	0	0	2
<i>An annularis</i>	0	0	1	0	0	0	0	1	2
<i>An balabacensis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>An barbirostris</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>An flavirostris</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>An kochi</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>An maculatus</i>	0	0	12	0	0	1	0	0	13
<i>An subpictus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>An vagus</i>	0	0	7	0	0	0	0	0	7



Gambar 7. *Anopheles* spp yang tertangkap istirahat di dalam rumah

Tabel 7. Jumlah nyamuk *Anopheles* spp yang tertangkap istirahat di sekitar kandang / tambatan temak.

Spesies	Lokasi								Jumlah
	Panusupan	Sidareja	Bani-bani	Berjoko	Bandarjaya	Tegiri	Gunungrego	Dayeuhluhur	
<i>An aconitus</i>	9	0	3	0	0	6	4	77	99
<i>An annularis</i>	1	0	111	0	0	2	0	27	141
<i>An balabacensis</i>	0	0	0	2	0	0	0	0	2
<i>An barbirostris</i>	21	0	0	0	0	1	0	72	94
<i>An. flavirostris</i>	0	0	0	0	0	9	8	0	17
<i>An kochi</i>	6	0	0	0	0	1	1	0	8
<i>An maculatus</i>	1	11	24	51	36	54	54	1	232
<i>An subpictus</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	2
<i>An vagus</i>	66	0	46	3	0	11	6	34	166



Gambar 8. *Anopheles* spp yang tertangkap istirahat di sekitar kandang/tambatan temak

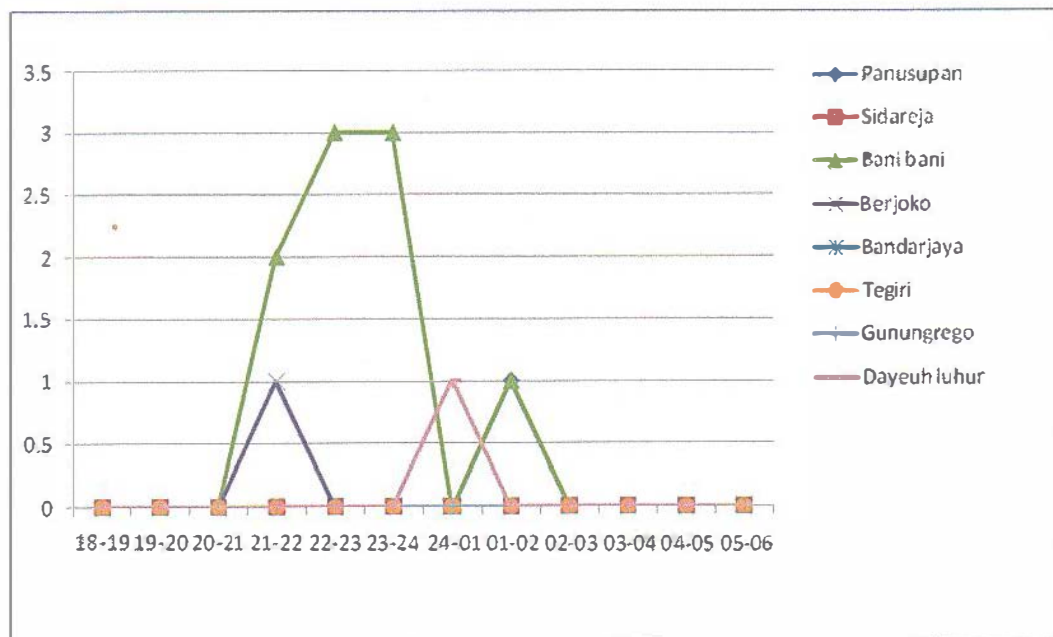
Berdasarkan hasil penangkapan nyamuk *Anopheles* spp di 6 lokasi penelitian tampak bahwa *An. maculatus* lebih dominan jumlahnya dibandingkan dengan spesies yang lain. *An. maculatus* tertangkap hinggap pada manusia di dalam rumah pada malam hari sebanyak 12 ekor (Tabel 4) dan di luar rumah sebanyak 19 ekor (Tabel 5). *An. maculatus* tertangkap istirahat di dalam rumah pada malam hari sebanyak 13 ekor (Tabel 6) dan di sekitar kandang/tambatan temak di luar rumah sebanyak 232 ekor (Tabel 7). Hasil tersebut

menggambarkan bahwa *An. maculatus* cenderung mencari makan atau menghisap darah di luar rumah (lebih bersifat zoofagik) daripada di dalam rumah (endofagik).

C. Kompetensi vektorial *An. maculatus*

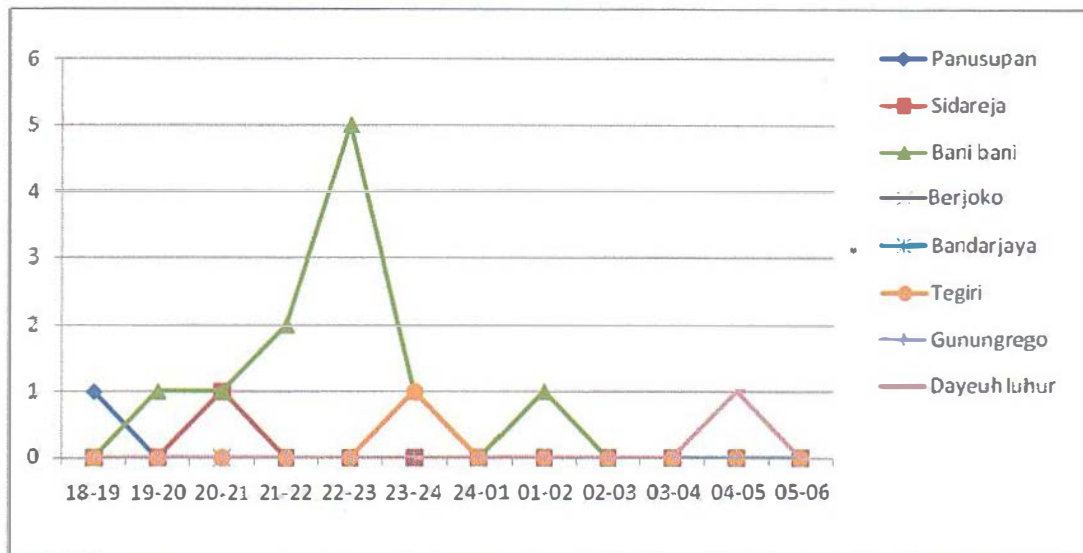
Kompetensi vektorial *An. maculatus* menyangkut kepadatan, angka paritas yang mencerminkan rentang umur nyamuk, kerentanan nyamuk terhadap parasit (*P. falciparum* dan atau *P. vivax*), dan sifat antropofilik atau zoofilik. Terlebih dulu akan diinformasikan fluktuasi *An. maculatus* berdasarkan lokasi dan periode waktu penangkapan.

Pada Gambar 9 terlihat bahwa *An. maculatus* aktif menghisap darah manusia di dalam rumah berturut-turut di Panusupan (Purbalingga) pada jam 21-22, Bani-bani (NTT) pada jam 22-24, dan Dayehluhur (Cilacap) pada jam 01-02.



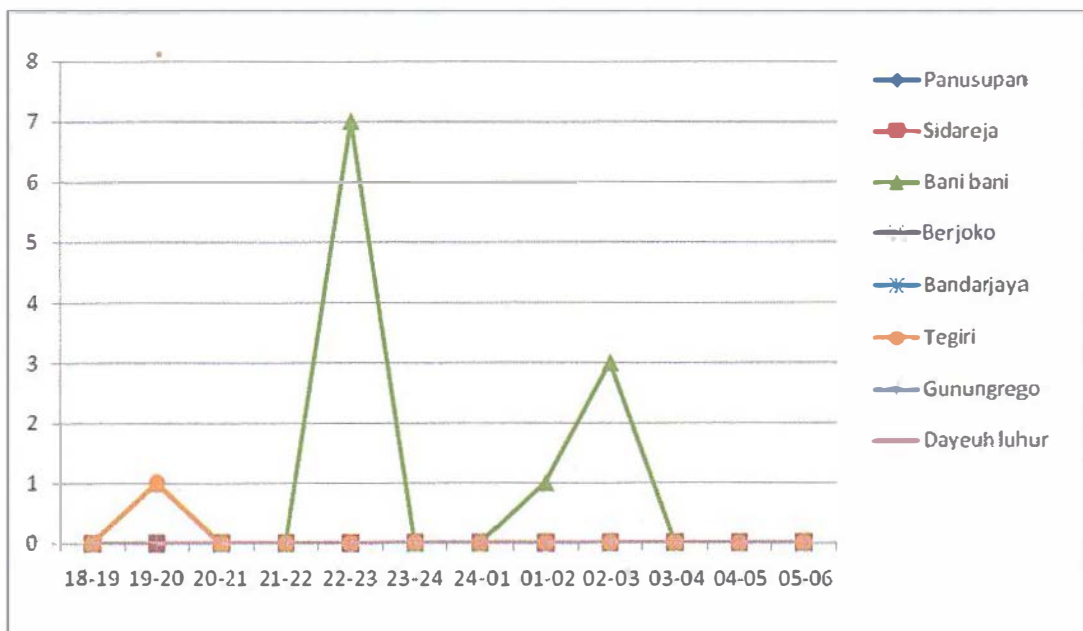
Gambar 9. Fluktuasi *An. maculatus* yang hinggap pada manusia di dalam rumah menurut lokasi dan waktu penangkapan

Hasil penangkapan *An. maculatus* yang hinggap pada manusia di luar rumah terlihat bahwa *An. maculatus* aktif pada jam 18-19 di Panusupan (1 ekor), 20-21 di Sidareja (1 ekor), 22-23 di Bani-bani (5 ekor), 23-24 di Tegiri (1 ekor), dan 04-05 di Dayeuhluhur (1 ekor)(Gambar 10)

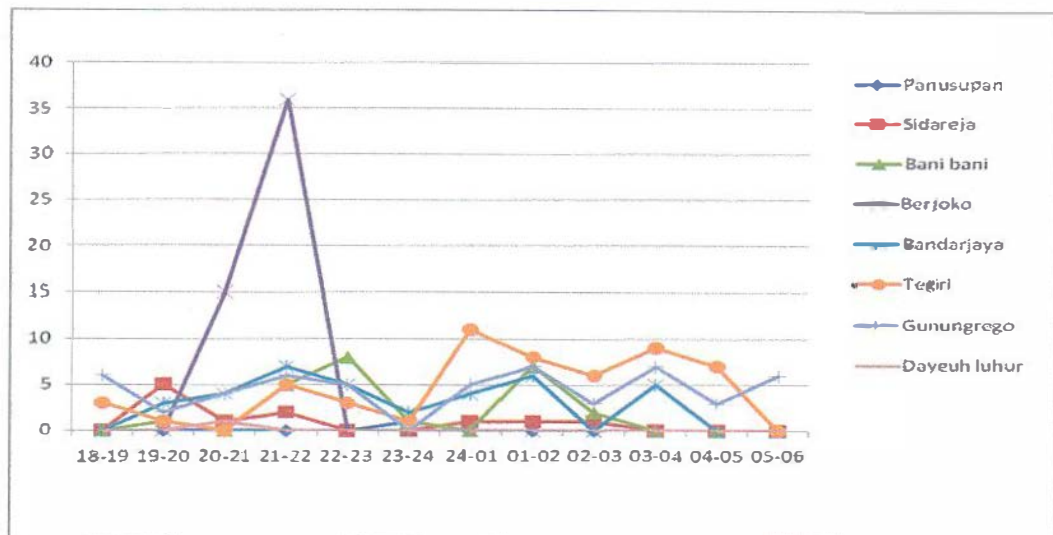


Gambar 10. Fluktuasi *An. maculatus* yang hinggap pada manusia di luar rumah menurut lokasi dan waktu penangkapan

Pada Gambar 11 terlihat bahwa *An. maculatus* paling banyak tertangkap istirahat di dalam rumah pada jam 19-20 di Tegiri (1 ekor), dan 22-23 di Bani-bani (7 ekor).



Gambar 11. Fluktuasi *An. maculatus* yang istirahat di dalam rumah menurut lokasi dan waktu penangkapan



Gambar 12. Fluktuasi *An. maculatus* yang istirahat di sekitar kandang/tambatan temak menurut lokasi dan waktu penangkapan

Pada Gambar 12 terlihat bahwa *An. maculatus* paling banyak tertangkap istirahat di sekitar kandang/tambatan temak pada jam 23-24 di Panusupan (1 ekor), 19-20 di Sidareja (5 ekor), 22-23 di Bani-bani (8 ekor), 21-22 di Berjoko (36 ekor), 21-22 di Bandarjaya (7 ekor), 24-01 di Tegiri (11 ekor), 01-02 dan 03-04 di Gunungregu (masing-masing 7 ekor), dan jam 20-21 di Dayeuhluhur (1 ekor).

C.1. Kepadatan nyamuk *An. maculatus*

Tabel 8. Kepadatan nyamuk *An. maculatus* menurut lokasi dan metode penangkapan

Lokasi	Metode penangkapan							
	HMD		HML		IDR		ISKT	
	Jumlah	MHD	Jumlah	MHD	Jumlah	MHD	Jumlah	MHD
Panusupan	1	0.03	1	0.03	0	0.00	1	0.12
Sidareja	0	0.00	1	0.03	0	0.00	11	1.37
Bani bani	9	0.28	11	0.34	12	1.50	24	3.00
Berjoko	1	0.06	0	0.00	0	0.00	51	12.75
Bandarjaya	0	0.00	4	0.26	0	0.00	36	9.00
Tegiri	0	0.00	1	0.06	1	0.25	54	13.50
Gunungregu	0	0.00	0	0.00	0	0.00	54	13.50
Dayeuh luhur	1	0.06	1	0.06	0	0.00	1	0.25

Keterangan: HMD = Hinggap pda manusia di dalam rumah, HML = Hinggap pda manusia di luar rumah, IDR = Istirahat di dalam rumah, ISKT = Istirahat sekitar kandang/tambatan temak, MHD = Man hour Density (kepadatan nyamuk/orang/jam)

C.2. Angka paritas *An. maculatus*

Tabel 9. Angka paritas nyamuk *An. maculatus* menurut lokasi dan metode penangkapan

Lokasi	Metode penangkapan							
	HMD		HML		IDR		ISKT	
	Jumlah parous/ jumlah diperiksa	AP (%)	Jumlah parous/ jumlah diperiksa	AP (%)	Jumlah parous/ jumlah diperiksa	AP (%)	Jumlah parous/ jumlah diperiksa	AP (%)
Panusupan	1/1	100	1/1	100			2/2	100
Sidareja			1/1	100			9/10	90,00
Bani bani	3/5	60	0/8	0	1/7	14,28	9/18	50,50
Berjoko	0/1	0					30/48	62,50
Bandar jaya			4/4	100			32/36	88,89
Tegiri			1/1	100	0/1	0	20/30	66,67
Gunungrego							21/51	41,17
Dayeuh luhur	1/1	100						

Keterangan:; HMD = Hinggap pada manusia di dalam rumah, HML = Hinggap pada manusia di luar rumah, IDR = Istirahat di dalam rumah, ISKT = Istirahat sekitar kandang/tambatan ternak, AP = Angka Paritas

C.3. Kerentanan *An. maculatus* terhadap *Plasmodium*

Tabel 10. Hasil pemeriksaan *Elisa* circum sporozoit *Plasmodium* pada nyamuk *An. maculatus*

Lokasi	Jumlah	Metode dan waktu penangkapan	Circum Sporozoit positif		Angka sporozoit (%)
			<i>P.f</i>	<i>P.v</i>	
Panusupan	4	HML 18.00-19.00	0	1	25
Sidareja	10		0	0	
Bani-bani	31	IDR 22.00-23.00	1	0	3,22
Berjoko*	27	HML 22.00-23.00	1	0	3,70
Bandar jaya	40		0	0	
Tegiri	42		0	0	
Gunungrego	28	ISKT 21.00-22.00	0	1	3,57
Dayeuhluhur	2		0	0	

*= Circum sporozoit positif untuk *P. falciparum* selain ditemukan pada *An. maculatus* juga ditemukan pada *An. balabacensis* dari penangkapan HML pada jam 22.00-23.00 di Berjoko.

C.4. Kesukaan *An. maculatus* yang menghisap darah manusia

Pemeriksaan pakan darah dilakukan terhadap nyamuk *An. maculatus* yang tertangkap istirahat pada pagi hari di habitat aslinya di luar rumah seperti di semak-semak dan lubang batu / tanah yang lembab. Hasil pemeriksaan specimen darah pada *An. maculatus* disajikan pada Tabel 11.

Tabel 11. Hasil pemeriksaan specimen darah pada *An. maculatus* di berbagai lokasi

Lokasi	Jumlah sampel diperiksa	Jumlah sampel positif menghisap darah manusia	HBI (%)
Panusupan	2	0	
Sidareja	7	0	
Tegiri	24	4	16,67
Gunungrego	12	0	
Bani-bani	18	3	16,67
Bandarjaya	0	0	
Berjoko	2	0	
Dayeuhluhur	2	0	

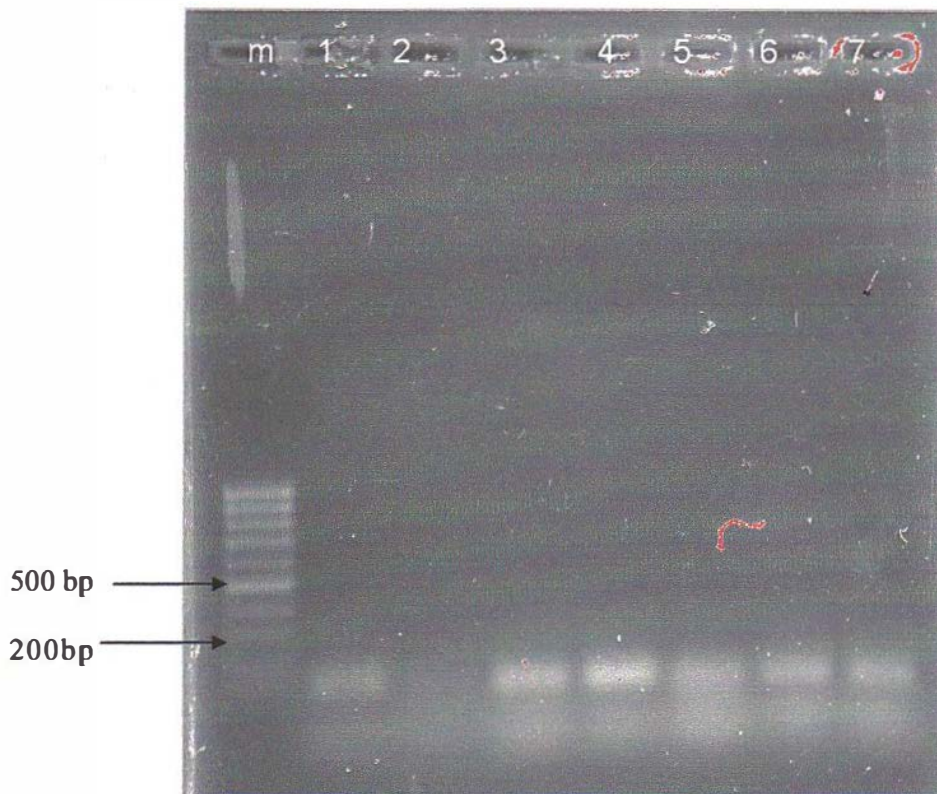
D. Keanekaragaman genetik *An. maculatus*

Sampel dari berbagai lokasi penelitian diambil sebanyak 30 (kecuali Purbalingga dan Cilacap) untuk diperiksa keanekaragaman genetiknya. Ekstraksi DNA dilakukan secara individual. DNA yang diperoleh dari masing-masing sampel, diamplifikasi dengan menggunakan 5 macam primer yang spesifik untuk mengidentifikasi spesies yang termasuk dalam anggota *An. maculatus* group, dielektroforesis, dan secara visual dilihat pada gel dokumentasi, hasil identifikasi dapat dilihat pada Tabel 12 dan Gambar 13.

Tabel 12. Hasil amplifikasi ITS2 DNA ribosom *An. maculatus*

Lokasi	Jumlah sampel diperiksa	Jumlah sampel positif/negatif				
		Mac	Pseu	Will	Saw	Drav
Purbalingga (Panusupan dan Sidareja)	18	+	-	-	-	-
Kulonprogo (Tegiri dan Gunungrego)	30	+	-	-	-	-
Belu, NTT (Bani-bani)	30	+	-	-	-	-
OKU Selatan (Bandarjaya)	30	+	-	-	-	-
Nunukan (Berjoko)	30	+	-	-	-	-
Cilacap (Dayeuhluhur)	4	-	-	-	-	-

Sampel-sampel dari Kulonprogo, Purbalingga, NTT, OKU Selatan, Nunukan (semuanya adalah merupakan daerah endemis tinggi) secara genetik teridentifikasi sebagai *An. maculatus* sedangkan sampel dari Dayeuhluhur Cilacap (daerah non endemis) menunjukkan hal yang negatif untuk kelima primer yang digunakan untuk identifikasi. Hal tersebut menunjukkan bahwa sampel dari Cilacap berbeda secara genetik dengan sampel-sampel dari Kulonprogo, Purbalingga, NTT, OKU Selatan, dan Nunukan. Untuk memastikan hal tersebut akan dilanjutkan dengan sekuensing untuk sampel dari Cilacap dan dari Kulonprogo, Purbalingga, NTT, OKU Selatan, dan Nunukan (terutama untuk nyamuk yang positif mengandung sporozoit) untuk mengetahui urutan nukleotidanya, melakukan alignment dan merekonstruksi pohon filogenetik.

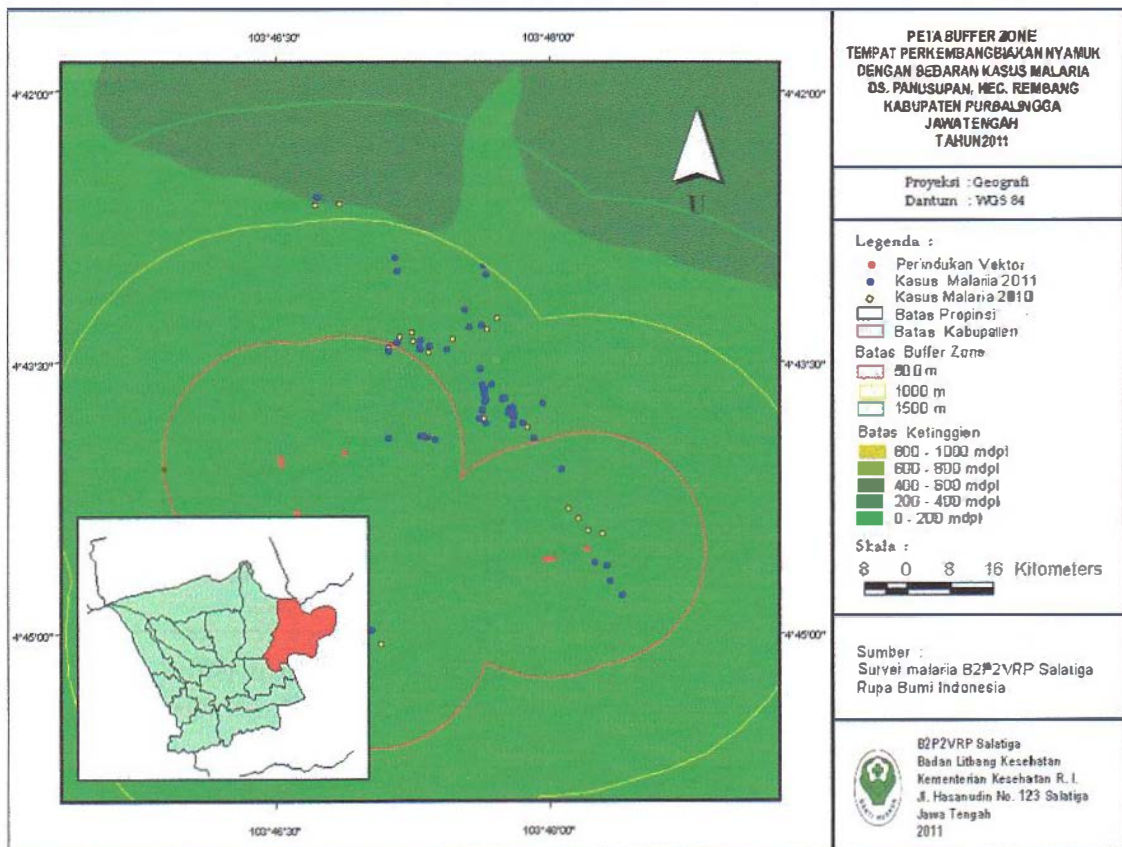


Keterangan: m = marker, lane 1 = sampel dari NTT, lane 2 = sampel dari Cilacap, lane 3-7 masing-masing sampel dari OKU Selatan, Nunukan, Kulonprogo, Purbalingga 12 dan 14

Gambar 13. Hasil amplifikasi ITS2 DNA ribosom nyamuk *An. maculatus*

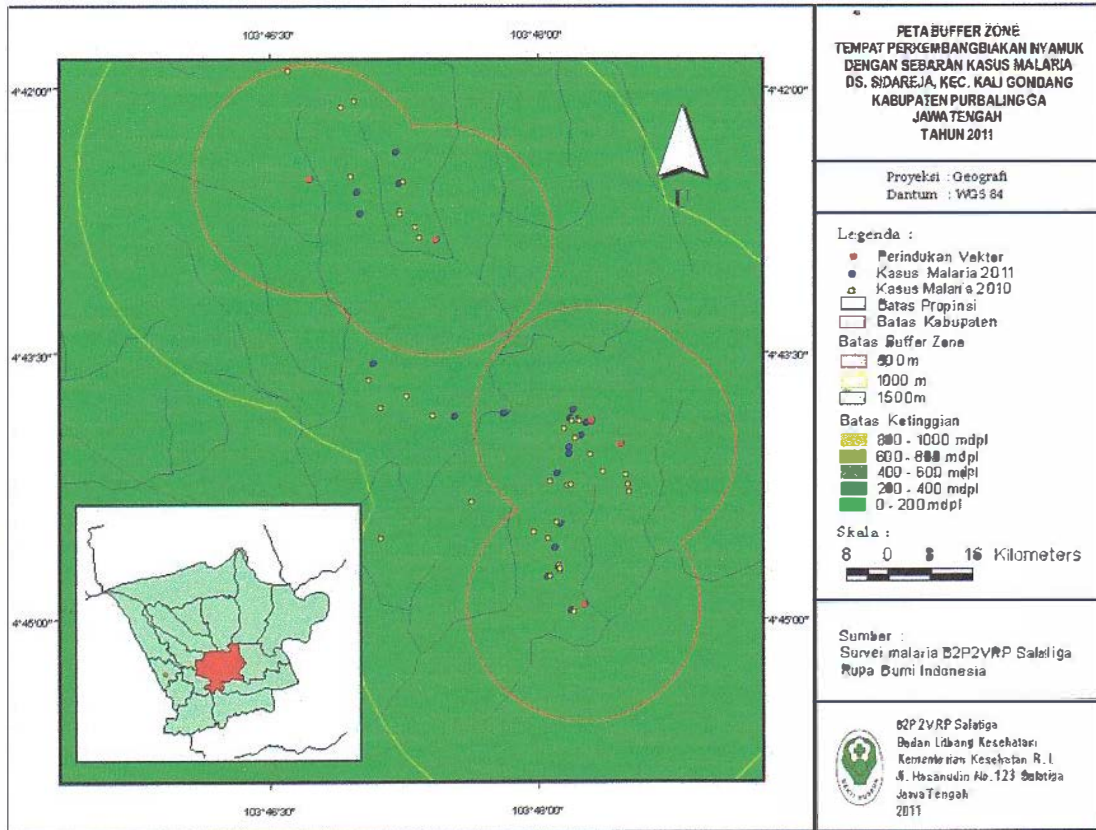
E. Sebaran kasus malaria di Kabupaten Purbalingga

Kasus malaria di Panusupan, Kecamatan Rembang, Kabupaten Purbalingga cukup tinggi yaitu sebanyak 20 kasus pada tahun 2010 dan 53 kasus pada tahun 2011. Pada tahun 2010 terjadi KLB malaria di wilayah tersebut. Sebaran kasus malaria di Panusupan terlihat pada jarak antara 500-1500 meter dari habitat perkembangbiakan nyamuk, dan terlihat dominan pada jarak antara 500-1000 meter dari habitat perkembangbiakan nyamuk (Gambar 14)



Gambar 14. Buffer zone sebaran kasus malaria dan habitat perkembangbiakan nyamuk *Anopheles* di Panusupan, Kabupaten Purbalingga

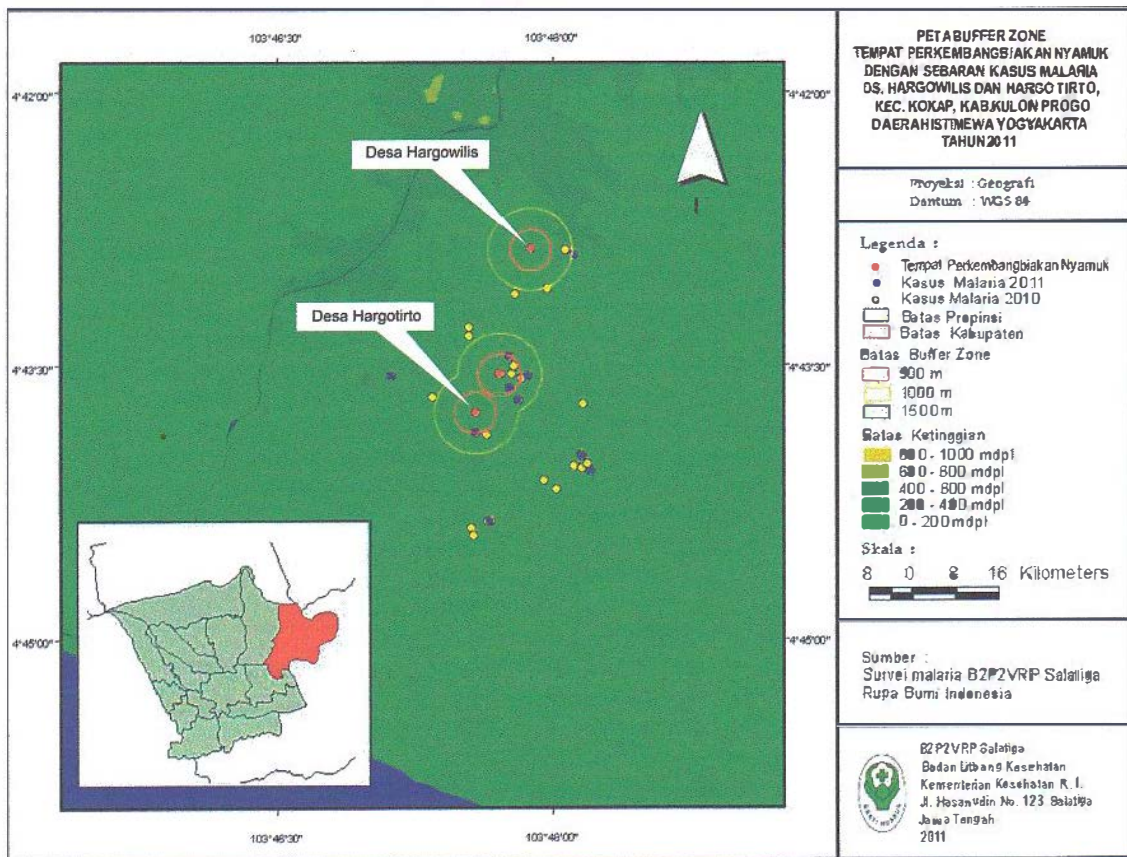
Kasus malaria di Sidareja, Kecamatan Kaligondang, Kabupaten Purbalingga cukup tinggi dan pada tahun 2009 terjadi KLB malaria di wilayah tersebut. Pada tahun 2011 mencapai total 49 kasus. Sebaran kasus malaria pada tahun 2010 – 2011 terlihat dominan pada jarak antara 500-1.000 meter dari habitat perkembangbiakan nyamuk (Gambar 15).



Gambar 15. Buffer zone sebaran kasus malaria dan habitat perkembangbiakan nyamuk *Anopheles* di Sidareja, Kabupaten Purbalingga

F. Sebaran kasus malaria di Kabupaten Kulonprogo

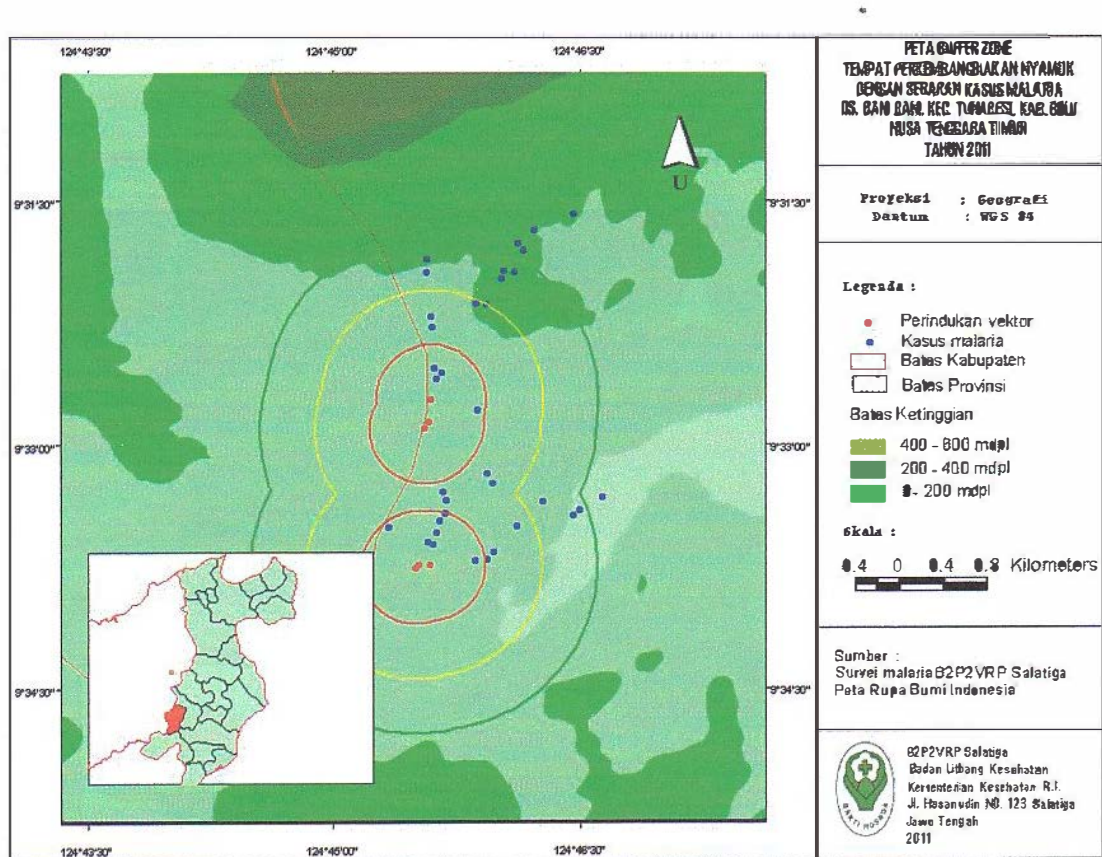
Jumlah kasus malaria di Hargowilis dan Hargotirto, Kecamatan Kokap sebanyak 23 kasus pada tahun 2010 dan 10 kasus pada tahun 2011. Sebaran kasus malaria di Hargowilis terlihat pada jarak antara 500-1000 meter dari habitat perkembangbiakan nyamuk, dan di Hargotirto kasus menyebar hingga lebih dari 1.500 meter dari habitat perkembangbiakan nyamuk. Hal ini menggambarkan bahwa aktivitas terbang nyamuk cukup jauh atau penduduk mempunyai mobilitas jauh dari habitat perkembangbiakan nyamuk (Gambar 16)



Gambar 16. Buffer zone sebaran kasus malaria dan habitat perkembangbiakan nyamuk *Anopheles* di Tegiri, Hargowilis dan Gunungrego, Hargotirto, Kecamatan Kokap, Kabupaten Kulonprogo.

G. Sebaran kasus malaria di Kabupaten Belu

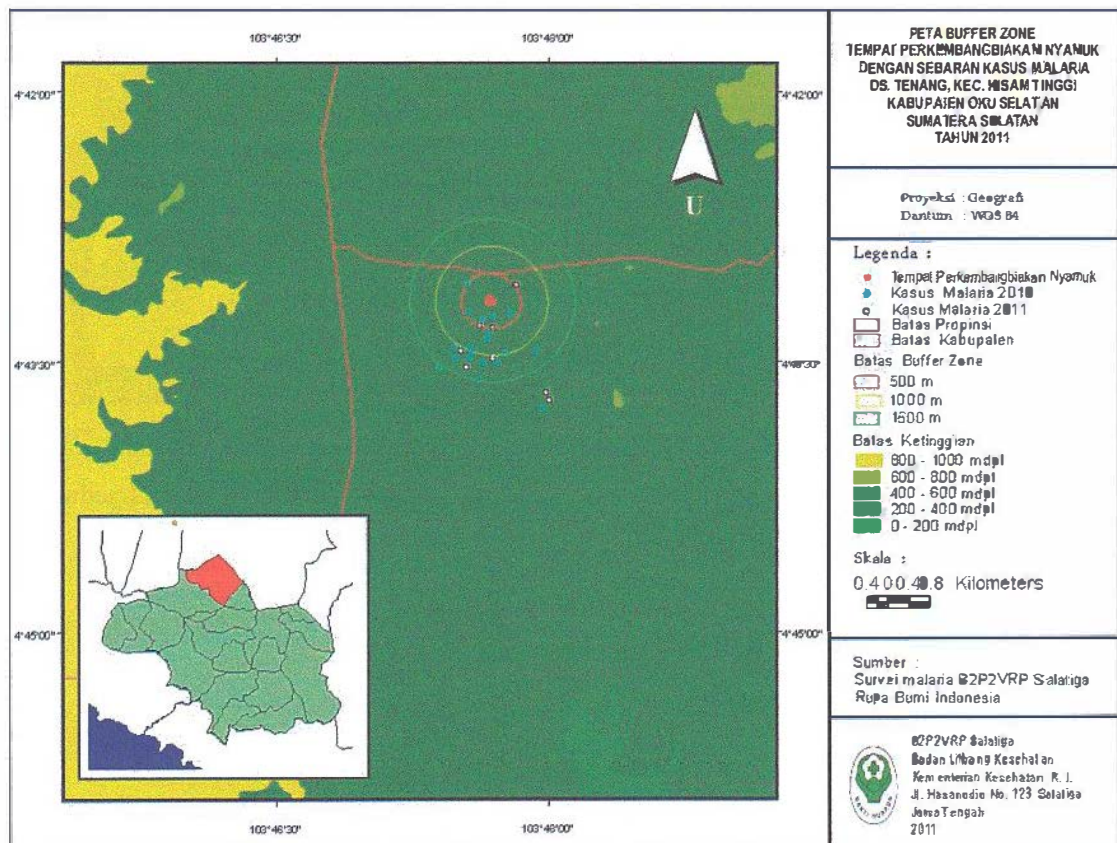
Kasus malaria di Bani-bani, Kecamatan Io Kufeu pada tahun 2011 mencapai total 38 kasus. Kasus terlihat menyebar mulai dari kisaran 500 meter di sekitar habitat perkembangbiakan nyamuk sampai lebih dari 1500 meter (Gambar 17).



Gambar 17. Buffer zone sebaran kasus malaria dan habitat perkembangbiakan nyamuk *Anopheles* di Bani-bani, Kecamatan Io Kufeu, Kabupaten Belu

H. Sebaran kasus di Kabupaten OKU Selatan

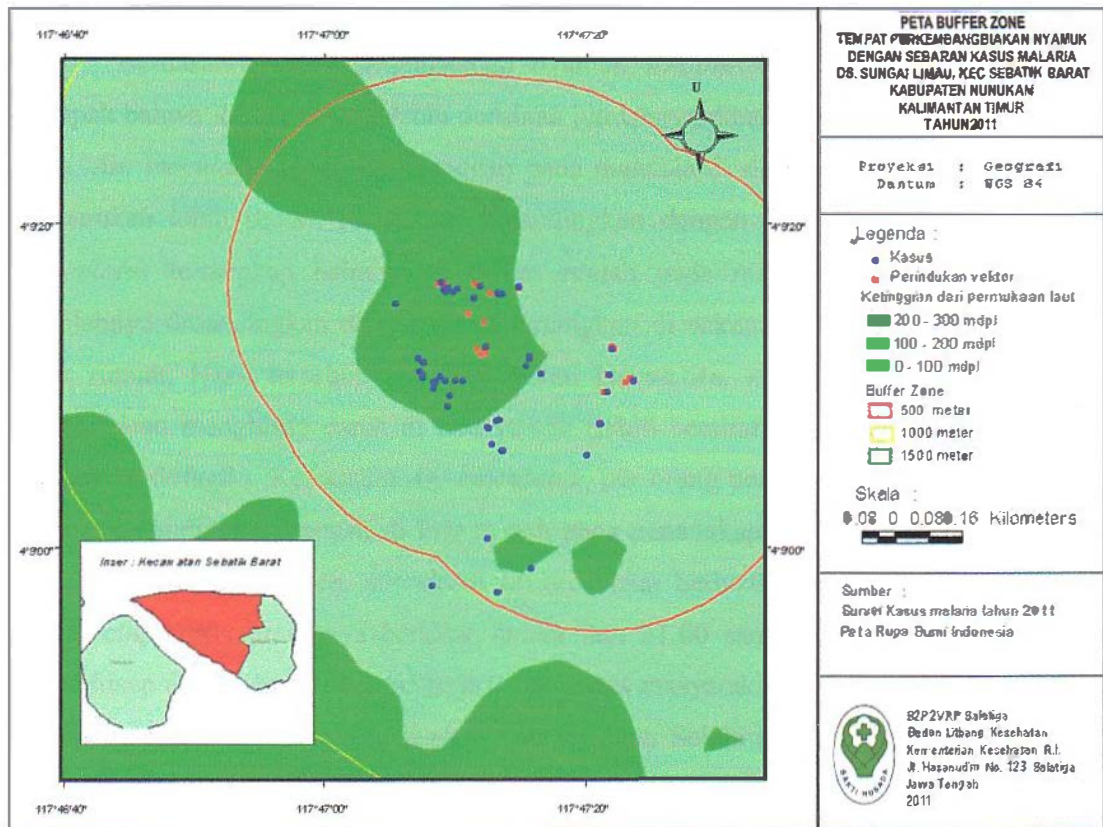
Kasus malaria di Bandarjaya, Kecamatan kisam Tinggi, Kabupaten OKU Sealatan cukup tinggi yaitu sebanyak 19 kasus pada tahun 2010 dan 8 kasus pada tahun 2011. Sebaran kasus malaria di Bandarjaya terlihat pada jarak antara 500 sampai lebih dari 1500 meter dari habitat perkembangbiakan nyamuk, dan terlihat dominan pada jarak antara 500-1.500 meter dari habitat perkembangbiakan nyamuk (Gambar 18)



Gambar 18. Bufferzone sebaran kasus malaria dan habitat perkembangbiakan nyamuk *Anopheles* di Bandarjaya, Kecamatan Kisam Tinggi, Kabupaten OKU Selatan

I. Sebaran kasus malaria di Kabupaten Nunukan

Kasus malaria di Desa Sungai Limau, Kecamatan Sebatik Barat, Kabupaten Nunukan disajikan pada Gambar 19. Total kasus pada tahun 2010 sebanyak 36 kasus dan 11 kasus pada tahun 2011. Sebaran kasus malaria 2011 terlihat mengelompok dan dominan pada jarak antara 500 meter dari habitat perkembangbiakan nyamuk (Gambar 19).



Gambar 19. Buffer zone sebaran kasus malaria dan habitat perkembangbiakan nyamuk *Anopheles* di Bani-bani, Kecamatan Io Kufeu, Kabupaten Belu

XV. PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil penangkapan nyamuk *Anopheles spp* di 6 lokasi penelitian tampak bahwa *An. maculatus* lebih dominan jumlahnya dibandingkan dengan spesies yang lain. *An. maculatus* tertangkap hinggap pada manusia di dalam rumah pada malam hari ditemukan lebih sedikit jumlahnya dibandingkan dengan yang di luar rumah. *An. maculatus* tertangkap istirahat di dalam rumah pada malam hari juga lebih sedikit jumlahnya dibandingkan dengan yang tertangkap di sekitar kandang/tambatan temak di luar rumah. Hasil tersebut menggambarkan bahwa *An. maculatus* cenderung mencari makan atau menghisap darah di luar rumah (lebih bersifat zoofagik) daripada di dalam rumah (endofagik). Kepadatan *An. maculatus* per orang per jam juga lebih tinggi di luar rumah dibandingkan dengan di luar rumah pada penangkapan malam hari. Pola aktivitas menghisap darah oleh *An. maculatus* ini meskipun berbeda-beda antar lokasi penelitian akan tetapi pada umumnya berkisar antara jam 21.00 sampai dengan 03.00. Aktivitas menghisap darah *An. maculatus* terjadi pada saat masyarakat tidur lelap sehingga diduga bahwa penularan malaria terjadi pada saat tersebut. Selain itu juga masyarakat di daerah malaria seperti di Kulonprogo ataupun di Panusupan mempunyai kebiasaan melakukan aktivitas pada pagi-pagi buta untuk mengambil air ataupun nira, hal ini dapat meningkatkan frekuensi kontak antara manusia dan nyamuk vektor. Untuk menghindari gigitan nyamuk agar tidak tertular malaria, upaya pencegahan dapat dilakukan baik pada tingkat masyarakat maupun personal. Perlindungan personal sangat dianjurkan untuk daerah-daerah endemis malaria tinggi ini seperti pemakaian kelambu pada saat tidur ataupun menggunakan perlindungan yang lain pada saat melakukan aktivitas di luar rumah seperti repelen atau baju pelindung (*clothing*) karena *An. maculatus* ini lebih banyak menghisap darah di luar rumah. Selain itu dapat juga dilakukan pemasangan kasa di rumah-rumah sebagai *insect proofing* ataupun mencegah tempat perkembangbiakan nyamuk di sekitar rumah. Pencegahan pada level masyarakat dapat dilakukan penyemprotan dinding rumah, space spraying dan mencegah habitat perkembangbiakan nyamuk di lapangan (Rozendaal, 1997).

Hasil pemeriksaan paritas menunjukkan persentase yang cukup tinggi, hal tersebut menggambarkan bahwa *An. maculatus* yang tertangkap merupakan nyamuk tua dengan rentang umur yang panjang. Rentang umur ini akan mempengaruhi penyelesaian masa inkubasi ekstrinsik parasit yaitu dari gametosit sampai sporozoit di kelenjar ludah, yang

dipengaruhi pula oleh faktor lingkungan klimatologis. Semakin panjang umur nyamuk semakin besar pula kesempatan untuk menularkan malaria (Bruce Chwatt, 1985).

Hasil pemeriksaan protein circum sporozoit dengan teknik *Elisa* menunjukkan bahwa *An. maculatus* di Panusupan, dan Gunungrego rentan terhadap *P. vivax*, sedangkan di Bani-bani dan Berjoko rentan terhadap *P. falciparum*. Reseptivitas atau kerentanan nyamuk terhadap parasit malaria dipengaruhi oleh faktor genetik. Nyamuk *Anopheles* yang rentan terhadap infeksi parasit malaria menunjukkan adanya kecocokan fisiologis antara nyamuk sebagai inang definitif dan *Plasmodium* (Bruce- Chwatt, 1985).

Hasil pemeriksaan pakan darah dengan teknik *Elisa* menunjukkan bahwa hanya sebagian kecil populasi *An. maculatus* yang menghisap darah manusia atau hanya sebagian yang bersifat antropofilik. Dengan kata lain *An. maculatus* lebih bersifat zoofilik. Hal ini terlihat dari rendahnya persentase index darah manusia (*human blood index / HBI*) sekitar 16,67% di Bani-bani dan Tegiri. Kesukaan menghisap darah manusia ini dipengaruhi oleh perilaku nyamuk. Sifat antropofilik merupakan hal yang mutlak bagi nyamuk untuk dapat menularkan parasit malaria antar manusia. HBI yang rendah ini menunjukkan bahwa *An. maculatus* ini sangat efektif berperan sebagai vektor (Bruce- Chwatt, 1985). *Anopheles maculatus* dikenal mempunyai tendensi menghisap darah binatang atau bersifat zoofilik ini sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Muenvorn *et al*, 2009 di Thailand. dan Barodji *et al*, 2001 di Kulonprogo. Peneliti lain melaporkan hasil yang berbeda antara lain Rattanarithikul *et al*, 1996 melaporkan bahwa *An. maculatus* mempunyai sifat antropofilik yang kuat dan Loong *et al.*, 1990 melaporkan bahwa di Post Betau, Pahang, Malaysia tidak ada perbedaan antara antropofilik dan zoofilik dari populasi *An. maculatus*. Bahkan individu *An. maculatus* yang sama dapat menghisap darah binatang dan manusia. Perilaku menghisap darah ini penting untuk diteliti karena situasi dan kondisi daerah yang berbeda-beda khususnya untuk mengetahui proporsi nyamuk yang menghisap darah manusia (*Human Blood Index*) yang akan menentukan status kevektoran nyamuk sebagai vektor primer atau sekunder (Dharmawan, 1993).

Secara umum terlihat dari hasil penelitian bahwa kompetensi vektorial *An. maculatus* di beberapa lokasi penelitian menunjukkan perbedaan karena masing-masing lokasi penelitian mempunyai kondisi lingkungan seperti ekosistem, ketinggian, suhu, kelembaban, dan kebiasaan masyarakat (perilaku penduduk) yang berbeda-beda yang merupakan spesifik lokal suatu daerah yang pada akhirnya akan mempengaruhi frekuensi kontak antara nyamuk-parasit-manusia.

Hasil pemeriksaan dengan PCR untuk mengamplifikasi ITS2 DNA ribosom berhasil dilakukan untuk sampel-sampel dari Kulonprogo, Purbalingga, NTT, OKU Selatan, Nunukan (semuanya adalah merupakan daerah endemis tinggi), dan secara genetik teridentifikasi sebagai *An. maculatus* sedangkan sampel dari Dayeuhluhur Cilacap (daerah non endemis) menunjukkan hal yang negatif untuk kelima primer yang digunakan untuk identifikasi. Hal tersebut menunjukkan bahwa sampel dari Cilacap berbeda secara genetik dengan sampel-sampel dari Kulonprogo, Purbalingga, NTT, OKU Selatan, dan Nunukan. Untuk memastikan hal tersebut penelitian dilanjutkan dengan sekuensing untuk sampel dari masing-masing lokasi untuk mengetahui urutan nukleotidanya, melakukan alignment dan merekonstruksi pohon filogenetik. Beberapa hal pokok yang menyebabkan ITS2 DNA ribosom nyamuk *Anopheles* sering digunakan untuk identifikasi spesies antara lain adalah : a). Dapat digunakan utk identifikasi spesifik spesies, b). Ukuran ITS2 relatif pendek yaitu kurang dari 1 kbp sehingga untuk mengamplifikasi ITS2 dengan primer yang dibuat dari daerah terkonservasi di *flanking coding region* relatif mudah dilakukan, c). Tingkat variasi intraspesifik lebih rendah dari interspesifik, dan d). ITS2 mempunyai laju evolusi lebih cepat dibandingkan dengan *coding region* (Beebe & Saul, 1995; Paskewitz & Collins, 1990; Ma *et al.*, 2006; Walton *et al.*, 2007).

Penyebaran kasus malaria bervariasi antar daerah penelitian, berkisar antara 500 sampai 1.500 dari habitat perkembangbiakan. Hal tersebut dapat dilihat di Panusupan dan Sidareja (Kabupaten Purbalingga), dan Berjoko, Sungai Limau (Kabupaten Nunukan). Sebaran kasus mencapai lebih dari 1.500 meter ditemukan di Tegiri, Hargowilis dan Gunungrego, Hargotirto (Kabupaten Kulonprogo), Bandarjaya (OKU Selatan), dan Bani-bani (Kabupaten Belu). Hal tersebut menggambarkan bahwa rumah kasus atau penderita malaria tinggal tidak jauh dari habitat perkembangbiakan nyamuk atau masih dalam jangkauan jarak terbang aktif nyamuk. Kemungkinan lain adalah mobilitas penduduk di Bani-bani, Bandarjaya dan Tegiri atau Gunungrego cukup jauh dari habitat perkembangbiakan nyamuk. Nyamuk *Anopheles* biasanya jarang ditemukan lebih dari 2-3 km dari habitat perkembangbiakannya. Jarak terbang nyamuk juga ditentukan oleh kondisi lingkungan. Apabila habitat perkembangbiakan dan inang berjarak dekat, nyamuk *Anopheles* betina tidak membutuhkan terbang terlalu jauh. Namun demikian dengan adanya bantuan angin, nyamuk *Anopheles* dapat terbang mencapai jarak 30 km atau lebih (Service & Townson, 2004). Pada bagian kepala nyamuk khususnya pada palpus maksilari dan antenna terdapat *chemosensitive neurosensila* yang dapat digunakan untuk mendeteksi

keberadaan inang pada jarak tertentu. Di pihak inang terdapat adanya faktor fisika dan kimia yang merupakan atraktan. Faktor fisika, misalnya kehangatan aliran konveksi uap air yang timbul dari tubuh inang menyebabkan nyamuk dapat mencapai permukaan tubuh inang walaupun dalam gelap. Faktor kimia berupa atraktan CO₂ ataupun bau badan khas inang. Antena merupakan reseptor dari bau badan inang dan palpus maksilari merupakan reseptor dari atraktan CO₂. Adanya atraktan dari inang tersebut merangsang nyamuk mampu terbang melawan arah angin untuk mendekati inang. Kemampuan memantau inang sebagai korbannya dari jarak yang jauh ini merupakan faktor penting bagi nyamuk untuk mengembangkan kemampuannya sebagai vektor (Knols, 1996).

XVI. KESIMPULAN DAN SARAN

KESIMPULAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa:

1. *An. maculatus* di daerah endemis tinggi berbeda secara genetik dengan daerah non endemis.
2. *An. maculatus* rentan terhadap *P. falciparum* di Bani-bani (Kecamatan Io Kufeu, Kabupaten Belu, Nusa Tenggara Timur) dan Berjoko (Kecamatan Sebatik Barat, Kabupaten Nunukan, serta rentan terhadap *P. vivax*, masing-masing di Panusupan (Kecamatan Rembang, Kabupaten Purbalingga, Jawa Tengah), dan Gunungregro (Kecamatan Kokap, Kabupaten Kulon Progo, Daerah Istimewa Yogyakarta).
3. *An. maculatus* lebih bersifat zoofilik atau hanya sebagian populasi *An. maculatus* bersifat antropofilik dengan HBI sebesar 16,67% masing-masing di Tegiri, Hargowilis, Kabupaten Kulonprogo dan Bani-bani, Io Kufeu, Kabupaten Belu.
4. Angka paritas *An. maculatus* paling tinggi di Purbalingga menunjukkan umur nyamuk yang relatif panjang dan membuka kesempatan adanya penularan malaria.
5. Kepadatan *An. maculatus* paling tinggi ditemukan dari hasil penangkapan nyamuk yang istirahat di sekitar kandang atau tambatan ternak pada malam hari di Tegiri dan Gunungregro, Kabupaten Kulonprogo

SARAN

Dari penelitian ini disarankan untuk melakukan penelitian lanjutan menggunakan penanda molekuler yang lain agar dapat diketahui waktu divergensi spesies secara lebih tepat sehingga informasi mengenai spesies kompleks sebagai contoh keanekaragaman genetik pada *An. maculatus* bisa lebih lengkap.

XVII. UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kami panjatkan kehadiran Tuhan yang Mahaesa atas berakhirnya penelitian dan selesainya penyusunan laporan penelitian tahun 2011 ini.

Terima kasih yang sebesar-besarnya ditujukan kepada:

1. Kepala B2P2VRP selaku koordinator penelitian yang telah memberi kesempatan, arahan dan bimbingan selama penelitian berlangsung.
2. Para Kepala Dinas Kesehatan Kabupaten Kulonprogo, Purbalingga, Cilacap, Belu, ●gan Komerling Ulu Selatan, Nunukan beserta staf P2 malaria dan Kepala Puskesmas di lokasi penelitian yang telah membantu pelaksanaan penelitian di lapangan.
3. Segenap tim peneliti, pembantu peneliti, pembantu administrasi, dan teman-teman di laboratorium Entomologi dan Biologi Molekuler yang telah membantu pelaksanaan penelitian di lapangan dan laboratorium.

XVIII. DAFTAR PUSTAKA

- Andreas H dan M. Gamal. 1999. Petunjuk singkat penggunaan receiver Garmin 12XL. Kel. Kepakaran geodesi ITB Bandung.
- Ariati Y, 2004. Studi kromosom mitotic vector malaria nyamuk *An. maculatus* Theobald di daerah Purworejo, Jawa Tengah. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. 65 hal.
- Bangs, MJ. 1989. The sporozoite enzyme-linked immunosorbant assay: application in malaria epidemiology. Bull. Pen. Kes. 17(2): 197-205.
- Barcus MJ, F. Laihad, M. Sururi, P. Sismadi, H. Marwoto, MJ. Bangs and JK. Baird. 2002. Epidemic malaria in the Menoreh Hills of Central Java.
- Bardakci, F. 2001. *Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)* markers. Turk J. Biol. 25:185-196.
- Barodji, Boesri H, Boewono DT dan Sumardi. 2001. Bionomik vektor malaria di daerah endemis malaria Kec. Kokap, Kab. Kulonprogo, DIY.
- Barodji, H. Suwasono, Ristiyanto, DT. Boewono, ChP. Blondine, Widiarti, H Boesri, U. Widyastuti, dan W. Trapsilowati. 2006. Studi kebijakan kajian review hasil-hasil penelitian vector dan reservoir penyakit tahun 1975-2005. Laporan akhir penelitian studi kebijakan B2P2VRP, Badan Litbangkes, Depkes RI.
- Beard CB, DM. Ham, FH. Collins. 1993. The mitochondrial genome of the mosquito *An. gambiae*: DNA sequence, genome organization, and comparisons with mitochondrial sequence of other insects. Insect molecular biology 2(2): 103-124.
- Beier JC, PV. Perkin, RA. Wirtz, J. Koros, D. Diggs, TP. Gargan, and DK. Koech. 1988. Bloodmeal identification by direct Elisa, tested on Anopheles (Diptera: Culicidae) in Kenya. J. Med. Entomol. 25(1): 8-16.
- Biorad laboratories. 2010. PCR training.
- Black IV WC and NM DuTeau. 1997. RAPD-PCR and SSCP analysis for insect population genetic studies. In: Crampton JM, CB. Beard and C. Louis, 1997. The molecular biology of insect disease vectors. A methods manual. Chapman & Hall. Univ. Press, Cambridge.
- Boewono DT dan Ristiyanto. 2005. Studi bioekologi vektor malaria di Kec. Srumbung, Kab. Magelang. Bul. Pen. Kes.
- Boewono DT, Widiarti. U. Widyastuti, W. Trapsilowati, H. Boesri, dan Ristiyanto. 2009. Studi bio-epidemiologi penularan malaria di daerah lintas batas Indonesia-Malaysia (Kecamatan Sebatik, Kabupaten Nunukan, Kalimantan Timur). Laporan penelitian B2P2VRP Salatiga.
- Boewono DT, Widiarti. U. Widyastuti, W. Trapsilowati, Blondine Ch.P, H. Boesri, dan Ristiyanto. 2010. Studi bioepidemiologi penularan malaria di daerah lintas batas Indonesia-

- Timor Leste (Kabupaten Belu, Nusa Tenggara Timur). Laporan penelitian B2P2VRP Salatiga.
- Budihardja. 2006. Pencegahan dan pemberantasan penyakit di Indonesia: Kebijakan dan kendala. Kebutuhan penelitian di bidang P2M untuk mengambil kebijakan di daerah. Dinkes Prop. Jateng. 13 hal.
- Burkot, TR, WG. Goodman, ang GR. De Foliart. 1981. Identification of mosquito bloodmeal by enzyme-linked immunosorbant assay. *Am. J. Tropmed and Hyg.* 1336-1341.
- Champbell, NA, JB. Reeves, & LG. Mitchell. 2003. Biologi. Jilid 2, Edisi ke 5. Penerbit Erlangga.
- Chan, AST. 2001. Field evaluation of the VecTest™ malaria sporozoite antigen panel assay for Plasmodium infection in mosquito. Entomol. Branch CDC and Prevention, NE, USA
- Choochote W. 2009. Evidence to support karyotypic variation of the mosquito, *An. peditaeniatus* in Thailand. *J. Insect Sci.* 11 (10). Online: www.insectscience.org/11.10
- Coluzzi M, V. Petrarca dan MA. Dideco. 1985. Chromosomal inversion intergradation and incipient speciation in *An. gambiae*. *Bull. Zool.* 52: 45-63.
- Dhananjayan, K.J., R. Paramasivan, SC. Tewari, R. Rajendran, V. Tenmozhi, SVJ. Leo. A. Venkatesh, and BK. Tyagi. 2010. Molecular identification of mosquito vectors using genomic DNA isolated from eggshells, larval and pupal exuvium. *Trop. Biomed.* 27(1): 47-53.
- Dharnawan R. 1993. Metoda identifikasi spesies kembar nyamuk *Anopheles*. Sebelas Maret Univ. Press. 1-157.
- Dinkes Prop. Jateng. 2003. Gebrak Malaria. 25 hal.
- Dit. Jen. P2MPL. 1998. Dokumen pelatihan manajemen dan Epidemiologi.
- Dit. Jen. P2M PL. 1999. Gebrak malaria. Konsep program nasional pemberantasan malaria di Indonesia melalui gerakan basmi kembali malaria. 10 hal.
- Djadid, ND, S. Gholizadeh, E. Tafsiri, R. Romi, M. Gordeev and S. Zakeri. 2007. Molecular identification of palearctic members of *An. maculipennis* in northern Iran. *Malaria J.* 10 p.
- Edrissian GH, AV. Manouchehry, and A. Hafisi. 1995. Application of an enzyme-linked immunosorbant assay (*Elisa*) for determination of human blood index in Anopheline mosquitoes collected in Iran. *J. Am. Control Assoc.* 1(3):349-352.
- Garos, C., LL. Koekemoer, M. Cortzee, M. Coosemans & S. Manguin. 2004. A single multiplex assay to identify major malaria vectors with the African *An. funestus* and the oriental *An. minimus* group. *Am. J. of Tropmed and Hyg.* 70 (6): 583-590.

Gutierrez, LA., NJ. Naranjo, AV. Cienfuegos, CE. Muskus, S. Luckhart, JE. Conn and MM. Correa. 2009. Population structure analyses and demographic history of the malaria vector *An. albimanus* from the Caribbean and the Pacific regions of Colombia. *Malaria J.* 8: 259, 1-18

Hackett, BJ., J. Gimnig, W. Guelbeogo, C. Constantini, LL. Koekemoer, M. Coetzee, FH. Collins and NJ. Besansky. 2000. Ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS2) sequences differentiate *An. funestus* and *An. rivulorum*, and uncover a cryptic taxon. *Insect Mol. Biol.* 9(4): 369-374.

Handayani, FD dan A. Darwin. 2005. Laporan akhir penelitian tempat istirahat vektor malaria *An. maculatus* dan *An. balabacensis* di Kec Kokap, Kab. Kulonprogo.

Harijanto, PN. 1999. *Malaria, Epidemiologi, Patogenesis, Manifestasi klinis dan Penanganan*. Penerbit: EGC. 17-37.

Haymer, DS. 1995. Genetic analysis of laboratory and wild strain of the melon fly (Diptera: Tephritidae) using RAPD-PCR. *Ann. Entomol. Soc.* 88(5): 531-536.

Hii, JLK. 1985. Evidence for the existence of genetic variability in the tendency of *An. balabacensis* to rest in houses and to bite man. Seameo-troped technical meeting: Mosquito vectors of malaria in Southeast Asia. Bangkok, Thailand.

<http://blog.re.or.id/cara-menentukan-besarnya-sampel-sample-size.htm>

<http://id.wikipedia.org/wiki/Mikrosatelit> 17 Pebruari 2011

<http://www.nationsencyclopedia.com/Asia-and-Oceania/Indonesia-FLORA-AND-FAUNA.html>. 12-10-2006.

<http://www.geographia.com/indonesia/indono02.htm>. 6-10-2006

Innes MA, Gelfand DH, Sninsky JJ and White TJ. 1990. PCR protocols. A guide to methods and applications. Ac. Press Inc. HBJ Pub.

Kambhampati, S, Black IV and Rai KS. 1992. Random Amplified Polymorphism DNA of mosquito species and populations (Diptera: Culicidae): techniques, statistical analysis and application. *J. Med. Entomol.*

Kemkes RI, 2009. Keputusan Menteri Kesehatan RI, Nomor: 293/MENKES/SK/IV/2009, Tanggal: 28 April 2009, Tentang: Eliminasi Malaria di Indonesia.

Kemendag RI. 2010. Surat Edaran Menteri Dalam Negeri RI, Kepada Gubernur dan Bupati/Walikota Seluruh Indonesia Nomor : 443.41/465/SJ, Tanggal : 8 Februari 2010, Tentang : Pedoman Pelaksanaan Eliminasi Malaria di Indonesia

Junkum A., N. Komalamisra, A. Jitpakdi, N. Jariyapan, GS. Min, MH. Park, KH. Cho, P. Somboon, PA. Bates, and W. Choochote. 2005. Evidence to support two conspecific cytological races of *An. aconitus* in Thailand. *J. Vector Ecol.* 30(2): 213-224.

- Knols, BG. 1996. Odour mediated host seeking behaviour of the Afro-Tropical malaria vector *An. gambiae*, Gills. Van de Lan, Wageningen. 313 halm.
- Koekemoer IL, Lochovarn L, Hunt RH and Coetzec M. 1999. Single strand conformation polymorphism analysis for identification of four members of the *An. funestus* (Diptera: Culicidae) group. J. Med. Entomol. 36 (2): 125-130.
- Konishi, E and H.Yamanishi. 1984. Estimation of blood meal size of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) using Elisa. J. Med. Ent. 21(5): 506-513.
- Krzywinsky J., RC. Wilkerson, and NJ. Besansky. 2001. Evolution of mitochondrial and ribosomal gene sequences in Anophelinae (Diptera: Culicidae): Implication for phylogeny reconstruction. Mol. Phylogenetics and Evol. 18 (3): 479-487.
- Laihad, FJ.dan S. Gunawan. 1999. Malaria di Indonesia. Dalam : Malaria, Epidemiologi, Patogenesis, Manifestasi klinis dan Penanganan. Penerbit: EGC. 17-37.
- Lemeshow, S., D.W., Hosmer Jr., J., Klar, K.S., Lwanga. Besar Sampel Dalam Penelitian Kesehatan (Adequasi of Sample Size in Health Studys), GAMA Press, Yogyakarta Indonesia, 1990. 105-106.
- Loong, KP, GL Chiang, KL Eng, ST Tan and HH Yap. 1990. Survival and feeding behaviour of Malaysian strain of *An. maculatus* Theobald (Diptera:Culicidae) and their role in malaria transmission. South East Asian J. Trop.Med. & Pub. Health.
- Lopez-Antunano, FJ. And GA. Schmunis. 1993. Plasmodia in human. In Kreier, JP. Parasitic protozoa, 2 nd.Ed. Vol. 5. Acd. Press Inc. San Diego.
- Loxdale, HD and Lushai, G. 1998. Review article molecular marker in Entomology. Bul. Entomol. Res. 88: 577-600
- Li, WH & Graur D. 1991. Fundamentals of molecular evolution. Sinauer Assoc. Inc.Sunderland, MA.
- Ma Y, S. Li, and J. Xu. 2006. Molecular identification and phylogeny of the Maculatus group of *Anopheles* mosquitoes (Diptera: Culicidae based on nuclear and mitochondrial DNA sequences. Acta Tropica 99: 272-280.
- Marrelli, MT, MAM. Sallum & O. Marinotti. 2006. The second internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA as a tool for Latin American Anopheline taxonomy-A critical review. Memorias do instituto Oswaldo Cruz 101 (8): 817-832.
- Mayr, E. 1973. Animal species and evolution. The Belknap Press of Harvard Univ. Press. Cambridge, MA.
- Morgan K, SM.O'Louhglin, FM. Yik, YM. Linton, P. Somboon, S. Min, PT. Htun, S. Nambanya, I. Weerasinghe, T. Sochanta, A. Prakash and C. Walton. 2009. Molecular phylogenetics and biogeography of the Neocellia series of *Anopheles* mosquitoes in the Oriental region. Molecular phylogenetics and Evol.52(3): 588-601.

- Notoatmodjo, Soekidjo. Metode Penelitian Kesehatan. Rineka Cipta. Jakarta. 2002.
- O'Connor, CT and A. Soepanto. 1979. Kunci bergambar untuk *Anopheles* betina dari Indonesia. Dit. Jen P3M, Depkes RI, Jakarta.
- Paskewitz, SM and FH. Collins. 1997. PCR amplification of insect ribosomal DNA. In: Crampton JM, CB. Beard and C. Louis, 1997. The molecular biology of insect disease vectors. A methods manual. Chapman & Hall. Univ. Press, Cambridge.
- Povoa MM, PA. Wirtz, RNI. Lacerda, MA. Miles, D. Warhurst. 2001. Malaria vectors in the municipality of Serra do Navio, State of Amapa, Amazon Region, Brazil. Mem. Do Inst. Oswaldo Cruz. 96(2):179-184.
- Pusdatin dan Dit.P2B2. 2011. Epidemiologi malaria di Indonesia. Buletinjendela data dan Informasi Kesehatan. Kementerian Kesehatan RI. Triwulan I, 2011.
- Raghavendra K, BP. Niranjan Reddy, AP. Dash, and A. Das. 2009. Reanalysis of rDNA-ITS2 region sequences of *An. cf. culicifacies* 'Bluchistan' revealed conspecificity to *An. dthali*. Current Science, 97(6): 923-925.
- Ridley, M. 1996. Evolution. Blackwel Science Inc. 2nd Ed.
- Rongoparut P, M. Sirichotpakorn, R. Rattanaritikul, S. Yaicharon, and KJ.Lintichum. 1999. Estimates of gene flow among *An. maculatus* population in Thailand using microsatellite analysis. The Am.J. Tropmed and Hyg. 60(3): 508-515.
- Rongoparut P, P. Rodpradit, P. Kongsawadworakul, R. Sithiprasasna, and KJ.Lintichum. 2006. Population genetic structure of *An. maculatus* in Thailand. J. Am. Mosq. Control Assoc. 22(2): 192-197.
- Service, MW and H. Townson. 2004. *The Anopheles* vector. In Warrel D and HM. Gilles. 2004. Essential malariology.
- Small G, 1998. Lecture: Recent advances in molecular entomology. Mol. Ento. Workshop. Centre for Tropmed. UGM.
- Snow, RW and HM. Gilles. 2004. The epidemiology of malaria. In Warrel, D and HM. Gilles. 2004. Essential malariology.
- Song W, PJ. Yun, WX. Zhong, ZS. Sen, ZG. Qing, L. Qian and TL. Hua. 2009. *An. pseudowilmori* is the predominant malaria vector in Motuo County, Tibet Autonomous Region. Malaria J. 8:46
- Subbarao, SK. 1998. Anopheline species complexes in South-East Asia. Technical Publication, WHO SEARO. No. 18: 82p.
- Sumantri RA dan DT. Iskandar. 2005. Kajian keberagaman genetic nyamuk *An. barbirostris* dan *An. vagus* di dua daerah endemik penyakit malaria di Jawa Barat. J. Matematika dan Sains. 10(2): 37-44).

Tandon, N. 1998. Modern trends in research on vectors of medical importance. Adv. Med. Entomol. & Human welfare. 29-37p.

Tuimala J., 2006. A primer to phylogenetic analysis using the PHYLIP package. Scientific Computing Ltd. 5th Ed.

Unadi YC, I. Narayani, IK. Junitha. 2010. Variasi genetic suku Batak yang tinggal di Kota Denpasar dan Kabupaten Badung berdasarkan tiga lokus mikrosatelit DNA autosom. J. Biologi XIV (1) : 33 – 38

Walton C, P. Somboon, SM Loughlin, S. Zhang, RE. Harbach, YM. Linton, B. Chen, K. Nolan, S. Dong, MY. Fong, I. Vythilingum, ZD. Mohammed, Ho Dinh Trung, and RK. Butlin. 2007. Genetic diversity and molecular identification of mosquito species in the *Anopheles maculatus* group using the ITS2 region of rDNA. Infection, genetics and evolution 7: 93-102

WHO. 1992. Entomological field techniques for malaria control. Part I: Learner's guide. 78 p

WHO. 1994. Entomological laboratory techniques for malaria control. Part I: Learner's guide. 160 p

Wilkerson RC, TJ. Parson, DG. Albright, TA. Klein and MJ. Braun. 1993. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers readily distinguish cryptic mosquito species (Diptera: Culicidae: *Anopheles*). Insect Mol. Biol. 1(4): 205-211.

Williams, JGK, Hanafey. MK, Rafalski JA and Tingey, SV. 1990. Genetic analysis using RAPD markers. Meth. Enzymol 728: 704-740.

Wirtz RA., TR. Burkot, PM. Graves and RG. Andre. 1987. Field evaluation of Elisa for *P. falciparum* and *P. vivax* sporozoit in mosquitoes (Diptera: Culicidae) from Papua New Guinea. J. Med. Entomol. 24(4):433-437.

Wirtz RA, F. Savala, Y. Charoenvit, GH. Campbell, TR. Burkot, I. Schneider, KM. Esser, RL. Beaudoin, and RG. Andre. 1987. Comparatif testing of monoclonal antibodies against *P. falciparum* sporozoites. For Elisa development. Bull. of the WHO, 65(1):39-45

Wirtz RA. 2009. Sporozoit Eliza directions. CDC and Prevention. Atlanta, GA. 12 p.

Yatim, W. 2003. Biologi modern, biologi sel. Penerbit Transito, Bandung, 92-102

Yuwono T. 2006. Teori dan aplikasi Polymerase Chain Reaction. Panduan eksperimen PCR untuk memecahkan masalah biologi terkini. Penerbit Andi, Yogyakarta. 340 hal.

XIX. LEMBAR PENGESAHAN

Salatiga, 16 Januari 2012

Ketua pelaksana,



Dra. Umi Widyastuti, MKes

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Ketua Panitia Pembina Ilmiah (PPI) B2P2VRP dan Kepala Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Vektor dan Reservoir Penyakit Salatiga menyatakan bahwa Laporan Akhir Penelitian “**STUDI KEANEKARAGAMAN GENETIK *Anopheles maculatus* DI BEBERAPA DAERAH DI INDONESIA**” telah dapat disetujui sesuai ketentuan yang berlaku.

Menyetujui :

Ketua PPI B2P2VRP



(Dra. Blondine Ch.P M.Kes)
NIP. 194903251976112001

Kepala B2P2VRP



(Drs. Bambang Heriyanto, MKes)
NIP. 195406201981101002

LAMPTRAN 1.

Besar sampel menurut besar populasi

Populasi	Sampel
5	5
10	10
15	14
20	19
25	24
30	28
35	32
40	36
45	40
50	44
55	48
60	52
65	56
70	59
75	63
80	66
85	70
90	73
95	76
100	80
110	86
120	92
130	97
140	103
150	108
160	113
170	118
180	123
190	127
200	132
210	136
220	140
230	144
240	148
250	152
260	155
270	159
280	162
290	165

300	169
320	175
340	181
360	186
380	191
400	192
420	196
440	201
460	205
480	210
484	214
500	217
550	226
600	234
650	242
700	248
750	254
800	260
850	265
900	269
950	274
1000	278
1100	285
1200	291
1300	297
1400	302
1500	306
1600	310
1700	313
1800	317
1900	320
2000	322
2200	327
2400	331
2600	335
2800	338
3000	341
3500	346
4000	351
4500	354
5000	357
6000	361
7000	364
8000	367

9000	368
10000	370
15000	375
20000	377
30000	379
40000	380
50000	381
75000	382
100000	382
1000000	384

Dari Metodologi Penelitian Sosial dan Pendidikan (Sumanto 1995)
(<http://blog.re.or.id/cara-menentukan-besarnya-sampel-sample-size.htm>)



KEMENTERIAN KESEHATAN
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN

Jalan Percetakan Negara No. 29 Jakarta 10560 Kotak Pos 1226

Telepon: (021) 4261088 Faksimile: (021) 4243933

E-mail: sesban@litbang.depkes.go.id, Website: <http://www.litbang.depkes.go.id>

PEMBEBASAN PERSETUJUAN ETIK (EXEMPTED)

Nomor: KE.OI.03/EC/037/2011

Yang bertanda tangan di bawah ini, Ketua Komisi Etik Penelitian Kesehatan Badan Litbang Kesehatan, setelah dilaksanakan pembahasan dan penilaian, dengan ini memutuskan protokol penelitian yang berjudul :

"Studi Keanekaragaman Genetik Anopheles maculatus di beberapa daerah di Indonesia"

dengan Ketua Pelaksana/Peneliti Utama: **Dra. Umi Widyastuti, M.Kes**

dapat dibebaskan dari keharusan memperoleh persetujuan etik (*Exempted*) untuk pelaksanaan penelitian tersebut. Pembebasan ini berlaku sejak dimulai dilaksanakannya penelitian tersebut di atas sampai dengan selesai sesuai yang tercantum dalam protokol.

Walaupun demikian kami mengingatkan bahwa dalam pelaksanaan penelitian ini, peneliti tetap diminta untuk menjaga dan menghormati martabat manusia yang menjadi responden/informan dalam penelitian ini. Dengan demikian diharapkan masyarakat luas dapat memperoleh manfaat yang baik dari penelitian ini.

Pada akhir penelitian, laporan pelaksanaan penelitian harus diserahkan kepada KEPK-BPPK. Jika ada perubahan protokol dan / atau perpanjangan penelitian, harus mengajukan kembali permohonan kajian etik penelitian (amandemen protokol).

Jakarta, 8 Maret 2011

Ketua
Komisi Etik Penelitian Kesehatan
Badan Litbang Kesehatan,

Prof. Dr. M. Sudomo

Hai terakhir