

ARTIKEL

by Evi Hanizar Fpmipa

Submission date: 30-Jul-2019 09:20PM (UTC-0500)

Submission ID: 1156375672

File name: 1Biodiv-Rev.pdf (64.83K)

Word count: 2092

Character count: 12030

Kloning dan Karakterisasi cDNA sY86 Pengendali Spermatogenesis pada Manusia

Evi Hanizar

Jurusan P. Biologi FP MIPA IKIP PGRI JEMBER

ABSTRACT

Sy 86 gene was one of the genes involved in spermatogenesis and often deleted in infertile men. The purpose of this study were to get cDNA sY86 from the blood of infertile man and its characterizations for the preparation of protein expression. The sample was blood from man with normal sperm category and mRNA extracted using a modified method of Single Step. cDNA of sY86 was obtained by RT-PCR using RT-PCR kit and DNA was subsequently ligated in pGEM-T easy vector. The ligation product was transformed to competent cells E.coli. The result of transformation was showed by a single colony on solid medium containing the antibiotic ampicillin. Plasmids then were isolated and the success of isolation showed by the result of cutting with EcoRI. After electrophoresis there were two band that determined sizes of vector and gene target. The DNA fragment was performed by PCR method using T7 and SP6 primers and the results were sequenced to determine whether the isolated DNA fragment has sequences that match with sequence sY86. The DNA fragment was analyzed to determine this orientation and prepared to protein expression in the next step.

Key words : cDNA, sY86, ligation, transformation, vector

PENGANTAR

Evaluasi genetik terhadap pria infertil hingga kini terus dilakukan, dan hasilnya masih menunjukkan variasi diantara peneliti. Meskipun demikian, ada satu persamaan tentang penyebab infertilitas pria tersebut yaitu rendahnya kuantitas spermatozoa yang meliputi oligozoospermia (jumlah spermatozoa < 20 juta /ml ejakulat) atau severe

oligozoospermia (spermatozoa 5-20 juta/ml ejakulat) hingga tidak adanya spermatozoa yang dihasilkan (azoospermia). Rendahnya kuantitas spermatozoa tersebut berhubungan dengan delesi gen AZF (*Azoospermic Factor*) yang terletak dalam lengan panjang kromosom Y (Yq). Gen ini tersebar dalam subregion AZFa, AZFb dan AZFc (Seifer *et al.*, 1999; CMGS ¹³ *et al.*, 2000;

McElreavey *et al.*, 2000; Friel *et al.*, 2001; Ferlin *et al.*, 2003).

Hasil penelitian Evi Hanizar (2003; 2004) menunjukkan bahwa delesi gen dalam region AZF tidak hanya terjadi pada pria infertile oligozoospermia atau *severe* oligozoospermia saja, tetapi juga pada pria oligoasthenoteratozoospermia (OAT) atau oligoateratozoospermia (OT). OAT adalah mereka yang mempunyai jumlah spermatozoa < 20 juta/ml, motilitas normal < 50 % dan morfologi normal < 30 %), sedangkan OT mempunyai spermatozoa < 20 juta/ml dan morfologi normal < 30 %). Hal ini berarti delesi gen AZF selain berhubungan dengan rendahnya kuantitas spermatozoa juga berhubungan dengan kualitas spermatozoa yang rendah.

Di Indonesia analisis genetik belum diterapkan sebagai prosedur yang baku untuk kasus infertilitas. Sebagian besar pria infertil yang sedang berusaha untuk mendapatkan keturunan belum diberlakukan analisis genetik untuk mendapatkan kepastian apakah infertilitas

mereka disebabkan adanya delesi dalam kromosom Y. Melihat status kesehatan para pria infertil tersebut, sebagian besar tidak menunjukkan faktor yang menjadi penyebab infertilitas baik secara fisik dan psikis. Hal ini berarti kemungkinan faktor yang menjadi penyebab infertilitas adalah faktor genetik, dan kondisi demikian dikatakan idiopatik sehingga analisis genetik perlu dilakukan pada pria infertil kelompok ini.

Analisis genetik yang telah dilakukan selama ini dengan mendeteksi adanya delesi DNA dari berbagai lokasi gen dalam masing-masing subregion AZF melalui metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Banyaknya lokasi gen yang akan dianalisis membawa konsekuensi pada banyaknya waktu dan biaya untuk mengetahui hasil analisis secara menyeluruh. Hal ini tentu saja akan menambah beban bagi mereka yang akan melakukan pemeriksaan. Untuk itu diperlukan analisis genetik alternatif yang relatif lebih hemat dari segi waktu dan

biaya, dan juga dapat dipakai untuk menentukan infertilitas pria.

Analisis genetik dengan menggunakan konsep pengenalan antigen antibodi dapat dilakukan untuk menganalisis delesi gen untuk beberapa lokasi dalam waktu bersamaan sehingga dapat mempercepat proses analisis. Oleh karena itu, peneliti menggunakan salah satu lokasi gen dari subregion AZF untuk dibuat antibodinya dan kemudian akan dikembangkan pada lokasi gen yang lain dalam subregion AZF. Penelitian ini menggunakan lokasi gen sY86, terdapat dalam subregion AZFa yang merupakan gen “*hot spot*” yaitu gen yang sering mengalami delesi pada pria infertil, dari hasil penelitian sebelumnya. Agar dapat diekspresikan menjadi protein, gen sY86 perlu dikloning dalam vektor tertentu yang sesuai.

BAHAN DAN CARA KERJA

Eksraksi mRNA

Sampel penelitian adalah darah pria dengan kategori spermatozoa normal, yaitu mempunyai jumlah spermatozoa > 20 juta/ml ejakulat, motilitas (gerakan) spermatozoa > 50 % bergerak lurus, dan morfologi (bentuk) spermatozoa > 30 % normal. RNA total diekstraksi melalui metode *single step* yang telah dimodifikasi, dengan menggunakan sampel sebanyak 5 gr ditambahkan *denaturing solution* sebanyak 15 ml. Setelah divortex ditambahkan β merkaptan 110 μ l, divortex dan ditambahkan 1,5 ml NaAcetat 3 M PH4, divortex, ditambahkan 12 ml Phenol saturation H₂O dan divortex. Kemudian ditambahkan 2,4 ml C;I (Cloroform : Isoamilalkohol dengan perbandingan 49:1), divortex , dibiarkan *on ice* selama 15 menit, disentrifuse 9000 rpm selama 10 menit pada suhu 4° C. Supernatant diambil dan ditambahkan C;I 10 ml, dan divortex. Campuran selanjutnya disentrifuse 9000 rpm selama 10 menit pada suhu 4° C, supernatant diambil dan ditambahkan isopropanol sesuai volume,

kemudian dipresipitasi pada suhu -20°C selama 1 jam, disentrifuse 9000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C . Pellet diambil dan divacum selama 15 menit, kemudian ditambahkan 9 atau 6 ml *denaturing solution* dan 10 μl β merkaptan, dan dipipetting. Selanjutnya ditambahkan isopropanol sebanyak 1x total volume, dipresipitasi pada suhu -20°C selama 1 jam, disentrifuse 12000 rpm, selama 10 menit pada suhu 4°C . Pellet diambil dan ditambahkan 5 ml etanol dingin 75 %, divortex, dan disentrifuse 12000 rpm, selama 10 menit pada suhu 4°C . Pellet diambil dan ditambahkan 5 ml etanol dingin 75 %, dipindahkan ke eppendorf dan disentrifuse 12000 rpm, selama 10 menit pada suhu 4°C , kemudian divacum hingga kering dan ditambahkan 25 μl TE dan disimpan pada suhu -70°C . Sebelum disimpan, RNA yang diperoleh dicek konsentrasi dan kemurniannya menggunakan spectrophotometer dan secara fisik keberadaan RNA dicek melalui elektroforesis.

Mendapatkan cDNA sY86

Untuk mendapatkan cDNA digunakan RNA sebagai *template* dan dilakukan RT-PCR menggunakan kit RT-PCR dengan komposisi Premix RT-PCR 8 μl , Primer (Forward dan Reverse) masing-masing 2 μl , RNA template 2 μl dan water 6 μl . RT-PCR dilakukan dalam thermocycler dengan kondisi Reverse transcription reaction 45°C , 30 menit; Denaturation of RNA (cDNA hybrid) 94°C , 5 menit; dengan siklus denaturation 94°C , 5 detik; Annealing 54°C , 30 detik; Extension 72°C , 1 menit sebanyak 30 siklus dan Final extension 72°C , 5 menit. Hasil RT-PCR selanjutnya dicek melalui elektroforesis. cDNA yang diperoleh kemudian dipurifikasi menggunakan kit purifikasi dan DNA hasil purifikasi selanjutnya disekuensing dan sebagian dipersiapkan untuk diligasikan dalam vektor pGEM-T Easy.

Membuat klon cDNA SY86

Sebelumnya harus disiapkan dahulu *competent cell*, menggunakan

starter *single strain Escherichia coli* DH5 α . Starter ditumbuhkan dalam 2 ml media LB non antibiotik, diinkubasikan dalam suhu 37°C *overnight*. Selanjutnya 1 ml biakan *E.coli* DH5 α ditumbuhkan dalam media cair 50 ml, digojok selama 2-3 jam pada suhu 37°C dengan OD 0,6. Kemudian disentrifuse 5000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Pellet diambil, ditambahkan 20 ml 0,1 M CaCl₂, dipipetting *on ice* selama 30 menit sampai tersuspensi. Selanjutnya disentrifuse 5000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C, pellet diambil dan ditambahkan 1 ml 0,1 M CaCl₂, dipipetting *on ice* selama 30 menit. Kemudian dipindahkan ke eppendorf steril, dapat langsung digunakan untuk transformasi atau disimpan dalam gliserol 10 %.

Sementara itu dilakukan ligasi fragment DNA sY86 pada vektor pGEM-T *Easy*. Hasil PCR DNA sY86 diligasikan pada vektor pGEM-T *Easy* dengan komposisi : 2 x Rapid ligation buffer, T4 DNA ligase 5 μ l, pGEM-T *Easy* vector 1

μ l, PCR product 1 μ l, T4 DNA ligase 2 μ l, water 2 μ l. Semua campuran dipipetting dan disimpan *overnight* pada suhu 4°C, selanjutnya dapat disimpan pada suhu - 20 °C.

Hasil ligasi DNA sY86 dengan vektor pGEM-T *Easy* ditransformasikan dalam *competen cell* dengan komposisi 1 μ l DNA dengan 200 μ l *competen cell*. Kemudian didiamkan dalam es selama 30 menit, dan dilakukan *heat shock* pada suhu 42°C selama 90 detik. Setelah didiamkan *on ice* selama 5 menit, ditambahkan 1 ml media LB cair dan diinkubasikan dengan cara digojok selama 2-3 jam pada suhu 37°C. Pellet disuspensikan dan ditanam pada media padat yang mengandung ampicillin menggunakan *glassroll*. Media padat sebelumnya diratakan dulu dengan IPTG dan x-gal menggunakan *glassroll*. Media kemudian diinkubasi pada suhu 37°C *overnight*.

Proses penyiapan *competent cell* dan transformasi dilakukan dalam laminar.

Isolasi Plasmid

Beberapa koloni tunggal hasil transformasi ditumbuhkan pada media LB cair 3 ml yang mengandung ampicillin 6 µl, selanjutnya digojok pada suhu 37 °C ⁶ *overnight*. Biakan kemudian dipindahkan ke tube 1,5 ml, ¹⁶ disentrifuse 12.000 rpm ³ selama 10 menit pada suhu 4°C. Pellet bakteri disuspensikan pada 100 µl larutan I (150 mM Glukosa; 25 mM Tris HCl pH 8,0; 10 mM EDTA pH 8,0), dilakukan *on ice* dan ditambahkan 200 µl larutan II (0,2 NaOH; 1 % SDS; H₂O). Campuran ini dibolak-balik dan diinkubasikan *on ice* hingga nampak transparan. Selanjutnya ditambahkan larutan III (60 ml 5M potasium asetat; ¹ 11,5 ml asam asetat glacial; 28,5 ml H₂O), dibolak-balik dan didiamkan *on ice* selama 10 menit. Larutan ³ disentrifuse 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatant ¹⁷ dipindahkan pada tube 1,5 ml dan ditambahkan PCI dengan volume yang sama, kemudian ³ disentrifuse 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatant dipindahkan

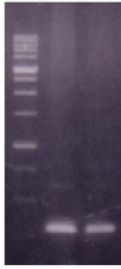
pada tube lain, ditambahkan 2,5 volume etanol p.a dan 0,1 volume sodium acetat. Campuran dipresipitasi pada suhu -20°C selama 1jam, kemudian disentrifuse ⁶ 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Pellet dicuci dengan 1 ml alkohol ⁷⁰ %, disentrifuse ¹ 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C dan *didry up* dalam eksikator hingga kering. Pellet dilarutkan dengan dengan buffer TE 20 µl dan disimpan pada suhu - 20° C untuk digunakan.

Untuk melihat keberhasilan isolasi plasmid dilakukan elektroforesis atau dilakukan pematangan dengan enzim EcoRI (Karcher, 1995), setelah hasil sekuensing gen sY86 dikonfirmasi titik potongnya dengan enzim EcoRI.

HASIL

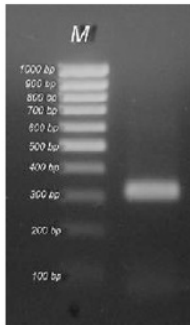
Hasil RT-PCR yang divisualisasi melalui elektroforesis menggunakan gel agarose, mendapatkan cDNA sY86 seperti yang nampak pada gambar 1.

M



Gambar 1. cDNA sY86 hasil RT-PCR

DNA yang diperoleh selanjutnya digandakan melalui metode PCR, menggunakan primer sY86, dan hasil elektrophoresis nampak pada gambar 2.



Gambar 2. Hasil PCR sY86

Setelah hasil ligasi DNA sY86 dengan vektor pGEM-T Easy ditransformasikan dalam *competen cell E.coli DH5α* menggunakan media LB padat yang mengandung ampisilin, hasilnya Nampak pada gambar 3.

326 bp

A.



B

Gambar 3. A. Media yang tidak ditumbuhi bakteri (kontrol).

B. Media yang ditumbuhi bakteri yang tertransformasi

PEMBAHASAN

RNA total yang diperoleh dari sampel darah pria normal setelah dilakukan spektrofotometer diperoleh konsentrasi 0,79 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ dan kemurnian 1,4.

RNA yang diperoleh cukup untuk dilakukan RT-PCR karena jumlah standard RNA yang diperlukan adalah 1 pg hingga 2 μg . RNA selanjutnya digunakan sebagai *template* untuk mendapatkan cDNA melalui proses RT-PCR dan terbukti hasil elektrophoresis mendapatkan DNA yang sesuai ukuran yaitu 326 bp. Kepastian fragmen cDNA yang diperoleh dibuktikan

melalui hasil PCR menggunakan primer (Forward dan Revers) sY86 dengan kondisi temperatur denaturasi, annealing, ekstensi dan elongasi yang sesuai. Hasil elektroforesis menghasilkan band DNA dengan ukuran 326 bp.

Hasil transformasi menunjukkan sel *E.coli* yang tertransformasi vektor pGEM-T Easy dan DNA sY86 dapat tumbuh. Hal ini diketahui dari adanya ¹ koloni tunggal *E.coli* pada media LB padat, sedangkan pada media kontrol tidak (Gambar 3). Media kontrol berisi *competen cell E.coli* DH5 α yang tidak ditransformasi ² dengan vektor pGEM-T Easy. Transforman (*E.coli* yang tertransformasi ² vektor pGEM-T Easy dan DNA sY86) dapat tumbuh karena vektor pGEM-T Easy membawa gen ketahanan pada ampisilin. Gen tersebut mengkode enzim yang mampu mendegradasi ampisilin.

Untuk mengetahui keberhasilan transformasi dilakukan isolasi plasmid dengan metode minipreparation, kemudian

dilanjutkan dengan elektroforesis. Hasil elektroforesis menunjukkan dari koloni yang diambil nampak adanya band semua. Agar dapat dipastikan bahwa fragment DNA yang tertransformasi adalah DNA sY86, dilakukan pemotongan plasmid dengan enzim EcoRI. Enzim ini digunakan karena setelah hasil sekuensing DNA sY86 dilakukan pengecekan titik potongnya, tidak terdapat titik potong untuk enzim EcoRI. Titik potong yang ada untuk enzim PstI dan NcoI. Hasil pemotongan plasmid dengan enzim EcoRI selanjutnya dielektroforesis dan akan menampilkan band yang mempunyai ukuran sesuai ² ukuran vektor pGEM-T easy (3015) dan band yang sesuai ukuran target ² gen yaitu sY86 (326 bp).

Untuk mengetahui apakah fragment DNA sY86 hasil pemotongan mengalami disorientasi atau tidak, setelah dipurifikasi selanjutnya dilakukan PCR dengan primer T7 dan SP6. Selanjutnya hasil PCR disekuensing, yang menunjukkan bahwa fragment DNA yang

diperoleh tidak mengalami disorientasi dan dapat dipersiapkan untuk ekspresi protein pada penelitian ¹⁴ selanjutnya. Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa cDNA sY86 yang diperoleh melalui RT-PCR dari sampel darah pria infertile dikloning menggunakan vektor pGEM-T *Easy* dan dapat dipersiapkan untuk ekspresi protein pada penelitian selanjutnya.

ARTIKEL

ORIGINALITY REPORT

15%

SIMILARITY INDEX

8%

INTERNET SOURCES

3%

PUBLICATIONS

14%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	Submitted to iGroup Student Paper	4%
2	Submitted to School of Business and Management ITB Student Paper	2%
3	media.neliti.com Internet Source	1%
4	"Antiviral Resistance in Plants", Springer Nature, 2012 Publication	1%
5	Submitted to Universitas Andalas Student Paper	1%
6	id.scribd.com Internet Source	1%
7	www.scribd.com Internet Source	1%
8	link.springer.com Internet Source	1%

9	Submitted to Universitas Muhammadiyah Surakarta Student Paper	1%
10	repository.up.ac.za Internet Source	1%
11	Submitted to Sophia University Student Paper	<1%
12	journal.bio.unsoed.ac.id Internet Source	<1%
13	Submitted to Bilkent University Student Paper	<1%
14	es.scribd.com Internet Source	<1%
15	docplayer.net Internet Source	<1%
16	Submitted to Universitas Indonesia Student Paper	<1%
17	Danar Wicaksono, Arif Wibowo, Ani Widiastuti. "METODE ISOLASI PYRICULARIA ORYZAE PENYEBAB PENYAKIT BLAS PADI", JURNAL HAMA DAN PENYAKIT TUMBUHAN TROPIKA, 2017 Publication	<1%
18	Submitted to Universitas Islam Indonesia Student Paper	<1%

Exclude quotes Off

Exclude matches Off

Exclude bibliography On

ARTIKEL

GRADEMARK REPORT

FINAL GRADE

/100

GENERAL COMMENTS

Instructor

PAGE 1

PAGE 2

PAGE 3

PAGE 4

PAGE 5

PAGE 6

PAGE 7

PAGE 8

PAGE 9
