

# ARTIKEL

*by* Evi Hanizar Fpmipa

---

**Submission date:** 30-Jul-2019 11:28PM (UTC-0500)

**Submission ID:** 1156416124

**File name:** prosiding\_the\_international\_conference\_on\_basic\_science\_2011.pdf (110.81K)

**Word count:** 1389

**Character count:** 7906

# 1 Preparation of constructs gene sY86 as the Basis of Antibody Formation for Determination Method of Male Infertility

Evi Hanizar<sup>1</sup>, Miswar<sup>2</sup>

1) Department of Biology Education, Faculty of Science Education, IKIP PGRI Jember, Indonesia

2) Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Jember University, Indonesia

## ABSTRACT

*sY86 gene is one of the genes contained in the AZF region in the long arm of the Y chromosome that control male spermatogenesis. Previous research proved that this gene frequent deleted in infertile men. Purpose of this study is to make a construct sY 86 gene, which will be used to make antibodies to detect infertility in men. The material used cDNA fragment sY86 with molecular weight 326 bp derived from the blood of man with normal sperm category. This fragment was ligated in PET TOPO vector, and the ligation product was transformed to E.col TOP 10. Selection of transformants using the ampicillin because PET TOPO vector containing a gene that resistant to ampicillin. Plasmids then were isolated and the success of isolation showed by the result of electrophoresis. To ensure the size of the plasmid, the DNA fragment was performed by PCR method and PCR results were then followed elektrophoresis. if it showed appropriate band size (326 bp), the DNA was sequenced and the result that accordance with sY 86 gene from NCBI can be used for expression in liquid LB medium with antibiotics.*

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

## 1. Introduction

Gen-gen yang mengendalikan proses spermatogenesis pada pria terdapat dalam region AZF (*Azoospermic Factor*) pada lengan panjang kromosom Y. Region AZF terdiri dari tiga subregion yaitu subregion AZFa, AZFb dan AZFc. Berbagai penelitian melaporkan adanya delesi gen dalam subregion ini pada pria infertil dengan gangguan spermatozoa kategori azoospermia, *severe* oligozoospermia dan oligozoospermia. Delesi yang terjadi dapat meliputi satu subregion hingga ketiga subregion disertai dengan kuantitas dan kualitas abnormalitas spermatozoa yang berbeda-beda pula. (1,2,3,4,5)

Analisis genetik yang dilakukan oleh peneliti pada pria infertile di salah satu klinik infertilitas di Indonesia menunjukkan rata-rata 90 % pria infertil mempunyai spermatozoa dengan kategori azoospermia, *severe* oligozoospermia dan oligozoospermia(6). Mereka sedang berusaha untuk mendapatkan keturunan, dan seharusnya mempunyai spermatozoa yang kuantitas dan kualitasnya normal. Untuk mengetahui kemungkinan mendapatkan spermatozoa yang normal diperlukan data tentang ada tidaknya gen yang mengendalikan proses spermatogenesis.. Analisis delesi gen AZF pada pria infertil yang dilakukan selama ini menggunakan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*), yang membutuhkan reagen, biaya serta waktu yang banyak. Konsekuensinya jika hal ini dilakukan pada pasien akan membebani pasien dalam hal pembiayaan dan membutuhkan waktu yang lama untuk mengetahui hasilnya. Dengan demikian diperlukan suatu metode analisis delesi lain yang cepat, mudah, tepat dan relative mengurangi pembiayaan.

Salah satu metode yang dapat dikembangkan adalah pembuatan antibodi yang dapat mengenal antigennya. Gen yang akan dibuat antibodinya adalah sY86 yang terdapat dalam subregion AZFa, dan sering mengalami delesi pada pria infertil yang diperoleh dari hasil penelitian sebelumnya (7). Fragment cDNA sY86 sudah berhasil dikloningkan pada vektor pGEM-T easy dan selanjutnya akan diekspresikan untuk mendapatkan protein rekombinan (7). Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan plasmid sY86 untuk diekspresikan dalam vektor ekspresi. Oleh karena masing-masing subregion AZF terdiri dari berbagai gen, maka hasil penelitian ini diharapkan dapat dilanjutkan dengan menggunakan gen lain. Kepastian adanya delesi pada pria infertil akan membantu pasien dan dokter untuk membuat keputusan yang tepat dan mencegah pewarisan delesi gen tersebut dari seorang ayah kepada anak lelakinya.

## 2. Experimental Details

### a. Penyiapan DNA Plasmid

cDNA sY 86 digandakan melalui metode PCR, hasil PCR dipurifikasi menggunakan kit purifikasi dan selanjutnya diligasikan ke vektor pGEM-T easy. Campuran diinkubasi pada suhu 4 °C overnight.

### b. Transformasi DNA Plasmid ke *E. Coli*

Satu vial *E.coli* TOP 10 dithawing on ice dan ditambahkan 3 µl DNA hasil ligasi. Campuran diinkubasi on ice selama 15 menit, heat shock selama 30 detik pada suhu 42 °C tanpa digojok dan dipindahkan segera ke es. Kemudian ditambahkan 250 µl medium S.O.C diinkubasi dengan digojok (200 rpm) pada suhu 37 °C selama 1 jam. Semua campuran reaksi ditransformasi medium LB padat yang mengandung ampicillin, dan di kultur overnight pada suhu 37 °C.

### c. Isolasi Plasmid

Single koloni dari masing-masing koloni yang transforman ditumbuhkan pada media LB cair 3 ml yang mengandung ampicillin 6 µl, selanjutnya digojok pada suhu 37 °C overnight. Biakan kemudian dipindahkan ke tube 1,5 ml, disentrifuse 12.000 rpm 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; H<sub>2</sub>O). Campuran ini dibolak-balik dan diinkubasikan on ice hingga nampak transparan. Selanjutnya ditambahkan larutan III (60 ml 5M potasium asetat; 11,5 ml asam asetat glacial; 28,5 ml H<sub>2</sub>O), dibolak-balik dan didiamkan on ice selama 10 menit. Larutan disentrifuse 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatant dipindahkan pada tube 1,5 ml dan ditambahkan PCI dengan volume yang sama, kemudian disentrifuse 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatant dipindahkan pada tube lain, ditambahkan 2,5 volume etanol dan 0,1 volume sodium asetat. Campuran dipresipitasi pada suhu -20°C selama 1jam, kemudian disentrifuse 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Pellet dicuci dengan 1 ml alkohol 70 %, disentrifuse 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. Jika nampak band dilakukan PCR dengan komposisi PCR master mix 12,5 µl, primer T7 (F), primer SP6 (R) masing-masing 2 µl, DNA plasmid 1 µl, water 1 µl 7,5 µl. Adapun kondisi PCR predenaturasi 95°C, 5 menit; dengan siklus denaturation 94°C, 50 detik; Annealing 50°C, 1 menit; Extension 72°C, 50 detik sebanyak 30 siklus dan Final extension 72°C, 7 menit. Hasil PCR selanjutnya dielektrophoresis dan jika nampak band yang sesuai ukuran dilakukan sekuensing. Untuk sekuensing dibuat hasil PCR 50 µl.

## 3. Result and Discussion

Plasmid sY86 yang dihasilkan dari penelitian sebelumnya diamplifikasi dengan PCR kemudian dipurifikasi dan plasmid diisolasi dari gel agarose hasil elektroforesis DNA.



Gambar 1. Hasil PCR gen sY86

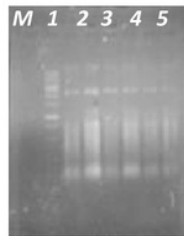
Gambar 1 menunjukkan hasil elektroforesis gen sY86 yang telah diamplifikasi dengan PCR dan di bawah UV illuminator nampak band sesuai dengan ukuran yaitu gen sY86 dengan berat molekul 326 bp.

Setelah ligasi dengan vektor pGEM-T easy dan ditransformasikan dalam *E.coli* Top 10 nampak koloni seperti gambar 2.



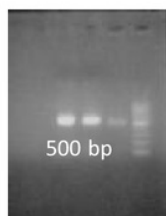
3  
 3  
 1  
 Gambar 2. Hasil Transformasi gen sY86 ke dalam sel *E.coli* (A) Kontrol (B) Koloni Transforman  
 Gambar 2.A menunjukkan media yang tidak ditumbuhi koloni yaitu *competen cell E.coli* TOP 10 tidak ditransformasi dengan vektor pGEM-T *Easy*. Hal ini karena media mengandung ampicillin dan *E.coli* tidak mampu mendegradasi ampisilin. Gambar B. berisi beberapa koloni transforman (*E.coli* yang tertransformasi vektor pGEM-T *Easy* dan DNA sY86) karena vektor pGEM-T *Easy* membawa gen ketahanan pada ampisilin. Gen tersebut mengkode enzim yang mampu mendegradasi ampisilin.

Hasil transformasi menghasilkan 6 koloni dan setelah diisolasi dan dielektrophoresis nampak band seperti Gambar 3.



Gambar 3. Elektrophoresis koloni hasil isolasi plasmid

Untuk membuktikan plasmid yang diisolasi mengandung DNA yang diligasikan dilakukan amplifikasi DNA dengan PCR menggunakan primer T7 dan SP6. Hasil PCR dari 6 koloni menunjukkan bahwa koloni nomor 5 nampak band seperti pada gambar 4, yaitu  $\pm 500$  bp karena gen sY 86 326 bp, masing-masing ujung plasmid mempunyai berat molekul untuk T7 52 bp dan SP6 141 bp.



Gambar 4. Hasil PCR untuk koloni nomor 5

Hasil PCR selanjutnya disekuensing untuk membuktikan apakah urutan DNA sesuai dengan urutan DNA target.

Produk PCR yang telah dipurifikasi, selanjutnya disekuensing untuk mengetahui urutan DNA yang diinginkan. Hasil sekuensing DNA adalah sebagai berikut:

1  
GTGACACACA GACTATGCTT CAGCAGGTCT GTCTGGGCC C AAGACACATT GTTTCATC  
AGCTCCCAGG GGATGTCAAG GCTGCAGATC CATGGATCTC ACTTGCAGG ACAGAGACTT  
GGTAATGGCT TCCCAGAGTT GTTACAAAGA AATCCCAAAG ACTGGGCC C TTAAACAACA  
ACCTTGATTC TCACAGTCCT TGAGGCTAGA AGTCTGAGAT CAAGCTATGG CCAGGGCTGG  
TTCCTCCTGA GGCCTCTCTC CTGGGTTGT AGATGCTGTC TTCTCCCTGT GTCCTCACAG  
GGTTGTCCT CTGTGTGT

Setelah diketahui kesesuaiannya dengan DNA target, maka DNA plasmid siap untuk diligasi pada vektor ekspresi dan dikultur untuk mendapatkan protein rekombinan.

#### 4. Conclusion

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa konstruk pET SY86 siap untuk diekspresikan pada vektor ekspresi.

#### 5. Acknowledgement

Penelitian ini dibiayai oleh proyek penelitian Hibah Bersaing DP2M –DIKTI tahun 2007, 2009 dan 2010

# ARTIKEL

## ORIGINALITY REPORT

29%

SIMILARITY INDEX

24%

INTERNET SOURCES

3%

PUBLICATIONS

8%

STUDENT PAPERS

## PRIMARY SOURCES

1

[www.slideshare.net](http://www.slideshare.net)

Internet Source

21%

2

[media.neliti.com](http://media.neliti.com)

Internet Source

2%

3

Submitted to iGroup

Student Paper

2%

4

[id.scribd.com](http://id.scribd.com)

Internet Source

1%

5

Submitted to Universitas Indonesia

Student Paper

1%

6

Methods in Molecular Biology, 2012.

Publication

1%

7

Submitted to School of Business and  
Management ITB

Student Paper

1%

8

Danar Wicaksono, Arif Wibowo, Ani Widiastuti.  
"METODE ISOLASI PYRICULARIA ORYZAE  
PENYEBAB PENYAKIT BLAS PADI", JURNAL  
HAMA DAN PENYAKIT TUMBUHAN TROPIKA,

<1%

# 2017

Publication

---

---

Exclude quotes      Off

Exclude matches      Off

Exclude bibliography      On