

# Sertifikat

Diberikan Kepada:

Dra. Hasmiwati, M.Kes

Atas Partisipasinya Sebagai:

## PEMAKALAH SEMINAR NASIONAL BIOLOGI

Tema

**“Optimalisasi Riset Biologi dalam Bidang Pertanian,  
Peternakan, Perikanan, Kelautan, Kehutanan,  
Farmasi dan Kedokteran”  
Medan, 15 Februari 2014**



Dekan FMIPA USU

Dr. Sutarman, M.Sc.  
NIP.196310261991031001

Ketua Panitia Pelaksana

  
Prof. Dr. Syafruddin Ilyas, M.Biomed.  
NIP.196602091992031003

**Prosiding**  
**SEMINAR NASIONAL**  
**BIOLOGI**  
**Medan, 15 Februari 2014**

**“Optimalisasi Riset Biologi  
Dalam Bidang Pertanian, Peternakan, Perikanan,  
Kelautan, Kehutanan, Farmasi dan Kedokteran”**

Editor :

Prof. Dr. Mansyurdin, MS. (Univ. Andalas, Padang)  
Prof. Dr. Manihar Situmorang, MSc., PhD. (Univ. Negeri, Medan)  
Prof. Dr. Ramadanil Pitopang, MSi. (Univ. Tadulako, Medan)  
Dr. Salomo Hutahaean (Univ. Sumatera Utara, Medan)  
Dr. Hesti Wahyuningsih, MSi. (Univ. Sumatera Utara, Medan)  
Dr. Saleha Hanum, MSi. (Univ. Sumatera Utara, Medan)



**Departemen Biologi**  
**Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**  
**Universitas Sumatera Utara**  
**Medan**

 **USU**press

2014

**USU Press**

*Art Design, Publishing & Printing*  
Gedung F, Pusat Sistem Informasi (PSI) Kampus USU  
Jl. Universitas No. 9  
Medan 20155, Indonesia

Telp. 061-8213737; Fax 061-8213737

usupress.usu.ac.id

© USU Press 2014

Hak cipta dilindungi oleh undang-undang; dilarang memperbanyak menyalin, merekam sebagian atau seluruh bagian buku ini dalam bahasa atau bentuk apapun tanpa izin tertulis dari penerbit.

ISBN 979 458

Perpustakaan Nasional Katalog Dalam Terbitan (KDT)

Prosiding Seminar Nasional Biologi; Optimalisasi Riset Biologi dalam Bidang Pertanian, Peternakan, Perikanan, Kelautan, Kehutanan, Farmasi dan Kedokteran / Editor: Mansyurdin...[et.al.] – Medan: Usu Press, 2014

x, 441 p.: illus.; 29 cm

ISBN: 979-458-

Dicetak di Medan, Indonesia

|  |     |
|--|-----|
| PERSEBARAN MARGA <i>BOUEA</i> ( <i>ANACARDIACEAE</i> ) DI SUMATRA<br>Tri Harsono, Nursahara Pasaribu, Sobir, Fitmawati .....   | 371 |
| KAJIAN JENIS-JENIS TUMBUHAN YANG DIMANFAATKAN SEBAGAI OBAT<br>OLEH MASYARAKAT DI KOTA SABANG<br>Zuriana, S. dan Irvianty .....   | 376 |
| <b>MIKROBIOLOGI DAN GENETIKA</b>   |     |
| ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI DARI GINJAL IKAN NILA ( <i>Oreochromis niloticus</i> )<br>Cut Yulvizar .....  | 383 |
| ISOLASI DAN EKSTRAKSI DNA BAKTERI ENDOSIMBION DARI ANGGREK<br>PHALAEOPSIS<br>Dewi Nur Anggraeni .....  | 390 |
| JAMUR PADA PASIR SARANG DAN CANGKANG TELUR PENYU LEKANG ( <i>Lepidochelys<br/>olivacea</i> L.) YANG GAGAL MENETAS DI KAWASAN KONSERVASI PENANGKARAN<br>PENYU PARIAMAN SUMATERA BARAT<br>Fuji Astuti Febria, Nasril Nasir, Selfia Anwar ..... | 395 |
| KLONING KANDIDAT FRAGMENT DNA BERMOTIF MIKROSATELIT PENANDA GENETIK<br><i>Aedes aegypti</i> VEKTOR DEMAM BERDARAH DENGUE<br>Hasmiwati, Desy arysanti dan Eka Novita .....  | 400 |
| BUDI DAYA JAMUR PADALI ( <i>Lentinus</i> sp) UNTUK MENAMBAH JAMUR KOMERSIAL<br>DI INDONESIA<br>Ikhsan Matondang dan Noverita .....   | 407 |
| <i>Cosmopolites sordidus</i> GERMAR, SERANGGA VEKTOR PENYAKIT DARAH BAKTERI<br>( <i>Ralstonia solanacearum</i> Phylotype IV ) PADA TANAMAN PISANG DI SUMATERA BARAT<br>Mairawita, Suswati, Habazar .....                                     | 413 |
| PENGARUH FORMULASI BIOSTARTER EKSTRAK NENAS DAN LAMA PENYANGRAIAN<br>TERHADAP MUTU BUBUK KOPI<br>Setyohadi, Terip Karo-Karo, Sentosa Ginting, Healthy Aldriany Prasetyo .....  | 419 |
| ANALISIS DIVERSITAS GENETIK DAN STRUKTUR POPULASI TUMBUHAN LANGKA,<br>EDELWEIS ( <i>Anaphalis javanica</i> ) DENGAN PENANDA ISSR<br>Syamsuardi, Tesri Maideliza, Rizki Paramitha Mukhti dan Ahmad Taufiq .....                               | 424 |
| PENDUGAAN JUMLAH GEN PENGENDALI BENTUK BUNGA KEMBANG KERTAS<br>( <i>Zinnia elegans</i> Jacq)<br>Tumiur Gultom, Aziz-Purwantoro, Endang Sulistyaningsih, Nasrullah, Samse Pandiangan .....  | 431 |
| PENGENDALIAN BIOFILM <i>Streptococcus agalactiae</i> PADA PERMUKAAN SISIK IKAN<br>DAN PLASTIK PVC DENGAN SENYAWA ANTIBAKTERI <i>Lactobacillus plantarum</i><br>PERAIRAN TAWAR<br>Ulfayani Mayasari, It Jamilah, Herla Rusmarilin .....       | 437 |

## KLONING KANDIDAT FRAGMEN DNA BERMOTIF MIKROSATELIT PENANDA GENETIK *Aedes aegypti* VEKTOR DEMAM BERDARAH DENGUE

Hasmiwati<sup>1</sup>, Desy arysanti<sup>2</sup> dan Eka Novita<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Parasitology Division, medical Faculty, Andalas University, Padang  
Email: hasmiwati65@gmail.com

<sup>2</sup> Biochemistry Division, medical Faculty, Andalas University, Padang

### ABSTRAK

Usaha pengendalian secara genetik *Ae. aegypti* vektor Demam Berdarah Dengue (DBD), membutuhkan informasi sekuen yang mengandung motif mikrosatelit. Sekuen dari fragmen yang bermotif mikrosatelit akan digunakan untuk pendesainan penanda genetik *Ae. aegypti*. Untuk itu diperlukan proses kloning sebelum melakukan sekuensing. Ligasi dan transformasi kandidat fragmen yang bermotif mikrosatelit *Ae. aegypti* telah dilakukan menggunakan plasmid *pGem-T easy* dan *E. coli* DH5 $\alpha$  sebagai inang. Sel kompeten disiapkan dengan metode CaCl<sub>2</sub> dan transformasi dengan metode *Heat sock* (kejut panas). Hasil kloning didapatkan 85% koloni putih dan 15% koloni biru. Verifikasi insert dilakukan dengan PCR koloni menggunakan primer 21-mer menghasilkan fragmen sesuai dengan fragmen awal. Isolasi DNA plasmid dan PCR dengan primer T7SP6 berhasil membuktikan fragmen insert. Hasil analisis BLAST untuk mengetahui homologi sekuen yang telah diklon mempunyai nilai homologi 80% dengan E-value 3e-11.

**Kata Kunci :** *Ae. aegypti*, penanda genetik, mikrosatelit, Ligasi, transformasi

### PENDAHULUAN

Peningkatan kasus DBD setiap tahun selalu terjadi, hal ini salah satu penyebabnya adalah belum berhasilnya program pengendalian nyamuk vektornya *Ae. aegypti*. Salah satu usaha yang dapat dilakukan untuk pengendalian nyamuk vektor *Aedes aegypti* adalah dengan pengendalian secara genetik. Dalam usaha pengendalian secara genetik ini diperlukan informasi tentang diversitas genetik, Diversitas genetik merupakan salah satu cara untuk melihat keanekaragaman genetik suatu spesies berdasarkan inter dan intra populasi. Diversitas genetik dapat dipelajari dengan menggunakan beberapa marker/penanda seperti allozim, RAPD, RFLP dan mikrosatelit (Lovin, *et al.*, 2009).

Penanda mikrosatelit merupakan salah satu tool, marker molekuler yang dikembangkan untuk mempelajari genetika populasi dan diversitas genetik pada serangga dan merupakan salah satu tool yang mempunyai tingkat kepercayaan yang tinggi (Jarne dan Lagoda, 1996). Penelitian mengenai diversitas genetik *Aedes aegypti* berdasarkan mikrosatelit telah dilakukan antara lain oleh Huber *et al.*, (1999) tentang sekuen mikrosatelit sebagai marker/penanda dalam studi genetik *Aedes aegypti* sebagai vektor demam berdarah. Ravel, *et al.*, (2001) melakukan studi awal tentang genetika populasi *Aedes aegypti* di Mexico. Lovin, *et al.*, (2009) mengenai pengembangan polimorfik mikrosatelit dan validasi serta studi populasi genetika nyamuk *Aedes aegypti* di Haiti. Kemudian Paupy, *et al.*, (2010) menggabungkan data morfologi dan mikrosatelit untuk melihat variabilitas morfologi dan genetik *Aedes aegypti* di Niakhar, Senegal.

Penanda mikrosatelit merupakan penanda molekuler yang berbasis informasi dari fragmen DNA yang mengandung motif mikrosatelit. Untuk mendapatkan penanda tersebut dilakukan karakterisasi dan kloning dari kandidat fragmen bermotif mikrosatelit.

Dalam tulisan ini akan diuraikan kegiatan kloning kandidat fragmen DNA bermotif mikrosatelit *Ae. aegypti* yang selanjutnya akan disekuensing dan akan didesain primer untuk mendapatkan penanda mikrosatelit yang akan digunakan untuk mempelajari diversitas genetik *Ae. Aegypti* terkait dengan struktur genetik populasinya vektor DBD tersebut.

### CARA KERJA

#### Ligasi dan Transformasi

Ligasi dan transformasi menggunakan *pGem-T easy vector* (Promega) dan *E. coli* DH5 $\alpha$ , prosedur yang dilakukan sesuai dengan rekomendasi produsen. Ringkasan prosedurnya sebagai berikut. kandidat fragmen DNA bermotif mikrosatelit di purifikasi dan hasil purifikasi dicek dengan gel elektroforesis, selanjutnya fragmen tunggal diukur konsentrasinya selanjutnya dijadikan templat

untuk proses ligasi. Proses ligasi diinkubasi pada suhu 4°C selama 1 malam. Komposisi cocktail untuk reaksi ligasi ke dalam *pGem-Teasy* vektor dapat dilihat pada Tabel 1 berikut :

Tabel 1 : Komposisi reaksi ligasi DNA ke dalam *pGEM<sup>®</sup>-T Easy vector*

| Komponen                               | Hasil PCR | Kontrol positif | Kontrol negatif |
|--|-----------|-----------------|-----------------|
| DNA hasil PCR                          | 0,3 µl    | -               | -               |
| <i>pGEM<sup>®</sup>-T easy</i> (50 ng) | 1,00 µl   | 1,00 µl         | 1,00 µl         |
| T4 DNA ligase (3 U/µl)                 | 1,00 µl   | 1,00 µl         | 1,00 µl         |
| 2x rapid buffer ligasi                 | 5,00 µl   | 5,00 µl         | 5,00 µl         |
| DNA sisipan kontrol                    | -         | 2,00 µl         | -               |
| Air deion steril                       | 2,7 µl    | 1,00 µl         | 3,00 µl         |
| Total volume                           | 10,00 µl  | 10,00 µl        | 10,00 µl        |

Campuran ligasi selanjutnya digunakan untuk proses transformasi yang menggunakan bakteri *E.coli* DH5a yang telah dibuat menjadi kompeten dengan metoda CaCl<sub>2</sub>. *E.coli* dibuat kompeten supaya dapat menerima plasmid *pGem-Teasy* yang telah diligasi dengan kandidat fragmen yang bermotif mikrosatelit.

### Pembuatan sel kompeten

Pembuatan sel kompeten mengikuti protokol Inoue *et al.* (1990) dengan sedikit modifikasi. Suhu merupakan faktor yang harus diperhatikan dalam pembuatan sel kompeten *E.coli* DH5a, suhu harus dijaga selalu dalam kondisi dingin selama proses perlakuan kimiawi dan dalam kondisi aseptik.

Bakteri *E.coli* DH5a dari stok gliserol diambil 1 ose dan diinokulasikan kedalam media LB padat (2% Tryptone, 0,5% yeast extract, 1%(v/v) 1 M NaCl, 25% (v/v) 1 M KCl, 1% (v/v) 2 MgCl<sub>2</sub>, 1,5% Agar). Diinkubasi pada suhu 37°C semalam. Satu koloni tunggal *E.coli* DH5a umur 16-18 jam diambil dan diinokulasikan kedalam 5 – 6 ml medium LB cair pada tabung falcon 50 ml (kultur cair skala kecil). Inkubasi pada suhu 37°C dan dishaker selama 1 malam dengan kecepatan 150 rpm.

Dari kultur cair skala kecil, diambil suspensi sel sebanyak 2 ml dan diinokulasikan kedalam 30 ml medium LB cair pada labu erlemeyer 50 ml. Diinkubasi pada suhu 37°C dishaker pada kecepatan 150 rpm selama 4 jam. Suspensi dipanen ke tabung 2 ml, lalu disentrifuse 14.000 rpm 4°C selama 5 menit diulang sampai 3 kali. Supernatan dibuang, pelet diresuspensi dalam es ditambah dengan 500 ul 0,1 CaCl<sub>2</sub> *ditipping* beberapa detik sampai larut, diinkubasi pada es selama 20 menit, kemudian di sentrifuse 14.000 rpm pada 4°C selama 20 menit. Supernatan dibuang, pellet diresuspensi kedalam 500 ul 0,1 M CaCl<sub>2</sub> dan diinkubasi dalam es selama 20 menit.

### Transformasi

Metode yang dipakai adalah metode *Heat Shock* (kejut panas) mengikuti protokol Inoue *et al.* (1990) yang telah dimodifikasi. Sebanyak 5µl (2% Tryptone, 0,5% yeast extract DNA hasil ligasi (plasmid rekombinan) dimasukkan kedalam tabung falcon 15 ml (polipropilen) dingin kemudian dicampur dengan 50 – 100 µl sel kompeten. Tabung dijentik-jentik perlahan agar tercampur rata diinkubasi pada es selama 20 menit.

Tabung di heat shock dengan cara dimasukkan kedalam inkubator suhu 42°C selama 50 detik dan secara cepat tabung dipindahkan kedalam es selama 20 menit. Sebagai media pertumbuhan transforman ditambahkan 950 µl SOC (2% Tryptone, 0,5% yeast extract, 1% (v/v) 1 M NaCl, 25% (v/v) 1 M KCl, 1% (v/v) 2 MgCl<sub>2</sub>, 1,0% glukosa), diinkubasi pada suhu 37°C pada shaker selama 1 – 3 jam dengan kecepatan 200 rpm.

Kultur sel transforman sebanyak 50 – 100 µl ditanam pada medium LB padat yang telah mengandung 100 µg/ml ampicilin, 100 µl IPTG (100 mM Isopropylthio-β-D. galactoside) dan 20 µl X-gal (50 mg/ml), kultur diratakan dengan spraidsteril (plating) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama semalam. Diamati koloni putih dan koloni biru, koloni putih menandakan ada nya fragmen yang terinsert dan koloni biru tidak adanya fragmen yang terinsert. Verifikasi hasil transformasi di cek dengan koloni PCR menggunakan primer 21-mer.

### PCR Koloni

PCR koloni dilakukan untuk konfirmasi insert pada vektor yang diinginkan dengan menggunakan primer 21-mer. Amplifikasi dilakukan menggunakan RTG-bead, semua komponen PCR telah berbentuk bead dan ditambah 25 ul ddH<sub>2</sub>O. Ke dalam campuran tersebut ditambahkan 1 koloni yang dihomogenkan. Produk PCR di cek dengan gel elektroforesis.

### Isolasi DNA Plasmid

Isolasi DNA plasmid dilakukan berdasarkan metode lisis Sambrook *et al.* (1989) dengan sedikit modifikasi. Koloni putih tunggal yang berasal dari kultur transforman ditumbuhkan dalam 10 ml media selektif LB cair yang mengandung 100 µg/ml ampicilin, diinkubasi semalam pada suhu 37°C dengan shaker pada kecepatan 150 rpm.

Panen sel kultur bakteri dengan cara sentrifuse pada kecepatan 14.000 rpm selama 20 detik. Isolasi DNA plasmid ini dilakukan dengan menggunakan kit isolasi DNA Plasmid (Promega). Pellet dilarutkan dengan *nuclease free water* dan disimpan pada -20°C. Untuk kepastian hasil transformasi telah tersisip dalam plasmid, dicek dengan gel elektroforesis 1,2% dan selanjutnya dilakukan verifikasi dengan mengamplifikasi menggunakan primer 21-mer untuk mengetahui ukuran fragmen yang tersisip. Selanjutnya dilakukan PCR dengan menggunakan primer T7SP6 untuk menentukan ukuran fragmen sisipan pada plasmid *pGem-Teasy*. Amplifikasi dilakukan menggunakan RTG-bead PCR, semua komponen sudah berbentuk bead dan hanya menambahkan ddH<sub>2</sub>O dan DNA template.

### Sekuensing

Analisis sekuensing dilakukan di Jerman yang di kirim melalui Universitas Brawijaya Malang dan di Macrogen Korea, primer yang digunakan adalah T7 dan SP6.

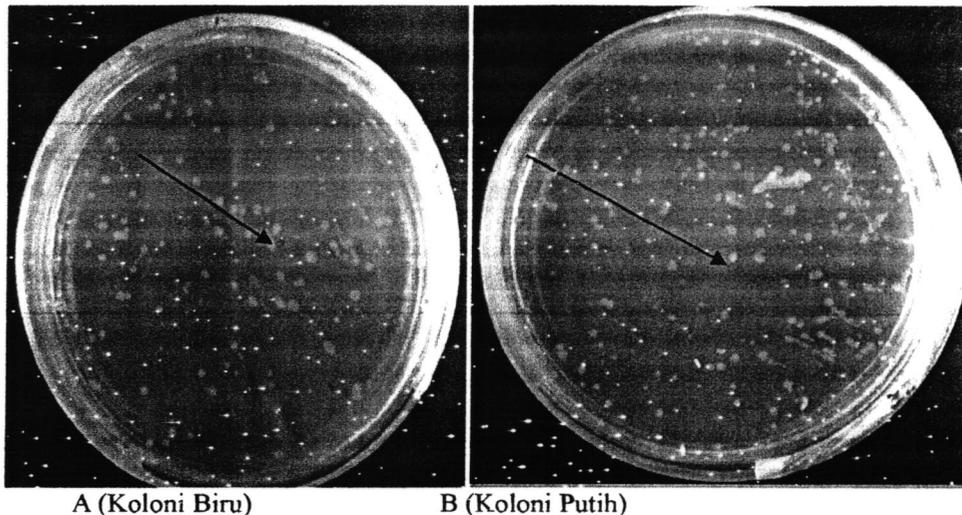
Untuk mengedit hasil sekuensing menggunakan teknik bioinformatika dengan program Bioedit software yang diakses secara online pada situs: NCBI: <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/>. Selanjutnya dilakukan *vecsreen* dengan situs NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Vecsreen/> untuk menentukan daerah insert dari rekombinan yang disekuensing. Hasil *vecsreen* di BLAST untuk mengetahui homologi sekuen yang didapat dengan data GenBank dan selanjutnya dianalisis dengan *Microsatellite Finder* yang juga secara online untuk mendapatkan motif mikrosatelit. Analisis ini dilakukan secara online.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Ligasi dan Transformasi

Hasil transformasi kandidat fragmen yang bermotif mikrosatelit menggunakan *pGem-T easy* dan inang *E.coli* DH5α dapat dilihat pada Gambar 1. Seleksi transforman dilakukan dengan skrining koloni biru putih (*blue-white screening*), secara teoritis koloni berwarna putih menunjukkan insert (rekombinan) yang membawa fragmen sisipan, sedangkan koloni warna biru tidak ada insert (bukan rekombinan).

Koloni hasil transformasi yang didapat pada penelitian ini didapatkan koloni biru (15%) dan koloni putih (85%). Hal ini menunjukkan bahwa efisiensi transformasi cukup berhasil, terbentuknya koloni berwarna putih karena terdapatnya fragmen DNA sisipan pada plasmid yang menghambat sintesis α-peptida yang berperan sebagai aktivator terhadap kerja enzim β-galaktosidase (Reece, 2004). Gen *Lac-Z* yang mengkode enzim β-galaktosidase yang mengkatalisis pemecahan laktosa menjadi galaktosa tidak mampu merubah senyawa X-Gal (5-bromo-4-kloro-3-indol-β-D galaktopiranosasida) menjadi warna biru karena adanya fragmen sisipan yang merusak basa gen *Lac Z* sehingga ekspresi gen yang menghasilkan enzim fungsional tidak terjadi. Hal ini menyebabkan koloni berwarna putih.



Gambar 1: Contoh Duplikat Koloni hasil transformasi

Seleksi biru putih adalah metode yang digunakan untuk mengetahui plasmid yang rekombinan dan yang tidak rekombinan, dilakukan untuk mengetahui keberhasilan proses ligasi atau keberadaan fragmen sisipan. Metode ini menggunakan media yang mengandung X-Gal dan IPTG (isopropyl Thiogalaktosida) (Brown,1991). X-Gal adalah molekul yang mirip galaktosida, IPTG berfungsi sebagai penginduksi ekspresi gen sedangkan X-Gal berfungsi sebagai substrat. Hasil penelitian ini sesuai dengan teori bahwa koloni yang berwarna putih adalah koloni bakteri rekombinan yang mengandung fragmen sisipan yang dapat dikatakan bahwa proses ligasi dan transformasi dinyatakan berhasil ( Brown,1991).

Pada proses transformasi menggunakan  $\text{CaCl}_2$ , Molekul  $\text{CaCl}_2$  ini dapat membuat dinding sel bakteri menjadi terbuka. Fragmen DNA yang ditambahkan pada campuran ini akan membentuk kompleks resisten DNase dengan ion  $\text{Ca}^{2+}$  yang terikat pada permukaan sel. Kompleks tersebut akan digunakan sel selama perlakuan *heat shock* (kejutpanas) (Susanto,2009). Larutan  $\text{CaCl}_2$  ini akan membuat dinding sel lebih permeabel sehingga akan bermuatan positif dan akan menarik fragmen DNA yang bermuatan negatif.

Pengamatan koloni bakteri yang ditumbuhkan dalam cawan petri dengan media LB yang mengandung ampisilin selama 18–20 jam pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  (Gambar 1). *E.coli* yang telah disisipi vektor *pGem-T* yang memiliki gen resisten ampisilin akan tumbuh sebaliknya bakteri yang tidak memiliki gen resisten ampisilin tidak akan tumbuh. Morfologi bakteri yang tumbuh terlihat bulat, mengkilat dan berbau khas.

Koloni bakteri yang berwarna putih merupakan koloni rekombinan. Replikasi molekul DNA rekombinan didalam sel bakteri mengikuti mekanisme normal replikasi DNA kromosomal yang terdapat dalam bakteri, untuk itu DNA rekombinan harus memiliki sekuen permulaan replikasi (ORF) atau berada dalam struktur sirkulair tertutup dan berpita ganda ini berlaku pada vektor yang berbasis plasmid (Jamsari, 2007).

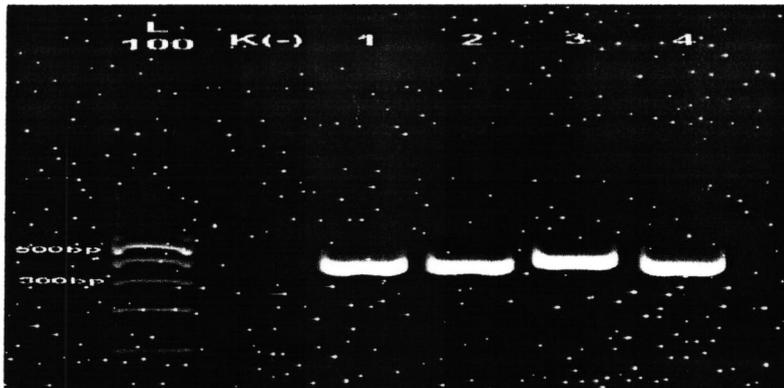
#### Koloni yang mengandung Fragmen Insert

Verifikasi koloni transforman dilakukan dengan tehnik PCR koloni menggunakan primer 21-mer. Hasil PCR koloni (Gambar 2) . Pada gambar dapat dilihat pada kolom K (-) adalah koloni biru yang menandakan tidak adanya fragmen terinsert sedangkan kolom 1, 2, 3 dan 4 koloni putih menunjukkan adanya fragmen yang teramplifikasi menandakan adanya fragmen terinsert. . Ukuran fragmen yang terinset sesuai dengan ukuran awal fragmen sebelum ditransformasi yait 300 – 450 bp.

#### Isolasi DNA Plasmid Rekombinan

Isolasi DNA plasmid rekombin dilakukan dengan mengkultur koloni berwarna putih mengkilat yang dipilih secara acak. Salah satu contoh hasil isolasi DNA plasmid seperti terlihat pada Gambar 3A. Hasil isolasi DNA plasmid yang terlihat dapat dinyatakan bahwa isolasi ini cukup berhasil karena

didapatkan panjang fragmen DNA yang dihasilkan lebih panjang dari ukuran awal DNA plasmid *pGem-T easy* ( lebih 3.000 bp). Berdasarkan hasil ini dapat dikatakan bahwa fragmen terinsert secara baik pada plasmid rekombinan.

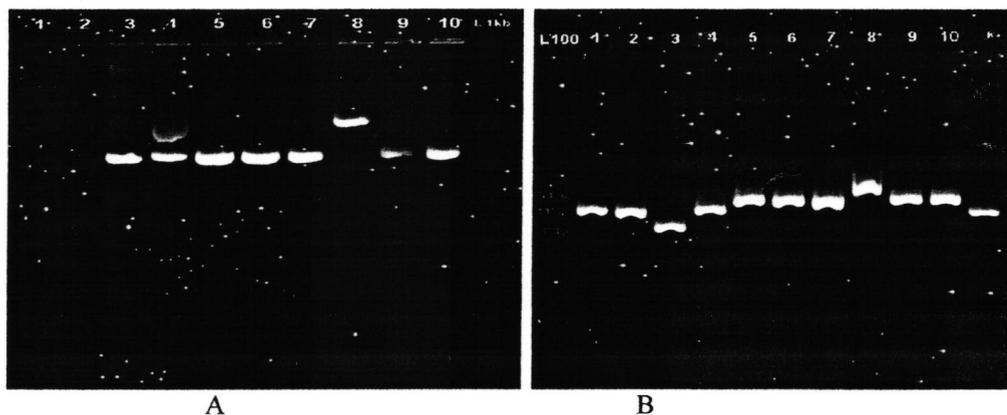


Gambar 2 : Hasil elektroforesis PCR Koloni (K(-)) = Koloni biru, 1,2, 3 dan 4 = koloni putih)

Hasil isolasi DNA plasmid selanjutnya di verifikasi lagi dengan melakukan PCR menggunakan primer 21-mer, hasil PCR menunjukkan adanya fragmen sesuai dengan fragmen DNA awal (Gambar 3B), Sebelum melakukan proses sekuensing di PCR lagi dengan menggunakan primer T7SP6. Sekuensing dilakukan untuk memastikan adanya motif mikrosatelit pada kandidat fragmen yang telah dikoloning.

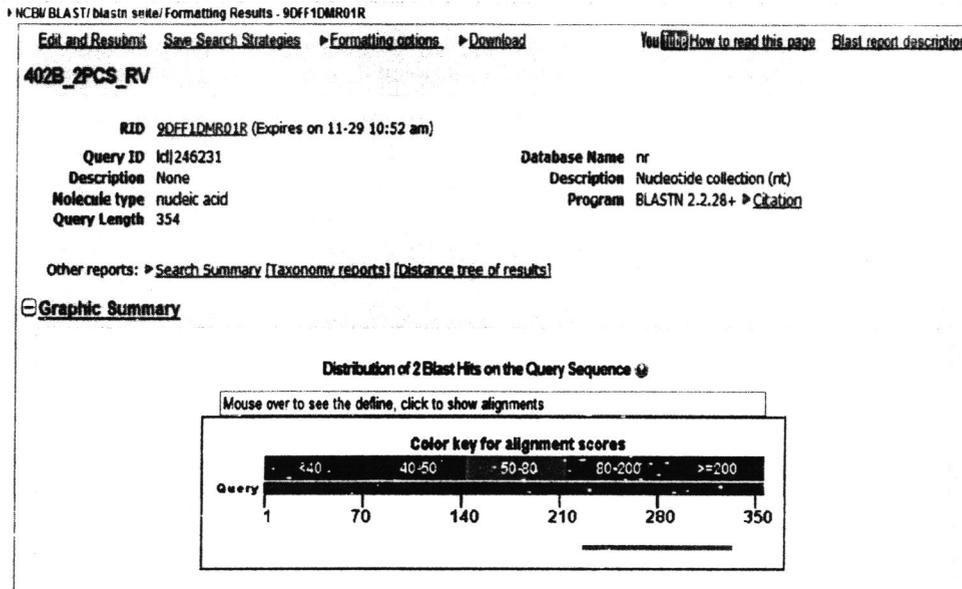
**Analisis Data Sekuensing**

Hasil analisis data sekuen menunjukkan adanya fragmen insert, ukuran fragmen yang berhasil disekuensing adalah 512 bp, setelah di edit, dilanjutkan analisis *vecsreen* (memisahkan sekuen target dan vektor), selanjutnyadi BLAST (untuk menilai homologi/kesamaan fragmen yang diklon dengan data GenBank.



Gambar 3 : Hasil elektroforesis Isolasi DNA plasmid koloni rekombinan (A) dan hasil elektroforesis PCR DNA plasmid rekombinan dengan primer 21- mer (B)

Didapatkan nilai homologi 80% dan E-value 3e-11, hasil ini menunjukkan nilai berwarna merah menunjukkan homologi yang sanat tinggi, untuk garis warna merah muda untuk tingkat homologi tinggi, garis hijau untuk tingkat homologi sedang, garis biru untuk tingkat homologi rendah dan garis hitam untuk tingkat homologi yang sangat rendah. homologi sedang (Gambar 4). Menurut Claveri dan Notredame (2003) garis yang



Gambar 4 : Hasil analisis BLAST kandidat fragmen bermotif mikrosatelit

**KESIMPULAN SARAN**

**Kesimpulan**

Dari penelitian ini dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

1. Ligasi dan transformasi kandidat fragmen bermotif mikrosatelit berhasil dilakukan dengan adanya koloni putih (ada insert) dan koloni biru (tanpa insert)
2. Koloni PCR dan PCR menggunakan primer awal (primer 21-mer) dan primer T7SP6 berhasil membuktikan adanya fragmen insert.
3. Hasil analisis data sekuensing dari fragmen insert menunjukkan nilai homologi 80% dibandingkan data GenBank *Ae.aegypti*.

**Saran**

Dari hasil penelitian ini dapat disarankan :

1. Melanjutkan proses kloning untuk kandidat fragmen mikrosatelit yang lain supaya mendapatkan variasi motif mikrosatelit target.
2. Untuk dapat merancang penanda yang spesifik sampel fragmen hasil cloning dimurnikan dengan metode purifikasi dan melakukan sekuensing dengan sampel yang banyak.

**Ucapan Teimakasih**

Penelitian ini dibiayai oleh Dirjen Dikti (DP2M) melalui HPEQ Project (Program Peningkatan Kualitas Pendidikan Dokter (PHKPKPD) FK UNAND Tahun Anggaran 2013 . Dengan Nomor Kontrak : 02/PHKPKPD/ FKUNAND /2013. Ucapan terimakasih kepada Bapak Prof. Dr.sc.agr.Jamsari, MP yang telah mengarahkan dan membimbing jalannya penelitian ini.

**DAFTAR PUSTAKA**

Brown, T.A, 1991. Pengantar Kloning Gen. Penterjemah: Sumiati, A.M dan Praseno. Yogyakarta. Yayasan Essentia Medica.

Claveri, J.M. dan C. Notredame. 2003. Bioinformatics for Dummies. Ed ke – 2. New York : Wiley Publishing

Huber K, Mousson L, Rodhain F, Failloux A-B.1999. Microsatellite sequences as markers for population genetic studies of the mosquito *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg*, 61:1001-1003.

Huber, K., Mousson, L., Rodhain, F., Failloux, A.B., 2001. Isolation and variability of polymorphic microsatellite loci in *Aedes aegypti* the vector of dengue viruses. *Mol. Ecol. Notes* 1, 219-222.-prone spontaneously hypertensive rat. *Cell* 67:657-662.s.

- Inoue H, Nojima H and Okayama H. 1990. High Efficiency transformation of *Escherchia coli* with plasmids. *Gene* 96:23-28
- Jarne, P. And Pierre J.L. Lagoda. 1996. Microsatellites from molecule to populations and back. *Elsivier Sci.* 11 : 424-429.
- Jamsari. 2007. Bioteknologi Pemula Prinsip Dasar dan Aplikasi Analisis Molekuler. Unri Pres. Pekanbaru.
- Lovin, D.D., Washington, K.O., deBruyn, B., Hemme, R.R., Mori, A., Epstein, S.R., Harker, B.W., Streit, T.G., Severson, D.W., 2009. Genome-based polymorphic microsatellite development and validation in the mosquito *Aedes aegypti* and application to population genetics in Haiti. *BMC Genomics* 10, 590.
- Paupy Christophe C., Brengues C. Ndiath C, Toty C., Herve JP, Simard F. 2010. Morphological and genetic variability within *Aedes aegypti* and in Niakhar, Senegal *Genetics and Evolution* 10 (2010) 473-480.
- Paupy C, Gilbert LG, Cécile B, Mabel G, Jimmy R, Zaïra BS, Herve J-P and Didier F. 2012. Genetic structure and phylogeography of *Aedes aegypti*, the dengue and yellow-fever mosquito vector in Bolivia. *Infection, Genetics and Evolution* 12 : 1260-1269
- Promega. 1999. Protocol and Application Guide. Edisi ke 3 USA. Promega Corporation.
- Ravel S, Nicole M, Dolores VO, Juan E Vand Gerard .2001. A preliminary study of the population genetics of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Mexic using microsatellite and AFLP markers *Acta Tropica* 78 () 241-250
- Ravel S, Herve J.P., Diarrassouba S, Kone A, Cuny G. 2002. Microsatellite markers for population genetic studies in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Co'te d'Ivoire: evidence for a microgeographic genetic differentiation of mosquitoes from Bouake. *Acta Trop.* 82, 39-49.
- Reece, R.J. 2004. *Analysis of Genes and Genomes*. England : John Willey & Sons Ltd.
- Sambrook, J., Fritsly, EF. And Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning, Laboratory Manual*. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Suryanto, D., 2003. *Melihat keanekaragaman organism melalui beberapa teknik genetika molekuler*. Digitized by USU Digital Library. FMIPA. USU.
- Susanto, A.H., 2009. *Bahan Ajar Biologi Molekuler. Dasar-Dasar Teknologi DNA Rekombinan*. <http://biomol.wodpress.com> {Januari 2014}
- Weber, J. L., and May, P. E. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.* 44: 388-396.
- Weising K, Nybom H, Wolff K and Kahl. 2005. *DNA Fingerprinting in Plants: Principle, Methode and Applications*. London: CR Press.