

Identifikasi spesies nyamuk genus *Mansonia* dan deteksi molekuler terhadap mikrofilaria/larva cacing *Brugia malayi* pada nyamuk genus *Mansonia*

Dalilah¹, Chairil Anwar¹, Theodorus², Irsan Saleh²

¹Bagian Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Sriwijaya, Palembang
²Bagian Farmakologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Sriwijaya, Palembang
21lila.azhari@gmail.com

Abstrak

Filariasis merupakan penyakit menular menahun dengan kecacatan seumur hidup yang disebabkan oleh infeksi cacing filaria. Daerah endemis filariasis di Indonesia tersebar cukup luas. Sebanyak 70% kasus ini disebabkan oleh *Brugia malayi*. Kabupaten Banyuasin Sumatera Selatan termasuk salah satu wilayah endemis filariasis malayi. Pemutusan transmisi vektor merupakan unsur utama program eliminasi filariasis limfatik sehingga metode deteksi untuk mengetahui ada tidaknya infeksi larva pada nyamuk adalah sangat diperlukan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui jenis spesies nyamuk *Mansonia* sebagai vektor filaria di Banyuasin dan mendeteksi DNA mikrofilaria/larvafilaria *Brugia malayi* pada tubuh vektor. Penelitian ini merupakan uji laboratoris yang dilaksanakan pada tiga Rukun Tetangga (RT) di Desa Sungai Rengit Murni yang lokasinya berdekatan dengan sungai/rawa dan pemukiman. Sampel adalah semua nyamuk genus *Mansonia* betina. Penangkapan dilakukan dengan umpan hewan/sapi yang dimasukkan di dalam kelambu. Identifikasi nyamuk dilakukan di Lokalitbang P2B2 Baturaja dan identifikasi molekuler dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi RSMH Palembang. Populasi nyamuk yang berhasil ditangkap dengan umpan sapi sebanyak 3085 ekor dengan populasi nyamuk dominan berasal dari genus *Culex* dan *Mansonia*. Sebanyak tujuh spesies nyamuk genus *Mansonia* ditemukan yakni : *Ma. uniformis*, *Ma. africana*, *Ma. indiana*, *Ma. dives*, *Ma. annulifera*, *Ma. annulata* dan *Ma. Bonneae*. Total jumlah nyamuk *Mansonia* yang didapat berjumlah 906 ekor yang dibagi dalam 50 pool. Pada hasil pemeriksaan laboratorium molekuler didapat hasil tidak munculnya pita di titik 322 bp atau 644 bp yang merupakan rantai DNA dari *Brugia malayi*. Pada penelitian ini disimpulkan bahwa ditemukan tujuh spesies nyamuk dari genus *Mansonia*. Pada uji molekuler tidak ditemukan larva/mikrofilaria. Sebagai saran dilakukan penelitian lebih lanjut dengan metode pemeriksaan molekuler yang lebih spesifik untuk mendeteksi keberadaan mikrofilaria dalam tubuh vektor, memperbanyak jumlah sampel sehingga peluang untuk ditemukannya akan semakin besar.

Kata Kunci: *Brugia malayi*, Filariasis, *Mansonia*, Polymerase Chain Reaction

Abstract

Identification of genus *mansonia* mosquito species and molecular detection of microfilariae / *brugia malayi* worm larvae in *mansonia* genus. Filariasis is a chronic infection disease with life long disability caused by the filarial worm infection. Filariasis endemic areas in Indonesia are rather widespread. As many as 70% of cases are caused by *Brugia malayi*. Almost all regions of Indonesia are at risk for filariasis contaminated, one in the South Sumatra village of Banyuasin. Termination of vector transmission is a key element of lymphatic filariasis elimination program, that detection method to determine the presence or absence of infection in the mosquito larvae is very necessary. This study aims to identify some species of *Mansonia* mosquitoes and to detect microfilariae/larvae *Brugia malayi* in *Mansonia* mosquitoes at Sungai Rengit Murni Village. This was a laboratory test. This study has been taken from March until May 2013. Mosquitoes population were collected using animal bait inside the tent located in three sites between swamp and the village. Sample was all female *Mansonia* mosquitoes. Identification of mosquitoes has been done at Lokalitbang P2B2 Baturaja and molecular identification conducted in the Laboratory of Microbiology RSMH Palembang. In the result, there has been found 3085 of mosquitoes population, which was *Culex* and *Mansonia* dominant number of mosquitoes. There were found seven species of *Mansonia* mosquitoes : *Ma. uniformis*, *Ma. africana*, *Ma. indiana*, *Ma. dives*, *Ma. annulifera*, *Ma. annulata* dan *Ma. Bonneae*. About 906 of female *Mansonia* mosquitoes were collected in to 50 pools, the molecular test result has not detected the band in 322 or 644 bp of larvae/microfilariae *Brugia malayi* DNA. It can be concluded that larvae/microfilariae in all species *Mansonia* has not been found. Following research should be attempted with molecular test that more specific to detect larvae/microfilariae from vectors, opportunity to get sample positive if was higher as many as samples were collected. Following research also can compare sensitivity and specificity between dissection methods and PCR methods

Keywords: *Brugia malayi*, Filariasis, *Mansonia*, Polymerase Chain Reaction

1. Pendahuluan

Filariasis merupakan penyakit menular menahun yang disebabkan oleh infeksi cacing filaria yang penularannya diperantarai berbagai jenis nyamuk. Menurut *World Health Assembly* (WHA), penyakit ini masih merupakan masalah kesehatan masyarakat dunia. Lebih dari 120 juta orang di 80 kota di dunia terinfeksi filaria dan lebih dari 40 juta orang menderita kecacatan kronis akibat filariasis.¹

Program eliminasi filariasis di dunia dimulai berdasarkan deklarasi WHO tahun 2000. Di Indonesia program eliminasi filariasis dimulai pada tahun 2002. Berdasarkan laporan dari kabupaten/kota di Indonesia, jumlah kasus kronis filariasis yang dilaporkan sampai tahun 2009 sudah sebanyak 11.914 kasus. Untuk mencapai eliminasi, di Indonesia ditetapkan dua pilar yang akan dilaksanakan yaitu: 1). Memutuskan rantai penularan dengan pemberian obat massal pencegahan filariasis (POMP Filariasis) di daerah endemis; dan 2). Mencegah dan membatasi kecacatan karena filariasis.²

Daerah endemis filariasis di Indonesia tersebar cukup luas. Sebanyak 70% kasus filariasis di Indonesia disebabkan oleh *Brugia malayi*. Hampir seluruh wilayah Indonesia mempunyai resiko untuk kejangkitan filariasis karena cacing penyebabnya dan nyamuk penyebarannya tersebar luas. Di Banyuwangi sendiri merupakan daerah endemis, angka *microfilaria rate* (mf rate) masih tinggi yaitu 2,02.^{3,4}

Di Indonesia telah teridentifikasi 23 spesies nyamuk dari 5 genus yaitu *Mansonia*, *Anopheles*, *Culex*, *Aedes*, dan *Armigeres* yang menjadi vektor filariasis. Pada filariasis bancroftian vektor potensial adalah *Culex sp*, *Anopheles spp* dan *Aedes spp* sedang pada filariasis brugian, adalah *Anopheles* dan *Mansonia*.⁵

Filariasis daerah perkotaan dapat ditularkan melalui gigitan vektor seperti *Culex quinquefasciatus* dan *Anopheles spp*, *Aedes spp* serta *Mansonia* di daerah

pedesaan. Penularan filariasis yang di bawa oleh nyamuk *Mansonia* disebabkan oleh lingkungan tempat penampungan air yang terbengek, rawa terbuka, lubang bekas penggalian yang didalamnya ditumbuhi oleh tumbuhan air seperti eceng gondok, trapa air merupakan perindukan yang potensial bagi nyamuk tersebut.^{6,7}

Pemutusan transmisi vektor merupakan unsur utama program eliminasi filariasis limfatik sehingga metode deteksi untuk mengetahui ada tidaknya infeksi pada nyamuk adalah sangat diperlukan. Selain monitoring terhadap infeksi filariasis pada manusia, pengukuran infeksi larva pada populasi nyamuk juga tak kalah penting untuk mengevaluasi kesuksesan intervensi dalam eliminasi filariasis pada daerah endemis.^{8,9,10}

Pada daerah endemis deteksi yang sangat bermanfaat adalah *finger prick test* atau pemeriksaan sediaan darah jari dan *the DEC provocative test* yang menjadi standar emas pengujian mikrofilaria, namun oleh karena parasit mempunyai periode nokturnal (penampakan dalam darah pada malam hari) yang membatasinya sehingga tes ini hanya efektif dilakukan pada malam hari.¹¹

Teknik lain dalam pemeriksaan untuk mendeteksi mikrofilaria dalam darah yaitu dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Metode ini dapat mendeteksi 1 pikogram DNA filaria pada darah penderita.¹²

Teknik PCR sensitif dalam mendeteksi adanya DNA *Brugia malayi* dalam darah walaupun konsentrasinya sangat sedikit, pada penelitian sebelumnya didapat bahwa tidak ada perbedaan hasil yang bermakna pada uji PCR dengan metode pengambilan darah siang dan darah malam dimana seharusnya untuk mendapat peluang ditemukannya DNA tersebut pemeriksaan lebih cenderung dilakukan pada malam hari.¹³

Dengan kemampuan teknik PCR yang dapat mendeteksi adanya DNA parasit filaria baik yang hidup maupun mati dalam densitas yang rendah, maka teknik ini sekarang dikembangkan juga untuk mendeteksi mikrofilaria pada tubuh nyamuk sebagai

vektor filaria. PCR dapat digunakan untuk mendeteksi genom *Brugia malayi Hha I repeat* padarah manusia dan pada tubuh vektor dan telah diuji pada sampel darah yang berasal dari Indonesia.¹⁴

Hha I repeat Brugia malayi sekuens adalah nukleotida sepanjang 322 yang mempunyai banyak ulangan, tersusun tandem dan unik, mempunyai >30.000 copy per haploid genome sehingga amplifikasi PCR salah satu pendekatan *Hha I* molekuler yang menjanjikan untuk mendeteksi infeksi pada vektor dan darah manusia baik dengan pendekatan konvensional PCR maupun menggunakan metode yang lebih spesifik dan kuantitatif seperti pada *RealTime* PCR.¹⁵

2. Metode

Penelitian ini berupa deskriptif uji laboratoris. Sampel diperoleh dari perumahan dan lingkungan di tiga dusun di Desa sungai rengit di Kabupaten Banyuasin. Identifikasi nyamuk akan dilaksanakan di lokalitbang Baturaja, sedangkan uji molekuler dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi RSMH Palembang. Penelitian dilakukan Maret sampai dengan Mei 2013.

Populasi adalah seluruh spesies nyamuk yang ada di Desa Sungai Rengit Kabupaten Banyuasin dengan sampel adalah nyamuk dari genus *Mansonia* betina yang akan ditangkap di tiga dusun di Desa Sungai Rengit Banyuasin.

Peralatan penangkapan nyamuk terdiri dari, kelambu dengan umpan ternak di dalamnya, aspirator, ovitrap, gelas kertas yang tertutup kasa bagian atasnya, tabung eppendorf. Sedangkan bahan pemeriksaan alat uji biomolekuler PCR antara lain: Cetakan Deoxiribonukleik Acid (DNA template), 1 pasang Primer (oligonucleotida primer); Enzim DNA polymerase yang tahan panas; Dioksinucleotida (dNTPs), buffer.

Tiap ekor nyamuk digerus menggunakan *spatle*, selanjutnya ekstraksi DNA dengan metode *Chelex-100* dengan menggunakan Phosphate Buffer Saline (PBS) pH 7,4;

Safonin 0,5% dalam PBS; dan *chelex* 20% dalam dd H₂O pH 10,5.

Volume total 25 ul yang digunakan saat melakukan PCR terdiri atas PCR *mix Go Taq* (Promega, USA) 10 ul, ddH₂O 9ul, dan DNA cetakan (*template*) 5ul serta primer oligonukleotida *reverse* (R) dan *forward* (F) masing-masing 0,5ul.

Polimerase chain reaction dilakukan dengan thermocycler GeneAmp 9700 (PE Applied Biosystem) menggunakan primer *forward* HhaI (5'GCGCATAAATTCATCAGC-3') dan *reverse* HhaII (5'GCGCAAAACTTAATTACAAAAGC-3').

Program PCR yang digunakan adalah denaturasi awal 95°C : 5 menit sebanyak 1 siklus; denaturasi 95°C : 1 menit, *annealing* 55°C : 1 menit, *extension* 72°C : 1 menit masing-masing sebanyak 35 siklus. Terakhir adalah *extension* pada 72°C selama 5 menit dan hold pada 4°C.

3. Hasil

Dari hasil penangkapan didapatkan total jumlah populasi nyamuk sebanyak 3085 ekor nyamuk, dengan jumlah nyamuk yang mendominasi yaitu dari Genus *Culex* sebanyak 2145 ekor dan dari Genus *Mansonia* sebanyak 923 ekor, dimana dari keseluruhan *Mansonia* ada pula 11 ekor nyamuk *Mansonia* jantan yang tertangkap di RT 1 dan 6 ekor di RT 7.

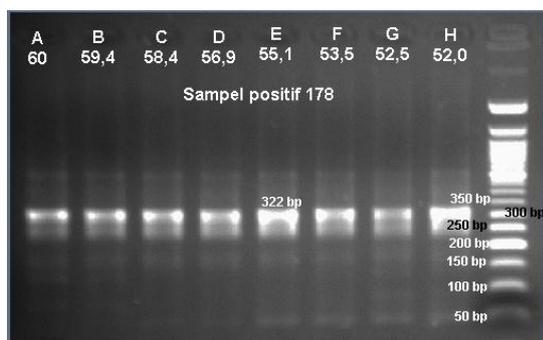
Tabel 1. Genus dan Kepadatan Nyamuk yang Tertangkap pada Kelambu dengan Umpan Sapi di Desa Sungai Rengit Murni

Genus Nyamuk	Lokasi			Jumlah	% Total
	RT 1	RT 6	RT 7		
<i>Mansonia</i>	506	240	177	923	29,92
<i>Culex</i>	586	838	721	2145	69,52
<i>Anopheles</i>	5	3	7	15	0,50
<i>Armigeres</i>	0	1	1	2	0,06
Jumlah	1097	1082	906	3085	100

Tabel 2. Hasil Penangkapan tujuh spesies *Mansonia* di desa Sungai Rengit Murni

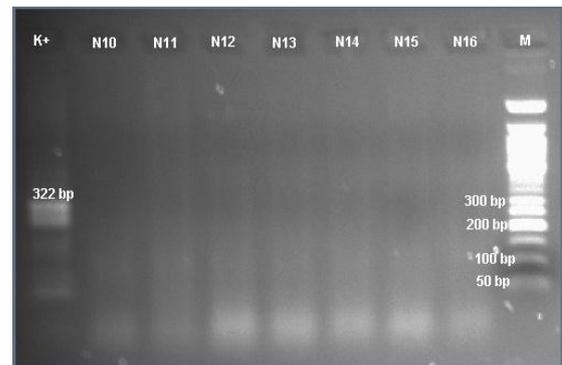
Jenis Nyamuk	RT			N	% total	Jumlah pool nyamuk (15-20 ekor/pool)
	1	6	7			
					71,41	
<i>Mansonia uniformis</i>	326	201	120	647		33
<i>Mansonia africana</i>	117	23	32	172	18,98	9
<i>Mansonia indiana</i>	44	7	2	53	5,85	3
<i>Mansonia dives</i>	5	5	4	14	1,55	1
<i>Mansonia annulifera</i>	1	3	13	17	1,88	1
<i>Mansonia annulata</i>	0	1	0	1	0,11	1
<i>Mansonia bonneae</i>	2	0	0	2	0,22	
Jumlah	495	240	171	906	100	50

Kontrol positif tidak didapatkan pada laboratorium FK UI, sebagai pengganti kontrol positif berasal dari darah penduduk Desa Sungai Rengit yang positif. Berikut adalah hasil amplifikasi PCR pada gen *HhaI repeat*.

**Gambar 1.** Amplifikasi Gen *HhaI Repeat* Pada Kontrol Positif dari darah penderita. Gambaran pita paling jelas pada suhu optimasi Annealing 60°C.

Amplifikasi PCR sampel nyamuk *Mansonia* yang berasal dari Desa Sungai Rengit Murni RT 1, RT 6 dan RT 7 sebanyak

906 ekor nyamuk *Mansonia* dibagi kedalam 50 pool, 1 pool nyamuk terdiri atas 15-20 ekor nyamuk, kecuali untuk *Ma. annulata* dan *Ma. bonneae* yang ditemukan 1-2 ekor digabung menjadi 1 pool. Semua pool nyamuk sampel menunjukkan hasil negatif PCR.

**Gambar. 2:** Hasil amplifikasi PCR dari pool sampel nyamuk, K+ adalah kontrol positif, N10-N16 adalah hasil amplifikasi nyamuk *Mansonia*, M=marker

4. Pembahasan

Hasil penangkapan nyamuk di tiga RT di Desa Sungai Rengit Murni didominasi oleh nyamuk genus *Culex* dan *Mansonia*. Pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Agustina (2011) *Mansonia* merupakan genus nyamuk paling banyak yang berhasil ditangkap. Sedangkan pada penelitian ini, jumlah *Culex* yang berhasil ditangkap mendominasi di 2 RT yaitu RT 6 dan 7.⁴

Cara pengambilan sampel pada penelitian ini berbeda dari penelitian sebelumnya dimana pengambilan sampel dilakukan dengan aspirator di area yang menjadi tempat perindukan dan peristirahatan nyamuk yaitu didekat tanaman air seperti lempuyang, dan eceng gondok hal ini memungkinkan didapatnya nyamuk *Mansonia* lebih tinggi karena area tersebut merupakan habitat dari nyamuk *Mansonia*.⁴

Pada penelitian ini metode pengambilan sampel dengan cara memasang kelambu diantara sungai tempat perindukan dan pemukiman dengan menjadika sapi sebagai umpan. Nyamuk paling banyak ditemukan adalah genus *Culex*. Beberapa spesies *Culex*

memang memiliki kesukaan menggigit hewan ternak/zoofilik daripada manusia seperti jenis *Culex gelidus* dan *Culex tritaeniorhynchus*.¹⁶

Kondisi sungai yang tercemar dengan sampah dan kotoran limbah rumah tangga (mandi,cuci,kakus) di area rawa dan pemukiman seperti ini lebih diminati oleh *Culexquinquefasciatus* dimana habitat nyamuk ini dapat berkembang biak di air yang terkontaminasi material organik comberan, selokan yang kotor, septik tank, hingga air jernih dari dalam wadah/pot artifisial.¹⁷

Selain itu, area pengambilan dimana ditempatkan kelambu diantara sungai/rawa dan pemukiman penduduk juga berpengaruh. Pada RT 1 populasi nyamuk antara Genus *Culex* dan *Mansonia* sama banyak, hal ini kemungkinan disebabkan area pengambilan di RT1 masih didominasi sungai/rawa yang banyak tanaman air dibandingkan area pemukiman.

Berbeda dengan hasil penangkapan di RT 6 dan 7 dimana area tersebut sudah padat pemukiman dan kawasan rawa/sungai di RT tersebut tidak begitu luas karena penurunan debit air akibat musim kemarau dan sepanjang rawa/sungai banyak ditemui sampah domestik rumah tangga,sehingga kemungkinan habitat yang seperti itu sesuai untuk nyamuk *Culex*.

Spesies *Mansonia* terbanyak ditemukan adalah *Mansonia uniformis* (71,41%) yang merupakan vektor filaria di daerah Sumatera Selatan. Populasi spesies yang dominan dari genus ini berupa rawa-rawa terbuka yang banyak ditumbuhi rumput air seperti yang ada di Desa Sungai Rengit Murni. Karakteristik nyamuk ini yaitu: pada scutum ada sepasang garis/jalur yang membujur berwarna kehijau-hijauan pronotum bagian belakang ada sekumpulan sisik-sisik yang sempit membengkok, nyamuk berukuran sedang berwarna coklat.⁵

Pada penelitian yang dilakukan sebelumnya, hasil positif didapat pada nyamuk *Aedes aegypti* yang telah diinfeksi dengan darah gerbill positif mikrofilaria *Brugia malayi* yang dibiakkan di laboratorium. Dengan membandingkan berbagai macam metode

ekstraksi, pada pool nyamuk yang diisi satu nyamuk positif terinfeksi mikrofilariadengan semua metode ekstraksi tersebut mendapat hasil positif, sebaliknya pada pool nyamuk yang tidak dimasukkan nyamuk infeksi, menunjukkan hasil yang negatif.¹⁹

Berbeda dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Haryuningtyas dan Subekti pada nyamuk di Kalimantan Selatan didapat juga hasil yang negatif untuk pool nyamuk dari lapangan yang telah di PCR, sedangkan untuk nyamuk sampel dari laboratorium yang telah diinfeksi dengan mikrofilaria dari darah gerbil ternyata juga tidak semua menunjukkan hasil yang positif.¹⁶ Hal ini menunjukkan perlu adanya pemeriksaan PCR yang lebih spesifik dalam mendeteksi DNA untuk meminimalisir kesalahan amplifikasi gen seperti pada nested PCR yang menggunakan 2 primer. Hasil fragmen DNA dari nested PCR lebih spesifik (lebih pendek) dibandingkan dengan PCR biasa. Waktu yang diperlukan dalam reaksi nested PCR lebih lama daripada PCR biasa karena pada nested PCR dilakukan 2 kali reaksi PCR sedangkan pada PCR biasa hanya 1 kali reaksi PCR.

Selain itu, hasil negatif juga dipengaruhi dari sifat vektor. Tidak semua vektor potensial akan positif mikrofilaria karena banyak faktor yang mempengaruhi. Ada banyak parameter yang terkait dengan siklus transmisi filariasis, parameter tersebut berhubungan setidaknya dengan lima hal berikut: (1) manusia sebagai sumber infeksi, (2) infeksi pada vektor, (3) perkembangan larva filarial dalam tubuh vektor, (4) efisiensi vektor dalam menginfeksi populasi manusia dan (5) efisiensi perkembangan dan reproduksi parasit dalam tubuh manusia.²⁰

Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi peran nyamuk sebagai vektor antara lain adalah umur nyamuk, kontak antara manusia/hospes dengan nyamuk, frekuensi menggigit, dan kerentanan nyamuk terhadap parasit. Kapasitas menjadi vektor adalah dipengaruhi faktor lingkungan, tingkah laku, biokimia dan seluler yang mempengaruhi hubungan antara vektor, patogen yang akan

ditransmisikan oleh vektor, dan hospes tempat patogen tersebut akan ditransmisikan.^{15,16}

Ketika dilakukan pengobatan massal di sentinel area infeksi mikrofilaria, hal ini juga dapat mempengaruhi terhadap hasil deteksi mf pada tubuh vektor dimana sesudah dilakukan pengobatan massal prevalensi infeksi mf pada vektor akan menurun, sehingga semakin banyak sampel peluang didapatkannya mf yang positif pada vektor juga semakin besar. Pengobatan massal satu siklus memang tidak dapat memutus rantai penularan infeksi langsung dari vektor ke hospes sehingga dibutuhkan pengobatan massal yang kontinu untuk mengeliminasi secara komplit penularan mikrofilaria.⁹

5. Kesimpulan

Dari hasil penangkapan nyamuk yang dilakukan, ditemukan tujuh spesies *Mansonia* yang merupakan vektor filariasis di daerah Banyuasin. Hasil penelitian dengan menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* pada *Mansonia* ini tidak menemukan adanya larva/mikrofilaria *Brugia malayi* pada *Mansonia*.

Daftar Pustaka

- Mladonicky, J. M., J. D. King., J. L. Liang., E. Chambers., M. Pa'au., M. A. Schmaedick., *et al.* 2009. Assessing Transmission of Lymphatic Filariasis Using Parasitologic, Serologic, and Entomologic Tools after Mass Drug Administration in American Samoa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 80(5): 769–773.
- Depkes RI. 2005. *Cara-cara Melakukan Survei Entomologi*. Ditjen PPM & PL. Jakarta.
- Schimdt, G.D And L.S. Roberts. 2000. *Foundation of Parasitology*. 6th ed. The McGraw Hill Companies, Inc.pp.
- Agustina, S. 2011. Faktor-Faktor Lingkungan Penyebab Perkembangan Filariasis serta Strategi Pengendalian Yang Efektif dan Berwawasan Lingkungan. Tesis Program Magister Kesehatan Lingkungan. Program Pascasarjana Universitas Sriwijaya (tidak dipublikasikan).
- Depkes RI. 2007. *Ekologi dan Aspek Perilaku Vektor*. Dit.Jen. PP & PL. Jakarta.
- Ambarita. LP, Sitorus H. 2006. Studi Komunitas Nyamuk di desa Sebusus Sumatera Selatan. *Jurnal Ekologi Kesehatan*. Volume 5 No1 : 368-375.
- Santoso, L.P., R. Ambarita., Oktarina., M. Sudomo. 2006. Epidemiologi Filariasis di Desa Sungai Rengit Kecamatan Talang Kelapa Kabupaten Banyuasin. *LokaLitbang P2B2 Baturaja*.
- Ramzy, R.M. 2002. Field Application of PCR Based Assays for Monitoring *Wuchereria Bancrofti* Infection in Africa. *Annals Trop. Med. Par.* 96: 55-59.
- Goodman, D.S., J.N. Orelus., J.M. Roberts., P.J. Lammie., T.G. Streit., 2003. PCR and Mosquito Dissection as Tools to Monitor Filarial Infection Levels following Mass treatment. *Filaria journal* 2:11 : 1-9.
- Pedersen, E. M., W. A. Stolk., S. J. Laney., E. Michael. 2009. Review. *Trends in Parasitology*. Volume 25 No. 7 : 319-327.
- Mc Mahon J.E., P.E. Simonsen. Filariasis dalam G.Cook (Eds). *Manson's Tropical Diseases 20th*. W.B Saunders Launders.
- Zhong, M., J.M.C. Carthy., L. Bierwert., M. Lizottewaniewski., S. Chanteu., T.B. Nutman., *et al.* 1996. A Polymerase Chain Reaction Assay for Detection of The Parasite *Wuchereria Bancrofti* In Human Blood Samples. *Am. J. Trop Med. Hyg.* 54: 357-363.
- Fischer, P., T. Supali., H. Wibowo., I. Bonow And S.A. William. 2000. Detection Of DNA Of Nocturnally Periodic *Brugia Malayi* In Night And Day Blood Samples By A Polymerase Chain Reaction-Elisa Based Method Using An Internal Control DNA. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 62: 291-296.

14. Fischer, P., H. Wibowo., S. Pischke., P. Ruckert., E. Liebau., I.S. Ismid., T. Supali. 2002. PCR Based Detection And Identification Of The Filarial Parasite *Brugia Timori* From Alor Island, Indonesia. *Annals Trop. Med. Par.*96: 809-821.
15. Rao R.U., G.J. Weil., K. Fischer., T. Supali., P. Fischer. 2006. Detection of *Brugia* Parasite DNA in Human Blood by Real Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology.* 44(11): 00969-06.
16. Haryunintyas, D dan D.T. Subekti. 2008. Deteksi Mikrofilaria/larva Cacing *Brugia malayi* pada nyamuk dengan *Polymerase Chain Reaction*. *Balai Besar Penelitian Veteriner. JITV* Vol. 13 No .3: 240-248.
17. Sembel D.T. 2009. Entomologi Kedokteran. ANDI. Yogyakarta. Hal : 14-32.
18. Manquin, S. and C. Boëte, 2011. Global Impact of Mosquito Biodiversity, Human Vector-borne Diseases and Enviromental Change. *The Importance of Biological Interactions in the Study of Biodiversity.* Dr.Jordi LÃ³pez-Pujol (Ed.), ISBN: 978-953-307-751-2.
19. Vasuki, V., K.P. Patra., S.L. Hoti. 2001 A rapid and simplified method of DNA extraction for the detection of *Brugia malayi* infection in mosquitoes by PCR assay. *Acta Tropica* 79 (2001) 245–248.
20. Wharton, R.H. 1978. *The Biology of Mansonia Mosquitoes in Relation to the Transmission of Filariasis in Malaya.* Institute for Medical Research. Bulletin No 1.