



PROSIDING **SEMINAR NASIONAL DAN KONGRES** **INDONESIAN PROTEIN SOCIETY (IPS)**

Jember, 6–7 Juli 2012

Tema:

**Eksplorasi dan Inovasi Sumber Protein
untuk Penguatan Sains dan Teknologi**

Editor:

Dr. Ir. Miswar, M.Si.

Netty Ermawaty, SP., M.Sc, Ph.D.

Tri Handoyo, SP., Ph.D

**PROSIDING
SEMINAR NASIONAL DAN KONGRES INDOONESIAN PROTEIN SOCIETY (IPS)**
Tema: Eksplorasi dan Inovasi Sumber Protein untuk Penguatan Sains dan Teknologi
Jember, 6-7 Juli 2012

Editor Dr. Ir. Miswar, M.Si.
Netty Ermawaty, SP, M.Sc., Ph.D.
Tri Handoyo, SP, Ph.D.

ISBN 978-979-803684-2

Penerbit  **Kartika Mulya** (Anggota IKAPI)
Jl. Potro Agung III No. 41C, Surabaya 60135
Tel. (031) 3715941, Fax. (031) 3770687
email: kartikamulya@gmail.com



UNIVERSITAS JEMBER



Indonesian Protein Society

Hak cipta dilindungi undang-undang.

Dilarang mengutip atau memperbanyak sebagian/seluruh isi buku ini
tanpa izin tertulis dari penerbit

Transformasi Gen sY86 dalam Vektor Ekspresi PET TOPO 200 untuk mendapatkan Protein Rekombinan sY86

Evi Hanizar

Jurusan P. Biologi FP MIPA IKIP PGRI JEMBER

ABSTRACT

Pembentukan antibodi sY86 untuk mengembangkan metode deteksi infertilitas pria membutuhkan protein rekombinan-sY86 . Tujuan penelitian ini mendapatkan transformant yang siap diekspresikan dalam bakteri E.coli . Sampel yang digunakan adalah hasil kloning gen sY86 dalam vektor pGEM-T easy yang diamplifikasikan dengan metode blunt-end PCR menggunakan primer sY86. Produk PCR yang sesuai ukuran dipurifikasi dan diligasikan kedalam vektor PET TOPO 200 untuk ditransformasikan ke dalam E.coli BL21 Star. Hasil transformasi berupa tumbuhnya koloni-koloni tunggal pada medium LB padat yang diberi antibiotik Kanamisin. Koloni selanjutnya diisolasi untuk mengetahui apakah transforman sesuai dengan yang diharapkan. Keberhasilan transformasi dapat dilihat dari hasil isolasi plasmid yang diamplifikasi dengan metode PCR menggunakan primer sY86 akan menunjukkan band dengan ukuran 326 bp dan hasil sekuensing menunjukkan urutan nukleotid yang cocok

Key words : *sY86, ligasi, transformasi, Plasmid, ekspresi*

PENDAHULUAN

Infertilitas pria, kondisi ketidakmampuan pria membuat pasangannya menghasilkan keturunan, disebabkan oleh rendahnya kuantitas dan kualitas spermatozoa yang dihasilkan. Proses pembentukan spermatozoa yang menghasilkan spermatozoa dengan kondisi tersebut dikendalikan oleh gen AZF (*Azoospermic Factor*) yang terdapat pada lengan panjang kromosom Y. Region AZF terdiri dari tiga subregion yaitu subregion

AZFa, AZFb dan AZFc. Hasil penelitian terhadap pria infertil dengan kuantitas dan kualitas spermatozoa yang rendah menunjukkan adanya delesi pada subregion AZF. (Seifer *et al.*, 1999; CMGS, 2000; Naysmith *et al.*, 2000; Friel *et al.*, 2001; Ferlin *et al.*, 2003; Hanizar, 2006).

Metode yang dilakukan untuk menganalisis adanya delesi pada pria infertil selama ini adalah metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*), yang

membutuhkan reagen yang banyak serta waktu pemeriksaan yang relatif panjang. Konsekuensinya jika hal ini dilakukan pada pasien akan membebani pasien dari segi biaya dan membutuhkan waktu yang lama untuk mengetahui hasil pemeriksaan. Penelitian Hanizar (2007) menunjukkan sebagian besar pria infertil yang mempunyai spermatozoa abnormal (azoospermia, *severe* oligozoospermia dan oligozoospermia) membutuhkan kepastian tentang status infertilitas mereka. Hal ini terkait dengan usaha mereka untuk mendapatkan keturunan. Oleh karena itu perlu adanya metode analisis delesi yang relatif tidak rumit dan tepat sehingga tidak membebani pasien dan dapat dijadikan prosedur standard untuk pemeriksaan delesi pada pria.

Salah satu metode yang dapat dikembangkan adalah pembuatan antibodi yang dapat mengenal antigennya. Tahapan awal yang diperlukan adalah mendapatkan klon gen yang akan dibuat antibodinya, dan memproduksi protein sesuai gen yang dimaksud. Gen yang akan diklon adalah sY86, salah satu gen yang terdapat dalam subregion AZFa. Gen ini merupakan gen yang sering mengalami delesi pada pria infertil dari hasil penelitian sebelumnya (Evi Hanizar, 2006). Fragment cDNA yang diperoleh dari penelitian berikutnya (Evi Hanizar, 2009) akan disubkloningkan

pada vektor kloning dan diekspresikan dalam vektor ekspresi untuk mendapatkan protein rekombinan.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan transforman untuk diekspresikan sehingga mendapatkan protein rekombinan. Keberhasilan penelitian ini akan dijadikan dasar untuk pembuatan antibodi gen lain pada subregion AZF. Hal ini karena masing-masing subregion AZF terdiri dari berbagai gen dan diharapkan menjadi dasar untuk membuat prosedur analisis delesi gen AZF pada pria infertil.

BAHAN DAN CARA

A. Membuat produk PCR Blunt-end

Hasil kloning gen sY86 dalam vektor pGEM-T easy digandakan melalui metode PCR dengan menggunakan primer sY86 dengan sekuens CACC pada ujung 5' forwardnya. Adapun komposisi PCR adalah 10xPfx 50 PCR Buffer 5 µl, 10 µM dNTP Mix 1,5 µl, Primer F dan R masing-masing 1,5 µl, DNA 2 µl, Pfx DNA polymerase 1 µl dan *deionized* H₂O 37,5 µl. Adapun kondisi PCR Predenaturation 94°C, 2 menit; dengan siklus denaturation 94°C, 15 detik; Annealing 60 °C, 20 detik; Extension 68 °C, 30 detik sebanyak 30 siklus dan Final extension 68 °C, 5 menit. Hasil PCR selanjutnya dicek melalui elektroforesis dengan adanya band dengan berat molekul 326 bp. Hasil

PCR kemudian dipurifikasi dengan menggunakan kit untuk purifikasi dan disiapkan untuk ligasi dalam vektor ekspresi atau dapat disimpan dalam suhu - 20 °C.

B. Ligasi Hasil PCR dalam Vektor Ekspresi

Hasil PCR blunt-end diligasikan dalam vektor pET TOPO 200 dengan komposisi produk PCR 2 µl, *salt solution* 1µl, vektor pET TOPO 1 µl, dan *steril water* 2 µl. Campuran diinkubasi pada temperatur kamar selama 5 menit untuk selanjutnya langsung ditransformasikan ke dalam *E.coli* BL21 Star atau disimpan pada suhu - 20 °C *overnight*.

C. Transformasi Hasil Ligasi ke *E.coli* BL21 STAR

Untuk transformasi disiapkan 1 vial *E.coli* BL21 Star melalui *thawing on ice*, kemudian ditambahkan dengan 3 µl hasil ligasi. Reaksi diinkubasi *on ice*

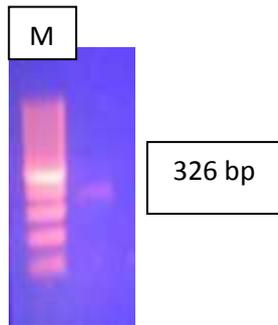
selama kira-kira 20 menit, *heat shock* pada suhu 42 °C selama 30 detik dan segera ditempatkan lagi *on ice*. Selanjutnya ditambahkan 250 µl medium S.O.C, dan digojok pada suhu 37 °C selama 1 jam. Transforman sebanyak 100-200 µl kemudian ditanam (*spread*) pada medium LB padat selektif dengan antibiotik kanamisin, dan diinkubasi pada suhu 37 °C *overnight*.

D. Isolasi Plasmid

Beberapa koloni tunggal hasil transformasi ditumbuhkan pada media LB cair 2 ml yang mengandung kanamisin 100 ppm, selanjutnya digojok pada suhu 37 °C *overnight*. Hasil kultur diisolasi dengan menggunakan metode isolasi plasmid (Li *et al*, 2010) . Untuk melihat keberhasilan isolasi plasmid dapat dilakukan : PCR dengan menggunakan primer sY 86 tanpa sekuens CACC, sequencing atau dilakukan pemotongan dengan enzim restriksi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil blunt-end PCR untuk gen sY86 nampak sebagai berikut :



Gambar 1. Hasil Elektroforesis Produk Blunt-end PCR

Gambar di atas menunjukkan bahwa produk blunt-end PCR mempunyai band dengan ukuran yang sesuai target sehingga dapat diligasikan dengan vektor kloning pET TOPO 200. Hasil transformasi sY86- pET-TOPO ke dalam *E.coli* BL 21 Star yang ditumbuhkan pada media LB padat yang mengandung antibiotik penyeleksi kanamycin dan menghasilkan koloni seperti dalam gambar 2.



Gambar 2. Hasil Transformasi klon gen sY86 dalam *E.coli* BL 21 Star pada Medium LB

Koloni *E.coli* BL 21 Star dapat tumbuh pada media dengan antibiotik kanamisin karena *E.coli* tertransformasi oleh sY86-pET-TOPO, dimana vektor pET-TOPO mengandung gen yang tahan terhadap antibiotik kanamisin. Hasil isolasi plasmid selanjutnya dilakukan PCR dengan primer sY86 tanpa sekuens CACC. Untuk memastikan apakah hasil PCR mempunyai sekuens yang sesuai dengan sekuens gen sY86, dilakukan disekuensing. Homologi hasil sekuensing dengan sekuens sY86 nampak pada gambar 3.

DAFTAR PUSTAKA

- CMGS. 2000. *Y Chromosome Deletion and male Infertility*. <http://www.ich.ucl.ac.uk/cmgs/ydeletions99.htm>
- Ferlin, A. E.Moro, A. Rossi, B.Dallapiccola, C.Foresta. 2003. *The Human Y Chromosome's Azoospermia Factor b (AZFb) Region: Sequence, Structure and Deletion Analysis in Infertile Men*. *Journal of Medical Genetics*. 40. 18-24.
- Friel, A. J.A. Houghton, M. Mahrer. T. Smith. S. Noel. A. Nolan. D. Egan & M. Glennon. 2001. *Molecular Deletion of Y Chromosome Microdeletions : An Irish Study*. *International Journal of Andrology*. 24 (1), 31-36.
- Hanizar, Evi, Aucky Hinting. 2009. *Analysis of AZF gene deletion on infertile men with azoospermia – Oligoasthenoteratozoospermia (OAT)*. *Berkala Penelitian Hayati Edisi Khusus No 3 D*
- Naysmith, T, Wendy S, Cynthia van Ee, Guy G.2000. *Identification of Y-Chromosome Deletion in Men with Subfertility*. Departemen of Obsetrics and Gynaecology. Auckland University.
- Seifer, I. Amat, S. Delgado-Viscogliosi, P. Boucher, D. Bignon, Y.J. 1999. *Screening for Microdeletions on The Long Arm of Chromosome Y in 53 Infertile Men*. *International Journal of Andrology*.22 (3), 148-154.

