

### **BAB III**

#### **METODE PENELITIAN**

##### **A. Jenis Penelitian**

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah dasar. Metode penelitian yang digunakan adalah deskriptif.

##### **B. Populasi dan Sampel**

Populasi dalam penelitian ini adalah seluruh serum penderita HBV yang berasal dari Rumah Sakit Hasan Sadikin (RSHS) Bandung. Sedangkan sampelnya adalah sebanyak 5 serum penderita HBV RSHS, dengan kandungan HBsAg positif dan HBeAg positif, yang digunakan dalam pembuatan konstruk plasmid pGHB (pGEM®-T Easy-HBsAg). Salah satu konstruk plasmid pGHB digunakan dalam pembuatan konstruk plasmid pGHBS (pGEM®-T Easy-HBsAg-VSP $\alpha$ S).

##### **C. Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilakukan pada bulan April 2007 sampai Februari 2008. Penelitian ini dilakukan di dua tempat. Tahap isolasi DNA HBV dilakukan di Laboratorium Patologi Klinik Rumah Sakit Umum Pusat Dr. Hasan Sadikin Bandung. Sedangkan selebihnya dilakukan di Laboratorium Genetika Molekuler, Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung.

Sikluensing plasmid pGHB (pGEM®-T Easy-HBsAg) dan pGHBS dilakukan oleh Badan Pengembangan dan Pengkajian Teknologi (BPPT), Indonesia.

#### D. Alat dan Bahan

##### 1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini terdapat dalam Tabel 3.1.

**Tabel 3.1** Alat yang digunakan dalam penelitian

No	Alat	Fungsi
1.	Alat elektroforesis	Memisahkan DNA berdasarkan berat molekulnya
2.	Alat PCR	Mengamplifikasi DNA
3.	Aluminium foil	Menimbang bahan
4.	Autoclave	Mensterilkan alat dan bahan
5.	Botol duran	Menyimpan larutan
6.	Ice maker	Membuat es serut
7.	Inkubator	Menginkubasi bakteri atau enzim
8.	Laminar air flow	Untuk pekerjaan yang membutuhkan teknik aseptis
9.	Freezer -80 °C	Menyimpan kultur gliserol dan sel kompeten
10.	Microsentrifuge	Memisahkan larutan berdasarkan berat jenisnya
11.	Microwave	Membuat gel Agarosa
12.	Mikropipet dan tips 1000 µL, 100 µL dan 10 µL	Mengambil dan memindahkan larutan
13.	Photo capture analysis DNA	Dokumentasi hasil elektroforesis
14.	pH meter	Mengukur pH larutan
15.	Shaker Incubator	Inkubasi bakteri
16.	Spektrofotometer	Menghitung konsentrasi dan rasio kemurnian DNA
17.	Tabung falcon 15 mL	Tempat perbanyak bakteri
18.	Tabung microsentrifuge 1,5 mL dan 200 µL	Tempat menyampurkan larutan
19.	Timbangan	Untuk menimbang bahan
20.	UV Hibridasi	Untuk memendarkan DNA
21.	Vorteks	Menghomogenkan larutan
22.	Waterbath	Untuk inkubasi larutan dan bakteri

## 2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdapat dalam Tabel 3.2.

**Tabel 3.2** Bahan yang digunakan dalam penelitian

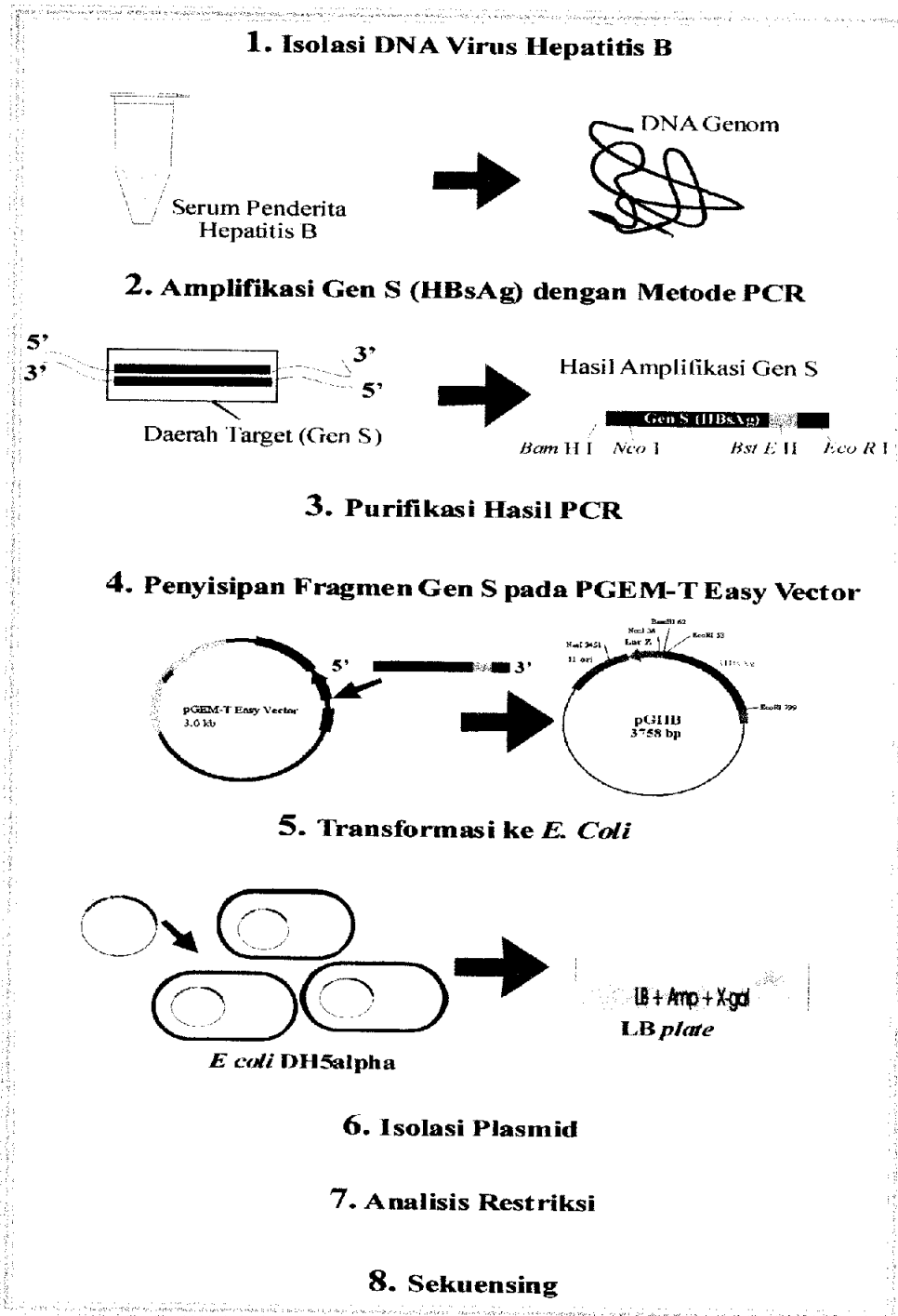
No	Bahan	Fungsi	Keterangan
1.	<i>Binding Buffer</i>	Mengikat asam nukleat pada kolom membran	<i>High Pure Viral Nucleic Acid Kit</i> untuk isolasi DNA HBV
2.	<i>Elution Buffer</i>	Mengelusi DNA pada kolom membran	
3.	<i>Inhibitor Removal Buffer</i>	Menghilangkan komponen seluler yang mengganggu proses selanjutnya	
4.	<i>Poly A</i>	Membantu tugas <i>Binding Buffer</i>	
5.	<i>Proteinase K</i>	Menghancurkan protein pada membran sel	
6.	<i>Wash Buffer</i>	Menghilangkan zat pengotor	
7.	<i>Buffer MgCl<sub>2</sub> Free</i>	Membuat primer bekerja pada kondisi optimum	PCR
8.	dNTPmix	Bahan untuk polimerisasi rantai DNA	
9.	MgCl <sub>2</sub>	Kofaktor enzim polymerase	
10.	<i>Taq DNA polymerase</i>	Mengkatalisis reaksi sintesis rantai DNA	
11.	Primer <i>forward</i> HBsF	Mengawali sintesis rantai DNA	
12.	Primer <i>reverse</i> HBsR	Mengawali sintesis rantai DNA	
13.	Primer <i>forward</i> VspA+HB-F	Mengawali sintesis rantai DNA	
14.	Primer <i>reverse</i> HB-R	Mengawali sintesis rantai DNA	
15.	Air deion steril	Pelarut	
16.	<i>DF buffer</i>	Melarutkan gel	
17.	<i>Elution Buffer</i>	Mengelusi DNA	
18.	<i>Wash Buffer</i>	Mencuci sisa-sisa gel	
19.	<i>Ligation Buffer</i>	Mempertahankan kestabilan enzim T4 DNA-ligase	Ligasi
20.	pGemT-Easy <i>vectors</i>	Kendaraan pembawa DNA sisipan	
21.	T4 DNA-ligase	Peligasi plasmid dengan DNA sisipan	
22.	Air deion steril	Pelarut	Transformasi
23.	Ampisilin 100 mg/mL	Zat penyeleksi bakteri	
24.	IPTG 20%	Analog dengan laktosa	
25.	Luria Bertani padat (Tryptone; Yeast Extract; NaCl; agar)		
26.	SOC	Medium pertumbuhan awal <i>E. coli</i>	
27.	X-gal 5%	Mendeteksi aktivitas β-galaktosidase	

Lanjutan Tabel 3.2

No	Bahan	Fungsi	Keterangan
28.	Larutan I GTE (50 mM Glukosa; 25 mM Tris-HCl pH 8.0; 10 mM EDTA pH 8.0)	Merusak dinding sel bakteri dan menghambat aktivitas enzim nuklease	Isolasi Plasmid
29.	Larutan II <i>Buffer</i> Lisis (0,2 N NaOH; 1% (w/v) SDS)	Membantu proses lisis dengan cara menghilangkan molekul lipid sehingga menyebabkan kerusakan membran sel bakteri.	
30.	Larutan III (5 M Potassium Asetat; Asam Asetat Glasial)	Memisahkan DNA plasmid dengan DNA kromosom	
31.	Luria Bertani cair (Tryptone; Yeast Extract; NaCl)	Medium pertumbuhan bakteri <i>E coli</i> .	
32.	RNase 1 µg/µL	Menghambat aktivitas RNA	Enzim-enzim endonuklease untuk analisis restriksi
33.	TE (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA)	Melarutkan plasmid	
34.	<i>BstE</i> II	Merestriksi plasmid	
35.	<i>Buffer EcoR</i> I	Mempertahankan kestabilan enzim	
36.	<i>Buffer O</i>	Mempertahankan kestabilan enzim	
37.	<i>Buffer Tango</i>	Mempertahankan kestabilan enzim	
38.	<i>EcoR</i> I	Merestriksi plasmid	
39.	<i>Nco</i> I	Merestriksi plasmid	

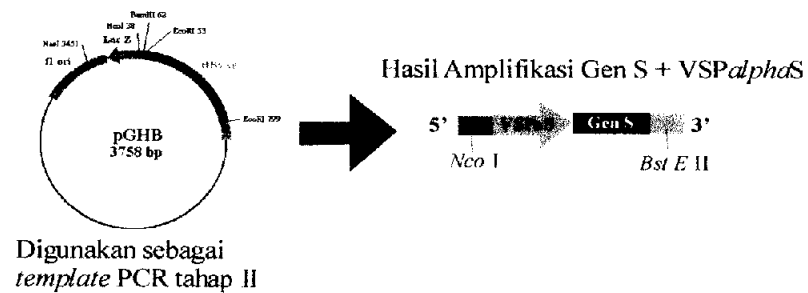
## E. Metode Kerja

Secara garis besar, alur penelitian ini diterangkan dalam gambar di bawah ini.



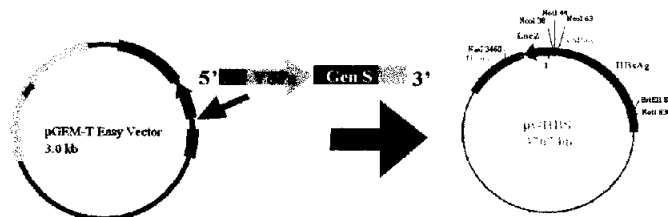
Gambar 3.1 Alur penelitian tahap I (pembuatan konstruk pGHB)

### 9. Amplifikasi Gen + VSP $\alpha$ dengan Metode PCR

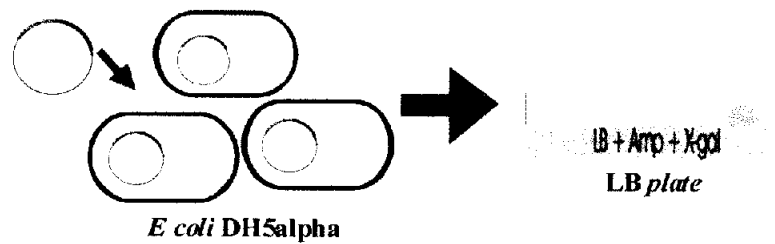


### 10. Purifikasi Hasil PCR

### 11. Penyisipan Fragmen Gen S + VSP $\alpha$ pada PGEM-T Easy



### 12. Transformasi ke *E. Coli*



### 13. Isolasi Plasmid

### 14. Analisis Restriksi

### 15. Sekuensing

Gambar 3.2 Alur penelitian tahap II (pembuatan konstruk pGHBS)

## 1. Pembuatan Konstruksi pGHB (pGEM®-T Easy vector-HBsAg)

### a. Isolasi DNA HBV

Isolasi genom HBV dari serum penderita Hepatitis B dilakukan dengan menggunakan *High Pure Viral Nucleic Acid Kit* dari ROCHE™. Ke dalam tabung *Microcentrifuge* 1,5 mL steril dimasukkan 200 µL serum penderita hepatitis B. Kemudian ditambahkan dengan 200 µL campuran *fresh Poly A* (50 µL) dan *Binding Buffer* (2,5 mL). *Binding Buffer* berfungsi untuk mengikat asam nukleat pada kolom membran sedangkan *Poly A* membantu *Binding Buffer* dalam pengikatan asam nukleat.

Selanjutnya, sebanyak 50 µL *Proteinase K* ditambahkan lalu dihomogenkan sesegera mungkin. Penambahan *Proteinase K* bertujuan untuk menghancurkan protein yang terdapat dalam membran sel. Campuran serum, *Poly A*, *Binding Buffer* dan *Proteinase K* tersebut kemudian diinkubasikan selama 10 menit pada suhu 72°C. Setelah diinkubasi, ditambahkan lagi dengan 100 µL *Binding Buffer*. Campuran larutan tersebut dipipet dan dipindahkan ke dalam tabung *High Pure Filter* yang sebelumnya telah digabungkan dengan tabung penampung lalu disentrifuga 8000 x g selama 1 menit.

*High Pure Viral Nucleic Acid Kit* dari ROCHE™ menggunakan dua jenis tabung yaitu *collection tube* atau tabung penampung dan *High Pure Filter* atau tabung filter. *Collection tube* adalah tabung yang berfungsi untuk menampung larutan sisa ekstraksi. Sedangkan *High Pure Filter* adalah tabung yang berfungsi untuk mengikat DNA dari serum.

Tabung penampung dan filtrat dibuang dan diganti yang baru. Ke atas kolom membran yang berada di dalam tabung filter ditambahkan 500  $\mu\text{L}$  *Inhibitor Removal Buffer* lalu disentrifuga 8000 x g selama 1 menit. *Inhibitor Removal Buffer* berfungsi untuk menghilangkan komponen seluler lainnya yang dapat menghalangi proses selanjutnya. Setelah itu, tabung penampung beserta filtrat dibuang dan diganti yang baru.

Kemudian ditambahkan 450  $\mu\text{L}$  *Wash Buffer* dan disentrifuga 8000 x g selama 1 menit. Langkah ini dilakukan sebanyak dua kali. Penambahan *Wash Buffer* bertujuan untuk menghilangkan zat kotor yang bukan merupakan asam nukleat. Selanjutnya, tabung penampung dan filtrat dibuang dan diganti dengan tabung penampung yang baru lalu disentrifuga 13000 x g selama 1 menit untuk mengeringkan kolom membran dari ethanol yang dapat menghambat proses PCR.

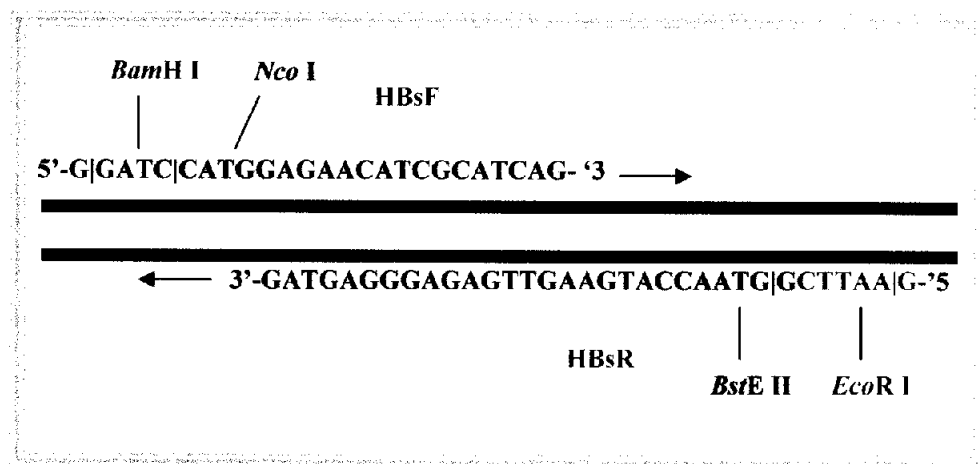
Selanjutnya, tabung penampung diganti dengan tabung *Microcentrifuge* 1,5 mL baru dan steril. Tepat ditengah-tengah kolom membran ditambahkan *Elution Buffer* sebanyak 50  $\mu\text{L}$  yang bertujuan untuk mengelusi DNA yang terikat pada kolom membran. Lalu didiamkan selama dua menit hingga larutan terserap dengan baik. Tahap terakhir, tabung disentrifuga 8000 x g selama 1 menit. Hasil elusi berupa genom HBV murni ditampung di dalam tabung *Microcentrifuge* tersebut.

#### **b. Amplifikasi Gen S (HBsAg)**

Sepasang primer yang terdiri dari primer *forward* dan primer *reverse* telah dirancang untuk komplemen dengan molekul DNA target (Gambar



3.3). *Template* atau cetakan DNA yang digunakan dalam tahap amplifikasi HBsAg adalah genom HBV hasil isolasi pada tahap sebelumnya. Sepasang primer spesifik yang digunakan pada amplifikasi gen HBsAg dirancang dari hasil sikuensing genom hepatitis B oleh Effendi (2004) pada penelitian sebelumnya. Sepasang primer tersebut terdiri dari primer *forward* (HBsF) dan primer *reverse* (HBsR) (Gambar 3.3).



**Gambar 3.3** Primer forward (HBsF) dan primer reverse (HBsR) yang digunakan dalam amplifikasi Gen S

Pada primer HBsF terdapat urutan sisi pemotongan enzim *BamH I* dan *Nco I* sedangkan pada primer HBsR terdapat urutan sisi pemotongan enzim *EcoR I* dan *BstE II* (Gambar 3.3). PCR dilakukan dalam volume total 50  $\mu$ L. Komposisi reaksi PCR disajikan dalam Tabel 3.4. Komponen reaksi PCR meliputi *template* yang mengandung urutan yang akan diperbanyak, primer yang mengawali sintesis rantai DNA yang diinginkan, Buffer  $MgCl_2$  *Free* yang membuat primer bekerja pada kondisi optimum, dNTPmix yang merupakan bahan untuk polimerisasi rantai DNA, *Taq* polymerase yang mengkatalisis reaksi sintesis rantai DNA serta Magnesium Klorida ( $MgCl_2$ )

yang merupakan kofaktor enzim *Taq* polymerase. Semua komponen reaksi PCR tersebut dicampur di dalam tabung *microcentrifuge* 200  $\mu$ L steril, kemudian dimasukkan ke dalam *thermocycler* atau mesin PCR. Profil PCR mengacu pada Effendi (2004) disajikan dalam Tabel 3.3.

**Tabel 3.3** Profil PCR

Proses	Suhu (°C)	Waktu (menit)	Siklus
<i>Initial Denaturation</i>	94°C	2.00	1
<i>Denaturation</i>	94°C	0.30	25
<i>Annealing</i>	50°C	0.45	
<i>Extention</i>	72°C	1.00	
<i>Final Extention</i>	72°C	7.00	1

Selanjutnya, analisis hasil PCR dilakukan dengan menggunakan metoda elektroforesis. Konsentrasi gel agarosa yang digunakan sebesar 1 % (w/v). Elektroforesis dijalankan selama  $\pm$  1 jam dengan menggunakan *buffer* TAE 1x (0,04 M Tris-asetat; 0,001 M EDTA pH 8). DNA hasil elektroforesis kemudian diwarnai dengan Etidium Bromida (EtBr) melalui proses perendaman selama  $\pm$  15 menit, kemudian fragmen DNA yang telah diwarnai dapat terlihat di bawah sinar *Ultra Violet* (UV).

**Tabel 3.4** Komposisi Reaksi PCR gen HBsAg

Reaksi	Konsentrasi akhir	Volume reaksi
10X <i>buffer</i> MgCl <sub>2</sub> Free	1X	5 $\mu$ L
25 mM magnesium klorida (MgCl <sub>2</sub> )	2 mM	4 $\mu$ L
10 mM dNTPmix	0,2 mM	1 $\mu$ L
Primer <i>forward</i> HBsF (25,96 p mol/ $\mu$ L)	0,5 p mol/ $\mu$ L	1 $\mu$ L
Primer <i>reverse</i> HBsR (28,88 p mol/ $\mu$ L)	0,5 p mol/ $\mu$ L	1 $\mu$ L
<i>Template</i> genom DNA HBV		10 $\mu$ L
<i>Taq</i> polymerase (1 U/ $\mu$ L)	1 U/ $\mu$ L	1 $\mu$ L
Deion <i>water</i>	-	27 $\mu$ L
<b>Volume Total</b>		<b>50<math>\mu</math>L</b>

### c. Pemurnian Gen HBsAg Hasil PCR

Purifikasi DNA hasil PCR dari gel agarosa 1% dilakukan dengan menggunakan *Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit* dari Geneaid™. Tahap ini bertujuan untuk membersihkan sisa-sisa reagen PCR agar tidak mengganggu tahap selanjutnya. Gel yang mengandung fragmen DNA hasil PCR dipotong dan dimasukkan ke dalam tabung *Microcentrifuge* steril 1,5 mL yang sebelumnya telah dihitung berat kosongnya. Berat gel yang dipotong maksimal 300 mg.

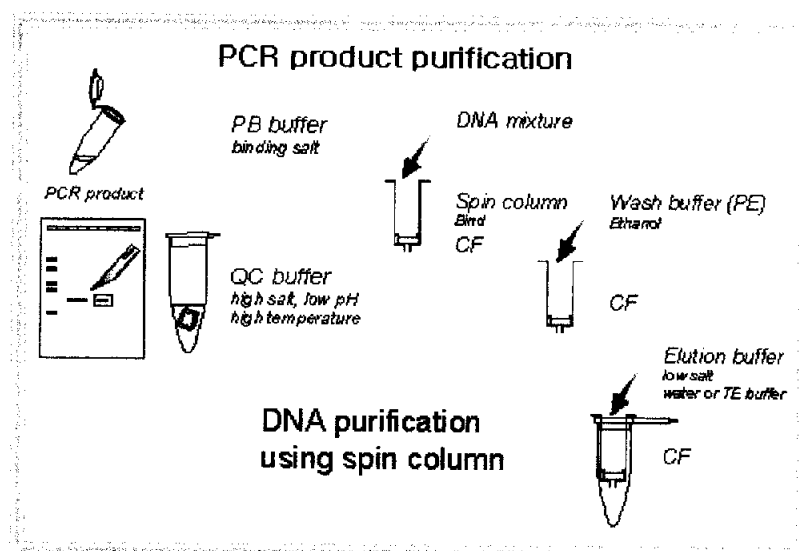
Kemudian potongan gel ditambahkan DF *buffer* sebanyak 500  $\mu$ L lalu divorteks agar tercampur dengan baik. DF *buffer* bertugas melarutkan gel. Selanjutnya gel yang telah ditambahkan DF *buffer* diinkubasi pada 55-60°C selama 10-15 menit hingga potongan gel benar-benar larut. Selama inkubasi, tabung dibolak-balik setiap 2-3 menit sekali. Setelah gel larut, sampel (gel+DF *buffer*) didinginkan pada suhu ruangan.

*Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit* dari Geneaid™ menggunakan dua jenis tabung yaitu DF *column* dan *collection tube*. DF *column* adalah tabung yang berfungsi untuk menjebak DNA yang dimurnikan dari gel sedangkan *collection tube* adalah tabung yang berfungsi untuk menampung larutan sisa ekstraksi gel. Kedua jenis tabung ini disertakan dalam *Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit* dari Geneaid™. DF *column* ditempatkan pada *collection tube*. Sebanyak 700  $\mu$ L sampel dimasukkan ke dalam DF *column* lalu disentrifuga 13000 rpm selama 30 detik. Cairan yang

terkumpul pada *collection tube* dibuang dan *DF column* kembali diletakkan ke atas *collection tube*.

Sebanyak 600  $\mu\text{L}$  *Wash Buffer* ditambahkan ke dalam *DF column* lalu disentrifuga 13000 rpm selama 30 detik. *Wash Buffer* berfungsi untuk mencuci sisa-sisa gel. Cairan yang terkumpul pada *collection tube* dibuang dan *DF column* kembali diletakkan ke atas *collection tube*. Selanjutnya tabung kembali disentrifuga 13000 rpm selama 3 menit untuk mengeringkan *DF column*.

Langkah berikutnya adalah penempatan *DF column* pada tabung *Microcentrifuge* 1,5 mL baru dan steril untuk menampung hasil elusi DNA. Pada *DF column* ditambahkan sebanyak 20  $\mu\text{L}$  *Elution Buffer* atau deion tepat ke tengah-tengah kolomnya, didiamkan selama dua menit hingga larutan terserap dengan baik lalu disentrifuga 13000 rpm selama 1 menit untuk mendapatkan DNA murni hasil elusi yang terlarut dalam 20  $\mu\text{L}$  *Elution Buffer*.



**Gambar 3.4** Purifikasi produk PCR

(sumber: Kwak, 2006)

#### d. Ligasi Fragmen HBsAg ke dalam Vektor pGEM®-T Easy

Fragmen HBsAg hasil purifikasi diligasikan ke dalam vektor pGEM®-T Easy (Gambar 3.5) untuk diklon atau diperbanyak dalam sel *E. coli* strain DH5α. Sebelum melakukan ligasi, ditentukan terlebih dahulu rasio molar vektor terhadap fragmen DNA (DNA sisipan). Menurut Promega™, rasio molar vektor : fragmen DNA = 3 : 1. Kemudian banyaknya DNA sisipan yang direaksikan dalam reaksi ligasi ditentukan berdasarkan rumus:

$$\frac{\text{Vektor (ng)} \times \text{fragmen DNA (bp)}}{\text{Vektor (bp)}} \times \text{fragmen DNA} : \text{rasio molar vektor}$$

Berdasarkan rumus diatas, rasio molar vektor terhadap fragmen Gen S (HBsAg) adalah sebagai berikut:

$$\frac{50 \text{ ng vektor} \times 743 \text{ bp sisipan} \times 3}{3015 \text{ bp vektor}} = 37 \text{ ng sisipan}$$

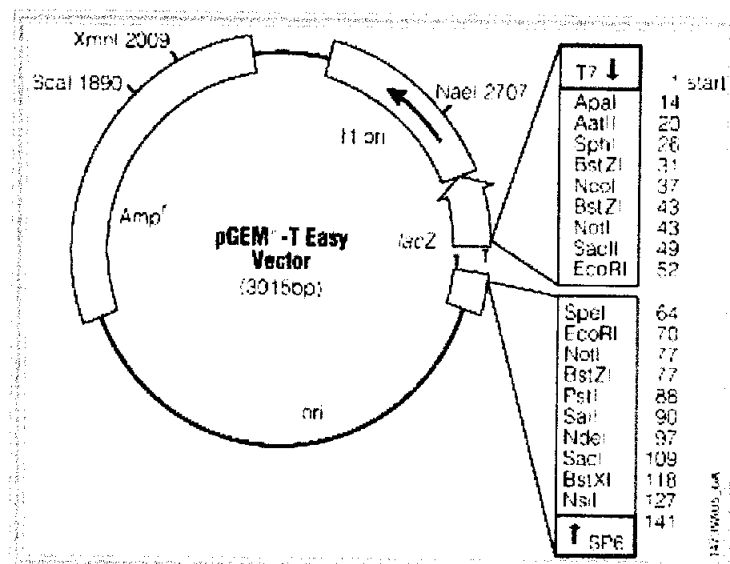
Komponen yang dibutuhkan dalam reaksi ligasi (Tabel 3.5) meliputi vektor pGEM®-T Easy yang bertugas sebagai kendaraan yang membawa DNA sisipan, T4 DNA-ligase yang merupakan enzim peligasi plasmid dengan DNA sisipan, *buffer* ligasi yang mempertahankan kestabilan enzim T4 DNA-ligase serta air deion sebagai pelarut.

Reaksi ligasi dilakukan selama semalam pada suhu 4°C untuk mendapatkan hasil ligasi yang optimal. Inkubasi enzim T4 DNA *ligation* dimaksudkan untuk menempelkan ujung fragmen lancip sisipan ke ujung

lancip yang komplementer pada plasmid pGEM®-T Easy. Semakin rendah temperatur, semakin lama masa inkubasi yang diperlukan. Hasil ligasi kemudian ditransformasikan ke dalam sel kompeten *E. coli* strain DH5 $\alpha$ . Sebanyak 3  $\mu$ L dari 10  $\mu$ L total reaksi ligasi digunakan untuk transformasi.

**Tabel 3.5** Komposisi reaksi ligasi hasil PCR HBsAg dengan pGEM®-T Easy

Pereaksi	Konsentrasi akhir	Volume pereaksi
2X Rapid Ligation Buffer	1X	5 $\mu$ L
pGEM®-T-Easy (50 ng/ $\mu$ L)	50 ng/ $\mu$ L	1 $\mu$ L
Fragmen HBsAg (37 ng/ $\mu$ L)	37 ng/ $\mu$ L	1 $\mu$ L
T4 DNA-ligase (3Weiss U/ $\mu$ L)	3Weiss U/ $\mu$ L	1 $\mu$ L
Deion water	-	2 $\mu$ L
<b>Volume total</b>		<b>10<math>\mu</math>L</b>



**Gambar 3.5** pGEM®-T Easy vector (sumber: Promega, 2007)

#### e. Transformasi pGHB ke dalam *E. coli* Strain DH5 $\alpha$

Transformasi bertujuan untuk memperbanyak kopi HBsAg di dalam sel kompeten *E. coli* strain DH5 $\alpha$ . Sel kompeten merupakan sel-sel yang telah mengalami pelakuan baik secara fisik dan kimiawi yang akan meningkatkan

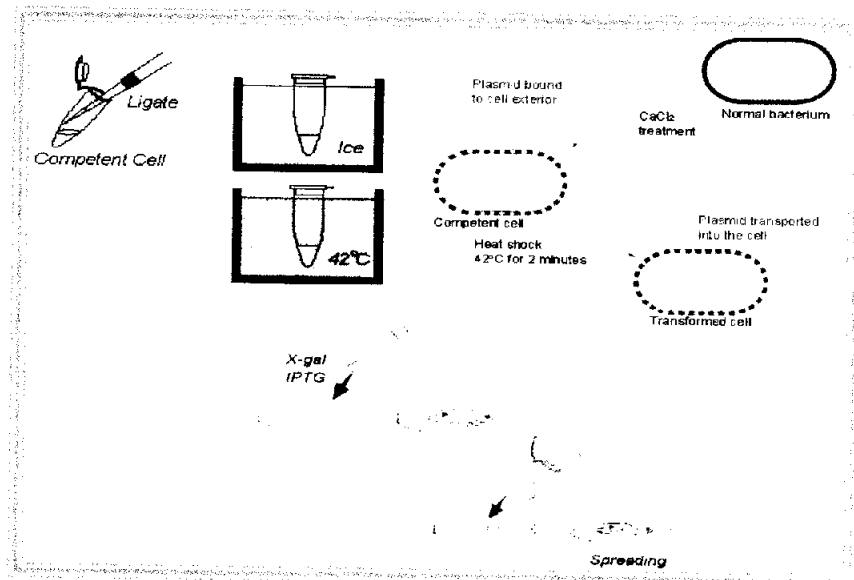
kemampuannya untuk mengambil DNA sehingga transformasi dapat dilakukan secara efisien (Brown, 2003). Metode transformasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode kejut panas ("Heat Shock") Sambrook *et al.* (1989) yang telah mengalami modifikasi.

Ke dalam tabung *Microcentrifuge* 1,5 mL baru steril dimasukkan 3  $\mu$ L DNA hasil ligasi (Gambar 3.6). Kemudian sebanyak 50  $\mu$ L sel kompeten dicampurkan dengan hati-hati. Tabung disimpan di dalam es selama 30 menit. Setelah itu diberi kejut panas selama 50 detik pada 42°C dan sesegera mungkin disimpan kembali dalam es dan didiamkan selama 10 menit (Gambar 3.6). Sebanyak 950  $\mu$ L SOC ditambahkan ke dalam campuran dan diinkubasi sambil dikocok 250 rpm pada suhu 37°C selama 3 jam. SOC merupakan medium yang baik bagi pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.

Setelah 3 jam inkubasi larutan SOC akan terlihat lebih keruh. Hal ini menunjukkan *E. coli* tumbuh dengan baik. Penambahan medium SOC tanpa antibiotik serta inkubasi dalam waktu yang pendek memungkinkan replikasi dan ekspresi plasmid dimulai, sehingga bila sel ini ditanam kembali dalam medium yang mengandung antibiotik, maka sel ini sudah mensintesis enzim resistensi yang cukup untuk tetap hidup. Kultur ini kemudian disentrifuga 14000 rpm selama 1 menit sehingga didapatkan pelet yang merupakan kumpulan sel-sel bakteri *E. coli*.

Pelet diresuspensikan ke dalam 100  $\mu$ L SOC dan seluruhnya disebar pada media LB (Luria Bertani) padat + antibiotik (Ampisilin = 100  $\mu$ g/mL) + IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside) + X-gal (5-bromo-4-chloro-3-

indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside) dalam cawan petri (Gambar 3.6). Kultur dalam cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 16-18 jam.



**Gambar 3.6** Tahap-tahap transformasi (sumber: Binder, 1997)

#### f. Isolasi DNA Plasmid pGHB

Isolasi plasmid dilakukan dengan menggunakan metoda alkali lisis atau *Lysis by Alkaline Minipreparation* (Sambrook *et al.*, 1989) dengan sedikit modifikasi. Cuplikan koloni putih tunggal hasil transformasi dikultur ke dalam 5 mL medium LB cair yang telah ditambahkan antibiotik (Ampisilin = 100  $\mu$ g/mL). Kultur diinkubasi sambil dikocok 250 rpm pada suhu 37°C selama 16 jam. Medium yang terlihat keruh menunjukkan adanya pertumbuhan koloni tunggal bakteri. Sebanyak 3 x 1,5 mL kultur dimasukkan ke dalam tabung *Microcentrifuge* 1,5 mL lalu disentrifuga 14.000 rpm. Supernatan yang merupakan sisa medium dibuang.



Pelet bakteri dikeringkan di udara lalu diresuspensi dengan 100-150  $\mu$ L Larutan I GTE (50 mM Glukosa ;25 mM Tris-HCl pH 8.0 ;10 mM EDTA pH 8.0) dan divorteks hingga homogen. Pemberian Larutan I GTE bertujuan untuk merusak dinding sel bakteri dan menghambat aktivitas enzim nuklease (Brown, 2003). Selanjutnya pada suspensi tersebut ditambahkan 200-300  $\mu$ L Larutan II Buffer Lisis (0,2 N NaOH ; 1% (w/v) SDS) lalu tabung dibolak-balik sebanyak lima kali sampai semua permukaan tabung terkena larutan tersebut. Letakkan tabung dalam es selama 5 menit. Penambahan Larutan II dapat membantu proses lisis dengan cara menghilangkan molekul lipid sehingga menyebabkan kerusakan membran sel bakteri (Brown, 2003). Setelah itu ditambahkan 150-225  $\mu$ L Larutan III (5 M Potassium Asetat ; Asam Asetat Glasial) untuk memisahkan DNA plasmid dengan DNA kromosom. tabung diletakkan kembali dalam es selama 5 menit kemudian disentrifuga 14.000 rpm selama 5 menit. Dari hasil sentrifugasi diperoleh pelet yang merupakan sisa-sisa sel-sel bakteri yang telah lisis, dan supernatan yang mengandung DNA plasmid. Supernatan dipindahkan ke tabung *Microcentrifuge* baru dan steril dengan hati-hati menggunakan mikropipet.

Tahap selanjutnya adalah presipitasi DNA. Ke dalam supernatan ditambahkan dua kali volume etanol absolut dingin, divorteks kemudian disimpan pada suhu  $-80^{\circ}\text{C}$  selama 1 jam. Setelah itu disentrifuga 14.000 rpm selama 5 menit. Pelet berwarna keputihan yang merupakan DNA plasmid akan mengendap pada dasar tabung. Supernatan dibuang sedangkan DNA plasmid dicuci dengan 1 mL etanol 70% dingin dan disentrifuga kembali

14.000 rpm selama 1 menit. Pelet kemudian dikeringkan dengan vakum selama 15 menit hingga pelet terlihat lebih bening. Pelet kemudian dilarutkan dalam 30  $\mu\text{L}$  TE pH 8 (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA) dan disimpan pada 4°C selama semalam agar DNA plasmid terlarut dengan baik.

Selanjutnya dilakukan presipitasi etanol untuk mengendapkan DNA plasmid. DNA plasmid dilarutkan dalam TE yang telah ditambahkan Ribonuclease (RNase) untuk menghindari kontaminasi oleh RNA. Enzim ini mendigesti RNA tanpa menyebabkan kerusakan DNA.

#### g. Analisis Restriksi Konstruk pGHB oleh Enzim *EcoR I*

Analisis restriksi dilakukan untuk membuktikan apakah fragmen DNA HBsAg telah terligasi ke dalam vektor pGEM®-T Easy. Pemotongan fragmen DNA pada sisi pemotongan yang spesifik dengan enzim restriksi endonuklease akan memberikan konfirmasi panjang fragmen DNA sisipan. Fragmen HBsAg yang diklon pada plasmid pGEM®-T Easy di potong menggunakan enzim *EcoR I*. Seluruh komponen reaksi restriksi pada Tabel 3.6 dicampur ke dalam tabung *microsentrifuge* 200  $\mu\text{L}$  steril, kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 2 jam.

**Tabel 3.6** Komposisi reaksi restriksi oleh enzim *EcoR I*

Pereaksi	Volume pereaksi
Plasmid pGHB	1 $\mu\text{L}$
<i>EcoR I</i>	0,5 $\mu\text{L}$
<i>Buffer EcoR I</i>	1 $\mu\text{L}$
Deion water	7,5 $\mu\text{L}$
<b>Volume total</b>	<b>10 <math>\mu\text{L}</math></b>

Selanjutnya, analisis hasil restriksi dilakukan dengan menggunakan metoda elektroforesis. Konsentrasi gel agarosa yang digunakan sebesar 1 %.

Elektroforesis dijalankan selama  $\pm$  1 jam dengan menggunakan *buffer* TAE 1x. DNA hasil elektroforesis kemudian diwarnai dengan EtBr melalui proses perendaman selama  $\pm$  15 menit, kemudian fragmen DNA hasil restriksi yang telah diwarnai dapat terlihat di bawah sinar UV.

#### **h. Sikuensing plasmid pGHB**

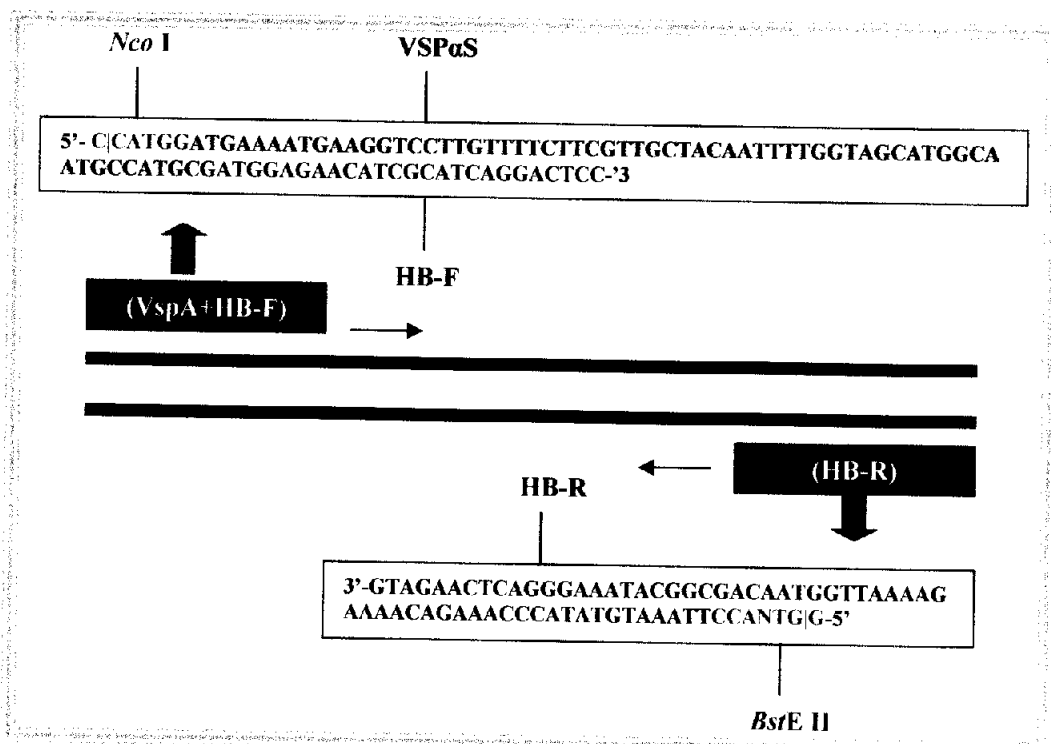
Setelah konfirmasi panjang DNA diketahui, sampel plasmid pGHB kemudian disikuensing untuk mengetahui urutan nukleotida gen HBsAg dan menentukan sub tipe isolat HBV yang digunakan. Lalu analisis hasil sikuensing untuk penentuan genotipe isolat virus dilakukan dengan menggunakan *Viral Genotyping Tools* yang tersedia pada situs *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), USA. Dengan menggunakan program ini, kita dapat membandingkan urutan yang kita miliki dengan referensi *database* yang tersedia dalam GenBank serta mengetahui genotipe HBV yang digunakan dalam penelitian.

## **2. Pembuatan Konstruk pGHBS (pGEM®-T Easy vector-HBsAg-VSP $\alpha$ S)**

### **a. Amplifikasi Fusi gen S (HBsAg) dengan Penambahan VSP $\alpha$ S**

Amplifikasi atau perbanyakkan Fusi gen S (HBsAg) + VSP $\alpha$ S dilakukan dengan metoda PCR. *Template* yang digunakan pada tahap amplifikasi HBsAg dengan penambahan sinyal peptida RE kedelai adalah gen HBsAg yang telah berada di dalam plasmid pGEM®-T Easy (konstruk pGHB). Sepasang primer yang digunakan pada amplifikasi gen HBsAg dengan penambahan sinyal peptida RE kedelai (VSP $\alpha$ S) dirancang

berdasarkan urutan HBsAg yang digabungkan dengan urutan sinyal peptida yang berasal dari urutan gen *vspA* (*Vegetative Storage Protein*) kedelai Rhee & Staswick (1992) pada ujung 5', yang juga digunakan dalam desain konstruk Sojikul *et al.* (2002). Sepasang primer tersebut terdiri dari primer *forward* (VspA+HB-F) primer *reverse* (HB-R) (Gambar 3.7). Pasangan primer tersebut telah didesain sebelumnya oleh Zainuddin (2008).



**Gambar 3.7** Primer forward (VspA+HB-F) dan primer reverse (HB-R) yang digunakan dalam amplifikasi fusi gen S-VSP $\alpha$ S

Pada primer *forward* (VspA+HB-F) terdapat urutan sisi pemotongan enzim *Nco* I sedangkan pada primer *reverse* (HB-R) terdapat urutan sisi pemotongan enzim *BstE* II. Penambahan urutan sisi pemotongan enzim-enzim

tersebut bertujuan agar pada penelitian selanjutnya, HBsAg dapat disisipkan ke dalam vektor ekspresi tumbuhan pCAMBIA.

PCR dilakukan dalam volume total 50  $\mu$ L. Komposisi reaksi PCR disajikan dalam Tabel 3.7. Semua komponen reaksi PCR tersebut dicampur di dalam tabung *microcentrifuge* 200  $\mu$ L steril, kemudian dimasukkan ke dalam *thermocycler* atau mesin PCR. Profil PCR yang digunakan dalam amplifikasi fusi gen S (HBsAg) + VSP $\alpha$ S sama dengan amplifikasi gen S dan dapat dilihat dalam Tabel 3.3.

**Tabel 3.7** Komposisi reaksi PCR fusi gen HBsAg + VSP $\alpha$ S

Reagen	Konsentrasi akhir	Volume peraksi
10X <i>buffer</i> MgCl <sub>2</sub> Free	1X	5 $\mu$ L
25 mM magnesium klorida (MgCl <sub>2</sub> )	2 mM	4 $\mu$ L
10 mM dNTPmix	0,2 mM	1 $\mu$ L
Primer <i>forward</i> VspA+HB-F (8,48 p mol/ $\mu$ L)	0,5 p mol/ $\mu$ L	3 $\mu$ L
Primer <i>reverse</i> HB-R (13,28 mol/ $\mu$ L)	0,5 p mol/ $\mu$ L	2 $\mu$ L
pGHB sebagai <i>template</i> (1 ng/ $\mu$ L)	0,02 ng/ $\mu$ L	1 $\mu$ L
<i>Taq</i> polymerase (1 U/ $\mu$ L)	1 U/ $\mu$ L	1 $\mu$ L
Deion water	-	33 $\mu$ L
<b>Volume Total</b>		<b>50<math>\mu</math>L</b>

Selanjutnya, analisis hasil PCR dilakukan dengan menggunakan metoda elektroforesis. Konsentrasi gel agarosa yang digunakan sebesar 1 %. Elektroforesis dijalankan selama  $\pm$  1 jam dengan menggunakan *buffer* TAE 1x. DNA hasil elektroforesis kemudian diwarnai dengan EtBr melalui proses perendaman selama  $\pm$  15 menit, kemudian fragmen DNA yang telah diwarnai dapat terlihat di bawah sinar UV. Fragmen DNA hasil PCR ini selanjutnya dimurnikan dari gel agarosa dengan menggunakan *Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit* dari Geneaid<sup>TM</sup>. Tahapan pemurnian fragmen gen S (HBsAg) + VSP $\alpha$ S hasil PCR sama dengan tahap pemurnian fragmen HBsAg.

**b. Ligasi Fragmen Fusi Gen S (HBsAg) + VSP $\alpha$ S ke dalam pGEM $\text{\textcircled{R}}$ -T Easy dan Transformasi pGHBS ke dalam *E. coli* Strain DH5 $\alpha$**

Fragmen fusi gen S (HBsAg) + VSP $\alpha$ S hasil purifikasi diligasikan ke dalam vektor pGEM $\text{\textcircled{R}}$ -T Easy untuk diklon atau diperbanyak dalam sel *E. coli* strain DH5 $\alpha$ . Rasio molar vektor terhadap fragmen gen S (HBsAg) + VSP $\alpha$ S adalah:

$$\frac{50 \text{ ng vektor} \times 756 \text{ bp sisipan} \times 3}{3015 \text{ bp vektor}} = 37,6 \text{ ng sisipan}$$

Reaksi ligasi dilakukan dalam volume total 10  $\mu$ L. Komposisi reaksi ligasi fragmen DNA HBsAg + VSP $\alpha$ S ke dalam vektor pGEM $\text{\textcircled{R}}$ -T Easy terdapat dalam Tabel 3.8.

**Tabel 3.8** Komposisi reaksi ligasi fragmen gen S (HBsAg) + VSP $\alpha$ S dengan vektor pGEM- T $\text{\textcircled{R}}$  Easy

Reagen	Konsentrasi akhir	Volume peraksi
2X Rapid Ligation Buffer	1X	5 $\mu$ L
pGemT-Easy (50 ng/ $\mu$ L)	50 ng/ $\mu$ L	1 $\mu$ L
Fragmen HBsAg+ VSP $\alpha$ S (37,6 ng/ $\mu$ L)	37,6 ng/ $\mu$ L	1 $\mu$ L
T4 DNA-ligase (3Weiss U/ $\mu$ L)	3 Weiss U/ $\mu$ L	1 $\mu$ L
Deion water	-	2 $\mu$ L
<b>Volume total</b>		<b>10<math>\mu</math>L</b>

Reaksi ligasi dilakukan selama semalam pada suhu 4 $^{\circ}$ C untuk mendapatkan hasil ligasi yang optimal. Hasil ligasi kemudian ditransformasikan ke dalam sel kompeten *E. coli* strain DH5 $\alpha$ . Sebanyak 3  $\mu$ L dari 10  $\mu$ L total reaksi ligasi digunakan untuk transformasi. Transformasi

bertujuan untuk memperbanyak kopi HBsAg + VSP $\alpha$ S di dalam sel kompeten *E. coli* strain DH5 $\alpha$ .

Tahapan transformasi pGHBS ke dalam *E. coli* strain DH5 $\alpha$  selengkapnya sama dengan tahap transformasi pGHB sebelumnya. Selanjutnya, koloni putih *E. coli* yang diduga mengandung sisipan HBsAg + VSP $\alpha$ S dikultur kembali dalam medium LB cair + ampisilin untuk diperbanyak. Kemudian konstruk plasmid pGHBS diisolasi dari kultur bakteri melalui metoda alkali lisis. Plasmid pGHBS yang telah berhasil diisolasi selanjutnya direstriksi dengan metode restriksi *double digest*.

### c. Analisis Restriksi Fragmen pGHBS oleh Enzim *Nco I* dan *BstE II*

Analisis restriksi dilakukan untuk membuktikan apakah fragmen fusi gen HBsAg + VSP $\alpha$ S telah terligasi ke dalam vektor pGEM $\text{\textcircled{R}}$ -T Easy. Pemotongan fragmen DNA pada sisi pemotongan yang spesifik dengan enzim restriksi endonuklease akan memberikan konfirmasi panjang fragmen DNA sisipan.

Fragmen fusi gen HBsAg + VSP $\alpha$ S yang diklon pada plasmid pGEM $\text{\textcircled{R}}$ -T Easy di potong menggunakan enzim *Nco I* dan *BstE II*. Seluruh komponen reaksi restriksi pada Tabel 3.9 dicampur ke dalam tabung *microcentrifuge* 200  $\mu$ L steril, kemudian diinkubasikan pada suhu 37 $^{\circ}$ C selama 2 jam. Setelah enzim *BstE II* melalui tahap inkubasi, seluruh hasil reaksi dipurifikasi dengan menggunakan *Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit* dari Geneaid $\text{\textsuperscript{TM}}$ .

Tahapan purifikasinya sama dengan purifikasi hasil PCR, hanya saja tidak disertai proses pemanasan gel terlebih dahulu. Hasil purifikasi dilarutkan dalam 15  $\mu\text{L}$  *Elution Buffer* dan seluruhnya digunakan dalam reaksi restriksi oleh enzim *Nco* I. Komponen reaksi restriksi oleh enzim *Nco* I terdapat dalam Tabel 3.10. Seluruh komponen tersebut kemudian diinkubasi selama semalam pada suhu 37°C.

**Tabel 3.9** Komposisi reaksi restriksi oleh enzim *BstE* II

Reaksi	Volume reaksi
Plasmid pGHBS	3 $\mu\text{L}$
<i>BstE</i> II	1 $\mu\text{L}$
<i>Buffer</i> O	2 $\mu\text{L}$
Deion water	14 $\mu\text{L}$
<b>Volume total</b>	<b>20<math>\mu\text{L}</math></b>

**Tabel 3.10** Komposisi reaksi restriksi oleh enzim *Nco* I

Reaksi	Volume reaksi
Plasmid pGHBS <i>cut</i> <i>BstE</i> II	15 $\mu\text{L}$
<i>Nco</i> I	1 $\mu\text{L}$
<i>Buffer</i> <i>Nco</i> I	2 $\mu\text{L}$
Deion water	2 $\mu\text{L}$
<b>Volume total</b>	<b>20<math>\mu\text{L}</math></b>

Selanjutnya, analisis hasil restriksi dilakukan dengan menggunakan metoda elektroforesis. Konsentrasi gel agarosa yang digunakan sebesar 1 %. Elektroforesis dijalankan selama  $\pm$  1 jam dengan menggunakan *buffer* TAE 1x. DNA hasil elektroforesis kemudian diwarnai dengan EtBr melalui proses perendaman selama  $\pm$  15 menit, kemudian fragmen DNA hasil restriksi yang telah diwarnai dapat terlihat di bawah sinar UV.

#### d. Sikuensing plasmid pGHBS

Setelah konfirmasi panjang DNA diketahui, sampel plasmid pGHBS kemudian disikuensing untuk mengetahui urutan nukleotida fusi gen HBsAg +



VSP $\alpha$ S. Lalu analisis hasil sikuensing dilakukan dengan menggunakan program BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) Tool yang tersedia pada situs National Center for Biotechnology Information (NCBI), USA. Dengan menggunakan program ini, kita dapat membandingkan urutan yang kita miliki dengan referensi *database* yang tersedia dalam GenBank.

