



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGEMBANGAN PELACAK DNA NON-RADIOAKTIF *Brugia malayi*  
PADA TES DOT BLOT DALAM RANGKA PEMANTAUAN  
PROGRAM PENGENDALIAN FILARIASIS  
DI INDONESIA**

DISERTASI

Oleh :

**TANIAWATI SUPALI**

**PROGRAM PASCASARJANA  
JAKARTA  
1992**



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGEMBANGAN PELACAK DNA NON-RADIOAKTIF *Brugia malayi*  
PADA TES DOT BLOT DALAM RANGKA PEMANTAUAN  
PROGRAM PENGENDALIAN FILARIASIS  
DI INDONESIA**

DISERTASI

UNTUK MEMPEROLEH GELAR DOKTOR DALAM BIDANG ILMU BIOMEDIK  
PROGRAM PASCASARJANA PADA UNIVERSITAS INDONESIA DI JAKARTA,  
DI BAWAH PIMPINAN REKTOR UNIVERSITAS INDONESIA  
PROF. DR. SUJUDI  
YANG DIPERTAHANKAN DI HADAPAN SENAT GURUBESAR  
PADA HARI RABU, 25 NOVEMBER 1992

DI JAKARTA

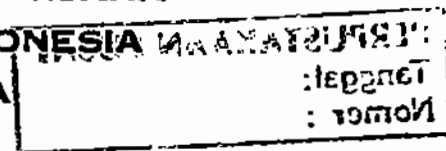
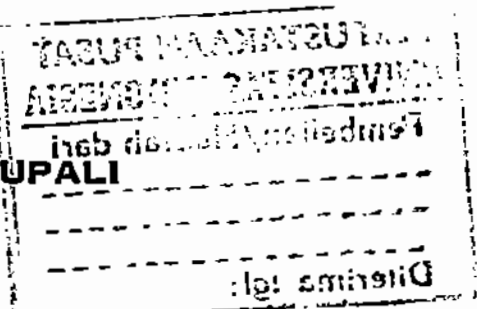
**TANIAWATI SUPALI**

**PROGRAM PASCASARJANA**

**UNIVERSITAS INDONESIA**

**JAKARTA**

**1992**




S.



PENGEMBANGAN PELACAK DNA NON-RADIOAKTIF *Brugia malayi*  
PADA TES DOT BLOT DALAM RANGKA PEMANTAUAN  
PROGRAM PENGENDALIAN FILARIASIS  
DI INDONESIA

Disertasi ini telah diperiksa dan disetujui tim pembimbing.  
Jakarta, November 1992



---

PROF. DR. BINTARI RUKMONO, MPHTM

Promotor



---

PROF. DR. STEVEN A. WILLIAMS

Ko-promotor I



---

DR. FELIX PARTONO

Ko-promotor II

**Tim Pembimbing:**

**Promotor : Prof. DR. Bintari Rukmono**

**Ko-promotor I : Prof. DR. Steven A. Williams**

**Ko-promotor II : DR. Felix Partono**

**Panitia Penguji:**

**Ketua Penanggung Jawab : Prof. DR. Sujudi**

**Ketua Pelaksana : Prof. DR. Iskandar Wahidiyat**

**Ketua Tim Penguji : Prof. DR. Nana Suhana**

**Anggota : Prof. DR. Noerhayati Soeripto**

**Prof. DR. Indrawati Ganjar**

**Prof. DR. Pinardi Hadidjaja**

**DR. Arjatmo Tjokronegoro**

**DR. Amin Soebandrio**



Dipersembahkan bagi ayah dan ibu

## UCAPAN TERIMA KASIH

Puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Yang Maha Esa atas segala rahmat yang dilimpahkan hingga tersusunnya disertasi ini.

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Prof. DR. Bintari Rukmono atas kesediaan beliau menjadi promotor. Penulis sangat beruntung dan berterima kasih atas segala dorongan, petunjuk yang tak henti-hentinya, dan bimbingan yang bijaksana disertai pengertian yang mendalam, telah banyak menolong penulis dalam menyelesaikan disertasi ini.

Kepada Prof. DR. Steven A. Williams, ko-promotor, penulis sangat beruntung dan berterima kasih atas kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk melakukan penelitian di Smith College, USA serta nasehat, petunjuk dan bimbingan hingga terselesainya disertasi ini.

Kepada DR. Felix Partono, Ko-promotor yang penulis hormai. Penulis sangat berterima kasih atas nasehat, bantuan dan petunjuknya mulai dari penulisan proposal ke *World Health Organization* untuk mendapatkan dana yang selanjutnya digunakan untuk membiayai penelitian sampai diselesaikannya disertasi ini.

Kepada Prof. DR. Pinardi Hadidjaja, Kepala Bagian Parasitologi, Fakultas kedokteran Universitas Indonesia, ingin penulis sampaikan rasa hormat dan terima kasih atas segala bantuan, anjuran dan bimbingan yang telah Profesor berikan kepada penulis.

Kepada Prof. DR. Iskandar Wahidiyat, Direktur Program Pasca Sarjana Universitas Indonesia, yang penulis hormati. Penulis ingin menyampaikan rasa

terima kasih yang sebesar-besarnya atas kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk menjadi peserta Program Pasca Sarjana di Universitas Indonesia.

Kepada DR. Farid Moeloek, Pembantu Dekan I Program Pasca Sarjana Universitas Indonesia. Penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih atas nasehat, dorongan dan bantuan yang telah diberikan selama mengikuti pendidikan Program Pasca Sarjana di Universitas Indonesia.

Terima kasih juga penulis sampaikan kepada Prof. DR. Dr. Sujudi, Rektor Universitas Indonesia, yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk mempertahankan disertasi ini di universitas yang beliau pimpin.

Penulis pun ingin menyampaikan rasa terima kasih kepada Prof. Dr. Mardiono Marsetio, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk menyelesaikan disertasi ini di fakultas yang beliau pimpin.

Prof. DR. Asri Rasad, mantan Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Terima kasih yang sebesar-besarnya atas kesempatan yang diberikan pada penulis untuk mengambil program S3 di Fakultas Kedokteran.

Kepada Prof. DR. Nana Suhana, Guru Besar Bagian Biologi FK-UI. Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya atas perhatian, bantuan dan nasehat yang telah diberikan untuk penulisan disertasi ini.

Pada tim penguji yang diketuai oleh Prof. DR. Nana Suhana, dengan anggotanya, Prof. DR. Pinardi Hadidjaja, Kepala Bagian Parasitologi FK-UI, Prof. DR. Indrawati Ganjar, Guru Besar Jurusan Biologi FMIPA-UI, Prof. DR.

Noerhayati Soeripto, Guru Besar Bagian Parasitologi FK-UGM, DR. Arjatmo Tjokronegoro, Kepala Bagian Biologi FK-UI, DR. Amin Soebandrio, Lektor Bagian Mikrobiologi FK-UI, telah meluangkan waktu untuk membaca dan membahas disertasi ini secara menyeluruh, serta memberikan saran-saran dan petunjuk-petunjuk yang sangat berharga. Untuk semua itu penulis ucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya.

Terima kasih yang sebesar-besarnya penulis sampaikan kepada Drs. Herry Illahude yang telah banyak membantu dalam pembuatan foto untuk disertasi ini.

Terima kasih yang tak terhingga penulis ucapkan kepada ayahanda Hudianto Supali dan Ibunda Jeni Supali serta adik-adik penulis yang telah memberikan perhatian dan dorongan hingga terwujudnya disertasi ini.

Terima kasih pula penulis ucapkan kepada Ir. W. Sugianto yang telah memberikan banyak bantuan dan nasehat dalam pengetikan disertasi ini.

Pada kesempatan ini pula penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada Dra. Erliyani Sartono, Dr. Agnes Kurniawan, Drs. Heri Wibowo dan Dra. Rita Ekarina, Dra. Nunuk Purwaningsih, Sdr. Sudirman yang telah memberikan dorongan serta uluran tangan setiap kali penulis memerlukan bantuan dan saran-saran. Begitu pula penulis sampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada seluruh Staf Pengajar dan Karyawan Bagian Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia atas segala bantuan yang diberikan pada saat penulis menyelesaikan disertasi ini.



PENGEMBANGAN PELACAK DNA NON-RADIOAKTIF *Brugia malayi*  
PADA TES DOT BLOT DALAM RANGKA PEMANTAUAN PROGRAM  
PENGENDALIAN FILARIASIS DI INDONESIA

Promovendus : Taniawati Supali  
Promotor : Prof. DR. Bintari Rukmono, MPHTM  
Kopromotor : Prof. DR. Steven Williams  
DR. Felix Partono

**ABSTRAK**

Filariasis adalah penyakit infeksi yang disebabkan oleh cacing filaria pada pembuluh dan kelenjar limfe, dan ditularkan melalui gigitan nyamuk. Gejala klinik akut berupa demam berulang, peradangan saluran atau kelenjar limfe, oedema dan gejala kronis berupa elefantiasis. Penyakit ini menyerang kelompok masyarakat yang aktif bekerja di daerah pedesaan sehingga dapat menurunkan produktivitas ekonomi suatu komunitas.

Di Indonesia lebih dari 20 juta penduduk tinggal di daerah endemis filariasis dan kira-kira 3-4 juta dari jumlah tersebut terinfeksi filariasis (Partono & Bintari, 1989). Dari ke-3 spesies cacing filaria yang menginfeksi manusia, *Brugia malayi* mempunyai penyebaran yang paling luas di Indonesia.

Program pengendalian filariasis telah dilakukan pemerintah sejak tahun 1970, melalui pemberian DEC secara massal pada penduduk yang tinggal di daerah endemis. Ada beberapa kendala dalam memantau keberhasilan program tersebut, yaitu: (1) Keengganan penduduk diambil darah malam berulang-ulang (2) Mahalnya biaya operasional pengambilan darah malam, dan (3) Pemeriksaan entomologis konvensional melalui pembedahan nyamuk langsung di bawah mikroskop di lapangan tidak dapat membedakan spesies larva parasit, terutama di daerah *B. malayi* terdapat bersamaan dengan parasit filaria hewan *B. pahangi*.

Dengan menggunakan bioteknologi telah dikembangkan pelacak DNA yang ditandai molekul radioaktif untuk parasit *B. malayi* (Piessens dkk., 1987), tetapi pelacak DNA radioaktif tersebut mahal, waktu paruh pendek, perlu latihan khusus

untuk pemakaiannya, perlu pembuangan khusus dan berbahaya bagi pemakainya.

Akhir-akhir ini telah dikembangkan pelacak DNA yang ditandai molekul non-radioaktif, tetapi pelacak DNA non-radioaktif ini kurang sensitif dibandingkan dengan pelacak DNA radioaktif. Oleh karena itu tujuan penelitian ini adalah mengembangkan pelacak DNA *B. malayi* non-radioaktif yang spesifik dan sensitif pada tes dot blot dan dapat digunakan sebagai alat pemantau secara entomologis pada program pengendalian filariasis *B. malayi* di daerah-daerah endemis di Indonesia. Ada 7 persyaratan yang harus dipenuhi sebelum pelacak DNA digunakan sebagai alat pemantau, yaitu: (1) Harus dapat dihasilkan dalam jumlah yang tidak terbatas dengan waktu yang relatif singkat di Indonesia, (2) Harus stabil dalam kurun waktu lama, (3) Harus spesifik dan sensitif untuk parasit *B. malayi*, (4) Harus dapat bereaksi dengan *B. malayi* di Indonesia, (5) Harus sensitif untuk mendeteksi I larva infeksi *B. malayi* dalam nyamuk, (6) Tes dot blot harus dapat diulang, dan (7) Tes dot blot harus mudah dilakukan.

Sekuensing DNA berulang *B. malayi* dari beberapa daerah di Indonesia telah dilakukan sebelum menentukan sikuen pelacak DNA *B. malayi* baru. Tiga strain *B. malayi* dari Indonesia, yaitu *B. malayi* strain Kendari (zoofilik subperiodik), *B. malayi* strain Bengkulu (zoofilik subperiodik), dan *B. malayi* strain Buton (antrofilik) telah dianalisis hasil sikuen DNA berulangnya dengan komputer untuk mendapatkan suatu konsensus sikuen DNA berulang *B. malayi* Indonesia.

Suatu pelacak DNA *B. malayi* dengan panjang 25-mer (25 nukleotida) telah dibuat dengan membandingkan konsensus sikuen DNA berulang *B. malayi* Indonesia dan *B. pahangi*. Untuk menghasilkan pelacak DNA tersebut di Indonesia maka harus dilakukan kloning ke dalam DNA plasmid Bluescript. Pelacak DNA 25-mer terlalu kecil untuk menjadi pelacak DNA yang efektif dalam DNA plasmid. Linker tambahan 3-mer telah ditambahkan pada kedua ujung

pelacak DNA yang bertujuan untuk membantu penempelan pelacak DNA satu dengan lainnya menjadi rantai lebih panjang pada orientasi yang sama, sehingga panjang total pelacak DNA 31-mer.

Pelacak DNA 31-mer disintesis dengan mesin dan ditempelkan satu dengan lainnya menggunakan enzim. Rantai panjang pelacak DNA yang sudah terbentuk ditempelkan ke dalam DNA plasmid untuk membentuk DNA rekombinan. DNA rekombinan ditransformasikan ke dalam sel bakteri *Escherichia coli*.

Dari hasil skrining klon diperoleh 9 klon positif. Sedangkan hasil sikuensing klon menunjukkan adanya 1 klon dengan pelacak DNA paling panjang, yaitu 153 bp yang terdiri dari 6 copi pelacak DNA 31 nukleotida pada orientasi yang sama. Klon tersebut telah dipilih sebagai pelacak DNA *B. malayi* dan dinamai pelacak DNA *B. malayi* 153. Pada kultur 250 ml klon positif selama 24 jam kerja diperoleh 5 µg DNA rekombinan. Hasil ini menunjukkan pelacak DNA dapat dihasilkan dalam waktu relatif singkat jika dibandingkan dengan memesan pelacak DNA karena harus diperhitungkan waktu untuk memesan, membuat, dan mengirimkan pelacak DNA, sesuai dengan kriteria sebagai alat pemantau.

Klon positif tersebut dapat disimpan selama beberapa tahun dalam etanol sebagai DNA rekombinan atau dalam gliserol sebagai sel bakteri *E. coli* yang mengandung DNA rekombinan. Jika klon tersebut hilang karena sesuatu hal, maka pelacak DNA dengan sikuen yang sama dapat disintesis kembali. Hal ini menunjukkan bahwa pelacak DNA tersebut mempunyai kestabilan yang baik. Dengan demikian pelacak DNA ini memenuhi salah satu persyaratan yaitu persyaratan kestabilan sebagai alat pemantau.

DNA rekombinan pelacak DNA *B. malayi* 153 telah dilakukan PCR dan hasil PCR ditandai dengan molekul non-radioaktif *fluorescein*. Uji spesifisitas telah dilakukan dengan menggunakan sampel DNA *B. malayi* dan *B. pahangi*. Hasil

penelitian menunjukkan bahwa pelacak DNA *B. malayi* 153-*fluorescein* spesifik untuk parasit *B. malayi*. Uji sensitivitas telah dilakukan terhadap berbagai konsentrasi DNA *B. malayi* (6,4 ng -0,1 ng dengan 2 X pengenceran). Hasil hibridisasi menunjukkan bahwa pelacak DNA dapat mendeteksi DNA *B. malayi* sampai konsentrasi 0,1 ng (setara dengan setengah DNA mikrofilaria). Dengan demikian pelacak DNA memenuhi persyaratan ketiga.

Pelacak DNA *B. malayi* 153-*fluorescein* telah diuji terhadap parasit *B. malayi* dari berbagai daerah di Indonesia, yaitu *B. malayi* strain Kalimantan Timur (zoofilik aperiodik), *B. malayi* strain Lampung (zoofilik subperiodik), dan *B. malayi* strain Kendari (zoofilik subperiodik). Hasil hibridisasi menunjukkan bahwa pelacak DNA bereaksi dengan semua strain parasit *B. malayi* yang diuji. Dengan demikian pelacak DNA *B. malayi* 153-*fluorescein* memenuhi persyaratan pelacak DNA sebagai alat pemantau untuk program pengendalian filariasis *B. malayi* di Indonesia.

Pelacak DNA *B. malayi* 153-*fluorescein* telah digunakan untuk mendeteksi hasil PCR penggerusan 1 larva infeksi *B. malayi* atau 1 larva infeksi *B. pahangi* saja dan 1 larva infeksi *B. malayi* atau 1 larva infeksi *B. pahangi* dalam berbagai konsentrasi nyamuk negatif (1,3,5) pada tes dot blot. Hasil hibridisasi menunjukkan bahwa pelacak DNA *B. malayi* 153-*fluorescein* dapat mendeteksi 1 larva infeksi *B. malayi* dalam maksimum 5 nyamuk negatif pada tes dot blot. Pelacak DNA tidak bereaksi silang dengan hasil PCR nyamuk negatif, DNA nyamuk negatif, DNA *B. pahangi*, dan DNA manusia. Hasil pengulangan tes dot blot untuk mendeteksi 1 larva infeksi *B. malayi* dalam 5 nyamuk negatif sebanyak lima kali memberikan hasil yang konsisten. Hasil ini menunjukkan bahwa persyaratan kelima dan keenam dapat dipenuhi.

Tes dot blot cocok untuk pengujian sampel dalam jumlah besar karena *dot blot*

*apparatus* dapat menguji 96 sampel. Satu sampel dapat mengolah 5 nyamuk maka 96 sampel dapat mengolah 480 nyamuk. Pada tahap hibridisasi, membran dapat dihibridisasi saling membelakangi maka jumlah nyamuk yang dapat diolah adalah  $2 \times 96 \text{ sampel} \times 5 \text{ nyamuk} = 960 \text{ nyamuk}$  dengan waktu kerja selama 25 jam.

Keuntungan tes dot blot dengan pelacak DNA adalah sampel nyamuk yang dikumpulkan di lapangan tidak perlu langsung diproses di tempat, tetapi dapat disimpan dalam larutan pengawet 100mM EDTA untuk dikirim ke laboratorium rujukan.

Dari hasil tersebut di atas dapatlah disimpulkan bahwa:

1. Pelacak DNA *B. malayi* 153 dapat dihasilkan dalam jumlah yang tidak terbatas melalui kloning dengan waktu yang relatif singkat pada kultur.
2. Pelacak DNA tersebut cukup stabil dalam kurun waktu lama. Dalam hal ini pelacak DNA dapat disimpan untuk beberapa tahun. Selain itu jika klon positif hilang maka pelacak DNA dengan sikuen yang sama dapat disintesis kembali.
3. Pelacak DNA *B. malayi* 153-*fluorescein* adalah spesifik untuk parasit *B. malayi* dan dapat mendeteksi DNA *B. malayi* sampai konsentrasi 0,1 ng (setara dengan setengah DNA mikrofilaria).
4. Pelacak DNA *B. malayi* 153-*fluorescein* bereaksi dengan *B. malayi* di Indonesia, yaitu *B. malayi* strain Kalimantan Timur (zoofilik aperiodik), *B. malayi* strain Lampung (zoofilik subperiodik), dan *B. malayi* strain Kendari (zoofilik subperiodik).
5. Pelacak DNA *B. malayi* 153-*fluorescein* sensitif untuk mendeteksi hasil PCR dari penggerusan 1 larva infeksi *B. malayi* di dalam 5 nyamuk negatif pada tes dot blot.

6. Hasil pengulangan pelacak DNA *B. malayi* 153-*fluorescein* pada tes dot blot konsisten.
7. Pelacak DNA *B. malayi* 153-*fluorescein* pada tes dot blot mudah dilakukan karena nyamuk dapat dikumpulkan dalam larutan pengawet 100 mM EDTA dan dikirim ke laboratorium rujukan. Tes tersebut dapat mengolah 960 nyamuk dalam waktu 25 jam kerja.

Pada penelitian ini telah dihasilkan pelacak DNA *B. malayi* baru yang ditandai molekul non-radioaktif *fluorescein* yang spesifik dan sensitif pada tes dot blot dan dapat digunakan sebagai alat pemantau secara entomologis pada program pengendalian filariasis *B. malayi* di Indonesia karena sudah memenuhi ke tujuh persyaratan yang ditentukan.

#### Saran

1. Pengembangan tes lebih lanjut perlu dilakukan dengan cara meningkatkan jumlah nyamuk pada tiap sampel sehingga harga per sampel dapat diturunkan.
2. Uji lapangan pelacak DNA *B. malayi* 153-*fluorescein* perlu dilakukan di daerah-daerah endemis *B. malayi* untuk memantau keberhasilan program pengendalian filariasis.
3. Laboratorium rujukan untuk pemeriksaan tes dot blot dengan pelacak DNA *B. malayi* 153 perlu didirikan di dua tempat, yaitu di Indonesia bagian Barat dan di Indonesia bagian Timur.
4. Pembuatan pelacak DNA *B. malayi* 153 ditawarkan kepada badan industri untuk diproduksi dalam jumlah banyak (skala nasional).

DEVELOPING A NON-RADIOACTIVE *Brugia malayi* DNA PROBE IN  
A DOT BLOT ASSAY FOR MONITORING THE PROGRESS OF THE  
FILARIASIS CONTROL PROGRAM IN INDONESIA

Promovendus : Taniawati Supali  
Promotor : Prof. DR. Bintari Rukmono , MPHTM  
Copromotor : Prof. DR. Steven A. Williams  
DR. Felix Partono

ABSTRACT

Filariasis is a disease resulting from an infection with a nematode parasite in lymph vessels and lymph nodes, and is transmitted by mosquito bites. The acute clinical manifestations of lymphatic filariasis are characterized by fever, lymphadenitis, retrograde lymphangitis, oedema and the chronic clinical manifestation is characterized by elephantiasis. The disease is predominantly affecting the young and the active working people in rural and slum areas, therefore it will decrease the economic productivity of the community significantly.

More than 20 million people live in endemic areas and approximately 3-4 million are currently infected. From the three species of parasites infecting man, *Brugia malayi* is the major and is widely distributed throughout the Indonesian islands.

Filariasis control program has been launched by the government since 1970, however, it met the following constraints in monitoring the progress of control program, (1) Poor participation in night blood collection from the people, (2) High costs of surveillance, and (3) Inappropriate technology in conventional entomological assessment to distinguish the infective larvae in vector mosquitoes.

In the last few years, new techniques for entomological assessment were explored using biotechnology. A radioactive *B. malayi* DNA probe was

developed (Piessens et al., 1987). The radioactive labelled DNA probes are not suitable for field use because they are expensive, they have a short shelf-life, and special training for handling the probes is imperative. Besides, laboratories arrangements for safe disposal are necessary.

Recently, non-radioactive labelled DNA probes have been developed but these probes were less sensitive compared to the radioactive labelled probes. Therefore, the objective of this experiment is to develop a new non-radioactive *B. malayi* DNA probe, which has more advantages than the conventional radiolabelled DNA probe, is specific and sensitive in a dot blot assay as a tool in entomological assessment for monitoring the progress of the filariasis control program in *B. malayi* infected areas of Indonesia. There are 7 requirements to be fulfilled before the probe can be widely used, such as:

1. The probe should be produced in a sufficient quantity in a relatively short period in Indonesia.
2. The probe should be stable.
3. The probe should be specific and sensitive for *B. malayi* parasite.
4. The probe should be able to hybridize with the Indonesian *B. malayi* strains.
5. The probe should be sensitive enough to detect 1 L3 in mosquitoes.
6. The dot blot assay should be reproducible.
7. The dot blot assay should be simple.

A new 25-mer (25 nucleotides) *B. malayi* DNA probe was designed by comparing the consensus sequences of *B. malayi* to *B. pahangi*. In order to produce the probe in Indonesia, it needs to be cloned in the plasmid DNA (plasmid bluescript). However, it was found that the probe is too small to be an effective probe in a vector DNA. Therefore, 3 nucleotides of additional linker



was synthesized on both sides of the probe (which made the total size of the probe 31 nucleotides) in order to get a longer chain of ligated DNA probe with the same orientation.

The 31-mer fragments DNA were synthesized in the DNA synthesizer machine and ligated together by using ligase enzyme. The ligated 31-mer DNA was then cloned in the plasmid bluescript DNA to produce the recombinant DNA. The recombinant DNA was then transformed to *Escherichia coli* bacteria cells.

The result of the screening clones showed that 9 clones were positive. Sequencing data analysis showed that one clone had the largest insert of the ligated DNA probe, 153 bp, which consists of 6 copies of 31 nucleotides fragment DNA in the same ligated orientation. The clone was chosen as a *B. malayi* DNA probe and it was named *B. malayi* DNA probe 153. From 250 ml culture of the positive clone in liquid medium, 5 µg of recombinant DNA could be harvested. The time required for producing the recombinant DNA was only 24 hours working time. This result showed that the time needed to produce the probe was relatively short in comparison with the time needed for buying a probe, as the ordering, production, and sending of the probe would be time-consuming and expensive.

The positive clone could be maintained either in ethanol as a recombinant DNA or in glycerol as the *E. coli* bacteria contains the recombinant DNA at -20°C, which is stable for several years. If the positive clone is lost, the DNA probe with the same sequence can be synthesized again using DNA synthesizer.

The recombinant DNA of the *B. malayi* DNA probe 153 was amplified by PCR. The PCR product was labelled with non-radioactive molecule, *fluorescein*. The *B. malayi* DNA probe 153-*fluorescein* was tested to *B. malayi* DNA and *B. pahangi* DNA. The result showed that *B. malayi* DNA probe 153-*fluorescein*

was specific to *B. malayi* parasite. The probe was also tested to the different concentrations of *B. malayi* DNA (doubling dilution ranging from 6.4 ng to 0.1 ng). The hybridization result showed that the probe was sensitive enough to detect 0.1 ng DNA *B. malayi* (equivalent to half DNA of microfilaria).

The *B. malayi* DNA probe 153-*fluorescein* was tested against Indonesian *B. malayi* strains, i.e: East Kalimantan strain (aperiodic zoophilic), Lampung strain (subperiodic zoophilic), and Kendari strain (subperiodic zoophilic) in the dot blot assay. The result showed that the probe hybridized to Indonesian *B. malayi* strains tested.

The *B. malayi* DNA probe 153-*fluorescein* was tested to detect the PCR product of the squashed one *B. malayi* infective larva or one *B. pahangi* infective larva and the PCR product of the squashed one *B. malayi* infective larva or one *B. pahangi* infective larva in the presence of different numbers of uninfected mosquitoes in a dot blot assay (1,3,5 uninfected mosquitoes). The hybridization results showed that the *B. malayi* DNA probe 153-*fluorescein* was able to detect the PCR product of the squashed 1 L3 *B. malayi* in the presence of 5 uninfected mosquitoes. There was no cross-hybridization observed in the PCR products of uninfected mosquito, the PCR products of *B. pahangi* infective larva, mosquito DNA, and human DNA. The repeated assay, done five times gave consistent results of detecting the infective larva in the presence of 5 uninfected mosquitoes.

The dot blot apparatus could handle 96 samples. If one sample contained 5 mosquitoes, so 480 mosquitoes could process from 96 samples simultaneously. Since the membran could be hybridized back to back, twice as 480 mosquitoes: that is 960 mosquitoes could be processed in 25 hours in a dot blot assay.

The advantage of this assay is the preservation of the collected mosquitoes in

100mM EDTA and then sent from the field to the reference laboratory for performance of the assay.

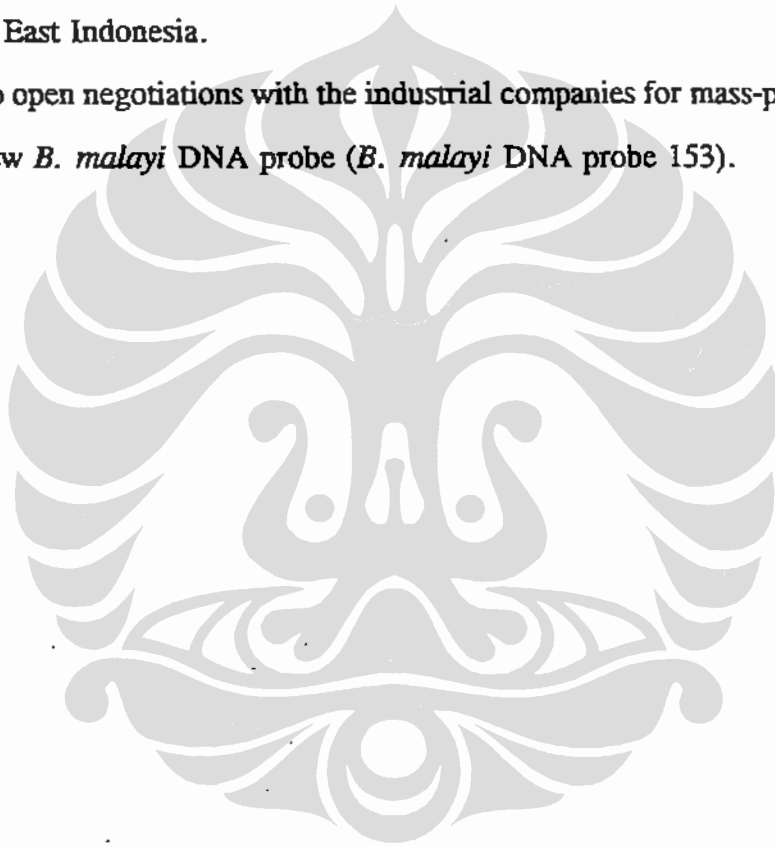
### Conclusions

The *fluorescein* labelled *B. malayi* DNA probe 153 was produced in this experiment. The probe could be used as a tool in the entomological assessment for monitoring the progress of the filariasis control program, because of:

1. The *B. malayi* DNA probe 153 can be produced in a sufficient quantity in a relatively short period in Indonesia through cloning technique.
2. The *B. malayi* DNA probe 153 is stable. The probe is stable either in ethanol or gliserol for several years. If the probe is lost for some reason, the probe with the same sequence can be synthesized again accurately.
3. The *fluorescein* labelled *B. malayi* DNA probe 153 is specific for *B. malayi* parasite and sensitive enough to detect 0.1 ng *B. malayi* DNA (equivalent to half DNA of microfilaria).
4. The probe hybridized to Indonesian *B. malayi* strains, i.e. East Kalimantan strain (aperiodic zoophilic), Lampung strain (subperiodic zoophilic) and Kendari strain (subperiodic zoophilic).
4. The *fluorescein* labelled *B. malayi* DNA probe 153 is sensitive enough to detect the PCR product of the squashed one *B. malayi* infective larva in the presence of 5 uninfected mosquitoes in the dot blot assay.
5. The repeated dot blot assay gives consistent results.
6. The dot blot assay using *fluorescein* labelled *B. malayi* DNA probe 153 can be performed accurately and ease, and the collected mosquitoes can be preserved in 100mM EDTA and can be directly sent from the field to the reference laboratory. An assay is able to process 960 mosquitoes.

### Suggestions

1. To conduct further studies by developing assay using more mosquitoes in each sample in order to decrease the price of the assay.
2. To conduct field trial of the fluorescein labelled *B. malayi* DNA probe 153 in *B. malayi* infected areas in order to evaluate the progress of the filaria's control program.
3. To set up reference laboratories for the assay, one in West Indonesia and one in East Indonesia.
4. To open negotiations with the industrial companies for mass-production of the new *B. malayi* DNA probe (*B. malayi* DNA probe 153).



## DAFTAR ISI

|  | Halaman |
|--|---------|
| Persetujuan tim pembimbing terhadap disertasi .....                                  | ii      |
| Tim pembimbing dan Panitia Penguji Disertasi .....                                   | iii     |
| Ucapan terima kasih .....  | v       |
| Abstrak .....  | viii    |
| Abstract .....   | xiv     |
| Daftar isi .....   | xx      |
| Daftar tabel di dalam teks .....   | xxiv    |
| Daftar gambar di dalam teks .....  | xxv     |
| <br>   |         |
| Bab I.      Pendahuluan .....  | 1       |
| A. Daur hidup .....  | 2       |
| B. Periodisitas .....  | 3       |
| C. Gejala klinis .....   | 8       |
| 1. Sindrom klinis disebabkan cacing dewasa atau<br>perkeimbangan cacing dewasa ..... | 8       |
| 2. Sindrom klinis disebabkan reaksi imun<br>terhadap mikrofilaria .....              | 10      |
| D. Diagnosis .....   | 10      |
| 1. Diagnosis klinis .....  | 10      |
| 2. Diagnosis parasitologis .....   | 10      |
| a. Menemukan mikrofilaria dalam sediaan darah tepi .....                             | 10      |
| 1. Pemeriksaan darah langsung .....  | 11      |
| 2. Pemeriksaan darah tebal .....   | 11      |
| 3. Kamar hitung .....  | 12      |

|          |   |    |
|----------|---|----|
|          | 4. Filtrasi .....   | 12 |
|          | 5. Teknik konsentrasi knott .....   | 12 |
|          | b. Menemukan cacing dewasa atau perkembangan<br>cacing dewasa pada biopsi kelenjar limfe .....                                      | 13 |
|          | 3. Diagnosis imunologis .....   | 13 |
|          | a. Deteksi antibodi .....   | 13 |
|          | b. Deteksi antigen .....  | 14 |
|          | E. Pengobatan .....   | 15 |
|          | F. Program pengendalian filariasis .....  | 17 |
|          | G. Program pengendalian filariasis di Indonesia .....   | 18 |
|          | H. Tujuan penelitian .....  | 22 |
|          | 1. Tujuan umum .....  | 22 |
|          | 2. Tujuan khusus .....  | 22 |
|          | I. Hipotesis .....  | 23 |
| Bab II.  | Tinjauan pustaka .....  | 24 |
|          | A. Pelacak DNA .....  | 24 |
|          | B. Polymerase chain reaction .....  | 38 |
| Bab III. | Bahan dan cara kerja .....  | 41 |
|          | A. Skrining pelacak DNA <i>B. malayi</i> (45-mer) - biotin pada<br>parasit <i>B. malayi</i> dari berbagai daerah di Indonesia ..... | 42 |
|          | B. Menentukan konsensus sikuen DNA berulang <i>B. malayi</i><br>di Indonesia .....  | 47 |
|          | C. Membuat sikuen pelacak DNA <i>B. malayi</i> dari konsensus sikuen<br>DNA berulang <i>B. malayi</i> di Indonesia .....            | 50 |
|          | D. Menghasilkan pelacak DNA spesifik untuk<br><i>B. malayi</i> dalam jumlah yang cukup .....  | 51 |
|          | E. Menentukan cara terbaik untuk menandai pelacak DNA<br>dengan molekul non-radioaktif .....  | 54 |

|         |  |     |
|---------|--|-----|
|         | F. Menentukan spesifisitas dan sensitivitas pelacak DNA fluorescein pada tes dot blot                                      | 58  |
|         | G. Penggunaan pelacak DNA fluorescein untuk mendeteksi 1 larva infeksi dalam nyamuk setelah PCR di laboratorium            | 60  |
| Bab IV. | Hasil  | 64  |
|         | A. Skrining pelacak DNA <i>B. malayi</i> (45-mer) - biotin pada parasit <i>B. malayi</i> dari berbagai daerah di Indonesia | 64  |
|         | B. Menentukan konsensus sikuen DNA berulang <i>B. malayi</i> di Indonesia  | 65  |
|         | C. Membuat sikuen pelacak DNA <i>B. malayi</i> dari konsensus sikuen DNA berulang <i>B. malayi</i> di Indonesia            | 66  |
|         | D. Menghasilkan pelacak DNA spesifik untuk <i>B. malayi</i> dalam jumlah yang cukup  | 73  |
|         | E. Menentukan cara terbaik untuk menandai pelacak DNA dengan molekul non-radioaktif  | 77  |
|         | F. Menentukan spesifisitas dan sensitivitas pelacak DNA fluorescein pada tes dot blot                                      | 80  |
|         | G. Penggunaan pelacak DNA fluorescein untuk mendeteksi 1 larva infeksi dalam nyamuk setelah PCR di laboratorium            | 81  |
| Bab V.  | Diskusi  | 87  |
| Bab VI. | Ringkasan, kesimpulan dan saran  | 108 |
|         | Summary, conclusions and suggestions   | 128 |
|         | Daftar rujukan   | 143 |

|  |     |
|--|-----|
| Lampiran 1 - Penyebaran filariasis di Indonesia . . . . .  | 150 |
| Lampiran 2 - Pembuatan fenol-kloroform untuk ekstrasi DNA . . . . .  | 151 |
| Lampiran 3 - Mempersiapkan sel kompeten <i>Escherichia coli</i> CaCl <sub>2</sub> untuk Transformasi . . . . . | 152 |
| Lampiran 4 - Transformasi bakteriofag M13 . . . . .  | 154 |
| Lampiran 5 - Transformasi plasmid . . . . .  | 156 |
| Lampiran 6 - Plaque lift . . . . .   | 159 |
| Lampiran 7 - Isolasi rantai tunggal DNA bakteriofag M13mp18 untuk sikuensing . . . . .                         | 162 |
| Lampiran 8 - Reaksi sikuensing DNA . . . . .   | 164 |
| Lampiran 9 - Southern blot . . . . .   | 166 |
| Lampiran 10 - Tes dot blot . . . . .   | 168 |
| Lampiran 11 - 192 Enzim Pemotong DNA . . . . .   | 169 |
| Lampiran 12 - Komposisi dan cara pembuatan larutan . . . . .   | 174 |
| Daftar istilah . . . . .   | 176 |
| Riwayat hidup . . . . .  | 179 |



## DAFTAR TABEL

| Tabel  | Halaman |
|--|---------|
| I. Perkiraan jumlah penduduk dunia yang terinfeksi filariasis . . . . .  | 6       |
| II. Keuntungan dan kelemahan antibodi monoklonal dan pelacak DNA . . . . .   | 20      |
| III. Hasil analisis 192 enzim pemotong DNA pada sikuen DNA Berulang <i>Brugia malayi</i> . . . . .                                       | 72      |
| IV. Hasil PCR 1 L3 tanpa atau dengan nyamuk negatif pada elektroforesis . . . . .  | 83      |
| V. Hasil hibridisasi pelecak DNA <i>Brugia malayi</i> 153-flourescein terhadap PCR 1 L3 <i>Brugia malayi</i> pada tes dot blot . . . . . | 86      |
| VI. Perkiraan waktu dan biaya untuk menghasilkan pelacak DNA . . . . .   | 103     |
| VII. Perkiraan waktu, biaya dan jumlah sampel yang dapat diuji pada tes dot blot . . . . .   | 104     |
| VIII. Keuntungan tes dot blot dibandingkan dengan cara konvensional . . . . .  | 104     |

## DAFTAR GAMBAR

| Gambar   | Halaman |
|--|---------|
| 1. Daur hidup parasit filaria limfatik pada manusia . . . . .  | 6       |
| 2. Pola periodisitas parasit filaria <i>Brugia malayi</i> . . . . .  | 7       |
| 3. Ikatan fosfodieter 5'-3' antara gugus fosfat dan gula yang merupakan tulang punggung DNA . . . . .                              | 26      |
| 4. Hasil perbandingan sikuen DNA berulang <i>Brugia malayi</i> dan <i>Brugia pahangi</i> , dan prosentase perbedaan basa . . . . . | 31      |
| 5. Cara penandaan pelacak DNA dengan <i>nick translation</i> . . . . .   | 34      |
| 6. Cara penandaan pelacak DNA dengan <i>random priming</i> . . . . .   | 35      |
| 7. Siklus PCR . . . . .  | 40      |
| 8. Rangkaian penelitian yang dilakukan penulis untuk disertasi ini . . . . .   | 41      |
| 9. <i>Primer HhaI</i> . . . . .  | 46      |
| 10. <i>Glass Rod</i> untuk menggerus nyamuk . . . . .  | 61      |
| 11. Hasil hibridisasi pelacak DNA <i>Brugia malayi</i> (45-mer)- <i>bionin</i> . . . . .   | 65      |
| 12. Sikuen DNA berulang <i>Brugia malayi</i> strain Kendari, strain Bengkulu dan strain Buton . . . . .                            | 67      |
| 13. Hasil perbandingan konsensus sikuen DNA berulang <i>Brugia malayi</i> dan <i>Brugia pahangi</i> . . . . .                      | 71      |
| 14. Sikuen pelacak DNA <i>Brugia malayi</i> 25 nukleotida . . . . .  | 72      |
| 15. <i>Linker</i> tambahan 3 nukleotida pada kedua ujung pelacak DNA . . . . .   | 74      |
| 16. Hasil elektroforesis ligasi pelacak DNA <i>Brugia malayi</i> 31 nukleotida . . . . .   | 75      |

|     |  |     |
|-----|--|-----|
| 17. | Hasil hibridisasi pelacak DNA total genom <i>Brugia malayi</i><br><sup>32</sup> S terhadap klon DNA rekombinan pada tes dot blot . . . . .   | 76  |
| 18. | Sikuen DNA klon 9 . . . . .  | 76  |
| 19. | Hasil PCR pelacak DNA 153 pada elektroforesis . . . . .  | 78  |
| 20. | Analisis <i>southern blot</i> hasil PCR DNA<br>pelacak <i>Brugia malayi</i> 153 . . . . .  | 79  |
| 21. | Hasil spesifisitas dan sensitivitas pelacak DNA<br><i>Brugia malayi</i> 153- <i>fluorescein</i> pada tes dot blot . . . . .  | 80  |
| 22. | Hasil Hibridisasi DNA <i>Brugia malayi</i> berbagai daerah<br>di Indonesia dengan pelacak DNA <i>Brugia malayi</i><br>153- <i>fluorescein</i> pada tes dot blot . . . . .  | 81  |
| 23. | Hasil PCR DNA 1 larva infeksiif tanpa atau dengan<br>nyamuk negatif <i>Aedes togoi</i> . . . . .   | 82  |
| 24. | Hasil PCR DNA 1 larva infeksiif dengan jumlah<br>nyamuk negatif lebih dari 5 pada elektroforesis . . . . .   | 85  |
| 25. | Hibridisasi hasil PCR 1 larva <i>Brugia malayi</i> dan<br><i>Brugia pahangi</i> tanpa atau dengan nyamuk negatif<br>dengan pelacak DNA <i>Brugia malayi</i> 153- <i>fluorescein</i><br>pada tes dot blot . . . . . | 85  |
| 26. | Hibridisasi pelacak DNA <i>Brugia malayi</i> (45-mer)- <i>biotin</i><br>pada nyamuk . . . . .  | 88  |
| 27. | Struktur sekunder . . . . .  | 93  |
| 28. | Kutikula larva . . . . .   | 98  |
| 29. | Hasil PCR nyamuk <i>Culex sp</i> yang diinfeksi di laboratorium pada<br>elektroforesis . . . . .   | 101 |
| 30. | Hibridisasi hasil PCR berbagai stadium larva dalam nyamuk<br>dengan pelacak DNA <i>Brugia malayi</i> 153- <i>fluorescein</i> pada<br>tes dot blot . . . . .  | 102 |

## BAB I

### PENDAHULUAN

Filariasis limfatik adalah suatu penyakit infeksi yang disebabkan oleh cacing filaria, yang larva infektifnya berkembang menjadi cacing dewasa jantan dan betina di dalam pembuluh dan kelenjar limfe inang. Cacing betina akan menghasilkan mikrofilaria yang dapat ditemukan dalam aliran darah tepi inang. Mikrofilaria dibisap oleh nyamuk dan berkembang menjadi larva di dalam tubuh nyamuk. Penularan penyakit ini terjadi melalui gigitan nyamuk yang mengandung larva infektif.

Ada 3 spesies cacing filaria penyebab filariasis limfatik pada manusia, yaitu *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, dan *Brugia timori*.

Penyakit filariasis mempunyai daerah penyebaran geografis yang luas, baik di daerah tropis maupun subtropis (World Health Organization, 1984). Umumnya penyakit ini ditemukan di daerah pedesaan, dan menyerang kelompok masyarakat umur dewasa muda yang aktif bekerja sehingga dapat menurunkan produktivitas ekonomi suatu komunitas (Oemijati, 1986; Partono, 1988).

Menurut perkiraan Organisasi Kesehatan Dunia (WHO), 90,2 juta penduduk di dunia terinfeksi filariasis dan lebih dari 90% (81,6 juta) terinfeksi *W. bancrofti* dan kurang dari 10% (8,6 juta) terinfeksi *B. malayi* dan *B. timori*. Kira-kira dua pertiga jumlah tersebut tinggal di China, India, dan Indonesia (Tabel I) (World Health Organization, 1984). *W. bancrofti* mempunyai penyebaran yang luas di Asia, Afrika, China, Kepulauan Pasifik, Sebagian Amerika latin. *B. malayi*

mempunyai daerah penyebaran yang luas di Asia Tenggara dan *B. timori* yang mempunyai penyebaran hanya di Kepulauan Indonesia bagian timur (Timor, Flores, Roti, dan Alor) (Manson-Bahr & Bell, 1987, World Health Organization, 1987).

Penularan penyakit filariasis tergantung pada ada tidaknya vektor nyamuk dan manusia yang mempunyai mikrofilaria di dalam darah sebagai sumber infeksi. Tidak setiap orang yang mempunyai mikrofilaria di dalam darah, merupakan sumber infeksi yang baik, karena jumlah mikrofilaria yang banyak dalam darah dapat membunuh nyamuk sedangkan jumlah mikrofilaria yang sedikit tidak akan menginfeksi nyamuk. Infeksi yang berulang-ulang pada jangka waktu yang lama dapat menyebabkan mikrofilaremia atau gejala-gejala klinis pada penduduk asli. Pendatang baru ke daerah endemis biasanya lebih rentan terhadap infeksi filariasis sehingga timbulnya gejala-gejala klinis filariasis lebih cepat dan lebih menderita daripada penduduk asli. Sedangkan orang-orang yang melakukan kunjungan ke daerah endemis selama 1 sampai 2 minggu tidak akan terkena filariasis (Partono, 1988).

#### A. Daur hidup.

Cacing filaria mempunyai daur hidup yang kompleks, yaitu mempunyai stadium pematangan di dalam nyamuk dan stadium reproduksi di dalam inang (Gambar 1) (World Health Organization, 1987). Nyamuk menghisap darah yang mengandung mikrofilaria. Setelah 2-6 jam, mikrofilaria melepaskan sarungnya

di dalam lambung nyamuk dan melakukan penetrasi ke saluran pencernaan, lalu ke otot-otot torak dan berkembang di dalam torak menjadi larva infeksi. Bentuk ramping mikrofilaria akan berubah menjadi bentuk yang pendek dan gemuk, yaitu larva stadium satu (L1) di dalam otot-otot torak nyamuk. Setelah dua hari, larva stadium satu tumbuh menjadi lebih panjang dan lebar, yaitu larva stadium dua (L2). Larva ini akan menjadi aktif, yang dikenal sebagai larva infeksi atau larva stadium tiga (L3). Larva infeksi bergerak secara aktif dari rongga haemocoel nyamuk ke abdomen, dan akhirnya ke kepala dan probosis. Umumnya lama perkembangan larva 10-14 hari. Nyamuk melepaskan larva infeksi melalui kulit pada waktu menggigit inang. Di dalam tubuh inang, larva infeksi berkembang menjadi larva stadium empat dan akhirnya menjadi cacing dewasa (jantan atau betina). Setelah terjadi pembuahan, cacing betina menghasilkan mikrofilaria yang dapat ditemukan pada aliran darah tepi (Beaver dkk., 1984). Mikrofilaria dapat hidup di dalam darah selama kira-kira satu tahun sedangkan cacing dewasanya dapat hidup di dalam saluran dan kelenjar limfe lebih dari 10 tahun (World Health Organization, 1987).

#### **B. Periodisitas.**

Di dalam tubuh inang (manusia), munculnya mikrofilaria dalam aliran darah tepi menunjukkan suatu periodisitas tertentu. Mikrofilaria berada di dalam pembuluh darah paru-paru selama mereka tidak berada di dalam aliran darah tepi.

Faktor yang dapat mempengaruhi periodisitas mikrofilaria adalah perbedaan tekanan oksigen pada pembuluh darah vena-arteri, aktifitas hospes (Piessens & Partono, 1980), dan adaptasi cacing filaria terhadap kebiasaan menggigit nyamuk (Denham & McGreevy, 1977), tetapi secara pasti mekanisme periodisitas tersebut belum diketahui.

Periodisitas dibedakan menjadi 3 macam, yaitu periodisitas nokturna, subperiodik nokturna, dan aperiodik (Gambar 2). Pada periodisitas nokturna, mikrofilaria ada di dalam aliran darah tepi selama 24 jam dan mencapai puncaknya pada malam hari yaitu pada pukul 22.00-01.00. Tetapi jumlah mikrofilaria yang dapat ditemukan di dalam aliran darah tepi pada siang hari sangat sedikit sehingga sulit untuk digunakan sebagai bahan diagnosis. Pada periodisitas subperiodik nokturna, mikrofilaria ada di dalam aliran darah tepi selama 24 jam tetapi mencapai puncaknya pada pukul 18.00 - 22.00. Sedangkan pada periodisitas aperiodik, mikrofilaria dapat ditemukan pada aliran darah tepi setiap saat (24 jam) dan tidak pernah mencapai puncak (Sasa, 1976, Partono & Purnomo, 1987).

Cacing filaria *W. bancrofti* hanya hidup pada manusia dan mempunyai periodisitas periodik nokturna dengan vektor nyamuk *Culex quinquefasciatus* untuk daerah perkotaan dan nyamuk *Anopheles* atau nyamuk *Aedes* daerah pedesaan.

Pada cacing filaria *B. malayi* ada 3 macam periodisitas, yaitu periodik nokturna, subperiodik nokturna, dan aperiodik. Parasit *B. malayi* ada yang dapat hidup pada manusia saja (antropofilik) atau dapat hidup pada manusia dan hewan

(zoofilik). Parasit yang hanya hidup pada manusia saja ditularkan oleh nyamuk *Anopheles barbirostris*, sedangkan parasit yang hidup pada manusia dan hewan ditularkan oleh nyamuk *Mansonia spp.*

Cacing filaria *B. timori* hanya hidup pada manusia, mempunyai periodisitas periodik nokturna, dan ditularkan oleh nyamuk *Anopheles barbirostris*.

Berbagai macam cara perhitungan periodisitas telah diusulkan untuk menentukan periodisitas cacing filaria (Sasa & Tanaka, 1972, Aikat & Das, 1976, Partono & Purnomo, 1987).

Partono & Purnomo (1987) telah melakukan penelitian ulang untuk menentukan periodisitas *B. malayi* dari daerah-daerah endemik di Indonesia serta melakukan pengamatan terhadap sifat-sifat biologis. Mereka sudah mengusulkan suatu sistem penamaan baru yang membedakan *B. malayi* menjadi 2 biotipe, yaitu antropofilik dan zoofilik. Cacing filaria antropofilik mempunyai karakteristik sebagai berikut: mikrofilaria bersifat periodik nokturna, parasit sukar diinfeksi ke hewan, sarung mikrofilaria terlepas pada sediaan darah tebal, dan ditemukan di daerah persawahan. Sedangkan cacing filaria zoofilik mempunyai karakteristik sebagai berikut: mikrofilaria bersifat periodik nokturna, subperiodik nokturna, atau aperiodik, parasit juga menginfeksi hewan sehingga mudah diinfeksi ke hewan, sarung mikrofilaria tidak lepas pada sediaan darah tebal, dan ditemukan di daerah rawa.

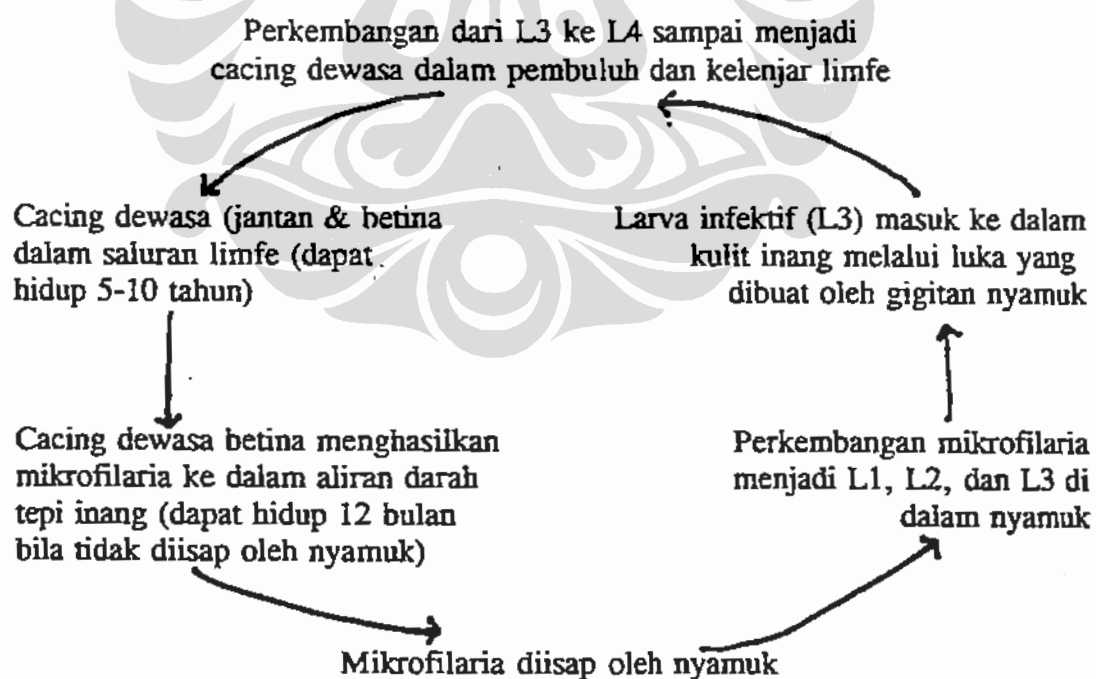


Tabel I.

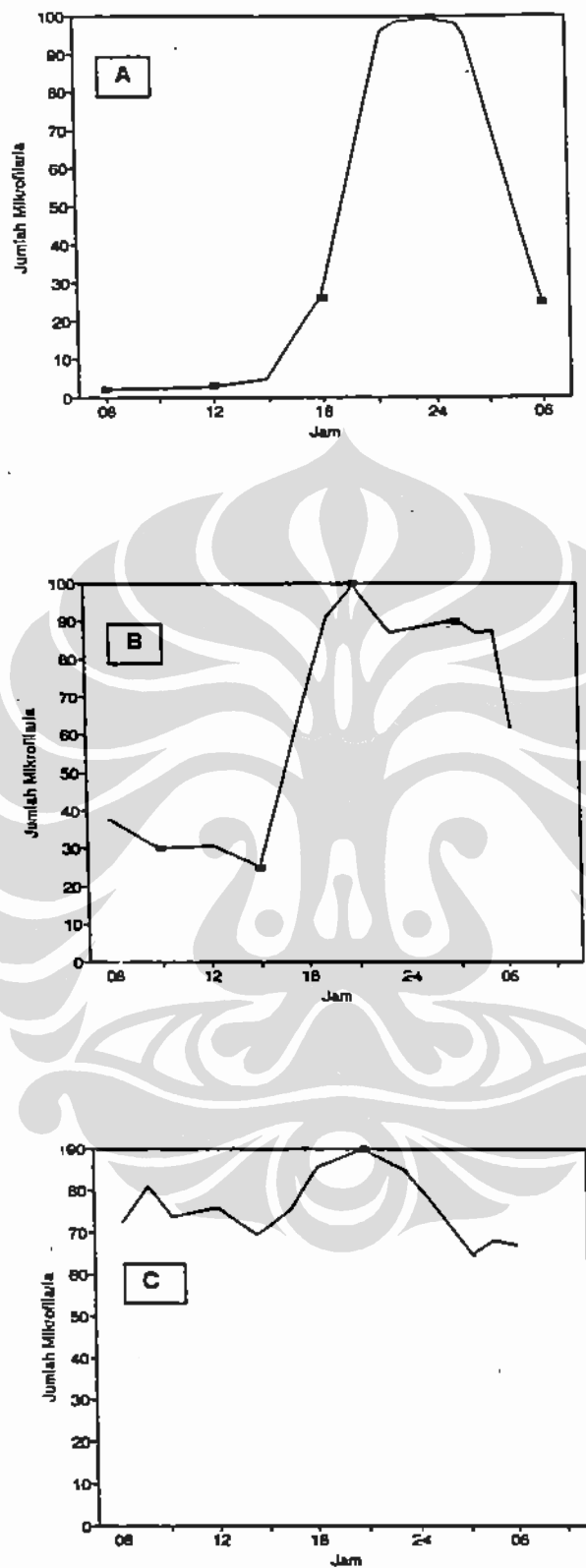
**PERKIRAAN JUMLAH PENDUDUK DUNIA YANG TERINFEKSI  
FILARIASIS**

|  |            |
|--|------------|
| Jumlah penduduk yang bermukim di daerah endemis . . . . .  | 2.677 juta |
| Jumlah penduduk di daerah yang diketahui terjadi transmisi<br>filariasis dan beresiko terinfeksi filaria . . . . . | 905 juta   |
| Jumlah penduduk yang terinfeksi :  |            |
| <i>Wuchereria bancrofti</i> . . . . .  | 81,6 juta  |
| <i>Brugia malayi</i> dan <i>Brugia timori</i> . . . . .  | 8,6 juta   |
| Jumlah penduduk yang terinfeksi . . . . .  | 90,2 juta  |

Sumber: World Health Organization, 1984



Gambar 1. Daur hidup parasit filaria limfatik pada manusia (World Health Organization, 1987).



Gambar 2. Pola periodisitas parasit filaria *Brugia malayi* (Partono & Purnomo, 1987). A. Periodik nokturna, B. subperiodik nokturna, C. Aperiodik.

### C. Gejala klinis.

Secara pato-fisiologi, gejala klinis filariasis dapat dibedakan menjadi 2 sindrom yang berbeda (Partono, 1984) yaitu:

1. Gejala klinis yang disebabkan oleh cacing dewasa atau perkembangan cacing dewasa, yang dikenal sebagai filariasis klasik.

Perjalanan penyakit filariasis dimulai dengan masa prepaten yang diikuti oleh stadium mikrofilaremia tanpa gejala klinis (mikrofilaremia asimtomatik), stadium akut dan stadium kronis. Pada penduduk asli, masa prepaten bervariasi antara 3-7 bulan dan masa inkubasi klinis antara 2- > 10 tahun. Hanya sebagian penduduk yang terinfeksi menjadi stadium akut dan sedikit yang menjadi stadium kronis, sedangkan yang lainnya tetap mikrofilaremia asimtomatik seumur hidup. Pada pendatang ke daerah endemis, perjalanan penyakit filariasis lebih cepat. Stadium akut terjadi dalam waktu 2-3 bulan dan stadium kronis dalam waktu 1-2 tahun, kemudian terjadi mikrofilaremia (Partono, 1988).

Manifestasi klinis pada stadium akut ditandai dengan demam dan gejala peradangan kelenjar limfe (limfadenitis) yang berlangsung 2-5 hari dan dapat sembuh dengan sendirinya tanpa pengobatan. Kadang-kadang peradangan ini menjalar ke pembuluh limfe dan menyebabkan limfangitis retrograd yang terlihat sebagai garis merah yang menjalar ke bawah. Pada stadium ini tungkai bawah biasanya ikut membengkak dan

menimbulkan gejala limfedema yang berlangsung beberapa minggu sampai 3 bulan lamanya. Limfedema biasanya hilang lagi setelah gejala peradangan menyembuh, tetapi serangan yang berulang kali menyebabkan elefantiasis.

Pada filariasis bancrofti, dijumpai adanya limfadenitis pada alat kelamin pria yang menimbulkan funikulitis, epididimitis dan orkitis. Kadang-kadang saluran sperma yang meradang menyerupai hernia inkarserata. Gejala klinis yang sering ditemukan pada stadium kronis adalah hidrokel dan kadang-kadang kiluria. Elefantiasis mengenai seluruh kaki, seluruh tangan, buah zakar, vulva dan payudara.

Pada filariasis brugia, alat kelamin dan payudara tidak pernah terkena. Elefantiasis mengenai tungkai bawah, di bawah lutut, atau kadang-kadang lengan bawah di bawah siku (Partono, 1984). Pada penderita filariasis, elefantiasis dapat menimbulkan trauma psikologis, karena mereka tidak dapat bekerja sehingga menjadi beban bagi keluarganya dan mereka juga sering dikucilkan dari komunitas (Partono, 1988).

Ada penduduk di daerah-daerah endemik meskipun sudah terpapar infeksi tetapi tidak pernah menunjukkan adanya gejala klinis atau ditemukannya mikrofilaria pada sediaan darah. Kelompok ini disebut sebagai endemik normal dan beberapa dari mereka diduga imun terhadap filariasis.

2. Gejala klinis yang disebabkan oleh reaksi imun yang berlebihan dari penderita terhadap mikrofilaria, disebut *occult filariasis* atau *tropical pulmonary eosinophilia* (TPE) (Lie, 1962).

TPE sudah ditemukan di India, Amerika Selatan, dan Asia Tenggara (Indonesia). Penyakit ini ditandai dengan reaksi imun yang berlebihan dari penderita terhadap mikrofilaria. Gejala klinis dari TPE adalah pembesaran kelenjar limfe dan gejala asma bronkial. Pada pemeriksaan laboratorium dapat ditemukan adanya peningkatan jumlah sel eosinofil (20% - 90%), meningkatnya antibodi (Ig E), dan secara histologis adanya benda Meyers-Kouwenaar yang berupa sisa-sisa mikrofilaria yang bersatu dengan eosinofil kadang-kadang ditemukan dalam kelenjar limfe, paru-paru, limpa, atau hati.

#### D. Diagnosis.

Diagnosis filariasis dapat dilakukan melalui pemeriksaan sebagai berikut:

1. **Diagnosis klinis.**

Diagnosis secara klinis dapat dilakukan dengan memeriksa gejala-gejala akut dan kronis penderita filariasis (World Health Organization, 1987).

2. **Diagnosis parasitologis.**

Diagnosis secara parasitologis dapat dilakukan melalui 2 cara, yaitu:

- a. **Menemukan mikrofilaria dalam sediaan darah tepi.**

Untuk pemeriksaan darah ini perlu diperhatikan waktu

pengambilan darah. Darah sebaiknya diambil pada waktu puncak periodisitas. Ada beberapa cara untuk mendeteksi mikrofilaria pada sediaan darah, yaitu:

a.1. Pemeriksaan darah langsung:

Setetes darah dari ujung jari ditempatkan pada gelas obyek dan ditutup dengan gelas penutup, lalu dilihat langsung di bawah mikroskop pada pembesaran 100X untuk menemukan mikrofilaria. Cara pemeriksaan ini sangat mudah dilakukan tapi kurang dapat dipercaya hasilnya karena memberikan kesalahan hitung jumlah mikrofilaria yang disebabkan oleh adanya pergerakan mikrofilaria ke tepi gelas penutup atau beberapa mikrofilaria tidak terlihat jelas karena menggumpal dengan darah (Denham dkk., 1971)

a.2. Pemeriksaan darah tebal:

20 - 60  $\mu$ l darah diambil dari ujung jari dengan pipet kapiler dan dibuat sediaan darah tebal pada gelas obyek, kemudian diwarnai dengan pewarnaan giemsa dan diperiksa di bawah mikroskop pada pembesaran 100X.

Umumnya kesalahan menghitung jumlah mikrofilaria disebabkan oleh hilangnya mikrofilaria pada proses hemolisis dan pewarnaan. Hal ini dapat diatasi dengan menggunakan gelas obyek yang bersih dan pipa kapiler yang tidak mengandung heparin, dan gelas obyek darah dikeringkan lebih dari 12 jam untuk mencegah hilangnya mikrofilaria pada proses hemolisis dan pewarnaan (Partono & Idris, 1977). Metoda ini merupakan

metoda terbaik untuk penelitian filariasis di lapangan (World Health Organization, 1987). Dengan cara ini dapat dilakukan identifikasi spesies dengan mengukur struktur fisik parasit.

a.3. Kamar hitung:

Darah ujung jari sebanyak 20 - 60  $\mu$ l dilisis dan segera dihitung dengan kamar hitung atau dilisis lalu disimpan dalam 3% asam asetat untuk dihitung kemudian. Kamar hitung hanya digunakan untuk menghitung jumlah parasit tetapi tidak dapat dipakai untuk identifikasi spesies karena tidak mungkin dilakukan pengukuran parasit (Denham & McGreevy, 1977).

a.4. Filtrasi:

Darah vena sebanyak 1 - 5 ml difilter pada filter nukleopore 5  $\mu$ m dan diwarnai dengan giemsa. Kemudian filter dikeringkan pada gelas obyek untuk diperiksa di bawah mikroskop cahaya. Metoda ini paling peka untuk mendeteksi mikrofilaria, tetapi mahal dan umumnya hanya digunakan untuk memeriksa kasus khusus seperti kasus perseorangan.

a.5. Teknik konsentrasi Knott:

Darah vena diencerkan dengan 2% formalin pada perbandingan 1:10, kemudian disentrifugasi. Sedimennya disebarkan pada gelas obyek dan diwarnai dengan 1% metilen biru kemudian diperiksa di bawah mikroskop. Metoda ini dapat digunakan untuk menggantikan pemeriksaan dengan filtrasi tetapi kepekaan metoda ini lebih rendah

dibandingkan filtrasi karena mikrofilaria dapat hilang pada sedimen yang terbentuk (Knott, 1939).

**b. Menemukan cacing dewasa atau perkembangan cacing dewasa pada biopsi kelenjar limfe.**

Pengetahuan mengenai mikroanatomi cacing dewasa pada sediaan penampang sangat penting untuk membedakan spesies parasit. Adanya mikrofilaria di sekitar cacing dewasa sangat membantu diagnosis. Tetapi cara identifikasi parasit dengan biopsi jarang digunakan pada diagnosis filariasis.

**3. Diagnosis imunologis.**

Pemeriksaan imunologis dapat dilakukan dengan mendeteksi antibodi atau antigen parasit pada serum penderita filariasis.

**a. Deteksi antibodi**

Antigen heterolog banyak digunakan pada deteksi antibodi, karena adanya kesukaran untuk membuat antigen homolog spesies filaria tertentu, misalnya antigen filaria *B. malayi* digunakan pada deteksi antibodi penderita filariasis *W. bancrofti* (Hussain dkk., 1981). Penggunaan antigen heterolog ini menyebabkan terjadinya reaksi silang sehingga mengurangi spesifisitas dari suatu test. Masalah tersebut dapat ditanggulangi melalui fraksinasi *crude antigen*, atau penggunaan antigen *excretory-secretory* atau *antigen permukaan* (Kaushal dkk., 1984, Maizels dkk., 1983). Tetapi



sampai saat ini belum ada komponen antigen yang spesifik untuk stadium atau spesies tertentu (Ottesen, 1984).

Deteksi klas atau subklas antibodi tertentu mungkin penting untuk meningkatkan spesifisitas teknik diagnosis imunologis. Penelitian terhadap Ig E dan subklas Ig G pada penderita filariasis *B. malayi* dengan berbagai gejala klinis telah dilakukan oleh Kurniawan dkk., 1991. Hasil penelitian menunjukkan bahwa titer IgG4 meningkat pada semua kelompok penderita dan titer IgG4 tertinggi ditemukan pada penderita mikrofilaremia. Sedangkan titer IgE meningkat pada kasus elefantiasis. Pada penderita elefantiasis, rasio titer IgE-IgG4 adalah 30x lebih tinggi dibandingkan dengan penderita mikrofilaremia. Titer IgG2 dan IgG3 pada penderita mikrofilaremia lebih rendah dibandingkan dengan penderita elefantiasis.

#### **b. Deteksi antigen**

Suatu antibodi monoklonal Ig M terhadap antigen *Dirofilaria immitis* telah digunakan untuk mendeteksi sirkulasi antigen 200 kilodalton pada penderita filariasis *W. bancrofti*. Antigen dapat terdeteksi pada 56 dari 57 serum penderita mikrofilaremia, 9 dari 64 penderita amikrofilaremia dengan klinis filaria, dan 11 dari 70 kontrol endemis, tetapi negatif pada serum non endemis, serum penderita filariasis *B. malayi* dan *Onchocerca volvulus* dan serum penderita infeksi cacing usus (Weil dkk., 1987).

Diagnosis imunologis sedang dikembangkan lebih lanjut karena sampai saat ini baru dapat mendeteksi kasus-kasus mikrofilariaemia.

#### E. Pengobatan.

Pengobatan pada penderita filariasis dimaksudkan untuk membunuh dan menghancurkan parasit yang bertujuan untuk mengurangi atau mencegah morbiditas. Untuk pengobatan filariasis, DEC (Diethylcarbamazine citrate) merupakan satu-satunya obat yang telah dipakai secara luas. Obat ini sudah dibuktikan dapat membunuh mikrofilaria dan cacing dewasa (Partono, 1988). Oleh karena itu DEC dinilai mempunyai khasiat yang efektif dan harganya relatif murah.

Dosis DEC yang dianjurkan untuk filariasis bancrofti adalah 6 mg/kg berat badan/hari selama 12 hari, sedangkan dosis DEC untuk filariasis brugia adalah 5 mg/kg berat badan selama 10 hari (Partono, 1984).

Pengobatan dengan dosis standar sering menimbulkan efek samping berupa demam, pusing, mual, muntah, nyeri otot tulang, gatal dan keluarnya cacing usus. Kadang-kadang dapat pula timbul gejala lokal, berupa limfadenitis dan limfangitis. Efek samping obat ini bersifat sementara dan hilang dengan sendirinya dalam waktu dua sampai lima hari. Untuk mengurangi efek samping obat, DEC dapat diberikan dengan dosis rendah dengan jangka waktu pemberian yang lebih lama. Pengobatan DEC dosis rendah yaitu: 1 tablet DEC (50 mg) sekali seminggu selama 18 bulan untuk penduduk yang berumur di atas 10 tahun atau setengah dosis (25 mg) untuk anak-anak di bawah 10 tahun telah dilakukan di daerah

endemis *B. timori*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa efek samping DEC dosis rendah dapat dikatakan tidak ada (Partono, 1980). Total dosis DEC yang diberikan untuk filariasis bancrofti adalah 6000 mg dan filariasis brugia adalah 4000 mg. Cara pengobatan ini terutama berguna untuk pengobatan penduduk secara massal (Partono, 1980).

Pada saat ini suatu obat baru, ivermectin, yang diproduksi oleh *Merck, Sharp and Dohme*, New Jersey, USA sedang dievaluasi untuk efektivitas dan keamanannya dalam membunuh parasit filaria. Efek samping ivermectin dilaporkan lebih sedikit dibandingkan dengan DEC pada penderita onkonserkiasis (Greene, 1989). Berbagai dosis tunggal ivermectin, 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  dan 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  telah diberikan pada penderita mikrofilaremia asimtomatik *W. bancrofti* di India dan *B. malayi* di Indonesia untuk menilai efektivitas dan keamanan obat tersebut. Pada hari ke-5 setelah pengobatan, jumlah mikrofilaria penderita filariasis *W. bancrofti* turun sampai nol tetapi 3 bulan kemudian jumlah mikrofilaria meningkat lagi sampai 10-20% dari jumlah mikrofilaria sebelum pengobatan. Efektivitas dan keamanan obat ini juga dibandingkan dengan DEC. Ternyata ivermectin lebih cepat menurunkan jumlah mikrofilaria dibandingkan DEC, tetapi DEC lebih efektif (Kumaraswami, 1989). Pada penderita mikrofilaremia asimtomatik *B. malayi*, 1 bulan setelah pengobatan jumlah mikrofilaria turun sampai kira-kira 8% dari jumlah mikrofilaria sebelum pengobatan. Tetapi 3 bulan kemudian, jumlah mikrofilaria meningkat sampai 25% dari jumlah mikrofilaria sebelum pengobatan. Hasil penelitian ini

menunjukkan bahwa ivermectin kurang efektif untuk penderita filariasis *B. malayi* dibandingkan hasil pengobatan filariasis *W. bancrofti* (Partono, 1989).

#### **F. Program pengendalian filariasis.**

Program pengendalian filariasis bertujuan untuk memutuskan rantai penularan, yaitu dengan cara melakukan intervensi terhadap faktor penularan. Intervensi pokok dalam program pemberantasan filariasis ditujukan pada parasit penyebab penyakit.

Pengukuran angka infeksi pada populasi manusia dan vektor merupakan hal yang sangat penting dalam program pengendalian filariasis untuk menentukan pengambilan keputusan meneruskan atau menghentikan program tersebut karena program pengendalian filariasis membutuhkan investasi dana, tenaga kerja, dan waktu yang cukup banyak (Southgate, 1984).

Menurut World Health Organization (1984) pemantauan keberhasilan program pengendalian filariasis dapat dilakukan melalui beberapa cara, yaitu:

1. Pemeriksaan gejala-gejala klinis
2. Pemeriksaan parasitologis, yang dilakukan dengan menemukan parasit mikrofilaria pada darah malam.
3. Pemeriksaan entomologis dengan menemukan larva parasit pada pembedahan nyamuk langsung di lapangan.

### G. Program pengendalian filariasis di Indonesia.

Di Indonesia, lebih dari 20 juta penduduk tinggal di daerah-daerah endemis filariasis dan kira-kira 3-4 juta jumlah tersebut terinfeksi filariasis (Partono & Bintari, 1989). Dari ke-3 spesies cacing filaria yang menginfeksi manusia, *B. malayi* mempunyai penyebaran yang paling luas di Indonesia (Lampiran 1) (Departemen kesehatan Republik Indonesia, 1990)

Sejak tahun 1970 pemerintah telah melakukan program pengendalian filariasis dengan sasaran daerah-daerah endemis yang merupakan daerah pembangunan, daerah transmigrasi, daerah pariwisata, dan daerah perbatasan dengan angka mikrofilaria (*microfilaria rate*) > 5%. Angka mikrofilaria diperoleh melalui pemeriksaan parasitologis dengan menemukan mikrofilaria pada darah malam penduduk daerah-daerah endemis.

Program pengendalian dilakukan dengan memberikan obat DEC dosis rendah secara massal pada penduduk yang tinggal di daerah endemis. Evaluasi keberhasilan program pengendalian filariasis dilakukan dengan menghitung angka mikrofilaria pada pemeriksaan parasitologis darah malam. Angka mikrofilaria yang harus dicapai setelah pengobatan adalah < 1% (Ditjen PPM & PLP, Departemen kesehatan Republik Indonesia, 1991).

Meskipun program pengendalian filariasis telah dilakukan di Indonesia, tetapi filariasis masih tetap merupakan masalah kesehatan masyarakat pedesaan di beberapa daerah di Indonesia. Hal ini disebabkan belum semua daerah endemis filariasis terjangkau oleh program tersebut, lebih lagi daerah terpencil.

Dalam memantau keberhasilan program pengendalian filariasis terdapat beberapa kendala, yaitu:

1. Keengganan penduduk untuk diambil darah malam berulang-ulang.
2. Mahalnya biaya untuk pemantauan dan pengambilan darah malam pada daerah-daerah yang terinfeksi.

Oleh sebab itu perlu dipertimbangkan pemantauan secara entomologis sebagai alternatif pemeriksaan darah malam. Pemeriksaan entomologis secara konvensional mempunyai beberapa kendala, yaitu:

1. Nyamuk yang dikumpulkan di lapangan harus segera diproses.
2. Pemeriksaan entomologis dilakukan melalui pembedahan nyamuk langsung di bawah mikroskop secara individu, yang memerlukan waktu lama.
3. Pemeriksaan entomologis tidak dapat membedakan spesies larva yang ditemukan di dalam nyamuk terutama di daerah *B. malayi* terdapat bersamaan dengan *B. pahangi* (parasit filaria pada hewan).

Untuk mengatasi kendala tersebut dipilih pemecahan secara bioteknologi. Dengan menggunakan bioteknologi telah dikembangkan antibodi monoklonal (Carlow dkk., 1987) dan pelacak DNA (McReynolds dkk., 1986, Sim dkk., 1986\*). Kedua tes tersebut dapat membedakan larva parasit *B. malayi* dari *B. pahangi* dan masing-masing tes mempunyai keuntungan dan kelemahan.

Tabel II

**KEUNTUNGAN DAN KELEMAHAN  
ANTIBODI MONOKLONAL DAN PELACAK DNA**

| Antibodi monoklonal  | Pelacak DNA   |
|--|---|
| - Spesifik untuk parasit <i>B. malayi</i>                                | - Spesifik untuk parasit <i>B. malayi</i> pada keadaan hibridisasi yang optimal |
| - Hanya bereaksi dengan larva infeksi (L3) dan stadium transisi L2 ke L3 | - Bereaksi dengan semua stadium larva (mikrofilaria, L1, L2, L3)                |
| - Kemungkinan untuk menemukan sel hibridoma spesifik lebih kecil         | - Kemungkinan untuk menemukan klon positif lebih besar                          |
| - Sel hibridoma lebih peka terhadap pengaruh faktor eksternal            | - Pelacak DNA lebih tahan terhadap pengaruh faktor eksternal                    |
| - Antibodi monoklonal tidak dapat disintesis secara kimiawi              | - Pelacak DNA yang sudah diketahui sikuennya dapat disintesis secara kimiawi    |
| - Digunakan sebagai alat diagnosis secara individu pada nyamuk           | - Digunakan sebagai alat pemantau pada pemeriksaan entomologis                  |

Ditinjau dari segi keuntungan dan kelemahan kedua alat pemantau tersebut maka penulis memakai pelacak DNA sebagai alat pemantau program pengendalian filariasis di Indonesia.

Pelacak DNA yang ada saat ini adalah pelacak DNA yang ditandai radioaktif (McReynolds dkk., 1986, Sim dkk., 1986\*) . Sim dkk., telah mengembangkan pelacak DNA-radioaktif ( $^{32}\text{P}$ ) untuk parasit *B. malayi*, yaitu pBm15. Pelacak ini telah dicoba untuk mendeteksi larva infeksi *B. malayi* (parasit filaria pada

manusia), *B. pahangi*, *Dirofilaria repens*, dan *Breintia booliati* (parasit filaria pada hewan) yang diisolasi dari nyamuk. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pelacak DNA berhibridisasi dengan larva infeksi *B. malayi* dan dapat mendeteksi 1 larva infeksi tanpa adanya jaringan tubuh nyamuk (Sim dkk., 1986<sup>b</sup>). Tetapi ada beberapa kendala penggunaan pelacak DNA molekul radioaktif, yaitu: harganya mahal, mempunyai waktu paruh yang pendek, memerlukan tempat pembuangan khusus, memerlukan latihan khusus untuk menggunakan molekul radioaktif, dan berbahaya bagi pemakainya.

Oleh karena itu, penelitian ini dimaksudkan untuk menghasilkan pelacak DNA *B. malayi* non-radioaktif yang akan digunakan untuk mendeteksi larva parasit dalam vektor nyamuk. Ada beberapa syarat yang harus dipenuhi sebelum pelacak DNA *B. malayi* pada tes dot blot digunakan sebagai alat pemantau program pengendalian filariasis di Indonesia:

1. Pelacak DNA *B. malayi* harus dapat dihasilkan di Indonesia dalam jumlah yang tidak terbatas dengan waktu yang relatif singkat.
2. Pelacak DNA harus stabil untuk kurun yang lama.
3. Pelacak DNA *B. malayi* harus spesifik dan sensitif untuk parasit *B. malayi*.
4. Pelacak DNA *B. malayi* dapat bereaksi dengan strain-strain *B. malayi* di Indonesia.
5. Pelacak DNA *B. malayi* harus sensitif untuk mendeteksi 1 larva infeksi *B. malayi* di dalam nyamuk.
6. Tes dot blot tersebut harus dapat diulang.
7. Tes dot blot dengan pelacak DNA harus mudah dilakukan.



Adapun permasalahan utama dalam penelitian ini adalah apakah pelacak DNA *B. malayi* non-radioaktif spesifik dan sensitif pada tes dot blot dan dapat dipakai sebagai alat pemantau secara entomologis pada program pengendalian filariasis *B. malayi* di Indonesia ?.

## H. Tujuan Penelitian

### 1. Tujuan umum:

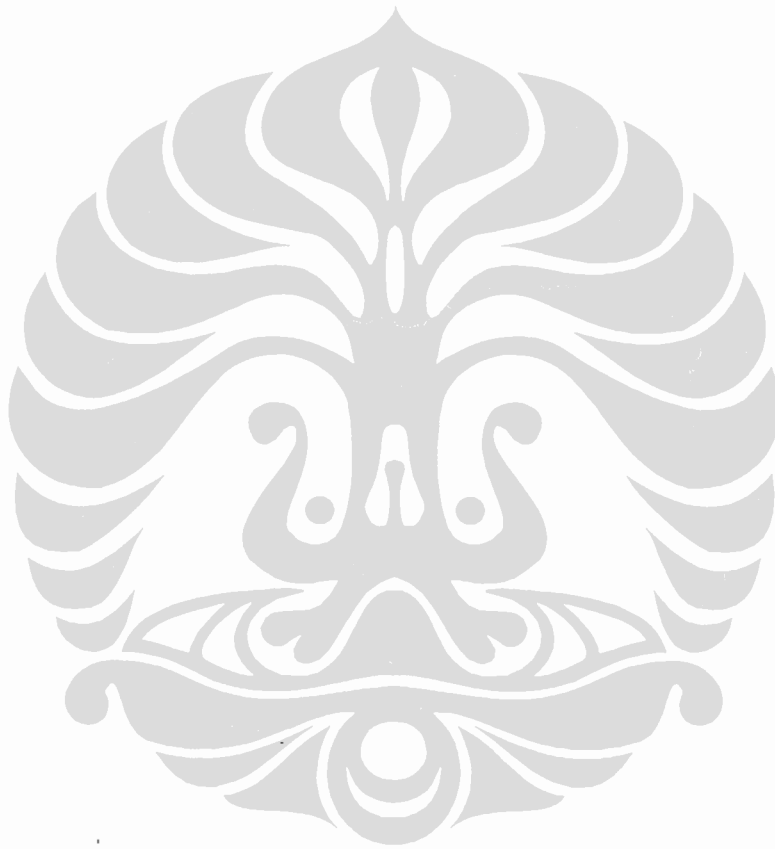
Mengembangkan pelacak DNA *Brugia malayi* non-radioaktif pada tes dot blot untuk mendeteksi parasit *B. malayi* dalam nyamuk pada pemantauan program pengendalian filariasis *B. malayi* di daerah-daerah endemis di Indonesia.

### 2. Tujuan khusus:

1. Menentukan konsensus sikuen DNA berulang *B. malayi* di Indonesia
2. Membuat sikuen pelacak DNA *B. malayi* dari konsensus sikuen DNA berulang *B. malayi* di Indonesia.
3. Menghasilkan pelacak DNA yang spesifik untuk *B. malayi* dalam jumlah yang cukup.
4. Menentukan cara terbaik untuk menandai pelacak DNA dengan molekul non-radioaktif.
5. Menentukan spesifisitas dan sensitivitas pelacak DNA pada tes dot blot.
6. Mendeteksi 1 larva infeksi *B. malayi* dalam nyamuk setelah PCR pada tes dot blot dengan menggunakan pelacak DNA molekul non-radioaktif.

## I. Hipotesis

Pelacak DNA *B. malayi* non-radioaktif adalah spesifik dan sensitif pada tes dot blot dan dapat dipakai sebagai alat pemantau secara entomologis pada program pengendalian filariasis *B. malayi* di Indonesia.



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. Pelacak DNA

Kemajuan bioteknologi melalui teknik DNA rekombinan telah memberikan informasi yang luas dan terinci mengenai parasit yang menginfeksi manusia. Teknik ini sudah dipergunakan untuk mempelajari epidemiologi dan penularan penyakit-penyakit infeksi yang disebabkan oleh parasit (Wirth dkk., 1986). Menurut Baker (1989), DNA pada organisme, seperti parasit, tidak mengalami perubahan pada seluruh daur hidup parasit baik di dalam inang vertebrata atau invertebrata.

DNA (asam dioksiribonukleat) adalah materi genetik di dalam kromosom yang berperan sebagai pembawa informasi genetik. DNA tersusun atas nukleotida yang dihubungkan satu dengan lainnya melalui ikatan fosfodiester. Nukleotida itu sendiri tersusun atas basa nitrogen purin (guanin **G** dan adenin **A**) atau pirimidin (sitosin **C** dan timin **T**), gula pentosa, dan gugus fosfat (Gambar 3) (Watson dkk., 1983).

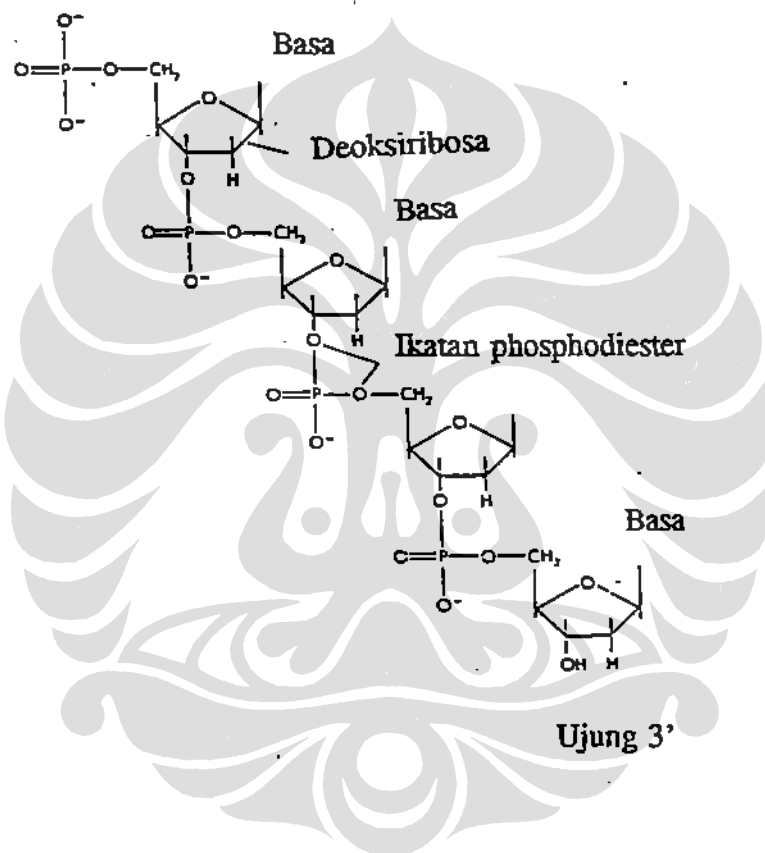
DNA rantai ganda (*double helix*) dibentuk oleh dua rantai polinukleotida yang berpasangan. Kedua rantai polinukleotida saling berpasangan pada arah yang berlawanan (*antiparallel*) melalui ikatan hidrogen, satu rantai berada pada arah 5'-3' dan pasangan berada pada 3'-5'. Adenin (A) hanya dapat berpasangan dengan timin (T) melalui dua ikatan hidrogen, dan guanin (G) berpasangan dengan sitosin (C) melalui tiga ikatan hidrogen.

Sebagai pembawa informasi genetik maka DNA akan diubah menjadi molekul RNA (asam ribonukleat) melalui proses transkripsi dengan bantuan enzim polimerase RNA. Molekul RNA yang terbentuk merupakan pasangan basa komplementer DNA dengan kekecualian yaitu basa timin pada DNA diganti basa urasil (U) pada RNA. Kemudian melalui proses translasi akan dihasilkan asam-asam amino penyusun protein. Protein ini berfungsi sebagai enzim yang berperanan dalam proses metabolisme suatu organisme.

Ada 3 macam molekul RNA yang berperan dalam sintesis protein, yaitu mRNA (*messenger RNA*), tRNA (*transfer RNA*) dan rRNA (*ribosomal RNA*). Penempelan molekul mRNA pada ribosom dan adanya bantuan dari tRNA, menyebabkan diterjemahkannya basa-basa pada mRNA menjadi asam-asam amino. Pembacaan basa-basa pada mRNA dimulai dari ujung 5'.

Basa-basa pada mRNA dibaca sebagai suatu triplet, yaitu dalam 3 susunan basa, yang disebut kodon. Dari 4 macam basa (adenin, guanin, sitosin, dan urasil) dihasilkan variasi kodon sebanyak  $4^3 = 64$ , yang terdiri dari 3 kodon yang mengkode tanda berhenti dan 61 kodon yang mengkode asam amino. Jumlah asam amino hanya 20 maka satu asam amino dikode oleh lebih dari satu kodon. Kodon-kodon tersebut berkomplementari dengan antikodon pada tRNA, dan setiap molekul tRNA akan membawa asam amino spesifik yang akan masuk pada rantai polipeptida jika ada kodon tertentu yang terbuka pada ribosom (Watson dkk., 1983).

Ujung 5'



Menurut Jelinek (1982) DNA dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

1. DNA unik (*Unique DNA*): berisi gen yang mengkode protein dan jumlahnya 1 copi per haploid genom.
2. DNA berulang dibedakan menjadi 2 berdasarkan jumlah copi DNA berulang tersebut di dalam genom.
  - a. DNA berulang yang terdapat dalam jumlah 1000-100.000 copi per haploid genom, disebut *moderately repetitive DNA*. Kadang-kadang DNA ini ditranskripsikan menjadi RNA .
  - b. DNA berulang yang terdapat dalam jumlah 1.000.000 copi per haploid genom, disebut *highly repetitive DNA*. Fungsi *highly repetitive DNA* ini tidak diketahui.

Jumlah copi tersebut di atas umumnya ditemukan pada mamalia (ukuran haploid genom berkisar 3.000.000.000 bp). Pada organisma (seperti parasit) dengan genom berukuran lebih kecil, jumlah copi bermacam-macam kelas akan lebih sedikit.

DNA berulang (*Highly repetitive DNA*) adalah spesifik untuk spesies tertentu (Dover, 1982) dan terdapat dalam jumlah banyak di dalam genom, karena itu cocok untuk dipakai membuat suatu pelacak DNA yang spesifik dan sensitif dalam mendeteksi DNA parasit baik pada inang vertebrata maupun vektor invertebrata.

Pelacak DNA berulang ini telah banyak dibuat untuk keperluan diagnosis, di antaranya adalah untuk leishmaniasis, malaria (Wirth dkk., 1986), tripanosomiasis (Hide dkk., 1990), sistosomiasis (Rollinson dkk., 1986) dan onkoserkiasis (Unnasch, 1987) dan filariasis (McReynolds dkk., 1990).

Pelacak DNA yang dibuat dari DNA berulang ini telah dikembangkan pula untuk mendeteksi parasit filaria limfatik, *B. malayi* (parasit filaria pada manusia) dan *B. pahangi* (parasit filaria pada hewan) (McReynolds dkk., 1986, Sim dkk., 1986) dan *W. bancrofti* (Dissanayake & Piessens, 1990).

DNA berulang pada parasit filaria *B. malayi* dan *B. pahangi* dapat dipotong dengan enzim pemotong DNA *Hha* I dan mempunyai panjang sikuen 322 bp (pasangan basa), sehingga dikenal sebagai *Hha* I family. DNA berulang ini terdapat dalam jumlah 30.000 copi pada panjang genom 80.000.000 bp atau 12% dari total genom sehingga dianggap sebagai *highly repetitive DNA* dan DNA tersebut tersusun secara tandem (yaitu saling berdampingan satu dengan lainnya pada orientasi yang sama).

McReynolds dkk., membuat pelacak DNA pBma68 yaitu suatu plasmid pBR322 yang mempunyai dua copi *Hha* I *B. malayi*. Pelacak DNA pBma68 yang yang ditandai dengan molekul radioaktif  $^{32}\text{P}$  berikatan kuat dengan DNA *B. malayi* pada tes dot blot, tetapi bereaksi silang dengan DNA *B. pahangi* pada intensitas 10% DNA *B. malayi*. Ternyata hasil analisis konsensus sikuen DNA *B. malayi* dan *B. pahangi* menunjukkan adanya perbedaan basa-basa di antara keduanya sebesar 11% (McReynolds dkk., 1986).

Pelacak DNA lainnya, pBm15 yaitu suatu plasmid yang mempunyai 4 copi DNA berulang parasit *B. malayi* yang dipotong dengan enzim *Sau* 3A telah dibuat oleh Sim dkk., 1986\*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kemampuan hibridisasi pelacak DNA pBm15 yang ditandai dengan radioaktif  $^{32}\text{P}$  pada DNA

*B. malayi* lebih baik jika dibandingkan dengan kemampuan hibridisasi pelacak 3DNA dengan DNA *B. pahangi*, meskipun konsentrasi DNA *B. malayi* 1000X lebih rendah dibandingkan dengan konsentrasi DNA *B. pahangi*. Pelacak DNA ini juga telah dicoba untuk mendeteksi larva infeksi *B. malayi*, *B. pahangi*, *D. repens*, dan *B. hooliati* yang diisolasi dari nyamuk. Nyamuk infeksi dihidang dalam larutan garam di bawah mikroskop, kemudian larva infeksi yang ditemukan dihitung. Larutan garam yang mengandung larva infeksi diteteskan pada membran nitroselulosa dan dihibridisasi dengan pelacak DNA pBm15-radioaktif. Hasil hibridisasi pelacak DNA menunjukkan bahwa pelacak DNA tersebut spesifik untuk parasit filaria *B. malayi* dan dapat mendeteksi 1 larva infeksi *B. malayi* (Sim dkk., 1986<sup>b</sup>).

DNA berulang Hha I pada pelacak DNA pBma68 tidak mempunyai tempat pemotongan untuk enzim Sau 3A, walaupun demikian hasil analisis sikuen DNA berulang antara pBma68 dan pBm15 DNA tersebut menunjukkan adanya homologi sebesar 97%. Hal ini menunjukkan bahwa kedua klon pelacak DNA sangat berhubungan erat satu dengan lainnya dan kemungkinan berasal dari sikuen DNA berulang yang sama dari genom *B. malayi* (Piessens dkk., 1987).

Spesifisitas suatu pelacak DNA dapat ditingkatkan dengan membuat pelacak DNA oligonukleotida dari daerah sikuen DNA yang paling banyak perbedaan susunan basanya antara 2 spesies berbeda.

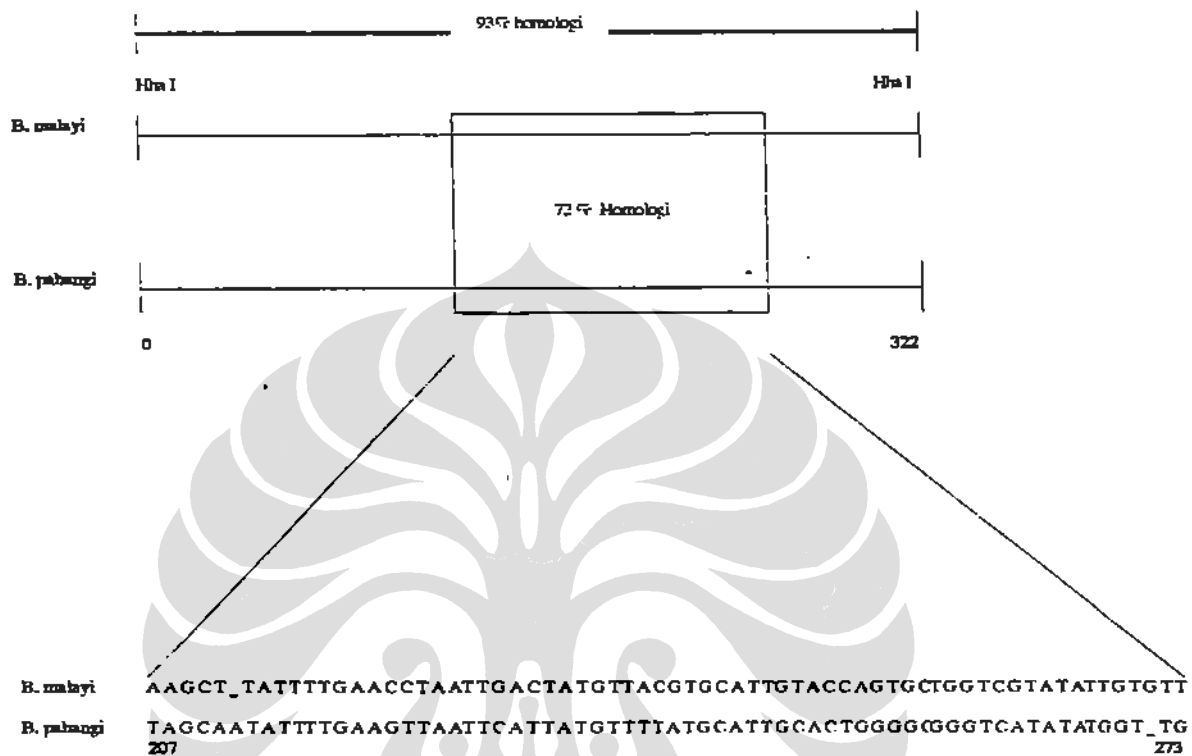
Pada sikuen DNA berulang *B. malayi* dan *B. pahangi* terdapat perbedaan tempat pemotongan enzim oleh enzim Msp I. Sikuen DNA berulang *B. pahangi* mempunyai 10 kali lebih banyak tempat pemotongan enzim Msp I dibandingkan



sikuen DNA berulang *B. malayi*. Selain itu sikuen DNA berulang *B. pahangi* tidak mempunyai tempat pemotongan untuk enzim Alu I dan Rsa I sedangkan sikuen DNA berulang *B. malayi* mempunyai tempat pemotongan untuk enzim Alu I dan Rsa I. Hal ini menunjukkan bahwa Hha I family pada DNA berulang *B. malayi* dan *B. pahangi* adalah homolog tetapi tidak identik.

Berdasarkan analisis perbedaan tempat pemotongan enzim pada DNA berulang *B. malayi* dan *B. pahangi*, diketahui bahwa daerah 209-275 hanya mempunyai homologi sebesar 72% sedangkan daerah lainnya mempunyai homologi sebesar 93% (Gambar 4). Kemudian sikuen di antara 209-275 digunakan untuk mensintesis pelacak DNA oligonukleotida *B. malayi* dengan panjang 29 nukleotida dan pelacak DNA oligonukleotida *B. pahangi* dengan panjang 21 nukleotida. Sikuen tersebut dipilih dengan tujuan untuk meningkatkan spesifisitas pelacak DNA *B. malayi* dan *B. pahangi*. Selain itu sikuen pada kedua pelacak DNA mempunyai banyak basa GC yang berguna untuk meningkatkan stabilitas hibridisasi pelacak DNA dengan DNA parasit. Pelacak DNA oligonukleotida (29-mer *B. malayi* dan 21-mer *B. pahangi*) yang ditandai radioaktif telah diuji pada tes dot blot terhadap DNA *B. malayi* dan *B. pahangi*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kemampuan hibridisasi pelacak DNA *B. malayi* terhadap DNA *B. malayi* adalah 500 kali lebih besar bila dibandingkan kemampuan hibridisasi terhadap DNA *B. pahangi* dan dapat mendeteksi DNA parasit *B. malayi* sampai konsentrasi 0,2 ng DNA (sama dengan 1-2 mikrofilaria).

Spesifisitas dan sensitivitas pelacak DNA *B. pahangi* hampir sama dengan pelacak DNA *B. malayi* (Williams dkk., 1988).



Gambar 4. Hasil perbandingan sikuen DNA berulang *Brugia malayi* dan *Brugia pahangi*. Prosentase homologi sikuen DNA berulang *Brugia malayi* dan *Brugia pahangi* adalah 93% tetapi prosentase homologi pada sikuen di daerah 207-273 adalah 72% (Williams dkk., 1988).

Umumnya pelacak DNA yang ditandai dengan molekul radioaktif ( $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ) mempunyai sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi pada hibridisasi, tetapi molekul radioaktif tersebut tidak stabil, mahal, waktu paruh pendek, perlu latihan penggunaan peralatan khusus untuk molekul radioaktif, perlu pembuangan khusus, dan berbahaya bagi pemakainya. Pengembangan sistem hibridisasi menggunakan pelacak DNA yang ditandai molekul non-radioaktif diharapkan dapat mengatasi kesulitan-kesulitan tersebut di atas.

Akhir-akhir ini berbagai macam molekul non-radioaktif telah digunakan untuk menandai pelacak DNA, misalnya *biotin* (Langer dkk., 1981), *fluorescein* (Prober dkk., 1987), *digoxigenin* (Hotlke dkk., 1992) dan enzim (Whitehead dkk., 1983). Molekul-molekul non-radioaktif dapat berikatan secara kovalen pada nukleotida pirimidin, dUTP atau dCTP (Langer dkk., 1981) atau nukleotida purin, dATP atau dGTP (Gebeychu dkk., 1987).

Ada 2 cara penandaan pelacak DNA dengan molekul non-radioaktif (Keller & Manak, 1989), yaitu:

1. Penandaan pelacak DNA secara kimiawi. Sebagai contoh dapat dikemukakan penandaan pelacak DNA dengan menggunakan senyawa yang sensitif terhadap pengaruh cahaya: fotobiotin. Fotobiotin adalah suatu *linker arm* yang ditandai dengan biotin dan gugus *aryl azide*. Adanya cahaya akan merubah gugus *aryl azide* menjadi *aryl nitrene* yang siap bereaksi dengan DNA. Cara penandaan yang lain adalah menggunakan *linker arm ethylenediamine* dengan mempunyai *bisulfite*.
2. Penandaan pelacak DNA secara enzimatik, yaitu melalui *nick-translation*, *random priming* dan *end-labelling*.

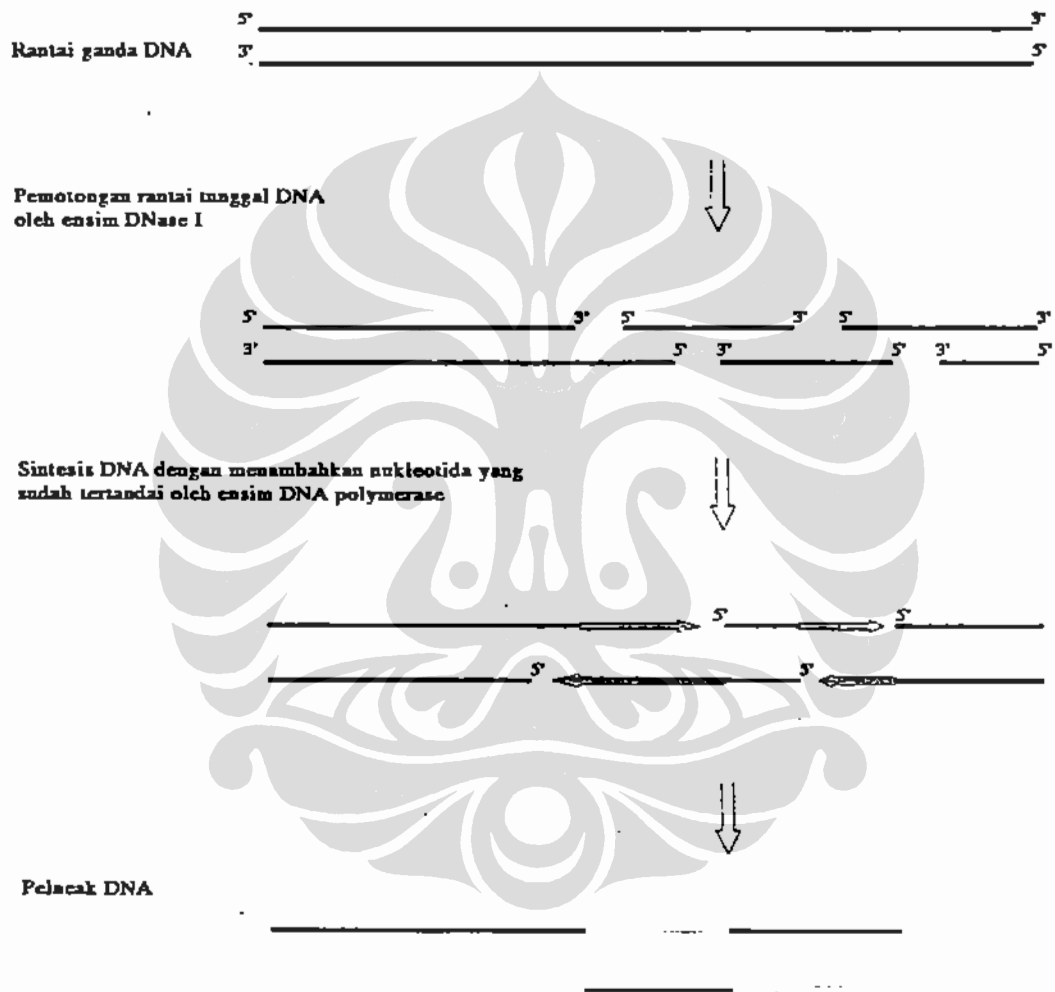
Reaksi *nick-translation* pada penandaan pelacak DNA merupakan aktivitas gabungan enzim DNase I dan *E. coli* DNA polimerase I. Enzim *E. coli* polimerase I adalah enzim yang mempunyai kemampuan ganda, yaitu 5'→3' polimerase untuk sintesis DNA dan 5'→3' eksonuklease untuk memotong DNA. Enzim DNase I akan memutuskan setiap rantai tunggal DNA secara

acak pada beberapa tempat (*nick*) pada rantai ganda DNA sehingga terbentuk gugus bebas 3' hidroksil. Aktivitas 5'→3' eksonuklease akan memindahkan 1 atau lebih basa-basa dari gugus 5' fosfat pada tempat yang terputus dan aktivitas 5'→3' polimerase akan mengisi tempat kosong dengan nukleotida yang sudah tertandai (Gambar 5). Cara penandaan *nick translation* hanya dapat digunakan untuk menandai rantai ganda DNA sirkular dan linier.

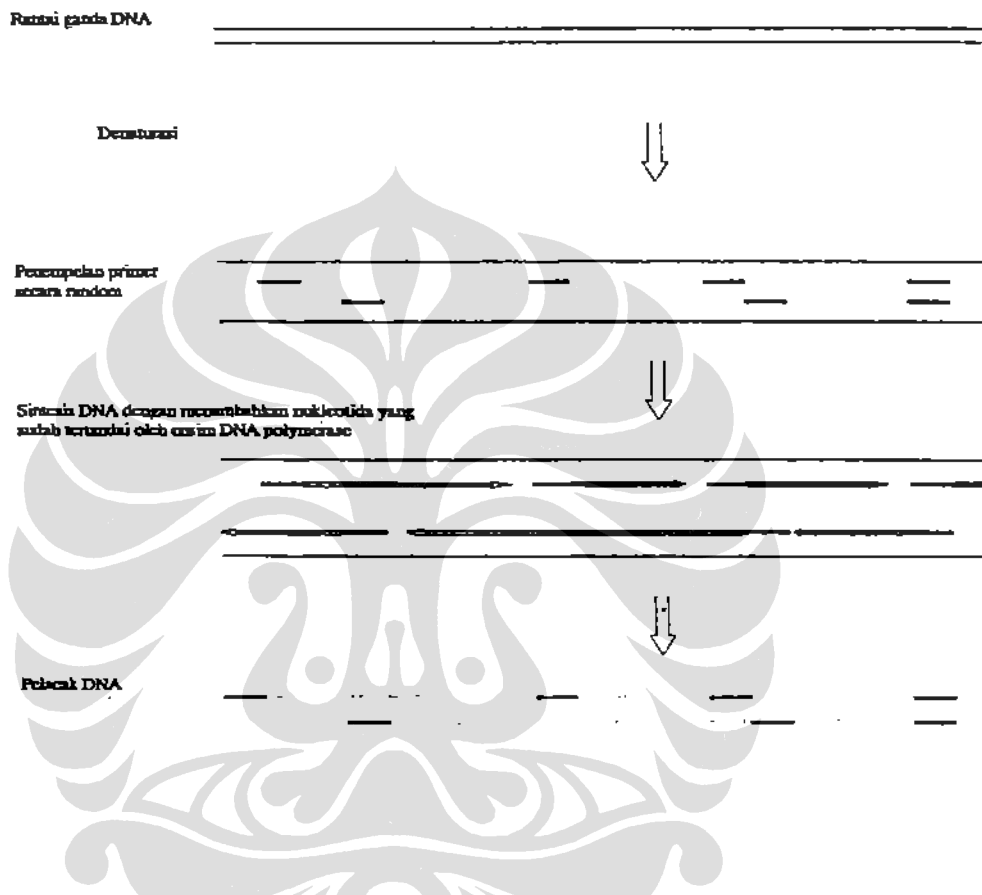
Reaksi *random-priming* memerlukan *primer* oligonukleotida (*primer* heksanukleotida) dan enzim DNA polimerase I *klenow fragment*. Enzim DNA polimerase I *klenow fragment* mempunyai aktivitas 5'→3' polimerase dan 3'→5' eksonuklease. Aktivitas 3'→5' eksonuklease dapat dikurangi dengan menggunakan bufer pH 6,6. *Primer* heksanukleotida akan menempel pada banyak tempat di sepanjang rantai tunggal DNA. *Primer* tersebut merupakan tempat permulaan bekerjanya enzim 5'→3' polimerase untuk mensintesa rantai baru DNA melalui menambahkan nukleotida yang sudah tertandai (Gambar 6). Cara penandaan *random-priming* tidak efisien untuk DNA sirkular karena itu DNA harus dibuat linier dahulu dengan enzim pemotong DNA atau DNase I untuk membuat *nick*.

*End-labelling* pada ujung 5' dapat dilakukan dengan enzim T4 polinukleotida kinase. Penandaan ini cocok untuk pelacak DNA oligonukleotida yang mempunyai ujung 5' hidroksil. Enzim T4 polynucleotide kinase akan menempelkan satu nukleotida yang sudah tertandai pada ujung 5' tersebut. Cara lain untuk *End-labelling* adalah menandai

pelacak DNA pada ujung 3' hidroksil dengan bantuan enzim *terminal deoxynucleotidyl transferase*. Enzim tersebut akan menambahkan nukleotida yang sudah tertandai pada ujung 3' sehingga terbentuk *tail*.



Gambar 5. Cara penandaan pelacak DNA dengan *nick translation*. Enzim DNase I akan menyebabkan terjadi putusnya rantai tunggal DNA dan enzim *E. coli* polimerase I akan mensintesisnya dengan nukleotida yang sudah tertandai (Keller & Manak, 1989)



Gambar 6. Cara penandaan pelacak DNA dengan *random-priming*. Untuk melakukan *random priming* diperlukan *primer* oligonukleotida dan enzim *E. coli* polimerase I klenow fragment. Primer hexanukleotida diperlukan untuk memulai sintesis rantai baru DNA melalui penambahan nukleotida yang sudah tertandai (Keller & Manak, 1989)

Pelacak DNA non-radioaktif kurang sensitif dibandingkan dengan pelacak DNA radioaktif. Untuk meningkatkan sensitivitas dan spesifisitas pelacak DNA maka Williams dkk., 1991 (sedang dicetak) memutuskan untuk membuat pelacak DNA oligonukleotida yang lebih panjang.

Pelacak DNA oligonukleotida baru dengan panjang 45 nukleotida untuk *B. malayi* dan panjang 44 nukleotida untuk *B. pahangi* telah disintesis secara kimiawi. Perbedaan basa-basa kedua pelacak DNA tersebut adalah 57% homologi. Kedua pelacak DNA tersebut ditandai dengan 90 nukleotida uridin-biotin yang diselingi timidin pada ujung 5' sehingga panjang keseluruhan pelacak DNA *B. malayi* 136 nukleotida dan *B. pahangi* 135 nukleotida (Williams dkk., 1991 sedang dicetak). Kedua pelacak DNA tersebut menunjukkan sensitivitas optimal pada suhu hibridisasi tes dot blot yang berbeda. Sensitivitas optimal dicapai oleh pelacak DNA *B. malayi* pada suhu 37°C dalam 50% formamide-larutan hibridisasi dengan kemampuan mendeteksi DNA total genom *B. malayi* pada konsentrasi 0,1 ng. Sensitivitas pelacak DNA *B. pahangi* dicapai pada suhu 35°C dalam 50% formamide-larutan hibridisasi dengan mendeteksi DNA total genom *B. pahangi* pada konsentrasi 0,1 ng (Supali dkk., 1989).

Penandaan pelacak DNA oligonukleotida dengan molekul non-radioaktif secara enzimatik *end-labelling* menggunakan dNTP yang dimodifikasi merupakan cara yang paling efisien (Keller & Manak, 1989). Enzim *terminal deoxynucleotidyl transferase* banyak digunakan untuk menandai ujung 3' pelacak DNA oligonukleotida, sehingga terbentuk *tail* pada ujung 3' (Lobban & Kaiser, 1973).

Trainor & Jensen (1988) melaporkan bahwa dideoksinukleotide trifosfat yang ditandai *succinylfluorescein* adalah substrat yang baik untuk enzim *terminal deoxynucleotidyl transferase* dan dapat digunakan untuk menandai pelacak DNA pada ujung 3'. Amersham Corporation (Arlington Height, IL) telah

mengembangkan metoda penandaan pelacak DNA dengan molekul non-radioaktif *fluorescein-dUTP*. Cara penandaan ini relatif cepat, hanya membutuhkan waktu 1 jam untuk menandai  $25-250 \times 10^{-12}$  mol pelacak DNA oligonukleotida dan tidak diperlukan pemurnian sisa molekul *fluorescein-dUTP* (*unincorporated fluorescein-dUTP*) yang tidak terpakai dari pelacak DNA oligonukleotida yang sudah tertandai.

Untuk mendeteksi pelacak DNA non-radioaktif digunakan enzim sebagai konjugat pada pelacak DNA. Enzim dapat berikatan secara kovalen pada pelacak DNA (Carlson dkk., 1990). Reaksi enzimatik ini dapat divisualisasikan melalui deteksi *colometric* (perubahan warna) atau deteksi *chemiluminescent* (Keller & Manak, 1989).

Sistem deteksi *colometric* menggunakan enzim alkaline fosfatase sebagai konjugat dan dideteksi dengan substrat 5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfatase dan nitroblue tetrazolium telah dikembangkan oleh Renz dan Kurz, 1984. Sistem deteksi warna (*color*) ini akan menghasilkan endapan warna langsung pada membran, sehingga hasilnya dapat diamati langsung dengan mata atau didokumentasikan dengan menggunakan kamera atau fotokopi. Tetapi pemakaian deteksi warna ini memerlukan waktu yang lama (selama 10 jam) dan sulit untuk melakukan *reprobing* membran. *Reprobing* akan terganggu dengan adanya endapan tidak larut yang dihasilkan oleh reaksi warna. Oleh karena itu endapan-endapan pada membran harus dicuci sebelum dilakukan *reprobing*. Hal ini menyebabkan penggunaan *reprobing* untuk rutin sangat sulit. Contoh pada



diagnosis filariasis, *reprobing* kadang-kadang dibutuhkan jika sampel-sampel yang perlu diskriming dengan lebih dari satu pelacak (pelacak DNA *B. malayi*, dan pelacak DNA *B. pahangi*).

Kekurangan-kekurangan ini dapat diatasi dengan memakai sistem deteksi *chemiluminescent*. Pada sistem ini, enzim *horseradish peroxide* dengan bantuan *hydrogen peroxide* mengoksidasi luminol yang terdapat dalam larutan deteksi *chemiluminescent* sehingga terjadi emisi cahaya. Cahaya tersebut dapat dideteksi oleh luminometer atau film. Sistem deteksi ini cepat (memerlukan waktu  $\pm 3$  jam) dan tidak menyebabkan adanya pengendapan pada membran sehingga dapat dilakukan *reprobing*.

## B. Polymerase Chain Reaction

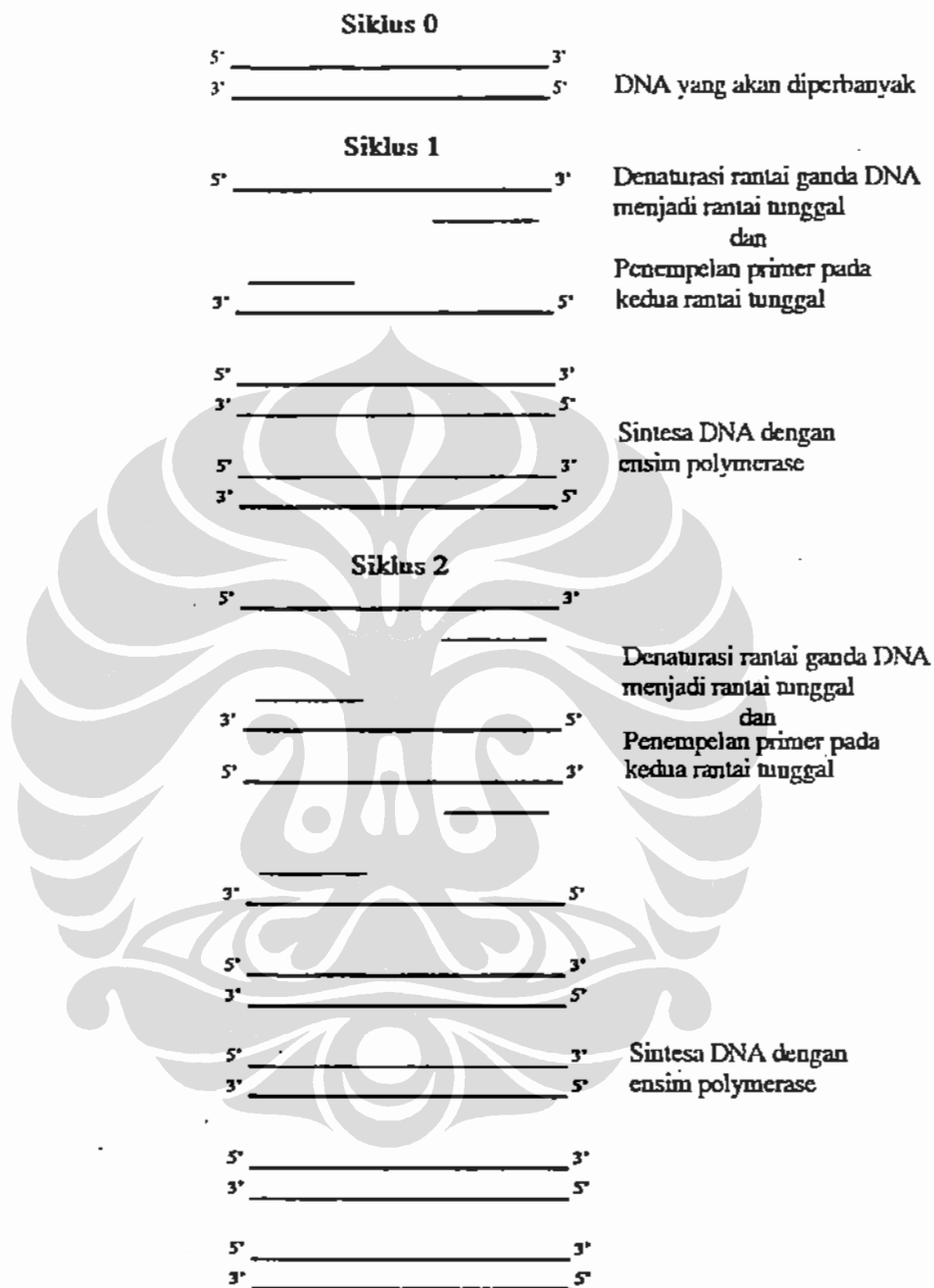
Suatu teknik *in vitro* untuk menggandakan DNA secara enzimatik telah dikembangkan oleh Saiki dkk., 1985. Teknik tersebut dikenal sebagai *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Teknik ini terdiri atas 3 reaksi (Williams, 1989) yaitu :

1. Denaturasi rantai ganda DNA menjadi rantai tunggal melalui pemanasan pada suhu  $92^{\circ}\text{C} - 95^{\circ}\text{C}$ .
2. Penempelan 2 macam *primer* pada masing-masing rantai tunggal DNA pada tempat DNA akan diperbanyak. Reaksi ini dilakukan pada suhu  $37^{\circ}\text{C} - 55^{\circ}\text{C}$ .
3. Sintesis DNA dengan menggunakan enzim polimerase yang dilakukan pada suhu  $65^{\circ}\text{C} - 72^{\circ}\text{C}$ .

Ketiga reaksi tersebut merupakan satu siklus (Gambar 7) dan setiap siklus akan menggandakan DNA, sehingga rumusnya adalah  $2^n$  ( $n$  = jumlah siklus)

(Erich dkk., 1991). Menurut teori, 25 siklus PCR dapat menggandakan DNA sebanyak  $3,4 \times 10^7$  kali. Namun demikian efisiensi setiap siklus PCR kurang dari 100% sehingga hasil penggandaan DNA yang tercapai setelah 25 siklus PCR adalah  $1-3 \times 10^6$  kali. Efisiensi PCR dipengaruhi oleh konsentrasi DNA dan aktivitas enzim (Kumar, 1989). Teknik PCR ini dapat digunakan untuk menggandakan DNA dalam jumlah sedikit sekali yaitu satuan picogram ( $10^{-12}$  gram) (Oste, 1988). Penggunaan teknik PCR ini dapat pula membantu meningkatkan sensitivitas pelacak DNA non-radioaktif.

Bell & DeMarini, 1991 melaporkan pengaruh banyaknya siklus reaksi PCR terhadap spesifisitas DNA hasil PCR. Mereka mencoba menggandakan DNA 328 bp dan melakukan elektroforesis terhadap hasil PCR sebanyak 5 ul pada siklus ke 20, 26, 32, 38, dan 44 pada 1% gel agarose/2% nusieve agarose, kemudian dilakukan *southern blot* pada membran nitroselulosa dan dihibridisasi pelacak DNA radioaktif. Hasil *southern blot* dari berbagai macam siklus PCR (siklus 20,26,32,38 dan 44) menunjukkan bahwa maksimum banyaknya siklus untuk menggandakan DNA 328 bp adalah 26 siklus. Spesifisitas DNA hasil PCR hampir hilang pada siklus ke 44. Dari hasil ini diketahui bahwa setelah siklus ke 30 maka primer dalam reaksi PCR akan berubah menjadi cetakan untuk reaksi selanjutnya dan hasil PCR primer tersebut akan menempel pada ujung 3' dari cetakan DNA yang sebenarnya (DNA 328 bp) atau hasil PCR primer akan saling menempel sendiri.



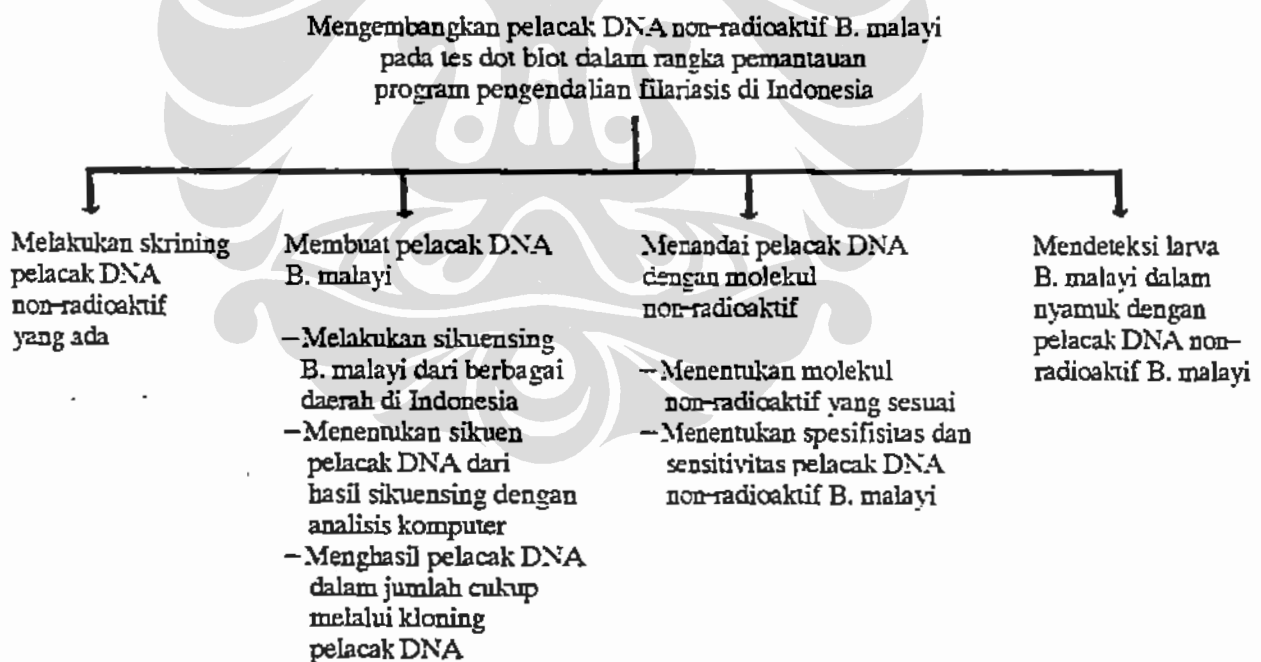
Gambar 7. Siklus PCR, yang terdiri dari denaturasi rantai ganda DNA menjadi rantai tunggal, penempelan 2 *primer* pada masing-masing rantai tunggal DNA, dan sintesis DNA (Oste, 1988).

### BAB III

#### BAHAN DAN CARA KERJA

Penelitian ini dilakukan oleh penulis sendiri di Department of Biological Sciences, Smith College, USA dan Bagian Parasitologi, Fakultas kedokteran, Universitas Indonesia sejak tahun 1988-1992 sebagai *sandwich program* untuk program S3 dengan biaya dari World Health Organization.

Di bawah ini dipaparkan bagan kerja yang dilakukan penulis:



Gambar 8. Rangkaian penelitian yang dilakukan oleh penulis untuk disertasi ini.

A. Skrining pelacak DNA *B. malayi* (45-mer) - biotin pada parasit *B. malayi* dari berbagai daerah di Indonesia.

Pelacak DNA *B. malayi* (45-mer) yang ditandai 90 nukleotida uridin-biotin diselingi biotin pada ujung 5' (Williams dkk., 1991 sedang dicetak) telah dicoba pada penelitian ini dengan tujuan untuk mengetahui spesifisitas dan sensitivitas terhadap parasit filaria *B. malayi* dari berbagai daerah di Indonesia sebelum pelacak DNA tersebut digunakan secara luas di Indonesia untuk mendeteksi larva di dalam nyamuk dalam program pemantauan filariasis *B. malayi*.

**Bahan dan reagensia:**

- L3 parasit *B. malayi* dari Kalimantan Timur (zoofilik aperiodik) , Lampung (zoofilik subperiodik), Kendari (zoofilik subperiodik), dan Buton (antropofilik).
- Fenol
- Kloroform
- Isoamil alkohol
- Agarose
- Kit PCR (Perkin Elmer, Norwalk, CT)
- Pelacak DNA *B. malayi* (45-mer)-biotin (New England Biolab, Beverly, MA)
- Kit PhotoGene Nucleic Acid Detection System (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, MD)
- Membran nitroselulosa 0,45 $\mu$ m (Schleicher and Schuell, Keene, NH)
- Filter millipore VSWP 0,025  $\mu$ m (Millipore Corporation, Bedford, MA)

**Cara kerja:**

- a. Sonifikasi 100 larva infeksi parasit dilakukan dalam 50  $\mu\text{l}$  TE selama 10 menit dan kemudian hasil sonifikasi diperiksa di bawah mikroskop untuk memastikan bahwa semua larva infeksi telah hancur.
- b. 25  $\mu\text{l}$  TE ditambahkan ke dalam larutan hasil sonifikasi sehingga volume akhir 75  $\mu\text{l}$ , kemudian disentrifugasi pada 12.000 x g selama 15 menit
- c. Ekstraksi fenol-kloroform (Lampiran 2) dilakukan dengan cara menambahkan volume yang sama (75  $\mu\text{l}$ ) fenol yang sudah dijenuhkan dengan TRIS pH 8 ke dalam tabung, kemudian dilakukan *vortex* 1 menit dan disentrifugasi pada 12.000 x g selama 2 menit. Supernatan bening (lapisan atas) dipindahkan pada tabung baru dan ditambahkan volume yang sama fenol-chisam (*chisam: campuran kloroform dan isoamil alkohol dengan perbandingan volume 24:1*), kemudian dilakukan *vortex* 1 menit dan disentrifugasi pada 12.000 x g selama 2 menit. Supernatan dipindahkan lagi ke dalam tabung baru, lalu ditambahkan volume yang sama chisam. Kemudian dilakukan *vortex* 1 menit dan disentrifugasi pada 12.000 x g selama 2 menit.
- d. Supernatan didialisis di atas filter millipore 0,025  $\mu\text{m}$  pada TE dalam cawan petri selama 5 jam pada 4 °C.
- e. Pada 10  $\mu\text{l}$  supernatan dilakukan PCR dengan tujuan untuk memperbanyak DNA berulang.

Reagensia yang dipakai pada reaksi PCR:

- 10  $\mu$ l 10X bufer PCR
- 16  $\mu$ l campuran dNTP (1,25mM setiap dNTP)
- 6  $\mu$ l MgCL<sub>2</sub> (25mM)
- 2  $\mu$ l 18-mer *primer* (10 pmol/ $\mu$ l)
- 2  $\mu$ l 23-mer *primer* (10 pmol/ $\mu$ l)
- 10  $\mu$ l sampel DNA (supernatan)
- 2  $\mu$ l enzim Taq polimerase (pengenceran 1:10)
- 52  $\mu$ l steril ddH<sub>2</sub>O

---

100  $\mu$ l

Semua reagensia dicampur dalam satu tabung, kemudian ditambahkan 2 tetes minyak mineral untuk mencegah penguapan. PCR dilakukan sebanyak 30 siklus dengan temperatur denaturasi pada 93 °C selama 1 menit, penempelan *primer* pada 55 °C selama 1 menit, dan sintesis pada 72 °C selama 1 menit.

Kedua *primer* yang digunakan pada penelitian ini disintesa dengan menggunakan metoda *phosphoramidite* pada *DNA synthesizer* (Caruthers, 1985). Primer 18-mer (*forward primer*) mempunyai sikuen 5'GCGCATAAATTCATCAGC 3'; primer 23-mer (*reverse primer*) mempunyai sikuen 5'GCGCAAAACTTAATTACAAAAGC3. Kedua *primer* akan menempel pada DNA berulang parasit di dua tempat yang berbeda (Gambar 9).

- f. 10  $\mu$ l DNA hasil PCR dikuantitasi pada 1,8% gel agarose selama 1 jam pada 60 volt dengan elektroforesis (Bio Rad, Richmond, CA). Untuk standar digunakan DNA pBR 322-*Msp* I (*DNA plasmid pBR 322 yang dpotong dengan enzim Msp I*) dari New England BioLabs, Beverly, MA.

- 8  $\mu$ l sampel PCR
- 2  $\mu$ l 5X "loading dye"
- 10  $\mu$ l

- g. Gel diwarnai dengan ethidium bromide 5 menit, dicuci dengan dH<sub>2</sub>O 15 menit, dan difoto dengan pencahayaan ultraviolet (Fotodyne Incorporated, New Berlin, WI)
- h. Untuk kontrol digunakan DNA total genom *B. malayi* dan *B. pahangi*, yang diisolasi dari 100.000 mikrofilaria (TRS Laboratory, Athens, GA) dengan cara: Ke dalam 500  $\mu$ l 1x bufer lisis (100.000 mikrofilaria) ditambahkan proteinase K (100ug/ml), Sodium Dodecyl Sulfate (0.5%), dan beta mercaptoetanol (50mM) dan diinkubasi pada 65°C selama 5 jam dengan dilakukan vortex setiap jam. Kemudian dilakukan ekstraksi fenol-kloroform dan dialisis seperti pada tahap c-d. Selain itu juga dilakukan elektroforesis pada 0,8% gel agarose untuk kuantitasi DNA, dan berbagai konsentrasi DNA bakteriofag lambda digunakan sebagai *marker*.
- i. Setelah semua DNA sampel dikuantisasi, kemudian diencerkan dalam berbagai konsentrasi dari 6,4 ng sampai 0,1 ng dengan pengenceran 2 kali (6,4 ng, 3,2 ng, 1,6 ng, 0,8 ng, 0,4 ng, 0,2 ng, dan 0,1 ng).
- j. Semua DNA didenaturasi dengan menambahkan NaOH sampai konsentrasi akhir 1M dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang, kemudian dinetralisasi dengan NH<sub>4</sub>OAc sampai konsentrasi akhir 2M dan diinkubasi dalam es sampai siap ditetaskan di atas membran nitroselulosa 0,45 $\mu$ m.
- k. Semua sampel ditetaskan di atas membran nitroselulosa 0,45 $\mu$ m pada *dot blot apparatus* (Millipore Corporation, Bedford, MA) (Lampiran 10). Sebagai kontrol digunakan DNA total genom *B. malayi*, DNA *B. pahangi*, dan pBma 68.



- l. DNA pada membran didenaturasi lagi dengan meletakkan membran di atas kertas filter yang sudah dibasahi dengan 0.5N NaOH selama 1 menit, kemudian dinetralisasi pada kertas filter yang dibasahi dengan 1M TRIS selama 1 menit dan 0,5M TRIS, 1,5M NaCl selama 1 menit.
- m. Membran dikeringkan dalam oven vakum selama 1 jam pada 80° C, bertujuan untuk menempelkan DNA pada membran.
- n. Membran diprehibridisasi dalam 5 ml larutan hibridisasi selama 2 jam pada 37° C dan hibridisasi dilakukan dengan menambahkan pelacak DNA-*hiorin* (50ng/ml) selama semalam pada 37° C.
- o. Filter dicuci dan dideteksi dengan *chemiluminescent* sesuai dengan protokol Bethesda Research Laboratories.
- p. Membran dipaparkan pada film selama 3 jam.

Sumber:

1. Protokol PCR dari Perkin Elmer, Norwalk, CT.
2. Protokol PhotoGene Nucleic Acid Detection System dari Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, MD.
3. Sambrook dkk., 1989.
4. Molecular Biology and Biotechnology, Summer Workshop 1991, Smith College, USA.



Gambar 9. *Primer Hha* I (18-mer *forward primer* dan 23-mer *reverse primer*). Kedua *primer* menempel pada 2 posisi yang berbeda di DNA berulang parasit filaria.

## B. Menentukan konsensus sikuen DNA berulang *B. malayi* di Indonesia

Sikuensing DNA berulang *B. malayi* dari berbagai daerah di Indonesia dilakukan untuk menentukan konsensus sikuen DNA berulang *B. malayi* di Indonesia. Untuk keperluan sikuensing tersebut telah dikumpulkan 3 strain *B. malayi* dari beberapa daerah di Indonesia, yaitu: *B. malayi* strain Kendari yang bersifat zoofilik subperiodik, *B. malayi* strain Bengkulu yang bersifat zoofilik subperiodik, dan *B. malayi* strain Buton yang bersifat antropofilik.

### Bahan dan reagensia:

- Proteinase K
- Beta merkaptotanol
- Sodium Dodecyl sulfat
- Mikrofilaria *B. malayi* dari berbagai daerah di Indonesia, yaitu *B. malayi* dari Kendari (zoofilik subperiodik), Bengkulu (zoofilik subperiodik), dan Buton (antropofilik)
- Bakteriofag M13mp18 (New England BioLabs, Beverly, MA)
- Enzim pemotong DNA Hin PI, Acc I (New England BioLabs, Beverly, MA)
- Enzim penyambung DNA (enzim ligase dari New England BioLabs, Beverly, MA)
- Bakteri *E. coli* JM 101 (Stratagene, La Jolla, CA)
- Fenol
- Kloroform
- Isoamil alkohol
- Radioaktif <sup>35</sup>S (Amersham corp, Arlington Height, IL)

**Cara kerja:**

- a. 100.000 mikrofilaria dari berbagai daerah di Indonesia (Kendari, Bengkulu, dan Buton) dikumpulkan dari darah.
- b. Mikrofilaria dipisahkan dari sel-sel darah dengan filtrasi memakai filter nukleopore (sampai air hasil filtrasi berwarna bening). Filter dimasukkan ke dalam tabung yang berisi 500  $\mu$ l 100 mM EDTA, kemudian mikrofilaria dilepaskan dari filter dengan kuas kecil. Parasit disentrifugasi pada 12.000 x g selama 15 menit, kemudian pellet dicuci 2X dengan 1X bufer lisis untuk menglisis sel-sel darah.
- c. DNA parasit diisolasi dengan mencampurkan mikrofilaria ke dalam 500  $\mu$ l bufer lisis serta menambahkan proteinase K (100ug/ml), Sodium Dodecyl Sulfat (0,5%), dan beta merkaptoetanol (50mM) dan diinkubasi pada suhu 65° C selama 5 jam. *Vortex* dilakukan setiap 1 jam untuk membantu menghancurkan parasit.
- d. Setelah dilakukan ekstraksi fenol-kloroform dan dialisis maka DNA parasit dipotong dengan enzim pemotong DNA Hin PI.

Reaksi pemotongan DNA parasit:

|                             |                               |
|-----------------------------|-------------------------------|
| 25 $\mu$ l                  | parasit DNA (500ng)           |
| 5 $\mu$ l                   | 10X bufer enzim <u>Hin</u> PI |
| 2 $\mu$ l                   | enzim <u>Hin</u> PI           |
| <u>18 <math>\mu</math>l</u> | ddH <sub>2</sub> O            |
| 50 $\mu$ l                  |                               |

Reaksi diinkubasi pada suhu 37° C selama 2 jam.

- e. DNA vektor (bakteriofag M13) dipotong dengan enzim pemotong DNA Acc I.

Reaksi pemotongan DNA vektor:

10  $\mu$ l DNA bakteriofag M13mp18 (1 $\mu$ g)  
 3  $\mu$ l 10X bufer enzim Acc I  
 1  $\mu$ l enzim Acc I  
 16  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O  
 30  $\mu$ l

Reaksi diinkubasi pada 37°C selama 2 jam dan kemudian ditambahkan

lagi 0,5  $\mu$ l enzim Acc I selama 2 jam.

- f. Ekstraksi fenol-kloroform, dialisis, dan elektroforesis pada 0,8% gel agarose dilakukan sesuai dengan cara di atas (cara A pada tahap c-d). *Marker* yang digunakan adalah DNA bakteriofag lambda.
- g. Penempelan antara DNA parasit dengan DNA vektor dilakukan dengan menggunakan enzim ligase pada rasio 1:1.

Reaksi penempelan DNA:

16  $\mu$ l DNA parasit  
 12  $\mu$ l DNA vektor  
 10  $\mu$ l 5X bufer ligase  
 1  $\mu$ l enzim T<sub>4</sub> ligase  
 16  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O  
 50  $\mu$ l

Reaksi diinkubasi pada suhu 14°C selama semalam (10 jam).

- h. Sel kompeten bakteri *Escherichia coli* JM 101 dipersiapkan sesuai dengan protokol pada Lampiran 3.
- i. Transformasi dilakukan sesuai dengan protokol pada Lampiran 4.
- j. *Plaque lift* yaitu skrining untuk menentukan klon yang mengandung DNA parasit (klon positif) dilakukan sesuai dengan protokol pada Lampiran 6 dengan menggunakan pelacak DNA pBma 68 yang ditandai radioaktif <sup>35</sup>S.
- k. Rantai tunggal bakteriofag M13mp18 yang mengandung DNA parasit (DNA

rekombinan) diisolasi sesuai dengan protokol pada Lampiran 7.

1. Reaksi labeling untuk sikuensing dilakukan sesuai dengan protokol pada Lampiran 8.
- m. Sikuensing dilakukan pada 6% gel acrylamide (50mA, 75 Watt).

Sumber:

1. Sambrook dkk., 1989.
2. Molecular Biology and Biotechnology, Summer Workshop 1991, Smith College, USA.

**C. Membuat sikuen pelacak DNA *B. malayi* dari konsensus sikuen DNA berulang *B. malayi* di Indonesia.**

Konsensus sikuen DNA berulang *B. malayi* Indonesia dibandingkan dengan konsensus sikuen DNA berulang *B. pahangi* untuk menentukan daerah pada sikuen DNA berulang yang mempunyai perbedaan basa paling banyak. Daerah tersebut akan digunakan sebagai sikuen pelacak DNA *B. malayi*. Semua analisis data sikuen dilakukan dengan menggunakan program komputer MacVector II (International Biotechnologies Incorporation, New Haven, CT).

**Cara kerja:**

- a. Konsensus sikuen DNA berulang *B. malayi* dibuat dengan membandingkan hasil sikuen DNA *B. malayi* Kendari, Bengkulu, dan Buton pada analisis komputer program MacVector II.
- b. Dengan komputer, konsensus sikuen DNA berulang *B. malayi* dibandingkan dengan konsensus sikuen DNA berulang *B. pahangi* untuk menentukan daerah

sikuen DNA berulang yang paling berbeda basa-basanya untuk digunakan sebagai pelacak DNA.

- c. Analisis 192 enzim pemotong dilakukan untuk menentukan enzim pemotong DNA yang dapat memotong daerah pada sikuen DNA berulang *B. malayi* yang dipakai sebagai pelacak DNA. Untuk melakukan analisis enzim pemotong maka 192 nama enzim pemotong DNA dan sikuen DNA berulang 322 bp *B. malayi* dimasukkan ke dalam program (Lampiran 11).

Sumber:

- Buku petunjuk program komputer MacVector II (International Biotechnologies Incorporation, New Haven, CT).

**D. Menghasilkan pelacak DNA spesifik untuk *B. malayi* dalam jumlah yang cukup.**

Untuk tujuan pemantauan keberhasilan program pengendalian filariasis *B. malayi* di Indonesia maka pelacak DNA spesifik untuk *B. malayi* harus dapat dihasilkan dalam jumlah yang cukup. Oleh karena itu pelacak DNA harus diklon ke dalam DNA vektor (DNA plasmid).

**Bahan dan reagensia:**

- Plasmid bluescript II (Stratagene, La Jolla, CA)
- Enzim ligase (New England BioLabs)
- Enzim pemotong DNA Sma I, Nde I, Nsi I (New England BioLabs)
- Radioaktif <sup>33</sup>S (Amersham)
- Bakteri *E. coli*

- Centricon-100 microconcentrator (Amicon division, W.R. Grace and co., Beverly, MA)
- Qiagen plasmid isolation column (Qiagen Inc, Chatsworth, CA)

**Cara kerja:**

- a. Pelacak DNA yang telah ditentukan sikuennya disintesis dengan menggunakan reaksi kimia *phosphoramidite* pada *DNA synthesizer* (Caruthers, 1985).
- b. Reaksi fosforilasi dilakukan dengan tujuan untuk menambahkan gugus fosfat pada ujung 5'. Kemudian dilakukan reaksi penempelan pelacak-pelacak DNA dengan enzim ligase dan purifikasi hasil penempelan pelacak DNA. Semua reaksi dilakukan sesuai dengan protokol Sambrook dkk., 1989.
- c. Panjang pelacak DNA yang sudah saling menempel dapat dianalisis pada 1% agarose/2% Nusieve pada elektroforesis 50 volt selama 2 jam.
  - 4  $\mu$ l ligasi pelacak DNA
  - 2  $\mu$ l 5X loading dye
  - 4  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O
  - 10  $\mu$ l
- d. Pelacak DNA yang sudah tersambung dipisahkan dari pelacak DNA yang tidak tersambung dengan *centricon-100 microconcentrator*, yang dilakukan sesuai protokolnya.
- e. DNA plasmid dipotong dengan enzim pemotong DNA Sma I.
- f. Penempelan pelacak DNA ke dalam DNA plasmid (rasio 2:1) dengan enzim ligase (volume total reaksi 20  $\mu$ l) dan diinkubasi pada suhu 14° C semalam (10 jam) untuk membentuk DNA rekombinan.

- g. Dilakukan ekstraksi fenol-kloroform dan dialisis pada hasil ligasi.
- h. DNA yang sudah terligasi dipotong dengan enzim Nde I dan Nsi I yang bertujuan untuk menghindari tersambungannya pelacak DNA pada orientasi yang tidak sama.

15  $\mu$ l DNA rekombinan (Pelacak DNA-DNA plasmid)  
 5  $\mu$ l 10X bufer untuk enzim Nde I & Nsi I  
 1  $\mu$ l enzim Nde I  
 1  $\mu$ l enzim Nsi I  
 28  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O  
 50  $\mu$ l

Reaksi diinkubasi pada suhu 37° C selama 3 jam.

- i. Transformasi DNA rekombinan ke sel kompeten bakteri *E. coli* JM101 dilakukan sesuai dengan protokol pada Lampiran 5.
- j. Skrining dengan menggunakan pelacak DNA total genom *B. malayi*-<sup>35</sup>S dilakukan untuk menentukan klon yang berisi DNA rekombinan (klon positif) sesuai dengan protokol *plaque lift* pada Lampiran 6.
- k. Klon positif ditumbuhkan dalam 50 ml medium cair LBA (*Luria bertani amplicillin*) pada inkubator 37° C selama semalam, kemudian dilakukan isolasi plasmid dengan *Qiagen plasmid isolation column*.
- l. DNA plasmid ditetaskan di atas membran nitroselulosa 0,45 $\mu$ m dengan pengenceran 1:5, 1:10, dan tanpa pengenceran pada tes dot blot (lampiran 10).
- m. Denaturasi, netralisasi, dan pengeringan membran dilakukan sesuai dengan protokol pada tahap A.
- n. Prehibridisasi, hibridisasi dengan pelacak DNA total genom *B. malayi* <sup>35</sup>S, dan



pencucian dilakukan sesuai dengan protokol pada Lampiran 6.

- o. Sikuensing klon positif dilakukan untuk mencari DNA rekombinan yang mempunyai pelacak DNA paling panjang.

Sumber:

1. Protokol centricon-100 microconcentrator dari Amicon divison, W.R. Grace and co., Beverly, MA.
2. Protokol qiagen plasmid isolation column dari Qiagen Inc, Chatsworth, CA.
3. Molecular Biology and Biotechnology, Summer Workshop 1991, Smith College, USA.
4. Sambrook dkk., 1989.

#### **E. Menentukan cara terbaik untuk menandai pelacak DNA dengan molekul non-radioaktif**

Dua macam kit digunakan untuk melakukan percobaan penandaan pelacak

DNA, yaitu:

1. *Dig DNA labelling and detection kit dari Boehringer Mannheim.*

Kit dari Boehringer Mannheim menandai pelacak DNA dengan *digoxigenin* melalui teknik *random priming*.

2. *ECL 3'-oligolabelling and detection system dari Amersham.*

Kit dari Amersham menandai fragmen pelacak DNA dengan *fluorescein* melalui teknik *end-labelling*.

1. *Dig DNA labelling and detection kit dari Boehringer Mannheim.*

**Bahan dan reagensia:**

- Kit Dig DNA labelling and detection
- Reagensia *chemiluminescent*

- Film kodak XAR-5
- Larutan *developer* dan *fixer* dari kodak

**Cara kerja:**

- a. DNA rekombinan yang mempunyai pelacak DNA paling panjang diisolasi dengan *Qiagen plasmid isolation column*.
- b. DNA rekombinan dipotong dengan enzim Hind III sehingga berbentuk linier, kemudian ditandai dengan *digoxigenin* sesuai dengan protokol dari kit.
- c. Pelacak DNA yang sudah ditandai diuji pada tes dot blot (Lampiran 9), dengan DNA sampel yang terdiri dari DNA total genom *B. malayi*, *B. pahangi*, dan DNA rekombinan sendiri. Berbagai konsentrasi DNA ditetaskan pada membran nitroselulosa 0,45 $\mu$ m mulai dari konsentrasi 6,4 ng sampai 0,1 ng dengan pengenceran 2 kali, kemudian membran dikering-anginkan.
- d. DNA pada membran didenaturasi dengan meletakkan membran di atas kertas filter yang sudah dibasahi dengan 0,5N NaOH selama 1 menit, kemudian dinetralisasi pada kertas filter yang dibasahi dengan 1M TRIS selama 1 menit dan 0,5M TRIS, 1,5M NaCl selama 1 menit.
- e. Membran dikeringkan dalam oven vakum selama 1 jam pada 80 $^{\circ}$ C, bertujuan untuk menempelkan DNA pada membran.
- f. Prehibridisasi dilakukan pada 60 $^{\circ}$ C selama 2 jam dan dihibridisasi pada 60 $^{\circ}$ C selama semalam dengan pelacak DNA-*digoxigenin*.
- g. Pencucian membran setelah hibridisasi dan deteksi dengan reagensia *chemiluminescent* dilakukan sesuai protokol.
- f. Membran dipaparkan pada film selama 3 jam dan hasil positif akan terlihat sebagai dot yang hitam. Perbedaan *signal* yang dihasilkan pada dot

menunjukkan adanya perbedaan konsentrasi DNA.

## 2. ECL 3'-oligolabelling and detection system dari Amersham.

### Bahan dan reagensia:

- Kit ECL 3'-oligolabelling and detection
- Reagensia *chemiluminescent*
- Film kodak XAR-5
- Larutan *developer* dan *fixer* dari kodak

### Cara kerja:

- a. DNA rekombinan yang mempunyai pelacak DNA paling panjang diisolasi dengan *Qiagen plasmid isolation column*.
- b. DNA rekombinan dipotong pada 2 tempat dengan enzim *Xba I* dan *Eco RV* untuk mendapatkan fragmen pelacak DNA 153 bp, kemudian dilakukan *electroelution* (Sambrook dkk., 1989) dan pengendapan dengan etanol dilakukan untuk memurnikan fragmen tersebut. Fragmen ini siap untuk ditandai dengan *fluorescein*.
- c. Penandaan pelacak DNA dengan *fluorescein* juga dilakukan pada fragmen pelacak DNA hasil perbanyakan dengan PCR.

### Reagensia yang dipakai pada reaksi PCR:

- 10  $\mu$ l 10X bufer PCR
- 16  $\mu$ l campuran dNTP (1,25mM setiap dNTP)
- 6  $\mu$ l MgCL<sub>2</sub> (25mM)
- 2  $\mu$ l 24-mer primer (10 pmol/ $\mu$ l)
- 2  $\mu$ l 24-mer primer (10 pmol/ $\mu$ l)
- 2  $\mu$ l DNA rekombinan (5 ng)
- 2  $\mu$ l enzim Taq polimerase (pengenceran 1:10)
- 60  $\mu$ l steril ddH<sub>2</sub>O
- 100  $\mu$ l

Primer yang digunakan pada reaksi PCR adalah *primer* untuk bakteriofag M13 (New England BioLabs, Beverly, MA).

Semua reagensia dicampur dalam satu tabung, kemudian ditambahkan 2 tetes minyak mineral untuk mencegah penguapan. PCR dilakukan sebanyak 30 siklus dengan temperatur denaturasi pada 93 °C selama 1 menit, penempelan *primer* pada 55 °C selama 1 menit, dan sintesis pada 72 °C selama 1 menit.

- d. Terhadap hasil PCR dilakukan elektroforesis 60 volt selama 1 jam pada 1% agarose.
- e. Untuk mengetahui spesifisitas fragmen hasil PCR dilakukan *southern blot* pada membran nitroselulosa 0,45  $\mu\text{m}$  sesuai dengan protokol *ECL gene detection system RPN 2101, Amersham* (Lampiran 9) dan dihibridisasi dengan pelacak DNA 31-mer yang ditandai dengan *fluorescein* (75ng/ml). Pencucian dan deteksi dengan *fluorescein* dilakukan sesuai *ECL 3'-oligolabelling and detection system, Amersham*.
- f. Fragmen pelacak DNA yang sudah tertandai *fluorescein* diuji pada tes dot blot (lampiran 10), dengan DNA sampel yang terdiri dari DNA total genom *B. malayi*, *B. pahangi*, dan DNA rekombinan sendiri. Berbagai konsentrasi DNA ditetaskan pada membran nitroselulosa 0,45  $\mu\text{m}$  dari konsentrasi 6,4 ng sampai 0,1 ng dengan pengenceran 2 kali, kemudian membran dikering-anginkan .
- g. DNA pada membran didenaturasi dengan meletakkan membran di atas kertas filter yang sudah dibasahi dengan 0,5N NaOH selama 1 menit, kemudian dinetralisasi pada kertas filter yang dibasahi dengan 1M TRIS selama 1 menit dan 0,5M TRIS, 1,5M NaCl selama 1 menit.

- h. Membran dikeringkan dalam oven vakum selama 1 jam pada 80° C. bertujuan untuk menempelkan DNA pada membran.
- i. Prehibridisasi dalam 5 ml larutan hibridisasi dilakukan pada 37° C selama 2 jam dan hibridisasi untuk pelacak DNA-*fluorescein* (150ng/ml) dilakukan pada 37° C semalam.
- j. Pencucian membran setelah hibridisasi dan deteksi dengan reagensia *chemiluminescent* dilakukan sesuai dengan protokol *ECL 3'-oligolabelling and detection system, Amersham..*
- k. Membran dipaparkan pada film selama 3 jam dan hasil positif akan terlihat sebagai dot yang hitam. Perbedaan *signal* hitam yang dihasilkan pada dot menunjukkan adanya perbedaan konsentrasi DNA.

Sumber:

1. Protokol dari Dig DNA labelling and detection kit dari Boehringer Mannheim.
2. Protokol dari ECL gene detection system RPN 2101, Amersham untuk *southern blot*.
3. Protokol dari ECL 3'-oligolabelling and detection system, Amersham.
4. Protokol PCR dari Perkin Elmer, Norwalk, CT.
5. Molecular Biology and Biotechnology, Summer Workshop 1991, Smith College, USA.
6. Sambrook dkk., 1989.

**F. Menentukan spesifisitas dan sensitivitas pelacak DNA *fluorescein* pada tes dot blot.**

Spesifisitas pelacak DNA *B. malayi* ditentukan dengan hibridisasi pada DNA *B. malayi* dan *B. pahangi* serta *B. malayi* dari berbagai daerah di Indonesia. Sedangkan sensitivitas pelacak DNA ditentukan melalui konsentrasi terendah DNA *B. malayi* yang terdeteksi pada tes dot blot (lampiran 10).

**Bahan dan reagensia:**

- DNA parasit *B. malayi* dan *B. pahangi*
- DNA parasit *B. malayi* dari Kalimantan Timur, Lampung, dan Kendari
- Membran nitroselulosa 0,45 $\mu$ m
- Pelacak DNA *fluorescein*
- *ECL 3'-oligolabelling and detection system*

**Cara kerja:**

- a. Pengenceran DNA total genom *B. malayi*, *B. pahangi*, dan DNA *B. malayi* dari Kalimantan Timur, Lampung, dan Kendari dalam berbagai konsentrasi DNA dilakukan menggunakan TE, mulai dari konsentrasi 6,4 ng sampai 0,1 ng dengan 2 kali pengenceran (6,4 ng, 3,2 ng, 1,6 ng, 0,8 ng, 0,4 ng, 0,2 ng, dan 0,1 ng).
- b. Sebagai kontrol positif digunakan DNA rekombinan itu sendiri dan fragmen DNA hasil PCR dari DNA rekombinan dan sebagai kontrol negatif digunakan DNA bakteriofag lambda. Konsentrasi DNA adalah 6,4 ng, 3,2 ng, 1,6 ng, 0,8 ng, 0,4 ng, 0,2 ng, dan 0,1 ng
- c. DNA tersebut diteteskan di atas membran nitroselulosa 0,45  $\mu$ m pada *dot blot apparatus*.
- d. DNA pada membran didenaturasi dengan meletakkan membran di atas kertas filter yang sudah dibasahi dengan 0,5N NaOH selama 1 menit, kemudian dinetralisasi pada kertas filter yang dibasahi dengan 1M TRIS selama 1 menit dan 0,5M TRIS, 1,5M NaCl selama 1 menit.

- e. Membran dikeringkan dalam oven vakum selama 1 jam pada 80°C, bertujuan untuk menempel DNA pada membran.
- f. Prehibridisasi dilakukan pada suhu 37°C selama 2 jam dan hibridisasi pada 37°C selama semalam dilakukan dengan menambahkan pelacak DNA *fluorescein* (150ng/ml).
- g. Pencucian membran dan deteksi dengan reagensia *chemiluminescent* dilakukan sesuai dengan protokol kit (*ECL 3'-oligolabelling and detection system dari Amersham*).
- h. Membran dipaparkan pada film selama 3 jam dan hasil positif akan terlihat sebagai dot yang hitam. Perbedaan *signal* yang dihasilkan pada dot menunjukkan perbedaan konsentrasi DNA.

Sumber:

1. Protokol dari ECL 3'-oligolabelling and detection system, Amersham.
2. Molecular Biology and Biotechnology, Summer Workshop 1991, Smith College, USA.

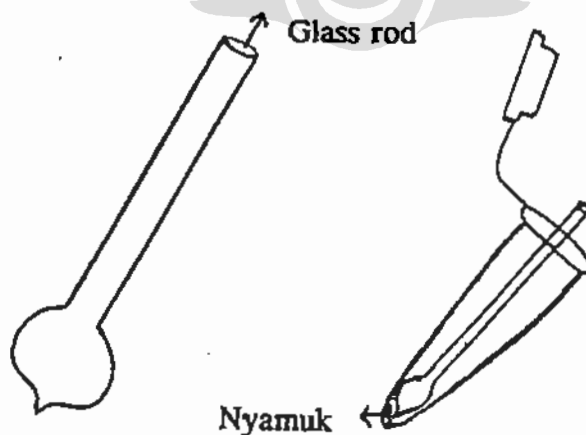
**G. Penggunaan pelacak DNA *fluorescein* untuk mendeteksi 1 larva infeksi dalam nyamuk setelah PCR di laboratorium.**

Fragmen pelacak DNA yang diperoleh dari PCR ditandai dengan *fluorescein* dan digunakan untuk mendeteksi 1 larva infeksi tanpa nyamuk atau dengan adanya nyamuk. Penelitian ini dimaksudkan untuk menguji penggunaan pelacak DNA *fluorescein* sebagai alternatif penggunaan cara entomologis konvensional.

- Nyamuk negatif *Aedes togoi* dan *Culex sp.*
- larva infeksi *B. malayi* dan *B. pahangi*
- DNA nyamuk *Aedes togoi* dan *Culex sp.*
- Kit PCR
- Membran nitroselulosa 0,45 $\mu$ m
- DNA manusia

#### Cara kerja:

- a. 1 larva infeksi (*B. malayi* atau *B. pahangi*) dimasukkan ke dalam tabung yang sudah berisi 15  $\mu$ l TE dengan jarum pancing di bawah mikroskop, kemudian langsung digerus (tanpa nyamuk) dengan *glass rod* (Gambar 10) dan diinkubasi dalam air mendidih selama 3 menit.
- b. Ke dalam tabung yang berisi 1 larva infeksi yang lain (*B. malayi* atau *B. pahangi*) dimasukkan berbagai jumlah nyamuk negatif (1, 3, 5, 10, 15, 20) dan kemudian digerus dengan *glass rod* dan diinkubasi dalam air mendidih selama 3 menit.



Gambar 10. *Glass rod* untuk menggerus nyamuk.



- b. Kemudian disentrifugasi selama 5 menit pada 12.000 x g untuk mengendapkan jaringan tubuh nyamuk.
- c. Melakukan PCR terhadap 5  $\mu$ l supernatan sampel.

Reagensia yang dipakai pada reaksi PCR:

- 10  $\mu$ l 10X bufer PCR
- 16  $\mu$ l campuran dNTP (1,25mM setiap dNTP)
- 6  $\mu$ l MgCL<sub>2</sub> (25mM)
- 2  $\mu$ l 18-mer primer (10 pmol/ $\mu$ l)
- 2  $\mu$ l 23-mer primer (10 pmol/ $\mu$ l)
- 5  $\mu$ l DNA sampel
- 2  $\mu$ l enzim Taq polimerase (pengenceran 1:10)
- 57  $\mu$ l steril ddH<sub>2</sub>O
- 100  $\mu$ l

PCR dilakukan sebanyak 30 siklus dengan suhu denaturasi pada 93° C selama 1 menit, penempelan *primer* pada 55° C selama 1 menit, dan sintesis pada 72° C selama 1 menit.

- d. 10  $\mu$ l DNA hasil PCR dielektroforesis pada 60 volt selama 1 jam pada 1,8% gel agarose. Untuk standard digunakan DNA pBR 322-Msp I (DNA pBR 322 yang dpotong dengan enzim Msp I) dari New England BioLabs, Beverly, MA.

- 8  $\mu$ l sampel PCR
- 2  $\mu$ l 5X loading dye
- 10  $\mu$ l

- e. Gel diwarnai dengan ethidium bromide 5 menit, dicuci dengan dH<sub>2</sub>O 15 menit, dan difoto dengan pencahayaan ultraviolet (Fotodyne Incorporated, New Berlin, WI)
- f. Sampel yang menghasilkan DNA 322 bp pada PCR kemudian ditetaskan di atas membran nitroselulosa 0,45 $\mu$ m pada *dot blot apparatus* dengan berbagai konsentrasi 5  $\mu$ l, 10  $\mu$ l, 15  $\mu$ l, 20  $\mu$ l, 25  $\mu$ l dari pengenceran 1:5 hasil PCR

ke dalam larutan TE. Selain itu juga diteteskan 10  $\mu$ l sampel tanpa pengenceran. Sebagai kontrol digunakan DNA nyamuk *Aedes togoi*, DNA nyamuk *Culex sp.*, dan DNA manusia serta 1 nyamuk negatif yang digerus dalam 50  $\mu$ l TE dan dididihkan selama 3 menit, kemudian diteteskan seluruh supernatannya.

- g. DNA pada membran didenaturasi dengan meletakkan membran di atas kertas filter yang sudah dibasahi dengan 0,5N NaOH selama 1 menit, kemudian dinetralisasi pada kertas filter yang dibasahi dengan 1M TRIS selama 1 menit dan 0,5M TRIS, 1,5M NaCl selama 1 menit.
- h. Membran dikeringkan dalam oven vakum selama 1 jam pada 80° C, bertujuan untuk menempel DNA pada membran.
- i. Prehibridisasi dilakukan pada suhu 37° C selama 2 jam dan dihibridisasi dengan pelacak DNA *fluorescein* (150ng/ml) selama semalam pada 37° C. Penandaan pelacak DNA dengan *fluorescein* dilakukan sesuai dengan protokol.
- j. Pencucian membran dan deteksi dengan reagensia *chemiluminescent* dilakukan sesuai dengan protokol kit (*ECL 3'-oligolabelling and detection system dari Amersham*).

Sumber:

1. Protokol PCR dari Perkin Elmer, Norwalk, CT.
2. Protokol dari ECL 3'-oligolabelling and detection system, Amersham.
3. Sambrook dkk., 1989.
4. Molecular Biology and Biotechnology, Summer Workshop 1991, Smith College, USA.

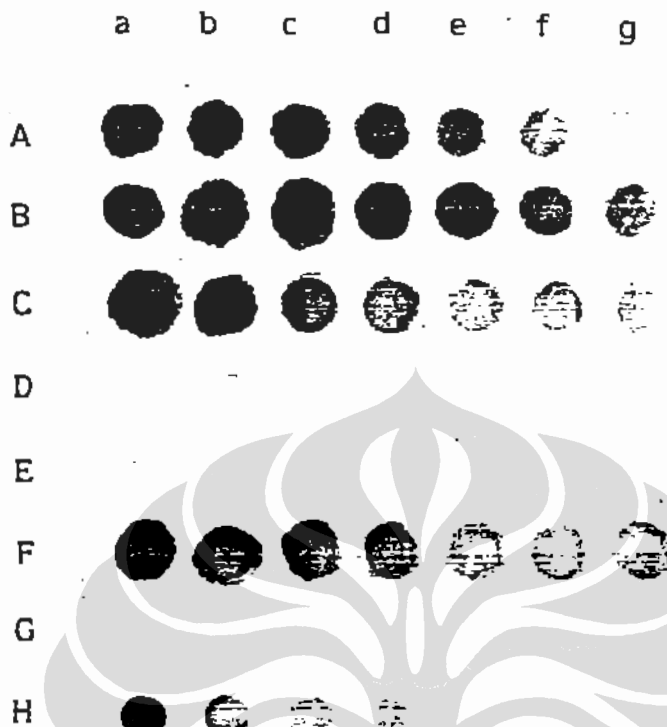
## BAB IV

### HASIL

#### A. Skrining pelacak DNA *B. malayi* (45-mer) - biotin pada parasit *B. malayi* dari berbagai daerah di Indonesia.

Pelacak DNA *B. malayi* (45-mer) yang ditandai kedua ujungnya dengan 45-mer uridin-biotin diselingi timidin berhibridisasi dengan parasit *B. malayi* dari berbagai daerah di Indonesia (*B. malayi* strain Kalimantan Timur, *B. malayi* strain Lampung, dan *B. malayi* strain Kendari) dengan sensitivitas sampai 100 pg. Pada DNA Buton tidak dilakukan pengenceran sampel. Hal ini disebabkan DNA yang tersedia terbatas. Hanya 1 *dot* dengan konsentrasi DNA kira-kira 25 pg telah dipakai pada tes dot blot ini.

Hasil tes dot blot menunjukkan adanya reaksi silang antara pelacak DNA *B. malayi* (45-mer) - biotin dengan DNA *B. pahangi*. Hasil hibridisasi pelacak DNA pada DNA *B. malayi* 0,1 ng lebih gelap dibandingkan dengan DNA *B. pahangi* 6,4 ng. Hal ini menunjukkan bahwa spesifisitas pelacak DNA pada parasit *B. malayi* 64 kali lebih besar dibandingkan dengan parasit *B. pahangi* (Gambar 11).



Gambar 11. Hasil hibridisasi pelacak DNA *Brugia malayi* (45-mer)-biotin (Williams dkk., 1991 sedang dicetak). Sampel DNA yang diuji yaitu: A. Hasil PCR DNA *B. malayi* strain Kendari, B. Hasil PCR DNA *B. malayi* strain Kalimantan Timur, C. Hasil PCR DNA *B. malayi* strain Lampung, D. 10ng dan 1ng DNA bakteriofag Lambda (kolom a dan b), 10ng dan 1ng DNA nyamuk *A. togoi* (kolom c dan d), 10ng dan 1ng DNA manusia (kolom e dan f), E. DNA *B. malayi* Buton (kolom g), F. DNA *B. malayi*, G. DNA *B. pahangi*, H. DNA plasmid pBma 68 Konsentrasi DNA.

Konsentrasi DNA yang digunakan adalah: a. 6,4ng, b. 3,2ng, c. 1,6ng, d. 0,8ng, e. 0,4ng, f. 0,2ng, g. 0,1ng

## B. Menentukan konsensus sikuen DNA berulang *B. malayi* di Indonesia

Beberapa klon yang mengandung DNA *B. malayi* Kendari, Bengkulu, Buton (DNA rekombinan) telah diperoleh pada skrining hasil kloning dengan pelacak DNA *B. malayi* pBma 68 yang ditandai radioaktif  $^{35}\text{S}$ . Klon DNA

rekombinan tersebut terdiri dari 3 klon *B. malayi* strain Kendari (zoofilik subperiodik), 6 klon *B. malayi* strain Bengkulu (zoofilik subperiodik), dan 4 klon *B. malayi* strain Buton (antropofilik). Kemudian semua klon positif tersebut disekuensing. Selanjutnya hasil sikuensing akan dianalisis untuk menentukan sikuen DNA berulang parasit *B. malayi* dari Indonesia.

**C. Membuat sikuen pelacak DNA *B. malayi* dari konsensus sikuen DNA berulang *B. malayi* di Indonesia.**

Hasil sikuen DNA berulang parasit *B. malayi* dari berbagai daerah di Indonesia (Kendari, Bengkulu, dan Buton) dianalisis dengan komputer, yang bertujuan untuk menentukan konsensus sikuen DNA berulang *B. malayi* Indonesia (Gambar 12). Kemudian hasil konsensus sikuen *B. malayi* Indonesia dibandingkan dengan konsensus sikuen DNA berulang *B. pahangi* untuk mengetahui persentase perbedaan basa-basa pada sikuen DNA berulang. Daerah yang paling banyak mempunyai perbedaan basa dipakai sebagai sikuen pelacak DNA (Gambar 13).

Ternyata daerah sikuen DNA berulang 238 - 263 (25 nukleotida) merupakan daerah yang paling banyak mempunyai perbedaan basa-basanya, yaitu 40% atau 10 nukleotida dalam 25 nukleotida. Persentase basa-basa GC (guanin dan sitosin) pada daerah tersebut juga tinggi yaitu 52% atau 13 basa GC dalam 25 nukleotida (Gambar 14). Oleh karena itu daerah 238 - 263 dipakai sebagai sikuen pelacak DNA.

**Sikuen DNA berulang *Brugia malayi* Kendari, Bengkulu dan Buton**

|             |                                  |    |    |    |
|-------------|----------------------------------|----|----|----|
|             | 0                                | 10 | 20 | 30 |
| <b>Ken8</b> | GCATAAATTC ATCAGCAAAA TTAATAAAAC |    |    |    |
| <b>Ken7</b> | GCATAAATTC ATCAGCAAAA TTAATAAAAC |    |    |    |
| <b>Ken6</b> | GCATAAATTC ATCAGCAAAA TTAATAAAAC |    |    |    |

|              |                                  |    |    |    |
|--------------|----------------------------------|----|----|----|
|              | 0                                | 10 | 20 | 30 |
| <b>Ben2</b>  | GCATAAATTC ATCAGCAAAA TTAATAAAAC |    |    |    |
| <b>Ben3</b>  | GCATAAATTC ATCAGCAAAA TTAATAAAAC |    |    |    |
| <b>Ben5</b>  | GCATAAATTC ATCAGCAAAA TTAATAAAAC |    |    |    |
| <b>Ben11</b> | GCATAAATTC ATCAGCAAAA TTAATAAAAC |    |    |    |
| <b>Ben17</b> | GCATAAATTC ATCAGCAAAA TTAATAAAAC |    |    |    |
| <b>Ben37</b> | GCATAAATTC ATCAGCAAAA TTAATAAAAC |    |    |    |

|               |                                  |    |    |    |
|---------------|----------------------------------|----|----|----|
|               | 0                                | 10 | 20 | 30 |
| <b>Ant8</b>   | GCATAAATTC ATCAGCAAAA TTAATAAAAC |    |    |    |
| <b>Ant9 B</b> | GCATAAATTC ATCAGCAAAA TTAATAAAAC |    |    |    |
| <b>Ant10</b>  | GCATAAATTC ATCAGCAAAA TTAATAAAAC |    |    |    |
| <b>Ant13</b>  | GCATAAATTC ATCAGCAAAA TTAATAAAAC |    |    |    |

|              |                                  |    |    |    |
|--------------|----------------------------------|----|----|----|
|              | 0                                | 10 | 20 | 30 |
| <b>BMCON</b> | GCATAAATTC ATCAGCAAAA TTAATAAAAC |    |    |    |

|             |                                  |    |    |
|-------------|----------------------------------|----|----|
|             | 40                               | 50 | 60 |
| <b>Ken8</b> | TTTCAATTAA TCATGATTTT AATTCAATTC |    |    |
| <b>Ken7</b> | TTTCAATTAA TCATGATTTT AATTCAATTT |    |    |
| <b>Ken6</b> | TTTCAATTAA TCATGATTTT AATTCAATTT |    |    |

|              |                                  |    |    |
|--------------|----------------------------------|----|----|
|              | 40                               | 50 | 60 |
| <b>Ben2</b>  | TTTCAATTAA TCATGATTTT AATTCAATTT |    |    |
| <b>Ben3</b>  | TTTCAATTAA TCATGATTTT AATTCAATTT |    |    |
| <b>Ben5</b>  | TTTCAATTAA TCATGATTTT AATTCAATTT |    |    |
| <b>Ben11</b> | TTTCAATTAA TCATGATTTT AATTCAATTT |    |    |
| <b>Ben17</b> | TTTCAATTAA TCATGATTTT AATTCAATTT |    |    |
| <b>Ben37</b> | TTTCAATTAA TCATGATTTT AATTCAATTT |    |    |

|               |                                  |    |    |
|---------------|----------------------------------|----|----|
|               | 40                               | 50 | 60 |
| <b>Ant8</b>   | TTTCAATTAA TCATGATTTT AATTCAATTT |    |    |
| <b>Ant9 B</b> | CTTCAATTAA TCGTGATTTT AATTCAATTT |    |    |
| <b>Ant10</b>  | TTTCAATTAA TCATGATTTT AATTCAATTT |    |    |
| <b>Ant13</b>  | TTTCAATTAA TCATGATTTT AATACAATTT |    |    |

|              |                                  |    |    |
|--------------|----------------------------------|----|----|
|              | 40                               | 50 | 60 |
| <b>BMCON</b> | TTTCAATTAA CAATTAATCA TGATTTTAAT |    |    |

BM CON = konsensus sikuen DNA *Brugia malayi*

|        |            |                 |               |
|--------|------------|-----------------|---------------|
| Ken8   | AAGAATTTAA | ATT A ??? ???   | ?? ?? CA?? TT |
| Ken7   | AAGAATTTAA | ATTAAATTTA      | AATTCAAATT    |
| Ken6   | AAGAATTTAA | ATT ??? ????    | ??? TT?? ?AT  |
| Ben2   | AAGAATTTAA | ATTAAATTTA      | AATTCAAATT    |
| Ben3   | TAGAATTTAA | ATT ??? ? ? ?   | ?? ? ? AAATT  |
| Ben5   | AAGAATTTAA | ATT ??? ? ? ?   | ?? ? ? ACATT  |
| Ben11  | AAGAATTTAA | ATTAAA ? ? ? ?  | ?? ? ? AAATT  |
| Ben17  | AAGAATTTAA | ATTAAA ? ? ? ?  | ?? ? ? AAATT  |
| Ben37  | AAGAATTTAA | ATTAAATTTA      | AATTCAAATT    |
| Ant8   | AAGAATTTAA | ATTAAATTTA      | AATTCAAATT    |
| Ant9 B | AAGAATTTAA | ATTAAATTTT      | AATTCAAATT    |
| Ant10  | AAGAATTTAA | ATTAAATTTA      | AATTCAAATT    |
| Ant13  | TAGAATTTAA | ATT ??? ? ? ? ? | ?? ? ? AAATT  |
| BMCON  | AAGAATTTAA | ATTAAATTTA      | AATTCAAATT    |
| Ken8   | GAAATTTTGA | ATTTTTCAA       | AATTTTAAAA    |
| Ken7   | TAAATTTTGA | ATTTTTTAAA      | AATTTTAAAA    |
| Ken6   | TAAATTTTGA | ATTTTTTAAA      | AATTTTAAAA    |
| Ben2   | TAAATTTTGA | ATTTTTTAAA      | AATTTTAAAA    |
| Ben3   | TAAATTTTGA | ATTTTTTAAA      | A?? ? ? ? ? ? |
| Ben5   | TAAATTTTGA | ATTTTTTAAA      | AATTTTAAAA    |
| Ben11  | TAAATTTTGA | ATTTTTTAAA      | AATTTTAAAA    |
| Ben17  | TAAATTTTGA | ATTTTTTAAA      | AATTTTAAAA    |
| Ben37  | TAAATTTTGA | ATTTTTTAAA      | AATTTTAAAA    |
| Ant8   | TAAATTTTGA | ATTTTTTAAA      | AATTTTAAAA    |
| Ant9 B | TAAATTTTGA | ATTTTTTAAA      | AATTTTAAA     |
| Ant10  | TAAATTTTGA | ATTTTTTAAA      | AAATTTAAAA    |
| Ant13  | TAAATTTTGA | ATT ? ? ? ? ? ? | ? ? TTTTAAAA  |
| BMCON  | TAAATTTTGA | ATTTTTTAAA      | AATTTTAAAA    |
| Ken8   | TTTGTTGTAG | TTTTCTTACA      | TTAGACAAGG    |
| Ken7   | TTTGTTATAG | TTTTCTTACA      | TTAGACAAGG    |
| Ken6   | TTTGTTGTGG | TTTTCTTACA      | TTAGACAAGG    |
| Ben2   | TTTGTTATAG | TTTTCTTACA      | TTAGACAAGG    |
| Ben3   | TTTGTTATAG | TTTTCTTACA      | TTAGACAAGG    |
| Ben5   | TTTGTTGTGG | TTTTCTTACA      | TTAGACAAGG    |
| Ben11  | TTTGTTATAG | TTTTCTTACA      | TTAGACAAGG    |
| Ben17  | TTTGTTATAG | TTTTCTTACA      | TTAGACAAGG    |
| Ben37  | TTTGTTATAG | TTTTCTTACA      | TTAGACAAGG    |
| Ant8   | TTTGTTATAG | TTTTCTTACA      | TTTGACAAGG    |
| Ant9 B | ATTGTTATAG | TTTTCTTACA      | TTATACAAGG    |
| Ant10  | TTTGTTATAG | TTTTCTTACA      | TTAGACAAGG    |
| Ant13  | TTTGTTATAG | TTTTCTTACA      | TTAGACAAGG    |
| BMCON  | TTTGTTATAG | TTTTCTTACA      | TTAGACAAGG    |

|      |                                  |
|------|----------------------------------|
| Ken8 | AAATTGGTTC TAATTTATCA ATTTTAATTT |
| Ken7 | AAATTGGTTC CAATTTATCA ATTTCAATTT |
| Ken6 | AAATTGGTTC TAATTTATCA ATTTTAATTT |

|       |                                  |
|-------|----------------------------------|
| Ben2  | AAATTGGTTC TAATTTATCA ATTTTAATTT |
| Ben3  | AAATTGGTTC TAATTTATCA ATTTTAATTT |
| Ben5  | AAATTGGTTC TAATTTATCA ATTCTAATGT |
| Ben11 | AAATTGGTTC TAATTTATCA ATTTTAATTT |
| Ben17 | AAATTGGTTC TAATTTATCA ATTTTAATTT |
| Ben37 | AAATTGGTTC TAATTTATCA ATTTTAATTT |

|        |                                  |
|--------|----------------------------------|
| Ant8   | AAATTGGTTC TAATTTATCA ATTTTAATTC |
| Ant9 B | AAATTGGTTC TAATTTATCA TTTTAAATTT |
| Ant10  | AAATTGGTTC TAATTTATCA ATTTTAATTT |
| Ant13  | AAATTGGTTC TAATTTATCA ATTCTAATTT |

|       |                                  |
|-------|----------------------------------|
| BMCON | AAATTGGTTC TAATTTATCA ATTTTAATTT |
|-------|----------------------------------|

|      |                                  |
|------|----------------------------------|
| Ken8 | TAATTAAGTG CCAAAACTAC TAAAAAAAGC |
| Ken7 | TAATTAAGTG CCAAAACTGC TAAAAAAAGC |
| Ken6 | TAATTAAGTG CCAAAACCAC TAAAAAAAGC |

|       |                                  |
|-------|----------------------------------|
| Ben2  | TAATTAAGTG CCAAAACTAC TAAAAAAAGC |
| Ben3  | TAATTAAGTG CCAAAACTAC TAAAAAAAGC |
| Ben5  | TTATTAAGTG CCAAAACTAC TAAAAAAAGC |
| Ben11 | TAATTAAGTG CCAAAACTAC TAAAAAAAGC |
| Ben17 | TAATTAAGTG CCAAAACTAC TAAAAAAAGC |
| Ben37 | TAATTAAGTG CCAAAACTAC TAAAAAAAGC |

|        |                                  |
|--------|----------------------------------|
| Ant8   | TAGTTAAGTG CCAAAACTAC TAAAAAAAGC |
| Ant9 B | TAATTAAGTG CCAAAACAGC TAAAAAAAGC |
| Ant10  | TAATTAAGTG CCAAAACTGC TAAAAAAAGC |
| Ant13  | TAATTAAGTG CCAAAACTAC TAAAAAAAGC |

|       |                                  |
|-------|----------------------------------|
| BMCON | TAATTAAGTG CCAAAACTAC TAAAAAAAGC |
|-------|----------------------------------|

|      |                                  |
|------|----------------------------------|
| Ken8 | TNTATTTTGA AATTAATTGA CTATGTTACG |
| Ken7 | TNTATTTTGA ACCTAATTGA CCATGTTATG |
| Ken6 | TNTATTTTGA AATTAATTGA CTATGTTACG |

|       |                                  |
|-------|----------------------------------|
| Ben2  | T?TATTTTGA AGTTAATTGA CTATGTTACG |
| Ben3  | T?TATTTTGA AATTAATTGA CTATGTTACG |
| Ben5  | T?TATTTTGA AATTAATTGA CTATGTTACG |
| Ben11 | T?TATTTTGA AGTTAATTGA CTATGTTACG |
| Ben17 | T?TATTTTGA AGTTAATTGA CTATGTTACG |
| Ben37 | T?TATTTTGA AGTTAATTGA CTATGTTACG |

|        |                                  |
|--------|----------------------------------|
| Ant8   | T?TATTTTGA AATTAATTGA CTATGTTACG |
| Ant9 B | T?TATTTTGA ACCTAATTGA CTATGTTACG |
| Ant10  | T?TATTTTGA ACCTAATTGA CTAAGTTACG |
| Ant13  | T?AATTTTGA AATTAATTGA CTATGTTACG |

|       |                                  |
|-------|----------------------------------|
| BMCON | T?TATTTTGA AATTAATTGA CTATGTTACG |
|-------|----------------------------------|



|        |                                  |
|--------|----------------------------------|
| Ken8   | TGAACTGTAC CAGTGCTGGT CGTATATTGC |
| Ken7   | TGCATTGTAC CAGTGCTGGT CGTATATTGC |
| Ken6   | TGAACTGTAC CAGTGCTGGT CGTATATTGA |
| Ben2   | TGAACTGTAC CAGTGCTGGT CGTATATTGC |
| Ben3   | TGAACTGTAC CAGTGCTGGT CATATATTGC |
| Ben5   | TGAACTGTAC CAGTGCTGGT CGTATATTGC |
| Ben11  | TGAACTGTAC CAGTGCTGGT CGTATATTGC |
| Ben17  | TGAACTGTAC CAGTGCTGGT CGTATATTGC |
| Ben37  | TGAACTGTAC CAGTGCTGGT CGTATATTGC |
| Ant8   | TGCATTGTAC CAGTGCTGGT CGTATATTGC |
| Ant9 B | TGCATTGTAC CAGTGCTGGT CGTACATTGC |
| Ant10  | TGCATTGTAC CAGTGCTGGT CGTACATTGC |
| Ant13  | TGAACTGTAC CAGTGCTGGA CGTATATTGC |
| BMCON  | TGAACTGTAC CAGTGCTGGT CGTATATTGC |
| Ken8   | GTTGTCATTT TATAGTTTAA ATATTAAAAT |
| Ken7   | GTTGTTATTT TATAGTTTAA ATATTAAAAT |
| Ken6   | GTCGTCATTT TATAGTTTAA ATATTAAAAT |
| Ben2   | GTTGTCATTT TATAGTTTAA ATATTAAAAT |
| Ben3   | GTCGTCATTT TATAGTTTAA ATATTAAAAT |
| Ben5   | GTCGTCATTT TATAGTTTAA ATATTAAAAT |
| Ben11  | GTTGTCATTT TATAGTTTAA ATATTAAAAT |
| Ben17  | GTTGTCATTT TATAGTTTAA ATATTAAAAT |
| Ben37  | GTTGTCATTT TATAGTTTAA ATATTAAAAT |
| Ant8   | GTTGTCATTT TATAGTTTAA ATATTAAAAT |
| Ant9 B | GCTGTCATTT TATAGTTTAA ATATTAAAAT |
| Ant10  | GCTGTCATTT TATAGTTTAA ATATTAAAAT |
| Ant13  | GTCGTCATTT TATAGTTTAA ATATTAAAAT |
| BMCON  | GTTGTCATTT TATAGTTTAA ATATTAAAAT |
| Ken8   | ACGCTTTTGT AATTAAGTTT TGC        |
| Ken7   | ACGCTTTTGT AATTAAGTTT TGC        |
| Ken6   | ACGCTTTTGT AATTAAGTTT TGC        |
| Ben2   | ACGCTTTTGT AATTAAGTTT TGC        |
| Ben3   | ACGCTTTTGT AATTAAGTTT TGC        |
| Ben5   | ACGCTTTTGT AATTAAGTTT TGC        |
| Ben11  | ACGCTTTTGT AATTAAGTTT TGC        |
| Ben17  | ACGCTTTTGT AATTAAGTTT TGC        |
| Ben37  | ACGCTTTTGT AATTAAGTTT TGC        |
| Ant8   | ACGCTTTTGT AATTAAGTTT TGC        |
| Ant9 B | ACGCTTTTGT AATTAAGTTT TGC        |
| Ant10  | ACGCTTTTGT AATTAAGTTT TGC        |
| Ant13  | ACGCTTTTGT AATTAAGTTT TGC        |
| BM CON | ACGCTTTTGT AATTAAGTTT TGC        |

Gambar 12. Sikuen DNA berulang *B. malayi* strain Kendari, strain Bengkulu dan strain Buton. BM Con: konsensus sikuen DNA berulang *B. malayi*

|            |               |             |                             |
|------------|---------------|-------------|-----------------------------|
| GCATAAATTC | ATCAGCAAAA    | TTAATAAAAC  |                             |
| GCAAAAATTC | ATCAGCAAAA    | TTAATAAAAC  |                             |
| TTTCAATTAA | TCATGATTTT    | AATTCAAATT  |                             |
| TTTCAATTAA | TAATGGTTTT    | AATTCAAATT  |                             |
| AAGAATTTAA | ATTAAATTTA    | AATTCAAATT  |                             |
| AAGAATTTAA | ATTAAATTTA    | AATTCAAATT  |                             |
| TAAATTTTGA | ATTTTTTAAA    | AATTTTAAAA  |                             |
| TAAATTTTGA | ATTTTTTAAA    | AATCTTAAAA  |                             |
| TTTGTTATAG | TTTTCTTACA    | TTAGACAAGG  |                             |
| TTTGTTATAG | TTTTCTTACA    | TTTAACATGA  |                             |
| AAATTGGTTC | TAATTTATCA    | ATTTTAATTT  |                             |
| AAATTGGTTC | TAAATTATCA    | ATTTTAATTT  |                             |
| TAATTAAGTG | CCAAAACACTAC  | TAAAAAAAGC  |                             |
| TAATTAAGTG | TCAAAAACACTGC | TAAAAAATAGC |                             |
| T TATTTTGA | AATTAATTGA    | CTATGTTACG  |                             |
| AATATTTTGA | AGTTAATTCA    | TTATGTTTAA  |                             |
| TGAATTGTAC | CAGTGCTGGT    | CGTATATTGC  |                             |
| TGCATTGCAC | TGGGGCGGGT    | CATATATGGT  |                             |
| GTTGTCATT  | TATAGTTTAA    | ATATTAAAAT  |                             |
| TGTTGTCATT | TATAGTTTAA    | ATATTAAAAT  |                             |
| ACGCTTTTGT | AATTAAGTTT    | TGC         | ..... <i>Brugia malayi</i>  |
| ATGCTTTTAT | AATTAAGTTT    | TGC         | ..... <i>Brugia pahangi</i> |

\* Perbedaan basa antara ke 2 konsensus sikuen DNA berulang

Jumlah basa yang berbeda = 34

% perbedaan antara ke 2 konsensus sikuen DNA berulang = 11%

Gambar 13. Hasil perbandingan konsensus sikuen DNA berulang *Brugia malayi* dan *Brugia pahangi*. Perbedaan basa antara ke 2 konsensus ditandai dengan bintang sedangkan daerah yang digunakan untuk membuat pelacak DNA oligonukleotida *Brugia malayi* ditandai dimulai dari nomor 238-263.

5' ACGTGAATTG TACCAGTGCT GGTCG 3'  
 3' TGCACCTAAC ATGGTCACGA CCAGC 5'

Pelacak DNA *Brugia malayi* 25-mer  
 Persentase perbedaan basa (10/25) = 40%  
 Persentase GC (13/25) = 52%

Gambar 14. Sikuen pelacak DNA *Brugia malayi* 25 nukleotida.

Analisis 192 enzim pemotong DNA (lampiran 11) dilakukan dengan komputer untuk menentukan enzim yang dapat memotong sikuen DNA berulang pada daerah 238 - 263 (Tabel III). Hasil analisis menunjukkan bahwa enzim *Mae 2* dapat memotong pada daerah 238 dan tidak ada enzim yang dapat digunakan untuk memotong daerah 263 pada DNA berulang.

Tabel III

HASIL ANALISIS 192 Enzim PEMOTONG DNA PADA SIKUEN  
 DNA BERULANG *Brugia malayi*

| Enzim       | Tempat | Daerah |    |    |     |     |     |    |     |
|-------------|--------|--------|----|----|-----|-----|-----|----|-----|
| Aha3        | 6      | 68     | 79 | 91 | 107 | 116 |     |    | 228 |
| AluI        | 1      | 209    |    |    |     |     |     |    |     |
| Asel        | 3      | 21     | 37 |    | 223 |     |     |    |     |
| BspHI       | 1      | 41     |    |    |     |     |     |    |     |
| DraI        | 6      | 68     | 79 |    | 91  | 107 | 116 |    | 228 |
| EcoRI*      | 23     | 5      | 18 |    | 34  | 50  | 55  | 63 | 69  |
| Hind3       | 1      | 207    |    |    |     |     |     |    |     |
| <b>Mae2</b> | 1      | 238    |    |    |     |     |     |    |     |
| Mae3        | 1      | 234    |    |    |     |     |     |    |     |
| MseI        | 17     | 21     | 37 |    | 49  | 59  | 67  | 72 | 78  |
| Nla3        | 1      | 45     |    |    |     |     |     |    |     |
| PacI        | 1      | 184    |    |    |     |     |     |    |     |
| RsaI        | 1      | 248    |    |    |     |     |     |    |     |
| SspI        | 1      | 292    |    |    |     |     |     |    |     |

Oleh karena itu pelacak DNA 25-mer tersebut disintesis dengan *DNA synthesizer*.

**D. Menghasilkan pelacak DNA spesifik untuk *B. malayi* dalam jumlah yang cukup.**

Fragmen DNA (25-mer) terlalu kecil untuk menjadi pelacak DNA yang efektif dalam plasmid bluescript II (2961 bp). Oleh karena itu fragmen-fragmen tersebut harus disambung dahulu menjadi suatu rantai yang lebih panjang. Untuk menghindari penempelan pelacak DNA dengan orientasi yang berlawanan maka dibuat linker tambahan 3 nukleotida pada ujung 5' dan 3' fragmen tersebut sehingga panjang total pelacak DNA adalah 31 nukleotida. Linker tersebut merupakan suatu sikuen DNA yang dapat dipotong dengan enzim pemotong DNA tertentu, yaitu *Nde* I dan *Nsi* I jika fragmen tersambung pada orientasi yang berlawanan (Gambar 15).

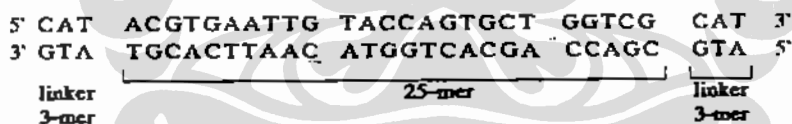
Rantai panjang fragmen pelacak DNA disambung ke dalam DNA plasmid untuk membentuk DNA rekombinan. Pemotongan enzim *Nde* I dan *Nsi* I dilakukan pada DNA rekombinan untuk menghindari fragmen pelacak DNA yang menempel pada orientasi berlawanan. Pelacak DNA yang saling menempel pada orientasi berlawanan satu dengan lainnya di dalam DNA rekombinan akan terpotong oleh enzim *Nde* I dan *Nsi* I sehingga terbentuk DNA rekombinan yang linier. Bentuk DNA rekombinan linier ini tidak akan tertransformasi ke dalam bakteri *E. coli*, hanya DNA rekombinan yang mempunyai pelacak DNA-pelacak DNA yang menempel pada orientasi sama (bentuk tetap sirkular) yang akan ditransformasikan ke dalam sel bakteri *E. coli*. Kemudian hasil transformasi ditumbuhkan pada medium medium LBA (*Luria bertani ampicillin*) plate. Pada medium tersebut sel bakteri yang mempunyai plasmid akan tumbuh, karena plasmid punya gen resisten ampicillin. Dan koloni yang terbentuk akan berwarna putih karena plasmid mempunyai gen Z. .

Hasil analisis penyambungan fragmen DNA pada elektroforesis menunjukkan

bahwa DNA terpanjang berukuran kira-kira 160 bp (Gambar 16). Kemudian DNA tersebut dipisahkan dari DNA yang lebih kecil ukuran dengan menggunakan *centricon-100 microconcentrator*, lalu diklon ke dalam *plasmid bluescript II*. *Centricon-100 microconcentrator* dapat memisahkan DNA dengan berat molekul 100.000 atau sama dengan DNA rantai ganda dengan panjang 153 bp (berat molekul 1 pasangan basa adalah 650) dari DNA lainnya yang berukuran lebih kecil.

Sembilan klon positif didapat pada skrining klon dengan pelacak DNA total genom *B. malayi* yang ditandai dengan  $^{35}\text{S}$ . Kemudian dilakukan tes dot blot dengan pelacak DNA total genom DNA *B. malayi* yang ditandai dengan  $^{35}\text{S}$  untuk menentukan klon yang mempunyai pelacak DNA paling panjang (makin hitam dot maka makin panjang pelacak DNA yang ada di dalam plasmid). Ternyata klon nomor 9 memberikan *signal* paling hitam pada tes dot blot (Gambar 17).

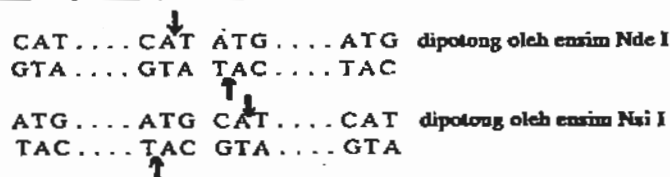
3 nukleotida tambahan pada ujung 5' dan 3' dari pelacak DNA B. malayi



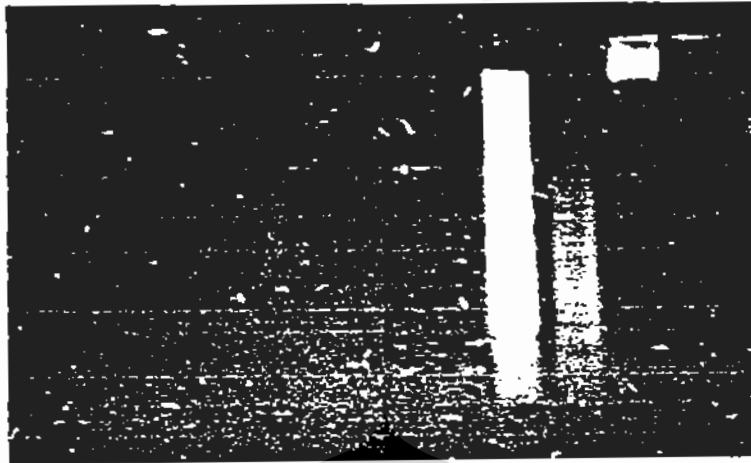
25 mer B. malayi probe yang tersambung pada orientasi yang sama:



2 kemungkinan pelacak DNA 25 mer B. malayi tersambung pada orientasi yang berlawanan:



Gambar 15. *Linker* tambahan 3 nukleotida pada kedua ujung pelacak DNA oligonukleotida menjadikan panjang pelacak DNA secara keseluruhan adalah 31 nukleotida. *Linker* berfungsi untuk mencegah ligasi pelacak DNA pada orientasi yang berlawanan. Bila pelacak DNA yang terligasi pada orientasi berlawanan maka akan dipotong oleh enzim *Nde I* dan *Nsi I* pada bagian linker tersebut.

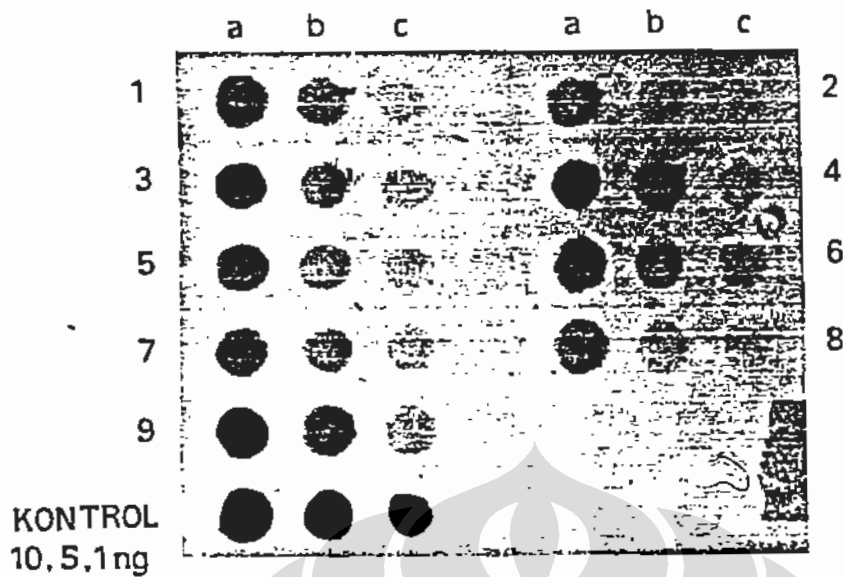


Gambar 16. Hasil elektroforesis ligasi pelacak DNA *Brugia malayi* 31 nukleotida pada 1% gel agarose/2% Nusieve agarose selama 2 jam pada 50 volt dalam 1X TBE. Baris 1. DNA pBR322-Msp I dengan panjang fragmen DNA dari atas ke bawah): 622bp, 527bp, 404bp, 307bp, 242bp, 238bp, 160bp, 110bp, dan <90bp. Baris 2. Hasil ligasi pelacak DNA. Baris 3. DNA bakteriofag lambda-Hind III dengan panjang fragmen DNA: 23.130bp-2.027bp).

Hasil analisis sikuen DNA dari 6 klon (yang terdiri dari klon nomor 1,3,5,6,7 dan 9) menunjukkan bahwa klon nomor 9 memang mempunyai pelacak DNA yang paling panjang, yaitu 153 bp yang terdiri dari 6 fragmen 31-mer yang tergabung menjadi satu. Semua fragmen saling menempel pada orientasi yang sama, tetapi ada delesi beberapa nukleotida pada fragmen ke 4 dan ke 6. Fragmen ke 4 hanya mempunyai 19 nukleotida dan fragmen ke 6 mempunyai 10 nukleotida (Gambar 18). Delesi tersebut mungkin disebabkan oleh hasil sintesis nukleotida yang tidak lengkap.

Kemudian klon 9 tersebut dipurifikasi pada medium LBA plate dan ditumbuhkan dalam medium cair LBA untuk diisolasi DNA rekombinan yang selanjutnya akan digunakan sebagai pelacak DNA untuk parasit filaria *B. malayi*. Pelacak DNA ini dinamai pelacak DNA *B. malayi* 153.

Dari 250 ml kultur klon 9 diperoleh DNA rekombinan kira-kira sejumlah 5  $\mu$ g.



Gambar 17. Hasil hibridisasi pelacak DNA total genom *B. malayi*-<sup>35</sup>S terhadap klon DNA rekombinan pada tes dot blot. Kolom a-c menunjukkan konsentrasi DNA pada *dot*: a. stok DNA plasmid, b. pengenceran 1:5 DNA plasmid, c. pengenceran 1:10 DNA plasmid. Angka 1-9 menunjukkan nomor klon.

```

1          10          20          30
TACGCCAAGC GCGCAATTAA CCCTCACTAA
          40          50          60
AGGGAACAAA AGCTGGAGCT CCACCGCGGT
          70          80          90
GGCGGCCGCT CTAGAACTAG TGG ATGCGAC
          100         110         120
CAGCACTGGT ACAATTCACG TATGATGCGA
          130         140         150
CCAGCACTGG TACAATTCAC GTATGATGCG
          160         170         180
ACCAGCACTG GTACAATTCA CGTATGATGC
          190         200         210
GACCAGCACT GGTACATGCG ACCAGCACTG
          220         230         240
GTACAATTCA CGTATGATGC GACCAG GGCT
          250         260         270
GCAGGAATTC GATATCAAGC TTATCGATAC
          280         290
CGTCGACCTC GAGGGGGGGG
  
```

mempunyai sikuen pelacak DNA 153 bp (daerah 84–236)

Gambar 18. Sikuen DNA klon 9. Panjang dari sikuen pelacak DNA pada klon 9 adalah 153 bp, terdiri dari 6 kopi dari pelacak DNA 31-mer, dalam plasmid. Semua kopi terligasi pada orientasi yang sama. Pelacak DNA *B. malayi* yang baru ini diberi nama pelacak DNA *B. malayi* 153-mer.

E. Menentukan cara terbaik untuk menandai pelacak DNA *B. malayi* 153 dengan molekul non-radioaktif.

Pada penelitian penandaan pelacak DNA *B. malayi* 153 dengan *digoxigenin* diketahui bahwa waktu yang diperlukan untuk penandaan pelacak DNA dan tahap purifikasinya adalah sekitar 4 jam. Pelacak DNA *B. malayi* 153 yang ditandai dengan *digoxigenin* memberikan hasil hibridisasi yang tidak bersih pada membran nylon karena memberikan latar belakang yang berupa titik-titik hitam sehingga menyulitkan pembacaan hasil sedangkan pada membran nitroselulosa, pelacak DNA tersebut hanya dapat mendeteksi sampel dari hasil PCR pelacak DNA itu sendiri dari konsentrasi 6,4 ng sampai 1,6 ng dan tidak memberikan *signal* pada DNA *B. malayi*.

Penandaan pelacak DNA *B. malayi* 153 dengan *fluorescein* memakai *ECL 3'-oligolabelling and detection system* lebih cepat dibandingkan dengan *digoxigenin* memakai *Dig DNA labelling and detection kit*, yaitu hanya memerlukan waktu 1 jam pada suhu 37°C dan tidak memerlukan purifikasi untuk memurnikan pelacak DNA yang sudah tertandai (sesuai dengan protokol dari kit). Pelacak DNA *B. malayi* 153 yang sudah tertandai dapat diketahui dengan cara deteksi yang sangat cepat dalam waktu kira-kira 30 menit (sesuai protokol), sehingga keseluruhan waktu yang dibutuhkan untuk penandaan dan deteksi pelacak DNA *fluorescein* adalah 1½ jam.

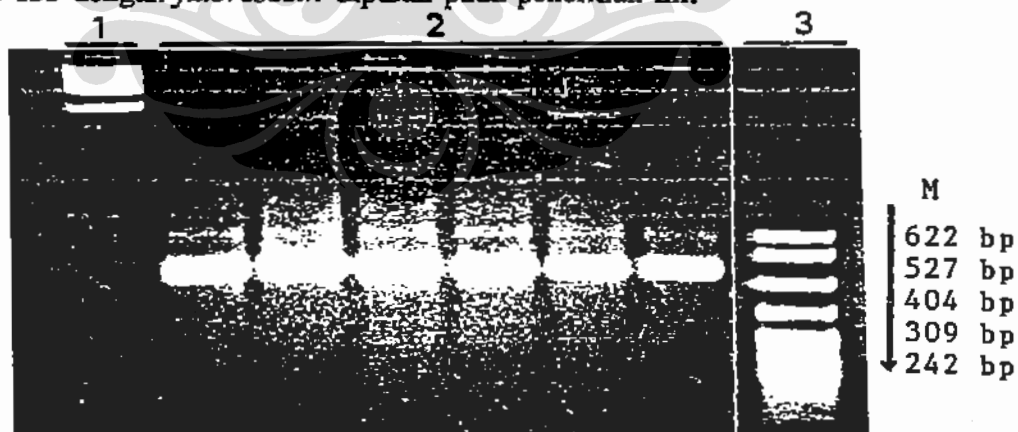
Sistem penandaan pelacak dengan *fluorescein* pada ujung 3' dibuat khusus untuk menandai pelacak DNA yang berukuran  $\leq 50$  nukleotida. Untuk mendapatkan fragmen pelacak DNA *B. malayi* 153 maka dilakukan pemotongan



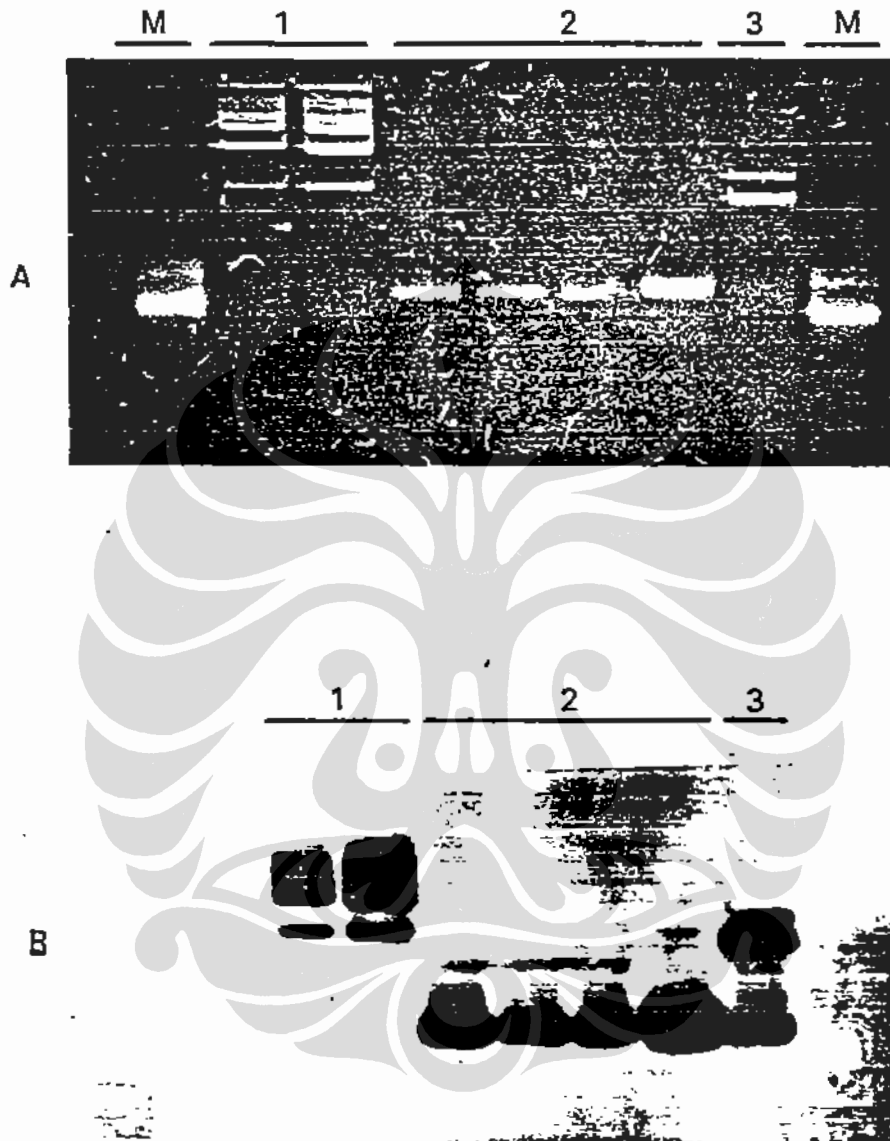
DNA rekombinan klon 9 dengan enzim *Xba* I dan *Eco* RV dan PCR-DNA rekombinan klon 9. Fragmen pelacak DNA *B. malayi* 153 yang berukuran 290 bp didapat dari pemotongan DNA rekombinan klon 9 dengan enzim *Xba* I dan *Eco* RV.

Pada hasil analisis PCR pada gel agarose, diketahui bahwa ukuran fragmen yang diperoleh dari reaksi PCR sekitar 440 bp (Gambar 19). Kemudian hasil PCR ini dianalisis pada *southern blot* yang dihibridisasi dengan pelacak DNA *B. malayi* 31-mer yang ditandai pada ujung 3' dengan *fluorescein*. Hasil *southern blot* menunjukkan bahwa DNA hasil PCR berhibridisasi dengan pelacak DNA *B. malayi* 31-mer. Hal ini menunjukkan bahwa PCR memperbanyak DNA pada sikuen yang spesifik yaitu sikuen pelacak DNA *B. malayi* 153 bp (Gambar 20).

Kedua fragmen, yaitu hasil pemotongan dengan 2 enzim dan hasil PCR kemudian ditandai dengan *fluorescein* pada ujung 3' dan dicoba pada tes dot blot. Pelacak DNA *fluorescein* memberikan hasil hibridisasi yang bersih (tidak ada *background*) pada hasil tes dot blot. Oleh karena itu penandaan pelacak DNA *B. malayi* 153 dengan *fluorescein* dipakai pada penelitian ini.



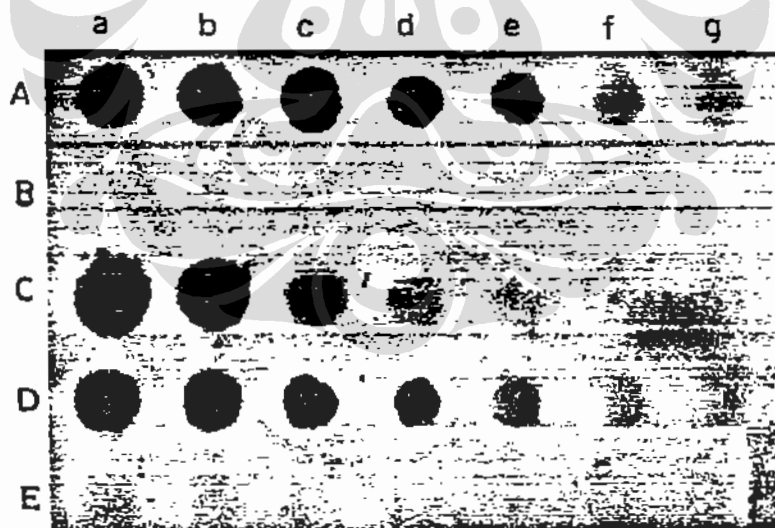
Gambar 19. Hasil PCR pelacak DNA *B. malayi* 153 pada elektroforesis 1,8% gel agarose, 60 volt selama 1 jam. Ukuran dari fragmen hasil PCR adalah 440 bp, yang terletak di antara fragmen kedua dan ketiga dari DNA marker pBR 322-*Msp* I. 1. Pelacak DNA *B. malayi* 153-mer. 2. Hasil PCR DNA pelacak *B. malayi* 153-mer. 3. DNA plasmid pBR 322-*Msp* I



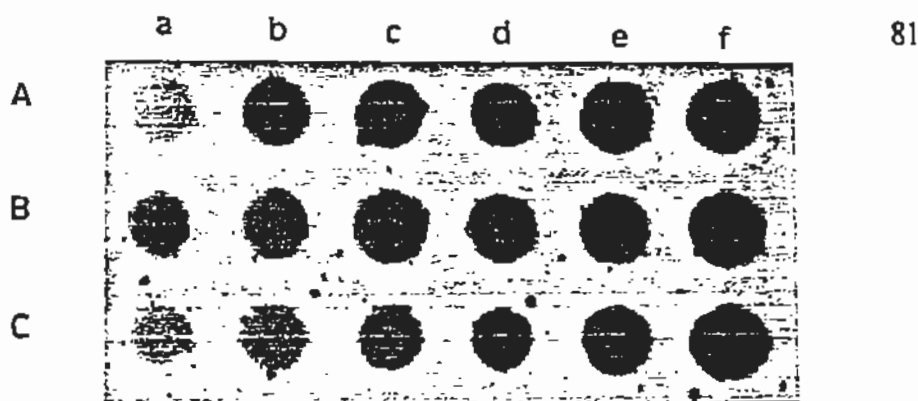
Gambar 20. Analisis *southern blot* hasil PCR DNA pelacak *B. malayi* 153.  
 A. Hasil elektroforesis pada 1,8% gel agarose, 60 volt selama 1 jam. 1. DNA pelacak *B. malayi* 153-mer, 2. 50ng, 100ng, 150ng dan 200ng hasil PCR DNA pelacak *B. malayi* 153-mer, 3. DNA pelacak *B. malayi*-Hind III, M. DNA marker pBR 322-Msp I.  
 B. Hasil *southern blot* pada membran nitroselulosa yang dihibridisasi pelacak DNA *B. malayi* (31-mer)-fluorescein.

F. Menentukan spesifisitas dan sensitivitas pelacak DNA *B. malayi* 153-*fluorescein* pada tes dot blot.

Untuk menentukan spesifisitas pelacak DNA *B. malayi* 153 dilakukan hibridisasi antara pelacak DNA *B. malayi* 153 dengan DNA *B. pahangi* dan DNA *B. malayi* strain Kalimantan Timur (zoofilik aperiodik), strain Lampung (zoofilik subperiodik), dan strain Kendari (zoofilik subperiodik). Hasil hibridisasi menunjukkan bahwa pelacak DNA *B. malayi* 153 tidak bereaksi silang dengan DNA *B. pahangi* (Gambar 21) dan dapat mendeteksi DNA semua strain *B. malayi* yang diuji. Penentuan sensitivitas pelacak DNA *B. malayi* 153 dilakukan dengan melakukan pengenceran konsentrasi DNA *B. malayi* dari 6,4 ng sampai 0,1 ng. Hasil tes dot blot menunjukkan bahwa pelacak DNA *B. malayi* 153 dapat mendeteksi DNA parasit *B. malayi* sampai konsentrasi DNA 0,1 ng (setengah DNA mikrofilaria (Gambar 22)).



Gambar 21. Hasil spesifisitas dan sensitivitas pelacak DNA *B. malayi* 153-*fluorescein* pada tes dot blot. Sampel DNA yang diuji yaitu: A. DNA *B. malayi*, B. DNA *B. pahangi*, C. DNA pelacak *B. malayi* 153-mer, D. hasil PCR DNA pelacak *B. malayi*, E. DNA bakteriofag Lambda. Konsentrasi DNA adalah: a. 6,4ng, b. 3,2ng, c. 1,6ng, d. 0,8ng, e. 0,4ng, f. 0,2ng, dan g. 0,1ng.



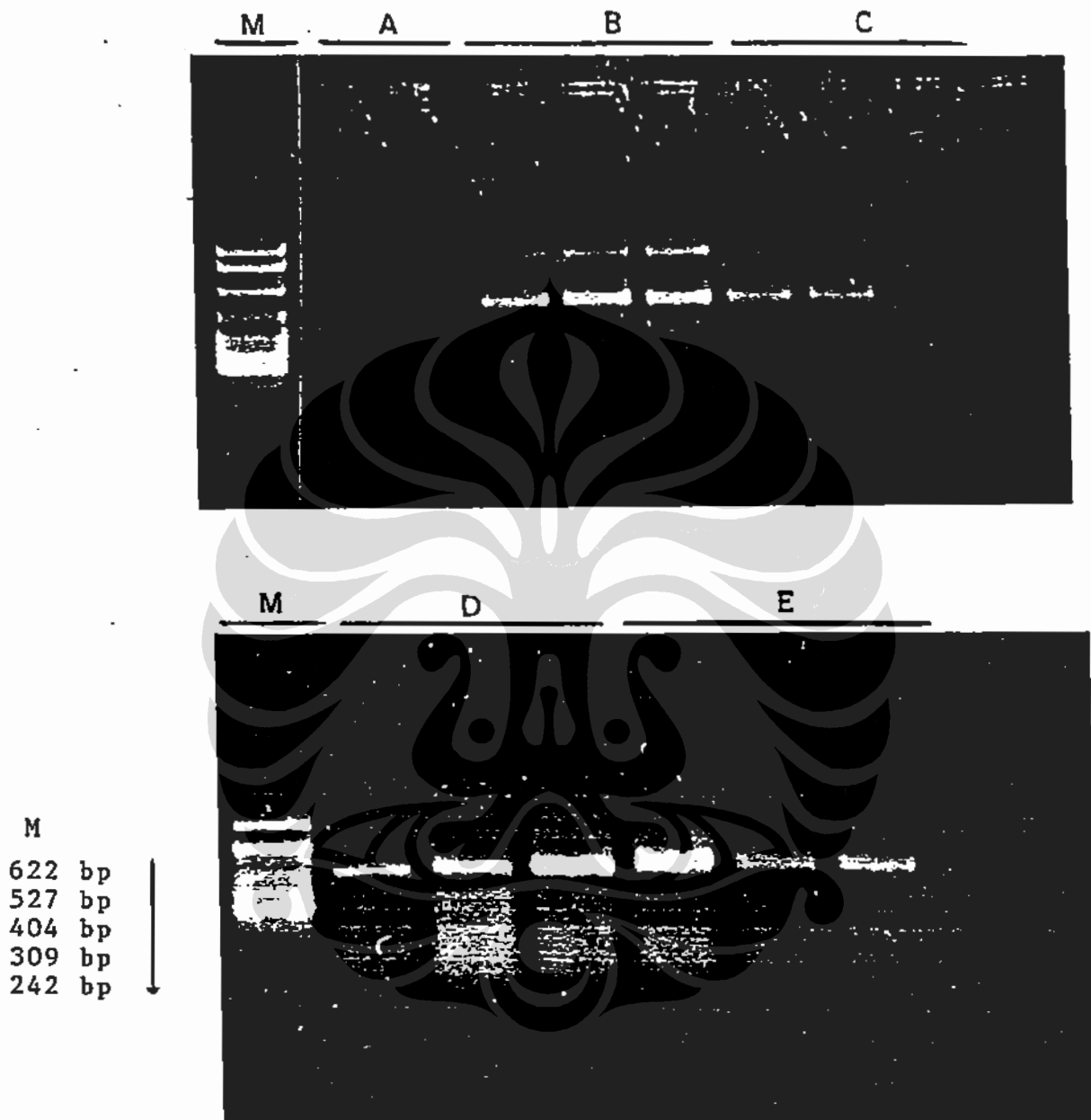
Gambar 22. Hasil hibridisasi DNA *B. malayi* dari berbagai daerah di Indonesia dengan pelacak DNA *B. malayi* 153-*fluorescein* pada tes dot blot. A. Hasil PCR DNA *B. malayi* strain Kendari, B. Hasil PCR DNA *B. malayi* strain Kalimantan Timur, C. Hasil PCR DNA *B. malayi* strain Lampung  
Konsentrasi DNA adalah a. 0,1ng, b. 0,2ng, c. 0,4ng, d. 0,8ng, e. 1,6ng, dan f. 3,2ng

#### G. Penggunaan pelacak DNA *B. malayi* 153-*fluorescein* untuk

mendeteksi 1 larva infeksi dalam nyamuk setelah PCR di laboratorium.

Hasil PCR menunjukkan bahwa DNA berulang 1 larva telah berhasil diperbanyak tanpa atau dengan adanya berbagai jumlah nyamuk. Tetapi meningkatnya jumlah nyamuk dalam reaksi PCR menyebabkan hasil PCR yang tidak konsisten. Menurunnya sensitivitas reaksi PCR ini disebabkan oleh kutikula larva tidak hancur dengan sempurna pada proses penggerusan karena terhambat oleh jaringan tubuh nyamuk sehingga DNA yang dihasilkan tidak cukup oleh PCR.

Hasil PCR pada gel agarose (elektroforesis) menunjukkan bahwa panjang pita (*band*) yang diperoleh sesuai dengan yang diinginkan yaitu 322 bp. Pita trimer dan dimer teramati secara samar pada sampel 1 larva infeksi tanpa jaringan nyamuk. Tidak ada pita yang teramati pada hasil PCR nyamuk negatif (Gambar 23).



Gambar 23. Hasil PCR DNA 1 larva infeksi tanpa atau dengan nyamuk negatif *Aedes togoi*: A. 1 nyamuk negatif *A. togoi*, B. 1 larva infeksi, C. 1 larva infeksi dengan 1 nyamuk negatif *A. togoi*, D. 1 larva infeksi dengan 3 nyamuk negatif *A. togoi*, E. 1 larva infeksi dengan 5 nyamuk negatif *A. togoi*, dan M. DNA pBR 322-Msp I. Semua reaksi memberikan pita yang sama pada elektroforesis yaitu 322 bp, pita tersebut berada pada ukuran fragmen ketiga dan keempat

Tabel di bawah ini menyajikan jumlah sampel yang dipakai untuk PCR dan sensitivitas reaksi PCR:

Tabel IV

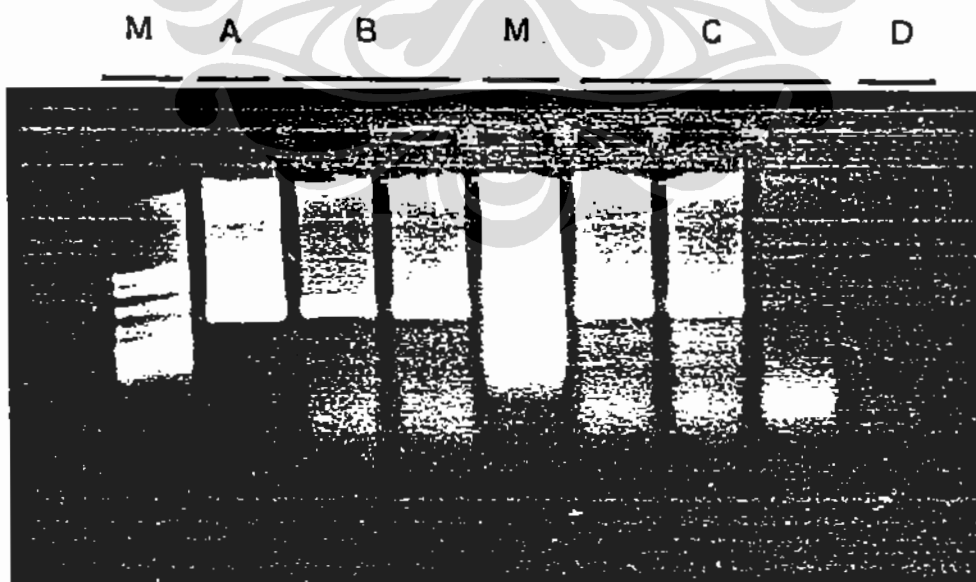
**HASIL PCR 1 larva infeksi TANPA ATAU DENGAN NYAMUK NEGATIF PADA ELEKTROFORESIS**

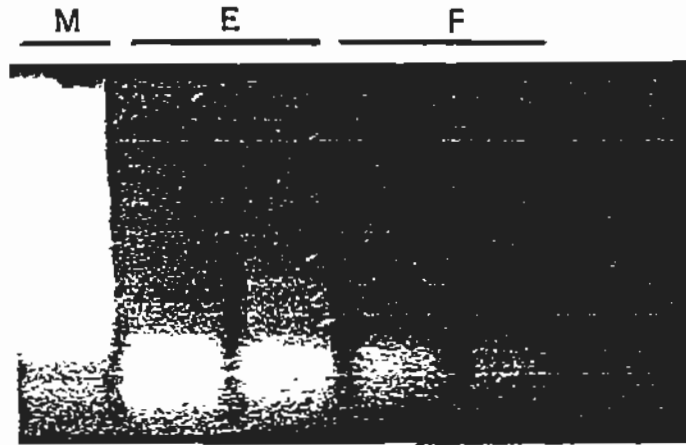
| Jenis sampel                 | Jumlah sampel | Positif PCR pada elektroforesis | % sensitivitas PCR |
|------------------------------|---------------|---------------------------------|--------------------|
| 1 Nyamuk negatif             | 6             | 0                               | 0%                 |
| 1 Larva infeksi (L3)         | 15            | 15                              | 100%               |
| 1 L3 dalam 3 nyamuk negatif  | 15            | 15                              | 100%               |
| 1 L3 dalam 5 nyamuk negatif  | 15            | 13                              | 87%                |
| 1 L3 dalam 10 nyamuk negatif | 10            | 4                               | 40%                |
| 1 L3 dalam 15 nyamuk negatif | 10            | 1                               | 10%                |
| 1 L3 dalam 20 nyamuk negatif | 10            | 0                               | 0%                 |

\* Elektroforesis pada 1,8% gel agarose pada 50 volt selama 2 jam.

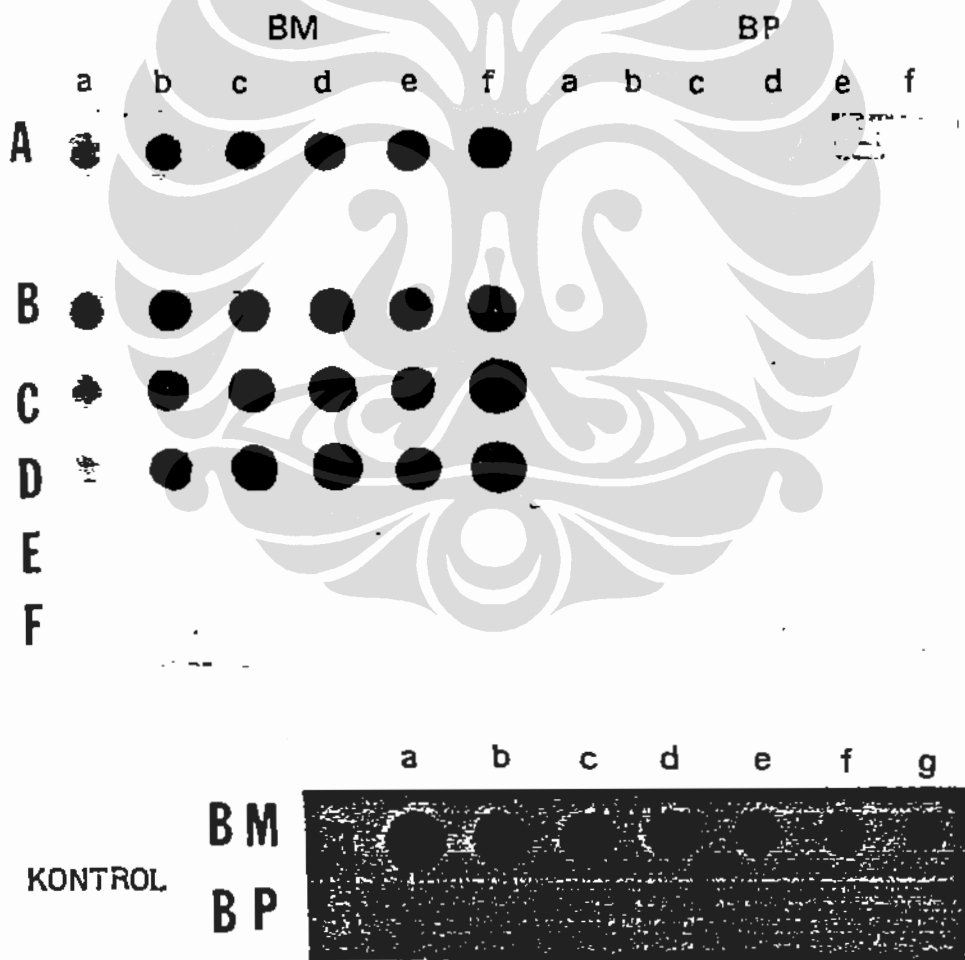
Dari hasil tabel di atas terlihat adanya loncatan nilai prosentase hasil sensitivitas PCR dari 100% pada 1 larva infeksi dalam 3 nyamuk negatif ke 87% pada 1 larva infeksi dalam 5 nyamuk negatif. Nilai 87% didapat dari pengujian 15 sampel dengan 13 sampel memberikan hasil positif dan 2 sampel memberikan hasil negatif. Hasil negatif tersebut diperoleh pada pengujian sampel yang pertama kali (diuji 3 sampel, 1 sampel positif dan 2 sampel negatif), disebabkan oleh proses penggerusan sampel yang kurang baik. Penambahan jumlah nyamuk negatif (lebih dari 5) dalam 1 larva infeksi menyebabkan hasil PCR yang tidak konsisten (Gambar 24).

Hasil tes dot blot menunjukkan bahwa pelacak DNA *B. malayi* 153 dapat mendeteksi 1  $\mu$ l sampel hasil PCR (5  $\mu$ l dari pengenceran 1:5). Intensitas *signal* yang dihasilkan oleh pelacak DNA *B. malayi* 153-*fluorescein* pada sampel 1 L3 tanpa nyamuk tidak berbeda dengan intensitas *signal* yang dihasilkan pada sampel 1 L3 dalam berbagai jumlah nyamuk negatif (1,3,5 nyamuk negatif). Hasil ini menunjukkan tidak ada perbedaan sensitivitas pelacak DNA dalam mendeteksi hasil PCR 1 L3 tanpa atau dengan nyamuk. Selain itu juga tidak ditemukan reaksi silang antara pelacak DNA *B. malayi* 153 dengan hasil PCR L3 *B. pahangi*, nyamuk negatif, supernatan nyamuk negatif tanpa PCR maupun dengan DNA kontrol, nyamuk dan manusia. Hasil ini menunjukkan bahwa pelacak DNA *B. malayi* 153 tersebut spesifik untuk mendeteksi larva parasit *B. malayi* (Gambar 25).





Gambar 24. Hasil PCR DNA 1 larva infeksi dengan jumlah nyamuk negatif lebih dari lima pada elektroforesis: A. 1 larva infeksi, B. 1 larva infeksi dengan 5 nyamuk negatif, C. 1 larva infeksi dengan 10 nyamuk negatif, D. 1 nyamuk negatif, E. 1 larva infeksi dengan 15 nyamuk negatif, F. 1 larva infeksi dengan 20 nyamuk negatif, M. pBR322-Msp I.



Gambar 25. Hibridisasi hasil PCR 1 larva *Brugia malayi* dan *Brugia pahangi* tanpa atau dengan Nyamuk negatif dengan pelacak DNA *B. malayi* 153-fluorescein



pada tes dot blot. Sampel yang diuji adalah: A. Hasil PCR 1 larva infeksi, B. Hasil PCR 1 larva infeksi dengan 1 nyamuk negatif *A. togoi*, C. Hasil PCR 1 larva infeksi dengan 3 nyamuk negatif *A. togoi*, D. Hasil PCR 1 larva infeksi dengan 5 nyamuk negatif *A. togoi*, E. 10ng dan 1ng DNA nyamuk (kolom a dan b), F. 10ng dan 1ng DNA bakteriofag lambda (kolom a dan b). Konsentrasi sampel adalah: a. 5  $\mu$ l, b. 10  $\mu$ l, c. 15  $\mu$ l, d. 20  $\mu$ l, e. 25  $\mu$ l (semua sampel dengan pengenceran 1:5), dan f. 10  $\mu$ l (tanpa pengenceran). Kontrol: DNA *B. malayi* (BM) dan DNA *B. pahangi* (BP) dengan konsentrasi DNA: a. 6,4ng, b. 3,2ng, c. 1,6ng, d. 0,8ng, e. 0,4ng, f. 0,2ng, g. 0,1ng.

Tabel di bawah ini menyajikan jumlah sampel yang diuji pada tes dot blot:

**Tabel V**

**HASIL HIBRIDISASI PELACAK DNA *Brugia malayi* 153 -  
*fluorescein* TERHADAP PCR 1 L3 *Brugia malayi*  
PADA TES DOT BLOT**

| Jenis sampel                | Jumlah sampel | Reaksi dot blot positif | % positif |
|-----------------------------|---------------|-------------------------|-----------|
| 1 Nyamuk negatif            | 6             | 0                       | 0%        |
| 1 larva infeksi (L3)        | 10            | 10                      | 100%      |
| 1 L3 dalam 3 nyamuk negatif | 10            | 10                      | 100%      |
| 1 L3 dalam 5 nyamuk negatif | 10            | 10                      | 100%      |

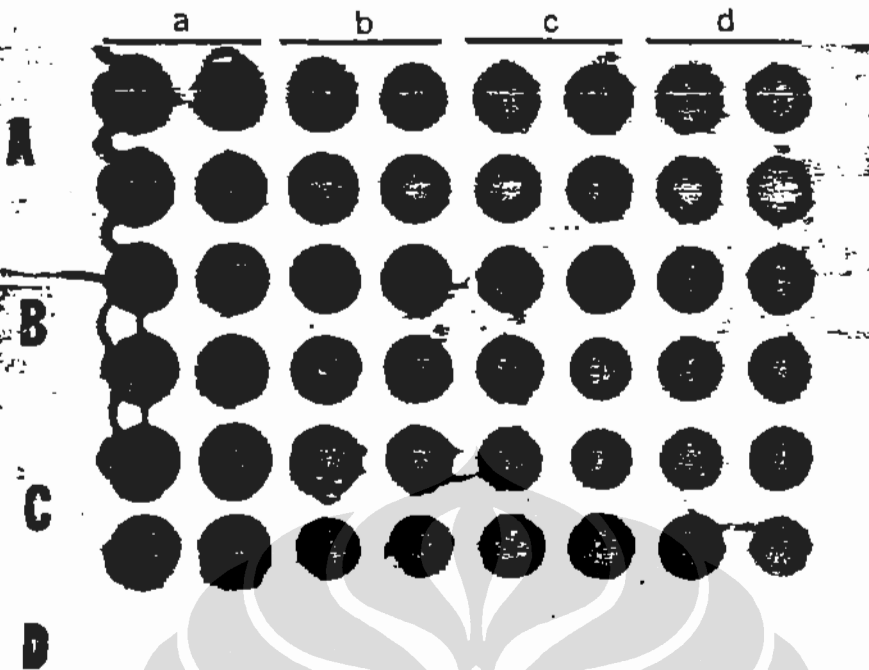
Pada setiap tes dot blot ditetaskan 2 sampel berbagai macam sampel. Setiap sampel yang mengandung 1 larva infeksi *B. malayi* berhibridisasi dengan pelacak DNA *B. malayi* 153-*fluorescein*. Untuk semua sampel yang diuji dilakukan lima kali tes dot blot. Dari hasil tes dot blot di atas menunjukkan bahwa PCR dapat menggandakan DNA berulang parasit sehingga dapat terdeteksi dengan mudah oleh pelacak DNA *B. malayi* 153.

## BAB V

### DISKUSI

Pada saat ini pelacak DNA *B. malayi* non-radioaktif yang ada adalah pelacak DNA *B. malayi* yang ditandai biotin (Williams dkk., 1991). Sebelum pelacak DNA tersebut dipakai sebagai alat pemantau secara entomologis pada program pengendalian filariasis *B. malayi* di Indonesia maka perlu dilakukan skrining pelacak DNA terhadap strain-strain *B. malayi* di Indonesia. Dari hasil skrining telah diputuskan untuk tidak mempergunakan pelacak DNA *B. malayi* 45-mer yang ditandai biotin sebagai alat pemantau pada pemeriksaan entomologis dengan alasan-alasan sebagai berikut:

1. Pelacak DNA *B. malayi* (45-mer) yang ditandai dengan biotin bereaksi silang dengan DNA *B. pahangi*.
2. Pelacak DNA *B. malayi* (45-mer)-biotin telah diuji untuk mendeteksi sampel 5 larva infeksi yang dicampur dengan nyamuk negatif dan sampel nyamuk negatif saja. Hasil hibridisasi menunjukkan adanya reaksi silang antara pelacak DNA dengan nyamuk negatif *A. togoi* dan *Culex sp.* (Gambar 26). Hal ini diduga disebabkan adanya reaksi antara biotin di dalam jaringan tubuh nyamuk (biotin merupakan suatu vitamin) dengan larutan deteksi sehingga dapat menghasilkan *signal* pada penambahan larutan deteksi. Oleh karena itu diputuskan untuk membuat pelacak DNA *B. malayi* baru yang akan digunakan untuk mendeteksi larva *B. malayi* di dalam nyamuk.



Gambar 26. Hasil hibridisasi pelacak DNA *B. malayi* (45-mer)-biotin. Sampel yang dipakai adalah: A. 5 L3 dengan 1 nyamuk negatif *Aedes togoi*, B. 1 nyamuk negatif *Culex sp.*, C. 1 nyamuk negatif *Aedes togoi*, D. 10ng DNA nyamuk *Culex sp.*, 10ng DNA manusia, 10ng DNA bakteriofag lambda. Semua sampel digerus dan dimasukkan ke dalam air mendidih dengan berbagai waktu inkubasi: a. 5 menit, b. 10 menit, c. 15 menit, dan d. 20 menit.

Untuk membuat suatu pelacak DNA *B. malayi* baru yang dapat bereaksi dengan *B. malayi* di Indonesia maka terlebih dahulu perlu dilakukan penelitian terhadap sikuen DNA berulang strain-strain *B. malayi* di Indonesia. Tiga strain *B. malayi* dari Indonesia, yaitu *B. malayi* strain Kendari (zoofilik subperiodik), *B. malayi* strain Bengkulu (zoofilik subperiodik), dan *B. malayi* strain Buton (antropofilik), telah diteliti sikuen DNA berulangnya. Hasil semua sikuen DNA berulang tersebut dianalisis dengan komputer untuk mendapatkan konsensus sikuen DNA berulang *B. malayi* Indonesia. Kemudian hasil konsensus sikuen DNA berulang *B. malayi* Indonesia dibandingkan dengan konsensus sikuen DNA berulang *B. pahangi* (parasit filaria pada hewan), bertujuan untuk mendapatkan

daerah pada DNA berulang yang paling banyak mempunyai perbedaan basa-basa. Daerah yang paling banyak perbedaan basa tersebut akan digunakan sebagai sikuen pelacak DNA. Parasit filaria hewan *B. pahangi* telah digunakan sebagai pembanding karena umumnya parasit filaria manusia *B. malayi* terdapat pada daerah yang bersamaan dengan parasit filaria hewan *B. pahangi* dan ditularkan oleh vektor yang sama.

Hasil perbandingan DNA berulang *B. malayi* Indonesia dan *B. pahangi* menunjukkan bahwa daerah 238-263 dengan panjang 25 nukleotida mempunyai perbedaan basa sebesar 40% dan persentase GC (guanin dan sitosin) 52%. Sikuen pada daerah 238-263 tersebut telah dipilih sebagai sikuen pelacak DNA *B. malayi* yang baru.

Pemilihan daerah tersebut sebagai sikuen pelacak DNA *B. malayi* yang baru sudah memenuhi 3 persyaratan pembuatan pelacak DNA oligonukleotida (Williams dkk., 1988), yaitu:

1. Sikuen pelacak DNA harus dipilih dari daerah yang persentase homologi basanya rendah antara dua konsensus sikuen DNA spesies yang berbeda (*B. malayi* dan *B. pahangi*), yang bertujuan untuk meningkatkan spesifisitas pelacak DNA.
2. Sikuen yang dipilih mempunyai homologi yang maksimum antara sikuen DNA parasit *B. malayi* dari berbagai daerah di Indonesia, yang bertujuan untuk meningkatkan kemampuan hibridisasi pelacak DNA dengan DNA parasit *B. malayi* di Indonesia.

3. Sikuen yang dipilih harus mempunyai persentase GC (guanin dan sitosin) yang tinggi dan mempunyai panjang lebih dari 20 nukleotida sehingga dapat meningkatkan stabilitas hibridisasi pelacak DNA pada DNA parasit.

Analisis 192 enzim pemotong DNA dengan komputer telah dilakukan untuk mengetahui enzim yang dapat dipergunakan untuk memotong daerah 238-263. Ternyata hasil analisis menunjukkan bahwa tidak ada enzim yang dapat dipakai untuk memotong daerah 238-263 DNA berulang *B. malayi*, sehingga pelacak DNA tidak dapat diperoleh melalui pemotongan DNA berulang *B. malayi*. Oleh karena itu pelacak DNA harus dibuat melalui sintesis pada mesin.

Untuk menghasilkan pelacak DNA dalam jumlah cukup pada waktu relatif singkat maka pelacak DNA tersebut harus diklon. DNA plasmid Bluescript II telah dipilih sebagai DNA vektor untuk kloning dengan beberapa alasan, yaitu:

1. Ukuran DNA plasmid kecil.
2. Plasmid mempunyai 2 gen, yaitu gen yang resisten terhadap ampisillin dan gen Z. Kedua gen berguna dalam tahap skrining klon. Hanya sel-sel bakteri yang mempunyai plasmid yang akan tumbuh pada medium LB-ampisillin pada cawan petri karena adanya gen resisten ampisillin. Adanya gen Z pada plasmid menyebabkan koloni yang mempunyai DNA rekombinan berwarna putih.

3. Kemampuan replikasi plasmid yang berukuran kecil lebih besar daripada plasmid yang berukuran besar (Old & Primrose, 1985).
4. Plasmid yang berukuran kecil lebih tahan terhadap perlakuan-perlakuan dari luar, seperti isolasi (Brown, 1986).

Fragmen pelacak DNA 25 nukleotida tersebut terlalu kecil untuk menjadi pelacak DNA yang efektif dalam plasmid bluescript II (2961 bp). Oleh karena itu fragmen-fragmen tersebut harus disambung dahulu menjadi suatu rantai yang lebih panjang sebelum dikloning ke dalam DNA plasmid bluescript II.

Suatu teknik baru telah dipakai dalam penelitian ini untuk menyambung fragmen-fragmen pelacak DNA menjadi rantai yang lebih panjang. Ada 2 kemungkinan yang terjadi bila fragmen-fragmen pelacak DNA tersebut digabung menjadi rantai lebih panjang, yaitu: pelacak DNA tersambung pada orientasi yang sama atau orientasi yang berlawanan. Orientasi yang diinginkan pada penyambungan fragmen pelacak DNA adalah fragmen pelacak DNA yang tersambung pada orientasi yang sama. Hal ini bertujuan untuk menghindari terbentuknya struktur sekunder (Gambar 27), yang akan menghambat terbentuknya rantai tunggal pelacak DNA pada proses denaturasi. Adanya struktur sekunder pelacak DNA menyebabkan terganggunya proses hibridisasi.

Untuk mendapatkan hasil penyambungan pelacak DNA pada orientasi yang sama maka ada beberapa tahap yang harus dilakukan, yaitu:

1. Membuat linker tambahan 3 nukleotida pada kedua ujung fragmen pelacak

DNA 25-mer sehingga panjang total fragmen pelacak DNA menjadi 31 nukleotida.

2. Ada 2 kemungkinan orientasi berlawanan yang terbentuk pada penyambungan fragmen pelacak DNA (gambar 15). Oleh karena itu pada linker tambahan 3 nukleotida harus terdapat sikuen untuk pemotongan 2 macam enzim yang berbeda (Nde I dan Nsi I) tetapi kedua enzim harus dapat bekerja pada kondisi reaksi yang sama, yaitu bufer dan temperatur inkubasi yang sama.
3. DNA rekombinan sirkular akan terbentuk pada hasil penyambungan rantai panjang pelacak DNA pada DNA plasmid bluescript. Kemudian DNA rekombinan sirkular direaksikan dengan enzim Nde I dan Nsi I, kedua enzim akan memotong pelacak DNA yang tersambung pada orientasi berlawanan di daerah linker tambahan. Hasil pemotongan enzim tersebut adalah DNA rekombinan yang berbentuk linier.
4. DNA rekombinan linier tidak akan tertransformasi ke dalam sel bakteri *E. coli* pada proses transformasi. Jadi hanya DNA rekombinan sirkular (tidak terpotong enzim), yaitu DNA rekombinan dengan fragmen pelacak DNA yang tersambung pada orientasi sama yang akan tertransformasi. Hasil transformasi ditumbuhkan pada medium LBA agar sehingga terbentuk klon.





tambahan 3 nukleotida tambahan pada kedua ujung 5' dan 3' pelacak DNA berhasil dipotong dengan baik oleh enzim pemotong DNA *Nde* I dan *Nsi* I apabila fragmen tersambung pada orientasi berlawanan.

Sebagai hasil rekayasa tersebut di atas, maka ditetapkan DNA rekombinan klon 9 sebagai pelacak DNA untuk parasit filaria *B. malayi* dan dinamai pelacak DNA *B. malayi* 153.

Pada kultur klon 9 dalam medium cair 250 ml LBA (*Luria bertani ampisilin*) diperoleh DNA rekombinan sejumlah 5  $\mu$ g (5000 ng). Waktu yang dibutuhkan untuk mendapatkan DNA rekombinan tersebut adalah 24 jam kerja. Hasil ini menunjukkan waktu yang dibutuhkan untuk menghasilkan pelacak DNA setiap kali diperlukan adalah lebih singkat dibandingkan jika membeli pelacak DNA karena harus memperhitungkan waktu untuk memesan, membuat, dan mengirimkan pelacak DNA. Dengan demikian pelacak DNA tersebut memenuhi syarat sebagai alat pemantau.

Klon positif yang sudah diperoleh dapat disimpan dengan 2 cara, yaitu:

1. DNA rekombinan disimpan di dalam etanol pada  $-20^{\circ}\text{C}$ , stabil untuk beberapa tahun, (Glover, 1985). DNA rekombinan ini dapat ditransformasikan ke dalam sel bakteri *E. coli* setiap saat diperlukan.
2. Sel-sel bakteri *E. coli* yang mengandung DNA rekombinan disimpan di dalam gliserol pada  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Untuk menghindari hilangnya klon positif sebaiknya klon disimpan dalam 2 macam cara penyimpanan tersebut di atas. Jika karena sesuatu hal klon positif

tersebut hilang, maka cara untuk mengatasinya adalah mensintesis kembali pelacak DNA dengan sikuen yang sama. Dari uraian ini dapatlah dikatakan bahwa pelacak DNA mempunyai kestabilan yang baik sehingga memenuhi syarat sebagai alat pemantau.

Untuk mencari molekul non-radioaktif yang sesuai untuk menandai pelacak DNA telah dipakai 2 macam kit yang berbeda, yaitu:

1. Penandaan pelacak DNA dengan molekul *digoxigenin*. Molekul *digoxigenin* dipakai untuk menandai DNA rekombinan dengan teknik *random priming*. DNA rekombinan diperoleh dari isolasi langsung klon yang mempunyai pelacak DNA *B. malayi* 153. Waktu untuk penandaan pelacak DNA dan tahap purifikasinya adalah sekitar 4 jam. Pelacak DNA *B. malayi* 153 yang ditandai dengan *digoxigenin* memberikan hasil hibridisasi yang tidak bersih pada membran nylon, yaitu latar belakang yang berupa titik-titik hitam sehingga menyulitkan pembacaan hasil sedangkan hasil hibridisasi pada membran nitroselulosa, pelacak DNA tersebut hanya dapat mendeteksi sampel dari hasil PCR pelacak DNA itu sendiri dari konsentrasi 6,4 ng sampai 1,6 ng dan tidak memberikan *signal* pada DNA *B. malayi*.
2. Penandaan pelacak DNA dengan molekul *fluorescein*. Molekul *fluorescein* dipakai untuk menandai ujung 3' fragmen pelacak DNA dengan teknik *end labelling*. Fragmen pelacak DNA rekombinan *B. malayi* 153 diperoleh dari 2 cara yang berbeda, yaitu:
  - (a) Pemotongan DNA rekombinan dengan enzim *Xba* I dan *Eco* RV. Pada

pemotongan DNA rekombinan DNA *B. malayi* 153 diperoleh fragmen berukuran 290 bp. Tetapi cara ini kurang efisien karena jumlah fragmen DNA yang didapat kembali (setelah di *electroelution*, ekstraksi fenol - kloroform untuk membuang enzim, dan dialisis) kira-kira setengah jumlah semula.

(b) Perbanyak DNA rekombinan dengan teknik PCR. Hasil analisis PCR pada gel agarose menunjukkan bahwa ukuran fragmen yang diperoleh dari reaksi PCR sekitar 440 bp. Dari 5 ng DNA rekombinan pelacak DNA *B. malayi* 153 diperoleh hasil PCR sebanyak 2  $\mu$ g. Oleh karena itu perbanyak PCR telah dipakai dalam penelitian ini untuk memperbanyak pelacak DNA *B. malayi* 153.

Penandaan pelacak DNA *B. malayi* 153 dengan *fluorescein* hanya memerlukan waktu 1 jam pada suhu 37 °C dan tidak memerlukan purifikasi untuk memurnikan pelacak DNA yang sudah tertandai. Hasil hibridisasi pelacak DNA *B. malayi* 153-*fluorescein* jernih sehingga memudahkan pembacaan hasil.

Berdasarkan alasan-alasan tersebut di atas maka penandaan pelacak DNA dengan *fluorescein* telah dipilih untuk menandai fragmen hasil PCR pelacak DNA *B. malayi* 153.

Uji spesifisitas pelacak DNA telah dilakukan dengan menggunakan sampel DNA *B. malayi* dan DNA *B. pahangi*. Hasil hibridisasi pelacak DNA *B. malayi* 153-*fluorescein* menunjukkan bahwa pelacak DNA bereaksi dengan DNA *B. malayi*. Pelacak DNA *B. malayi* 153-*fluorescein* telah diuji sensitivitasnya dengan melakukan hibridisasi pelacak DNA terhadap berbagai konsentrasi DNA

*B. malayi* (6.4 ng - 0,1 ng dengan 2 kali pengenceran) pada tes dot blot. Hasil uji sensitivitas menunjukkan bahwa pelacak DNA *B. malayi* 153-*fluorescein* dapat mendeteksi DNA *B. malayi* sampai konsentrasi 0,1 ng. spesifik untuk parasit *B. malayi*. Hasil spesifisitas dan sensitivitas tersebut menunjukkan bahwa pelacak DNA memenuhi syarat untuk digunakan sebagai alat pemantau.

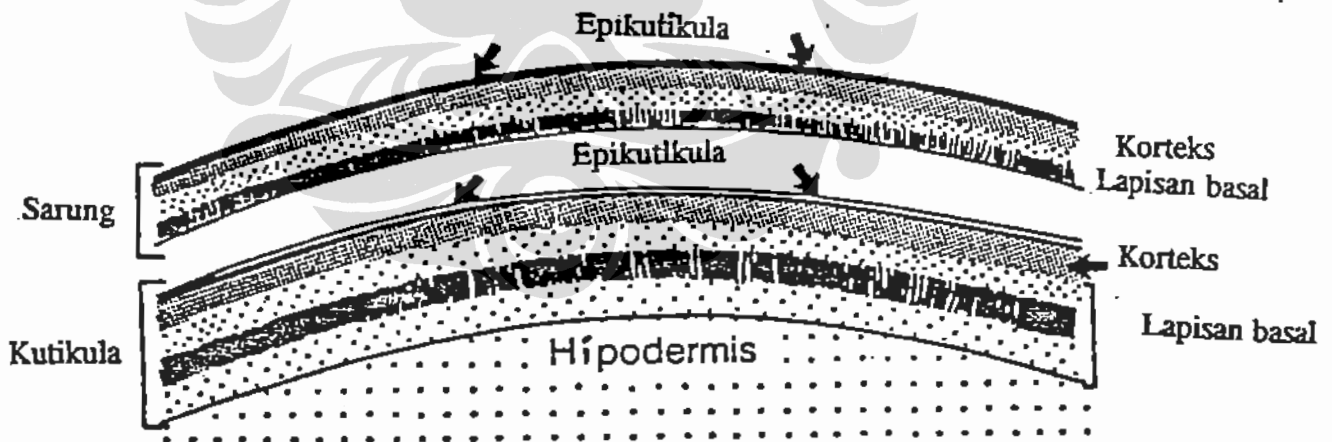
Pelacak DNA *B. malayi* 153-*fluorescein* telah diuji terhadap *B. malayi* dari berbagai daerah di Indonesia, yaitu *B. malayi* strain Kalimantan Timur (zoofilik aperiodik), *B. malayi* strain Lampung (zoofilik subperiodik), dan *B. malayi* strain Kendari (zoofilik subepriodik). Hasil hibridisasi menunjukkan bahwa pelacak DNA *B. malayi* 153-*fluorescein* bereaksi dengan semua strain *B. malayi* yang diuji. Dengan demikian pelacak DNA *B. malayi* 153-*fluorescein* dapat dipakai sebagai alat pemantau pada program pengendalian filariasis *B. malayi* di Indonesia.

Penggunaan pelacak DNA yang ditandai molekul radioaktif ( $^{32}\text{P}$ ) untuk mendeteksi larva *B. malayi* dalam nyamuk telah diteliti oleh Kurniawan dkk., 1989. Mereka telah membandingkan penggunaan pelacak DNA radioaktif untuk mendeteksi larva yang diisolasi dari nyamuk dan nyamuk infeksi yang langsung digerus pada membran, kemudian membran-membran tersebut direndam dalam larutan enzim untuk mengeluarkan DNA larva. Ternyata hasil penelitian menunjukkan bahwa hibridisasi pelacak DNA dengan larva yang digerus langsung dalam nyamuk lebih rendah jika dibandingkan dengan hibridisasi pelacak DNA dengan larva yang telah diisolasi dari nyamuk. Hal ini disebabkan jaringan tubuh

nyamuk menghalangi menempelnya DNA larva pada membran. Meredith dkk., 1991 juga melaporkan bahwa hasil hibridisasi pelacak DNA pada vektor parasit memberikan hasil yang tidak konsisten karena disebabkan sukarnya penghancuran kutikula larva parasit dengan sempurna untuk mengeluarkan DNA.

Dawkins & Spencer, 1989 melaporkan bahwa kutikula parasit dengan ketebalan 460nm, tersusun atas hipodermis dan epikutikula yang sukar dihancurkan dengan reaksi enzimatik (Gambar 28). Kutikula tersebut tidak dapat dihancurkan dengan enzim trypsin, pepsin, kitinase, kolagenase, proteinase K, pronase, dan elastase.

Untuk menanggulangi masalah tersebut di atas, penulis telah memilih cara penggerusan larva dalam nyamuk dan melakukan PCR untuk mendapatkan DNA larva yang cukup, sehingga dapat dideteksi pelacak DNA.



Gambar 28. Kutikula larva mempunyai ketebalan 460 nm, yang tersusun dari lapisan epikutikula, lapisan korteks dan lapisan basal (Dawkins & Spencer, 1989).

Berbagai jumlah nyamuk negatif (1, 3, 5, 10, 15, 20) telah dimasukkan ke dalam 1 larva infeksi *B. malayi*, kemudian campuran tersebut digerus dan di PCR untuk memperbanyak DNA larva. Analisis hasil PCR penggerusan 1 larva infeksi dalam 5 nyamuk negatif pada gel agarose memberikan hasil yang cukup konsisten, yaitu terlihatnya pita yang berukuran 322 bp. Sedangkan analisis hasil PCR penggerusan 1 larva infeksi dengan jumlah nyamuk negatif lebih dari lima ekor pada gel agarose memberikan hasil yang tidak konsisten, yaitu pita 322 bp tidak selalu terlihat pada hasil PCR. Hal ini mungkin disebabkan kutikula larva tidak dapat dipecahkan dengan sempurna pada penggerusan karena terhalang oleh tubuh nyamuk (Meredith dkk., 1991). Oleh karena itu perlu dicari cara lain untuk dapat mengatasi hal tersebut.

Pada penelitian telah digunakan cara mekanik, yaitu penggerusan untuk menghancurkan larva infeksi dalam nyamuk. Kemudian larutan hasil penggerusan di PCR yang bertujuan untuk memperbanyak DNA larva.

Pelacak DNA *B. malayi* 153-*fluorescein* telah dicoba untuk mendeteksi hasil PCR penggerusan 1 larva infeksi *B. malayi* dan 1 larva infeksi *B. pahangi* dalam berbagai jumlah nyamuk negatif pada tes dot blot. Hasil hibridisasi menunjukkan bahwa pelacak DNA tersebut hanya bereaksi dengan larva infeksi *B. malayi*.

Hasil penelitian pada nyamuk menunjukkan bahwa pelacak DNA *B. malayi* 153-*fluorescein* dapat mendeteksi 1 larva infeksi dalam 5 nyamuk negatif pada tes dot blot. Dan hasil tes dot blot tidak menunjukkan adanya perbedaan *signal* yang diperoleh dari sampel 1 larva infeksi saja tanpa nyamuk negatif atau sampel 1

larva infeksi dengan berbagai jumlah nyamuk negatif (1,3,5). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pelacak DNA *B. malayi* 153-*fluorescein* mempunyai sensitivitas yang cukup tinggi, yaitu dapat mendeteksi hasil PCR dari penggerusan 1 larva infeksi *B. malayi* dalam 5 nyamuk negatif.

Untuk mengetahui konsistensi tes dot blot pada nyamuk telah digunakan 2 kelompok perlakuan, yaitu 1 larva infeksi *B. malayi* dalam berbagai jumlah nyamuk negatif dan 1 larva infeksi *B. pahangi* dalam berbagai jumlah nyamuk negatif per sampel. Jumlah sampel yang diuji pada setiap perlakuan adalah 10 sampel pada setiap perlakuan, yang terbagi dalam lima kali tes dot blot. Hasil pengulangan tes dot blot memberikan hasil yang konsisten, yaitu pelacak DNA *B. malayi* 153-*fluorescein* hanya bereaksi dengan DNA larva infeksi *B. malayi*. Hasil ini menunjukkan bahwa tes dot blot dengan menggunakan pelacak DNA *B. malayi* 153-*fluorescein* pada sampel nyamuk adalah konsisten dan dapat diulang. Dengan demikian memenuhi syarat sebagai alat pemantau.

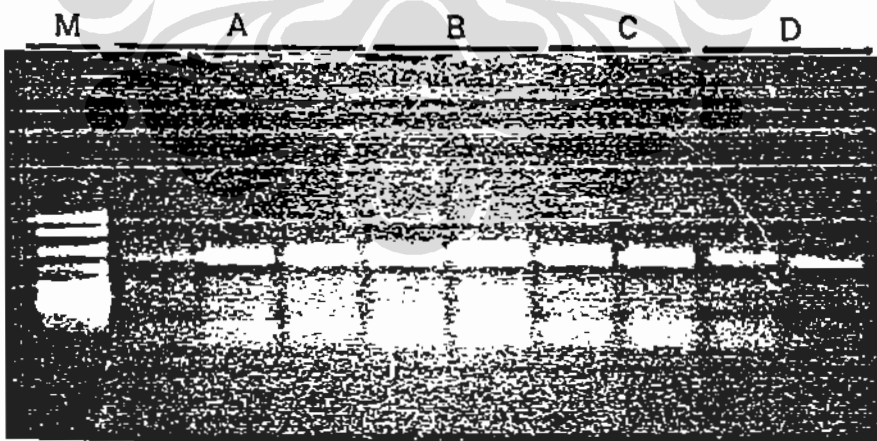
PCR juga dapat dipakai untuk memperbanyak DNA berbagai stadium larva *B. malayi* di dalam nyamuk, yaitu nyamuk yang baru saja diinfeksi di laboratorium (mengandung mikrofilaria), nyamuk yang mengandung larva stadium 1 (hari ke 1 setelah diinfeksi), larva stadium 2 (hari ke 5 setelah diinfeksi) dan larva stadium 3 (hari ke 14 setelah diinfeksi) yang dicampur dengan 4 nyamuk negatif.

Dari analisis yang diamati pada gel agarose (elektroforesis), semua pita yang

terbentuk mempunyai panjang yang sama yaitu 322 bp sesuai dengan ukuran panjang DNA berulang (Gambar 29). Hasil tes dot blot menunjukkan bahwa pelacak DNA *B. malayi* 153 dapat mendeteksi berbagai stadium larva parasit *B. malayi* dalam nyamuk (Gambar 30).

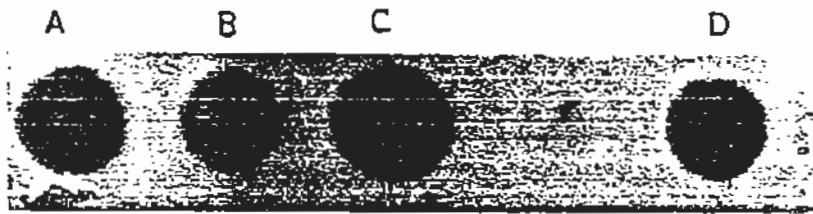
Penggunaan pelacak DNA *B. malayi* 153-*fluorescein* pada tes dot blot mempunyai beberapa keuntungan, yaitu:

- *fluorescein* dapat disimpan sampai 1 tahun.
- Larutan hibridisasi dapat digunakan beberapa kali (2-3 kali).
- Tes dot blot cocok untuk pengujian sampel dalam jumlah besar karena *dot blot apparatus* dapat menguji 96 sampel. Pada tes dot blot dapat dilakukan hibridisasi membran dalam posisi saling membelakangi sehingga dapat diolah sampel sebanyak 192 sampel. Oleh karena 1 sampel dapat mengolah maksimum 5 nyamuk maka pada 1 kali tes dot blot dapat diproses 960 nyamuk (192 X 5 nyamuk).



Gambar 29. Hasil PCR nyamuk *Culex sp.* yang diinfeksi filaria *B. malayi* di laboratorium pada elektroforesis: A. 1 nyamuk hari ke 14 (mengandung L3) dengan 4 nyamuk negatif, B. 1 nyamuk hari ke 5 (mengandung L2) dengan 4 nyamuk negatif, C. 1 nyamuk hari ke 2 (mengandung L1) dengan 4 nyamuk negatif, D. 1 nyamuk yang baru diinfeksi (mengandung mikrofilaria) dengan 4 nyamuk negatif.





Gambar 30. Hibridisasi hasil PCR berbagai stadium larva dalam nyamuk dengan pelacak DNA *B. malayi* 153 bp-*fluorescein* pada tes dot blot. Sampel yang diuji adalah: A. Hasil PCR 1 nyamuk hari ke 14 (mengandung L3) dengan 4 nyamuk negatif, B. Hasil PCR 1 nyamuk hari ke 5 (mengandung L2) dengan 4 nyamuk negatif, C. Hasil PCR 1 nyamuk hari ke 2 (mengandung L1) dengan 4 nyamuk negatif, D. Hasil PCR 1 nyamuk yang baru diinfeksi (mengandung mikrofilaria) dengan 4 nyamuk negatif. Konsentrasi sampel yang ditetaskan pada membran nitroselulosa adalah 15  $\mu$ l (pengenceran 1:5).

Di bawah ini dipaparkan perkiraan waktu dan biaya jika seseorang ingin menggunakan pelacak DNA *B. malayi* 153-*fluorescein* pada tes dot blot untuk mendeteksi larva parasit filaria *B. malayi* dalam nyamuk:

**TABEL V**  
**PERKIRAAN WAKTU DAN BIAYA UNTUK MENGHASILKAN PELACAK DNA**

| Jenis reaksi                               | Jumlah sampel    | Biaya | Waktu  |
|--|------------------|-------|--------|
| - Kultur klon 9 dan isolasi DNA rekombinan | 250ml untuk 5 ug | \$50  | 24 jam |
| - PCR pelacak DNA (DNA rekombinan)         | 5ng per reaksi   | \$2   | 2 jam  |

\* 5  $\mu$ g DNA rekombinan cukup untuk melakukan reaksi PCR sebanyak:

5000 ng/5  $\mu$ g = 1000 reaksi PCR. Jadi harga pelacak DNA per reaksi PCR adalah \$ 0.05. Setiap 5 ng DNA rekombinan dapat menghasilkan 2  $\mu$ g fragmen PCR (440bp) yang dapat dipakai untuk 3 kali tes dot blot. Jadi harga pelacak DNA per tes dot blot adalah \$ 0.7.

TABEL VI

**PERKIRAAN WAKTU, BIAYA DAN JUMLAH SAMPEL YANG  
DAPAT DIUJI PADA TES DOT BLOT**

| Jenis reaksi  | Jumlah sampel | Biaya | Waktu                |
|---|---------------|-------|----------------------|
| - Penandaan pelacak DNA<br><i>B. malayi-fluorescein</i> | 3ug           | \$2   | 1jam                 |
| - PCR   | 192           | \$250 | hari 1 ( $\pm$ 7jam) |
| - Tes dot blot  | 192           | \$50  | hari 2:              |
| 1. Meneteskan sampel                                    |               |       | 2 jam                |
| 2. Pengeringan membran                                  |               |       | 1 jam                |
| 3. Prehibridisasi                                       |               |       | 2 jam                |
| 4. Hibridisasi  |               |       | semalam (8jam)       |
|   |               |       | hari 3:              |
| 5. Pencucian membran setelah hibridisasi                |               |       | 2 jam                |
| 6. Pemaparan pada film                                  |               |       | 3 jam                |

Jadi seseorang dapat mengerjakan 192 sampel (lampiran 9) dalam satu tes dot blot dengan biaya \$ 302 atau \$ 1.6 per sampel dalam waktu 3 hari kerja.

Harga tes dot blot ini masih dapat ditekan lagi, karena tes ini masih mempunyai kemampuan untuk dikembangkan lebih lanjut. Dari komunikasi pribadi dengan ko-promotor I, diperoleh keterangan bahwa penelitian di Amerika dapat mendeteksi 1 larva dalam 50 nyamuk. Dengan meningkatkan jumlah nyamuk yang dapat diuji per sampel, ada 2 keuntungan yang dapat diperoleh yaitu: harga per sampel dapat ditekan dan jumlah sampel yang dapat disktrin lebih banyak lagi.

Tes dot blot dengan pelacak DNA ini mempunyai beberapa keuntungan dibandingkan dengan cara konvensional, yaitu:

**TABEL VII**  
**KEUNTUNGAN TES DOT BLOT DIBANDINGKAN**  
**DENGAN CARA KONVENSIONAL**

| Cara konvensional:   | Pelacak DNA-tes dot blot:   |
|--|---|
| - Nyamuk yang dikumpulkan harus langsung dibedah dan diperiksa di bawah mikroskop dalam keadaan hidup di lapangan  | - Nyamuk dapat disimpan dalam 100mM EDTA selama 1 bulan pada suhu ruang atau disimpan pada - 20° c sampai kira-kira 1 tahun |
| - Tidak dapat membedakan larva parasit filaria manusia <i>B. malayi</i> dari larva parasit hewan <i>B. pahangi</i> | - Dapat membedakan larva parasit filaria <i>B. malayi</i> dan <i>B. pahangi</i>   |
| - Untuk membedah 1 nyamuk dibutuhkan waktu ± 5 menit maka untuk memproses 960 nyamuk dibutuhkan waktu 80 jam       | - Untuk memproses 960 nyamuk dibutuhkan waktu 25 jam  |

Dari tabel VII dapatlah diketahui bahwa tes dot blot dengan pelacak DNA mudah dilakukan karena untuk mengolah 960 nyamuk hanya memerlukan waktu 25 jam kerja. Keuntungan lain dari tes ini adalah dapat membedakan spesies parasit filaria yang diuji. Demikian pula sampel nyamuk yang dikumpulkan di lapangan tidak perlu langsung diproses tetapi dapat disimpan dalam larutan

pengawet 100 mM EDTA untuk kemudian dikirim ke laboratorium rujukan, sehingga memenuhi syarat sebagai alat pemantau.

Dari uraian di atas maka dapatlah disimpulkan:

1. Pelacak DNA *B. malayi* 153 dapat dihasilkan dalam jumlah banyak melalui kloning dengan waktu relatif singkat pada kultur selama 24 jam di Indonesia.
2. Pelacak DNA tersebut cukup stabil untuk kurun waktu yang lama. Klon positif yang mengandung pelacak DNA dapat disimpan untuk beberapa tahun. Selain itu jika klon positif hilang karena suatu hal maka pelacak DNA dengan sikuen yang sama dapat disintesis kembali.
3. Pelacak DNA *B. malayi* 153-*fluorescein* adalah spesifik untuk parasit *B. malayi* dan dapat mendeteksi DNA *B. malayi* sampai konsentrasi 0,1 ng (setara dengan setengah DNA mikrofilaria).
4. Pelacak DNA *B. malayi* 153-*fluorescein* bereaksi dengan strain-strain *B. malayi* di Indonesia, yaitu *B. malayi* strain Kalimantan Timur (zoofilik aperiodik), *B. malayi* strain Lampung (zoofilik subperiodik), dan *B. malayi* strain Kendari (zoofilik subperiodik).
5. Pelacak DNA *B. malayi* 153-*fluorescein* sensitif untuk mendeteksi hasil PCR dari penggerusan 1 larva infeksi *B. malayi* di dalam 5 nyamuk negatif pada tes dot blot.
6. Hasil pengulangan pelacak DNA *B. malayi* 153-*fluorescein* pada tes dot blot konsisten.
7. Pelacak DNA *B. malayi* 153-*fluorescein* pada tes dot blot mudah dilakukan

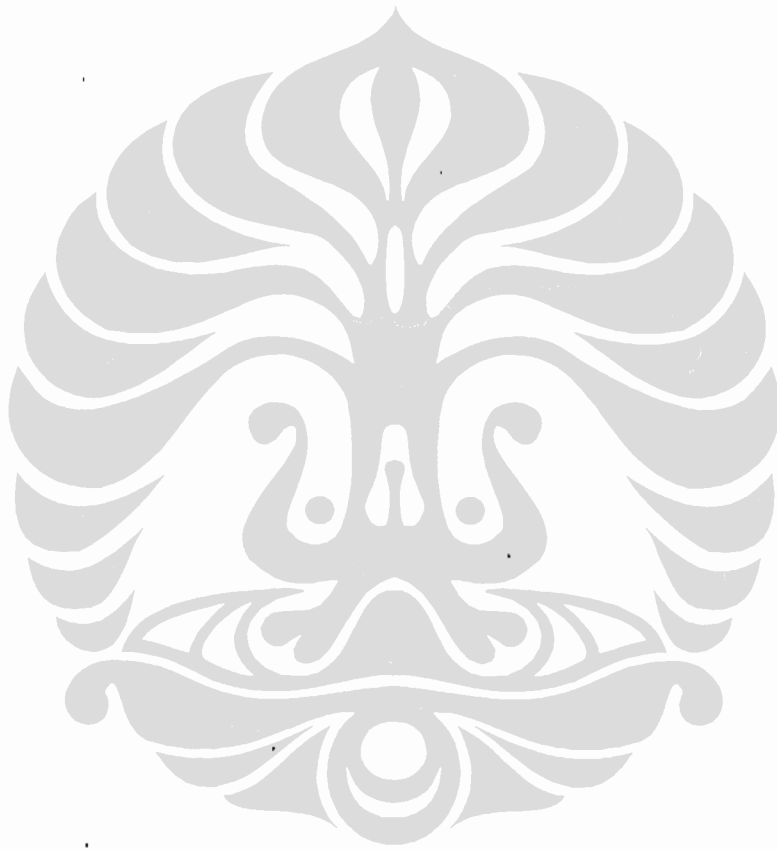
karena nyamuk dapat dikumpulkan dalam larutan pengawet 100 mM EDTA dan dikirim ke laboratorium rujukan. Tes tersebut dapat mengolah 960 nyamuk dalam waktu 25 jam kerja dan dapat membedakan spesies filaria *B. malayi* dari parasit filaria hewan *B. pahangi*.

Hasil yang telah diperoleh dalam penelitian sesuai dengan tujuan dari penelitian, yaitu mengembangkan pelacak DNA *Brugia malayi* non-radioaktif pada tes dot blot untuk mendeteksi parasit *B. malayi* dalam nyamuk pada pemantauan program pengendalian filariasis *B. malayi* di daerah-daerah endemis di Indonesia. Dengan tujuan khusus sebagai berikut:

1. Menentukan konsensus sikuen DNA berulang *B. malayi* di Indonesia
2. Membuat sikuen pelacak DNA *B. malayi* dari konsensus sikuen DNA berulang *B. malayi* di Indonesia.
3. Menghasilkan pelacak DNA yang spesifik untuk *B. malayi* dalam jumlah yang cukup.
4. Menentukan cara terbaik untuk menandai pelacak DNA dengan molekul non-radioaktif.
5. Menentukan spesifisitas dan sensitivitas pelacak DNA pada tes dot blot.
6. Mendeteksi 1 larva infeksi *B. malayi* dalam nyamuk setelah PCR pada tes dot blot dengan menggunakan pelacak DNA molekul non-radioaktif.

Pada penelitian ini telah dihasilkan suatu pelacak DNA *B. malayi* non-

radioaktif baru yang memenuhi persyaratan untuk dipakai sebagai alat pemantau secara entomologis pada program pengendalian filariasis *B. malayi* di Indonesia. Oleh karena itu hipotesis yang diajukan dapat diterima.



## BAB VI

### RINGKASAN, KESIMPULAN DAN SARAN

#### I. Pendahuluan

Filariasis limfatik adalah suatu penyakit infeksi yang disebabkan oleh cacing filaria, yang larva infektifnya berkembang menjadi cacing dewasa jantan dan betina di dalam pembuluh dan kelenjar limfe inang. Cacing betina akan menghasilkan mikrofilaria yang dapat ditemukan dalam aliran darah tepi inang. Mikrofilaria dihisap oleh nyamuk dan berkembang menjadi larva di dalam tubuh nyamuk. Larva infektif akan menuju ke probosis dan siap untuk masuk ke hospes melalui gigitan nyamuk.

Filariasis ditemukan di daerah pedesaan, dan menyerang kelompok masyarakat umur dewasa muda yang aktif bekerja sehingga dapat menurunkan produktivitas ekonomi dari suatu komunitas (Oemijati 1986, Partono, 1988).

Di Indonesia, lebih dari 20 juta penduduk tinggal di daerah-daerah endemis filariasis dan kira-kira 3-4 juta dari jumlah tersebut terinfeksi filariasis (Partono dan Bintari, 1989). Dari ke-3 spesies cacing filaria yang menginfeksi manusia (*Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, dan *Brugia timori*), *B. malayi* mempunyai penyebaran yang paling luas di Indonesia.

Penularan penyakit ini terjadi melalui gigitan nyamuk yang mengandung larva infektif. Infeksi yang berulang-ulang pada jangka waktu yang lama dapat menyebabkan mikrofilaremi dan gejala-gejala klinis pada penduduk asli. Pemandang baru ke daerah endemis biasanya lebih rentan terhadap infeksi filariasis

sehingga timbulnya gejala-gejala klinis filariasis lebih cepat dan lebih menderitanya daripada penduduk asli. Sedangkan orang-orang yang melakukan kunjungan ke daerah endemis selama 1 sampai 2 minggu tidak akan terkena filariasis (Partono, 1988).

Perjalanan penyakit filariasis dimulai dengan masa prepaten yang diikuti oleh stadium mikrofilaremia tanpa gejala klinis (mikrofilaremia asimtomatik), stadium akut dan stadium kronik. Pada penduduk asli, masa prepaten bervariasi antara 3-7 bulan dan masa inkubasi klinis antara 2- > 10 tahun. Pada penderitanya ke daerah endemis, perjalanan penyakit filariasis lebih cepat. Stadium akut terjadi dalam waktu 2-3 bulan dan stadium kronik dalam waktu 1-2 tahun, kemudian terjadi mikrofilaremia.

Manifestasi klinis pada stadium akut ditandai dengan demam dan gejala peradangan pada kelenjar limfe (limfadenitis) yang berlangsung 2-5 hari dan dapat sembuh dengan sendirinya tanpa pengobatan. Kadang-kadang peradangan ini menjalar ke pembuluh limfe dan menyebabkan limfangitis retrograd yang terlihat sebagai garis merah yang menjalar ke bawah. Pada stadium ini tungkai bawah biasanya ikut membengkak dan menimbulkan gejala limfedema yang berlangsung beberapa minggu sampai 3 bulan lamanya. Limfedema biasanya hilang lagi setelah gejala peradangan menyembuh, tetapi serangan yang berulang kali menyebabkan elefantiasis. Pada filariasis brugia, elefantiasis mengenai tungkai bawah, di bawah lutut, atau kadang-kadang lengan bawah di bawah siku.



Diagnosis penyakit ini dibuat berdasarkan pemeriksaan gejala-gejala klinis dan dibuktikan dengan pemeriksaan parasitologis yaitu menemukan mikrofilaria di dalam darah tepi.

Untuk pengobatan filariasis, DEC (Diethylcarbamazine citrate) merupakan satu-satunya obat yang telah dipakai secara luas. Obat ini dinilai mempunyai khasiat yang efektif, dan harganya relatif murah meskipun menimbulkan efek samping yang tidak disukai oleh pemakainya seperti pusing, mual dan lain-lain. DEC sudah dibuktikan dapat membunuh mikrofilaria dan cacing dewasa (Partono, 1988). Pada pengobatan filariasis brugia, DEC diberikan dengan dosis 5 mg/kg berat badan selama 10 hari (Partono, 1984).

Sejak tahun 1970 pemerintah telah melakukan program pengendalian filariasis dengan memberikan obat DEC secara massal pada penduduk yang tinggal di daerah endemis. Evaluasi keberhasilan program dilakukan melalui pemeriksaan parasitologis dengan menghitung angka mikrofilaria. Ada beberapa kendala dalam memantau program pengendalian filariasis dengan cara tersebut, yaitu: keengganan penduduk untuk diambil darah malam berulang-ulang, dan mahalnnya biaya untuk pemantauan dan pengambilan darah malam.

Oleh sebab itu dipertimbangkan pemantauan secara entomologis sebagai alternatif pemeriksaan darah malam penduduk. Pemeriksaan entomologis secara konvensional di lapangan dengan cara pembedahan nyamuk langsung di bawah mikroskop memerlukan waktu lama dan tidak dapat membedakan spesies larva filaria. Karena itu perlu dikembangkan cara pemantauan baru yang dapat mengidentifikasi larva *B. malayi* di dalam nyamuk.

Akhir-akhir ini dengan menggunakan bioteknologi telah dikembangkan pelacak DNA. Pelacak DNA untuk parasit *B. malayi*, pBma 68, telah dikembangkan dari plasmid yang mempunyai 2 kopi DNA berulang 322 bp *B. malayi* (McReynolds dkk., 1986). Sim dkk., 1986<sup>a</sup>, telah mengembangkan pelacak DNA, pBm15, yaitu suatu plasmid yang mengandung 4 kopi DNA berulang *B. malayi*. Kedua pelacak DNA tersebut ditandai dengan radioaktif <sup>32</sup>P dan telah dicoba pada tes dot blot. Ternyata hasil dot blot menunjukkan adanya reaksi silang antara pelacak DNA dengan DNA parasit *B. pahangi* (parasit filaria hewan).

Pada tahun 1988, William dkk. membuat suatu pelacak DNA oligonukleotida, yang bertujuan untuk meningkatkan spesifisitas pelacak DNA. Pelacak DNA oligonukleotida dibuat dari daerah sikuen DNA berulang *B. malayi* dan *B. pahangi* yang paling banyak mempunyai perbedaan susunan basanya. Pelacak DNA tersebut mempunyai panjang 29 nukleotida untuk *B. malayi* dan 21 nukleotida untuk *B. pahangi*. Pelacak DNA tersebut ditandai dengan molekul radioaktif dan dicoba pada tes dot blot. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pelacak tersebut spesifik untuk masing-masing parasit *Brugia* dan dapat mendeteksi sampai 0,2 ng DNA.

Ada beberapa kendala penggunaan pelacak DNA yang ditandai dengan molekul radioaktif, yaitu: harganya mahal, mempunyai waktu paruh yang pendek, memerlukan tempat pembuangan khusus, memerlukan latihan khusus untuk menggunakan molekul radioaktif, dan berbahaya bagi pemakainya.

Akhir-akhir ini beberapa penelitian telah dilakukan untuk menandai pelacak DNA dengan molekul non-radioaktif (*biotin*, *digoxigenin* dan *fluorescein*).

Pelacak DNA non-radioaktif ini dapat dideteksi dengan perubahan warna pada membran dapat diamati dengan mata menggunakan reagensia tertentu (*colormetric*) atau memaparkan membran pada film menggunakan reagensia deteksi *chemiluminescent* dan sampel positif dapat terlihat sebagai dot hitam pada film. Adanya perubahan warna pada membran menyebabkan tidak mungkin dilakukannya hibridisasi ulang pada membran (*reprobing*). Dengan deteksi *chemiluminescent* memungkinkan dilakukannya hibridisasi ulang pada membran; misalnya pada diagnosis filariasis, hibridisasi ulang kadang-kadang diperlukan apabila sampel yang akan diuji lebih dari 1 spesies, *B. malayi* dan *B. pahangi*.

Pelacak DNA non-radioaktif kurang sensitif bila dibandingkan dengan pelacak DNA radioaktif. Untuk meningkatkan sensitivitas dan spesifisitas pelacak DNA maka Williams dkk., 1991 (sedang dicetak) membuat suatu pelacak DNA oligonukleotida yang lebih panjang, yaitu: pelacak DNA oligonukleotida dengan panjang 45 nukleotida untuk *B. malayi* (45-mer) dan 44 nukleotida *B. pahangi* (44-mer) yang ditandai pada kedua ujung masing-masing sepanjang 45 nukleotida dengan uridin-biotin yang diselengi timidin. Pelacak DNA tersebut dapat mendeteksi DNA parasit sampai 0,1 ng (sama dengan setengah mikrofilaria) (Supali dkk., 1989). Pelacak DNA 45-mer *B. malayi* yang ditandai dengan biotin masih harus diskriminasi terhadap parasit filaria *B. malayi* dari berbagai daerah di Indonesia untuk dapat digunakan secara luas sebagai alat pemantau program pengendalian filariasis di Indonesia.

Adapun permasalahan utama dalam penelitian ini adalah apakah pelacak DNA *B. malayi* non-radioaktif spesifik dan sensitif pada tes dot blot dan dapat dipakai

sebagai alat pemantau secara entomologis pada program pengendalian filariasis *B. malayi* di Indonesia ?. Ada 7 persyaratan yang harus dipenuhi sebelum pelacak DNA tersebut digunakan sebagai alat pemantau, yaitu:

1. Pelacak DNA *B. malayi* harus dapat dihasilkan dalam jumlah yang tidak terbatas dengan waktu yang relatif singkat.
2. Pelacak DNA harus stabil untuk kurun yang lama.
3. Pelacak DNA *B. malayi* harus spesifik dan sensitif untuk parasit *B. malayi*.
4. Pelacak DNA *B. malayi* dapat bereaksi dengan strain-strain *B. malayi* di Indonesia.
5. Pelacak DNA *B. malayi* harus sensitif untuk mendeteksi 1 larva infeksi *B. malayi* di dalam nyamuk.
6. Tes dot blot tersebut harus dapat diulang.
7. Tes dot blot dengan pelacak DNA harus mudah dilakukan.

## II. Tujuan Penelitian

### Tujuan umum:

Mengembangkan pelacak DNA *Brugia malayi* non-radioaktif pada tes dot blot untuk mendeteksi parasit *B. malayi* dalam nyamuk pada pemantauan program pengendalian filariasis *B. malayi* di daerah-daerah endemis di Indonesia.

### Tujuan khusus:

1. Menentukan konsensus sikuen DNA berulang *B. malayi* di Indonesia

2. Membuat sikuen pelacak DNA *B. malayi* dari konsensus sikuen DNA berulang *B. malayi* di Indonesia.
3. Menghasilkan pelacak DNA yang spesifik untuk *B. malayi* dalam jumlah yang cukup.
4. Menentukan cara terbaik untuk menandai pelacak DNA dengan molekul non-radioaktif.
5. Menentukan spesifisitas dan sensitivitas pelacak DNA pada tes dot blot.
6. Mendeteksi 1 larva infeksi *B. malayi* dalam nyamuk setelah PCR pada tes dot blot dengan menggunakan pelacak DNA molekul non-radioaktif.

### III. Hipotesis

Pelacak DNA *B. malayi* non-radioaktif adalah spesifik dan sensitif pada tes dot blot dan dapat dipakai sebagai alat pemantau secara entomologis pada program pengendalian filariasis *B. malayi* di Indonesia.

### IV. Bahan dan Cara kerja

Penelitian ini dilakukan oleh penulis sendiri di *Department of Biological Sciences, Smith College, USA* dan Bagian Parasitologi, Fakultas kedokteran, Universitas Indonesia sejak tahun 1988-1992 sebagai *sandwich program* untuk program S3 dengan biaya dari *World Health Organization*.

**A. Skrining pelacak DNA *B. malayi* (45-mer) - biotin pada parasit**

***B. malayi* dari berbagai daerah di Indonesia.**

Pelacak DNA *B. malayi* (45-mer) - biotin telah dicoba pada penelitian ini dengan tujuan untuk mengetahui spesifisitas dan sensitivitas terhadap parasit filaria *B. malayi* dari berbagai daerah di Indonesia, yaitu: Kalimantan Timur (zoofilik aperiodik, Lampung (zoofilik subperiodik), dan Kendari (zoofilik subperiodik) dan Buton (antropofilik) sebelum pelacak DNA tersebut digunakan secara luas di Indonesia untuk mendeteksi larva di dalam nyamuk dalam program pemantauan filariasis *B. malayi*.

**B. Menentukan konsensus sikuen DNA berulang *B. malayi* di Indonesia**

Sikuensing DNA berulang *B. malayi* dari berbagai daerah di Indonesia dilakukan untuk menentukan konsensus sikuen DNA berulang *B. malayi* di Indonesia. Untuk keperluan sikuensing tersebut telah dikumpulkan 3 strain *B. malayi* dari beberapa daerah di Indonesia, yaitu: *B. malayi* strain Kendari yang bersifat zoofilik subperiodik, *B. malayi* strain Bengkulu yang bersifat zoofilik subperiodik, dan *B. malayi* strain Buton yang bersifat antropofilik.

**C. Membuat sikuen pelacak DNA *B. malayi* dari konsensus sikuen DNA berulang *B. malayi* di Indonesia.**

Konsensus sikuen DNA berulang *B. malayi* Indonesia dibandingkan dengan konsensus sikuen DNA berulang *B. pahangi* untuk menentukan daerah pada sikuen DNA berulang yang mempunyai perbedaan basa paling banyak. Daerah tersebut

akan digunakan sebagai sikuen pelacak DNA *B. malayi*. Semua analisis data sikuen dilakukan dengan menggunakan program komputer MacVector II (International Biotechnologies Incorporation, New Haven, CT).

**D. Menghasilkan pelacak DNA spesifik untuk *B. malayi* dalam jumlah yang cukup.**

Untuk tujuan pemantauan keberhasilan program pengendalian filariasis *B. malayi* di Indonesia maka pelacak DNA spesifik untuk *B. malayi* harus dapat dihasilkan dalam jumlah yang cukup. Oleh karena itu pelacak DNA yang sudah ditentukan sikuenya harus diklon ke dalam DNA vektor (DNA plasmid bluescript II).

**E. Menentukan cara terbaik untuk menandai pelacak DNA dengan molekul non-radioaktif**

Dua macam kit digunakan untuk melakukan percobaan penandaan pelacak DNA, yaitu:

1. *Dig DNA labelling and detection kit* dari Boehringer Mannheim. Kit dari Boehringer Mannheim menandai pelacak DNA dengan *digoxigenin* melalui teknik *random priming*.
2. *ECL 3'-oligolabelling and detection system* dari Amersham. Kit dari Amersham menandai fragmen pelacak DNA dengan *fluorescein* melalui teknik *end-labelling*.

**F. Menentukan spesifisitas dan sensitivitas pelacak DNA *fluorescein* pada tes dot blot.**

Spesifisitas pelacak DNA *B. malayi* ditentukan dengan hibridisasi pada DNA *B. malayi* dan *B. pahangi* serta *B. malayi* dari berbagai daerah di Indonesia. Sedangkan sensitivitas pelacak DNA ditentukan melalui konsentrasi terendah DNA *B. malayi* yang terdeteksi pada tes dot blot (lampiran 10).

**G. Penggunaan pelacak DNA *fluorescein* untuk mendeteksi 1 larva infeksi dalam nyamuk setelah PCR di laboratorium.**

Pelacak DNA *B. malayi* 153-*fluorescein* digunakan untuk mendeteksi 1 larva infeksi tanpa nyamuk atau dengan adanya nyamuk setelah di PCR pada tes dot blot. Penelitian ini dimaksudkan untuk menguji penggunaan pelacak DNA *fluorescein* sebagai alternatif penggunaan cara entomologis konvensional.

**V. Hasil**

**A. Skrining pelacak DNA *B. malayi* (45-mer) - biotin pada parasit *B. malayi* dari berbagai daerah di Indonesia.**

Pelacak DNA *B. malayi* (45-mer) yang ditandai kedua ujungnya dengan 45-mer uridin-biotin diselingi timidin berhibridisasi dengan parasit *B. malayi* dari berbagai daerah di Indonesia (Kalimantan Timur, Lampung, Kendari) dengan sensitivitas sampai 0,1ng. Pada DNA Buton tidak dilakukan pengenceran sampel. Hal ini disebabkan DNA yang tersedia sangat terbatas. Hanya 1 dot dengan



konsentrasi DNA kira-kira 25 pg dipakai pada tes dot blot ini.

Hasil tes dot blot menunjukkan reaksi silang pelacak DNA dengan DNA *B. pahangi*. Dot DNA *B. malayi* pada 0,1 ng lebih gelap dibandingkan dengan dot DNA *B. pahangi* pada 6.4 ng. Hal ini menunjukkan spesifisitas pelacak DNA pada parasit *B. malayi* 64 kali lebih besar dibandingkan dengan parasit *B. pahangi*.

Pelacak DNA ini juga telah dicoba untuk mendeteksi larva infeksi di dalam nyamuk. Ternyata hasil hibridisasi menunjukkan adanya reaksi silang antara pelacak DNA dengan nyamuk negatif. Hal ini diduga oleh adanya biotin di dalam jaringan nyamuk (biotin merupakan suatu vitamin) yang bereaksi dengan larutan deteksi sehingga dapat terdeteksi.

#### **B. Menentukan konsensus siku DNA berulang *B. malayi* di Indonesia**

Beberapa klon yang mengandung DNA *B. malayi* Kendari, Bengkulu, Buton (DNA rekombinan) telah diperoleh pada skrining hasil kloning dengan pelacak DNA *B. malayi* pBma 68 yang ditandai radioaktif <sup>35</sup>S. Klon DNA rekombinan tersebut terdiri dari 3 klon *B. malayi* strain Kendari (zoofilik subperiodik), 6 klon *B. malayi* strain Bengkulu (zoofilik subperiodik), dan 4 klon *B. malayi* strain Buton (antropofilik). Kemudian semua klon positif tersebut disikuensing. Selanjutnya hasil sikuensing akan dianalisis untuk menentukan siku DNA berulang parasit *B. malayi* dari Indonesia.

**C. Membuat sikuen pelacak DNA *B. malayi* dari konsensus sikuen DNA berulang *B. malayi* di Indonesia.**

Dengan analisis komputer, konsensus sikuen DNA berulang *B. malayi* Indonesia telah ditentukan dengan membandingkan hasil sikuen DNA berulang parasit *B. malayi* dari berbagai daerah di Indonesia (Kendari, Bengkulu, dan Buton). Hasil konsensus sikuen ini dibandingkan dengan konsensus sikuen DNA berulang *B. pahangi* untuk menentukan daerah yang paling banyak mempunyai perbedaan basa.

Ternyata daerah sikuen DNA berulang 238-263 (25 nukleotida) merupakan daerah yang paling banyak mempunyai perbedaan basa-basanya, yaitu 40% atau 10 nukleotida dalam 25 nukleotida dengan persentase basa-basa GC (guanin dan sitosin) pada daerah tersebut juga tinggi yaitu 52%. Oleh karena itu daerah 238 - 263 dipakai sebagai sikuen pelacak DNA.

Hasil analisis 192 enzim pemotong DNA pada komputer menunjukkan bahwa enzim *Mae 2* dapat memotong pada daerah 238 dan tidak ada enzim yang dapat memotong daerah 263 pada DNA berulang. Hasil ini menunjukkan pelacak DNA tidak dapat diperoleh melalui pemotongan enzim pada DNA berulang parasit. Oleh karena itu pelacak DNA 25 nukleotida (25-mer) harus disintesis.

**D. Menghasilkan pelacak DNA spesifik untuk *B. malayi* dalam jumlah yang cukup.**

Pelacak DNA (25-mer) terlalu kecil untuk menjadi pelacak DNA yang efektif

dalam plasmid bluescript II (2961 bp). Oleh karena itu fragmen-fragmen tersebut harus disambung dulu menjadi suatu rantai yang lebih panjang. Untuk menghindari penyambungan DNA dengan orientasi berlawanan maka dibuat linker tambahn 3 nukleotida pada ujung 5' dan 3' fragmen tersebut sehingga panjang total pelacak DNA adalah 31-mer. Linker tambahan 3 nukleotida ini merupakan suatu sikuen DNA yang dapat dipotong dengan enzim pemotong DNA tertentu, yaitu *Nde* I dan *Nsi* I jika fragmen tersambung pada orientasi berlawanan.

Hasil analisis penyambungan fragmen pelacak DNA pada elektroforesis menunjukkan bahwa DNA terpanjang berukuran kira-kira 160 bp. Kemudian DNA tersebut dipisahkan dari DNA yang lebih kecil ukuran dengan menggunakan *centricon-100 microconcentrator*, lalu diklon ke dalam plasmid bluescript II.

Sembilan klon positif didapat pada penyaringan klon dengan pelacak total genom DNA *B. malayi* yang ditandai dengan <sup>35</sup>S. Kemudian dilakukan tes dot blot dengan pelacak DNA total genom DNA *B. malayi* yang ditandai dengan <sup>35</sup>S untuk menentukan klon yang mempunyai pelacak DNA paling panjang (makin hitam dot maka makin panjang pelacak DNA yang ada di dalam plasmid). Ternyata klon nomor 9 memberikan *signal* paling hitam pada tes dot blot.

Hasil analisis sikuen DNA dari 6 klon (yang terdiri dari klon nomor 1,3,5,6,7 dan 9) menunjukkan bahwa klon nomor 9 memang mempunyai pelacak DNA yang paling panjang, yaitu 153 bp yang terdiri dari 6 fragmen 31-mer yang tergabung menjadi satu. Semua fragmen saling menempel pada orientasi yang sama, tetapi ada delesi beberapa nukleotida pada fragmen ke 4 dan ke 6. Fragmen ke 4 hanya

mempunyai 19 nukleotida dan fragmen ke 6 mempunyai 10 nukleotida.

Klon 9 ini mempunyai pelacak DNA paling panjang, karena itu klon 9 digunakan sebagai pelacak DNA dengan nama pelacak DNA *B. malayi* 153.

Selanjutnya klon 9 dipurifikasi dan ditumbuhkan dalam medium cair LBA (*Luria bertani ampicillin*) untuk diisolasi DNA rekombinan yang selanjutnya akan digunakan sebagai pelacak DNA untuk parasit filaria *B. malayi*. Dari 250 ml kultur klon 9 diperoleh DNA rekombinan kira-kira sejumlah 5  $\mu$ g (5000 ng). Jumlah tersebut cukup banyak untuk digunakan sebagai pelacak DNA pada tes dot blot sehingga pelacak DNA memenuhi syarat sebagai alat pemantau. Waktu yang dibutuhkan untuk mendapatkan DNA rekombinan tersebut adalah 24 jam. Hasil ini menunjukkan pelacak DNA dapat dihasilkan dalam waktu relatif singkat jika dibandingkan dengan memesan pelacak DNA karena harus diperhitungkan waktu untuk memesan, membuat, dan mengirimkan pelacak DNA, sesuai dengan kriteria sebagai alat pemantau.

Untuk menghindari hilangnya klon positif sebaiknya klon disimpan dalam 2 macam cara penyimpanan, yaitu dalam etanol sebagai DNA rekombinan dan gliserol sebagai sel bakteri *E. coli* yang mengandung DNA rekombinan pada  $-20^{\circ}\text{C}$ . Klon dapat disimpan pada penyimpanan tersebut di atas untuk beberapa tahun. Jika karena sesuatu hal klon positif tersebut hilang, maka cara untuk mengatasinya adalah mensintesis kembali pelacak DNA dengan sikuen yang sama. Dari uraian ini dapatlah dikatakan bahwa pelacak DNA *B. malayi* 153 mempunyai kestabilan yang baik, dan hal ini memenuhi syarat sebagai alat pemantau.

**E. Menentukan cara terbaik untuk menandai pelacak DNA *B. malayi* 153 dengan molekul non-radioaktif.**

Pada penelitian ini ternyata bahwa penandaan pelacak DNA *B. malayi* 153 dengan *digoxigenin* dan tahap purifikasinya memerlukan waktu sekitar 4 jam. Pelacak DNA *B. malayi* 153 yang ditandai dengan *digoxigenin* tidak memberikan hasil hibridisasi yang bersih pada membran karena memberikan latar belakang berupa titik-titik hitam sehingga menyulitkan pembacaan hasil.

Cara penandaan pelacak DNA *B. malayi* 153 dengan *fluorescein* lebih cepat dibandingkan dengan *digoxigenin*, yaitu hanya memerlukan waktu 1 jam pada suhu 37°C (sesuai dengan protokol). Selain itu tidak diperlukan purifikasi untuk memurnikan pelacak DNA yang sudah ditandai. Pelacak DNA *B. malayi* 153 yang sudah ditandai dapat diketahui dengan cara deteksi yang sangat cepat dalam waktu kira-kira 30 menit.

Sistem penandaan pelacak dengan *fluorescein* pada ujung 3' dibuat khusus untuk menandai pelacak DNA yang berukuran  $\leq 50$  nukleotida. Untuk mendapatkan fragmen pelacak DNA *B. malayi* 153 maka dilakukan PCR pada DNA rekombinan klon 9. Hasil analisis reaksi PCR pada gel agarose, diketahui bahwa ukuran fragmen yang diperoleh dari reaksi PCR sekitar 440 bp. Kemudian hasil PCR ini dianalisis pada southern blot yang dihibridisasi dengan pelacak DNA *B. malayi* 31-mer yang ditandai dengan 3' *fluorescein*. Hasil *southern blot* menunjukkan PCR memperbanyak DNA pada sikuen yang spesifik yaitu sikuen pelacak DNA *B. malayi* 153 bp. Kemudian fragmen tersebut ditandai dengan *fluorescein* dan dicoba pada tes dot blot. Hasil tes dot blot memberikan latar

belakang yang bersih pada membran sehingga pembacaan hasil lebih mudah. Oleh karena itu penandaan pelacak DNA *B. malayi* 153 dengan *fluorescein* dipakai pada penelitian ini.

**F. Menentukan spesifisitas dan sensitivitas pelacak DNA *B. malayi* 153-*fluorescein* pada tes dot blot.**

Untuk menentukan spesifisitas pelacak DNA *B. malayi* 153 dilakukan hibridisasi pelacak DNA *B. malayi* 153 dengan DNA *B. pahangi* dan DNA *B. malayi* dari Kalimantan Timur, Lampung, dan Kendari. Hasil hibridisasi menunjukkan bahwa pelacak DNA *B. malayi* 153 tidak bereaksi silang dengan DNA *B. pahangi* dan dapat mendeteksi DNA *B. malayi* dari Kalimantan Timur, Lampung, dan Kendari.

Penentuan sensitivitas pelacak DNA *B. malayi* 153 dilakukan dengan melakukan pengenceran konsentrasi DNA *B. malayi* dari 6,4 ng sampai 0,1 ng. Hasil tes dot blot menunjukkan bahwa pelacak DNA *B. malayi* 153 dapat mendeteksi DNA parasit *B. malayi* sampai konsentrasi DNA 0,1 ng (sama dengan DNA setengah mikrofilaria).

Dari hasil spesifisitas dan sensitivitas di atas, dapat diketahui bahwa pelacak DNA *B. malayi* 153-*fluorescein* memenuhi kriteria sebagai alat pemantau.

**G. Penggunaan pelacak DNA *B. malayi* 153-*fluorescein* untuk mendeteksi 1 larva infeksi dalam nyamuk setelah PCR di laboratorium.**

Hasil PCR menunjukkan bahwa DNA berulang 1 L3 *B. malayi* atau *B. pahangi* telah berhasil diperbanyak tanpa atau dengan adanya berbagai jumlah nyamuk. Meningkatnya jumlah nyamuk yang dipakai dalam reaksi PCR menyebabkan hasil PCR yang tidak konsisten.

Hasil reaksi PCR pada gel agarose (elektroforesis) menunjukkan bahwa panjang pita yang diperoleh sesuai dengan yang diinginkan yaitu 322 bp. Pita trimer dan dimer teramati secara samar pada sampel 1 L3 tanpa jaringan nyamuk. Tidak ada pita yang teramati pada hasil PCR nyamuk negatif.

Hasil tes dot blot menunjukkan bahwa pelacak DNA *B. malayi*153-*fluorescein* mampu mendeteksi 1  $\mu$ l sampel hasil PCR dari penggerusan 1 larva infeksi *B. malayi* dalam berbagai jumlah nyamuk negatif (1,3,5 nyamuk negatif). Intensitas *signal* yang dihasilkan sampel 1 larva infeksi tanpa nyamuk tidak berbeda dengan intensitas *signal* yang dihasilkan oleh sampel 1 larva infeksi dengan berbagai jumlah nyamuk negatif. Selain itu juga tidak ditemukan reaksi silang antara pelacak DNA dengan hasil PCR larva infeksi *B. pahangi*, nyamuk negatif, DNA nyamuk dan DNA manusia.

Hasil pengulangan tes dot blot untuk mendeteksi 1 L3 *B. malayi* tanpa nyamuk dan 1 L3 *B. malayi* dalam berbagai jumlah nyamuk negatif (3, 5) sebanyak lima kali tes memberikan hasil yang konsisten. Dengan demikian memenuhi syarat sebagai alat pemantau.

Tes dot blot cocok untuk pengujian sampel dalam jumlah besar karena *dot blot apparatus* dapat menguji 96 sampel. 1 sampel terdiri dari 5 nyamuk maka 96 sampel dapat mengolah 480 nyamuk. Pada tahap hibridisasi, membran dapat dihibridisasi saling membelakangi maka jumlah sampel yang dapat diolah adalah  $2 \times 96 \text{ sampel} \times 5 \text{ nyamuk} = 960 \text{ nyamuk}$  dengan waktu kerja selama 25 jam.

Keuntungan tes dot blot dengan pelacak DNA adalah bahwa sampel nyamuk yang dikumpulkan di lapangan tidak perlu langsung diproses di tempat, tetapi dapat disimpan dalam larutan pengawet 100 mM EDTA untuk dikirim ke laboratorium rujukan.

## VI. Kesimpulan

Pelacak DNA *B. malayi* yang ditandai dengan *fluorescein* pada tes dot blot dapat dipakai sebagai alat pemantau pada program pengendalian filariasis di Indonesia, karena:

1. Pelacak DNA *B. malayi* 153 dapat dihasilkan dalam jumlah banyak melalui kloning dengan waktu relatif singkat pada kultur selama 24 jam di Indonesia.
2. Pelacak DNA tersebut cukup stabil untuk kurun waktu yang lama. Klon positif yang mengandung pelacak DNA dapat disimpan untuk beberapa tahun. Selain itu jika klon positif hilang karena suatu hal maka pelacak DNA dengan sikuen yang sama dapat disintesis kembali.
3. Pelacak DNA *B. malayi* 153-*fluorescein* adalah spesifik untuk parasit *B. malayi* dan dapat mendeteksi DNA *B. malayi* sampai konsentrasi 0,1 ng (setara dengan setengah DNA mikrofilaria).



4. Pelacak DNA *B. malayi* 153-*fluorescein* bereaksi dengan strain-strain *B. malayi* di Indonesia, yaitu *B. malayi* strain Kalimantan Timur (zoofilik aperiodik), *B. malayi* strain Lampung (zoofilik subperiodik), dan *B. malayi* strain Kendari (zoofilik subperiodik).
5. Pelacak DNA *B. malayi* 153-*fluorescein* sensitif untuk mendeteksi hasil PCR dari penggerusan 1 larva infeksi *B. malayi* di dalam 5 nyamuk negatif pada tes dot blot.
6. Hasil pengulangan pelacak DNA *B. malayi* 153-*fluorescein* pada tes dot blot konsisten.
7. Pelacak DNA *B. malayi* 153-*fluorescein* pada tes dot blot mudah dilakukan karena nyamuk dapat dikumpulkan dalam larutan pengawet 100 mM EDTA dan dikirim ke laboratorium rujukan. Tes tersebut dapat mengolah 960 nyamuk dalam waktu 25 jam kerja dan dapat membedakan spesies filaria *B. malayi* dari parasit filaria hewan *B. pahangi*.

Dari uraian tersebut di atas dapat disimpulkan bahwa pada penelitian telah dihasilkan suatu pelacak DNA *B. malayi* 153 baru yang dapat ditandai dengan molekul non-radioaktif *fluorescein*. Pelacak DNA *B. malayi* 153-*fluorescein* tersebut spesifik dan sensitif pada tes dot blot dan dapat digunakan sebagai alat pemantau secara entomologis pada program pengendalian filariasis *B. malayi* di Indonesia, karena sudah memenuhi ke tujuh persyaratan yang ditentukan sehingga hipotesis dapat diterima.

## VII. Saran

1. Pengembangan tes lebih lanjut perlu dilakukan dengan cara meningkatkan jumlah nyamuk pada tiap sampel sehingga harga per sampel dapat diturunkan.
2. Uji lapangan pelacak DNA *B. malayi* 153-*fluorescein* perlu dilakukan di daerah-daerah endemis *B. malayi* untuk memantau keberhasilan program pengendalian filariasis.
3. Laboratorium rujukan untuk pemeriksaan tes dot blot dengan pelacak DNA *B. malayi* 153 perlu didirikan di dua tempat, yaitu di Indonesia bagian Barat dan di Indonesia bagian Timur.
4. Pembuatan pelacak DNA *B. malayi* 153 ditawarkan kepada badan industri untuk diproduksi dalam jumlah banyak (skala nasional).

## SUMMARY, CONCLUSIONS AND SUGGESTIONS

### I. Introduction

Human lymphatic filariasis is a disease resulting from an infection with a nematode parasite from which the infective larvae will develop into the female and male adult worms in the lymph vessels and lymph nodes. The females produce microfilariae which circulate in the peripheral blood. The microfilariae will develop into larvae in the mosquitoes. The infective larvae will actively move to the proboscis and ready to enter the human host through the wound made by mosquitoes.

The disease is an important public health problem in the rural and slum areas of many tropical and subtropical countries, predominantly affecting the young and active working people; therefore it will significantly decrease the economic productivity of the community (Oemijati, 1986, Partono, 1988).

In Indonesia, more than 20 million people live in endemic areas and approximately 3-4 million are currently infected (Partono & Rukmono, 1989). From the three species of filarial parasites infecting man (*Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, and *Brugia timori*), *B. malayi* is the major parasite and is widely distributed throughout the Indonesian islands.

The transmission of the disease occurs through the bite of a vector mosquito containing third stage (infective) filarial larvae. Repeated infections over a long period are apparently necessary for the development of microfilaraemia or clinical filariasis among natives. Migrants from non-endemic to endemic filaria areas are prone to develop clinical filariasis within a short time but people making brief visits of 1-2 weeks to endemic areas are probably not at risk (Partono, 1988).

The course of lymphatic filariasis starts with the prepatent period, followed by asymptomatic microfilaraemia, acute and then chronic filariasis. The prepatent period lasts 3-7 months, and the clinical incubation period varies from 2 to more than 10 years among natives. In migrants moving from non-endemic to endemic filarial areas, lymphatic filariasis runs an accelerated course: acute clinical filariasis may develop within 2-3 months, and chronic clinical filariasis within 1-2 years. Microfilaraemia develops much later.

The acute clinical manifestations of lymphatic filariasis are characterized by episodic attacks of lymphadenitis associated with fever for 2-5 days and usually heal spontaneously. Sometimes lymphadenitis is followed by a characteristic retrograde lymphangitis. At this stage, there is often lymphoedema of the foot or ankle. The acute clinical course with its complication may last from several weeks to 3 months. Usually, the oedema subsides after each episodic attack, but with repeated attacks the oedema persists, leading to chronic lymphoedema and ultimately to elephantiasis. Characteristically in brugian filariasis, elephantiasis involves the leg below the knee, but occasionally it affects the arm below the elbow.

The diagnosis can be made by examinations of the clinical manifestations and by finding microfilariae in blood samples.

Filariasis control program has been launched by the government since 1970. DEC is used to treat the people in the endemic areas. The evaluation of the control program is done by determining the microfilaria rate in the night blood of the treated people. There are several constraints in monitoring the progress of control program with this method. Firstly, the reluctance of the people to undergo repeated examination of their night blood. Secondly, the high costs

associated with night blood surveillance of the infected communities which have to be paid by the control program.

An entomological assessment is considered as an alternative tool to monitor the progress of the control program. However, conventional entomological assessment method through direct mosquitoes dissection under the microscope can not distinguish the infective larvae of different filarial species found in mosquitoes. Therefore, there is a need to develop a new tool which can determine exclusively infective larvae of *B. malayi* in mosquitoes to order to monitor the progress of the control program.

In recent years, DNA probes have been developed using biotechnology. *B. malayi* DNA probe, pBma 68, has been made from a plasmid which contained two copies of the *Hha* I repeat sequence of *B. malayi* (McReynold et al., 1986). Sim et al., (1986\*) developed another plasmid probe called pBm15 that contained 4 copies of repeated sequences of *B. malayi*. These probes were labelled with radioactive molecule  $^{32}\text{P}$  and tested in a dot blot assay. The dot blot hybridization assay showed that the probes revealed cross-hybridization to genomic *B. pahangi* DNA.

The species-specificity of the probe could be improved by constructing a oligonucleotide probe based on the most divergent region in comparing the consensus sequences of *B. malayi* to *B. pahangi* (Williams et al., 1988). The probes are 29 (*B. malayi*) and 21 (*B. pahangi*) nucleotides long. These radiolabelled oligonucleotides probe have been used in dot blot hybridization assay. The results showed that the probes were specific for its parasite and sensitive enough to detect 0.2 ng DNA. The radiolabelled probes are not suitable for field use, because they are expensive, have a short shelf-life, need special

training for handling and laboratories for their use and disposal to avoid potential health hazards.

Various non-radioactive molecules have been developed to label the DNA probe (biotin, digoxigenin, and fluorescein). The non-radioactive probes can be detected by colorimetric detection system observed by naked eyes or chemiluminescent detection system which can be exposed to the X-ray film and a positive result gives a black dot on the film. Usage of the colorimetric detection has several limitations in the reprobing technique of the membranes. This problem can be solved by using a chemiluminescent detection system.

The non-radioactive probes are not as sensitive as the radioactive probes. Williams et al, 1991 (in press) designed the new longer oligonucleotide probes for *B. malayi* and *B. pahangi* in order to increase the sensitivity and specificity. The size of the probes were 45-mer *B. malayi* and 44-mer *B. pahangi* respectively. Each probe was labelled with uridin-biotin alternated thymidine on both tails of the probe. The probes were specific for each parasite and sensitive to detect 0.1 ng DNA (equivalent to half microfilaria) (Supali et al., 1989). The *B. malayi* biotinylated probe needs to be screened against Indonesian *B. malayi* before it can be used as a tool to monitor the progress of the control program in *B. malayi* endemic areas.

The main problem of this experiment is whether a new non-radioactive *B. malayi* probe which is specific and sensitive in the dot blot assay can be used as a tool in the entomological assessment for monitoring the progress of the filariasis control program in *B. malayi* infected areas of Indonesia ?. There are 7 requirements to be fulfilled before the probe can be widely used:

1. The probe should be produced in a sufficient quantity in a relatively short

period in Indonesia.

2. The probe should be stable.
3. The probe should be specific and sensitive for *B. malayi* parasite.
4. The probe should be able to hybridize with the Indonesian *B. malayi* strains.
5. The probe should be sensitive enough to detect 1 L3 in mosquitoes.
6. The dot blot assay should be reproducible.
7. The dot blot assay should be simple.

## II. The objective of the experiment

### General objective:

To develop a non-radioactive *Brugia malayi* DNA probe which is specific and sensitive in dot blot assay against *B. malayi* filarial parasite in mosquitoes for monitoring the progress of filariasis control program in *B. malayi* infected areas of Indonesia.

### Specific objectives:

1. To determine the repeated sequences of Indonesian *B. malayi* strains
2. To design a new *B. malayi* DNA probe from the Indonesian *B. malayi* consensus sequence.
3. To produce a *B. malayi* specific DNA probe in sufficient quantities
4. To determine a suitable non-radioactive labelling system
5. To determine specificity and sensitivity of the probe in a dot blot assay
6. To detect a *B. malayi* infective larva in mosquitoes in a dot blot assay after PCR amplification

### III. Hypothesis:

A new non-radioactive *B. malayi* DNA probe which is specific and sensitive in a dot blot assay can be used as a tool in the entomological assessment for monitoring the progress of the filarial control program in *B. malayi* infected areas of Indonesia.

### IV. Materials dan methods

The experiments were carried out at the Department of Biological Sciences, Smith College, USA and the Department of Parasitology, Faculty of Medicine, University of Indonesia since 1988-1992 as a sandwich program for Ph.D degree financed by World Health Organization.

#### A. Screening the 45-mer biotinylated *B. malayi* DNA probe to different Indonesian *B. malayi* strains

The 45-mer biotinylated *B. malayi* probe was tested against various strains of *B. malayi* from Indonesia in order to determine the specificity and sensitivity of the probe before it is widely used as a tool for monitoring the progress of *B. malayi* filariasis control program in mosquitoes.

#### B. Determining the repeated sequences of the Indonesian *B. malayi* strains

Several Indonesian *B. malayi* strains, Kendari strain (subperiodic zoophilic), Bengkulu strain (subperiodic zoophilic), and Buton strain (antropophilic) need to be sequenced in order to determine the consensus sequence of the Indonesian *B. malayi* *Hha* I repeated sequence.



### C. Designing a new *B. malayi* oligonucleotide probe

Hha I repeats cloned from different Indonesian *B. malayi* were sequenced. The *B. malayi* sequence comparison was done in order to find the Indonesian *B. malayi* consensus sequence. The *B. malayi* consensus sequence obtained was compared to the *B. pahangi* consensus to find the most divergent region of the 322 base pair repeat which will be used as the sequence of the new *B. malayi* probe. All sequence analysis were done <sup>by</sup> using computer analysis program, Mac Vector II (International Biotechnologies Incorporation, New Haven, CT).

### D. Producing the *B. malayi* probe in a sufficient quantity

For monitoring the success of *B. malayi* filariasis control program, the probe should be produced in sufficient quantities in Indonesia. Therefore, the probe has to be cloned into vector DNA (Bluescript plasmid).

### E. Determining the suitable non-radioactive labelling system for the probe

Two different non-radioactive labelling systems were used in the experiment:

1. Dig DNA labelling and detection kit from Boehringer Mannheim. The kit uses digoxigenin as a non-radioactive molecule to label the probe in random priming technique.
2. ECL 3'-oligolabelling and detection system from Amersham. The kit uses fluorescein as a non-radioactive molecule to label the probe in end labelling priming technique.

**F. Determining the specificity and sensitivity of the *B. malayi* fluorescein labelled DNA probe in a dot blot assay**

The specificity of the *B. malayi* fluorescein labelled DNA probe was determined by hybridization the probe to *B. pahangi* DNA and *B. malayi* DNA from different Indonesian strains. Doubling dilution ranging from 6.4 ng to 0.1 ng of the DNAs were used in the dot blot assay in order to know the sensitivity of the probe. The sensitivity of the probe was determined by the lowest concentration of DNA detected by the probe.

**G. Detection of 1 infective larva in mosquitoes using the *B. malayi* fluorescein labelled DNA probe at the laboratory**

The *B. malayi* fluorescein labelled DNA probe was used to detect 1 infective larva without or with the different numbers of uninfected mosquitoes after PCR in the dot blot assay.

**V. Results**

**A. Screening the 45-mer biotinylated *B. malayi* DNA probe to different Indonesian *B. malayi* strains**

The 45-mer *B. malayi* DNA probe which had been labeled with 45-mer uridin-biotin alternated thymidine hybridized to all of Indonesian *B. malayi* strains tested (East Kalimantan strain, Lampung strain, Kendari strain). The probe was sensitive enough to detect 0.1 ng of all strains. There was no doubling dilutions for *B. malayi* from Buton isolate because of limited amounts of DNA sample available. Only one spot of a very small amount of DNA (25 pg) was used in the assay.

There was<sup>a</sup> cross-hybridization of the *B. malayi* probe to *B. pahangi*, but the *B. malayi* probe hybridized much more strongly to *B. malayi* DNA. A dot containing 0.1 ng of *B. malayi* DNA was darker than a dot of 6.4 ng *B. pahangi* DNA. Therefore, the specificity was greater than 64-fold.

The 45-mer biotinylated *B. malayi* DNA probe cross hybridized to uninfected mosquitoes. This might be due to endogenous biotin present in the bodies of the mosquitoes which reacted to the detection system.

#### **B. Determining the repeated sequences of the Indonesian *B. malayi* strains**

Several positive clones were found in the screening clones using the radioactive (<sup>35</sup>S) labelled pBma 68. There were 3 positive clones of *B. malayi* Kendari strain (subperiodic zoophilic), 6 positive clones of *B. malayi* Bengkulu strain (subperiodic zoophilic), and 4 positive clones of *B. malayi* Buton strain (antropophilic). The positive clones were then sequenced and analyzed in order to determine the consensus sequence of the Indonesian *B. malayi* Hha I repeated sequence.

#### **C. Designing a new *B. malayi* oligonucleotide probe**

The *B. malayi* sequence comparison was done in order to find the Indonesian *B. malayi* consensus sequence. The *B. malayi* consensus sequence obtained was compared to *B. pahangi* consensus to find the most divergent region of the 322 bp repeat. The region 238-263 (25 nucleotides in length) showed maximum difference (40% or 10 nucleotides different in 25 nucleotides) and GC rich (52%). Therefore, this divergent region was used as a sequence for a new *B. malayi* DNA probe.

Restriction enzymes analysis using 192 enzymes was also done in the computer program to find those enzymes that would cut within 25 nucleotides of this divergent region. The results showed that only one enzyme, *Mae* 2, cut the 238 region and no enzyme cut the 263 region. Therefore, two complementary oligonucleotides based on that region were synthesized.

#### D. Producing the *B. malayi* probe in a sufficient quantity

The 25-mer oligonucleotides probe was too small to be an effective probe in a plasmid bluescript II (2961 bp), so it needed to be ligated to make a longer chain. When two 25 mers were ligated together, there were 2 possible orientations produced: the same orientation or reverse orientation of the ligated probe. The same orientation of the ligated probe was needed in order to avoid secondary structure of the probe when it was melted for use as a hybridization probe. To avoid cloning of the reverse ligated probe, 3 nucleotides of additional linker DNA was synthesized on both the 5' and 3' side of the probe (which made the total size of the probe 31 nucleotides). Ligation of the probe with the 3'-mer ends in reverse orientation resulted in the creation of restriction sites that could be cut by restriction enzymes *Nde* I or *Nsi* I.

The ligation of oligonucleotides was run on a gel to estimate the size of the ligation products. The largest size of the fragment was about 160 bp. The 160 bp fragments were then concentrated using the centricon-100 microconcentrator. The fragment was cloned into the plasmid bluescript II vector.

Nine positive clones were obtained by screening the white colonies with <sup>35</sup>S labelled genomic *B. malayi* DNA. The DNA was isolated and tested in a dot blot assay probed with <sup>35</sup>S labelled genomic *B. malayi* DNA in order to ascertain which

clones had the largest inserts. From the assay, it was found that clone 9 gave the darkest signal.

Using signal intensity as a measurement, six clones (1, 3, 5, 6, 7, 9) were chosen for DNA sequence analysis. Clone 9 showed to have the largest insert of multiple 31-mer oligonucleotides. This clone contained a 153 bp insert that consisted of 6 copies of the 31-mer fragment. All fragments ligated were in the same orientation. Some nucleotides in the fourth and the sixth repeats were deleted. The fourth repeat of 31-mer was only 19 nucleotides long and the sixth repeat was only 10 nucleotides long.

Since clone 9 was the only clone containing the largest insert so it was decided to use it as a *B. malayi* DNA probe and was named *B. malayi* DNA probe 153.

The clone 9 was then purified and grown in the LBA (*Luria bertani ampicillin*) medium for recombinant DNA isolation. From 250 ml culture of clone 9 in LBA medium, 5 ug of recombinant DNA could be harvested. The time required for producing the recombinant DNA was only 24 hours working time. This result showed that the time needed to produce the probe was relatively short in comparison with the time needed for buying a probe, as the ordering, production, and sending of the probe would be time-consuming and expensive.

The positive clone could be maintained either in ethanol as the recombinant DNA or in glycerol as the *E. coli* bacteria containing the recombinant DNA at -20 °C, which is stable for several years. If the positive clone is lost, the DNA

probe with the same sequence can be synthesized again accurately using DNA synthesizer. Therefore, the DNA probe is stable.

#### **E. Determining the suitable non-radioactive labelling system for the probe**

By comparing two different labelling systems, it was found that the time for processing the fluorescein labelling system was shorter than the digoxigenin labelling system. The digoxigenin labelling system and purification step needed 4 hours and the probe gave a dirty background in the dot blot assay. The fluorescein labelling system needed only 1 hour labelling time at 37°C. The labelled probe could be monitored using a rapid method within 30 minutes and could be directly used without purification step.

Fluorescein labelling system was designed to label short oligonucleotide DNA i.e. 50 nucleotides or less. In order to obtain a DNA fragment of the *B. malayi* DNA probe 153, the recombinant DNA of clone 9 was amplified by PCR. The electrophoresis analysis showed that the fragment size of the PCR product was about 440 bp. This gel was then southern blotted and hybridized with fluorescein labelled 31-mer *B. malayi* DNA probe. The southern blot result showed that the PCR amplified the right sequence of the *B. malayi* DNA probe 153. The fragment was then labelled with fluorescein and tested in a dot blot assay. The dot blot assay showed that there was no background observed, therefore the fluorescein labelling system was used in these experiments.

#### **F. Determining the specificity and sensitivity of the *B. malayi* fluorescein labelled DNA probe in a dot blot assay**

The specificity of the *B. malayi* DNA probe 153 was determined by

hybridization of the probe to the Indonesian *B. malayi* strains, East Kalimantan (aperiodic zoophilic), Lampung (subperiodic zoophilic), Kendari (subperiodic zoophilic) and *B. pahangi* (animal filarial parasite). There was no cross-hybridization observed in a dot blot assay. The sensitivity of the probe was determined in the dot blot assay using doubling dilution of *B. malayi* DNA ranging from 6.4 ng to 0.1 ng. The probe showed to be highly sensitive, and the limit of detection was approximately 0.1 ng of *B. malayi* DNA.

#### **G. Detection of 1 infective larva in mosquitoes using the *B. malayi* fluorescein labelled DNA probe at the laboratory**

The PCR results showed that the Hha I DNA repeats were successfully amplified from one infective larvae without or with 5 mosquitoes debris being present. Since the method was constantly reproducible, it was decided to increase the number of mosquitoes added to one L3, but the results were inconsistent.

On the electrophoresis gel, the bands of the PCR product were approximately seen in the 322 bp region, the size expected for Hha I repeat DNA. A dimer and trimer were also faintly visible in L3 samples only. No 322 bp band was observed in mosquito samples.

The dot blot hybridization assay demonstrated that the probe could detect 1  $\mu$ l of the PCR product of the squashed 1 L3 *B. malayi* in the presence of different uninfected mosquitoes numbers (1,3,5 uninfected mosquitoes). There was no differences in the sensitivity of the probe in the amplified product of one L3 with or without mosquitoes. There was no cross hybridization observed in the dot blot hybridization with either *B. pahangi* amplified DNA, uninfected mosquito

amplified DNA, human and mosquito DNA. The results of the repeated dot blot assay showed that the assay was consistent.

The dot blot assay could handle 96 samples. 1 sample contained 5 mosquitoes, therefore 96 samples could process 480 mosquitoes. Since the membrane could be hybridized back to back, twice as 480 mosquitoes: that is 960 mosquitoes could be processed in 25 hours in a dot blot assay.

The advantage of using *B. malayi* DNA probe 153-*fluorescein* in the dot blot assay is the preservation of the collected mosquitoes in 100mM EDTA and then sent from the field to the reference laboratory.

## VI. Conclusions

The *fluorescein* labelled *B. malayi* DNA probe 153 was produced in this experiment. The probe could be used as a tool in the entomological assessment for monitoring the progress of the filariasis control program, because of:

1. The *B. malayi* DNA probe 153 can be produced in a sufficient quantity in a relatively short period in Indonesia through cloning technique.
2. The *B. malayi* DNA probe 153 is stable. The probe is stable either in ethanol or gliserol for several years. If the probe is lost for some reason, the probe with the same sequence can be synthesized again accurately.
3. The *fluorescein* labelled *B. malayi* DNA probe 153 is specific for *B. malayi* parasite and is sensitive enough to detect 0.1 ng *B. malayi* DNA (equivalent to half DNA of microfilaria).
4. The probe hybridized to Indonesian *B. malayi* strains, i.e. East Kalimantan strain (aperiodic zoophilic), Lampung strain (subperiodic zoophilic) and Kendari strain (subperiodic zoophilic).



4. The *fluorescein* labelled *B. malayi* DNA probe 153 is sensitive enough to detect the PCR product of the squashed one *B. malayi* infective larva in the presence of 5 uninfected mosquitoes in the dot blot assay.
5. The repeated dot blot assay gives consistent results.
6. The dot blot assay using *fluorescein* labelled *B. malayi* DNA probe 153 can be performed accurately and with ease. The collected mosquitoes can be preserved in 100mM EDTA and can be directly sent from the field to the reference laboratory. An assay is able to process 960 mosquitoes.

## VII. Suggestions

1. To conduct further studies by developing assay using more mosquitoes in each sample in order to decrease the price of the assay.
2. To conduct field trial of the *fluorescein* labelled *B. malayi* DNA probe 153 in *B. malayi* infected areas in order to evaluate the progress of the filaria sis control program.
3. To set up reference laboratories for the assay, one in West Indonesia and one in East Indonesia.
4. To open negotiations with the industrial companies for mass-production of the new *B. malayi* DNA probe (*B. malayi* DNA probe 153).

## DAFTAR RUJUKAN

- Aikat T.K. and Das M. 1976. A modified statistical method for analysis of periodicity of microfilaria. *FIL/76.142*. World Health Organization, Geneva. Switzerland.
- Barker D.C. 1989. Molecular approaches to DNA diagnosis. *Parasitology* **99**, S125-S146.
- Beaver P.C., Jung R.C, and Cupp E.W. 1984. The filariae, dalam *Clinical Parasitology*, hal. 350-399. Ninth Edition. Lea and Febiger, Philadelphia.
- Bell D.A. and DeMarini D.M. 1991. Excessive cycling converts PCR product to random length higher molecular weight fragments. *Nucl. Acids Res.* **19**, 5079.
- Brown T.A. 1986. Vehicles: plasmids and bacteriophages, dalam *Gene Cloning an Introduction*, hal. 10-22. The Thetford Press Ltd, Thetford, Norfolk.
- Carlow C.K.S., Franke E.D., Lowrie R.C., Partono F., and Philipp M. 1987. Monoclonal antibody to a unique surface epitope pf the human filaria *Brugia malayi* identifies infective larvae in mosquito vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 6914-6918.
- Carlson D.P., Superko C., Mackey J., Gaskill M.E., and Hansen P. 1990. Chemiluminescent detection of nucleic acid hybrdization. *Focus* **12**, 9-12.
- Caruthers M.H. 1985. Gene synthesis machine: DNA chemistry and its uses. *Science* **230**, 281-285.
- Dawkins H.J.S. and Spencer T.L. 1989. The isolation of nucleic acid from nematodes requires an understanding of the parasite and its cuticular structure. *Parasitology Today* **5**, 7376.
- Denham D.A., Dennis D.T., Ponnudurai T., Nelson G.S., and Guy F. 1971. Comparison of a counting chamber and thick smear methods of counting microfilariae. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **65**, 521-526.
- Denham D.A. and McGreevy P.B. 1977. Brugian filariasis: Epidemiological and experimental studies, dalam *Advances in Parasitology* (Dawes B. ed.). Academic Press, Inc., New York.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia: Badan Penelitian dan pengembangan kesehatan. 1990. Peta masalah kesehatan per propinsi di Indonesia.

- Departemen kesehatan Republik Indonesia, Direktorat Jenderal Pemberantasan Penyakit Menular dan Penyehatan Lingkungan Pemukiman. 1991. Petunjuk pelaksanaan pemberantasan penyakit kaki gajah di puskesmas.
- Dissanayake S. and Piessens W. 1990. Cloning and characterization of a *Wuchereria bancrofti*-specific DNA sequence. Mol. Biochem. Parasitol. **39**, 147-150.
- Dover G. 1982. Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. Nature **299**, 171-173.
- Erlich H.A., Gelfand D., and Sninsky J.J. 1991. Recent advances in the polymerase chain reaction. Science **252**, 1643-1651.
- Gebeyehu G., Rao P.Y., Chan P.S., Simms D.A., and Klevan L. 1987. Novel biotinylated nucleotide-analogs for labeling and colorimetric detection of DNA. Nucl. Acids Res. **15**, 4513-4534.
- Greene B. 1989. A new drug for Onchocerciasis-Ivermectin. World Health Organization proceeding on Workshop on DNA Diagnosis and Filariasis and Symposium on Filariasis and Onchocerciasis, Jakarta, Indonesia, 18-20 December 1989.
- Hide G., Cattand P., LeRay D., Barry J.D., and Tait A. 1990. The identification of *Trypanosoma brucei* subspecies using repetitive DNA sequences. Mol. Biochem. Parasitol. **39**, 213-226.
- Hotlke H.J., Sagner G., Kessler C., and Schmitz G. 1992. Sensitive chemiluminescent detection of digoxigenin-labeled nucleic acids: a fast and simple protocol and its applications. Biotechniques **12**, 104-113.
- Hussain R., Hamilton R.G., Kumaraswami V., Adkinson N.F. and Ottesen E.A. 1981. IgE responses in human Filariasis: Quantitation of filaria-specific IgE. I. Immunol. **127**, 1623 - 1628.
- Jelinek W.R. 1982. Repetitive sequences in eukaryotic DNA and their expression. Ann. Rev. Biochem. **51**, 813-844.
- Kaushal N.A., Hussain R., and Ottesen E.A. 1984. Excretory-secretory and somatic antigens in the diagnosis of human filariasis. Clin. Exp. Immunol. **56**, 567 - 576.
- Keller, G.H. and Manak M.M. 1989. DNA probes. Macmillan Publishers Ltd., the United Kingdom.

- Knott, J. 1939. A method for making microfilarial surveys on day blood. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. **33**, 191-196.
- Kumar R. 1989. The technique of polymerase chain reaction. Technique **1**, 133-152.
- Kumaraswami. 1989. A new drug for lymphatic filariasis-Ivermectin. World Health Organization proceeding on Workshop on DNA diagnosis and filariasis and symposium on filariasis and onchocerciasis, Jakarta, Indonesia, 18-20 December 1989.
- Kurniawan A., Maizels R.M., Selkirk M.E., and Yazdanbakhsk M. 1991. IgE, IgG4 and other isotypes in human filariasis. Abstracts and recommendations, 2nd CEC filariasis Network Meeting, Amsterdam, 11-13 September 1991.
- Kurniawan, L., Harun S., Utami B.S., Sim B.K.L., Piessens W.F., and Atmosoedjono S. 1989. Detection of *Brugia malayi* infected mosquitoes with species-specific DNA probe pBma 15, in Riau, Indonesia. Bul. Penelit. Kesehat. **17**, 88-94.
- Langer P.R., Waldrop A.A., and Ward D.C. 1981. Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**, 6633-6637.
- Lichtenstein C. and Draper J. 1985. Genetic engineering of plants, dalam DNA Cloning, Vol. II (Glover D.M., ed), hal. 67-119. IRL Press, Oxford, UK.
- Lie, K.J. 1962. Occult filariasis: its relationship with tropical pulmonary eosinophilia. Am. J. Trop. Med. Hyg. **11**, 646-652.
- Lobban, P.E. and Kaiser A.D. 1973. Enzymatic end-to-end joining of DNA molecules. J. Mol. Biol. **78**, 453-471.
- Maizels, R.M., Partono F., Oemijati S., and Ogilvie B.M. 1983. Antigenic analysis of *Brugia timori*, a filarial nematode of man: initial characterization by surface radioiodination and avaluation of diagnostic potential. Clin. Exp. Immunol. **51**, 269-277.
- Maniatis T., Fritsch E.F., and Sambrook J. 1982. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Manson-Bahr, P.E.C. and Bell D.R. 1987. Filariasis, dalam Manson's Tropical Diseases, hal. 353-373. Nineteenth Edition. Bailliere Tindall, London.
- McReynolds L.A., DeSimone S.M., and Williams S.A. 1986. Cloning and comparison of repeated DNA sequences from the human filarial parasite *Brugia malayi* and the animal parasite *Brugia pahangi*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **83**, 797-801.

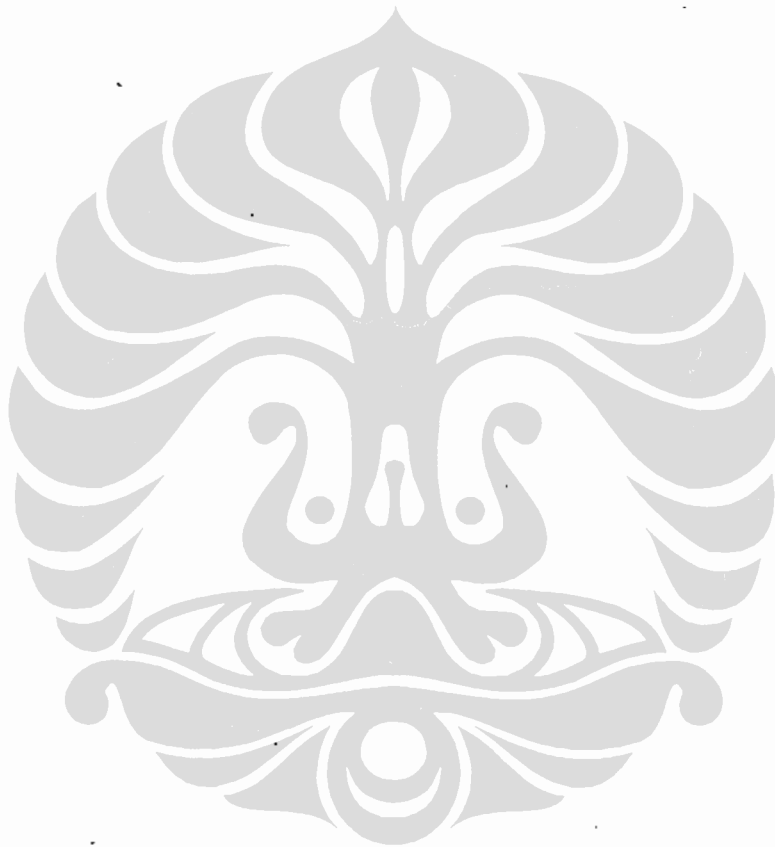
- McReynolds L., Poole C.B., and Williams S.A. 1991. Filial DNA probes in Jakarta. Parasitology Today 7, 65-67.
- Meredith S.E.O., Schoone G., Kroor N., Gbakima A.A., and Gbakima S.S. 1991. On the polymerase chain reaction detection and identification of *Onchocerca* larvae in simuliid vectors, and in the characterization of *Onchocerca volvulus* from vactors and man. Abstracts and recommendations, 2nd CEC filariasis Network Meeting, Amsterdam, 11-13 September 1991
- Oemijati S. 1986. Epidemiology and control of filariasis in Indonesia. Trop. Med. seminar on the 25th Anniversary of the Faculty of the Tropical Medicine, Bangkok.
- Old R.W. and Primrose S.B. 1985. Plasmids as cloning vehicles for use in *E. coli*. dalam Principles of gene manipulation, hal 47-73. Third edition. Blackwell Scientific Publications, UK.
- Oste C. 1988. Polymerase chain reaction. Biotechniques 6, 162-167.
- Ottesen E.A. 1984. Immunological aspects of lymphatic filariasis and onchocerciasis in man. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 78, 9-18.
- Partono F. 1980. Pengobatan *Brugia timori* dengan pemberian DEC takaran rendah oleh penduduk kepada penduduk. Cermin Dunia Kedokteran. Nomor Khusus, 41.
- Partono F. 1984. Filariasis in Indonesia: clinical manifestations and basic concepts of treatment and control. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 78, 9-12.
- Partono F. 1988. Lymphatic filariasis. Medicine International, 2270-2273.
- Partono F. 1989. A new drug for Brugian filariasis-Ivermectin. World Health Organization proceeding on Workshop on DNA diagnostics and filariasis and symposium and onchocerciasis, Jakarta, Indonesia, 18-20 December 1989.
- Partono F. and Idris K.N. 1977. Some factors influencing the loss of microfilariae from stained blood films. Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Hlth. 8, 158-164.
- Partono F. and Purnomo. 1987. Periodicity studies of *Brugia malayi* in Indonesia: recent findings and a modified classification of the parasite. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 81, 657-662.

- Partono F. and Rukmono B. 1989. Biotechnology of the filaria of Indonesia. Bull. Penelit. Kesehat. 17, 22-25.
- Piessens W.F. and Partono F. 1980. Host-Vector-Parasite relationship in human filariasis, dalam Seminars in Infectious Disease, Vol. III, hal 131-152. Thieme-Stratton Inc.
- Piessens W.F., McReynolds L.A., and Williams S.A. 1987. Highly repeated DNA sequences as species-specific probes for *Brugia*. Parasitology Today 3, 378-379.
- Renz M. and Kurz C. 1984. A colorimetric method for DNA hybridization. Nucl. Acids Res. 12, 3435-3444.
- Rollison, D., Walker T.K., and Simpson A.J.G. 1986. The application of recombinant DNA technology to problem of helminth identification. Parasitology 91, S53-S71.
- Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., and Arnheim N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230, 1350-1354.
- Sasa M. and Tanaka H. 1972. Studies on the methods for statistical analysis of the microfilarial survey data. Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Hlth. 3, 518-536.
- Sasa M. 1976. Analysis and evaluation of the microfilarial periodicity, dalam Human Filariasis: A Global Survey of Epidemiology and Control, hal. 663-734. University of Tokyo Press, Japan.
- Sambrook J., Fritsch E.F., and Maniatis T. 1989. Molecular cloning a laboratory manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- <sup>a</sup> Sim B.K.L., Piessens W.F., and Wirth D.F. 1986. A DNA probe cloned in *Escherichia coli* for the identification of *Brugia malayi*. Mol. Biochem. Parasitol. 19, 117-123.
- <sup>b</sup> Sim B.K.L., Mak J.W., Cheong W.H., Sutanto I., Kurniawan L., Marwoto H.A., Franke E., Campell J.R., Wirth D.F., and Piessens W.F. 1986. Identification of *Brugia malayi* in vectors with a species-specific DNA probe. Am. J. Trop. Med. Hyg. 35, 559-564.

- Southgate, B.A. 1984. Recent advances in the epidemiology and control of filarial infections including entomological aspects of transmission. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 78, 19-28.
- Supali, T., Williams S.A., Poole C.B., Glover J., McReynolds L.A., and Partono F. 1989. Detection of *Brugia malayi* and *Brugia pahangi* parasites by biotinylated DNA probes. Bul. Penelit. Kesehat. 17, 95-97.
- Trainor G.L. and Jensen M.A. 1988. a procedure for the preparation of fluorescence-labeled DNA with terminal deoxynucleotidyl transferase. Nucl. Acids Res. 16, 11846.
- Unnash T.R. 1987. DNA probes to identify *Onchocerca volvulus*. Parasitology Today 3(1), 377-378.
- Watson J.D., Tooze J., and Kurtz D.T. 1983. Recombinant DNA, a short course. Scientific American Books, Inc, USA.
- Weil G.J. Jain D.C., Santhanan S., Malhotra A., Kumar H., Sethumadhavan K.V.P., Liftis F., dan Ghosh T.K. 1987. A monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for detecting parasite antigenemia in bancroftian filariasis. J. Infect. Dis. 156, 350-355.
- Whitehead T.P., Thorpe G.H.G., Carter T.J. N., Groucutt C., and Kricka L.J. 1983. Enhanced luminescence procedure for sensitive determination of peroxidase-labelled conjugates in immunoassay. Nature 305: 158-159.
- Williams S.A., DeSimone S.M., and McReynolds L.A. 1988. Species-specific oligonucleotide probes for identification of human filarial parasites. Mol. Biochem. Parasitol. 28, 163-170.
- Williams J.F. 1989. Optimization strategies for the polymerase chain reactions. Biotechniques 7, 762-767.
- Williams S.A., Poole C.B., McReynolds L.A., and Glover J. 1991. Biotinylated DNA probe. Sedang dicetak.
- Wirth D.F., Rogers W.O., Barker R., Dourado H., Suesebang L., and Albuquerque B. 1986. Leishmaniasis and Malaria: New tools for epidemiologic analysis. Science 234, 975-979.
- World Health Organization. 1984. Lymphatic filariasis. Fourth report of the WHO expert committee of filariasis, Geneva. WHO Tech. Rep. Ser. 702.

World Health Organization. 1987. Control of lymphatic filariasis: A manual for health personnel. Geneva, Switzerland.

World Health Organization. 1989. Tropical diseases: Progress in international research 1987-1988. Ninth programme report of the UNDP/World Bank/WHO special programme for research and training in Tropical Diseases, Geneva.





PENYEBARAN FILARIASIS DI INDONESIA



- Vektor Bancrofti**
- 4. *M. indiana*
  - 5. *M. uniformis*
  - 10. *An. aconitatus*
  - 11. *An. subpictus*
  - 12. *An. bancrofti*
  - 13. *An. kolienis*
  - 14. *An. farauti*
  - 15. *An. punctulatus*
  - 16. *Cx. fatigans (quinque fasciatus)*
  - 17. *Cx. annulirostris*
  - 18. *Cx. bitaeniorhynchus*
  - 18. *An. kochi*
  - 20. *Ar. obaturbens*

- Vektor Brugie**
- 1. *M. bonese*
  - 2. *M. dives*
  - 3. *M. annulata*
  - 4. *M. indiana*
  - 5. *M. uniformis*
  - 6. *M. annulifera*
  - 7. *An. barbirostris*
  - 8. *An. nigerlimus*
  - 9. *An. pedisulanius* (potensial)
  - 21. *An. vagus*
  - 22. *An. subpictus*
- *Brugia malayi*  
• *Brugia timori*  
• *Wuchereria bancrofti*

| NO PROPINSI        | ANGKA MIBROBITULAJA 1946 |           | NO PROPINSI            | ANGKA MIBROBITULAJA 1946 |           |
|--------------------|--------------------------|-----------|------------------------|--------------------------|-----------|
|                    | KISARAN                  | RATA-RATA |                        | KISARAN                  | RATA-RATA |
| 1 ACEH             | 1,06-23,4                | 4,14      | 14 BALI                | -                        | -         |
| 2 SUMATERA UTARA   | 0,0-0,5                  | 1,5       | 15 NUSA TENGGARA BARAT | 0,3-10,8                 | 2,3       |
| 3 RIAU             | 0,0-12,4                 | 4,2       | 16 NUSA TENGGARA TIMUR | 1,5-4,6                  | 3         |
| 4 SUMATERA BARAT   | 2,11-4,73                | 2,52      | 17 KALIMANTAN BARAT    | 0,0-3,1                  | 1,7       |
| 5 JAWA BARAT       | 0,8-11,3                 | 4,8       | 18 KALIMANTAN TENGAH   | 0,0-3,4                  | 4,9       |
| 6 SUMATERA SELATAN | 0,0-14,2                 | 3,3       | 19 KALIMANTAN SELATAN  | 0,1-3,9                  | 2,6       |
| 7 BENGKULU         | 0,6-4,7                  | 3,4       | 20 KALIMANTAN TIMUR    | 0,0-0,7                  | 0,4       |
| 8 LAMPUNG          | -                        | -         | 21 SULAWESI UTARA      | 0,6-41,04                | 3,93      |
| 9 DKI JAWA         | 1,5-2,05                 | 1,6       | 22 SULAWESI TENGAH     | 0,0-4,5                  | 1,9       |
| 10 JAWA BARAT      | 0,0-2,9                  | 1,2       | 23 SULAWESI SELATAN    | 0,0-9,8                  | 2,3       |
| 11 JAWA TENGAH     | -                        | -         | 24 SULAWESI TENGGARA   | 19,2-23,8                | 21,1      |
| 12 DI YOGYAKARTA   | -                        | -         | 25 MALIKU              | 1,7-10,1                 | 4,4       |
| 13 JAWA TIMUR      | -                        | -         | 26 BUNAY               | -                        | -         |
|                    |                          |           | 27 TIMOR TIMUR         | -                        | -         |

Sumber: Ditjen PPM & PLP  
Depkes RI

## LAMPIRAN 2

## PEMBUATAN FENOL-KLOROFORM UNTUK EKSTRASI-DNA

1. Ke dalam kristal fenol ditambahkan volume yang sama ddH<sub>2</sub>O dan diaduk selama beberapa jam pada suhu 4 °C hingga semua kristal larut, kemudian larutan dibiarkan pada suhu kamar hingga terbentuk 2 lapisan yang terpisah.
2. Lapisan fenol (yang berada dibagian bawah) dipindahkan ke dalam botol berwarna (untuk menghindari cahaya) dan disimpan pada suhu 4 °C.  
\*0,1% antioxidant 8-hydroxyquinoline ditambahkan ke dalam larutan fenol, dan berfungsi sebagai pengawet dan indikasi yang memberikan warna kuning pada larutan fenol. Perubahan warna yang terjadi pada larutan fenol menunjukkan bahwa larutan tersebut tidak dapat dipergunakan lagi.
3. Larutan fenol dijenuhkan dengan menambahkan volume yang sama 1M Tris-HCl pH 8 dan diaduk selama beberapa jam pada suhu 4 °C, kemudian larutan dibiarkan pada suhu kamar sehingga terbentuk 2 lapisan.
4. Lapisan atas dibuang dan kemudian ditambahkan volume yang sama 0,1M Tris-HCl pH 8 serta diaduk selama beberapa jam, lalu larutan disimpan pada suhu 4 °C. Larutan fenol berada pada lapisan bawah dan larutan ini hanya dapat disimpan selama 1 bulan.
5. Campuran kloroform dan isoamil alkohol (chisam) dibuat dengan perbandingan 24:1. Chisam disimpan dalam botol berwarna.

Sumber: Maniatis, dkk., 1982.

## LAMPIRAN 3

MEMPERSIAPKAN SEL KOMPETEN *Escherichia coli* CaCl<sub>2</sub>  
UNTUK TRANSFORMASI

Larutan yang dipakai:

**10X Garam M9**

- 60 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 30 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 10 g NH<sub>4</sub>Cl
- 5 g NaCl
- dilarutkan dalam 1 liter ddH<sub>2</sub>O dan disteril dengan autoklaf 120 °C selama 30 menit.

**Medium minimal (100ml)**

- 88 ml steril ddH<sub>2</sub>O dimasukkan ke dalam 100 ml botol steril
- 10 ml 10X garam M9
- 100 µL 1M MgSO<sub>4</sub>
- 1 ml 20% glukosa
- 100 µL 1% tiamin (Vit B1)
- 1 ml 0,01 M CaCl<sub>2</sub>
- Semua bahan dicampurkan, kemudian ditambahkan ddH<sub>2</sub>O sampai 100 ml
- Larutan disteril dengan filter 0,22 µm

**Minimal plate:** 15 g agar ditambahkan ke dalam 1 liter medium minimal

**Medium 2X YT**

- 16 g Bacto-tryptone
- 10 g Yeast extract
- 10 g NaCl
- dilarutkan dalam 1 liter ddH<sub>2</sub>O
- disteril dengan autoklaf 120 °C selama 30 menit

**Medium LB (Luria Bertani)**

- 10 g Bacto-tryptone
- 5 g Yeast extract
- 10 g NaCl
- dilarutkan dalam 1 liter ddH<sub>2</sub>O
- disteril dengan autoklaf 120 °C selama 30 menit

## Cara kerja:

1. Bakteri *E. coli* JM 101 ditumbuhkan pada LB plate dan diinkubasi pada suhu 37°C semalam ( $\pm$  12 jam).
2. Bakteri tersebut ditumbuhkan pada *Minimal plate* (medium selektif) dengan suhu 37°C selama  $\pm$  16 jam (sampai terlihat adanya koloni pada medium). Koloni yang akan tumbuh pada medium tersebut adalah koloni bakteri jantan, yaitu bakteri yang mempunyai faktor F.
3. Kemudian bakteri ditumbuhkan dalam 10 ml medium cair LB pada suhu 37°C selama semalam ( $\pm$  10 jam), yang bertujuan untuk mendapatkan suspensi.
4. Bakteri yang didapat diencerkan 1:100 dalam 30 ml medium 2X YT dan ditumbuhkan pada suhu 37°C dalam *shaking incubator* hingga mencapai OD550 = 0,25-0,3 (diinkubasi 1½-2 jam).
5. Pada saat bakteri sedang tumbuh, dipersiapkan larutan 100mM CaCl<sub>2</sub> dan 50mM CaCl<sub>2</sub>/50mM MgCl<sub>2</sub> dengan mengencerkan larutan 1M CaCl<sub>2</sub> dan MgCl<sub>2</sub>, dan semua larutan disteril dengan filter 0,22  $\mu$ m. Kemudian semua larutan disimpan dalam es sampai siap dipakai.
6. Jika suspensi sudah mencapai OD550 = 0,25-0,3 maka suspensi disentrifugasi pada suhu 4°C selama 10 menit dengan kecepatan 2000 x g.
7. Supernatan dibuang, dan ke dalam pelet yang terbentuk ditambahkan 15 ml 100mM CaCl<sub>2</sub> (dingin) dengan pipet yang disentuh pada dinding tabung dekat dengan pelet sehingga sel-sel akan tercampur dalam larutan (dihindari kontak langsung pipet dengan sel). Penambahan larutan tersebut tidak boleh lebih dari satu menit.
8. Suspensi sel disimpan dalam es selama 30 menit, kemudian disentrifugasi pada suhu 4°C selama 10 menit dengan kecepatan 2000 x g.
9. Supernatan dibuang, dan ke dalam pelet ditambahkan 3ml 50mM CaCl<sub>2</sub>/50mM MgCl<sub>2</sub> (dingin) dengan pipet melalui pinggiran pada tabung sehingga sel tercampur dalam larutan.
10. Suspensi sel disimpan dalam es selama 60 menit sebelum dipakai.

## LAMPIRAN 4

## TRANSFORMASI BAKTERIOFAG M13

Larutan yang dipakai:

**2 % X-GAL (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactoside)**

- 0.35 g x-gal dilarutkan dalam 17.5 ml dimethyl formamide (larutan di simpan dalam botol kaca dan dijauhkan dari cahaya)
- Larutan disimpan  $-20^{\circ}\text{C}$

**0.1 M IPTG**

- 0.24 g IPTG
- 10 ml ddH<sub>2</sub>O
- disterilkan dengan filter  $0.22\mu\text{m}$  dan disimpan  $-20^{\circ}\text{C}$

**Medium LB (Luria Bertani)**

- 10 g Bacto-tryptone
- 5 g Yeast extract
- 10 g NaCl
- dilarutkan dalam 1 liter ddH<sub>2</sub>O
- disteril dengan autoklaf  $120^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit

**LB plate:** 15 g agarose ditambahkan ke dalam 1 liter medium LB sebelum disteril

**LB top agarose**

- 0,6 g agarose ditambahkan ke dalam 100 ml medium LB sebelum disteril

Cara kerja:

1. Mempersiapkan cawan petri yang berisi medium LB (*LB plate*) sesuai dengan kebutuhan sehari sebelum transformasi.
2. Mempersiapkan sel kompeten *E. coli* JM101 sesuai dengan protokol pada lampiran 2 dan masukkan 100  $\mu\text{l}$  suspensi sel per tabung (tabung 1).
3. Ke dalam tabung (tabung 2) dicampurkan:
  - 3 ml medium LB top agarose
  - 50  $\mu\text{l}$  2% X-gal
  - 20  $\mu\text{l}$  0,1M IPTG
  - 200  $\mu\text{l}$  sel bakteri *E. coli* JM101 (hasil kultur semalam sel bakteri dalam medium LB)

4. Membuat pengenceran dari reaksi penempelan bakteriofag M13mp18-DNA parasit sebagai berikut:

a. Pengenceran 1:5

$$\begin{array}{r} 1 \mu\text{l reaksi penempelan bakteriofag M13mp18-DNA parasit} \\ 4 \mu\text{l TE} \\ \hline 5 \mu\text{l} \end{array}$$

b. Pengenceran 1:10

$$\begin{array}{r} 1 \mu\text{l reaksi penempelan bakteriofag M13mp18-DNA parasit} \\ 9 \mu\text{l TE} \\ \hline 10 \mu\text{l} \end{array}$$

5.  $1 \mu\text{l}$  dari pengenceran tersebut ditambahkan ke dalam tabung 1. Semua pengenceran 1:5 dan 1:10 dibuat 5X ulangan.
6. Tabung diletakkan dalam es selama 30 menit, kemudian diletakkan dalam *water bath* pada suhu  $42^\circ\text{C}$  selama 90 detik (*heat shock*).
7. Tabung diletakkan dalam es selama 2-5 menit
8. Tabung 1 dituangkan ke dalam tabung 2
9. Campuran tersebut dituangkan ke dalam cawan petri (*LB plate*)
10. Campuran didiamkan 10-15 menit pada suhu kamar
11. Cawan petri dimasukkan ke dalam inkubator  $37^\circ\text{C}$  dengan keadaan terbalik (tutup cawan petri di bawah) dan dibiarkan semalam (12 jam).
12. Cawan petri disimpan dalam keadaan tertutup dengan *parafilm* pada suhu  $4^\circ\text{C}$ .

## LAMPIRAN 5

## TRANSFORMASI PLASMID

Larutan yang dipakai:

**2 % X-GAL (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactoside)**

- 0.35 g x-gal dilarutkan dalam 17.5 ml dimethyl formamide (larutan di simpan dalam botol kaca dan dijauhkan dari cahaya)
- Larutan disimpan  $-20^{\circ}\text{C}$

**0.1 M IPTG**

- 0.24 g IPTG
- 10 ml ddH<sub>2</sub>O
- disterilkan dengan filter  $0.22\mu\text{m}$  dan disimpan  $-20^{\circ}\text{C}$

**Medium LB (Luria Bertani)**

- 10 g Bacto-tryptone
- 5 g Yeast extract
- 10 g NaCl
- dilarutkan dalam 1 liter ddH<sub>2</sub>O
- disteril dengan autoklaf  $120^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit

LB plate: 15 g agarose ditambahkan ke dalam 1 liter medium LB sebelum disteril

**LB top agarose**

- 0,6 g agarose ditambahkan ke dalam 100 ml medium LB sebelum disteril

**Medium LBA (Luria Bertani-Ampicillin)**

- 50mg ampicillin ditambahkan ke dalam 1 liter medium LB steril pada saat suhu medium  $\pm 55^{\circ}\text{C}$

**Medium 2X YT**

- 16 g Bacto-tryptone
- 10 g Yeast extract
- 10 g NaCl
- dilarutkan dalam 1 liter ddH<sub>2</sub>O
- disteril dengan autoklaf  $120^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit

**Medium SOC**

- 20 g bacto-tryptone
- 5 g yeast extract
- 0,5 g NaCl
- 10ml 250mM KCl
- ddH<sub>2</sub>O ditambahkan sampai volume 1 liter dan disteril dengan autoklaf
- Pada saat medium sudah dingin ditambahkan:
  - 10ml 1M MgCl<sub>2</sub> steril
  - 20ml 1M Glukosa yang disteril dengan filter 0,22 $\mu$ m

**10X Garam M9**

- 60 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 30 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 10 g NH<sub>4</sub>Cl
- 5 g NaCl
- dilarutkan dalam 1 liter ddH<sub>2</sub>O dan disteril dengan autoklaf 120° C selama 30 menit

**Medium minimal (100ml)**

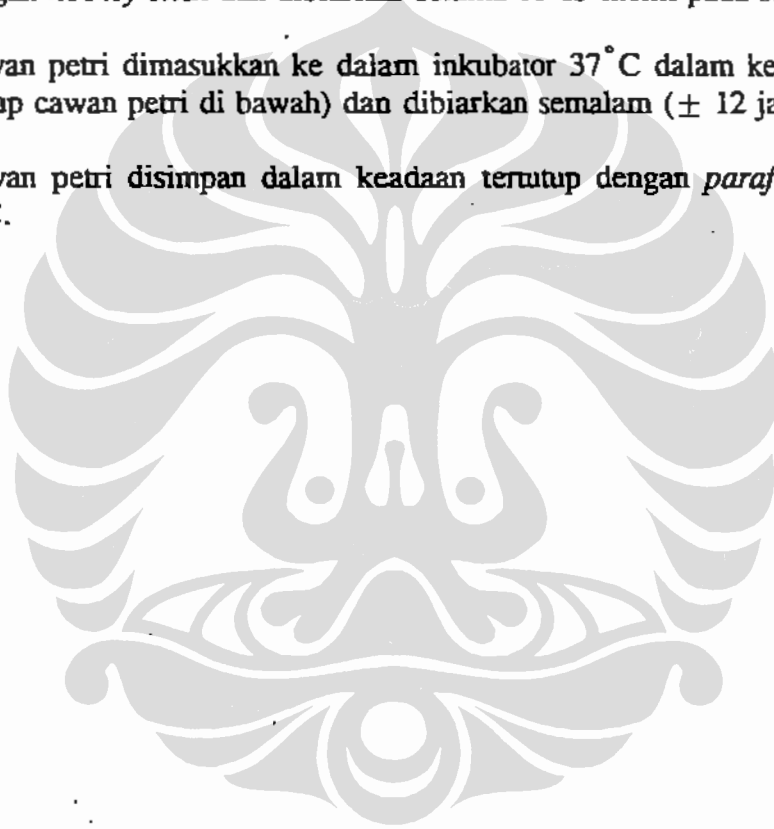
- 88 ml steril ddH<sub>2</sub>O dimasukkan ke dalam 100 ml botol steril
- 10 ml 10X garam M9
- 100  $\mu$ L 1M MgSO<sub>4</sub>
- 1 ml 20% glukosa
- 100  $\mu$ L 1% tiamin (Vit B1)
- 1 ml 0,01 M CaCl<sub>2</sub>
- Semua bahan dicampurkan, kemudian ditambahkan ddH<sub>2</sub>O sampai 100 ml
- Larutan disteril dengan filter 0,22  $\mu$ m

**Cara kerja:**

1. Mempersiapkan cawan petri yang berisi medium LBA (*LBA plate*) sesuai dengan kebutuhan sehari sebelum transformasi.
2. Sebelum transformasi ditambahkan 50  $\mu$ l 2% X-gal dan 20  $\mu$ l 0,1M IPTG ke dalam cawan petri, kemudian disebarakan secara merata pada permukaan *LBA plate* dengan memakai *hockey stick*. Cawan petri pada suhu 37° C selama 2 jam.
3. Mempersiapkan sel kompeten *E. coli* JM101 sesuai dengan protokol pada lampiran 2. Ke dalam setiap tabung dimasukkan 200  $\mu$ l suspensi sel (tabung 1).
4. 2  $\mu$ l reaksi penempelan plasmid bluescript II-pelacak DNA ditambahkan ke dalam tabung 1 (dibuat 10X ulangan).



5. Tabung tersebut diletakkan ke dalam es selama 30 menit, kemudian diletakkan dalam *water bath* pada suhu  $42^{\circ}\text{C}$  selama 90 detik (*heat shock*).
6. Tabung diletakkan ke dalam es selama 2-5 menit.
7. 1 ml medium SOC ditambahkan ke dalam tabung 1 dan diinkubasi dalam inkubator  $37^{\circ}$  selama 1 jam, kemudian dipindahkan ke dalam *shaking incubator*  $37^{\circ}$  selama 1 jam.
8. Isi tabung 1 dituangkan ke dalam cawan petri dan disebarakan secara merata dengan *hockey stick* dan dibiarkan selama 10-15 menit pada suhu kamar.
9. Cawan petri dimasukkan ke dalam inkubator  $37^{\circ}\text{C}$  dalam keadaan terbalik (tutup cawan petri di bawah) dan dibiarkan semalam ( $\pm 12$  jam).
10. Cawan petri disimpan dalam keadaan tertutup dengan *parafilm* pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$ .



## LAMPIRAN 6

## PLAQUE LIFT

Larutan yang dipakai:

**50 x Larutan Denhardt**

- 1 g Ficoll type 400
- 1 g Bovine serum albumine (Pentax fraction V)
- 1 g Polyvinylpyrrolidone
- dilarutkan dalam 100 ml ddH<sub>2</sub>O
- disteril dengan filter 0.22  $\mu$ m dan disimpan pada -20° C

**Denaturasi DNA salmon sperm**

- 0.1 g DNA salmon sperm dilarutkan ke dalam 10 ml ddH<sub>2</sub>O
- diaduk sampai merata (2 - 4 jam)
- larutan disemprotkan dengan jarum suntik nomor 18 sebanyak 20x, kemudian dididihkan selama 10 menit
- disimpan dalam tabung-tabung kecil 1ml pada -20° C

**Larutan bufer pencuci**

- 50 mM Tris pH 8
- 1 M NaCl
- 10 mM EDTA
- 0,1% SDS

**Larutan denaturasi**

- 0,5 M NaOH
- 1,5 M NaCl

**Larutan netralisasi**

- 0,5 M Tris-HCl pH 7,5
- 1,5 M NaCl

**Bufer pencuci filter**

- 50 mM Tris pH 8
- 1 M NaCl
- 10 mM disodium EDTA
- 0,1% SDS

**Larutan prehibridisasi/hibridisasi**

- 6X SSC
- 5X Larutan Denhardt
- 0,1 % SDS
- 10 mM disodium EDTA

**Larutan pencuci membran setelah hibridisasi**

1. 2X SSC  
0,1% SDS
  
2. 0,2X SSC  
0,1% SDS

**Cara kerja:**

1. Membran nylon dipotong sesuai dengan ukuran cawan petri.
2. Membran nylon diletakkan di atas permukaan cawan petri dengan hati-hati selama 5 menit dan dihindarkan adanya gelembung udara.
3. Memberikan tanda pada membran dengan cara menusukkan jarum yang telah diberi tinta India secara asimetris.
4. Membran diangkat dari cawan dengan hati-hati supaya lapisan agarose tidak rusak, kemudian membran dikering-anginkan (dengan plaque pada permukaan atas) selama 15 menit.
5. Membran didenaturasi dengan meletakkan membran di atas kertas filter yang sudah dibasahi dengan 0,5N NaOH, 1,5M NaCl selama 2 menit, kemudian dinetralisasi pada kertas filter yang dibasahi dengan 0,5M Tris-HCl pH 7,5, 1,5M NaCl selama 5 menit.
6. Membran dibasahi dengan 2X SSC selama 2 menit.
7. Membran dikering-anginkan selama 15 menit pada suhu kamar, kemudian membran dikeringkan dalam oven vakum pada 80° C selama 1 jam, bertujuan untuk menempel DNA pada membran.
8. Membran dicuci dengan larutan bufer pencuci dalam *shaking water bath* pada suhu 42° C selama 2 jam.
9. Membran diprehibridisasi dalam larutan hibridisasi pada suhu 60° C selama 2 jam.

10. Membran dihibridisasi dengan menambahkan pelacak DNA pBma 68 yang ditandai dengan molekul radioaktif  $^{32}\text{S}$  (Amersham) pada suhu  $60^\circ\text{C}$  selama semalam.
11. Membran dicuci dengan larutan pencuci 2X SSC, 0,1% SDS pada suhu kamar semalam 15 menit. Pencucian dilakukan 2X dengan pengocokan.
12. Kemudian membran dicuci dengan larutan pencuci 0,2X SSC, 0,1% SDS pada suhu  $60^\circ\text{C}$  semalam 1 jam.
13. Membran dikering-anginkan pada suhu kamar, kemudian membran dikeringkan dalam oven vakum pada  $70^\circ\text{C}$  selama 30 menit.
14. Membran dipaparkan pada X-ray film selama semalam. Film dicuci pada larutan *developer* selama 5 menit, air selama 5 menit, dan larutan *fixer* selama 5 menit.
15. Dot hitam pada film menunjukkan adanya klon yang mempunyai DNA rekombinan, kemudian dilakukan purifikasi terhadap klon-klon positif dengan cara menumbuhkan klon-klon positif dalam cawan petri baru.

## LAMPIRAN 7

ISOLASI RANTAI TUNGGAL DNA BAKTERIOFAG M13mp18  
UNTUK SIKUENSING

Larutan yang dipakai:

**1X Bufer TE**

- 10 mM TRIS pH 8
- 1 mM disodium EDTA pH 8
- dilarutkan dalam ddH<sub>2</sub>O

**5X TBE**

- 60.55 g TRIS
- 30.90 g boric acid
- 20 ml 0.5 M disodium EDTA pH 8
- ditambahkan ddH<sub>2</sub>O sampai 1 liter dengan pH 8

**Ethidium bromide**

- 10 mg/ml dilarutkan dalam ddH<sub>2</sub>O

**5X Loading dye**

- 20% Ficoll (Pharmacia atau Sigma)
- 0.1% Bromophenol Blue
- 0.01 M TRIS pH 8
- 0.01 M disodium EDTA pH 8
- 0.1% xylene cyanol FF
- dilarutkan dalam ddH<sub>2</sub>O

**0.8 % gel agarose**

- 0.8 g agarose
- 100 ml 1 X TBE
- dididihkan sampai larut sempurna, kemudian didinginkan sampai suhu 50 - 60 °C, lalu dituangkan ke dalam *gel apparatus*

Cara kerja:

1. Menumbuhkan sel bakteri *E. coli* JM 101 dalam 50 ml medium minimal pada suhu 37 °C selama 8 jam, kemudian sentrifugasi pada 3000 g selama 10 menit.
2. Supernatan dibuang, kemudian ditambahkan 10 ml 2X YT ke dalam pelet dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 2 jam dengan pengocokkan.

3. 2 ml 2X YT dicampurkan ke dalam 200  $\mu$ l sel bakteri *E. coli* JM101, kemudian diambil klon positif lalu ditumbuhkan pada suhu 37°C selama 8 jam.
4. Ditambahkan 200 $\mu$ l 2,5M NaCL, 20% PEG 6000 (polyethylene glycol 6000 dari sigma).
5. Semua campuran larutan dipindahkan ke dalam beberapa tabung eppendorf dan disentrifugasi 12.000 x g pada suhu 4°C selama 10 menit.
6. Supernatan dibuang dan pelet dibiarkan mengering dengan meletakkan tabung dalam keadaan terbalik di atas tissue.
7. Pelet dilarutkan dalam larutan 200  $\mu$ l TE.
8. Dilakukan ekstraksi fenol-kloroform dengan menambahkan 200  $\mu$ l fenol-Tris ke dalam tabung, *vortex* 1 menit dan disentrifugasi pada 12.000g selama 2 menit, kemudian lapisan atas yang terbentuk dipindahkan ke dalam tabung baru dan ditambahkan 200  $\mu$ l fenol-chisam, *vortex* 1 menit dan disentrifugasi pada 12.000g selama 2 menit. Pindahkan supernatan bagian atas ke dalam tabung dan tambahkan 200  $\mu$ l chisam, kemudian *vortex* 1 menit dan sentrifugasi pada 12.000g selama 2 menit.
9. Supernatan bagian atas dipindahkan ke dalam tabung baru dan ditambahkan 20  $\mu$ l 3 M NaAc pH 6, 400  $\mu$ l 100% isopropanol, kemudian *vortex* 30 detik.
10. DNA diendapkan pada suhu -20°C selama 1 jam, kemudian disentrifugasi pada 12.000 x g 4°C selama 15 menit.
11. Supernatan dituangkan ke dalam tabung baru dan disimpan pada suhu -12°C, kemudian ditambahkan 500  $\mu$ l 100% isopropanol ke dalam tabung yang berisi endapan DNA (jangan dicampurkan) dan disentrifugasi pada 12.000 x g 4°C selama 15 menit.
12. Supernatan dituangkan ke dalam tabung baru dan disimpan pada suhu -12°C.
13. Tabung yang berisi pelet dikeringkan dalam keadaan terbalik dengan dialasi tissue selama 40 menit.
14. Pelet dilarutkan ke dalam 10  $\mu$ l TE dan disimpan pada suhu 4°C.
15. DNA dikuantitasi pada 0.8 % gel agarose (elektroforesis 100 volt selama 1 jam).

## LAMPIRAN 8

## REAKSI SIKUENSING DNA

Larutan yang dipakai:

**5X Bufer sikuensing**

- 200 mM Tris HCl pH 7,5
- 50 mM MgCl<sub>2</sub>
- 250mM NaCl

**5X reaksi labeling**

- 7,5  $\mu$ M dGTP
- 7,5  $\mu$ M dCTP
- 7,5  $\mu$ M dTTP

**Pengenceran 1:5 reaksi labeling**

- 2 $\mu$ l reaksi labeling
- 8 $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O

**Pengenceran enzim sequenase**

- 1 $\mu$ l enzim sequenase
- 7 $\mu$ l bufer TE

**Stop solution**

- 95% Formamide
- 20 mM EDTA
- 0,05% zylene cyanol FF
- 0,05% bromophenol blue

**Primo 20% larutan acryl/bis**

- 19 g acylamide
- 1 g bis
- ditambahkan 100 ml 1X TBE
- disimpan pada suhu 4° C dan botol ditutup dengan aluminium foil

**Primo 6% gel acrylamide**

- 48.05 g Urea
- 30 ml acryl/bis solution
- 1X TBE ditambahkan sampai volume akhir 100 ml dan diaduk pada suhu < 55° C sampai semua urea larut, kemudian dibiarkan dingin dalam es sampai suhu larutan mencapai 20° C.
- untuk melakukan polimerisasi ditambahkan:
  - 438  $\mu$ l Amonium Persulfate ( 10 % = 0.1 g/1ml)
  - 66  $\mu$ l TEMED store in 4° C (dibungkus dengan alumunium foil)

Cara kerja:

1. Reaksi random priming (Pharmacia Oligolabelling, US Biochemical Corporation Cleveland OH):

... $\mu$ l rantai tunggal DNA M13Mp18/DNA parasit (1  $\mu$ g)  
 2  $\mu$ l primer sikuensing (2,5 ng) (New England BioLabs, Beverly, MA)  
 2  $\mu$ l 5X bufer sikuensing  
 7  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O

---

10  $\mu$ l

Reaksi dipanaskan pada suhu 65° C selama 2 menit, kemudian didinginkan pada suhu  $\pm$  25° C selama 30 menit.

2. Dipersiapkan 4 tabung yang ditandai A, T, C, G.
3. 2,5  $\mu$ l ddGTP dimasukkan ke dalam tabung G, 2,5  $\mu$ l ddATP ke dalam tabung A, 2,5  $\mu$ l ddCTP ke dalam tabung C, dan 2,5  $\mu$ l ddTTP ke dalam tabung T.
4. Ke dalam tabung baru dimasukkan 0,5  $\mu$ l <sup>35</sup>S dATP (1000 Ci/mMole, 5  $\mu$ Ci) dan ditambahkan:

10  $\mu$ l reaksi random priming dari tahap 1  
 1  $\mu$ l 0,1 M DTT  
 2  $\mu$ l reaksi labeling (pengenceran 1:5)  
 2  $\mu$ l enzim sequenase (T7 DNA polymerase)

semua reagensia dicampur dengan baik dan diinkubasi pada suhu  $\pm$  25° C selama 5 menit.

5. 3,5  $\mu$ l reaksi campuran tersebut dimasukkan ke dalam tabung T, A, G, C. Kemudian reaksi tersebut dicampur dengan baik dan diinkubasi pada 37° C selama 5 menit.
6. Reaksi dihentikan dengan penambahan 4  $\mu$ l *stop solution* ke dalam setiap tabung, kemudian tabung disimpan dalam es sampai siap dipakai



LAMPIRAN 9  
SOUTHERN BLOT

Larutan yang dipakai:

**Larutan depurinasi**

- 0,25N HCl

**Larutan denaturasi**

- 0,5 M NaOH
- 1,5 M NaCl

**Larutan netralisasi**

- 1 M Tris-HCl pH 7,5
- 1,5 M NaCl

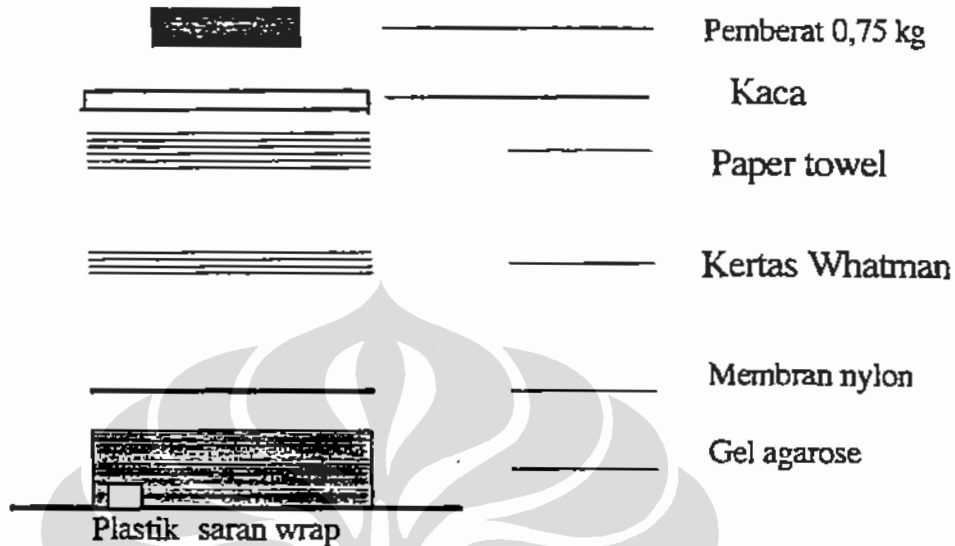
**20 x SSC**

- 3 M NaCl
- 0.3 M Na Citrate
- dilarutkan dalam ddH<sub>2</sub>O (pH sebaiknya 7)

Cara kerja:

1. Pada sampel dilakukan elektroforesis pada 1 % gel agarose dalam 1X TBE.
2. Gel diwarnai dalam ethidium bromide selama 5 menit dan *destain* selama 15 menit dalam ddH<sub>2</sub>O serta diambil foto dengan kamera UV.
3. Kemudian gel direndam dalam larutan depurinasi selama 15 menit, sampai ada perubahan warna pada sampel DNA dari biru menjadi kuning.
4. Gel dicuci 3 kali dengan ddH<sub>2</sub>O.
5. Gel direndam dalam larutan denaturasi selama 15 menit, sampai warna kuning sampel DNA kembali menjadi biru.
6. Gel dicuci 3 kali dengan ddH<sub>2</sub>O.
7. Gel direndam dalam larutan netralisasi selama 15 menit, kemudian larutan dibuang dan diganti dengan larutan netralisasi baru untuk 15 menit.

8. *Blotting* dilakukan semalam pada membran nylon, seperti pada gambar di bawah ini:



- Gel diletakkan terbalik dengan lubang *well* menghadap ke bawah, dan dihindarkan adanya udara antara gel dengan kertas filter.
  - Membran nylon diletakkan di atas gel dan dihindari adanya udara di antara gel dan membran.
  - Kertas filter whatman dibasahi dengan 0,4M NaOH.
  - *Paper towel* setebal 5-7 cm diletakkan di atas membran, kemudian *glass plate* diletakkan di atasnya.
  - Pemberat 0,75 kg diletakkan di atasnya.
9. Membran dicuci dengan 5X SSC selama 1 menit.
10. Membran dikering-anginkan di atas kertas filter kemudian dikeringkan lagi pada oven vakum suhu 70 °C selama 1 jam.
11. Prehibridisasi dilakukan pada suhu 37 °C selama 2 jam dan kemudian membran dihibridisasi dengan pelacak DNA *B. malayi* 31 mer-*fluorescein* (75ng/ml) pada suhu 37 °C selama semalam. Pencucian dan deteksi dilakukan sesuai dengan protokol pada ECL 3'-oligolabelling and detection system, Amersham.

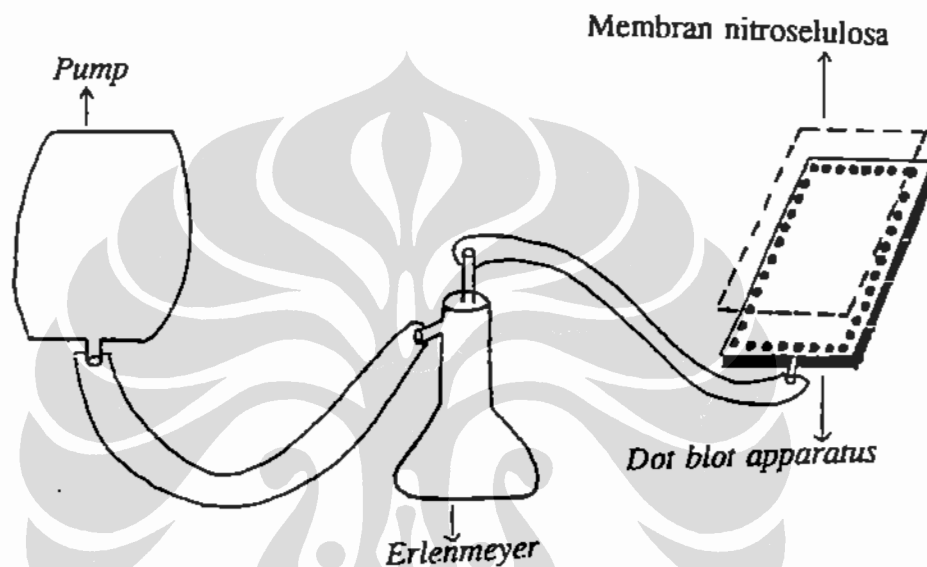
**Catatan:**

Southern blot dilakukan sesuai dengan protokol dari ECL gene detection system RPN 2101, Amersham, sedangkan penandaan pelacak DNA dengan *fluorescein*, hibridisasi, pencucian dan deteksi dilakukan sesuai dengan protokol ECL 3'-oligolabelling and detection system, Amersham.

## LAMPIRAN 10

## TES DOT BLOT

1. *Dot blot apparatus* yang mempunyai lubang (*well*) sebanyak 96 dan *vacuum pump* dipersiapkan.



2. Membran nitroselulosa  $0,45\mu\text{m}$  direndam dalam ddH<sub>2</sub>O selama 10 menit dan kemudian direndam dalam 10X SSC selama 10 menit.
3. Sampel diteteskan di atas membran tersebut.
4. Membran dikering-anginkan, kemudian DNA pada membran didenaturasi dengan meletakkan membran di atas kertas filter yang sudah dibasahi dengan 0,5N NaOH selama 1 menit, dan dinetralisasi pada kertas filter yang dibasahi dengan 1M TRIS selama 1 menit dan 0,5M TRIS, 1,5M NaCl selama 1 menit.
5. Membran dikeringkan dalam oven vakum selama 1 jam pada 80° C, bertujuan untuk menempelkan DNA pada membran.
6. Membran siap diprehibridisasi dan dihibridisasi.

## Catatan:

Membran dapat dihibridisasi *back to back*, yaitu 2 kertas yang saling membelakangi sehingga jumlah sampel yang dapat diolah adalah 192 sampel untuk sekali hibridisasi.

## LAMPIRAN 11

## 192 Enzim PEMOTONG DNA

|        |   |  |
|--------|---|--|
| Aat1   | AGG <sup>^</sup> CCT  | Iso= Stul, Gd11                          |
| Aat2   | G <sup>^</sup> ACGT <sup>^</sup> C  |  |
| Acc1   | GT <sup>^</sup> MK <sup>^</sup> AC  |  |
| Acc2   | CG <sup>^</sup> CG  | Iso FnuD2, Thal                          |
| Acc3   | T <sup>^</sup> CCGG <sup>^</sup> A  | Iso BspM2                                |
| Acy1   | GR <sup>^</sup> CG <sup>^</sup> YC  |  |
| Afl1   | G <sup>^</sup> GWC <sup>^</sup> C   | Iso Ava2, Eco47I                         |
| Afl2   | C <sup>^</sup> TTAA <sup>^</sup> G  |  |
| Afl3   | A <sup>^</sup> CRYG <sup>^</sup> T  |  |
| Aha1   | CC <sup>^</sup> S <sup>^</sup> GG   | Iso Nci1, Bcn1                           |
| Aha2   | GR <sup>^</sup> CG <sup>^</sup> YC  | Iso= Acy1                                |
| Aha3   | TTT <sup>^</sup> AAA  | ISO= Dra1                                |
| Alu1   | AG <sup>^</sup> CT  | Iso= M11, Oxal                           |
| Alw1   | GGATC <sup>^</sup> NNNN <sup>^</sup> N <sup>^</sup>                           |  |
| AlwN1  | CAG <sup>^</sup> NNN <sup>^</sup> CTG   |  |
| Aoc1   | CC <sup>^</sup> TNA <sup>^</sup> GG   | Iso Cvn1, Mst2, Saul                     |
| Aoc2   | G <sup>^</sup> DGCH <sup>^</sup> C  | Iso Bsp1286, Sdul                        |
| Aos1   | TGC <sup>^</sup> GCA  | Iso= Mst1, Fsp1                          |
| Apal   | G <sup>^</sup> GGCC <sup>^</sup> C  | IBI #14090                               |
| Apal1  | G <sup>^</sup> TGCA <sup>^</sup> C  | Iso= Sna1                                |
| Apyl   | CC <sup>^</sup> W <sup>^</sup> GG   | Iso= BstN1                               |
| Aqu1   | C <sup>^</sup> YCGR <sup>^</sup> G  | Iso Aval                                 |
| Asel   | AT <sup>^</sup> TA <sup>^</sup> AT  |  |
| Asp700 | GAANN <sup>^</sup> NNTTC  | Iso Xmn1                                 |
| Asp718 | G <sup>^</sup> GTAC <sup>^</sup> C  |  |
| AspA1  | G <sup>^</sup> GTNAC <sup>^</sup> C   | Iso= BstE2                               |
| Asu1   | G <sup>^</sup> GNC <sup>^</sup> C   | Iso= Apu1, Bac36I, BspB2, Cfr4I, Cfr8I   |
| Asu2   | TT <sup>^</sup> CG <sup>^</sup> AA  | Iso= Fsp2, Lsp1, M1a1, Nsp(7524)V        |
| Aval   | C <sup>^</sup> YCGR <sup>^</sup> G  | Iso= Agul, Avr1, Nsp(7524)3              |
| Ava2   | G <sup>^</sup> GWC <sup>^</sup> C   | Iso= Afl1, BamX1, Caul, Clm1, Clm2, Eco4 |
| Ava3   | A <sup>^</sup> TGCA <sup>^</sup> T  | Iso EcoT22I, Nsi1                        |
| Avr2   | C <sup>^</sup> CTAG <sup>^</sup> G  |  |
| Bal1   | TGG <sup>^</sup> CCA  |  |
| BamH1  | G <sup>^</sup> GATC <sup>^</sup> C  | Iso= Acl1, Ael1, BamF1, BamK1, others    |
| Ban1   | G <sup>^</sup> GYRC <sup>^</sup> C  | Iso= HgiC1                               |
| Ban2   | G <sup>^</sup> RGCY <sup>^</sup> C  | Iso= Bvu1, HgiJ2                         |
| Ban3   | AT <sup>^</sup> CG <sup>^</sup> AT  | Iso= Cla1                                |
| Bbe1   | G <sup>^</sup> GCGC <sup>^</sup> C  | Iso= Nar1                                |
| Bbs 1  | GAAGACNN <sup>^</sup> NNNN <sup>^</sup>                                       |  |
| Bbv1   | GCAGC <sup>^</sup> NNNNNNNN <sup>^</sup> NNNN <sup>^</sup>                    |  |
| Bcg 1  | NN <sup>^</sup> NNNNNNNNNNCGANN <sup>^</sup> NNNTGCNNNNNNNNNN <sup>^</sup> NN |  |
| Bcl1   | T <sup>^</sup> GATC <sup>^</sup> A  | Iso= AtuC1, Cpel, Sst4                   |
| Bgl1   | GCCN <sup>^</sup> NNN <sup>^</sup> NGGC                                       |  |
| Bgl2   | A <sup>^</sup> GATC <sup>^</sup> T  | Iso= Nsp, Mac1                           |
| Bsa J1 | C <sup>^</sup> CNNG <sup>^</sup> G  |  |
| Bsa1   | GGTCTCN <sup>^</sup> NNNN <sup>^</sup>  |  |
| BsaA1  | YAC <sup>^</sup> GTW  |  |
| BsaB1  | GATNN <sup>^</sup> NNATC  |  |
| Bsm1   | GAATG <sup>^</sup> CN <sup>^</sup>  |  |
| BsmA1  | GTCTCN <sup>^</sup> NNNN <sup>^</sup>   |  |

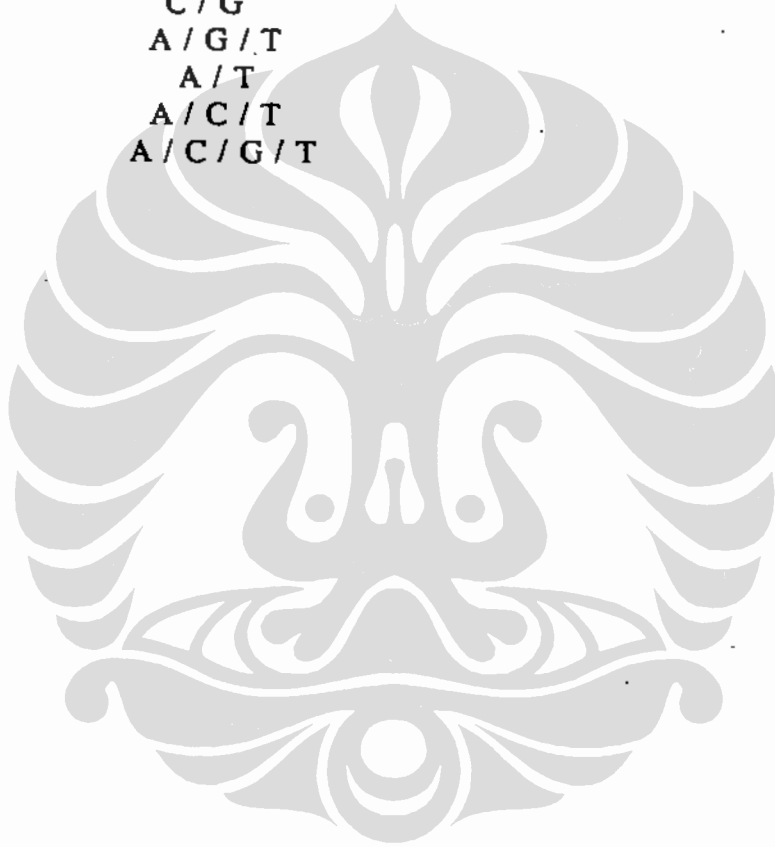
|          |  |   |
|----------|--|---|
| Bsp1286I | G <sup>^</sup> DGCH <sup>^</sup> C             | Iso Aoc2, Sdul                            |
| BspE1    | T <sup>^</sup> CCGG <sup>^</sup> A             |   |
| BspH1    | T <sup>^</sup> CATG <sup>^</sup> A             |   |
| BspM1    | ACCTGCNNNN <sup>^</sup> NNNN <sup>^</sup>      |   |
| BspM2    | T <sup>^</sup> CCGG <sup>^</sup> A             |   |
| Bsr1     | ACTG <sup>^</sup> GN <sup>^</sup>              |   |
| BssH2    | G <sup>^</sup> CGCG <sup>^</sup> C             | isoschizomer of BseP1                     |
| BstB1    | TT <sup>^</sup> CG <sup>^</sup> AA             | Iso Fsp2, Asu2                            |
| BstE2    | G <sup>^</sup> GTNAC <sup>^</sup> C            | AspA1, Bst31I, BstP1, others              |
| BstN1    | CC <sup>^</sup> W <sup>^</sup> GG              | Iso Apy1, EcoR2, Mva1                     |
| BstU1    | CG <sup>^</sup> CG                             | Iso FnuD2                                 |
| BstX1    | CCAN <sup>^</sup> NNNN <sup>^</sup> NTGG       |   |
| BstY1    | R <sup>^</sup> GATC <sup>^</sup> Y             |   |
| Bsu36I   | CC <sup>^</sup> TNA <sup>^</sup> GG            | Iso Mst2, OxaN1                           |
| Ccr1     | C <sup>^</sup> TCGA <sup>^</sup> G             | Iso PaeR71, Sex1, Xho1                    |
| Cfo1     | G <sup>^</sup> CG <sup>^</sup> C               | Iso= FnuD3, Hha1, HincU1, others          |
| Cfr1     | Y <sup>^</sup> GGCC <sup>^</sup> R             | Cfr141, Cfr381, Eae1, Eco901, others      |
| Cfr101   | R <sup>^</sup> CCGG <sup>^</sup> Y             |   |
| Cfr13I   | G <sup>^</sup> GNC <sup>^</sup> C              | Iso Sau96I, Sdy1, Asu1                    |
| Cla1     | AT <sup>^</sup> CG <sup>^</sup> AT             | iso= Asp7071, Ban3, Bcl1, Bsp1061         |
| Cvn1     | CC <sup>^</sup> TNA <sup>^</sup> GG            | Iso Mst2, Sau1                            |
| Dde1     | C <sup>^</sup> TNA <sup>^</sup> G              |   |
| Dpn1     | GA <sup>^</sup> TC                             | Iso= Cfu1, Nan2, NmuD1, NsuD1, others4    |
| Dpn2     | <sup>^</sup> GATC <sup>^</sup>                 |   |
| Dra1     | TTT <sup>^</sup> AAA                           | Iso= Aha3                                 |
| Dra2     | RG <sup>^</sup> GNC <sup>^</sup> CY            | Iso= EcoO1091, Pss1                       |
| Dra3     | CAC <sup>^</sup> NNN <sup>^</sup> GTG          |   |
| Drd1     | GACNN <sup>^</sup> NN <sup>^</sup> NGTC        |   |
| Eae1     | Y <sup>^</sup> GGCC <sup>^</sup> R             | Iso Cfr1                                  |
| Eag1     | C <sup>^</sup> GGCC <sup>^</sup> G             | Iso Xma3                                  |
| Ear1     | CTCTTCN <sup>^</sup> NNN <sup>^</sup>          |   |
| Eco47I   | G <sup>^</sup> GWC <sup>^</sup> C              | Iso Afl1, Ava2                            |
| Eco47III | AGC <sup>^</sup> GCT                           |   |
| Eco52I   | C <sup>^</sup> GGCC <sup>^</sup> G             | Iso Eag1, Xma3                            |
| Eco81I   | CC <sup>^</sup> TNA <sup>^</sup> GG            |   |
| EcoN1    | CCTNN <sup>^</sup> N <sup>^</sup> NNAGG        |   |
| EcoO109I | RG <sup>^</sup> GNC <sup>^</sup> CY            | Iso Dra2                                  |
| EcoR1    | G <sup>^</sup> AATT <sup>^</sup> C             | Iso= Eco821, Rsr1, Sst1, others           |
| EcoR1*   | <sup>^</sup> AATT <sup>^</sup>                 |   |
| EcoR2    | <sup>^</sup> CCWGG <sup>^</sup>                | Iso= Aor1, Apy1, BstN1, Mva1, others      |
| EcoR5    | GAT <sup>^</sup> ATC                           | Iso= Ceq1, Eco321, Nae1, Nfi1             |
| EcoT22I  | A <sup>^</sup> TGCA <sup>^</sup> T             | Iso Ava3, Nsi1                            |
| Esp1     | GC <sup>^</sup> TNA <sup>^</sup> GC            |   |
| Fdi2     | TGC <sup>^</sup> GCA                           | Iso Mst1                                  |
| Fnu4H1   | GC <sup>^</sup> N <sup>^</sup> GC              | Iso= Fbr1                                 |
| FnuD2    | CG <sup>^</sup> CG                             | Iso= Acc2, BceF1, FspM1, Tha1, others     |
| Fok1     | GGATGNNNNNNNNNN <sup>^</sup> NNNN <sup>^</sup> |   |
| Fsp1     | TGC <sup>^</sup> GCA                           | Iso= Acl1, Mst1                           |
| Hae2     | R <sup>^</sup> GCGC <sup>^</sup> Y             | Iso= HincH1, Ngo1                         |
| Hae3     | GG <sup>^</sup> CC                             | Iso= Blu2, Bse1, Cln1, Cln1, Pae1, others |

|            |  |  |
|------------|--|--|
| Hap2       | C <sup>∇</sup> CG <sub>△</sub> G           | Iso= Hpa2                                  |
| Hga1       | GACGCNNNNN <sup>∇</sup> NNNNN <sub>△</sub> |  |
| HgiA1      | G <sub>△</sub> WGCW <sup>∇</sup> C         |  |
| Hha1       | G <sub>△</sub> CG <sup>∇</sup> C           | Iso= Cfo1, PnuD3, HingU1, Mnn4, others     |
| Hinc2      | GTY <sup>∇</sup> RAC                       | Iso= Hind2                                 |
| Hind2      | GTY <sup>∇</sup> RAC                       | Iso= Chu2, Hin11602, Hinc2, Mnn1, others   |
| Hind3      | A <sup>∇</sup> AGCT <sub>△</sub> T         | Iso= Asp521, Bbr1, Bpa1, Eco8, Hsu1, other |
| Hinf1      | G <sup>∇</sup> ANT <sub>△</sub> C          | Iso= CviB1, Hha2, Nca1, Nov2, others       |
| HinP1      | G <sup>∇</sup> CG <sub>△</sub> C           | Iso Cfo1, Hha1                             |
| Hpa1       | GTT <sup>∇</sup> AAC                       | Iso=Bse2                                   |
| Hpa2       | C <sup>∇</sup> CG <sub>△</sub> G           | Iso= Fin2, Hap2, Mno1, Msp1, Sec2, others. |
| Hph1       | GGTGANNNNNNN <sub>△</sub> N <sup>∇</sup>   |  |
| Kas1       | G <sup>∇</sup> GCGC <sub>△</sub> C         |  |
| Kpn1       | G <sub>△</sub> GTAC <sup>∇</sup> C         | Iso= Asp7181, Eco1491, KpnK141, Nml1       |
| Mae1       | C <sup>∇</sup> TA <sub>△</sub> G           | Iso= Mja1                                  |
| Mae2       | A <sup>∇</sup> CG <sub>△</sub> T           |  |
| Mae3       | <sup>∇</sup> GTNAC <sub>△</sub>            |  |
| Mbo1       | <sup>∇</sup> GATC <sub>△</sub>             | Iso=Nde2, Sau3A1, others                   |
| Mbo2       | GAAGANNNNNNN <sub>△</sub> N <sup>∇</sup>   | Iso= Ncu1, Tce1                            |
| Mlu1       | A <sup>∇</sup> CGCG <sub>△</sub> T         |  |
| Mnl1       | CCTCNNNNNNN <sup>∇</sup>                   |  |
| Mro1       | T <sup>∇</sup> CCGG <sub>△</sub> A         |  |
| Msc1       | TGG <sup>∇</sup> CCA                       |  |
| Mse1       | T <sup>∇</sup> TA <sub>△</sub> A           |  |
| Msp1       | C <sup>∇</sup> CG <sub>△</sub> G           | Iso= Hpa2                                  |
| Mst1       | TGC <sup>∇</sup> GCA                       | Iso Acs, Fsp 1                             |
| Mst2       | CC <sup>∇</sup> TNA <sub>△</sub> GG        | Iso Aoc1, Cvn1, Sau1                       |
| Mva1       | CC <sup>∇</sup> W <sub>△</sub> GG          | Iso Apy1, BstN1, EcoR2                     |
| Nae1       | GCC <sup>∇</sup> GGC                       | Iso= Ani1, Apr1, Misl, others              |
| Nar1       | GG <sup>∇</sup> CG <sub>△</sub> CC         | Iso=Bbe1, Nun2, others                     |
| Nci1       | CC <sup>∇</sup> S <sub>△</sub> GG          | Iso= Cau2                                  |
| Nco1       | C <sup>∇</sup> CATG <sub>△</sub> G         | Iso= NspSA3                                |
| Nde1       | CA <sup>∇</sup> TA <sub>△</sub> TG         |  |
| Nde2       | <sup>∇</sup> GATC <sub>△</sub>             | Iso Mbo1                                   |
| Nhe1       | G <sup>∇</sup> CTAG <sub>△</sub> C         |  |
| Nla3       | <sub>△</sub> CATG <sup>∇</sup>             |  |
| Nla4       | GGN <sup>∇</sup> NCC                       |  |
| Not1       | GC <sup>∇</sup> GGCC <sub>△</sub> GC       |  |
| Nru1       | TCG <sup>∇</sup> CGA                       | Iso= Ama1, Sbo13                           |
| Nsi1       | A <sub>△</sub> TGCA <sup>∇</sup> T         | Iso= Ava3                                  |
| Nsp(7524)1 | R <sub>△</sub> CATG <sup>∇</sup> Y         | Iso=NspH1                                  |
| Nsp(7524)2 | G <sub>△</sub> DGCH <sup>∇</sup> C         | Iso= Sdu1                                  |
| NspB2      | CMG <sup>∇</sup> CKG                       |  |
| NspH1      | R <sub>△</sub> CATG <sup>∇</sup> Y         | Iso= Nsp(7534)I                            |
| Pac1       | TTA <sub>△</sub> AT <sup>∇</sup> TAA       |  |
| PaeR7I     | C <sup>∇</sup> TCGA <sub>△</sub> G         |  |
| Pal1       | GG <sup>∇</sup> CC                         | Iso Hae3                                   |
| Pf1m1      | CCAN <sub>△</sub> NNN <sup>∇</sup> NTGG    |  |
| Pf1M1      | CCAN <sub>△</sub> NNN <sup>∇</sup> NTGG    |  |
| Ple1       | GAGTCNNNN <sup>∇</sup> N <sub>△</sub>      |  |

|         |  |  |
|---------|--|--|
| Pml1    | CAC <sup>^</sup> GTG                                   |  |
| PpuM1   | RG <sup>^</sup> GWC <sup>^</sup> CY                    |  |
| Psa1    | RG <sup>^</sup> GNC <sup>^</sup> CY                    |  |
| Pst1    | C <sup>^</sup> TGCA <sup>^</sup> G                     | Iso=AliaJ1, BsuB1, Cfl1, Mau1, others  |
| Pvu1    | CG <sup>^</sup> AT <sup>^</sup> CG                     | Iso= Nbl1, Rsh1, Rsp1, Xnl1, Xor2      |
| Pvu2    | CAG <sup>^</sup> CTG                                   | Iso= Bav1, Cfr61, Mz11                 |
| Rma1    | C <sup>^</sup> TA <sup>^</sup> G                       |  |
| Rsa1    | GT <sup>^</sup> AC                                     |  |
| Rsr2    | CG <sup>^</sup> GWC <sup>^</sup> CG                    |  |
| Sac1    | G <sup>^</sup> AGCT <sup>^</sup> C                     | Iso= Ecol362, NasS1, Scol, Sst1        |
| Sac2    | CC <sup>^</sup> GC <sup>^</sup> GG                     | Iso= Bac1, Cfr371, Sst2, others        |
| Sall    | G <sup>^</sup> TCGA <sup>^</sup> C                     | Iso= Nop1, Rha1, Xma1, others          |
| Sau1    | CC <sup>^</sup> TNA <sup>^</sup> GG                    | Iso= Aoc1, Cvn1, Eco811, Mst2, others  |
| Sau3A1  | <sup>^</sup> GATC <sup>^</sup>                         |  |
| Sau96I  | G <sup>^</sup> GNC <sup>^</sup> C                      | Iso Asu1, Cfr13I, Sdyl                 |
| Scal    | AGT <sup>^</sup> ACT                                   | Iso= Asp7631                           |
| ScrF1   | CC <sup>^</sup> N <sup>^</sup> GG                      | Iso= Eco431, Msp671, Sso2, others      |
| Sdul    | G <sup>^</sup> DGCH <sup>^</sup> C                     | Iso= Aoc2, Bsp12861, Nbp(7524)2        |
| Secl    | C <sup>^</sup> CNNG <sup>^</sup> G                     |  |
| SfaN1   | GCATC <sup>^</sup> NNNN <sup>^</sup> NNNN <sup>^</sup> |  |
| Sfil    | GGCCN <sup>^</sup> NNN <sup>^</sup> NGGCC <sup>^</sup> |  |
| Sma1    | CCC <sup>^</sup> GGG                                   | Iso= Cfr91, Xcy1, Xma1                 |
| SnaB1   | TAC <sup>^</sup> GTA                                   | Iso= Ecol051, Ecol582                  |
| Spe1    | A <sup>^</sup> CTAG <sup>^</sup> T                     |  |
| Sph1    | G <sup>^</sup> CATG <sup>^</sup> C                     | Iso= Pae1, SpaX1                       |
| Spl1    | C <sup>^</sup> GTAC <sup>^</sup> G                     |  |
| Ssp1    | AAT <sup>^</sup> ATT                                   |  |
| Sst1    | G <sup>^</sup> AGCT <sup>^</sup> C                     | Iso= Sac1                              |
| Sst2    | CC <sup>^</sup> GC <sup>^</sup> GG                     | Iso= Sac2                              |
| Stu1    | AGG <sup>^</sup> CCT                                   | Iso=Aat1, Asp781, Ecol471, Gd11, NtaS1 |
| Sty1    | C <sup>^</sup> CWVG <sup>^</sup> G                     | Iso= Ecol301, EcoT141, EcoT1041        |
| Taq1    | T <sup>^</sup> CG <sup>^</sup> A                       | Iso= Tfl1, TthHB81                     |
| Tfi1    | G <sup>^</sup> AAT <sup>^</sup> C                      |  |
| Tha1    | CG <sup>^</sup> CG                                     |  |
| Tth111I | GACN <sup>^</sup> N <sup>^</sup> NGTC                  | Iso= Fsu1, Nta1, Sph2, Tte1, Ttr1      |
| Xba1    | T <sup>^</sup> CTAG <sup>^</sup> A                     |  |
| Xcm1    | CCANN <sup>^</sup> NN <sup>^</sup> NNNTGG              |  |
| Xho1    | C <sup>^</sup> TCGA <sup>^</sup> G                     | Iso= Abri, BsuM1, PaeR71, Sex1, others |
| Xho2    | R <sup>^</sup> GATC <sup>^</sup> Y                     | Iso=Mfl1                               |
| Xma1    | C <sup>^</sup> CCGG <sup>^</sup> G                     | Iso= Sma1                              |
| Xma3    | C <sup>^</sup> GGCC <sup>^</sup> G                     | Iso=Eag1, Eco521                       |
| Xmn1    | GAANN <sup>^</sup> NN <sup>^</sup> TTC                 | Iso= Asp7001                           |

## KETERANGAN:

| Simbol | Mengenal basa |
|--------|---------------|
| R      | A/G           |
| B      | C/G/T         |
| Y      | C/T           |
| M      | A/C           |
| V      | A/C/G         |
| K      | G/T           |
| S      | C/G           |
| D      | A/G/T         |
| W      | A/T           |
| H      | A/C/T         |
| N      | A/C/G/T       |





## LAMPIRAN 12

## KOMPOSISI DAN CARA PEMBUATAN LARUTAN

**1X Bufer TE**

- 10 mM TRIS pH 8
- 1 mM disodium EDTA pH 8
- dilarutkan dalam ddH<sub>2</sub>O

**5X TBE**

- 60.55 g TRIS
- 30.90 g boric acid
- 20 ml 0.5 M disodium EDTA pH 8
- ditambahkan ddH<sub>2</sub>O sampai volumee akhir 1 liter dengan pH 8

**Ethidium bromide**

- 10 mg/ml dilarutkan dalam ddH<sub>2</sub>O

**5X Loading dye**

- 20% Ficoll (Pharmacia atau Sigma)
- 0.1% Bromophenol Blue
- 0.01 M TRIS pH 8
- 0.01 M disodium EDTA pH 8
- 0.1% xylene cyanol FF
- dilarutkan dalam ddH<sub>2</sub>O

**0.8 % gel agarose**

- 0.8 g agarose
- 100 ml 1 X TBE
- dididihkan dan kemudian didinginkan sampai suhu 50 - 60° C, lalu dituangkan

**10 % SDS**

- 50 g SDS
- ditambahkan ddH<sub>2</sub>O sampai volumenya 500 ml

**20 x SSC**

- 3 M NaCl
- 0.3 M Na Citrate
- dilarutkan dalam ddH<sub>2</sub>O (pH sebaiknya 7)

**Proteinase K (10mg/ml)**

- 10 mM TRIS pH 8
- 5mM disodium EDTA pH 8
- 0,5% SDS
- diaduk dan diinkubasi pada 37° C selama 30 menit
- disimpan dalam tabung-tabung kecil 1 ml pada -20° C

**2X bufer lisis**

- 100 mM disodium EDTA pH 8
- 100 mM TRIS pH 8
- 200 mM NaCl
- dilarutkan dalam ddH<sub>2</sub>O



## DAFTAR KATA

- Acc I*** : Enzim pemotong DNA yang diisolasi dari bakteri *Acinetobacter calcoaceticus*, dan memotong sikuen DNA  
GT<sup>+</sup>CGAC  
CAGC<sup>-</sup>TG  
Hasil potongan DNA berupa *sticky end*.
- Bakteriophage*** : Suatu virus yang menginfeksi bakteri.
- Bakteriophage M13*** : Virus yang dapat menginfeksi bakteri *Escherichia coli* dan ditemukan dalam bentuk rantai ganda atau tunggal dalam sel bakteri *E. coli* yang terinfeksi
- Blunt End*** : Potongan rantai ganda DNA yang mempunyai ujung 5' atau 3' rata.
- Bp (base pair)*** : Satuan yang dipakai untuk menyatakan panjang DNA.
- Denaturasi*** : Pemutusan ikatan hidrogen pada molekul-molekul nukleotida.
- Dideoksinukleotida***: Suatu nukleotida yang tidak mempunyai gugus hidroksil pada ujung 3' sehingga penempelan dideoksinukleotida pada polinukleotida dapat menghambat sintesa DNA  
Dideoksinukleotida terdiri atas dCTP/dGTP/dTTP/dATP atau dikenal pula sebagai dNTP.
- Gel Elektroforesis*** : Pemisahan molekul DNA pada gel yang didasarkan pada ukuran ukurannya.
- Hha I*** : Enzim pemotong DNA yang diisolasi dari bakteri *Haemophilus haemolyticus* dan memotong sikuen DNA  
GCG<sup>+</sup>C  
C<sup>-</sup>GCG  
Hasil potongan DNA berupa *sticky end*.
- Isoschizomer*** : Enzim pemotong DNA yang diisolasi dari bakteri berbeda tetapi memotong pada sikuen yang sama. Contoh: enzim *Hha I* dan *Hin PI*.
- Klon*** : suatu populasi sel yang identik dan mengandung molekul DNA rekombinan yang identik pula.

- Konsensus sikuen** : Sikuen nukleotida yang digunakan untuk menggambarkan jumlah sikuen yang bertalian erat meskipun tidak identik. Setiap posisi nukleotida pada konsensus sikuen menunjukkan nukleotida yang sering ditemukan pada sikuen yang sebenarnya.
- Ligasi (ligation)** : penggabungan 2 potongan DNA dengan enzim ligase, yang berfungsi memperbaiki ikatan fosfodiester.
- Nanogram (ng)** :  $10^{-9}$  gram atau  $10^3$  pikogram
- Mer** : nukleotida
- Nde I*** : Enzim pemotong DNA yang diisolasi dari bakteri *Neisseria denitrificans* dan memotong sikuen DNA  
 CA'TATG  
 GTAT'AC  
 Hasil potongan DNA berupa *sticky end*.
- Nsi I*** : Enzim pemotong DNA yang diisolasi dari bakteri *Neisseria sicca* dan memotong sikuen DNA  
 ATGCA'T  
 T'ACGTA  
 Hasil potongan DNA berupa *sticky end*.
- Plasmid** : Suatu molekul DNA sirkular yang terdapat di dalam bakteri dan hidup bebas di dalam sel tanpa pengaruh kromosom bakteri.
- Primer** : suatu rantai pendek oligonukleotida yang menempel pada rantai tunggal DNA dan menjadi titik permulaan dari sintesis DNA.
- Sel kompeten** : Suatu kultur bakteri yang sudah diperlakukan secara khusus untuk meningkatkan kemampuan sel dalam mengambil molekul DNA.
- Sikuen (sequence)** : urutan basa-basa (G,A,T,C) yang menyusun DNA
- Sikuening DNA** : Digunakan untuk menentukan urutan basa-basa dalam molekul DNA.
- Sma I*** : Enzim pemotong DNA yang diisolasi dari bakteri *Serratia marcescens* dan memotong sikuen DNA  
 CCC'GGG  
 GGG'CCC  
 Hasil potongan DNA berupa *blunt end*.

*Southern blot* : Suatu teknik memindahkan DNA dari gel agarose ke membran nitroselulosa atau nylon.

*Transformasi* : Proses memasukkan DNA asing ke dalam sel hidup.



## RIWAYAT HIDUP

### 1. DATA PRIBADI

**Nama** : Taniawati Supali  
**Lahir** : 26 Juni 1962 di Pekalongan  
**Agama** : Katholik  
**Status keluarga** :

**Ayah** : Hudianto Supali  
**Ibu** : Jeni Supali  
**Adik** : Dra. Iwanti Supali  
           Dra. Susanti Supali  
           Setiaji Supali

### 2. PENDIDIKAN

#### 2.1. Pendidikan formal

1969-1974 : Tamat sekolah dasar  
           Sekolah Dasar Yayasan Pendidikan Sampangan di  
           Pekalongan

1975-1977 : Tamat Sekolah Menengah Pertama  
           Sekolah Menengah Pertama Yayasan Pendidikan  
           Sampangan di Pekalongan

1978-1981 : Tamat Sekolah Menengah Atas  
           Sekolah Menengah Atas Negeri Pekalongan

1981-Januari 1987 : Tamat Sarjana Biologi  
           Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu  
           Pengetahuan Alam Universitas Indonesia

#### 2.2. Pendidikan non formal

Oktober 1987 : Kursus bioteknologi ASEAN selama 3 minggu di Kuala Lumpur, Malaysia

- September 1988 : Pelatihan mengenai kloning dan sikuensing selama 6 bulan di Smith College, Northampton, Massachussets, USA
- Juni 1991 : Penelitian pelacak DNA *B. malayi* selama 12 bulan di Smith College, Northampton, Massachussets, USA

### 3. PEKERJAAN

- Februari 1987 : Asisten di Bagian Parasitologi, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

### 4. AKTIVITAS

- 1989 : Pemenang Harapan II Bidang Ilmu Ilmu Lingkungan dan Hayati, Universitas Indonesia  
Judul: Detection of *Brugia malayi* and *Brugia pahangi* parasites by biotinylated DNA probes

### 5. PENELITIAN DAN PUBLIKASI

- Supali, T., Carlow, C.K.S., Philipp, M., Bahang, Z.B., Partono, F. 1988. Identifikasi larva infeksi *B. malayi* dalam nyamuk dengan stadium dan spesifik antibodi monoklonal. Seminar Parasitologi Nasional V & Kongres Perkumpulan Pemberantasan Penyakit Parasit Indonesia (P4I), 20-22 Agustus 1988 di Bogor, Jawa Barat.
- Supali, T., Williams, S.A., Poole, C.B., Glover, J., McReynolds, L.A., Partono, F. 1989. Detection of *B. malayi* and *B. pahangi* parasites by biotinylated DNA probes. In the Indonesian-United States Conference on the Application of Biotechnology in the Study of Zoonotic Parasites and Their Vectors, Jakarta, Indonesia, June 26-29, 1989.
- Supali, T., Williams, S.A., Sartono, E., McReynolds, L.A., Kurniawan, A., Wibowo, H., Glover, J., Partono, F. 1989. Non-radioactive DNA probes for the diagnosis of Brugian parasites. WHO sponsored meeting: DNA probes to diagnose Filariasis, December 1989 in Jakarta, Indonesia.
- Supali, T., Rukmono, B., Kurniawan, A., Sartono, E., Wibowo, H., Partono, F. 1990. Khasiat ivermectin dosis tunggal (20 - 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) pada cacing usus manusia. Seminar Parasitologi Nasional VI & Kongres Perkumpulan Pemberantasan Penyakit Parasit Indonesia (P4I), 23 - 25 Juni 1990 di Pandaan, Jawa Timur.