

LAPORAN PENELITIAN

ANALISIS RAPD (RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA) DARI NYAMUK *Aedes aegypti* DARI KOTAMADYA BANDUNG



MILIK PERPUSTAKAAN UNIV. NEGERI PADANG	
DITERIMA TGL. :	21-3-2
SUMBER/HARGA :	100 1
KOLEKSI :	R
NO. INVENTARIS :	4002/R/2000-0202
KLASIFIKASI :	595.771 ANG

MILIK PERPUSTAKAAN
UNIV. NEGERI PADANG

Oleh

Dra. Evita Anggereini, M.Si

Penelitian ini dibiayai oleh :

Proyek Pengkajian dan Penelitian Ilmu Pengetahuan Terapan
Sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Penelitian
Nomor : 019/P2IPT/DPPM/LITMUD/V/1998 Tanggal 20 Mei 1998
Direktorat Pembinaan Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat
Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi
Departemen Pendidikan dan Kebudayaan

INSTITUT KEGURUAN DAN ILMU PENDIDIKAN PADANG
1999

LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR HASIL
PENELITIAN DOSEN MUDA

- 1a. Judul penelitian : Analisis RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA) dari nyamuk *Aedes aegypti* dari Kotamadya Bandung
- b. Bidang Ilmu : MIPA (Biologi)
- c. Kategori : II
-
2. Ketua Penelitian
- a. Nama Lengkap : Dra. Evita Anggereini, M.Si
- b. Jenis Kelamin : Wanita
- c. Pangkat Gol/NIP : Penata Muda IIIa/131953673
- d. Jabatan Fungsional : Asisten Ahli Madya
- e. Jabatan Struktural : -
- f. Fakultas/Jurusan : FPMIPA Biologi
- g. Pusat Penelitian : IKIP Padang
3. Jumlah Tim Peneliti : 1 orang
- a. Nama Anggota Peneliti : Dra. Evita Anggereini, M.Si
4. Tempat Penelitian : Lab. Entomologi dan lab. Genetika Jurusan Biologi FMIPA dan PAU Ilmu Hayati ITB.
5. Kerjasama dengan Institusi Lain
- a. Nama Institusi : ITB
- b. Alamat : Jl. Ganesa no 10 Bandung
6. Lama Penelitian : 10 bulan
7. Biaya dan Sumber Dana : Rp. 5.331.500,- , Dikti

Padang, Maret 1999

Mengetahui

Ketua Peneliti

Dekan FPMIPA IKIP Padang



Ali Amran, MPd, M.A.Ph.D
130 343 264

Dra. Evita Anggereini, M.Si
NIP. 131 953 673

Menyetujui

Ketua Lembaga Penelitian



Dr. Kumaidi, M.A
NIP. 130 605 231

RINGKASAN

Analisis RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA) dari nyamuk *Aedes aegypti* dari Kotamadya Bandung
(Evita Anggereini, 1999, 59 halaman)

Aedes aegypti merupakan nyamuk yang telah menimbulkan masalah serius bagi kesehatan masyarakat sehubungan dengan peranannya sebagai vektor demam berdarah. Penyakit ini telah tersebar keseluruh daerah Bandung. Dari seluruh daerah tersebut ada daerah yang tingkat serangan penyakit demam berdarahnya selalu tinggi, walaupun telah dilakukan program pengendalian terhadap vektor tersebut.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui status resistensi dan tingkat polimorfisme DNA nyamuk *Aedes aegypti* sebagai vektor penyakit demam berdarah dengue di Kotamadya Bandung, Jawa Barat. Nyamuk tersebut dikoleksi dari Sukajadi, Padasuka (daerah endemis), Cibiru dan Tamblong (daerah non endemis), berdasarkan data mengenai tingkat serangan demam berdarah dari Dinas Kesehatan Kotamadya Bandung. Digunakan uji resistensi menurut standar WHO dan uji esterase. Metoda Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) digunakan untuk mengetahui tingkat polimorfisme DNA nyamuk *Aedes aegypti*. Enam oligonukleotida digunakan sebagai primer RAPD. *Ae. aegypti* dari NAVIRU (Naval Medical Research Unit, USA / Departemen Kesehatan RI) digunakan untuk pembandingan.

Hasil uji resistensi menunjukkan bahwa nyamuk *Aedes aegypti* dari Sukajadi, Padasuka, Cibiru dan Tamblong belum menunjukkan gejala resiten terhadap insektisida malathion. Analisis kualitatif RAPD menunjukkan bahwa tingkat polimorfisme antara individu nyamuk *Ae. aegypti* dalam setiap lokasi Sukajadi, Padasuka, Tamblong dan Cibiru 74 %, 80%, 72% dan 66%. Analisis seluruh larik DNA nyamuk *Ae. aegypti* dari semua lokasi di Bandung

mengindikasikan bahwa tingkat polimorfisme DNA *Ae. aegypti* dari Sukajadi (96.4%), Padasuka (95.3%), Cibiru (94.1%) dan Tamblong (94%). Hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa primer oligonukleotida OPE 19 memberikan larik DNA yang spesifik untuk nyamuk NAMRU dengan ukuran 760 bp. Total ukuran larik DNA nyamuk yang dapat di amplifikasi berkisar 310 - 26140 bp. Analisis kuantitatif RAPD dengan menggunakan gabungan seluruh primer menunjukkan bahwa nyamuk *Ae. aegypti* yang berasal dari Bandung (Sukajadi, Padasuka, Tamblong dan Cibiru) membentuk kelompok yang terpisah dari nyamuk NAMRU. Sedangkan *Ae. aegypti* dari Sukajadi, Padasuka, dan Cibiru tidak menunjukkan suatu pola pengelompokan yang sistematis sehubungan dengan lokasi nyamuk dari Tamblong membentuk kelompok yang lain dan memperlihatkan indeks kesamaan yang lebih tinggi dari nyamuk lain.

SUMMARY

Analysis of RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) of *Aedes aegypti*
Mosquito from Bandung
(Evita Anggereini, 1999, page , 59)

Aedes aegypti , dengue vector is mosquito which made serious problem for society health. Dengue disease was distributed to all Bandung area. From all area, there is area which higher attack than other area, although have done controlling programe to vectors.

Object of the research to know resistance and DNA level polymorphism of *Aedes aegypti* from Bandung. The mosquitoes were collected from Sukajadi and Padasuka (endemic area), Cibiru and Tamblong (non endemic area), based on the data of dengue risk area from "Dinas Kesehatan Kotamadya Bandung". Resistance test based on WHO standard and esterase test has been used. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) method has been used to identify the level polymorphism of *Aedes aegypti*, a dengue vector from Bandung, West Java. Six oligonucleotides were used as RAPD's primer. *Ae. aegypti* from NAMRU (Naval Medical Research Unit, USA Department of Health RI) was used for comparison.

The result of resistance test showed that mosquitoes from Sukajadi, Padasuka, Cibiru and Tamblong is not tersitance yet. The result of RAPD qualitative analysis showed that the individual polymorphism level of mosquitoes from Sukajadi, Padasuka, Cibiru and Tamblong were 74 %, 80%, 72% and 66% respectively. Analysis of all DNA bands based on all areas in Bandung, indicates that polymorphism level of *Ae. aegypti* from Sukajadi (96,4%) and Padasuka (95.3%) areas were higher than Cibiru (94.1%) and Tamblong (94.0%). The results of these study indicated that oligonucleotides primer of OPE 19 gave a specific band for NAMRU mosquitoes with a size of 760 bp. The total yield of mosquitoes DNA band ranged from 310 to 26140 bp. RAPD quantitative analysis

using all primer showed that Bandung mosquitoes formed a separate group from NAMRU mosquito. However *Ae. aegypti* population from Sukajadi, Padasuka and Cibiru did not showed a systematic grouping pattern and among the sampling area, the Tamblong mosquitoes formed another group and showed a higher similarity index.

PENGANTAR

Kegiatan penelitian merupakan bagian dari darma perguruan tinggi, di samping pendidikan dan pengabdian kepada Masyarakat. Kegiatan penelitian ini harus dilaksanakan oleh IKIP Padang yang dikerjakan oleh staf akademiknya dalam rangka meningkatkan mutu pendidikan, melalui peningkatan mutu staf akademik, baik sebagai dosen maupun peneliti.

Kegiatan penelitian ini mendukung pengembangan ilmu serta terapannya. Dalam hal ini, Lembaga Penelitian IKIP Padang berusaha mendorong dosen untuk melakukan penelitian sebagai bagian yang tidak terpisahkan dari kegiatan mengajarnya, baik yang secara langsung dibiayai oleh dana IKIP Padang maupun dana dari sumber lain yang relevan atau bekerja sama dengan instansi terkait. Oleh karena itu, peningkatan mutu tenaga akademik peneliti dan hasil penelitiannya dilakukan sesuai dengan tingkatan serta kewenangan akademik peneliti.

Kami menyambut gembira usaha yang dilakukan peneliti untuk menjawab berbagai permasalahan pendidikan, baik yang bersifat interaksi berbagai faktor yang mempengaruhi praktek kependidikan, penguasaan materi bidang studi, ataupun proses pengajaran dalam kelas yang salah satunya muncul dalam kajian ini. Hasil penelitian seperti ini jelas menambah wawasan dan pemahaman kita tentang proses pendidikan. Walaupun hasil penelitian ini mungkin masih menunjukkan beberapa kelemahan, namun saya yakin hasilnya dapat dipakai sebagai bagian dari upaya peningkatan mutu pendidikan pada umumnya. Kami mengharapkan di masa yang akan datang semakin banyak penelitian yang hasilnya dapat langsung diterapkan dalam peningkatan dan pengembangan teori dan praktek kependidikan.

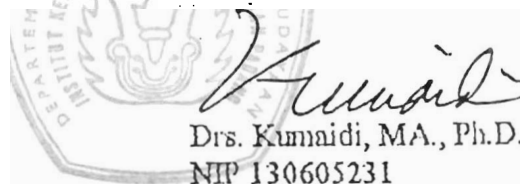
Hasil penelitian ini telah ditelaah oleh tim pereviu usul dan laporan penelitian Lembaga Penelitian IKIP Padang, yang dilakukan secara "blind reviewing". Kemudian diseminarkan yang melibatkan dosen fakultas IKIP Padang untuk tujuan diseminasi. Mudah-mudahan penelitian ini bermanfaat bagi pengembangan ilmu pada umumnya dan peningkatan mutu staf akademik IKIP Padang.

Pada kesempatan ini kami ingin mengucapkan terima kasih kepada berbagai pihak yang membantu terlaksananya penelitian ini, terutama pada Proyek Peningkatan Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, lembaga terkait yang menjadi objek penelitian, responden yang menjadi sampel penelitian, dan tim pereviu Lembaga Penelitian IKIP Padang yang telah memberi masukan untuk penyempurnaan laporan penelitian ini. Kami yakin tanpa dedikasi dan kerjasama yang terjalin selama ini, penelitian ini tidak akan dapat diselesaikan sebagaimana yang diharapkan, kerjasama yang baik ini diharapkan akan menjadi lebih baik lagi di masa yang akan datang.

Terima kasih.

Padang, Maret 1999

Ketua Lembaga Penelitian
IKIP Padang,



Drs. Kumaidi, MA., Ph.D.
NIP 130605231

DAFTAR ISI

	HALAMAN
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN.....	i
RINGKASAN.....	ii
SUMMARY.....	iv
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
BAB I. PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang.....	1
B. Rumusan Masalah.....	5
C. Tujuan Penelitian.....	5
D. Kegunaan Penelitian.....	5
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	
A. Biologi Nyamuk <i>Aedes aegypti</i>	6
B. Siklus Hidup dan Perilaku Nyamuk Dewasa.....	8
C Resistensi.....	10
D. Polimorfisme DNA dan Keanekaragaman Genetik.....	12
E. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).....	14
BAB III. METODOLOGI PENELITIAN	
A. Pengadaan Serangga Uji, Nyamuk <i>Aedes aegypti</i>	21
B. Uji Resistensi Nyamuk <i>Aedes aegypti</i>	23
C. Isolasi DNA.....	24
D. PCR	25
E. Elektroforesis.....	27
F. Penghitungan Produk RAPD	27
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	
A. Hasil.....	30

	B. Pembahasan.....	
BAB V.	KESIMPULAN.....	55
	DAFTAR PUSTAKA.....	56
	LAMPIRAN.....	59

DAFTAR TABEL

	hal
Tabel 1. Komposisi Reaksi PCR	26
Tabel 2. Hasil Uji Resistensi Standar WHO.....	30
Tabel 3. Hasil Interpretasi Larik DNA OPE 16.....	35
Tabel 4. Hasil Interpretasi Larik DNA OPE 17.....	37
Tabel 5. Hasil Interpretasi Larik DNA OPE 19.....	38
Tabel 6. Hasil Interpretasi Larik DNA OPF 2.....	40
Tabel 7. Hasil Interpretasi Larik DNA OPF 4.....	41
Tabel 8. Hasil Interpretasi Larik DNA OPF 6.....	42
Tabel 9. Perbandingan Persentase Pola Larik DNA yang Monomorfisme dan Polimorfisme Dalam Setiap Lokasi Sampel Nyamuk <i>Ae. aegypti</i>	44
Tabel 10. Perbandingan Persentase Larik DNA yang Monomorfisme dan Polimorfisme Seluruh Lokasi Sampel Nyamuk <i>Ae. aegypti</i> di Bandung.....	45
Tabel 11. Perbandingan Persentase Larik DNA yang Monomorfisme dan Polimorfisme Pada Keseluruhan Sampel Nyamuk <i>Ae. aegypti</i> dari Bandung dan NAMRU.....	47

DAFTAR GAMBAR

	hal
Gambar 1. Hasil Uji Esterase Nyamuk <i>Ae. aegypti</i>	30
Gambar 2. Elektroferogram OPE 16	35
Gambar 3. Elektroferogram OPE 17.....	36
Gambar 4. Elektroferogram OPE 19.....	38
Gambar 5. Elektroferogram OPF 2.....	39
Gambar 6. Elektroferogram OPF 4.....	40
Gambar 7. Elektroferogram OPF 6.....	42
Gambar 8. Dendogram Gabungan Semua Primer	52

DAFTAR LAMPIRAN

A. Peta Lokasi Pengumpulan Sampel.....	hai 59
--	-----------

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

• Penyakit demam berdarah dengue (DBD) merupakan masalah kesehatan yang serius dalam masyarakat. Khususnya di kotamadya Bandung, penyakit ini makin luas penyebarannya sejalan dengan meningkatnya kepadatan penduduk. Tahun 1989-1997 tercatat ada 5291 penderita, meninggal 84 orang. Diketahui penyakit ini telah tersebar luas di dua puluh enam kecamatan (Seksi P2M, 1989-1997). Berdasarkan jumlah kasus DBD dan jumlah wilayah yang endemis, Bandung menempati urutan paling pertama dari seluruh daerah tingkat II yang ada di Jawa Barat.

Untuk tahun 1995-1997 terlihat jumlah kasus demam berdarah dengue di kotamadya Dati II Bandung telah meningkat mencapai lebih dari 200 %. Dari 26 kecamatan tersebut, kecamatan yang paling banyak terserang adalah Anfir, Sukajadi, Cibeunying Kidul dan Kiara Condong. Daerah-daerah ini merupakan daerah endemis, yaitu daerah yang mempunyai "incident rate" kasus penyakit demam berdarah untuk setiap 100 000 penduduk lebih besar dari 5. (Seksi P2M, 1989-1997). Sementara kecamatan yang lain seperti kecamatan Cibiru dan Sumur Bandung merupakan kecamatan yang tingkat serangannya tergolong rendah. Daerah ini selanjutnya disebut daerah non endemis.

Salah satu faktor yang menentukan tingginya kasus tersebut adalah kepadatan vektor (Haymer, D.S. 1995), dalam hal ini *Ae. aegypti*. *Aedes aegypti* merupakan vektor yang dapat menularkan penyakit demam berdarah dengue dari satu penderita

vektor yang dapat menularkan penyakit demam berdarah dengue dari satu penderita ke penderita lain. Usaha pemberantasan vektor tersebut telah dilakukan dengan menggunakan insektisida tetapi tingkat serangan DBD pada daerah-daerah tersebut tetap tinggi. Insektisida yang digunakan untuk mengendalikan vektor ini adalah malathion. Penggunaan insektisida malathion untuk mengendalikan nyamuk *Aedes aegypti* sudah berlangsung lama yaitu sejak tahun 1974. (Seksi P2M, 1989-1997). Penggunaan insektisida tertentu dalam jangka waktu yang lama dapat memberikan peluang timbulnya gejala resistensi.

Berdasarkan hal tersebut timbul pertanyaan apakah nyamuk di daerah yang tingkat serangan DBD lebih tinggi (endemis) telah menunjukkan gejala resisten terhadap insektisida malathion yang digunakan selama ini.

Studi genetik mengenai nyamuk *Aedes aegypti* yang ada di kotamadya Bandung masih relatif sedikit sekali. Agoes R, 1996, menyatakan bahwa pengamatan terhadap keanekaragaman strain *Ae. aegypti* pada lokasi dan habitatnya di kotamadya Bandung harus mendapat perhatian dalam usaha monitoring yang telah ada selama ini.

Ada korelasi antara keanekaragaman dengan adaptasi untuk lulus hidup (Wallis et al, 1984). Organisme yang memiliki keanekaragaman yang lebih bervariasi akan lebih mudah lulus hidup dan berkembang biak dari pada organisme yang kurang bervariasi (Ayala, F.J, 1982). Keanekaragaman diantara individu dapat disebabkan oleh perbedaan genetik. Keanekaragaman yang demikian disebut keanekaragaman genetik.

Berdasarkan hal tersebut perlu kiranya diteliti fenomena genetik yang menyangkut keanekaragaman genetik dari nyamuk masing-masing daerah tersebut yaitu daerah endemis dan daerah non endemis.

Tingkat keanekaragaman genetik dari organisme yang bersangkutan dapat dilakukan dengan analisis DNA. Dengan mengetahui dan membandingkan tingkat polimorfisme DNA nyamuk dari masing-masing daerah tersebut dapat diketahui bagaimana keanekaragaman genetiknya.

Polimorfisme DNA merupakan materi yang sangat akurat untuk analisis genetik beberapa tipe organisme yang berbeda. Dalam hal ini termasuk analisis struktur genetik populasi. Metode-metode yang menghasilkan polimorfisme DNA dapat mengidentifikasi keanekaragaman pada individu secara langsung pada tingkat DNA. Keanekaragaman ini dapat dideteksi dengan metode RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) dan RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Haymer, D.S. 1995).

RAPD merupakan metode untuk mengidentifikasi polimorfisme DNA secara cepat dan efisien. RAPD dapat dengan mudah menghasilkan polimorfisme yang sangat tinggi dari DNA yang diamplifikasinya (Grosberg, R.K, 1996). Dalam metode tersebut oligonukleotida yang pendek bertindak sebagai primer melalui pengikatan daerah yang komplement dan memulai proses amplifikasi daerah-daerah yang spesifik dari genom dengan menggunakan reaksi PCR (Polymerase Chain Reaction). Urutan DNA yang diamplifikasi ini dapat menunjukkan polimorfisme dan pola inilah nantinya yang digunakan untuk analisis genetik.

RAPD merupakan metode yang efektif untuk membedakan organisme menurut pola larik DNANYA (Rollinson,D, 1996). Metode ini digunakan untuk mengetahui polimorfisme DNA yang dapat digunakan sebagai penanda genetik dan untuk menentukan hubungan kekerabatan pada bermacam-macam spesies serangga. (Rollinson, D, 1996).

Dalam melakukan analisis RAPD , DNA genom dijadikan subjek untuk PCR dengan menggunakan oligonukleotida sintetik pendek yang urutannya random. Umumnya para peneliti menyetujui bahwa pendekatan ini lebih cepat dan lebih sederhana dari analisis RFLP melalui "Southern Blotting" dan sekuensing DNA. Selain itu juga hemat waktu dan material. Hemat waktu yang dimaksudkan disini karena waktu yang dibutuhkan mulai dari persiapan protocol RAPD dari organisme tersebut dapat kurang dari 24 jam. Materi DNA yang dibutuhkan juga sangat sedikit, dengan reaksi satu primer hanya menggunakan 5-50 ng DNA, tidak seperti metode-metode molekuler yang lainnya (Wilkerson,R.C, 1993). Analisis RAPD dapat digabungkan dengan studi DNA lainnya dan studi ini dapat menunjukkan bahwa analisis RAPD, analisis kromosom dan analisis allozime pada individu yang sama menghasilkan pola yang sejalan dan saling mendukung.

Sehubungan dengan permasalahan penelitian diatas dan berdasarkan kemudahan-kemudahan dan kegunaan-kegunaan dari metode RAPD maka digunakanlah metode RAPD untuk menjawab permasalahan tingkat polimorfisme DNA dari nyamuk *Ae. aegypti* yang ada di kodya Bandung.

B. Rumusan Masalah

Permasalahan dalam penelitian ini dapat dirumuskan sebagai berikut : apakah nyamuk *Aedes aegypti* dari Sukajadi, Padasuka, Cibiru dan Tamblong telah menunjukkan gejala resistensi dan bagaimana tingkat polimorfisme DNA nyamuk dari masing-masing lokasi tersebut.

C. Tujuan Penelitian

Sesuai dengan latar belakang penelitian, analisis tingkat polimorfisme DNA *Ae. aegypti* dirasakan sangat perlu dilakukan. Dari kenyataan adanya lokasi-lokasi di kotamadya Bandung yang tingkat endemisitasnya bervariasi.

Maka tujuan penelitian ini adalah :

1. Untuk mengetahui apakah nyamuk *Aedes aegypti* dari Sukajadi, Padasuka, Cibiru dan Tamblong telah menunjukkan gejala resistensi.
2. Untuk mengetahui tingkat polimorfisme DNA sampel nyamuk *Aedes aegypti* dari Sukajadi, Padasuka, Tamblong dan Cibiru.

D. Kegunaan Penelitian

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat berguna untuk :

Memberikan sumbangan pemikiran bagi pihak Dinas Kesehatan Kota dalam mencari alternatif lain dalam mengendalikan nyamuk *Aedes aegypti* yang ada di Kotamadya Bandung.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Biologi Nyamuk *Aedes aegypti*

Nyamuk *Aedes aegypti* termasuk kelas Insecta, ordo Diptera, famili Culicidae dan genus *Aedes*. Serangga ini merupakan spesies yang kosmopolitan dan sangat terkenal karena kemampuannya menyebarkan penyakit. Tubuh nyamuk ini relatif kecil dan ramping, ukurannya berkisar 4 mm-6 mm, sebagaimana ciri nyamuk yang lain. Nyamuk jantan tidak dapat menggigit karena maksila dan mandibula biasanya ukurannya tereduksi atau mandibulanya tidak ada.

Famili Culicidae berbeda dengan famili lain karena fase larvanya akuatik dan dapat dikarakteristik melalui venasi sayap. Terdapat sisik sepanjang venasi sayap dan probosis yang panjang. Telur *Ae. aegypti* biasanya berwarna hitam dan berbentuk oval. Ukuran telur panjangnya 1mm atau kurang (Service, M.W, 1996). Telur *Aedes* dapat bertahan selama beberapa bulan. Pada beberapa spesies nyamuk *Aedes* telur dapat bertahan dalam jangka waktu yang cukup lama.

Larva *Ae. aegypti* dapat di bedakan dari semua serangga akuatik lainnya yaitu kakinya tidak berkembang dan mempunyai toraks yang lebih bulat dan lebih luas dari kepala dan abdomen. Dalam siklus hidupnya larva *Ae. aegypti* mengalami 4 kali pergantian kulit. Semua larva membutuhkan air untuk berkembang walau pun larva dapat lulus hidup dalam jangka waktu pendek seperti dalam lumpur yang basah. Udara atmosfer diambil melalui sepasang spirakel yang terletak sebelah dorsal pada segmen abdomen kesepuluh. Larva memakan ragi, bakteri, protozoa

dorsal pada segmen abdomen kesepuluh. Larva memakan ragi, bakteri, protozoa dan sejumlah mikroorganisme dan tanaman yang terdapat dalam air. Identifikasi *Ae. aegypti* untuk membedakan dengan nyamuk *Aedes* yang lain dapat dilakukan pada fase larva ini. Untuk daerah tropika lamanya perkembangan larva dari telur sampai pupa adalah 5-7 hari, tetapi banyak yang 7-14 hari (Service, M.W, 1996). Pada daerah temperata periode larva dapat menjadi beberapa minggu atau beberapa bulan.

Semua pupa nyamuk bersifat akuatik dan berbentuk "koma". Kepala dan toraks bergabung membentuk cephalothoraks. Pada cephalothoraks terdapat sepasang terompet respirasi pada bagian dorsal. Abdomen terdiri dari sepuluh segmen. Setiap segmen abdomen memiliki sejumlah rambut yang pendek. Pupa tidak melakukan kegiatan makan tetapi kebanyakan waktu mereka dihabiskan pada permukaan air untuk mengambil udara melalui terompet respirasinya. Jika diganggu pupa tersebut akan berenang ke atas dan ke bawah dengan gerakan yang menyentak-nyentak. Periode pupa pada daerah tropika hanya 2-3 hari tetapi pada daerah temperata dapat mencapai 9-12 hari atau lebih lama lagi (Service, M.W, 1996). Pupa merupakan fase yang kurang sensitif terhadap berbagai perubahan lingkungan dibandingkan dengan fase larva. Pupasi nyamuk jantan lebih awal dari nyamuk betina. Ukuran pupa nyamuk jantan lebih kecil dari pupa nyamuk betina.

Spesies *Ae. aegypti* mudah dikenali karena terdapat tanda yang berwarna keperakan berbentuk "lyre" pada seutuhnya. Lyre ini berbentuk bulan sabit,

sehingga spesies ini dapat dengan mudah dibedakan dengan spesies lainnya. Tubuh dan kaki memiliki sisik yang berwarna putih keperak-perakan. Jenis kelamin nyamuk dapat ditentukan dari bentuk antenanya. Antena jantan memiliki bentuk plumosa dengan bulu lateral yang panjang dan lebat sedangkan yang betina hanya mempunyai sedikit rambut pendek. Nyamuk betina mempunyai palpus yang sangat pendek dan ujungnya berwarna putih. Abdomen terdiri dari delapan segmen, dimana segmen kedelapan bentuknya sangat kecil dan berwarna hitam tanpa bintik putih. Ukuran tubuh nyamuk *Ae. aegypti* betina lebih besar bila dibandingkan dengan nyamuk jantan. Rata-rata usia nyamuk betina dewasa di daerah tropika berkisar 1-2 minggu sedangkan di daerah temperata sekitar 3-4 minggu.

B. Siklus Hidup dan Perilaku Nyamuk Dewasa

Nyamuk *Ae. aegypti* yang berumur 2 hari sudah dapat melakukan perkawinan. Spermatozoa disalurkan ke dalam spermateka betina untuk membuahi semua telur yang terdapat selama siklus hidupnya. Hanya satu kali perkawinan dan inseminasi per betina yang dibutuhkan. Nyamuk betina menggigit inangnya dan menghisap darah yang nantinya diperlukan untuk nutrisi bagi perkembangan telur di ovarium. Kecepatan untuk mencernakan darah tergantung pada temperatur. Nyamuk dari daerah tropika hanya membutuhkan waktu 2-3 hari mencernakan darah yang dihisapnya, tetapi untuk daerah temperata darah dicerna selama 7-14 hari.



Setelah menghisap darah abdomen nyamuk kelihatan membesar dan berwarna merah, tetapi beberapa jam kemudian abdomen menjadi berwarna merah gelap. Selama proses pencernaan darah, ovarium akan terlihat membesar, abdomen posterior berwarna keputih-putihan sedangkan abdomen anterior berwarna merah gelap. Kondisi ini menggambarkan titik tengah pencernaan darah dan perkembangan telur dalam ovarium dan nyamuk dalam keadaan tersebut disebut nyamuk yang setengah gravid (Service, M.W, 1996).

Setelah semua darah dicernakan, abdomen membesar dan berwarna keputih-putihan karena terbentuknya telur matang yang sudah penuh. Betina dalam keadaan ini disebut betina yang gravid dan nyamuk betina tersebut mencari habitat larva yang cocok untuk meletakkan telurnya. Setelah oviposisi nyamuk betina makan darah lagi dan 2-3 hari kemudian sejumlah telur dimatangkan lagi. Proses makan darah dan pematangan telur diikuti kemudian dengan oviposisi, diulangi beberapa kali selama nyamuk betina itu hidup. Siklus ini disebut siklus gonotropik.

Walaupun nyamuk jantan mempunyai probosis yang menyolok, mandibula dan maksila tidak cukup berkembang untuk menembus kulit dan mengisap darah. Sebagai gantinya nyamuk jantan mengisap nektar bunga dan sekresi gula alamiah lainnya. Dengan struktur seperti ini maka nyamuk jantan tidak dapat mentransmisikan penyakit. Nyamuk betina juga makan substansi gula untuk memperoleh energi yang berguna untuk terbang dan menyebar. Siklus hidup nyamuk *Ae. aegypti* dari telur sampai dewasa dapat berlangsung cepat sekitar 7

hari, tetapi biasanya 10-12 hari. Pada spesies temperata siklus hidupnya dapat mencapai waktu beberapa minggu bahkan beberapa bulan.

Nyamuk betina tertarik kepada inangnya karena stimuli yang keluar dari inang seperti panas, CO₂, bau badan dan lain-lain. Tingkah laku menggigit dari nyamuk betina sangat penting dalam epidemiologi penyebaran penyakit. Nyamuk spesies-spesies *Aedes* dapat menggigit inangnya sepanjang hari atau awal malam hari. Tetapi yang paling aktif menggigit pada pagi dan sore hari terutama bila cuaca mendung atau hampir hujan (Seksi P2M, 1989-1997). Tingkah laku makan nyamuk jenis ini dapat berubah karena pengaruh musim (Service, M.W, 1996). Setelah menggigit manusia atau inangnya, nyamuk mencari tempat peristirahatan untuk tinggal disana selama pencernaan darah berlangsung.

Vektor nyamuk demam berdarah jarang melakukan perjalanan jauh lebih dari beberapa ratus meter dari tempat dimana mereka menetas (Bebeee, N.W, 1995). Oleh sebab itu nyamuk ini tergolong hewan yang memiliki jarak terbang pendek.

C. Resistensi

Pemakaian insektisida secara tetap dan intensif pada suatu populasi serangga, akan memungkinkan terjadinya perkembangan kearah resisten, dimana populasi serangga tersebut tidak lagi dapat dikendalikan oleh dosis biasa. Resistensi timbul karena pada dasarnya populasi serangga terdiri dari individu-individu yang bervariasi daya tahannya terhadap insektisida. Variasi ini dapat timbul karena pengaruh lingkungan seperti nutrisi, parasitisme, patogen, insektisida dan lain-lain

ataupun terjadi secara genetik, variasi ini menyebabkan perlakuan insektisida tidak pernah dapat membunuh 100% suatu populasi serangga tersebut. (Matsumura, 1985).

Salah satu jenis insektisida yang digunakan untuk mengendalikan serangga hama adalah malathion. Malathion merupakan insektisida yang relatif aman terhadap organisme non target dan termasuk golongan organophosphat kelas 2 (Pedigo, 1989). Malathion efektif untuk mengendalikan banyak serangga dan aman bagi manusia dan hewan lain karena insektisida tersebut mudah terdegradasi menjadi senyawa non toksik. (Pedigo, 1989). Dari hasil penelitian Mardihusodo, 1992, ternyata telah terjadi resistensi nyamuk *Ae. aegypti* terhadap malathion di Mergangsan, Yogyakarta. Faktor penting dalam mekanisme resisten adalah : Mixed-Function Oxidation (MFO), esterase dan glutathionin S transferase (Matsumura, 1985).

Peningkatan aktivitas esterase adalah mekanisme umum resistensi, khususnya terhadap organophosphat (Pedigo, 1989). Pada nyamuk terdapat hubungan yang sangat erat antara resistensi dengan kelebihan produksi esterase (Devonshire, 1989). Esterase memegang peranan penting dalam mendegradasi insektisida organophosphat, oleh karena itu memberikan andil yang besar terhadap munculnya serangga yang resisten. Peningkatan produksi esterase diakibatkan oleh amplifikasi gen esterase, sehingga serangga yang resisten mengandung kopi gen yang lebih banyak dari serangga yang rentan (Georghiou, 1989).

D. Polimorfisme DNA dan Keanekaragaman Genetik

Keanekaragaman atau variasi pada suatu populasi atau spesies merupakan fenomena yang umum terjadi di alam. Setiap anggota dalam populasi akan bervariasi tanggapannya terhadap faktor lingkungan dalam berbagai karakter. Karakter itu dapat terjadi mulai dari tingkat morfologi sampai kepada tingkatan yang lebih mikroskopik. Individu dapat berbeda dalam morfologi, struktur mikroskopik: kromosom, urutan asam amino dari protein dan urutan DNA. Suatu organisme itu dapat berbeda: dalam bentuk individu (polimorfisme fenotip), bentuk organ pada individu yang sama, enzim (polimorfisme protein), substansi darah (polimorfisme biokimia), tingkat DNA dalam hal ini perbedaan dalam urutan nukleotida (polimorfisme DNA). (Passarge, E, 1994).

Pada tingkat morfologi keanekaragaman yang dimiliki individu tersebut dapat dinilai. Karakter morfologi memperlihatkan kategori yang terbatas jumlahnya. Namun adakalanya pengamatan terhadap karakter morfologi suatu organisme menemui kesulitan. Keanekaragaman pada aspek biokimia dapat dideteksi dengan metode elektroforesis protein, seperti penelitian mengenai variasi enzim pada populasi *Ae. aegypti* melalui gel elektroforesis, penelitian mengenai variasi enzim-enzim yang terlibat dalam resistensi nyamuk *Ae. aegypti* (Wallis, G.P, 1984).

Pada tingkat DNA jumlah variasi lebih banyak ditemukan. DNA lebih bervariasi dibandingkan dengan protein (Nei, M, 1983). Keanekaragaman atau

polimorfisme pada tingkat DNA tidak secara langsung dapat dipelajari seperti variasi enzim dan morfologi, karena tidak adanya pengukuran variasi DNA yang cepat.

Beberapa proses yang menghasilkan polimorfisme DNA dalam populasi adalah melalui rekombinasi sehingga dihasilkan kromosom yang baru dengan urutan yang unik dan variasi genetik baru, melalui migrasi individu atau organisme yang datang dari jarak jauh ke suatu lokasi yang sering berbeda genotipnya dengan populasi lokal. Bila terjadi perkawinan dengan individu-individu pada populasi lokal dapat menghasilkan sumber variasi genetik baru bagi keturunan selanjutnya. Sumber variasi genetik berasal dari rekombinasi dan mutasi (Ayala, F.J, 19982). Variasi genetik baru berasal dari perubahan-perubahan pada urutan DNA.

Populasi yang individunya relatif homogen secara genetik akan memiliki daya adaptasi yang kurang terhadap berbagai perubahan lingkungan bila dibandingkan dengan populasi yang keanekaragaman genetiknya lebih banyak. Populasi dengan keanekaragaman genetiknya lebih banyak akan memiliki daya adaptasi yang lebih baik (Passarge,E, 1994). Pada serangga, Hymenoptera, genetiknya kurang beranekaragam dibandingkan serangga lain, sehingga membawa pengaruh yang kurang menguntungkan untuk peluang kelulusan hidupnya. Keanekaragaman genetik yang rendah membuat serangga tersebut lebih sensitif terhadap gangguan lingkungan. Sehingga spesies-spesies dalam ordo tersebut dapat digunakan sebagai indikator untuk memonitor gangguan lingkungan (Mills,P.R, 1994). Hasil penelitian keanekaragaman genetik dengan populasi

Drosophila serrata strain campuran yang memiliki keanekaragaman genetik yang lebih banyak kemudian dibandingkan dengan populasi strain tunggal. Dari hasil pendedahan kepada lingkungan yang baru, ternyata setelah 25 generasi berikutnya jumlah lalat strain campuran dari generasi ke generasi lebih besar dari strain tunggal. Jumlah lalat yang lebih besar ini menggambarkan adaptasi yang lebih baik pada lingkungan baru (Ayala, F.J., 1982).

Pada penelitian dengan *Ae. aegypti*, peningkatan keanekaragaman genetik pada populasi lokal dapat terjadi karena masuknya *Ae. aegypti* dari lokasi lain ke lokasi tersebut. Setiap pemasukan organisme baru akan membawa materi genetik yang baru dan ini membawa pengaruh terhadap kemampuan vektor tersebut, resistensi terhadap insektisida dan adaptasi ekologi (Wallis, et al, 1984).

Dalam jangka waktu panjang daya lulus hidup atau survival akan sangat tergantung pada variasi genetik dalam beradaptasi terhadap perubahan lingkungan. Tetapi dalam penelitian keanekaragaman genetik sering sukar untuk menentukan variasi genetik yang spesifik terhadap variasi lingkungan yang spesifik (Ayala, F.J., 1982).

E. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

RAPD didasari oleh metode PCR untuk menghasilkan berjuta-juta kopi fragmen segmen DNA tertentu. RAPD merupakan suatu metode untuk mengidentifikasi polimorfisme atau keanekaragaman pola larik DNA amplifikasi dan menganalisis variasi genom dari populasi suatu spesies dengan cepat dan efisien (Haymer, D.S., 1994). Keanekaragaman disebut dengan polimorfisme, terjadi bila



primer mengamplifikasi daerah genom yang lebih bervariasi sedangkan monomorfisme bila primer mengamplifikasi daerah genom yang kurang bervariasi. Polimorfisme diantara individu dapat timbul melalui (Haymer, D.S, 1995).

1. perubahan nukleotida yang mencegah terjadinya amplifikasi.
2. delesi pada tempat pelekatan primer
3. insersi yang menyebabkan daerah pelekatan primer terlalu jauh untuk menyokong terjadinya amplifikasi
4. insersi atau delesi yang merubah ukuran dari produk amplifikasi.

Tipe polimorfisme ini membuat penanda RAPD cocok untuk studi mengenai keanekaragaman genetik, hubungan kekerabatan genetik, peta genetik, persilangan tanaman, sidik jari DNA dan populasi genetik (Wallis , et al, 1984).

Teknik ini menggunakan prinsip amplifikasi DNA melalui reaksi PCR untuk menghasilkan banyak kopi segmen DNA dengan menggunakan primer sintetik yang ukurannya pendek (oligonukleotida). Primer tunggal ini akan menginisiasi proses amplifikasi daerah-daerah DNA genom tertentu secara random. Biasanya daerah ini ditemukan dalam kisaran ukuran 0,1-3 kb (Haymer, D.S, 1994). Primer yang bersifat acak ini memiliki kandungan G-C diatas 50 %.

Kunci RAPD bahwa primer digunakan dengan urutan yang acak, primer tidak spesifik untuk gen tertentu atau untuk urutan gen tertentu dan mengikat DNA komplemennya dari bermacam-macam spesimen DNA. Primer yang digunakan tunggal dan mengannealing tempat pelekatan primer (priming site) dengan arah yang berlawanan untuk bisa terjadinya amplifikasi (Grosberg, et al, 1996). Priming

site adalah urutan-urutan nukleotida yang dikenali oleh primer yang selanjutnya ini disebut lokus RAPD. Produk amplifikasi yang dihasilkan dapat dipisahkan menurut ukurannya secara elektroforesis pada gel agarosa dan divisualisasi melalui pewarnaan dengan etidium bromida. Larik-larik DNA yang berbeda ukurannya biasanya mewakili lokus-lokus yang berbeda. Intensitas larik yang dihasilkan juga bisa bervariasi, hal ini disebabkan oleh variasi : jumlah kopi lokus yang diamplifikasi melalui kombinasi primer-template, sejumlah kopi pengulangan tandem urutan yang dapat diamplifikasi dalam lokus tersebut dan interaksi tambahan diantara lokus (Grosberg, et al, 1996).

Tergantung pada jumlah daerah pelekatan primer yang komplemen yang dicampuri pada genom individu tersebut dan panjangnya urutan DNA yang diintervensi, primer dapat mengamplifikasi 0 sampai 30 produk (Grosberg, et al, 1996). Beratus-ratus primer RAPD tersedia secara komersial dari Teknologi Operon Inc. Alameda dan beberapa primer digunakan secara bebas. Banyak penanda polimorfisme bisa diidentifikasi. Species yang berbeda dapat menunjukkan tingkat polimorfisme yang berbeda, sebanding dengan variasi lokus RAPD dan jumlah lokus yang diamplifikasi.

Karena primer RAPD tidak dirancang untuk mengamplifikasi urutan DNA target yang spesifik, lokus yang diamplifikasi tersebar pada genom (William et al, 1990). Umumnya peneliti mengasumsikan bahwa lokus RAPD diamplifikasi hanya jika daerah pelekatan primer melekat sempurna dengan oligonukleotida yang digunakan.



595.771

AN6

92

4992/IC(2000-92(2)

Pengidentifikasian polimorfisme DNA digunakan sebagai penanda genetik untuk membedakan populasi tersebut dan untuk menentukan hubungan kekerabatan pada bermacam-macam tanaman dan spesies serangga. Penanda genetik digunakan untuk menentukan variabilitas genetik diantara spesies yang diselidiki. Metoda RAPD PCR merupakan suatu pendekatan untuk menganalisis polimorfisme DNA dan menganalisis variasi genom dari populasi spesies serangga. Kebanyakan penelitian mempersoalkan pertanyaan yang berhubungan dengan variasi genetik, termasuk penelitian mengenai nyamuk (Kambhampati, et al, 1992).

Khususnya pada serangga, telah dilakukan beberapa penelitian sehubungan dengan metode RAPD. Teknik ini untuk menentukan variabilitas genetik populasi lalat buah dari lokasi geografi yang berbeda. Penggunaan primer yang berbeda dalam metoda RAPD memungkinkan dapat mendeteksi perbedaan-perbedaan tiap populasi (Haymer, D.S, 1994).

Metoda ini juga dapat untuk mengidentifikasi bermacam-macam patogen seperti bakteri, Protozoa, Nematoda, serangga dan nyamuk (Rollinson, et al,1996). Teknik ini cepat, mudah dan hanya membutuhkan sedikit material. Disamping itu tidak membutuhkan informasi urutan nukleotida dari DNA genom yang diselidiki.

Banyak aplikasi analisis RAPD sangat membantu memecahkan masalah taksonomi dan biologi populasi serangga. RAPD juga digunakan untuk membedakan spesies serangga yang tidak bisa dibedakan secara morfologi. Analisis RAPD juga dapat mendeteksi keberadaan parasitoid pada Aphid 6 hari awal post

infeksi (Nei.M. 1983). Metoda ini juga dapat menghasilkan profil diagnosa lima spesies *Aedes*, tentunya fragmen RAPD adalah spesifik spesies (Kamphampati,et al, 1992). Metode RAPD yang berdasarkan PCR digunakan untuk mengidentifikasi dan membedakan spesies dan populasi nyamuk (Kamphampati,et al, 1992). Analisis RAPD sangat efektif untuk membedakan dua spesies nyamuk dan penanda molekul RAPD dapat mengidentifikasi dengan cepat epidemi vektor malaria (Wilkerson,et al, 1993). Analisis ini dapat berguna untuk memonitor dan menentukan keanekaragaman genetik dari benih. Produk RAPD juga berguna untuk pengelompokan genotip yang asalnya tidak diketahui (Hadrys,et al, 1992). Metode ini pertama kali digambarkan oleh William dkk (1990) dengan menggunakan satu primer yang panjangnya 10 basa yang urutan DNA acak dan menghasilkan segmen DNA yang diamplifikasi secara acak yang dikenal sebagai Random Amplified Polymorphic DNA. RAPD berfungsi baik pada kelompok serangga karena ukuran genom serangga relatif besar yang akan meningkatkan penemuan polimorfisme (Kamphampati, et al, 1992).

RAPD melibatkan amplifikasi DNA dengan menggunakan PCR (Polymerase Chain Reaction). RAPD dilakukan tanpa membutuhkan enzim restriksi, "Southern Blotting" ataupun probing. Walaupun demikian perubahan-perubahan kecil kondisi konsentrasi Mg, penyediaan enzim, thermal cycler yang digunakan dapat memberikan pola larik DNA yang berbeda.

Analisis RAPD secara cepat dan efektif dapat mengidentifikasi penanda genetik untuk membedakan spesies -spesies yang berhubungan erat. RAPD

digunakan sebagai alat untuk pembuatan peta genetik, identifikasi strain, spesies, populasi dan sistematik macam-macam organisme. Penanda RAPD dapat membedakan populasi laboratorium yang secara morfologi tidak dapat dibedakan. Penanda genetik ini merupakan alat yang akurat untuk menentukan sumber populasi pada kasus invasi hama (Haymer, D.S, 1995). Metode RAPD merupakan metode yang penting untuk menyelidiki fenomena genetik pada organisme yang tersebar luas pada berbagai macam organisme termasuk bakteri, tanaman tingkat tinggi, vertebrata dan invertebrata termasuk nyamuk dan serangga lainnya (Wilkerson, et al, 1993). Metode ini mengidentifikasi sejumlah besar polimorfisme genetik pada beberapa serangga.

Metoda RAPD dapat :

1. mengidentifikasi polimorfisme DNA sebagai akibat perubahan urutan DNA
2. mendeteksi polimorfisme akibat insersi dan delesi
3. mendeteksi penanda polimorfisme DNA
4. menentukan hubungan kekerabatan
5. menentukan sumber asal geografis dari invasi hama (Haymer, D.S, 1994).
6. melihat fenomena genetik dari strain kultur labor terhadap variasi panjangnya waktu (Haymer, D.S, 1995).

Menurut (Grosberg, et al, 1996) beberapa faktor yang mempengaruhi spesifisitas dan efisiensi interaksi primer dengan DNA template adalah sebagai berikut :

1. Jenis atau model thermocycler yang digunakan.

2. Temperatur "annealing"
3. Profil dan waktu denaturasi, "annealing" dan polimerisasi
4. Kombinasi dan konsentrasi primer dan DNA template
5. Konsentrasi dNTPS, Mg^{2+} , *Taq* polymerase

Metode RAPD dapat diaplikasikan pada berbagai bidang ilmu. Salah satunya pada bidang ekologi molekuler, termasuk menentukan identitas taksonomi. Beberapa polimorfisme diidentifikasi dalam penelitian populasi dapat digunakan untuk pembuatan peta pautan pada organisme yang sama (Haymer, D.S, 1994).

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Pengadaan Serangga Uji, Nyamuk *Aedes negypti*.

Pengumpulan sampel nyamuk berupa larvanya di lapangan, dilakukan berdasarkan data dari Dinas Kesehatan Kotamadya Bandung mengenai tingkat kasus demam berdarah di seluruh kecamatan yang ada di kota Bandung. Dari seleksi data dipilih daerah Sukajadi dan Padasuka mewakili daerah yang tingkat serangan penyakit demam berdarahnya tinggi (endemis) dan daerah Cibiru dan Tamblong (non endemis) mewakili daerah yang tingkat serangannya rendah. Peta lokasi ditunjukkan oleh lampiran A.

Pengambilan sampel dilakukan dari rumah ke rumah penduduk bersama petugas puskesmas. Sampel yang diambil berupa larva nyamuk. Kemudian sampel dari 4 lokasi ini dipelihara dan dikembang biakkan di laboratorium. Pengambilan larva nyamuk dilakukan dengan menggunakan pipet. Larva nyamuk diambil dari wadah tempat bersarangnya larva.

Sampel larva nyamuk yang telah terkumpul ini selanjutnya dipelihara di laboratorium, kemudian dilakukan identifikasi. Seringkali nyamuk *Ae. aegypti* keberadaannya bersamaan dengan *Aedes albopictus*, sehingga mungkin saja nyamuk yang tertangkap adalah *Ae. albopictus* yang tentunya hal ini dapat mengganggu dalam analisis pola larik DNA nyamuk tersebut karena tidak satu spesies. Untuk mengantisipasi kejadian demikian maka pengambilan sampel

dilakukan hanya di bak-bak penampungan air yang ada di dalam rumah sebab umumnya habitat *Ae. albopictus* di luar rumah di semak-semak dan kebun.

Untuk lebih memastikan sampel nyamuk yang dipelihara di laboratorium itu benar-benar *Ae. aegypti*, maka dilakukan identifikasi pada larva maupun dewasanya dengan panduan kunci determinasi. Larva yang diamati adalah larva instar IV. Kemudian juga dibandingkan juga dengan nyamuk *Ae. aegypti* yang berasal dari NAMRU

Pemeliharaan untuk larva nyamuk adalah sebagai berikut : telur nyamuk dilembabkan 1 malam dan kemudian direndam 1 malam dengan air kran yang telah diendapkan. Setelah telurnya menetas menjadi larva instar I, maka larva instar I tersebut dipindahkan ke wadah plastik lainnya yang berisi air dan makanan larva berupa suspensi tepung hati ditambah ragi dengan perbandingan 4:1. Setiap hari air beserta makanan larva diganti supaya tidak terjadi fermentasi sehingga bisa mengakibatkan pH air berubah. Demikian seterusnya untuk larva instar II, III dan IV. Bila telah sampai ke pupa, maka pupa dengan segera dipindahkan ke kandang. Dan selanjutnya dibiarkan menjadi dewasa. Biasanya paling lama pupa akan berubah menjadi imago dalam waktu dua hari.

Pemeliharaan untuk nyamuk dewasa : setelah 2 hari keluar dari pupa, maka nyamuk betina diberi makan darah tikus setiap sekali dua hari dan nyamuk jantan dengan larutan gula. Pada mulanya diberi larutan madu tetapi nyamuk lebih menyukai larutan gula dibandingkan dengan madu. Untuk pembuatan perangkap telurnya digunakan kertas saring yang diletakkan pada wadah yang berisi air. Kertas

saring yang telah berisi telur dikeringkan, selanjutnya siap digunakan untuk penetasan berikutnya. Telur pada kertas saring dapat disimpan sampai tiga bulan.

B. Uji Resistensi Nyamuk *Aedes aegypti*

Uji resistensi yang digunakan adalah uji resistensi menurut standar WHO dan uji esterase. Uji resistensi menurut standar WHO digunakan nyamuk dewasa. Tingkat resistensi ditentukan berdasarkan tingkat mortalitas nyamuk. Nyamuk *Aedes aegypti* didedahkan pada konsentrasi standar malathion 5 ‰. Setiap tabung pendedahan berisi *impregnant paper* yang mengandung malathion 5‰. Nyamuk uji dimasukkan ke dalam tabung pendedahan sebanyak 20 ekor nyamuk betina, dengan aspirator. Setelah nyamuk didedahkan selama 1 jam, nyamuk tersebut di pindahkan ke dalam tabung pemulihan dan dibiarkan selama 24 jam. Penghitungan mortalitas nyamuk dilakukan setelah 24 jam.

Untuk uji esterase nyamuk dewasa digerus terlebih dahulu. Nyamuk yang telah digerus dimasukkan ke dalam setiap lubang *plate*. Lubang ditutup dengan kertas *tissue*. Cairan yang terdapat pada kertas dipipet dan selanjutnya ditotolkan pada kertas *impregnant*. Kertas *impregnant* yang telah ditotol tersebut dimasukkan ke dalam larutan *buffer phosphate*. Kertas direndam dengan larutan Fast Garnet GBC setelah dikeringkan selama 1 menit. Akhirnya kertas tersebut direndam ke dalam *aquades* kemudian dikeringkan. Intensitas warna yang timbul diamati.

Untuk setiap sampel individu nyamuk dilakukan tiga kali ulangan untuk setiap daerah Sukajadi, Padasuka, Cibiru dan Tamblong.

C. Isolasi DNA

Dalam isolasi DNA digunakan tubuh nyamuk secara keseluruhan. Sebelum isolasi, nyamuk diambil dengan aspirator dan dimasukkan ke dalam freezer -20°C selama 10 menit. Kemudian dilakukan isolasi DNA sesuai dengan prosedur isolasi DNA metode CTAB (Cetyl trimethyl ammonium bromide) (Hoelzel, et al. 1994), dengan sedikit modifikasi yaitu penambahan proteinase K ke dalam larutan buffer lisis. Sodium asetat diganti dengan amonium asetat. Volume larutan buffer lisis dikurangi dari 500 μl menjadi 100 μl sesuai dengan larutan buffer ekstraksi DNA nyamuk dengan metode SDS. 100 μl larutan buffer lisis CTAB dipanaskan dalam waterbath 60°C selama 10 menit. Ke dalam larutan buffer tersebut dimasukkan 1 individu nyamuk untuk digerus dengan "pellet pestle". Nyamuk digerus sampai hancur. 1 μl 2 mercaptoetanol ditambahkan kedalamnya. Sampel divortex hingga homogen dan ditambah proteinase K 5 μl . Selanjutnya tabung diinkubasi 60°C selama 2 jam.

Setelah selesai inkubasi, ditambahkan ke dalam masing-masing sampel campuran 100 μl kloroform : isoamil alkohol (24:1). Sentrifuga 13.000 rpm selama 10 menit. Lapisan atas dari larutan tersebut dipindahkan ke dalam tabung ependorf yang baru, kemudian dicuci lagi dengan campuran 100 μl fenol : kloroform : isoamil alkohol (25:24:1). Sentrifuga lagi 13.000 rpm selama 10 menit. Lapisan atas dari larutan dipindahkan ke tabung yang baru lagi. Dilakukan penambahan 67 μl isopropanol dan dipresipitasi -20°C selama 1 malam. Sampel yang telah dipresipitasi tersebut disentrifuga 8000 rpm selama 5 menit. Isopropanolnya

dibuang dengan hati-hati, supaya pelet DNANYA tidak ikut terbang. Kemudian pelet tersebut dilarutkan dengan 200 μ l TE (50mM Tris 10mM EDTA pH 8), 20 μ l ammonium asetat dan 500 μ l etanol absolut. Presipitasi -20 °C selama 2 jam. Sentrifuga 10.000 rpm selama 5 menit. Larutan dibuang dan pelet DNA dicuci dua kali dengan etanol 70% untuk menghilangkan residu-residu CTAB atau kloroform. Sampel dikeringkan dengan desikator vakum selama 15 menit dan selanjutnya pelet DNA dilarutkan dengan 50 μ l TE (10mM Tris 1mM EDTA). Hasil isolasi DNA dari tubuh nyamuk ini diperoleh DNA genom dari masing-masing sampel nyamuk tersebut (Sukajadi, Padasuka, Tamblong, Cibiru dan NAMRU). Sampel disimpan pada suhu -20° C, siap digunakan untuk PCR

D. PCR (Polymerase Chain Reaction)

DNA genom yang diperoleh dari hasil isolasi, selanjutnya diamplifikasi dengan PCR. Pada reaksi PCR ditambahkan dNTP, enzim *Taq* Polimerase, Buffer PCR, MgCl₂, Primer, dH₂O dalam konsentrasi komposisi tertentu (tabel 2). Setiap kali PCR digunakan kontrol negatif, dimana semua komponen PCR ada kecuali DNA template. Kontrol negatif ini berguna untuk mendeteksi adanya kontaminasi. Disamping itu untuk mencegah kontaminasi, setiap komponen reaksi PCR kecuali enzim *Taq* polymerase dibuat dalam bentuk aliquot. Satu aliquot untuk lima kali reaksi. Total volume reaksi PCR adalah 25 μ l . Karena semua komponen PCR tidak dimasukkan pada tabung khusus untuk PCR tetapi pada tabung ependorf maka terakhir dimasukkan 50 μ l mineral oil. DNA genom diamplifikasi dengan menggunakan primer Kit E dan Kit F dari Teknologi Operon, Alameda CA.

Berdasarkan percobaan pendahuluan dengan menggunakan 36 primer, maka primer yang digunakan untuk analisa adalah 6 primer (lampiran D). Ke enam primer tersebut adalah OPE 16 : 5' GGTGACTGTG 3' OPE 17 : 5' CTACTGCCGT 3', OPE 19 : 5' ACGGCGTATG 3', OPF 6 : 5' GGGAATTCGG 3', OPF 4 : 5' GGTGATCAGG 3' dan OPF 2 : 5' GAGGATCCCT 3'. Keenam primer tersebut digunakan secara tetap pada keseluruhan sampel nyamuk. Pemilihan enam primer ini atas dasar bahwa primer tersebut menghasilkan produk amplifikasi yang jelas dan mudah terbaca sehingga memudahkan untuk mendiagnosis dan menganalisis DNA hasil amplifikasi. Sebelum tabung ependorf yang berisi komponen-komponen PCR dimasukkan kedalam mesin thermal cycler, terlebih dahulu disentrifuga selama 5 detik. Siklus temperatur PCR yang digunakan pada penelitian ini adalah : denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit, "annealing" pada suhu 35 °C selama 1 menit, polimerisasi pada suhu 72 °C selama 2 menit dan polimerisasi akhir 5 menit. Tabung ditempatkan pada suhu 4°C semalam. Total siklus adalah 45 siklus. Alat thermal cycler yang digunakan adalah jenis Thermolyne.

Tabel 1 Komposisi reaksi PCR untuk sampel DNA nyamuk *Aedes aegypti*

Larutan Stok	Volume	Konsentrasi akhir
DNA	4µl	
Buffer PCR 10x	2.5µl	buffer PCR 1x
25 mM Mg Cl ₂	2µl	2 mM
5U µl Taq DNA Polimerase	0.2µl	1 U
100 mM dNTP	0.2µl	200µM (tiap dATP,dCTP,dGTP ,dTTP)
32 ng µl primer	1µl	
Air deion steril	hingga 25µl	

E. Elektroforesis

Hasil dari amplifikasi DNA dipisahkan pasangan basanya dengan menggunakan gel elektroforesis 1,4 % pada larutan TAE 1x (Sambrook, et al, 1989). Sampel DNA yang telah diamplifikasi melalui reaksi PCR tadi diberi 5 μ l loading buffer dengan komposisi 5 : 1 (DNA : loading buffer) selanjutnya disentrifuga selama 5 menit agar loading buffernya bercampur dengan DNA sampel. Kemudian sampel DNA tersebut diambil 20ul untuk dimasukkan kedalam sumur gel elektroforesis. Kedalam alat elektroforesis dimasukkan larutan TAE 1X (40mM Tris-asetat, 1mM EDTA). Standar berat molekul yang dipakai adalah DNA Lambda yang telah dipotong dengan enzim restriksi Eco RI dan Hind III sebanyak 0.75 μ g. Alat elektroforesis dijalankan dengan beda potensial 70 volt selama 2.5 jam. DNA hasil amplifikasi yang telah di elektroforesis tersebut, direndam dengan etidium bromida dengan konsentrasi 2 μ g/ml selama 5 menit . Kemudian gel tersebut dicuci dengan akuabides selama 2 jam. Pengamatan pola larik DNA dilakukan dibawah sinar UV. Produk amplifikasi yang diamati tersebut kemudian difoto dengan film Polaroid 667.

F. Penghitungan Produk RAPD

Semua larik DNA amplifikasi diskor berdasarkan ada atau tidaknya larik DNA tersebut. Fragmen yang ada diberi nilai 1 dan yang tidak ada diberi nilai 0. Data tersebut dianalisis dengan menggunakan program NTSYS-pc. Digunakan dua

analisa yaitu analisa secara kualitatif dan analisa kuantitatif. Koefisien kesamaan antara pasangan objek yang diperbandingkan ditentukan dengan koefisien kesamaan Simple Matching. Berdasarkan koefisien kesamaan tersebut dibuat dendogram dengan metoda UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages). Berat molekul larik hasil amplifikasi dihitung pasangan biasanya dengan berpedoman kepada migrasi DNA standar dalam hal ini DNA λ yang telah dipotong dengan enzim Eco RI dan Hind III.

Larik DNA yang selalu hadir pada semua sampel nyamuk *Ae. aegypti* yang dibandingkan disebut larik DNA yang monomorfisme sedangkan larik DNA yang hanya hadir pada beberapa sampel yang dibandingkan disebut larik DNA yang polimorfisme.

Penghitungan pola larik DNA monomorfisme dan polimorfisme antara sampel nyamuk *Ae. aegypti* dalam setiap lokasi dilakukan dengan jalan membandingkan pola larik DNA yang selalu hadir dan larik DNA yang hanya hadir pada beberapa sampel per lokasi. Jadi perbandingannya hanya dilakukan pada sampel nyamuk *Ae. aegypti* yang ada pada lokasi tersebut. Karena setiap lokasi ada tiga atau empat sampel maka perbandingan pola larik DNA yang monomorfisme dan polimorfisme dilakukan pada tiga atau empat sampel tersebut.

Penghitungan pola larik DNA monomorfisme dan polimorfisme berdasarkan seluruh lokasi di Bandung dilakukan dengan membandingkan pola larik DNA pada seluruh sampel nyamuk *Ae. aegypti* yang berasal dari Bandung. Penghitungan ini tidak dilakukan pada sampel nyamuk *Ae. aegypti* yang berasal dari NAMRU.

Penghitungan pola larik DNA yang monomorfisme dan polimorfisme berdasarkan keseluruhan sampel dilakukan dengan jalan membandingkan pola larik DNA yang selalu hadir dan tidak hadir pada seluruh sampel nyamuk *Ae. aegypti* yang berasal dari Bandung (Sukajadi, Padasuka, Cibiru, Tamblong) dan NAMRU.

Semua penghitungan diatas dilakukan untuk setiap primer.

MILIK PERPUSTAKAAN
UNIV. NEGERI PADANG

BAB IV
HASIL DAN PEMBAHASAN

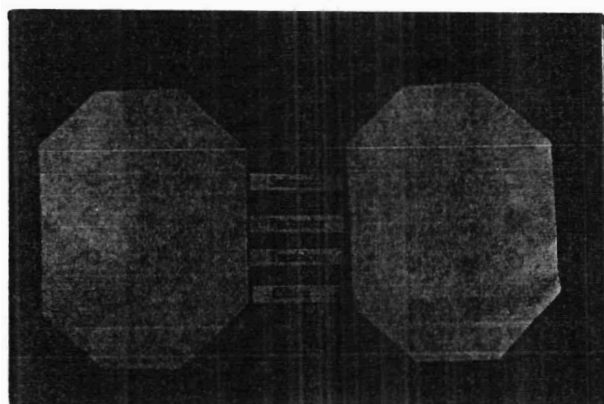
A. Hasil

1. Hasil Uji Resistensi

Hasil uji resistensi sampel nyamuk *Aedes aegypti* terhadap insektisida malathion terlihat pada tabel 2 dan gambar 1.

Tabel 2. Hasil Uji Resistensi Nyamuk *Aedes aegypti* dewasa terhadap insektisida malathion menurut standar WHO

Lokasi Sampel Nyamuk	Angka Kematian (%)	Status Resistensi
1. Sukajadi	100%	rentan (tidak resisten)
2. Padasuka	100%	rentan (tidak resisten)
3. Tamblong	100%	rentan (tidak resisten)
4. Cibiru	100%	rentan (tidak resisten)



Gambar 1. Hasil uji esterase nyamuk *Aedes aegypti* terhadap insektisida malathion

2. Hasil Amplifikasi DNA

Hasil amplifikasi DNA dengan metoda RAPD ditunjukkan oleh gambar 2,4,5,6,7. Untuk setiap lokasi digunakan digunakan 4 sampel nyamuk *Aedes aegypti*. Sebagai kontrol digunakan 4 sampel nyamuk *Aedes aegypti* dari NAMRU. Jadi keseluruhan sampel yang digunakan adalah 20 sampel. Dari hasil amplifikasi DNA ternyata ada 3 sampel yang tidak menghasilkan produk amplifikasi. Hal ini terlihat pada sampel nomor 11 dengan primer OPE 17, sampel nomor 15 dengan primer OPE 19, sampel nomor 2 dengan primer OPF 2. Walaupun telah dilakukan reaksi ulang ternyata tetap tidak menghasilkan produk amplifikasi. Ketidak berhasilan menghasilkan produk amplifikasi dapat disebabkan oleh stok sampel DNA sudah terdegradasi, total DNA yang digunakan tidak tepat (Dawson, 1996). Karena tidak dihasilkannya produk amplifikasi maka data sampel tersebut tidak digunakan.

Konsentrasi hasil isolasi DNA dari satu ekor nyamuk dewasa tidak diukur secara kuantitatif tetapi diamati secara kualitatif melalui elektroforesis. Konsentrasi gel agarosa yang digunakan adalah 0,8%. Karena konsentrasi DNA template tidak diukur secara kuantitatif maka konsentrasi DNA template untuk reaksi PCR tidak dapat ditentukan secara pasti. Namun diperkirakan konsentrasi DNA template untuk PCR dengan hewan objek nyamuk berkisar antara 0,2 ng - 4,0 ng / μ l (Wilkerson, et al, 1993). Konsentrasi DNA template sangat mempengaruhi derajat amplifikasi.

B. Pembahasan

1. Status Resistensi

Berdasarkan hasil uji resistensi baik pengujian menurut standar WHO maupun pengujian secara biokimia yaitu uji esterase menunjukkan bahwa nyamuk *Aedes aegypti* yang berasal dari Sukajadi, Padasuka, Cibiru dan Tamblong belum menunjukkan gejala resistensi. Hal ini ditunjukkan oleh angka kematian setelah nyamuk didedahkan pada insektisida mencapai 100 % untuk setiap lokasi. Menurut Davidson dan Zahar, 1973 dalam Mardihusodo 1992 menyatakan bila angka kematian besar dari 98% maka serangga uji tersebut belum resisten (rentan) sedangkan bila angka kematian kecil dari 80 % maka status serangga uji tersebut adalah resisten.

Belum resistennya nyamuk *Aedes aegypti* dari Sukajadi, Padasuka, Cibiru dan Tamblong didukung oleh hasil uji esterase yang menunjukkan bahwa intensitas warna yang ditimbulkan dari hasil uji tersebut belum menunjukkan adanya gejala resistensi.

Berdasarkan hasil uji tersebut, berarti insektisida malathion yang selama ini digunakan dilapangan untuk mengendalikan nyamuk *Aedes aegypti* yang berasal dari Sukajadi, Padasuka, Cibiru dan Tamblong belum mampu menimbulkan gejala resistensi pada nyamuk tersebut. Dengan demikian bukan faktor resistensi yang menyebabkan tingginya tingkat serangan demam berdarah pada daerah Sukajadi, dan Padasuka.

2. Analisis Produk RAPD

a. Analisis Kualitatif Pola Larik DNA

Untuk dapat menganalisis tingkat polimorfisme DNA terlebih dahulu dilakukan analisis secara kualitatif dari pola larik DNA hasil amplifikasi tersebut.

Ada 2 analisis data yang dilakukan. Pertama, dengan menganalisis semua larik DNA yang unik atau spesifik. Penganalisaan fragmen yang unik dan spesifik ada hubungannya dengan identitas taksonomi (Hadrys, et al, 1992). Larik DNA hasil amplifikasi yang hanya ada pada individu-individu spesies itu dapat digunakan untuk menghasilkan profil diagnostik untuk spesies tersebut (Kamphampati, et al, 1992). Larik DNA yang spesifik identik dengan kunci morfologi dan biokimia dari suatu organisme (Hadrys, et al, 1992), sehingga dapat digunakan untuk mengidentifikasi individu yang tidak diketahui spesiesnya.

Larik-larik DNA yang tidak selalu ada pada seluruh individu merupakan larik yang polimorfisme sedangkan larik DNA yang selalu ada dan konstan pada semua individu merupakan larik non polimorfisme atau monomorfisme. Larik DNA yang unik polimorfisme untuk tingkat spesies, bila larik itu hanya ada pada spesies itu sedangkan pada spesies lain tidak ada. Bila larik DNA itu dibandingkan dengan individu dalam spesies yang sama, maka larik yang selalu ada pada semua anggota spesies itu dapat digunakan untuk mengidentifikasi anggota spesies itu. Yang kedua adalah menganalisis semua larik yang diamplifikasi. Polimorfisme diantara dua individu diskor berdasarkan ada atau tidaknya larik DNA yang diamplifikasi. Dalam

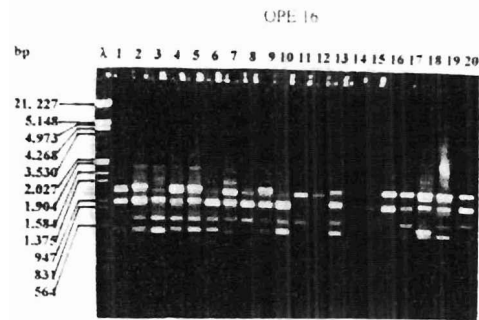


perhitungan ini semua larik yang berhasil diampifikasi diberi nilai 1 sedangkan yang tidak ada diberi nilai 0

Hasil perhitungan ukuran larik DNA yang berhasil diampifikasi dapat terlihat pada bagian kiri dari tabel 3, 4, 5, 6, 7 dan 8. Semakin jauh migrasi DNA pada gel semakin kecil ukuran DNA tersebut dan semakin dekat migrasi DNA dari sumur gel berarti semakin besar pula ukuran DNA tersebut.

Ketidakadaan larik DNA tertentu (non amplifikasi) dapat terjadi akibat defesi dan insersi pada tempat penempelan primer, insersi yang merubah ukuran fragmen DNA, perubahan basa sederhana atau yang terikat pada fragmen DNA.

Berdasarkan elektroferogram dari setiap primer diketahui bahwa primer OPE 16 menghasilkan larik DNA amplifikasi yang berkisar 444 bp-2639 bp (gambar 2, tabel 3). Tidak terdapat larik DNA yang spesifik. Larik DNA yang berukuran 1000 bp umumnya terlihat pada semua individu nyamuk yang berasal dari Bandung dan NAMRU. Hanya tiga individu yang tidak memiliki larik DNA tersebut. Ketiga individu tersebut berasal dari lokasi Cibiru dan Tarubloug. Demikian juga pada larik DNA yang berukuran 690 bp. Terlihat hanya 1 individu yaitu sampel nomor 12 dari Cibiru yang tidak memiliki larik tersebut. Semua larik yang dihasilkan menunjukkan polimorfisme diantara semua individu. Ini berarti daerah-daerah DNA genom dari individu-individu tersebut yang komplemen dengan primer ukurannya bervariasi satu sama lain.



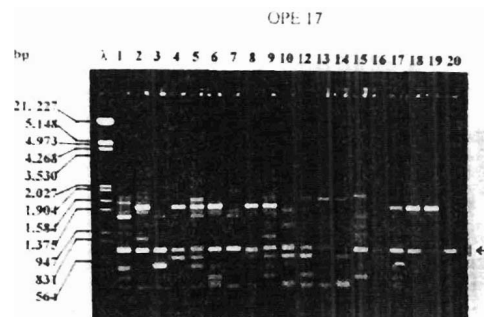
Gambar 2. Elektroferogram OPE 16. kolom 1-4 sampel Sukajadi. 5-8 Padasuka. 9-12 Cibiru, 13-16 Tamblong dan 17-20 NAMRU.

Tabel 3 Hasil interpretasi larik DNA atas dasar ada atau tidaknya larik DNA yang diamplifikasi dengan primer OPE 16 (gambar 4).

Sampel Nyamuk																				
Larik DNA (bp)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
2640	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1910	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1560	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1330	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1
1220	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0
1000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1
920	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
780	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
690	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
590	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
570	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1
440	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Amplifikasi DNA dengan menggunakan primer OPE 17 menghasilkan larik DNA amplifikasi yang berkisar 320 bp- 2560 bp (gambar 3, tabel 4). Terdapat larik DNA yang spesifik yaitu larik DNA yang ukurannya 610 bp. Larik ini ada pada

semua individu pada spesies itu, baik itu pada nyamuk yang dikumpulkan dari Bandung dan Jakarta. Hal ini berarti primer tersebut berpotensi digunakan untuk identitas taksonomi *Ae. aegypti*. Dalam hal ini identitas spesies. Dalam penelitian ini tidak digunakan spesies lain. Jadi untuk memastikan primer tersebut dapat digunakan sebagai penanda spesifik untuk spesies *Ae. aegypti* dapat dilakukan perbandingan dengan spesies lain misalnya *Ae. albopictus* dengan menggunakan primer yang sama yaitu OPE 17.



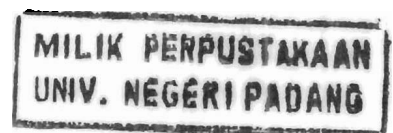
Gambar 3. Elektroferogram OPE 17, kolom 1-4 sampel Sukajadi. 5-8 Padasuka, 9-12 Cibiru, 13-16 Tamblong dan 17-20 NAMRU.

Pada primer OPE 17 banyak terdapat larik-larik DNA yang jarak migrasi DNA jauh dari sumur bila dibandingkan dengan hasil amplifikasi DNA dengan menggunakan primer yang lain. Hal ini dapat diakibatkan primer mengamplifikasi fragmen-fragmen yang pendek sehingga fragmen DNA yang dihasilkan memiliki berat molekul yang kecil sehingga jarak migrasi DNA juga akan semakin jauh. Kemungkinan lain juga dapat akibat dihasilkannya amplifikasi DNA non spesifik dengan menggunakan primer tersebut. Untuk meningkatkan kespesifikan hasil amplifikasi DNA dapat dilakukan dengan menaikkan temperatur "annealing".

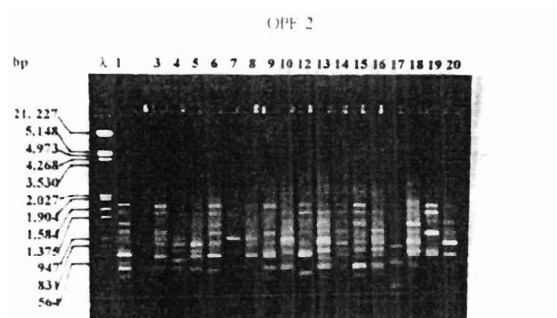
Tabel 4. Hasil interpretasi larik DNA atas dasar ada atau tidaknya larik DNA yang diamplifikasi dengan primer OPE 17

Larik DNA (bp)	Sampel Nyamuk																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
2560	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
2190	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
1950	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1810	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
1670	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	
1610	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1490	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	
1330	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	
1180	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
970	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	
870	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	
800	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
610	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
520	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	
490	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
430	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	
370	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	
320	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	

Pada primer OPE 19 (gambar 4, tabel 5) terdapat larik yang spesifik untuk strain nyamuk yang berasal dari NAMRU. Dimana larik yang berukuran 760 bp dan 1000 bp selalu ada pada semua individu pada strain nyamuk tersebut dan tidak dijumpai pada sampel nyamuk yang berasal dari Bandung. Ini berarti larik tersebut spesifik untuk nyamuk-nyamuk strain NAMRU. Jadi jelas terdapat perbedaan produk amplifikasi dari kedua sampel nyamuk tersebut, sehingga primer ini dapat digunakan untuk membedakan nyamuk yang berasal dari NAMRU dengan nyamuk yang berasal dari lokasi lainnya. Pola larik DNA untuk strain NAMRU menampilkan pola yang khas. Larik yang spesifik juga ditemukan untuk nyamuk



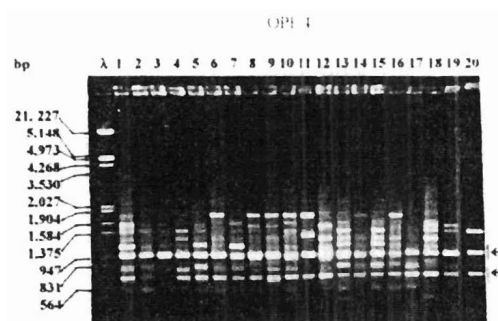
Primer OPF 2 menghasilkan larik DNA amplifikasi yang ukurannya berkisar 310 bp- 1820 bp (gambar 5, tabel 6). Tidak terdapat larik DNA yang spesifik. Semua larik DNA yang dihasilkan menunjukkan polimorfis yang tinggi dibanding dengan primer-primer lainnya. Ini berarti daerah DNA genom yang komplemen dengan primer OPF 2 lebih bervariasi dibandingkan dengan daerah DNA genom yang diamplifikasi dengan primer lain. Dengan demikian primer OPF 2 hanya dapat digunakan untuk melihat tingkat polimorfis diantara individu-individu tersebut. Pada primer OPF 2 dihasilkan banyak produk amplifikasi. Untuk mengatasi hal tersebut dapat dilakukan dengan menaikkan suhu annealing, sehingga larik yang dihasilkan dapat menjadi lebih spesifik sehingga larik yang dihasilkan tidak terlalu banyak. Hasil amplifikasi DNA dengan menggunakan primer OPF 2 tetap dipakai dalam pengolahan data karena larik yang dihasilkan menunjukkan polimorfis DNA antara satu sampel dengan yang lain.



Gambar 7. Elektroferogram OPF 2, kolom 1-4 sampel Sukajadi, 5-8 Padasuka, 9-12 Cibiru, 13-16 Tamblong dan 17-20 NAMRU.

Tabel 6. Hasil interpretasi larik DNA atas dasar ada atau tidaknya larik DNA yang diamplifikasi dengan primer OPF 2

		Sampel Nyamuk																			
LarikDNA (bp)	1	3	4	5	6	7	8	9	10	12	13	14	15	16	17	18	19	20			
1820	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1			
1550	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1			
1320	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1			
1220	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0			
1040	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1			
960	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1			
850	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1			
810	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0			
750	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0			
690	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1			
670	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0			
590	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0			
570	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1			
500	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0			
460	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1			
430	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0			
410	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0			
390	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0			
310	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0			



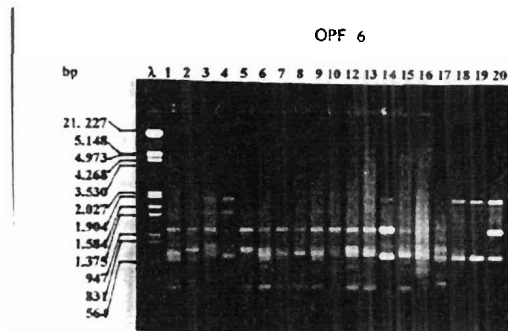
Gambar 6 Elektroferogram OPF 4, kolom 1-4 sampel Sukajadi, 5-8 Padasuka, 9-12 Cibiru, 13-16 Tamblong dan 17-20 NAMRU.

Tabel 7 Hasil interpretasi larik DNA atas dasar ada atau tidaknya larik DNA yang diamplifikasi dengan primer OPF 4

		Sampel Nyamuk																			
Larik DNA (bp)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
1870	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	
1680	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	
1570	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	
1180	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	
1240	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	
1110	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	
940	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
850	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
760	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1
670	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
520	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0
430	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0
410	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
400	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0

Primer OPF 4 menghasilkan larik DNA amplifikasi berukuran 400 bp - 1870 bp (tabel 7). Terdapat larik yang spesifik, dimana larik DNA ukuran 670 bp dan 940 bp ada pada seluruh individu spesies itu. Berarti larik DNA tersebut spesifik pada individu spesies *Ae aegypti*. Jadi primer OPF 4 berpotensi digunakan untuk membedakan spesies nyamuk ini dengan spesies nyamuk yang lain.

Larik DNA yang berhasil diamplifikasi oleh primer OPF 6 ukurannya berkisar 320 bp-1970 bp (gambar 7 tabel 8). Terdapat larik yang umumnya ada pada semua individu yaitu larik yang berukuran 633 bp. Hanya 2 individu saja dari 19 individu yang diuji yang tidak memiliki larik DNA yang berukuran 633 bp tersebut.



Gambar 7. Elektroferogram OPF 6, kolom 1-4 sampel Sukajadi, 5-8 Padasuka, 9-12 Cibiru, 13-16 Tamblong dan 17-20 NAMRU.

Tabel 8: Hasil interpretasi larik DNA atas dasar ada atau tidaknya larik DNA yang diamplifikasi dengan primer OPF 6

Sampel Nyamuk																				
Larik DNA (bp)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
1970	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	
1530	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1050	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	
750	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
690	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
630	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
560	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
490	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	
430	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
370	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
320	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	

MILIK PERPUSTAKAAN
UNIV. NEGERI PADANG

b. Analisis Tingkat Polimorfisme DNA

Dengan adanya perbedaan dan persamaan dari pola larik DNA nyamuk *Ae. aegypti* yang diamplifikasi oleh setiap primer memungkinkan untuk dapat dihitung persentase pola larik DNA yang monomorfisme dan pola larik DNA yang polimorfisme. Hasil perhitungan tersebut selanjutnya terlihat pada tabel 9, 10, dan 11.

Berdasarkan perbandingan persentase larik DNA yang monomorfisme dan polimorfisme antara individu nyamuk *Ae. aegypti* dalam setiap lokasi (tabel 9) terlihat bahwa tingkat polimorfisme larik DNA sampel nyamuk dari Padasuka paling tinggi yaitu 80% dibandingkan dengan tingkat polimorfisme sampel nyamuk *Ae. aegypti* dari lokasi lain. yang ada di Bandung. Sedangkan tingkat polimorfisme dari daerah Sukajadi adalah 74%. Berdasarkan data dari Dinas Kesehatan Kodya Bandung , Padasuka dan Sukajadi merupakan daerah endemis. Sampel nyamuk *Ae. aegypti* dari Cibiru dan Tamblong memiliki tingkat polimorfisme yang lebih rendah yaitu 72 % dan 66%.

Terjadinya perbedaan dalam tingkat polimorfisme tersebut karena primer mengamplifikasi DNA genom yang lebih bervariasi. Semakin banyak variasi daerah DNA genom yang diamplifikasi oleh primer semakin tinggi pula tingkat polimorfisme suatu organisme. Nyamuk *Ae. aegypti* dari Padasuka dan Sukajadi memiliki tingkat polimorfisme yang tinggi dibandingkan dengan sampel dari lokasi Cibiru dan Tamblong. Hal ini berarti bahwa tingkat keanekaragaman genetik antar individu

Tabel 10. Perbandingan persentase larik DNA yang monomorfisme dan polimorfisme berdasarkan seluruh lokasi sampel nyamuk *Ae. aegypti* di Bandung.

Lokasi	Primer	Mono- morfis- me	Jumlah Total Monomor- fisme (%)	Poli- morfis- me	Jumlah Total Polimorfis- me (%)	Jumlah Pola Larik DNA
Sukajadi	OPE 16	0	3 (4.6%)	11	63 (96.4%)	66
	OPE17	1		14		
	OPE 19	0		7		
	OPF 2	0		12		
	OPF 4	2		9		
	OPF 6	0		10		
Padasuka	OPE 16	0	3 (4.7%)	10	61 (95.3%)	64
	OPE17	1		12		
	OPE 19	0		12		
	OPF 2	0		11		
	OPF 4	2		10		
	OPF 6	0		6		
Cibiru	OPE 16	0	3 (5.9%)	6	48 (94.1%)	51
	OPE17	1		10		
	OPE 19	0		5		
	OPF 2	0		10		
	OPF 4	2		11		
	OPF 6	0		6		
Tamblong	OPE 16	0	3 (6%)	4	47 (94%)	50
	OPE17	1		11		
	OPE 19	1		8		
	OPF 2	1		11		
	OPF 4	2		8		
	OPF 6	0		5		

Berdasarkan tingkat polimorfisme DNA nyamuk *Ae. aegypti* seluruh lokasi sampel nyamuk *Ae. aegypti* di Bandung (tabel 10) menunjukkan bahwa Sukajadi dan Padasuka tetap memiliki tingkat polimorfisme yang tinggi dibanding dengan tingkat polimorfisme nyamuk *Ae. aegypti* dari Cibiru dan Tamblong. Tingkat polimorfisme nyamuk dari Sukajadi adalah 96.4% dan Padasuka 95.3% . Sedangkan sampel nyamuk yang berasal dari Cibiru dan Tamblong adalah 94.1% dan 94%. Fenomena tersebut memperlihatkan bahwa sampel nyamuk *Ae. aegypti* dari Sukajadi dan Padasuka tetap memiliki tingkat polimorfisme yang tinggi bila ditinjau dari perbandingan tingkat polimorfisme antar individu dalam setiap lokasi dan sampel nyamuk antar lokasi seluruh kotamadya Bandung. Lokasi yang dimaksudkan disini adalah Sukajadi, Padasuka, Cibiru dan Tamblong.

Tetapi bila dilihat tingkat polimorfisme DNA nyamuk *Ae. aegypti* seluruh lokasi penelitian, baik yang berasal dari Bandung maupun dari NAMRU (tabel 11.) terlihat bahwa tingkat polimorfisme DNA dari Sukajadi dan Padasuka 98.3% dan tingkat polimorfisme nyamuk *Ae. aegypti* dari Cibiru dan Tamblong adalah 98 %.

Sedangkan sampel dari NAMRU tingkat polimorfismenya 98.3 %. Terlihat bahwa sampel dari Sukajadi dan Padasuka sedikit lebih tinggi.

Tabel 11.. Perbandingan persentase larik DNA yang monomorfisme dan polimorfisme pada keseluruhan sampel nyamuk *Ae. aegypti* dari Bandung dan NAMRU

Lokasi	Primer	Mono- morfisme	Jumlah Total Monomorfis- me (%)	Poli- morfis- me	Jumlah Total Polimorfis- me (%)	Jumlah Pola Larik DNA
Sukajadi	OPE 16	0	1 (1.6%)	11	63 (98.4%)	64
	OPE17	0		15		
	OPE 19	0		7		
	OPF 2	0		12		
	OPF 4	1		9		
	OPF 6	0		10		
Padasuka	OPE 16	0	1 (1.6%)	10	63 (98.4%)	64
	OPE17	0		13		
	OPE 19	0		12		
	OPF 2	0		11		
	OPF 4	1		12		
	OPF 6	0		6		
Cibiru	OPE 16	0	1 (2%)	6	50 (98%)	51
	OPE17	0		11		
	OPE 19	0		5		
	OPF 2	0		10		
	OPF 4	1		12		
	OPF 6	0		6		
Tamblong	OPE 16	0	1 (2%)	4	49 (98%)	50
	OPE17	0		12		
	OPE 19	0		8		
	OPF 2	0		11		
	OPF 4	1		9		
	OPF 6	0		5		
NAMRU	OPE 16	0	1 (1.7%)	7	58 (98.3%)	59
	OPE17	0		8		
	OPE 19	0		7		
	OPF 2	0		18		
	OPF 4	1		12		
	OPF 6	0		6		

Ditinjau dari fenomena genetik tersebut bahwa tingkat polimorfisme yang tinggi mengindikasikan tingkat keanekaragaman genetik yang tinggi. Semakin tinggi tingkat keanekaragaman genetik suatu organisme, semakin dapat organisme tersebut untuk dapat menyesuaikan diri terhadap perubahan lingkungan sehingga nyamuk tersebut mempunyai daya lulus hidup yang lebih tinggi dibanding dengan organisme yang memiliki keanekaragaman genetik yang rendah.

Serangga vektor yang mempunyai daya lulus hidupnya lebih tinggi akan memiliki jumlah populasi yang lebih banyak dari generasi ke generasi. Ada hubungan antara jumlah populasi dengan tingginya angka infeksi (Harwood et al.) . Semakin banyak populasi serangga vektor dalam hal ini nyamuk *Ae. aegypti* akan semakin banyak peluang kontak dengan manusia. Sebab nyamuk betina menghisap darah manusia untuk pematangan sel telurnya. di ovarium (Service, M.W, 1996). Apalagi didukung oleh tingkah laku nyamuk betina yang lebih menyukai darah manusia dibandingkan darah mamalia (Agies,R, 1996).

Karena virus ditularkan oleh nyamuk betina, dengan semakin banyaknya nyamuk kontak dengan manusia maka kemungkinan manusia terserang virus akan semakin tinggi pula. Hal ini tentu membawa pengaruh terhadap tingginya tingkat serangan DBD. Tingginya tingkat serangan DBD mengakibatkan tingginya kasus DBD. Tingginya kasus DBD merefleksikan tingginya tingkat endemisitas.

Namun tingginya tingkat endemisitas ditentukan oleh banyak faktor lain, bukan hanya faktor keanekaragaman genetik saja. Faktor-faktor tersebut adalah : lamanya siklus ekstrinsik parasit, frekuensi makan vektor dan lamanya usia hidup

vektor (Harwood et al). Faktor lain yang mempengaruhi tingginya atau rendahnya kasus penyakit yang disebabkan vektor adalah kecocokan vektor, kepadatan vektor, kondisi iklim, frekuensi kontak antara manusia dan vektor dan tingkat imunitas manusia (Harwood et al).

Jika dibandingkan tingkat polimorfisme antar sampel nyamuk dari NAMRU, ternyata nyamuk dari NAMRU tingkat polimorfismenya cukup tinggi yaitu 79 % (tabel 10). Ada dua kemungkinan yang dapat menjelaskan peristiwa ini. Pertama adalah sampel *Ae. aegypti* berasal dari lokasi geografi dan habitat yang jauh berbeda yaitu Jakarta dan Bandung. Hal ini dapat mempengaruhi tingkat keanekaragaman genetik dari individu-individu tersebut.. Lokasi geografi dapat mempengaruhi tingkat keanekaragaman genetik dari suatu organisme (Wallis, et al, 1984).

Kedua, strain NAMRU sudah dipelihara di laboratorium sejak tahun 1985. Fenomena genetik dalam populasi seperti berkurangnya variabilitas genetik yang disebabkan oleh seleksi, inbreeding atau efek leher botol yang harus dilalui populasi (Haymer,D.S, 1995). Peningkatan indeks kesamaan dalam populasi berbanding langsung dengan jumlah generasi organisme tersebut selama dikultur di laboratorium. Dengan meningkatnya jumlah generasi, variabilitas genetik semakin berkurang. Seharusnya tingkat polimorfis dari nyamuk *Ae. aegypti* yang dipelihara di laboratorium NAMRU tersebut lebih rendah dari nyamuk *Ae. aegypti* yang berasal tipe liar. Hal ini dapat berlaku bila mengetahui tingkat polimorfisme awal dari strain tersebut sebelum dikultur di laboratorium, karena sampel nyamuk yang

kultur tersebut berasal dari hasil koleksi liar dari lokasi yang ada di Jakarta. Berkemungkinan tingkat polimorfisme awal dari nyamuk tersebut lebih tinggi dari nyamuk *Ae. aegypti* NAMRU yang telah dikultur beberapa tahun. Tetapi karena dalam penelitian ini tidak diteliti tingkat polimorfisme awal dari nyamuk tersebut dan tidak diteliti pula tingkat polimorfisme dari tempat asal nyamuk *Ae. aegypti* tersebut dikoleksi, maka perlu dilakukan penelitian lanjutan.

Sesuai dengan kecenderungan tingkat polimorfisme diberbagai lokasi penelitian di Bandung yaitu dua daerah merupakan endemis (Sukajadi dan Padasuka) dan dua daerah lagi merupakan daerah non endemis (Cibiru dan Tamblong), maka mungkin dapat diprediksi bahwa lokasi tempat asal sampel NAMRU adalah lokasi yang endemis. Karena berdasarkan data, bahwa pola larik DNA dari daerah-daerah endemis memperlihatkan polimorfisme yang lebih tinggi dibanding dengan daerah-daerah non endemis. Berdasarkan gambaran lokasi asal tempat pengumpulan nyamuk NAMRU tersebut berasal dari daerah Sukasari di Jakarta, daerah ini termasuk daerah endemis penyakit demam berdarah (komunikasi pribadi dengan staf NAMRU).

Dengan diketahuinya polimorfisme atau keanekaragaman genetik dari individu-individu tersebut dapat dibuat dendogram. Dendogram ini dibuat atas dasar indeks kesamaan melalui program NTSYS-PC.

Hasil-hasil yang diperoleh tersebut menggambarkan bahwa metoda RAPD merupakan teknik yang cukup efisien dalam melihat keanekaragaman genetik dari spesies nyamuk yang diteliti. Primer RAPD berguna untuk mengidentifikasi daerah-

daerah genom yang mempromosikan segmen DNA yang spesifik pada genom. Segmen DNA yang diamplifikasi ini sering bervariasi diantara semua individu tersebut. Penggunaan set genom yang berarti DNA template yang diekstraksi dari individu nyamuk, terlihat bahwa primer mengenal daerah DNA yang bervariasi. Daerah yang dikenal primer akan mempromosikan proses amplifikasi segmen DNA genom. Segmen DNA ini sering bervariasi ukurannya antara individu dalam populasi dan bertindak sebagai penanda genetik yang polimorfisme.

Berbagai macam primer yang digunakan memungkinkan untuk mengetahui variabilitas genetik. Beberapa penanda RAPD disini diidentifikasi sebagai monomorfisme untuk lokasi atau strain tertentu. Seperti yang terlihat pada primer OPE 19. Primer RAPD yang berbeda dapat menghasilkan penanda genetik untuk membedakan populasi. Primer yang berbeda dapat membedakan variabilitas genetik diantara populasi.

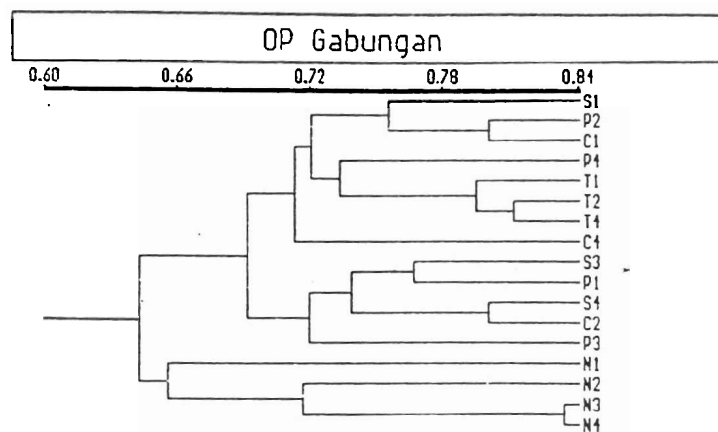
Intensitas produk RAPD dapat bervariasi. Ada produk amplifikasi yang jelas sekali dan ada yang samar-samar. Hal ini timbul karena jumlah pengulangan produk yang terlalu rendah, kompetisi diantara sesama molekul atau tempat melekatnya primer mismatching (salah menempel) partial.

Analisis data total RAPD dengan menggunakan program NTSYS -PC yang ditransformasikan ke dalam bentuk dendogram, dibuat berdasarkan indeks kesamaan. NTSYS-PC merupakan sistem program yang digunakan untuk menemukan struktur pada data multivariate. Sistem ini dapat menghitung atau mengukur kesamaan atau ketidaksamaan diantara semua pasangan objek yang

dibandingkan, dan kemudian menyimpulkan kesamaan ini kedalam sekumpulan set yang objeknya sama (Rohlf, F.J. 1993).

c. Analisis Kuantitatif Pola Larik DNA

Bila semua primer digabungkan, akan membentuk suatu dendogram yang berdasarkan indeks kesamaan dan ketidak samaan. Setelah semua objek yang diperbandingkan diketahui indeks kesamaannya melalui metode Simple Matching, maka dibuat dendogram dengan metode kluster UPGMA. Tampilan dendogram (tabel 13) dapat dilihat sebagai berikut :



Gambar 18). Dendogram dari gabungan dari semua primer OP gabungan : Gabungan keseluruhan primer dari Operon yang digunakan dalam penelitian ini. S : sampel *Ae.aegypti* dari Sukajadi, P: sampel *Ae.aegypti* dari Padasuka, C: sampel *Ae.aegypti* dari Cibiru, T: sampel *Ae.aegypti* dari Tamblong, N: NAMRU.

Dari hasil dendogram yang merupakan gabungan keseluruhan primer terlihat bahwa dengan Simple Matching membagi keseluruhan individu menjadi

dua kelompok besar yaitu nyamuk *Ae. aegypti* dari NAMRU dan nyamuk *Ae. aegypti* yang berasal dari Sukajadi, Padasuka, Cibiru, Tamblong, yang semuanya berasal dari Bandung. Terlihat bahwa untuk nyamuk *Ae. aegypti* yang berasal dari NAMRU yaitu N1, N2, N3 dan N4 mengelompok pada satu kelompok tertentu yang terpisah dari kelompok lain. Hal yang sama juga terlihat pada dendogram OPE 19. Ini menandakan bahwa nyamuk NAMRU telah terisolasi di laboratorium bertahun-tahun. Alternatif isolasi yang dapat berlaku disini adalah isolasi reproduksi .

Lokasi geografi tidak menyebabkan perbedaan kelompok masing-masing lokasi pengambilan sampel nyamuk tersebut. Sukajadi, Padasuka, dan Cibiru tidak memiliki kelompok tersendiri. Terjadi pencampuran distribusi nyamuk dari masing-masing lokasi tersebut. Karena jarak terbang nyamuk relatif pendek yaitu hanya beberapa ratus meter (Borror, D.J., 1981) maka alternatif yang paling mungkin untuk tersebarnya nyamuk tersebut ke berbagai lokasi tersebut adalah pengaruh manusia dan transportasi. Jadi nyamuk tersebut dapat terbawa ke lokasi lain melalui alat transportasi ataupun terbawa oleh manusia.

Nyamuk dari daerah Tamblong, terlihat membentuk kelompok kecil tersendiri. Ini menandakan nyamuk dari Tamblong masih belum tersebar betul ke lokasi lain dan masih terisolasi begitu juga sebaliknya nyamuk dari lokasi lain Sukajadi, Padasuka dan Cibiru belum tersebar betul ke Tamblong. Sehingga sampel nyamuk Tamblong hubungan kekerabatannya masih sangat dekat.

Dari semua hasil tersebut diatas membuktikan bahwa metoda RAPD dapat mengidentifikasi daerah genom melalui amplifikasi segmen DNA spesifik pada

genom. Penanda RAPD dapat mengidentifikasi DNA polimorfisme dan monomorfisme nyamuk yang berasal dari NAMRU, Sukajadi, Padasuka, Tamblong dan Cibiru.

BAB V

KESIMPULAN

1. Belum terjadi resistensi nyamuk *Ae. aegypti* dari Sukajadi, Padasuka, Cibiru dan Tamblong terhadap insektisida malathion.
2. Larik DNA dari nyamuk *Ae. aegypti* yang diamplifikasi ukurannya berkisar 310 bp - 2640 bp
3. Terdapat larik yang spesifik untuk sampel nyamuk dari NAMRU yaitu larik DNA ukuran 760 bp dengan menggunakan primer OPE 19
4. Hasil analisis pola larik DNA secara kualitatif menunjukkan bahwa tingkat polimorfisme antara individu nyamuk *Ae. aegypti* dalam setiap lokasi adalah : Sukajadi 74%, Padasuka 80%, Cibiru 72% dan Tamblong 66%. Hasil analisis tingkat polimorfisme nyamuk *Ae. aegypti* berdasarkan seluruh lokasi sampel yang berasal dari Bandung adalah : Sukajadi 96.4%, Padasuka 95.3%, Cibiru 94.1% dan Tamblong 94%.
5. Hasil analisis pola larik DNA secara kuantitatif menunjukkan bahwa *Ae. aegypti* dari Bandung (Sukajadi, Padasuka, Cibiru dan Tamblong) membentuk kelompok yang terpisah dengan nyamuk NAMRU.
6. Nyamuk *Ae. aegypti* dari Sukajadi, Padasuka dan Cibiru tidak menunjukkan suatu pola pengelompokan yang sistematis sehubungan dengan lokasi dan tingkat endemisitas.

DAFTAR PUSTAKA

- Agoes, R. (1996). *Studi Bionomik Nyamuk *Ae. aegypti* (Linnaeus, 1752) Strain Geografis Bandung*. Disertasi, Universitas Padjajaran Bandung.
- Ayala, F.J., (1982). *Population and Evolutionary Genetics: A Primer*, The Benjamin/Cumming Publishing Company, California, 32-38
- Bebee, N.W., Saul A., (1995). Discrimination of All Members of The *Anopheles punctulatus* Complex by Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 478-481.
- Borror, D.J., DeLong, D.M., Triplehorn, C.A., (1981). *An Introduction to The Study of Insects* Fifth Edition, Saunders College Publishing, Philadelphia, New York, 584-587.
- Dawson, M.T., Powell, R., Gannon, F., (1996). *Gene Technology*, Bios Scientific Publishers, Ireland, 93-105.
- Devonshire, A.L, Field L.M, Williamson M.S., (1991). Molecular Biology of Insecticide Resistance, *Insect Molecular Science*, Academic Press, 173-181
- Georghiou, G.P, Pasteur N. (1989). Novel Test for Organophosphat Insecticide Resistance in Single Mosquitoes : an Over View of Recent Progress and Outline of Filter Paper Test. *Insect Mol. Bio.*, 191-194
- Grosberg, R.K., Levitan, D.R., Cameron, B.B., (1996). Characterization of Genetic Structure and Genealogies Using RAPD-PCR Markers: A Random primer for The Novice and Nervous, dari Ferraris, J.D., Palumbi, S.R., *Molecular Zoology*, Advances, Strategies and Protocols. John Willey & Sons, Inc, Publication, New York, 67-132.
- Hadrys, H., Balick M., Schierwater B., (1992). Application of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in Molecular Ecology, *Molecular Ecology*, 1, 55-63.
- Harwood, R.F., James, M.T., *Entomology in Human and Animal Health*. Mac Millan Publishing, New York, 48-77
- Haymer, D.S., (1994). Arbitrary (RAPD) Primer Sequences Used in Insect Studies. *Insect Mol Biol*, 3 (3), 191-194.
- Haymer, D.S., (1995). Genetic Analysis of Laboratory and Wild Strain of The Melon Fly (Diptera: Tephritidae) Using Random Amplified

- Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction,
Ann. Entomol. Soc. 88, (5), 705-710.
- Haymer, D.S., (1994). Resolution of Population of Mediterranean Fruit Fly at The DNA Level Random Primer for The Polymerase Chain Reaction, *Genome*, 37, 244-248.
- Hoelzel, A.R. (1994). *Molecular Genetic Analysis of Populations, A Practical Approach*, IRL Press, Oxford University Press, 71-74
- Kambhampati, S., Black, W.C., Rai, K.S., (1992). Random Amplified Polymorphic DNA of Mosquito Species and Populations (Diptera: Culicidae) : Techniques, Statistical Analysis, and Applications, *J. Med. Entomol.*, 29 (6), 939-945.
- Matsumura, F. F. 1985. *Toxicology of Insecticide*, second edition, Plenum Press, New York and London
- Mardihusodo, (1992). Deteksi Dini Resistensi *Aedes Aegypti* terhadap Malathion dan Temefos, Fakultas Kedokteran UGM
- Mills, P.R., (1994). DNA Based Methods for Identification and Characterization, dari Hawksworth, D., The Identification and Characterization of Pest Organism, Wallingford, *The Systematics Association*, 427-433.
- Mullis, K.B. (1990). The Unusual Origin of Polymerase Chain Reaction, *Sci. Amer.*, 4, 36-43
- Nei, M., (1983). Genetic Polymorphism and The Role of Mutation in Evolution dari Nei, M., Koehn, R.K., *Evolution of Genes and Protein*, Sinauer Associates inc. Publisher, Massachusetts, 165-170
- Passarge, (1994). E., *Color Atlas of Genetics*, Thieme, 156-160.
- Pedigo, Larry P., (1989). *Entomology and Pest Management*, Macmillan Publishing Company, New York
- Rohlf, F.J., (1993). NTSYS-Pc, *Numerical taxonomy and Multivariate Analysis Software*, Version 1.80, Exeter Softwork, Setauket, New York,
- Rollinson, D., Stothard, J.R., (1996). Identification of Pests and Pathogens by Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPDs) dari Hawksworth, D.L., The Identification and Characterization of Pests Organism. Wallingford, *The Systematics Association*, 447-456.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Second edition, 1,2,3, Cold Spring Harbor Laboratory Press., 6.3-6.8.

Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Dinas Kesehatan Kotamadya Daerah Tingkat II, Seksi P2M, *Evaluasi Program Pemberantasan Penyakit Demam Berdarah Dengue (DBD), Anggaran Tahun 1989/1990-1996/1997*, Bandung: Pengarang.

Service, M.W., (1996). *Medical Entomology for Students*, Chapman & Hall, London. 55-80.

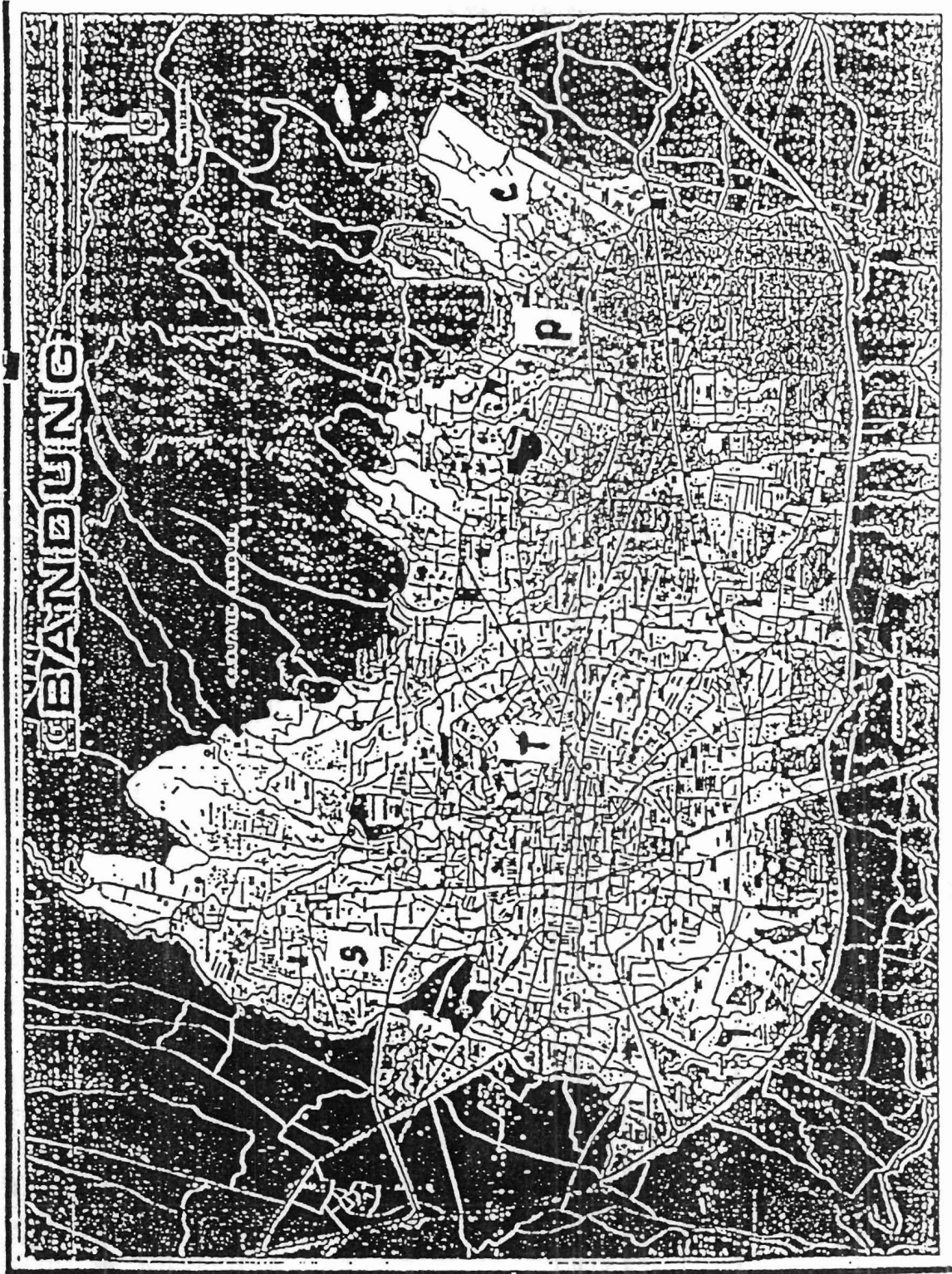
Wallis, G.P, Tabachnick, W.J, Powell, J.R., (1984). Genetic Heterogeneity among Caribbean Populations of *Aedes aegypti*, *Am.J.Trop.Med.Hyg*,33-3, 492-498.

Williams, J.G.K, Kubelik, A.R, Livak K.J, Rafalski, J.A, Tingey, S.V, (1990). DNA Polymorphism Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers, *Nucl. Acid. Res.*22(18), ,6531-6535.

Wilkerson, R.C., Parsons, T.J., Klem, T.A., (1995). Diagnosis by Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction of Four Cryptic Species Related to *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *albivittatus* (Diptera: Culicidae) from Paraguay, Argentina, *J. Med. Entomol*, 32(5), 697-704.

Wilkerson, R.C., Parsons, T.J., Klem, T.A., (1993). Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers Readily Distinguish Cryptic Mosquito Species Diptera: Culicidae: *Anopheles*, *Insect. Mol. Biol*, 1 (4), 205-211.

MILIK PERPUSTAKAAN
UNIV. NEGERI PADANG



Peta lokasi pengambilan sampel nyamuk *Aedes aegypti*
di Kotamadya Bandung, S : Sukajadi, P : Padasuka,
C: Cibiru, T : Tamblong