



Indeks sporozoit *Anopheles* spp. (Culicidae: Anophelinae) di daerah endemis malaria di Kecamatan Kokap, Kabupaten Kulon Progo

Sporozoite index of *Anopheles* spp. (Diptera: Anophelinae) in a malaria
endemic area of the Kokap Sub-district, Kulon Progo District

Andiyatu^{1*}, R.C. Hidayat Soesilohadi², Niken Satuti Nur Handayani²,
Sukarti Moeljopawiro²

¹Balai Besar Teknik Kesehatan Lingkungan dan Pengendalian Penyakit

Jalan Wiyoro Lor No. 21, Baturetno, Banguntapan, Bantul, Yogyakarta 55197

²Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Jalan Teknik Selatan, Yogyakarta 55281

(diterima Oktober 2014, disetujui Desember 2014)

ABSTRAK

Perbedaan endemisitas malaria antar desa dalam kecamatan yang sama mungkin berkaitan dengan perbedaan infektivitas dari *Anopheles* sp. Tujuan penelitian ini ialah untuk memeriksa proporsi spesies yang positif sporozoit atau infektivitas spesies (IS) dan proporsi sampel yang positif sporozoit atau indeks sporozoit total (IST) dari sebuah desa endemik tinggi (DET) dan sebuah desa endemik rendah (DER) di Kecamatan Kokap, Kabupaten Kulon Progo, Jawa Tengah. Empat spesies nyamuk *Anopheles* diperiksa, diantaranya *Anopheles vagus* Donitz, *Anopheles maculatus* (Theobald), *Anopheles balabacensis* Baisan, dan *Anopheles aconitus* Donitz. Nyamuk *Anopheles* sp. dikumpulkan secara serentak di dua desa, masing-masing lima kali selama Oktober–Desember 2013, dengan interval dua minggu, menggunakan metode *resting collection*. Pengumpulan nyamuk dilakukan setiap jam (@ 50 menit) di tiga rumah oleh dua kolektor per rumah (satu di dalam dan satu di luar), dari jam 18:00 sampai jam 06:00. Nyamuk betina parous diperiksa menggunakan metode *Multiplex-PCR* untuk mendeteksi keberadaan sporozoit. Pemeriksaan 77 sampel DNA menunjukkan bahwa IS dan IST kedua desa tersebut (49 DET dan 28 DER) berbeda nyata dengan rasio IS 66,7% : 33,3% dan rasio IST 20,41% : 3,57% (OR = 6,9; CI95% = 0,87 sampai 57,29; p = 0,021). Temuan ini mengindikasikan bahwa suatu transmisi malaria intensitas tinggi masih memungkinkan timbul di DET dan karenanya dibutuhkan suatu tindakan pengendalian vektor yang spesifik wilayah.

Kata kunci: *Anopheles* spp., endemisitas, indeks sporozoit, infektivitas

ABSTRACT

Intervillage variation of malaria endemicity in the same sub-district is probably related to infectivity variation of *Anopheles* sp. The purpose of this research was to examine the proportion of sporozoite positive species, or species infectivity (SI), and the proportion of sporozoite positive samples, or total sporozoite index (TSI), of a high endemic village (HEV) and a low endemic village (LEV) in the Kokap Sub-District, Kulon Progo District, Central Java. Four Anopheline species were examined - *Anopheles vagus* Donitz, *Anopheles maculatus* (Theobald), *Anopheles balabacensis* Baisan, and *Anopheles aconitus* Donitz. *Anopheles* mosquitoes were concurrently collected in the two villages, five times each during October–December 2013, at two-week intervals, using the resting collection method. The mosquito collection was conducted every hour (50 minutes each) at three houses by two collectors each (one inside and one outside), from 18:00 PM to 06:00 AM. Female parous mosquitoes were examined using the Multiplex-PCR method to detect the presence of sporozoites. The examination of 77 DNA samples showed that the SI and TSI of the two villages (49 HEV and 28 LEV) were significantly

*Penulis korespondensi: Andiyatu. Balai Besar Teknik Kesehatan Lingkungan dan Pengendalian Penyakit, Jalan Wiyoro Lor No. 21, Baturetno, Banguntapan, Bantul, Yogyakarta 55197, Tel: (0274) 371588, Faks: (0274) 443284, Email: andiyatu@yahoo.com.

different: a SI ratio of 66,7% : 33,3% and a TSI ratio of 20,41% : 3,57% (OR = 6,9; CI95% = 0.87 to 57.29; p = 0.021). This finding indicates that a high intensity malaria transmission could occur in the HEV and that a specific vector control measure is necessary.

Key words: *Anopheles* spp, endemicity, infectivity, sporozoite index

PENDAHULUAN

Di dunia terdapat kurang lebih 430 spesies nyamuk anggota Genus *Anopheles*, namun hanya 70 spesies dinyatakan kompeten vektor malaria (Snow & Gilles 2002). Di Indonesia, dari 81 *Anopheles* sp. yang ada terdapat 25 spesies yang telah dikonfirmasi sebagai vektor malaria (Kirnowardoyo et al. 2007; Asik et al. 2014). Status kompetensi vektor *Anopheles* sp. di suatu wilayah penting ditetapkan karena tidak semua spesies kompeten sebagai vektor malaria. Kompetensi vektor dapat berbeda antar maupun intra spesies, yaitu spesies yang sama, tetapi wilayah berbeda. Perbedaan kompetensi vektor antar dan intra spesies *Anopheles* disebabkan oleh perbedaan faktor bionomik populasi, mencakup tingkat kerentanan terhadap *Plasmodium*, rentang umur (*longevity*), sifat antropofilik, dan kepadatan relatif/kelimpahan nisbi (Mardihusodo 1999; Boewono 2012).

Informasi keberadaan spesies kompeten vektor dan karakteristik bionomiknya sangat diperlukan dalam memahami epidemiologi dan penentuan strategi penanggulangan penyakit tular vektor, termasuk malaria (Sigit 2005). Bagi wilayah endemis malaria, terutama wilayah yang akan memasuki tahap eliminasi, sangat diperlukan ketersediaan informasi sebaran *Anopheles* sp. kompeten vektor dan besaran infektifitas (Indeks Sporozoit) di tingkat spesies maupun tingkat wilayah (total spesies). Kedua informasi entomologis tersebut sangat membantu pemangku kepentingan (*stakeholder*) di dalam memahami epidemiologis penyakit dan penyusunan skala prioritas upaya pengendalian vektor secara tepat sasaran.

Kulon Progo merupakan satu-satunya kabupaten yang belum mencapai eliminasi malaria di Provinsi Daerah Istimewa Yogyakarta (DIY). Pada tahun 2012 status eliminasi malaria di Kabupaten Kulon Progo berada dalam fase pra-eliminasi, ditandai dengan capaian *annual parasite incidence* (API) < 1%. Di kabupaten ini masih terdapat tiga kecamatan endemis malaria di daerah perbukitan Bukit Menoreh (Kokap, Girimulyo, dan Samigaluh). Kokap tercatat sebagai kecamatan

dengan jumlah kasus malaria tertinggi (API 4,8%). Kasus malaria di Kecamatan Kokap tahun 2012 berkontribusi 67,5% terhadap total (237) kasus malaria di Kabupaten Kulon Progo (Dinkes. Kab. Kulon Progo 2012).

Kecamatan Kokap memiliki lima desa, yaitu Kalirejo, Hargorejo, Hargomulyo, Hargotirto, dan Hargowilis. Meskipun berada dalam wilayah kecamatan sama, kelima desa tersebut memiliki perbedaan endemisitas malaria. Laporan Murhandarwati et al. (2014) menunjukkan tingkat endemis malaria di lima desa tersebut bervariasi berdasarkan API, yaitu dua desa tergolong endemis tinggi (Kalirejo dan Hargotirto), satu desa endemis sedang (Hargowilis), dan dua desa endemis rendah (Hargorejo dan Hargomulyo). Penentuan status endemisitas malaria di lima desa tersebut didasarkan atas kriteria dalam Kemenkes. (2011) bahwa endemisitas dibagi atas tiga strata, yaitu endemis rendah, sedang, dan tinggi, dengan besaran API secara berurut < 1, 1–5, dan > 5%.

Endemisitas malaria suatu wilayah dipengaruhi berbagai faktor, antara lain infektifitas nyamuk vektor, yaitu banyaknya anggota populasi *Anopheles* sp. vektor yang terinfeksi sporozoit *Plasmodium* sp. (Snow & Gilles 2002). Untuk mempelajari fenomena endemisitas malaria yang berbeda antar desa di Kecamatan Kokap maka dilakukan pengukuran indeks sporozoit populasi *Anopheles* sp. di dua desa berbeda endemisitas, yaitu satu desa endemis tinggi dan satu desa endemis rendah.

Tujuan penelitian adalah mengetahui infektifitas spesies (proporsi spesies yang terinfeksi sporozoit) dan indeks sporozoit (proporsi sampel DNA nyamuk *Anopheles* sp. positif sporozoit) di DET dan DER di Kecamatan Kokap, Kabupaten Kulon Progo. Pengukuran indeks sporozoit *Anopheles* sp. antar wilayah bermanfaat dalam memberikan informasi entomologis penting tentang status kompetensi vektor *Anopheles* sp., yaitu spesies yang berperan penting dalam penularan malaria (Mahapatra et al. 2006). Informasi ini sangat diperlukan dalam perencanaan intervensi maupun untuk evaluasi efektifitas intervensi yang telah dilakukan (Msugh-Ter et al. 2014).

BAHAN DAN METODE

Objek penelitian

Objek penelitian adalah *Anopheles vagus* Donitz, *Anopheles aconitus* Donitz, *Anopheles maculatus* (Theobald), dan *Anopheles balabacensis* Baisan, yakni spesies dinyatakan *suspect*/vektor malaria pada penelitian sebelumnya. Keempat spesies tersebut ditemukan positif *sircumsporozoite-protein* (CSP) *Plasmodium falciparum* dan *Plasmodium vivax*, misalnya *An. aconitus* di Kabupaten Magelang dan Pekalongan (Widyastuti 2001; Barodji et al. 2007; Bangs & Rusmiarto 2007), *An. balabacensis* di Kecamatan Kokap, Magelang, dan Purworejo (Adrial et al. 2000; Bangs & Rusmiarto 2007), *An. maculatus* di Kecamatan Kokap, Purworejo, dan Banjarmangu (Widyastuti et al. 2013; Bangs & Rusmiarto 2007); dan *An. vagus* di Kokap, Purworejo, dan NTT (Wigati et al. 2006; 2010; Theodolfi 2011).

Lokasi penelitian

Penelitian dilaksanakan di Desa Hargotirto dan Hargomulyo Kecamatan Kokap Kabupaten Kulon Progo, terletak di daerah perbukitan Bukit Menoreh dengan ketinggian ± 100 m dpl (BPS Kulon Progo 2012). Kedua lokasi dipilih berdasarkan perbedaan endemisitas malaria, yaitu Hargotirto sebagai desa endemis tinggi (DET) dan Hargomulyo sebagai desa endemis rendah (DER) malaria. Jarak antara kedua desa $\pm 7-8$ km. Luas wilayah DET dan DER tidak jauh berbeda (rasio 1.471,73 : 1.520,97 ha) dengan rasio jumlah penduduk 4.788 : 8.011 jiwa. Keberadaan ternak (sapi) lebih rendah jumlahnya di DET dibanding DER, dengan rasio 124 : 675 ekor (Kecamatan Kokap 2013).

Pengambilan sampel nyamuk

Pengambilan sampel nyamuk menggunakan metoda *resting collection* (RC), yakni menangkap nyamuk beristirahat di dalam dan di luar rumah. Metoda RC dipilih karena alasan (1) memiliki risiko rendah terjadinya gigitan nyamuk infeksi pada penangkap nyamuk bila dibandingkan dengan metode umpan badan manusia (Service & Townson 2002), dan (2) representatif untuk berbagai tujuan pemeriksaan, misalnya pengukuran tingkat kepadatan, status paritas (rentang umur), dan status *blood meal*.

Pengumpulan sampel nyamuk di DET dan DER masing-masing dilakukan 5 kali antara Oktober–Desember 2013. Penangkapan nyamuk di tiap desa dilakukan di tiga rumah oleh dua orang penangkap per rumah (satu di dalam dan satu di luar rumah/ di kandang ternak). Tiga rumah dipilih di DET terdiri atas satu rumah terdapat penderita malaria (satu bulan terakhir sebelum penangkapan) dan dua rumah terdekat di sekitarnya. Di DER (tidak terdapat penderita selama periode penangkapan) dipilih tiga rumah berlokasi tidak jauh dari tempat perindukan nyamuk (< 2 km) sehingga memungkinkan memperoleh sampel nyamuk.

Nyamuk yang beristirahat di dalam rumah (di dinding, gantungan pakaian, kelambu/gorden, atau di bawah perabot) dan di luar rumah (di kandang sapi dan semak di halaman) ditangkap menggunakan aspirator mekanis. Penangkapan nyamuk dilaksanakan sebanyak 12 kali (@ 50 menit per jam), mulai pukul 18:00 sampai 06:00. Nyamuk tertangkap dimasukkan ke *paper cup* terpisah menurut jam. Setiap nyamuk ditentukan spesiesnya berdasarkan Kunci Identifikasi Nyamuk *Anopheles* Dewasa (O'Connor & Soepanto 1999; Depkes. 2000; Reid 1968). Status paritas *Anopheles* sp. sasaran (*parous* atau *nulliparous*) ditentukan berdasarkan hasil pemeriksaan ovarium di bawah lensa objektif mikroskop perbesaran 10 dan 40 kali. Prosedur pemeriksaan ovarium sesuai pedoman dalam Service & Townson (2002) dan Depkes. (2003). Nyamuk dinyatakan *parous* (pernah bertelur/berumur dewasa) bila ujung *tracheola* ovarium tampak membuka/terburai, sedangkan *nulliparous* (belum pernah bertelur/berumur muda) bila ujung *tracheola* masih menggulung. Khusus nyamuk *parous* diambil bagian kepala dan toraksnya lalu dimasukkan ke tabung *eppendorf* terpisah dan disimpan dalam toples berisi *silica gel*. Selanjutnya sampel kepala dan toraks dibawa ke laboratorium untuk proses isolasi DNA.

Ekstraksi DNA

Bahan dasar ekstraksi DNA pada sampel nyamuk hanya menggunakan bagian kepala dan toraks. Hal ini dimaksudkan agar *Plasmodium* yang terdeteksi adalah *Plasmodium* tahap sporozoit (Bass et al. 2008). Prosedur ekstraksi mengikuti protokol *GenJet Genomic DNA Purification Kit*

(Thermo Scientific), kecuali pemakaian Proteinase K dikurangi separuh (10 µl) dari protokol (20 µl). Pengurangan ini dilakukan dengan pertimbangan bahwa Proteinase K 20 µl diperuntukkan bagi 20 mg sampel jaringan mamalia, sedangkan berat 20 organ kepala dan toraks nyamuk tidak > 10 mg. Ekstraksi DNA menggunakan sistim individu (satu pool berisi satu organ kepala dan toraks dari satu individu nyamuk—bagi spesies memiliki anggota < 10 individu) dan komposit (satu pool berisi minimal 2 dan maksimal 20 organ kepala dan toraks dari spesies sama—bagi spesies memiliki anggota > 10 individu). Kedua sistim ekstraksi tersebut menggunakan prosedur dan komponen sama, seperti dalam protokol *GenJet Genomic DNA Purification Kit* (Thermo Scientific). DNA hasil purifikasi disimpan pada suhu -20 °C apabila tidak segera diproses untuk analisis selanjutnya.

Primer

Primer untuk deteksi sporozoit *Plasmodium* sp. di sampel DNA nyamuk mengacu Patsoula et al. (2003), terdiri atas tiga jenis, yaitu (1) PL3 (5'-ATG GCC GTT TTT AGT TCG TG-3'); (2) PL4 (5'-GGA AAC GGT ACG ATA AGC CA-3'); dan (3) PL5 (5'-ACG CGT GCA GCC TAG TTT AT-3'), diproduksi oleh MWG Biotech (High Point, NC). Primer tersebut didesain berdasarkan sekuens gen *small-subunit ribosomal RNA* (ssu-rRNA) *P. vivax* dan *P. falciparum* pada database GenBank dengan *accession numbers* (AN) U03080 dan M19173. Primer PL3 mengamplifikasi sekuens yang umum untuk gen rRNA *P. falciparum* (nukleotida 1390–1409, AN U03080) dan *P. vivax* (nukleotida 1427–1446, AN M19173), sedangkan PL4 dan PL5, masing-masing sebagai primer spesifik *P. vivax* (nukleotida 1636–1655, AN U03080) dan *P. falciparum* (nukleotida 1753–1772, AN M19173). Dengan aplikasi metoda *single step (multiplex-PCR)*, primer PL3 bersama PL4 dihasilkan produk spesifik 266 pb untuk *P. vivax*, sedangkan dengan primer PL3 dan PL5 dihasilkan produk spesifik 346 pb untuk *P. falciparum* (Patsoula et al. 2003).

Amplifikasi DNA

Komposisi reaksi PCR untuk amplifikasi DNA *Plasmodium* sp. pada sampel DNA genom nyamuk adalah seperempat (25 µl) dari volume akhir (100 µl) dalam Patsoula et al. (2002), terdiri atas 12,5 µl mix PCR, 4,5 µl ddH₂O, 1 µl untuk masing-masing

primer (PL3, PL5, dan PL5), dan 5 µl *template* DNA. Dalam uji PCR digunakan kontrol positif (*P. falciparum* 3D7) dari Laboratorium Biologi Molekular Eijkman Jakarta dan kontrol negatif (nyamuk *Anopheles* tidak terinfeksi *Plasmodium* sp.) dari Laboratorium Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Vektor dan Reservoir Penyakit (BBPPVRP) Salatiga. Kondisi optimum untuk amplifikasi DNA *Plasmodium* adalah predenaturasi 5 menit pada suhu 94 °C; denaturasi, *annealing* dan ekstensi masing-masing 94 °C, 55,5 °C, dan 72 °C dengan lama waktu masing-masing 30 detik; dan elongasi 10 menit pada suhu 72 °C, dengan jumlah siklus 40 kali.

Elektroforesis dan visualisasi hasil

Penentuan sampel nyamuk positif sporozoit *Plasmodium* sp. didasarkan hasil elektroforesis, yang menggunakan agarosa 2% dan ethidium bromida. Elektroforesis dilakukan dengan memasukkan 5 µl produk PCR ke dalam sumuran, kecuali sumuran 1 dimasukkan 3 µl DNA *ladder* sebagai *marker* (100–1500 pb). Proses *running* elektroforesis berlangsung 60 menit dengan 80 volt. Hasil elektroforesis diamati dengan UV *transilluminator* untuk melihat kemunculan pita DNA. Dalam penelitian ini digunakan kontrol positif untuk *P. falciparum* (346 pb). Kemunculan pita DNA yang sejajar dengan pita DNA kontrol positif maka sampel tersebut dinyatakan positif mengandung sporozoit *P. falciparum*. Sebaliknya, bila posisi pita DNA < 346 pb maka sampel tersebut dipastikan positif *P. vivax* (266 pb) karena primer yang digunakan hanya spesifik mengamplifikasi pita DNA 346 pb—untuk *P. falciparum* dan 266 pb—untuk *P. vivax* (Patsoula et al. 2003).

Analisis data

Infektifitas spesies (IS) *Anopheles* sp. adalah proporsi (persentase) spesies positif sporozoit dari jumlah spesies yang diuji PCR, sedangkan indeks sporozoit menurut spesies (proporsi sampel positif dari spesies tertentu menurut wilayah) dan indeks sporozoit total (IST) wilayah (proporsi sampel positif dari keseluruhan spesies menurut wilayah) ditentukan secara kuantitatif menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Indeks sporozoit} = \frac{\text{Jumlah sampel nyamuk positif sporozoit (spesies tertentu)}}{\text{Total sampel nyamuk diperiksa (dari spesies yang sama)}} \times 100$$

Keberadaan sporozoit *Plasmodium* sp. pada anggota populasi *Anopheles* menunjukkan secara kualitatif bahwa spesies tersebut kompeten sebagai vektor malaria (Boewono 2012). Analisis IS antar spesies dilakukan secara deskriptif berdasarkan besaran nilai IS per spesies per wilayah.

Pengujian perbedaan infektifitas *Anopheles* sp. di DET dan DER dilakukan dengan perangkat lunak Open-Epi versi 2.2 menggunakan ukuran *odds ratio* (OR), yaitu salah satu ukuran dalam studi epidemiologi (kasus kontrol, potong lintang, kohor, maupun eksperimental) untuk menunjukkan perbedaan risiko dari dua populasi yang dibandingkan (Murti 2013). Interpretasi nilai OR mengacu kriteria dalam Szumilas (2010), yaitu OR = 1 (tidak ada perbedaan) dan OR = > 1 (ada perbedaan). Penilaian besar perbedaan mengacu kriteria *effect size* dalam Wilson (2011), yaitu perbedaan kecil (OR < 2,5), sedang (OR 2,5–4,2), dan besar (OR ≥ 4,3).

HASIL

Keanekaragaman dan komposisi spesies

Spesies nyamuk *Anopheles* tertangkap di Desa Hargotirto (DET) dan Hargomulyo (DER) Kecamatan Kokap selama penelitian seluruhnya berjumlah 10 spesies (Tabel 1).

Keanekaragaman spesies *Anopheles* DET lebih rendah dibandingkan dengan DER (rasio 6 : 9). Meskipun keanekaragaman spesies lebih rendah, DET memiliki proporsi spesies *suspect*/vektor malaria yang lebih tinggi (66,7%; n = 4/6). Empat spesies *suspect*/vektor malaria (*An. aconitus*, *An. balabacensis*, *An. maculatus*, dan *An. vagus*) lengkap ditemukan di DET. Sebaliknya, DER yang memiliki keanekaragaman spesies lebih tinggi (9 spesies), hanya ditemukan tiga (33,3%) spesies *suspect*/vektor malaria (*An. aconitus*, *An. maculatus*, dan *An. vagus*).

Karakteristik bionomik populasi *Anopheles* sp.

Gambaran karakteristik bionomik populasi *Anopheles* sp. DET dan DER dilihat dari faktor kelimpahan nisbi (Kn) dan Indeks *Parous* (IP). DET memiliki lebih banyak (tiga) spesies yang terdapat dalam kelimpahan tinggi (Kn > 5%), terdiri atas *An. vagus* (Kn = 63,33%), *An. maculatus* (Kn = 29,17%) dan *An. balabacensis* (Kn = 6,67%). Di DER hanya terdapat satu spesies memiliki Kn tinggi, yaitu *An. vagus* (Kn = 98,05%) (Tabel 2).

Nilai rata-rata IP *Anopheles* di DET lebih tinggi (IP = 71,9%; kisaran IP = 67,1–75,0%). Nilai rata-rata IP *Anopheles* sp. DER 64,0% (kisaran IP = 48,3–76,9%). IP rata-rata *Anopheles* sp. di DET yang lebih tinggi mengindikasikan rentang umur *Anopheles* di DET lebih tinggi dari DER.

Tabel 1. Jenis spesies dan status kompetensi vektoral (KV) *Anopheles* spp. tertangkap di desa endemis tinggi (Hargotirto) dan desa endemis rendah malaria (Hargomulyo) di Kecamatan Kokap, Oktober–Desember 2013

Spesies	Desa endemis tinggi (Hargotirto)		Desa endemis rendah (Hargomulyo)	
	n (%)	Status KV*	n (%)	Status KV*
<i>Anopheles aconitus</i>	1 (0,71)	Vektor	3 (0,35)	Vektor
<i>An. annularis</i>	4 (2,86)	Non vektor	7 (0,80)	Non vektor
<i>An. balabacensis</i>	8 (5,71)	Vektor	0 (0,00)	
<i>An. barbirostris</i>	0 (0,00)		1 (0,12)	Non vektor
<i>An. flavirostris</i>	16 (11,43)	Non vektor	28 (3,22)	Non vektor
<i>An. kochi</i>	0 (0,00)		1 (0,12)	Non vektor
<i>An. maculatus</i>	35 (25,00)	Vektor	13 (1,49)	Vektor
<i>An. subpictus</i>	0 (0,00)		10 (1,15)	Non vektor
<i>An. tessellatus</i>	0 (0,00)		2 (0,23)	Non vektor
<i>An. vagus</i>	76 (54,29)	<i>Suspect</i>	804 (92,52)	<i>Suspect</i>
Jumlah	140 (100)		869 (100)	

*Status kevektoran berdasarkan penelitian sebelumnya.

IP tertinggi di DET ditempati *An. balabacensis* (75,0%), disusul *An. maculatus* (73,5%) dan *An. vagus* (67,1%). Di DER, IP tertinggi dimiliki *An. maculatus* (76,9%), diikuti *An. aconitus* (66,7%) dan terendah *An. vagus* (48,4%) (Tabel 2).

Indeks sporozoit *Anopheles* sp.

Ekstraksi DNA dengan sistem individu dan komposit pada 82 nyamuk *parous* DET dan 401 nyamuk *parous* DER dihasilkan 77 sampel DNA—49 dari DET dan 28 dari DER. Pemeriksaan 77 sampel DNA tersebut ditemukan 11 sampel positif sporozoit—10 sampel DET dan 1 sampel DER. Spesies *Plasmodium* yang menginfeksi nyamuk semuanya berasal dari *P. vivax*, ditandai dengan kemunculan pita DNA 266 pb pada gel elektroforesis (Gambar 1).

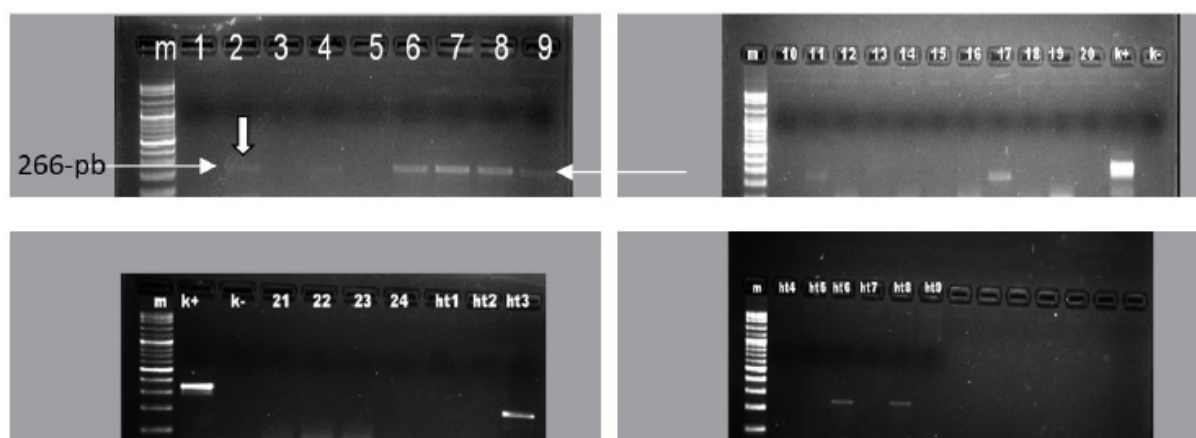
Terdapat tiga spesies positif sporozoit, yaitu dua di DET (*An. maculatus* dan *An. vagus*) dan

satu di DER (*An. aconitus*) (Tabel 3). Temuan ini menunjukkan infektifitas spesies (proporsi spesies *Anopheles* positif sporozoit) lebih tinggi di DET dibandingkan dengan DER (rasio 66,67% : 33,3%). IS tertinggi di DET ditemukan di *An. maculatus* (28%; n = 32), disusul oleh *An. vagus* (16,67%; n = 21). Di DER, diperoleh IS *An. aconitus* sebesar 100% (n = 1).

Infektifitas di tingkat individu *Anopheles* juga lebih tinggi di DET (Tabel 3). Secara total wilayah, indeks sporozoit di DET lebih tinggi secara bermakna, ditunjukkan rasio IST sebesar 20,4% : 3,57% dengan OR 6,92 (CI95% = 0,87 hingga 57,29; p = 0,021). Nilai OR tersebut menggambarkan besar risiko anggota populasi *Anopheles* sp. DET untuk terinfeksi sporozoit *P. vivax* adalah 7 kali lebih dari populasi *Anopheles* sp. DER.

Tabel 2. Kelimpahan nisbi dan Indeks *Parous* populasi *Anopheles* spp. di desa endemis tinggi (Hargotirto) dan desa endemis rendah (Hargomulyo) di Kecamatan Kokap selama Oktober–Desember 2013

Spesies	Desa endemis malaria tinggi (Hargotirto)			Desa endemis malaria rendah (Hargomulyo)		
	Jumlah nyamuk tertangkap (n)	Kelimpahan nisbi (%)	Jumlah nyamuk <i>parous</i> (Indeks <i>Parous</i>)	Jumlah nyamuk tertangkap (n)	Kelimpahan nisbi (%)	Jumlah nyamuk <i>parous</i> (Indeks <i>Parous</i>)
<i>Anopheles aconitus</i>	1	0,83	0 (0,00)	3	0,37	2 (66,67)
<i>An. balabacensis</i>	8	6,67	6 (75,00)	0	0	0
<i>An. maculatus</i>	35	29,17	25 (73,53)	13	1,58	10 (76,92)
<i>An. vagus</i>	76	63,33	51 (67,11)	804	98,05	389 (48,26)
Total	120	100,00	82 (68,91)	820	100,00	401 (48,78)



Gambar 1. Visualisasi pita DNA (266 pb) hasil elektroforesis yang menunjukkan sampel nyamuk *Anopheles* spp. uji positif *Plasmodium vivax* dari Desa Hargotirto dan Desa Hargomulyo, Kecamatan Kokap. Kode sampel 2, 4, 6, 7, 8, 9 dan 11: *An. maculatus* di Hargotirto); 17: *An. aconitus* di Hargomulyo); ht3, ht6, dan ht8: *An. vagus* di Hargotirto; m: ladder DNA 100–1500 pb; k+: kontrol positif *P. falciparum* 346- pb; dan k-: kontrol negatif.

Tabel 3. Angka sporozoit *Anopheles* spp. uji pada daerah endemis malaria tinggi (Hargotirto) dan desa endemis malaria rendah (Hargomulyo) di Kecamatan Kokap selama Oktober–Desember 2013

Spesies	Desa endemis malaria tinggi			Desa endemis malaria rendah		
	Jumlah sampel uji (n)	Jumlah positif <i>Plasmodium</i>	Angka sporozoit (%)	Jumlah sampel uji (n)	Jumlah positif <i>Plasmodium</i>	Angka sporozoit (%)
<i>Anopheles aconitus</i>	0	0	0,00	1	1	100,00
<i>An. balabacensis</i>	6	0	0,00	0	0	0,00
<i>An. maculatus</i>	25	7	28	7	0	0,00
<i>An. vagus</i>	18	3	16,67	20	0	0,00
Total	49	10	20,41	28	1	3,57

OR = 6,9 (CI95% = 0,87–57,29; p = 0,021)

OR: odds ratio.

PEMBAHASAN

Dari kajian indeks sporozoit di dua desa berbeda endemisitas di Kecamatan Kokap, yaitu Desa Hargotirto (desa endemis tinggi) dan Desa Hargomulyo (desa endemis rendah) malaria, dihasilkan dua informasi penting. Pertama, di Desa Hargotirto ditemukan lebih banyak spesies kompeten vektor malaria untuk *P. vivax*, yaitu *An. maculatus* dan *An. vagus*, sedangkan di Desa Hargomulyo hanya satu spesies kompeten vektor malaria *P. vivax*, yaitu *An. aconitus*. Ketiganya dinyatakan kompeten vektor karena di masing-masing spesies tersebut ditemukan sporozoit *P. vivax*. Sebagaimana menurut Boewono (2012) bahwa secara kualitatif kompetensi vektoral suatu spesies ditentukan berdasarkan penemuan sporozoit atau *circum sporozoite* protein dalam kelenjar ludah nyamuk (kepala dan toraks). Kedua, di Desa Hargotirto ditemukan lebih banyak anggota populasi *Anopheles* sp. positif sporozoit *P. vivax*, dengan rasio indeks sporozoit 20,4% : 3,57%. Kedua informasi tersebut menggambarkan bahwa *Anopheles* sp. di Desa Hargotirto memiliki infektifitas lebih tinggi, baik di tingkat spesies (proporsi spesies positif sporozoit) maupun di tingkat individu *Anopheles* sp. Temuan ini sejalan dengan teori bahwa tingkat endemis malaria suatu wilayah dipengaruhi oleh faktor, antara lain infektifitas nyamuk vektor—seberapa banyak/tinggi infeksi *Plasmodium* sp. terjadi di nyamuk vektor (Service & Townson 2002). Intensitas penularan malaria yang tinggi (endemis tinggi) di Desa Hargotirto adalah berkaitan dengan proporsi spesies kompeten vektor dan anggota populasi

terinfeksi sporozoit *P. vivax* yang lebih tinggi di wilayah setempat.

Sporozoit *P. vivax* hanya ditemukan di populasi *An. maculatus* dan *An. vagus* di Desa Hargotirto, tidak populasi di Desa Hargomulyo. Kondisi ini menunjukkan ada perbedaan kompetensi vektoral intra spesies *An. maculatus* maupun *An. vagus*, dalam arti kemampuan menularkan *Plasmodium* sp. (penyakit malaria) hanya ada di populasi *An. maculatus* maupun *An. vagus* di Desa Hargotirto. Perbedaan kompetensi vektoral intra spesies tersebut terkait dengan perbedaan karakteristik bionomik antar populasi, misalnya dalam hal rentang umur, kelimpahan, atau sifat antropofilik (Mardihusodo 1999; Boewono 2012). Populasi *An. maculatus* dan *An. vagus* Hargotirto yang ditemukan positif sporozoit *P. vivax*, keduanya memiliki rentang umur panjang (IP > 50%) dan kelimpahan tinggi (Kn > 5%). Kedua ciri tersebut tidak ditemukan lengkap di populasi *An. maculatus* dan *An. vagus* di Desa Hargomulyo. Populasi *An. maculatus* di Desa Hargomulyo juga memiliki rentang umur panjang (IP > 50%), tetapi kelimpahannya rendah (Kn < 5%), sedangkan populasi *An. vagus* adalah sebaliknya, yaitu terdapat dalam kelimpahan tinggi (Kn > 5%) atau bahkan sangat tinggi (Kn > 15%), tetapi rentang umur populasi relatif pendek (IP < 50%). Pengecualian terjadi di populasi *An. aconitus* di Desa Hargomulyo, yaitu meski populasi terdapat dalam kelimpahan rendah atau bahkan sangat rendah (Kn < 1%), tetapi positif sporozoit *P. vivax*. Hal ini menunjukkan kelimpahan bukan faktor penentu utama kompetensi vektoral. Penjelasan tentang fenomena *An. aconitus* yang dalam

kelimpahan populasi sangat rendah, tetapi positif sporozoit adalah terkait dengan strategi populasi dalam pencarian darah, yaitu dilakukan antara pukul 03:00–05:00, yang dalam rentang waktu tersebut aktifitas populasi spesies yang lain rendah (*unpublished*).

Tiga spesies *Anopheles* positif sporozoit *P. vivax* (*An. maculatus*, *An. vagus*, dan *An. aconitus*) terdapat ciri yang sama, yaitu populasi memiliki (1) rentang umur panjang; (2) kelimpahan tinggi (terkecuali *An. aconitus*); dan (3) antropofilik—berdasarkan temuan sebelumnya (*unpublished*). Ketiga ciri dimiliki tiga spesies tersebut menentukan mengapa ketiganya menjadi kompeten vektor. Antropofilik merupakan syarat utama dan pertama untuk terjadinya kontak antara populasi nyamuk vektor dan *Plasmodium* sp. Besar peluang kontak nyamuk—*Plasmodium* bergantung dari kelimpahan populasi *Anopheles* sp., dalam arti semakin tinggi Kn populasi maka semakin besar peluang (risiko) anggota populasi mendapat infeksi *Plasmodium* sp. *Plasmodium* sp. yang menginfeksi nyamuk dapat melangsungkan siklus hidupnya secara lengkap (dari gametosit sampai ke tahap sporozoit/infektif) bilamana rentang umur nyamuk yang diinfeksi panjang—diindikasikan dengan proporsi nyamuk *parous* yang tinggi.

Temuan bahwa *An. maculatus* dan *An. vagus* di Desa Hargotirto positif sporozoit *P. vivax* membuktikan status vektor kedua spesies tersebut sama dengan temuan peneliti sebelumnya di desa lain di Kecamatan Kokap. Misalnya, *An. maculatus* di Desa Hargorejo tahun 2011 dinyatakan kompeten vektor karena positif CSP *P. vivax*, dengan IS 3,57% (Widyastuti et al. 2013), dan *An. vagus* di Desa Hargorejo, Kalirejo, dan Hargowilis tahun 2005 juga disebut kompeten vektor karena positif CSP *P. falciparum*, dengan IS per desa, secara berurut 7,32%; 20,0%; dan 6,25% (Wigati et al. 2010). Dalam penelitian ini ditemukan IS *An. maculatus* lebih tinggi dari *An. vagus* (rasio 28% : 16,67%), hal mengindikasikan bahwa *An. maculatus* memiliki kompetensi vektoral lebih tinggi. Temuan ini lebih mengukuhkan status vektor *An. maculatus* yang dalam penelitian sebelumnya disebut vektor utama malaria di Kecamatan Kokap (NAMRU-2 1999). Besar IS yang lebih tinggi pada *An. maculatus* dapat dikaitkan dengan rentang umur populasi tersebut yang lebih panjang (rasio indeks *Parous* = 73,5% : 67,1%). Adapun temuan IS *An. aconitus*

sebesar 100% digunakan untuk menyatakan bahwa spesies ini kompeten vektor untuk *P. vivax* di Desa Hargomulyo, tetapi belum dapat menyimpulkan bahwa kompetensi vektoral spesies tersebut lebih tinggi dari *An. maculatus* (spesies dengan IS tertinggi di Desa Hargotirto; 28%). Alasannya karena IS *An. aconitus* sebesar 100% tersebut diperoleh berdasarkan perhitungan satu sampel positif dari satu sampel diperiksa (besar sampel terbatas karena Kn populasi ditemukan sangat rendah - < 1%). Sebaliknya, populasi *An. balabacensis* yang nihil sporozoit, belum dapat disimpulkan bahwa spesies ini tidak kompeten sebagai vektor malaria, dengan alasan (1) sebelumnya pernah dibuktikan sebagai spesies kompeten vektor malaria di Kecamatan Kokap karena positif CSP *P. vivax* (Adrial et al. 2000); (2) populasi memiliki Kn tinggi dan rentang umur panjang; dan (3) ada indikasi populasi bersifat antropofilik, ditandai dengan sampel yang ditemukan tidak ada yang berasal dari nyamuk beristirahat di kandang, melainkan diperoleh dari yang hinggap di manusia (penangkap nyamuk). Oleh karena anggota populasi *An. balabacensis* cenderung hinggap di tubuh penangkap di dalam maupun di luar rumah maka dilakukan penangkapan dengan metoda *landing collection*, meskipun metoda yang ditetapkan adalah *resting collection*. Besaran IS spesies dalam penelitian ini tidak diperbandingkan dengan besar IS dari temuan peneliti sebelumnya karena alasan adanya perbedaan lokasi, waktu maupun metode deteksi sporozoit yang digunakan. Metode deteksi sporozoit dengan PCR (*Multiplex-PCR*) yang digunakan dalam penelitian ini memiliki sensitifitas dan spesifisitas lebih tinggi dari metode yang digunakan peneliti sebelumnya - ELISA (Mohanty et al. 2007; Hasan et al. 2009).

Hasil penelitian ini yang menunjukkan Desa Hargotirto dan Desa Hargomulyo terdapat perbedaan dalam hal jenis spesies vektor dan infektifitasnya (indeks sporozoit) berimplikasi pada penentuan upaya pengendalian vektor yang spesifik wilayah, terutama pengendalian pada nyamuk pra dewasa, karena ketiga spesies kompeten vektor tersebut memiliki perbedaan preferensi habitat perkembangbiakan. Menurut Sigit (2005) bahwa informasi tentang spesies vektor dan bionomiknya penting untuk pemahaman epidemiologis dan penentuan strategi pengendalian penyakit tular vektor (termasuk malaria). Oleh

karena itu, diharapkan hasil temuan penelitian ini bermanfaat bagi *stakeholder* Kabupaten Kulon Progo untuk perencanaan secara tepat strategi pengendalian (pemilihan metode dan sasaran) dan alokasi sumber daya kegiatan pengendalian vektor maupun kegiatan lain terkait (misalnya edukasi ke masyarakat tentang potensi penularan dan upaya pencegahan di tingkat individu). Semua kegiatan pengendalian tersebut ditujukan untuk menurunkan jumlah atau menghilangkan fokus aktif (lokasi yang masih terjadi penularan setempat) dan jumlah kasus penularan setempat. Melalui pengendalian vektor yang tepat sasaran dan tepat metode diharapkan terjadi percepatan pencapaian eliminasi malaria di Kabupaten Kulon Progo, yakni kasus penularan setempat mencapai nol selama tiga tahun berturut (Kemenkes. 2009).

KESIMPULAN

Infektifitas spesies dan indeks sporozoit total *Anopheles* sp. DET dan DER berbeda secara signifikan. DET memiliki infektifitas spesies-spesies kompeten vektor malaria yang lebih banyak (*An. maculatus* dan *An. vagus*) dengan indeks sporozoit total wilayah yang lebih tinggi, hal ini menandakan DET memiliki risiko lebih tinggi mengalami intensitas penularan malaria yang tinggi (menjadi wilayah endemis tinggi malaria) dibandingkan dengan DER. Temuan penelitian berimplikasi pada perlunya skala prioritas tinggi alokasi sumber daya dan strategi pengendalian vektor yang spesifik wilayah bagi DET, tanpa mengabaikan DER yang juga berisiko terjadi penularan malaria akibat adanya *Anopheles* sp. kompeten vektor (*An. aconitus*).

UCAPAN TERIMA KASIH

Penghargaan dan terima kasih penulis sampaikan kepada Kepala BBPP-SDM Kementerian Kesehatan RI atas pemberian bantuan beasiswa pendidikan, termasuk biaya penelitian; penangkap nyamuk di Desa Hargotirto dan Hargomulyo yang telah membantu proses *sampling* nyamuk; Kepala Balai dan Kepala Laboratorium dan Teknisi di Laboratorium Biologi Molekular dan Laboratorium Entomologi

BBPPVRP Salatiga atas pendampingannya dalam pemeriksaan secara PCR untuk deteksi sporozoit *Plasmodium* sp. di nyamuk uji.

DAFTAR PUSTAKA

- Adrial, Mardihusodo SJ, Tjokrosonto S, Atmosoedjono S. 2000. Penentuan status vektor malaria nyamuk *Anopheles balabacensis* (Diptera: Culicidae) di Kokap, Kulon Progo, Daerah Istimewa Yogyakarta. *Sains Kesehatan* 13:89–98.
- Asik, Purbadi IMY, Samad I, Kusumaningsih M, Theodora M, Intarti Y, Susanto H, Laihadi FJ, Worowijat, Rogayah H, Pramono B, Sambodo A, Hawley W, Hakim L, Paulus S, Izhar A. 2014. *Pedoman Pengendalian Vektor Malaria*. Jakarta: Ditjen. Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan.
- Departemen Kesehatan [Depkes] RI. 2000. *Kunci Bergambar Nyamuk Anopheles Dewasa di Jawa*. Jakarta: Ditjen Pemberantasan Penyakit Menular dan Penyehatan Lingkungan Pemukiman.
- Departemen kesehatan [Depkes] RI. 2003. *Modul Entomologi Malaria*. Jakarta: Ditjen Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan.
- Dinkes. Kab. Kulon Progo. 2012. *Profil Kesehatan Kabupaten Kulon Progo Tahun 2012*. Wates.
- Bangs MJ, Rusmiarto S. 2007. Malaria Vector Incrimination in Indonesia using CSP-ELISA from 1986 to 2007. U.S. Naval Medical Research Unit 2 (NAMRU-2). Jakarta. Unpublished report.
- Barodji, Boewono DT, Sumardi. 2007. Fauna nyamuk, konfirmasi vektor dan beberapa aspek bionomik vektor malaria di daerah endemis malaria Kabupaten Pekalongan. *Jurnal Ekologi Kesehatan* 6:548–558.
- Bass C, Nikou D, Blagborough AM, Vontas J, Sinden RE, Williamson MS, Field LM. 2008. PCR-based detection of *Plasmodium* in *Anopheles* mosquitoes: a comparison of a new high-throughput assay with existing methods. *Malaria Journal* 7:177. doi: <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2875-7-177>.
- Boewono DT. 2012. Indikator Entomologi sebagai Variabel Epidemiologi dan Penentuan Strategi Pengendalian Vektor. Didalam: *Orasi Pengukuhan Profesor Riset Bidang Biologi Lingkungan*. Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan RI.
- BPS Kulon Progo. 2012. *Kecamatan Kokap dalam Angka 2012*. Wates: Badan Pusat Statistik Kabupaten Kulon Progo.

- Hasan AU, Suguri S, Sattabongkot J, Fujimoto C, Amakawa M, Harada M, Ohmae H. 2009. Implementation of a novel PCR based method for detecting malaria parasites from naturally infected mosquitoes in Papua New Guinea. *Malaria Journal* 8:182. doi: <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2875-8-182>.
- Kec. Kokap. 2013. *Profil Kecamatan Kokap Tahun 2013*. Kecamatan Kokap. Kabupaten Kulon Progo.
- Kemenkes. 2009. *Keputusan Menteri Kesehatan R.I. Nomor 293/Menkes/SK/IV/2009 tentang Eliminasi Malaria di Indonesia*. Jakarta: Mentrian Kesehatan.
- Kemenkes. 2011. *Buku Saku Menuju Eliminasi Malaria*. Jakarta: Direktorat PPBB, Ditjen PP dan PL, Kementerian Kesehatan RI.
- Kirnowardoyo S, Pitojo PD, Asfarain A, Situmeang RK, Zubaedah S, Riyanti F, Paulus S, Renny M. 2007. *Vektor Malaria di Indonesia*. Jakarta: Depkes. RI. Direktorat Jenderal Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan.
- Mahapatra NNS, Marai MR, Ranjit SK, Parida DP, Hansdah RK, Hazra, Kar SK. 2006. Detection of *Plasmodium falciparum* infection in *Anopheles* Mosquitoes from Keonjhar District, Orissa, India. *Journal of Vector Borne Diseases* 43:191–194.
- Mardihusodo SJ. 1999. Malaria: Status kini dan pengendalian nyamuk vektornya untuk abad XXI. Di dalam: *Pidato Pengukuhan Jabatan Guru Besar Pada Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada*. Yogyakarta: UGM.
- Mohanty A, Kar P, Mishra K, Singh DV, Mahapatra N, Kar SK, Dash AP, Hazra PK. 2007. Multiplex PCR assay for the detection of *Anopheles fluviatilis* species complex, human host preference, and *Plasmodium falciparum* sporozoite presence, using unique mosquito processing method. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 76:837–843.
- Msugh-Ter MM, Gbilekaa VC, Nyiutaha IG. 2014. Sporozoite infection rates of female Anopheline mosquitoes in Makurdi, an endemic area for Malaria in Central Nigeria. *Journal of the Entomological Research Society* 2:103–115.
- Murhandarwati EE, Fuad A, Nugraheni MDF, Suyanto S, Wijayanti MA, Widartono BS, Chuang TW. 2014. Early malaria resurgence in pre-elimination areas in Kokap Subdistrict, Kulon Progo, Indonesia. *Malaria Journal* 13:130. doi: <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2875-13-130>.
- Murti B. 2013. *Desain dan Ukuran Sampel untuk Penelitian Kuantitatif dan Kualitatif di Bidang Kesehatan*. Yogyakarta: UGM Press.
- NAMRU-2. 1999. Post War II Locations of malaria vector's in Indonesia. Jakarta: Naval Medical Research Unit.
- O'Connor CT, Soepanto A. 1999. *Kunci Bergambar Nyamuk Anopheles Dewasa di Indonesia*. Jakarta: Departemen Kesehatan R.I. Direktorat Jenderal Pemberantasan Penyakit Menular dan Penyehatan Lingkungan Pemukiman.
- Patsoula E, Spanakos G, Sofianatou D, Parara M. 2003. A single-step, PCR-based method for the detection and differentiation of *Plasmodium vivax* and *P. falciparum*. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 97:15–21. doi: <http://dx.doi.org/10.1179/000349803125002535>.
- Reid JA. 1968. *Anopheline Mosquitoes of Malaya and Borneo*. Kuala Lumpur: Government of Malaysia.
- Service MW, Townson H. 2002. The Anopheles vektor. In: Warrel DA, Gilles HM (Eds.), *Essential Malariology* 4th ed. pp. 59–84. London: Oxford University Press Inc.
- Sigit SH. 2005. *Bioekologi Vektor dan Reservoir: Arti Pentingnya dalam Epidemiologi dan Pengendalian Penyakit*. Jakarta: Simposium Nasional Vektor dan Reservoir Penyakit.
- Snow RW, Gilles HM. 2002. The epidemiology of malaria. In: Warrel DA, Gilles HM (Eds.), *Essential Malariology* 4th Ed. pp. 85–106. London: Oxford University Press Inc.
- Szumilas M. 2010. Explaining odds ratios. *Journal of the Canadian Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 19:227–229.
- Theodolfi R. 2011. *Studi Kompetensi dan Kapasitas Vektorial Anopheles vagus dan Anopheles barbirostris sebagai Vektor Malaria di Kelurahan Oesao Kabupaten Kupang*. Tesis. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada.
- Widyastuti U. 2001. *Kompetensi Vektorial An. aconitus Donitz (Diptera: Culicidae) di Kecamatan Borobudur*. Tesis. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada.
- Widyastuti U, Boewono DT, Widiarti, Supargiyono, Satoto TBT. 2013. Kompetensi vektorial *Anopheles maculatus* Theobald di Kecamatan Kokap, Kabupaten Kulon Progo. *Media Penelitian dan Pengembangan Kesehatan* 23:47–56.
- Wigati RA, Mardiana AY, Mujiono. 2006. Inkriminasi nyamuk *An. vagus* Donitz 1902 (Diptera: Culicidae) sebagai vektor malaria di Kecamatan Kokap, Kabupaten Kulonprogo, DIY. *Sains Kesehatan* 19:503–516.
- Wigati RA, Mardiana, Mujiyono, Alfiah S. 2010. Deteksi protein *circum sporozoite* pada spesies nyamuk *An. vagus* tersangka vektor malaria di Kecamatan Kokap, Kabupaten Kulon Progo dengan Uji *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). *Media Litbang Kesehatan* XX:118–123.
- Wilson DB. 2011. Calculating Effect Sizes. Tersedia di: www.campbellcollaboration.org [diakses 7 April 2015].