

I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Plasmid rekombinan pNZ8148-IFN merupakan plasmid pNZ8148 (vektor ekspresi bakteri asam laktat) yang telah disisipkan dengan gen penyandi *human* interferon α -2b *codon optimized* (Mohseni *et al.* 2017). Plasmid pNZ8148-IFN digunakan sebagai vektor ekspresi untuk produksi protein rekombinan interferon α -2b pada inang *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) (Nugraha 2019). Produksi protein rekombinan ini diperlukan dalam kegiatan karakterisasi biokimia, proses industri dan komersial yang membutuhkan tingkat ekspresi protein yang tinggi, karena itu perlu diketahui tingkat ekspresinya (Rosano & Ceccarelli 2014). Tingkat ekspresi protein ini ditentukan oleh jumlah plasmid atau *plasmid copy number* (PCN) yang mampu dikonservasi oleh bakteri inang (Tal & Paulsson 2012). Salah satu metode yang dapat mengetahui PCN adalah metode qPCR. *Quantitative* PCR (qPCR) merupakan metode PCR yang dapat mengukur produk amplifikasi DNA pada setiap siklus dengan menggunakan pewarna fluoresen sebagai penanda yang akan dideteksi oleh detektor (Singh *et al.* 2014).

Metode qPCR mampu mengukur PCN dengan membandingkan amplifikasi gen referens (kromosom bakteri) dengan gen target (plasmid pNZ8148-IFN) yang terdeteksi, semakin banyak jumlah suatu gen target maka semakin sedikit siklus amplifikasi yang dibutuhkan untuk terdeteksi dan siklus ini dinamakan dengan siklus ambang atau *Cycle Threshold* (C_T). Rasio siklus terdeteksi yang terhitung antara gen referens dengan gen target merupakan nilai PCN. Metode untuk menganalisis kuantifikasi PCN terdiri dari Kuantifikasi Absolut dan Kuantifikasi Relatif. Kuantifikasi Absolut mendeterminasi PCN gen target dengan mengaitkan sinyal PCR dengan kurva standar. Sedangkan Kuantifikasi Relatif ($\Delta\Delta C_T$) mendeterminasi gen target dengan mengaitkan pada plasmid sebagai kalibrator. Namun, untuk melakukan analisis memerlukan kondisi optimum pada proses amplifikasi PCR sehingga perlu dilakukan uji optimasi sebelum dilakukan metode tersebut (Plotka *et al.* 2017).

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah metode sintesis fragmen spesifik DNA (gen target) secara enzimatik dengan jumlah besar (Ehtisham *et al.* 2016). PCR merupakan metode yang prosesnya dijalankan menggunakan pengulangan siklus temperatur yang terdiri dari tahap denaturasi 95°C, *annealing* pada 40-70°C, dan ekstensi pada 72°C. Tahap *annealing* merupakan fase paling krusial yang sangat memerlukan kondisi optimum pada temperaturnya, karena pada tahap ini terjadi penempelan primer pada utas DNA spesifik yang membutuhkan temperatur optimum agar primer menempel dengan sempurna pada target sekuen DNA yang diinginkan (Erjavec 2019; Nurjayadi *et al.* 2019). Selain itu, hal yang penting juga perlu diuji adalah efisiensi PCR.

Efisiensi PCR adalah kemampuan untuk menggandakan satu sekuen spesifik DNA yang dalam satu siklus PCR menjadi dua sekuen, efisiensi PCR penting untuk diuji karena dalam analisis perhitungan qPCR dibutuhkan estimasi dengan presisi yang tinggi. Estimasi yang tidak akurat akan menyebabkan kesalahan besar pada proses perhitungan PCN (Svec *et al.* 2015). Efisiensi PCR dapat diketahui dengan metode qPCR dengan membentuk kurva standar dari perbandingan deret konsentrasi template DNA dengan C_T sehingga dihasilkan persamaan linear, lalu kemiringan



dari persamaan tersebut akan diinput dalam persamaan $E = 10^{(-1/B)}$ dimana B adalah kemiringan dan E adalah efisiensi PCR (Svec *et al.* 2015). Primer IFN yang digunakan pada penelitian ini adalah primer telah didesain spesifik terhadap gen *human* interferon α -2b *codon optimized* yaitu Fw_IFN_opt (5'-GTC ACG ACT TTG GGT TTC CAC-3') dan Rv_IFN_opt (5'-GTC CCA GGC AGC TGA TGA AT-3') (Gasmi *et al.* 2010).

Pada penelitian ini dilakukan determinasi temperatur *annealing* optimum dan uji efisiensi pada primer IFN yang spesifik terhadap gen *human* interferon α -2b *codon optimized* pada plasmid pNZ8148-IFN, sebagai permulaan untuk penelitian determinasi *plasmid copy number* pNZ8148-IFN pada *L. lactis*.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah primer IFN yang spesifik dengan gen *human* interferon α -2b *codon optimized* telah berhasil didesain namun belum diketahui temperatur *annealing* optimum dan efisiensi PCR untuk plasmid rekombinan pNZ8148-IFN.

1.3 Tujuan

Penelitian ini bertujuan mendeterminasi temperatur *annealing* optimum dan uji efisiensi primer IFN terhadap plasmid rekombinan pNZ8148-IFN.

1.4 Manfaat

Harapan dari penelitian ini adalah primer IFN yang telah dideterminasi temperatur *annealing* dan efisiensinya terhadap dapat plasmid rekombinan pNZ8148-IFN dapat digunakan dalam penelitian determinasi *plasmid copy number* pNZ8148-IFN pada *L. lactis*.



II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 PCR

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah metode perbanyakan fragmen spesifik DNA dari template DNA dengan prinsip replikasi utas ganda DNA spesifik dengan serangkaian 3 fase siklus temperatur yaitu: fase denaturasi, fase *annealing* dan fase ekstensi. Pertama, fase denaturasi merupakan proses pemisahan utas ganda DNA template yang dilakukan dengan mengatur temperatur pada 94°C dengan tujuan untuk membuka utas ganda DNA template, denaturasi terjadi akibat ikatan hidrogen terputus akibat energi kalor sehingga utas ganda DNA menjadi utas tunggal. Fase berikutnya adalah *annealing*, temperatur diatur pada 40-70°C. Ikatan yang hidrogen yang sebelumnya terputus mulai terbentuk kembali dan utas DNA yang komplemen akan mengalami penempelan (*Annealing*) akibat pendinginan temperatur antara 40-70°C (Garibyan & Avashia 2013).

Primer lebih mudah mengalami *annealing* daripada untai DNA akibat polimer sekuensnya lebih pendek. Apabila temperatur *annealing* tinggi, *annealing* akan lebih selektif, spesifik dan sulit, namun apabila rendah maka akan terjadi sebaliknya. Lalu, fase terakhir yaitu ekstensi diatur pada temperatur 72°C, fase ini terjadi sintesis DNA komplementer baru dengan enzim Taq polimerase pada utas tunggal DNA yang telah di-*anneal* dengan primer dan pembentukan utas baru dari monomer deoksiribonukleosida trifosfat (dNTP) di dalam campuran reaksi. Siklus ini diulang sampai 30 kali hingga didapatkan jumlah produk yang sesuai (Garibyan & Avashia 2013).

Tipe PCR terdiri dari 4 tipe utama yaitu: PCR Standar, *Reverse Transcription*-PCR (RT-PCR), *quantitative* PCR (qPCR), dan Kombinasi RT-PCR/qPCR. PCR standar telah dimodifikasi sehingga memiliki tipe beberapa varian diantaranya: PCR Spesifik Alel, PCR Asimetris, PCR Koloni, *Degenerate* PCR, *Hotstart* PCR, *Inverse* PCR, *Miniprimer* PCR, *Multiplex* PCR, *Nested* PCR, dan *Touchdown* PCR. Selanjutnya, tipe *Reverse Transcription*-PCR (RT-PCR) yang merupakan PCR yang mampu mendeteksi tingkat ekspresi RNA dengan membuat DNA komplementer (cDNA) dari RNA yang dibantu oleh enzim *reverse transcriptase* (Singh *et al.* 2014).

Quantitative PCR (qPCR) merupakan tipe PCR yang mampu mendeteksi pewarna DNA reporter fluoresen seperti SYBR *Green* I untuk mengukur amplifikasi DNA tiap siklusnya. Saat fase log linear amplifikasi PCR, sinyal fluoresen mencapai titik yang bisa diukur oleh detektor yang disebut *Threshold Cycle* (C_T) atau siklus ambang. Sehingga, dengan menggunakan pengenceran seri dari kuantitas standar DNA yang telah diketahui, jumlah DNA atau cDNA pada sampel yang tidak diketahui bisa diukur sebagai nilai C_T dengan membuat kurva standar log konsentrasi template DNA dan C_T . qPCR mampu menggabungkan dua fungsi sekaligus yaitu fungsi amplifikasi dan fungsi deteksi sehingga akan mengurangi proses pasca amplifikasi sampel (Elektroforesis DNA). Kelebihan lain yang juga dimiliki qPCR adalah seperti: sensitivitas, *real time* (deteksi secara langsung) dan analisis yang presisi (Singh *et al.* 2014).

Kelebihan ini disebabkan oleh kemampuan pewarna fluoresen DNA ataupun probe oligonukleotida menempel pada utas DNA baru yang terbentuk sehingga intensitasnya berkorelasi dengan jumlah sekuen DNA target yang

tebentuk. Lalu, kombinasi antara RT-PCR dan qPCR merupakan deteksi kuantitatif ekspresi RNA, teknik RT-PCR digunakan untuk konversi RNA menjadi cDNA dimana untuk deteksi kuantitatif ekspresi RNA digunakan gabungan teknik RT-PCR dan qPCR (Singh *et al.* 2014).

2.2 Primer

Primer merupakan sepasang untai tunggal sekuen DNA (*forward* (maju) dan *reverse* (mundur)) buatan yang panjangnya yang umumnya sekitar 18-25 pb dan komplementer pada awal dan akhir sekuen DNA target yang akan diamplifikasi. Primer akan menempel pada sekuen yang sesuai dengan basa komplementer, lalu enzim DNA Taq polimerase bekerja membentuk utas DNA baru (Rahman *et al.* 2013). Penelitian Anindyajayati *et al.* (2016) dengan metode qPCR menunjukkan penggunaan primer yang menargetkan gen *thymidine kinase* pada bakteri *E. coli* (*Ptdk*) memiliki panjang 22 pb (*forward*) & 21 pb (*reverse*) dan primer yang menargetkan gen region konservasi ekspresi untuk replikasi (*Pori*) pada plasmid pBR322 dan pUC memiliki panjang 20 pb (*forward*) dan 22 pb (*reverse*). Penelitian dari Plotka *et al.* (2016) menggunakan primer dengan target gen *bla* dan *dxs* dengan masing-masing panjang primer 20 pb. Primer-primer yang digunakan pada penelitian tersebut memiliki panjang normal pada umumnya yaitu 18-25 pb dan masih komplementer terhadap gen targetnya.

2.3 Temperatur *Annealing*

Temperatur *Annealing* (T_a) merupakan temperatur fase kedua setelah denaturasi pada siklus temperatur pada PCR, dan bertujuan menempelkan utas primer dengan utas DNA target. Temperatur ini sangat menentukan keberhasilan proses amplifikasi DNA karena pada tahap tersebut terjadi penempelan primer akan pada region target DNA yang memerlukan temperatur yang optimum, sehingga apabila tidak tercapai maka produk DNA yang dihasilkan tidak akan maksimal (Nurjayadi *et al.* 2019). Temperatur *annealing* optimum dapat diuji dengan membandingkan hasil elektroforesis dari deret temperatur *annealing* sampel PCR. Temperatur *annealing* diuji berdasarkan temperatur lelehan atau *melting temperature* (T_m) yaitu temperatur dimana separuh dari DNA utas ganda primer mengalami pelelehan (Anindyajayati *et al.* 2016). Penelitian Nurjayadi *et al.* (2019) memberikan informasi bahwa T_a optimum pada 60°C dengan primer yang digunakan pada T_m 60.5°C (*forward* dan *reverse*) sedangkan penelitian Plotka *et al.* (2017) nilai T_m optimum yaitu sebesar (*bla*) 53.8°C (*forward*); 51.8°C (*reverse*) dan (*dxs*) 51.8°C (*forward*) 53.8°C (*reverse*) dan T_a optimum yang didapatkan adalah 58°C.

2.4 Efisiensi PCR

Efisiensi PCR merupakan ukuran tingkat keberhasilan amplifikasi fraksi molekul DNA target pada siklus PCR. Kalkulasi nilai efisiensi PCR dilakukan dengan membuat plot korelasi (kurva standar) *Cycle Threshold* (C_t) dengan konsentrasi logaritmik DNA template sehingga akan memberikan persamaan $y = Bx + A$. Kemudian, efisiensi PCR akan didapatkan dengan menggunakan persamaan $E = 10^{(-1/B)}$. Efisiensi PCR terbaik pada nilai rentang 1.85-2.05 (Anindyajati *et al.* 2016; Svec *et al.* 2015). Hasil penelitian sebelumnya oleh

Anindyajayati *et al.* 2016 menunjukkan bahwa primer *Ptdk* memiliki nilai efisiensi 1.95 dan primer *Pori* nilai efisiensi 1.97 serta penelitian dari Plotka *et al.* (2016) juga menunjukkan nilai efisiensi PCR yaitu 2 pada masing-masing primer yang menargetkan gen *bla* dan *dxs*. Nilai tersebut menunjukkan nilai efisiensi PCR yang baik karena masih pada rentang normal 1.85-2.05.

2.5 Plasmid Rekombinan pNZ8148-IFN

Plasmid pNZ8148 merupakan vektor ekspresi yang memiliki cakupan inang luas (umumnya pada bakteri asam laktat), memiliki gen resistensi kloramfenikol, dan promotor *nisA* yang diikuti oleh situs enzim restriksi *NcoI* untuk fusi translasi pada kodon ATG. Plasmid ini mengandung terminator setelah region MCS (*Multicloning Site*). Plasmid ini diketahui memiliki tingkat replikasi tidak terlalu tinggi, namun masih bisa diatasi dengan inang *E.coli* dan *L. lactis* yang bisa mengenal dengan baik oleh 2 titik awal replikasi yaitu *repA* dan *repC* sehingga replikasi bisa ditingkatkan (Kusuma *et al.* 2017). Pada penelitian yang dilakukan oleh Nugraha (2019) menunjukkan plasmid pNZ8148 berhasil direkayasa yaitu dengan hasil tersisipkannya plasmid pNZ8148 oleh gen penyandi *human* interferon α -2b pada *L. lactis*.

III METODE

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan selama 10 bulan, dimulai dari bulan April 2019 sampai dengan bulan Januari 2020. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Rekayasa Genetika Terapan dan Protein, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia Bioteknologi Cibinong, Bogor.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat-alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu Inkubator, *Vortex*, Lemari Es, *UV Transluminator*, *Thermocycler*, *CFX96 Touch Real Time PCR Detection*, *Autoclave*, *Laminar Air Flow*, Korek Api, Seperangkat Alat Elektroforesis, Ruang Asam, Neraca Analitik Digital, Tabung Falcon, *Sentrifuge* Hitachi CR21GIII Series-High Speed Refrigerated Centrifuge dengan rotor R12A, Pipet Mikro, *NanoDrop™ 2000c Spectrophotometer* (Thermo Scientific), *Bulb*, Tabung Mikro, Tip, Bunsen, Tisu, Kasa, Kapas Hidrofil, *Gloves*, Masker, dan Alat-alat gelas.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Kloramfenikol, Aseton, Lisozim, Fenol, PCI (Fenol : Kloroform : Isoamil Alkohol 25:24:1), Isopropanol, Etanol 70%, ddH₂O, RNase, TBE 0,5X, Agarose, Marka DNA *Ladder* VC 1 Kb, *Loading Dye*, THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix. Media yang digunakan adalah media M17G (M17 + 0.5% glukosa).

Buffer yang digunakan untuk isolasi plasmid berdasarkan metode Duan *et al.* (1999) yaitu buffer resuspensi (I) (50Mm glukosa + 25mM Tris-HCl + 10 mM EDTA), buffer lisis (II) (NaOH 0.2 M + SDS 20%), dan buffer penetral (III) (Kalium Asetat 3 M + Asam Asetat 5 M). Kultur bakteri yang digunakan adalah *L. lactis* strain NZ3900 dengan plasmid pNZ8148-IFN. Primer yang digunakan dalam penelitian ini adalah Fw_IFN_opt (5'-GTC ACG ACT TTG GGT TTC CAC-3') (*Forward*) Tm: 56.4°C dan Rv_IFN_opt (5'-GTC CCA GGC AGC TGA TGA AT-3') (*Reverse*) Tm: 57.5°C. Template yang digunakan untuk penelitian ini adalah plasmid rekombinan pNZ8148-IFN.

3.3 Prosedur Kerja

3.3.1 Isolasi DNA plasmid pNZ8148-IFN dari *L. lactis* NZ3900 (Duan *et al.* 1999)

Tahap awal yang dilakukan penumbuhan bakteri *L. lactis* NZ3900 dengan plasmid pNZ8148-IFN. Sebanyak 5 µl isolat *L. lactis* NZ3900 pNZ8148-IFN diinokulasikan ke dalam media M17G+Kloramfenikol sebanyak 5 ml kemudian diinkubasi pada temperatur 30°C selama 18 jam lalu disentrifugasi dengan kecepatan 9000 rpm selama 2 menit pada temperatur 4°C.

Pelet yang tersisa dari hasil sentrifuse ditambahkan dengan aseton dingin es 200 μ l dengan gerakan aduk pipeting, ditambahkan buffer I 133,3 μ l dan lisozim 66.7 μ l dengan diresuspensi selama penambahan bahan, kemudian diinkubasi selama 15 menit dengan temperatur 37°C kemudian ditambahkan dengan buffer II 300 μ l dan diinkubasi 3 menit. Selanjutnya, buffer III dingin es ditambahkan 170 μ l dengan dibalik perlahan selama 3 menit, kemudian ditambahkan fenol 500 μ l dan dibalik. Langkah selanjutnya yaitu sampel disentrifuse 9000 rpm selama 3 menit pada temperatur 4°C.

Fase supernatan diambil dan ditambahkan dengan PCI 600 μ l, lalu disentrifuse 10000 g 5 menit. Fase supernatan diambil lagi dan ditambahkan dengan isopropanol 600 μ l dalam es. Lalu sampel disentrifuse 10000 g selama 15 menit. Pelet ditambahkan dengan etanol 70% 500 μ l, kemudian disentrifuse kembali 10000 g selama 5 menit. Pelet dikering-anginkan semalaman. Sampel kemudian dilarutkan dengan ddH₂O 27 μ l dan RNase 3 μ l kemudian diinkubasi selama 30 menit pada temperatur 37°C. Hasil isolasi plasmid dielektroforesis dengan agarosa 1% (b/v) pada voltase 100 V selama 25 menit.

3.3.2 Uji Kualitatif dan Kuantitatif DNA Plasmid pNZ8148-IFN (Desjardins & Conklin 2010)

Uji dilakukan dengan menggunakan alat *NanoDrop™ 2000c Spectrophotometer* (Thermo Scientific) dengan menggunakan cahaya pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Pengukuran dimulai dengan pembersihan permukaan optik pada sistem penyimpanan sampel spektrofotometer mikrovolum dengan dipipet 2-3 μ L ddH₂O pada sisi permukaan optik bagian bawah. Lengan tuas ditutup untuk memastikan alas atas bersentuhan dengan ddH₂O. Lengan atas diangkat dan disapu dengan tissue lab. *NanoDrop software* dibuka dan dipilih aplikasi asam nukleat. Pengukuran blank dilakukan menggunakan pipettor volume kecil terkalibrasi, 1 μ L buffer diteteskan pada bagian bawah permukaan optik. Lengan tuas ditutup dan dipilih pilihan “Blank” pada aplikasi asam nukleat. Setelah pengukuran blank selesai, kedua permukaan optik dibersihkan dengan tissue lab. Konstanta DNA-50 dipilih untuk sampel untuk diukur. Sampel 1 μ L diteteskan pada permukaan optik dan lengan tuas ditutup. Sampel hanya perlu berada diantara dua permukaan optik karena pengukuran tidak bergantung pada volume. Pilihan “Measure” dipilih pada *software* aplikasi. *Software* secara otomatis mengukur konsentrasi dan rasio kemurnian.

3.3.3 Determinasi Temperatur *Annealing* Optimum PCR (Anindyajayati *et al.* 2016)

Determinasi temperatur *annealing* optimum yang mengamplifikasi gen target *human interferon α -2b codon optimized* pada hasil isolasi plasmid pNZ8148-IFN dilakukan pada temperatur *annealing* uji yaitu 56°C; 57°C; 58°C; 59°C; & 60°C dengan formulasi pada Tabel 1. PCR dilakukan menggunakan sepasang primer IFN dimana proses diawali dengan predenaturasi pada temperatur 95°C selama 1 menit diikuti dengan 40 siklus amplifikasi (denaturasi 95°C selama 1 menit, *annealing* pada temperatur uji selama 30 detik, dan ekstensi 72°C selama 30 detik) dan ekstensi akhir 72°C

selama 10 menit. Hasil PCR kemudian dielektroforesis dengan agarosa 1% (b/v) pada voltase 100 V selama 25 menit.

Tabel 1 Formulasi PCR Determinasi Temperatur *Annealing* Optimum

Bahan	Jumlah (μL)
Thunderbird qPCR mix	5.0
DNA Template	1.0
Primer <i>forward</i>	0.4
Primer <i>reverse</i>	0.4
ddH ₂ O	3.2

3.3.4 Determinasi Efisiensi PCR (Anindyajati *et al.* 2016; Pfaffl 2001)

Determinasi efisiensi PCR dengan formulasi bahan pada Tabel 2. Proses dijalankan dengan konsentrasi template plasmid pNZ8148-IFN pada 0.1 ng/μl; 1 ng/μl dan 10 ng/μl dengan ulangan sebanyak 3 kali setiap konsentrasinya, selanjutnya proses diawali dengan predenaturasi pada temperatur 95°C selama 1 menit diikuti dengan 40 siklus amplifikasi (denaturasi 95°C selama 1 menit, *annealing* pada temperatur optimum selama 30 detik, dan ekstensi 72°C selama 30 detik) dan ekstensi akhir 72°C selama 10 menit. Efisiensi PCR dikalkulasi dengan membuat kurva korelasi deret konsentrasi template pNZ8148-IFN dengan C_T, kemudian didapatkan persamaan $y = Bx + A$. Lalu, nilai kemiringan (B) dimasukkan dalam persamaan $E = 10^{(-1/B)}$.

Tabel 2 Formulasi PCR Uji Efisiensi PCR

Bahan	Jumlah (μL)
Thunderbird qPCR mix	5.0
DNA Template	1.0
Primer <i>forward</i>	0.4
Primer <i>reverse</i>	0.4
ddH ₂ O	3.2

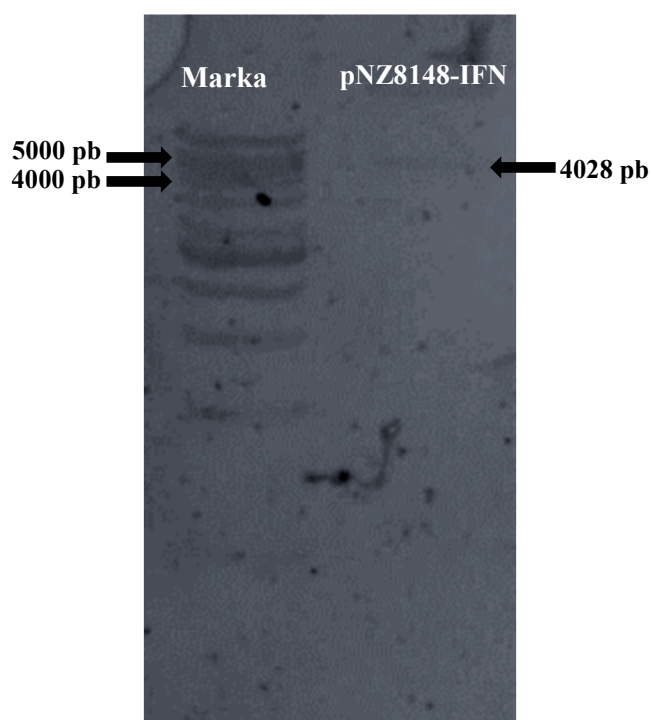


IV HASIL

4.1 DNA plasmid pNZ8148-IFN

4.1.1 Elektroforegram isolasi plasmid pNZ8148-IFN

Elektroforegram hasil isolasi plasmid pNZ8148-IFN (Gambar 1) menunjukkan berhasil dilakukan, pita berada sekitar 4028 pb sesuai dengan di literatur dengan ukuran diantara pita ke-4 (5000 pb) dan pita ke-5 (4000 pb) menggunakan marka ukuran 1 Kb yang terbagi menjadi 13 pita dengan rentang ukuran 10000-250 pb.



Gambar 1 Elektroforegram hasil isolasi plasmid pNZ8148-IFN.

Keterangan: Marka: DNA *Ladder* 1 Kb.

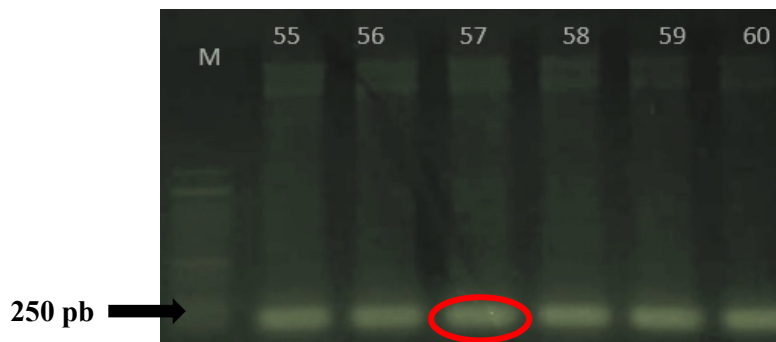
4.1.2 Kuantitatif dan Kualitatif DNA plasmid pNZ8148-IFN

Uji kuantitatif DNA menggunakan *NanoDrop*TM 2000c *Spectrophotometer* (Thermo Scientific) mendapatkan konsentrasi plasmid pNZ8148-IFN hasil isolasi 895.35 ng/μL dan kadar kemurnian (rasio absorbansi 280/260) sekitar 1.89.

4.2 Temperatur *Annealing* Optimum

Hasil amplifikasi DNA plasmid pNZ8148-IFN dengan PCR pada temperatur 55°C; 56°C; 57°C; 58°C; 59°C; dan 60°C menggunakan primer IFN (Gambar 2) menunjukkan pada temperatur 57°C paling optimum (pita yang

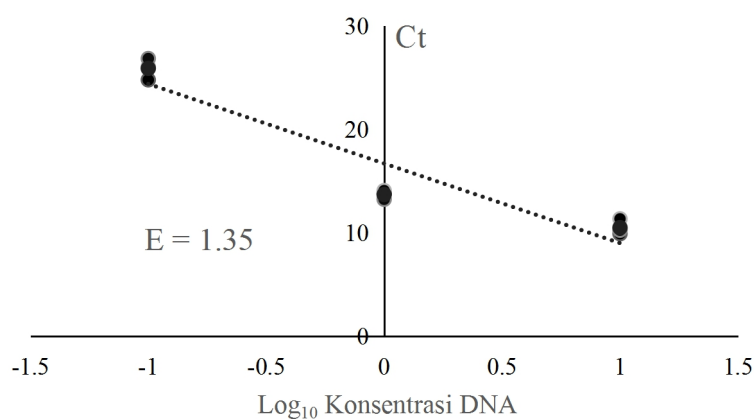
intensitasnya paling jelas yaitu pada temperatur 57°C dengan perbandingan kejelasan semua pita sebagai berikut: 60°C<55°C<59°C<56°C<58°C<57°C semua pada ukuran marka ± 250 pb, dengan letak pada pita ke-13 (250 pb) marka ukuran 1 Kb yang terbagi menjadi 13 pita dengan rentang ukuran 10000-250 pb .



Gambar 2 Hasil elektroforesis PCR plasmid pNZ8148-IFN untuk determinasi temperatur *annealing* optimum. Keterangan: Temperatur *annealing* yang diuji yaitu pada suhu 55°C; 56°C; 57°C; 58°C; 59°C; dan 60°C. M: Marka DNA *Ladder* 1 Kb.

4.3 Efisiensi PCR

Hasil uji efisiensi PCR plasmid pNZ8148-IFN menghasilkan nilai efisiensi sebesar 1.35 (Gambar 3). Data hasil qPCR dan perhitungan regresi linier terdapat pada Lampiran 5 dan 6.



Gambar 3 Pengaruh Konsentrasi DNA pNZ8148-IFN pada nilai C_T pada detektor mesin qPCR Keterangan : Sumbu x adalah tingkat sinyal terdeteksi (C_T) dan sumbu y adalah Logaritmik basis 10 konsentrasi DNA. Persamaan Regresi : $y = -7.6933x + 16.669$, $R^2 = 0.8979$ (Koefisien Determinasi).

V PEMBAHASAN

5.1 DNA plasmid pNZ8148-IFN

Pada elektroforegram hasil isolasi plasmid pNZ8148-IFN didapatkan pita pada ukuran 4028 pb yang menunjukkan bahwa isolasi DNA plasmid pNZ8148-IFN berhasil dilakukan. Elektroforesis gel agarose merupakan teknik pemisahan dan deteksi DNA yang umumnya menggunakan sistem visualisasi sinar UV dan pewarnaan EtBr seperti yang dilakukan pada penelitian ini, sehingga memerlukan kehati-hatian pada proses kerja, pewarna yang digunakan bersifat mutagenik serta sinar UV panjang gelombang pendek (312 nm) membahayakan pengguna sehingga perlu bahan pengganti lainnya yang lebih aman. Pewarna SYBR Green I lebih aman dari EtBr karena bersifat non-mutagenik dan bisa divisualisasi dengan menggunakan sinar tampak (Motohashi 2019). Hasil uji kemurnian (A260/280) sebesar 1,89 mendukung hal ini. Metode uji kualitatif dan kuantitatif DNA plasmid menggunakan teknologi sistem retensi sampel NanoDrop *microvolume*, teknologi ini menggabungkan serat optik dan tegangan permukaan alami untuk menangkap dan mempertahankan sampel pada jumlah sedikit dan tidak memerlukan kuvet dan pipa kapiler sehingga mengurangi langkah pengenceran, mengurangi volume sampel, menambah kontrol kualitas, dan meningkatkan efisiensi (Desjardins & Conklin 2010). Nilai rentang (A260/280) menunjukkan kemurnian DNA dari kontaminasi protein, nilai kemurnian yang baik dari pengotor protein berada pada rentang 1.8-2.0 (Abdelhai *et al.* 2019; Novita *et al.* 2014). Hasil uji kuantitatif yang telah dilakukan memberikan konsentrasi 895.35 ng/ μ L. Rendemen hasil isolasi bisa ditingkatkan lebih tinggi dengan metode elektroekstraksi. Prinsip utamanya sama dengan elektroporasi yaitu menginduksi medan listrik sehingga akan membentuk pori pada membran yang diakibatkan peningkatan permeabilitas, rendemen hasil isolasi bisa mencapai 3 kali lebih tinggi dibanding dengan teknik alkalin lisis (Haberl *et al.* 2013).

5.2 Temperatur *Annealing*

Temperatur *annealing* (Ta) perlu dioptimasi pada temperatur terbaiknya, jika temperatur terlalu rendah akan menyebabkan terjadinya reaksi yang tidak spesifik (*false priming*), dan jika temperatur terlalu tinggi maka primer tidak bisa menempel pada DNA target dan akan menyebabkan produk tidak jadi terbentuk, dan reproduktibilitas rendah (Nolan *et al.* 2013; Handayani *et al.* 2018). Hasil dari uji determinasi Ta optimum primer IFN dengan PCR menunjukkan seluruh temperatur *annealing* uji berhasil diamplifikasi (Gambar 2), dengan pita pada temperatur 57°C paling jelas intensitasnya, mengindikasikan jumlah DNA yang diamplifikasikan lebih tinggi dan primer bekerja lebih optimum untuk mengamplifikasi gen target *human* interferon α -2b *codon optimized*. Temperatur *annealing* optimum untuk primer yang mampu mengamplifikasi target DNA pada proses PCR pada rentang 57-60°C (Dorak 2006; Nurjayadi *et al.* 2019). Penelitian lain pada tipe primer menargetkan IFN γ juga menunjukkan Ta optimum pada 60°C sedangkan pada IFN τ menunjukkan Ta optimum pada 56°C (Roos *et al.* 2019; Rajaravindra *et al.* 2006), sedikit perbedaan pada temperatur 56°C tidak terlalu mempengaruhi secara nyata proses amplifikasi.

5.3 Efisiensi PCR

Efisiensi yang bernilai 2 mengindikasikan terjadi 100% proses amplifikasi produk PCR dalam satu siklus (Rocha *et al.* 2016; Svec *et al.* 2015) Efisiensi PCR primer IFN diperoleh menunjukkan nilai 1.35, sehingga efisiensi yang didapatkan hanya 35%. Hal ini menunjukkan bahwa primer yang diuji memiliki efisiensi yang rendah. (Nybo 2011). Temperatur *annealing* optimum seharusnya akan memberikan efisiensi PCR yang baik. Penyebab rendahnya efisiensi adalah adanya sekuen dari primer yang masih dimungkinkan terbentuk struktur sekunder (Svec *et al.* 2015). Meski primer yang sudah didesain sudah spesifik dengan gen target, perlu adanya penelitian lebih dalam terkait dengan pembentukan struktur sekunder seperti hairpin, heterodimer, dan homodimer (Kalendar *et al.* 2011). Solusi lainnya untuk masalah ini adalah dengan penambahan molekul aditif seperti betain monohidrat, gliserol, polietilen glikol, DMSO, dan 7-Deaza-dGTP yang akan bekerja untuk meningkatkan efisiensi proses amplifikasi, molekul-molekul tersebut mampu memperbaiki struktur sekunder yang terbentuk dan diketahui bekerja pada sekuen DNA dengan persentase GC tinggi (Mok *et al.* 2016).

VI SIMPULAN DAN SARAN

6.1 Simpulan

Temperatur *annealing* primer IFN yang didapatkan adalah 57°C masuk dalam kriteria yang baik yakni (57-60°C). Efisiensi primer IFN yang diperoleh (1.35) masih di luar kriteria yang baik (1.85-2.05).

6.2 Saran

Saran dari hasil evaluasi penelitian ini adalah perlunya studi terkait struktur sekunder pada primer IFN lebih lanjut dan penambahan senyawa aditif untuk meningkatkan efisiensi primer IFN.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdelhai MH, Zhang Q, Zhao L, Mahunu GK, Musa A, Yang Q, Serwah NA, Zhang H. 2019. Effects of baobab (*Adasonia digitata* L.) in combination with *Sporidiobolus pararoseus* Y16 on the activities of the defense-related enzymes and the expression levels of defense-related genes of apples. *Biological Control*. 139: 1-9.
- Anindyajayati, Artarini AA, Riani C, Retnoningrum DS. 2016. Plasmid copy number determination by quantitative polymerase chain reaction. *Scientia Pharmaceutica*. 84: 89-101.
- Desjardins P, Conklin D. 2010. NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *Journal of Visualised Experiments*. 45(e2565): 1-4.
- Duan K, Dunn N, & Kim W. 1999. Rapid plasmid DNA isolation from *Lactococcus lactis* using overnight cultures. *Biotechnology Technique*. 13: 519-521.
- Dorak T. 2006. *Real Time PCR*. Newcastle upon Tyne(UK): Taylor & Francis Group.
- Erjavec MS. 2019. *Annealing Temperature of 55°C and Specificity of Primer Binding in PCR Reactions, Synthetic Biology*. Di dalam. Nagpal ML, Boldura OM, Baltă C, Enany S. *New Interdisciplinary Science*. London(UK): Intechopen.
- Ehtisham M. 2016. Polymerase chain reaction (PCR): back to basic. *Indian Journal Of Contemporary Dentistry*. 4(2): 30-34.
- Garibyan L, Avashia N. 2013. Polymerase chain reaction. *The Journal of investigative dermatology*. 133(3): 1-4.
- Gasmi N, Fudalej F, Nicaud JM. 2011. A molecular approach to optimize hIFN $\alpha 2b$ expression and secretion in *Yarrowia lipolytica*. *Applied Genetics and Molecular Biotechnology*. 89: 109-119
- Handayani PI, Dewi DSW, Sari NPEN, Dewi SAMRW, Yowani SC, Dewi NNA, Yustiantara PS. 2018. In silico primer design and annealing temperature optimization to amplify the fragment of *gyrB* gene *Mycobacterium tuberculosis* isolate P010 using polymerase chain reaction. *Journal of Health and Medicine*. 2(1): 5-8.
- Haberl S, Jarc M, Strancar A, Peterka M, Hodžić D, Miklavčič D. 2013. Comparison of alkaline lysis with electroextraction and optimization of electric pulses to extract plasmid DNA from *Escherichia coli*. *The Journal of Membrane Biology*. 246(11): 861-867.
- Kalendar R, Lee D, Schulman AH. 2011. Java web tools for PCR, *in silico* PCR, and oligonucleotide assembly and analysis. *Genomics*. 98: 137-144.
- Kusuma AVA, Mustopa AZ, Mustafawi WZ, Suharsono. 2017. the production of SPusp45-MSP-1₁₉ gene construct and its recombinant protein in *Lactococcus lactis* to be used as a malaria vaccine. *Medical Journal of Indonesia*. 26: 261-269.

- Mohseni AH, Razavilar V, Keyvani H, Razavi MR, Khavari-Nejad RA. 2017. Efficient production and optimization of E7 oncoprotein from Iranian human papillomavirus type 16 in *Lactococcus lactis* using nisin-controlled gene expression (NICE) system. *Microbial Pathogenesis*. 110: 554-560.
- Mok E, Wee E, Wang Y, Trau M. 2016. Comprehensive evaluation of molecular enhancers of the isothermal exponential amplification reaction. *Scientific Reports*. 6(37837): 1-10.
- Motohashi K. 2019. Development of highly sensitive and low-cost DNA agarose gel electrophoresis detection systems, and evaluation of non-mutagenic and loading dye-type DNA-staining reagents. *PLoS ONE*. 14(9): 1-13.
- Nugraha MA. 2019. Rekayasa Plasmid Rekombinan pNZ8148 dengan Gen Penyandi Interferon α -2b Pada *Lactococcus lactis* [skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Nurjayadi M, Efrianti UR, Azizah N, Julio E, Nastassya L, Saamia V. 2019. *Optimum temperature of the amplification of the fljB gene of Salmonella typhimurium*. Di dalam. Rahmawati Y, Taylor PC, Editor. *Empowering Science and Mathematics for Global Competitiveness*. London(UK): CRC Press.
- Nolan T, Huggett J, Sanchez E. 2013. *National Measurement System: Good Practice Guide for The Application of Quantitative PCR*. Teddington (UK): LGC.
- Novita L Haska N, Surahman M, Wahyu Y. 2014. Pendugaan parameter genetik karakter morfo-agronomi dan seleksi genotipe untuk perbaikan genetik jarak pagar. *Jurnal Agronomi Indonesia*. 42(3): 236-243.
- Nybo K. 2011. qPCR efficiency calculations. *Biotechniques*. 51: 401-402.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 29(9): 2001-2007.
- Plotka M, Wozniak M, Kaczorowski T. 2016. Quantification of plasmid copy number with single colour droplet digital PCR. *PLoS ONE*. 12(1): 1-17.
- Rahman MT, Uddin MS, Sultana R, Moue A, Setu M. 2013. Polymerase chain reaction (PCR): A short review. *Anwer Khan Modern Medical College Journal*. 4(1): 30-36.
- Rajaravindra KS, Mitra A, Sharma AK, Deb SM, Sharma A. 2006. Molecular characterization of the interferon-tau gene of the mithun (*Bos frontalis*). *Zoological Science*. 23: 607-611.
- Rocha AJ, Miranda RS, Sousa AJS, da Silva ALC. 2016. *Guidelines for Successful Quantitative Gene Expression in Real- Time qPCR Assays*. Di dalam. Samdikuchaksaraei A. Editor. *Polymerase Chain Reaction for Biomedical Applications*. London(UK): IntechOpen Ltd
- Rosano GL, Ceccarelli EA. 2014. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*. 5(172): 1-17.
- Roos EO, Scott LA, Ndou S, Olea-Popelka F Buss PE, de Klerk-Lorist L, Warren RM, van Helden PD, Sylvester TT, Miller MA, Parsons SDC. 2019. Cytokine gene expression assay as a diagnostic tool for detection of *Mycobacterium*

bovis infection in warthogs (*Phacochoerus africanus*). *Scientific Reports*. 9(16525): 1-17.

Singh J, Birbian N, Sinha S, Goswani A. 2014. A critical review on PCR, its types and applications. *International Journal of Advanced Research in Biological Science*. 1(7): 65-80.

Svec D, Tichopad A, Novosadova V, Pfaffl MW, Kubista H. 2015. How good is a PCR efficiency estimate: recommendation for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomolecular Detection and Quantification*. 3: 9-16.

Tal S, Paulsson J. 2012. Evaluating quantitative methods for measuring plasmid copy numbers in single cells. *Plasmid*. 67(2): 167-173

@Hak cipta milik IPB University

IPB University





RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di kota Jakarta pada 14 Maret 1996 sebagai anak ke 2 dari pasangan bapak Mochamad Sumartono Wen dan ibu Alief Laila. Pendidikan sekolah menengah atas (SMA) ditempuh di sekolah Madrasah Aliyah Nuurul Qur'an Cileungsi, dan lulus pada tahun 2014. Pada tahun 2015, penulis diterima sebagai mahasiswa program sarjana (S-1) di Departemen Biokimia di IPB

Selama mengikuti program S-1, penulis aktif menjadi anggota Ifast (*IPB farmers student*), menjadi staff dalam keanggotaan CREB'S (*Community of Research and Education of Biochemistry Student*), dan menjadi panitia dalam LKIP (Lomba Karya Tulis Ilmiah Populer). Penulis mengikuti kegiatan Praktik Lapangan (PL) di BB Biogen Bogor mengerjakan riset dengan judul makalah "Identifikasi Molekuler Gen Padi Galur Inpari 13-HDB".

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.