

## **BAB IV**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **A. AMPLIFIKASI DAN PURIFIKASI GEN *NS1* VIRUS DENGUE**

Proses amplifikasi gen *NS1* virus dengue merupakan tahap awal dalam penelitian. Fragmen gen *NS1* virus dengue diamplifikasi secara *in vitro* dengan teknik PCR untuk memperbanyak salinan spesifik gen target, yang kemudian diligasikan dengan vektor ekspresi pGEX-6P1. Reaksi PCR yang divisualisasikan pada gel agarosa 0,8% berhasil mengamplifikasi fragmen gen *NS1* dengue berukuran 1.160 pb secara spesifik (Gambar 9, Lajur 3). Kontrol negatif PCR tidak menunjukkan adanya pita DNA, sedangkan pita DNA plasmid kontrol berukuran 323 pb terdapat pada lajur kontrol positif (Gambar 9, Lajur 1 & 2). Berdasarkan hasil elektroforesis, dapat disimpulkan bahwa proses amplifikasi gen *NS1* dengue telah berhasil dilakukan dengan spesifik dan tanpa terjadi kontaminasi.

Keberhasilan amplifikasi gen *NS1* dengue dapat dipengaruhi oleh konsentrasi komponen dalam reaksi PCR, antara lain enzim DNA polimerase, DNA cetakan, primer, kation divalen, kation monovalen, dNTP, *buffer*, serta kondisi reaksi PCR (Sambrook & Russell 2001: 8.4--8.9). Produk amplifikasi yang digunakan dalam kloning sebaiknya memiliki kualitas dan kuantitas yang tinggi. Optimasi perlu dilakukan untuk memperoleh produk PCR gen

*NS1* yang berkualitas dan berkuantitas tinggi, dengan memodifikasi komponen serta kondisi reaksi PCR (Grunenwald 2003: 89).

Tahap optimasi komponen PCR dapat diminimalisir dengan melakukan reaksi PCR menggunakan AccuPrime™ *Pfx* SuperMix. Komponen PCR selain primer dan DNA cetakan telah tercampur di dalam AccuPrime™ *Pfx* SuperMix. AccuPrime™ *Pfx* SuperMix mengandung DNA polimerase *Pfx*, yang memiliki ketelitian (*fidelity*) dan spesifitas tinggi karena memiliki aktivitas *proofreading* 3' ke 5' (Invitrogen 2005: 20). Menurut Zahn *dkk.* (2007: 463), penggunaan enzim DNA polimerase yang memiliki aktivitas *proofreading* dapat meminimalisir kesalahan dalam reaksi PCR. Aktivitas *proofreading* merupakan aktivitas koreksi basa nukleotida yang mengalami kesalahan pasangan oleh DNA polimerase (Wanli Bi & Stambrook 1998: 3073). Enzim *Pfx* DNA polimerase berhasil digunakan untuk mengamplifikasi daerah gen *E* dan *NS1* *Yellow Fever Virus* (Bonaldo *dkk.* 2007: 13).

Sampel produk PCR hasil amplifikasi dari cDNA DEN-3 *strain* CH53489 (3.009 pb) digunakan sebagai DNA cetakan dalam reaksi PCR. Konsentrasi DNA cetakan yang digunakan dalam 25 µl reaksi PCR adalah 50 ng. Menurut Henegariu *dkk.* (1997: 510), konsentrasi DNA cetakan 30--500 ng dapat digunakan dalam 25 µl reaksi PCR. Fragmen DNA gen *NS1* berukuran 1.160 pb diamplifikasi dari DNA cetakan dengan primer d3-2336sbam (*forward*) dan d3-NS1-1056c (*reverse*).

Kespesifikan penempelan primer sangat memengaruhi keberhasilan reaksi PCR sehingga primer yang digunakan perlu memiliki kemiripan (*similarity*) yang tinggi terhadap sekuen target (Abd-Elsalam 2003: 94). Berdasarkan analisis dengan perangkat lunak FastPCR, diketahui bahwa primer d3-2336sbam (*forward*) dan d3-NS1-1056c (*reverse*) memiliki nilai *similarity* sebesar 94% (19/20) dengan DNA cetakan (Lampiran 2). Meskipun nilai *similarity* sekuen primer tidak 100%, primer berhibridisasi secara tepat pada sekuen target karena tidak ada sekuen lain yang memiliki *similarity* lebih dari 94%. Perbedaan satu basa nukleotida antara sekuen primer dan cetakan disebabkan pasangan primer dirancang berdasarkan sekuen genom virus DEN-3 *strain* CH53489 yang diisolasi dari Thailand pada tahun 1973 (Raekiansyah *dkk.* 2005: 1187--1197). Kemungkinan besar terjadi perbedaan basa antara sekuen referensi dan sampel yang diisolasi di Indonesia pada tahun 2004.

Primer d3-2336sbam dan d3-NS1-1056c memiliki panjang 31 dan 34 basa nukleotida. Menurut Abd-Elsalam (2003: 94), panjang primer yang baik agar dapat menempel secara spesifik dan stabil pada DNA cetakan adalah sekitar 18--30 basa. Panjang kedua primer lebih dari 30 basa, disebabkan primer dirancang untuk membawa sekuen pengenalan enzim restriksi dan sekuen tambahan untuk meningkatkan efisiensi pemotongan enzim. Primer d3-2336sbam mengandung 6 sekuen pengenalan enzim restriksi *Bam*HI dan

5 basa tambahan. Primer d3-NS1-1056c membawa 6 sekuen pengenalan *Xho*I, 6 sekuen pengenalan *Eco*RI, serta 2 basa tambahan (Gambar 7).

Basa tambahan pada ujung primer berguna untuk meningkatkan efisiensi pemotongan enzim restriksi. Enzim *Bam*HI mencapai efisiensi pemotongan optimumnya (50--100%) apabila primer memiliki 1--5 basa tambahan dari ujung 3' ke situs pemotongan, sedangkan enzim *Xho*I membutuhkan 2--5 basa tambahan untuk mencapai efisiensi pemotongan 50--100% (Fermentas 2008a: 2 & 8). Penambahan sekuen pengenalan enzim restriksi bertujuan memudahkan penyisipan produk PCR gen *NS1* dengue pada vektor pGEX-6P1 pada tahap ligasi dengan membentuk *sticky ends*. Fragmen gen *NS1* hasil amplifikasi memiliki *flanking region* dengan situs pengenalan enzim restriksi yang dibawa oleh pasangan primer.

Menurut Henegariu (1997: 508), konsentrasi primer merupakan salah satu parameter yang dapat menentukan kespesifikan penempelan primer dan proses amplifikasi. Konsentrasi primer dalam reaksi PCR dioptimasi dengan kisaran 0,2--0,4  $\mu$ M. Konsentrasi primer 0,2  $\mu$ M memberikan hasil reaksi PCR yang lebih spesifik dan tanpa dimer dibandingkan dengan konsentrasi 0,4  $\mu$ M. Konsentrasi primer yang terlalu tinggi menyebabkan penempelan yang tidak spesifik dan terbentuknya primer dimer, sedangkan konsentrasi yang rendah dapat memengaruhi efisiensi PCR (Grunenwald 2003: 92).

Optimasi juga dilakukan pada kondisi tahap penempelan primer pada sekuen DNA target, yaitu tahap *annealing*. Kespesifikan penempelan primer

dipengaruhi oleh ketepatan penggunaan suhu *annealing* (Henegariu *dkk.* 1997: 507). Suhu *annealing* dioptimasi pada kisaran 54--58° C untuk menentukan suhu penempelan primer yang paling optimal. Menurut Sambrook dan Russell (2001: 8.8), suhu *annealing* yang baik berkisar antara 3--5° C dari nilai *temperature of melting* ( $T_m$ ) primer. Primer d3-2336sbam memiliki *temperature of melting* ( $T_m$ ) 52° C, sedangkan primer d3-NS1-1056c memiliki  $T_m$  58° C. Kisaran optimasi suhu *annealing* ditentukan berdasarkan perbedaan nilai  $T_m$  kedua primer.

Suhu *annealing* 55° C merupakan suhu optimal reaksi amplifikasi gen *NS1* karena pita DNA reaksi PCR dengan suhu *annealing* tersebut terlihat paling tebal dan spesifik dibandingkan reaksi PCR dengan suhu *annealing* lainnya (Gambar 9). Tebalnya pita DNA gen *NS1* disebabkan pasangan primer berhasil menempel dengan spesifik pada DNA cetakan sampel produk PCR. Menurut Grunenwald (2003: 94), suhu *annealing* yang terlalu rendah dapat menyebabkan primer berhibridisasi tidak spesifik pada sekuen target, sedangkan suhu *annealing* yang terlalu tinggi menyebabkan berkurangnya kemampuan hibridisasi primer sehingga berpengaruh pula terhadap berkurangnya produk PCR hasil amplifikasi.

Berdasarkan optimasi yang dilakukan pada suhu *annealing*, kondisi PCR yang diprogram pada penelitian diawali dengan tahap denaturasi awal pada suhu 94° C selama 3 menit, denaturasi pada suhu 94° C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 55° C selama 1 menit, polimerisasi awal pada

suhu 72° C selama 1 menit 30 detik, dan diakhiri dengan polimerisasi akhir pada suhu 72° C selama 5 menit kemudian inkubasi pada suhu 4° C. Reaksi PCR berlangsung selama 30 siklus (Gambar 6). Jumlah siklus yang digunakan dalam reaksi PCR sebaiknya tidak lebih dari 25--30 siklus. Apabila jumlah siklus melebihi 30 siklus, reaksi amplifikasi akan mengalami penurunan laju eksponensial serta peningkatan peluang kesalahan pemasangan basa pada untai salinan karena berkurangnya jumlah reagen PCR dan aktivitas DNA polimerase (Kolmodin & Birch 2002: 12).

Kontrol positif berupa DNA plasmid kontrol dari kit PCR Core System II diamplifikasi dengan pasangan primer *upstream control* dan *downstream control* menghasilkan fragmen DNA berukuran 323 pb. Kontrol positif bermanfaat untuk memastikan bahwa proses amplifikasi telah berjalan dengan baik sesuai dengan kondisi yang diinginkan (Smith *dkk.* 1997: 5). Kontrol negatif berupa campuran reaksi PCR tanpa DNA cetakan. Menurut Kidd dan Ruano (1995: 7), tidak tampaknya pita DNA pada kontrol negatif mengindikasikan tidak terjadi kontaminasi pada komponen PCR.

Produk PCR dituang ke dalam sumur gel agarosa 0,8% (b/v), kemudian dielektroforesis selama 30 menit, 100 V untuk memastikan keberadaan pita DNA produk PCR gen *NS1* dengue. Hasil elektroforesis menunjukkan pita tunggal yang berada sedikit di atas pita berukuran 1.000 pb pada penanda 1 kb DNA Ladders sehingga dapat dipastikan bahwa pita tersebut merupakan fragmen gen *NS1* dengue yang sesuai dengan produk

PCR target (berukuran 1.160 pb) (Gambar 9, Lajur 3). Lajur kontrol positif tampak pita DNA kontrol (323 pb), dan tidak terdapat pita pada lajur kontrol negatif (Gambar 9, Lajur 1 & 2). Berdasarkan hasil elektroforesis produk PCR dan kontrol, dapat disimpulkan bahwa reaksi PCR yang dilakukan berhasil mengamplifikasi fragmen gen *NS1* dengue secara optimal, spesifik, serta tanpa kontaminasi.

Fragmen DNA gen *NS1* yang ukurannya tepat dan memiliki pola pita spesifik diisolasi dari gel agarosa, kemudian dipurifikasi dengan kit Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System untuk menghilangkan sisa komponen PCR dan gel. Hasil purifikasi yang divisualisasi dengan elektroforesis menunjukkan pita tunggal yang berada di antara pita berukuran 1.000 pb dan 1.500 pb pada penanda 1 kb DNA Ladders Plus, merupakan fragmen gen *NS1* berukuran 1.160 pb (Gambar 10). Hasil tersebut menunjukkan bahwa proses purifikasi berhasil dilakukan, karena gen *NS1* hasil purifikasi tidak terdegradasi dan tidak mengalami perubahan ukuran. Pita DNA hasil purifikasi terlihat lebih tebal dan terang daripada pita DNA hasil reaksi PCR. Penampakan pita DNA yang relatif tebal dan terang menunjukkan bahwa proses purifikasi berhasil memurnikan fragmen DNA gen *NS1* dari pengotor berupa komponen PCR, protein, dan garam. (Promega 2005: 1--2). Proses purifikasi produk PCR gen *NS1* dengue dari gel agarosa berhasil dilakukan, diperkirakan konsentrasi DNA hasil purifikasi cukup tinggi sehingga hasilnya dapat digunakan dalam tahap digesti.

## B. ISOLASI DNA VEKTOR EKSPRESI PLASMID pGEX-6P1

Plasmid pGEX-6P1 diisolasi dari kultur cair bakteri *E. coli* BL21 Star™(DE3) yang membawa plasmid pGEX-6P1. Menurut Amersham Biosciences (2002: 12), isolasi pGEX-6P1 dapat dilakukan dengan metode minipreparasi lisis alkali standar. Plasmid pGEX-6P1 hasil isolasi digunakan sebagai vektor yang disisipkan gen *NS1* virus dengue pada proses ligasi. Visualisasi elektroforesis plasmid pGEX-6P1 hasil isolasi pada gel agarosa 0,8% menunjukkan dua pita DNA yang berada sejajar dengan pita penanda  $\lambda$ /HindIII berukuran 23.130 pb dan 6.557 pb (Gambar 11, Lajur M<sub>1</sub> & 1). Plasmid yang telah didigesti dengan enzim *Bam*HI menunjukkan pita DNA tunggal berukuran sekitar 4.984 pb (Gambar 11, Lajur M<sub>2</sub> & 2). Berdasarkan visualisasi elektroforesis, dapat disimpulkan bahwa plasmid pGEX-6P1 telah berhasil diisolasi dari sel bakteri *E. coli* BL21 Star™(DE3) dengan ukuran yang tepat, yaitu 4.984 pb (Geerlof 2004: 1).

Plasmid yang belum didigesti dapat memiliki 3 konformasi berbeda, antara lain: *nicked (open circular)*, *linear*, dan *supercoiled* (Dale & von Schantz 2007: 38--39). Plasmid hasil isolasi memiliki konformasi *nicked* karena kemungkinan salah satu untai DNA terpotong akibat perlakuan enzimatik atau mekanis. Konformasi DNA tersebut bermigrasi paling lambat sehingga pita DNA yang tampak berada di bagian atas gel (Dellis 2004: 1).

Plasmid pGEX-6P1 didigesti dengan enzim *Bam*HI yang memotong plasmid pada satu situs untuk menentukan ukuran tepatnya. Menurut Holt



(1990: 2), plasmid hasil isolasi tidak dapat ditentukan ukuran fragmennya secara tepat sebelum didigesti menjadi konformasi linier. Molekul DNA linier bermigrasi sebagai pita tunggal sehingga ukurannya dapat ditentukan (Carson & Robertson 2004: 24). Plasmid pGEX-6P1 memiliki satu situs pemotongan enzim restriksi *Bam*HI pada basa ke-945 dan membentuk konformasi linier dengan potongan kohesif (*sticky ends*) pada kedua ujungnya (Fairbanks & Andersen 1999: 257). Pita DNA plasmid hasil digesti berada sedikit di atas pita penanda  $\lambda$ *Hind*III berukuran 4.361 pb. Fragmen tersebut menunjukkan ukuran plasmid pGEX-6P1 yang tepat, yaitu 4.984 pb (Gambar 11, Lajur 2) (Geerlof 2004: 1). Plasmid pGEX-6P1 yang telah berhasil diisolasi selanjutnya didigesti dengan enzim *Bam*HI dan *Xho*I (*double digestion*) sebelum diligasikan dengan sisipan gen *NS1* dengue.

### **C. DIGESTI PLASMID pGEX-6P1 DAN GEN *NS1***

Gen *NS1* virus dengue hasil PCR serta plasmid pGEX-6P1 hasil isolasi, masing-masing didigesti dengan enzim *Bam*HI dan *Xho*I (*double digestion*). Reaksi digesti langsung dipurifikasi untuk menghilangkan sisa-sisa reagen digesti berupa enzim dan *buffer* yang dapat mengganggu proses ligasi. Gen *NS1* serta plasmid pGEX-6P1 yang telah didigesti dan dipurifikasi, dianalisis dengan elektroforesis pada gel agarosa 0,8% (b/v), menunjukkan fragmen linier berukuran sekitar 1.160 pb dan 4.960 pb (Gambar 12, Lajur 1 dan 2). Konsentrasi DNA hasil purifikasi ditentukan

berdasarkan perbandingan intensitas pita DNA pada hasil elektroforesis. Konsentrasi fragmen gen *NS1* dengue hasil purifikasi adalah 15 ng/μl, sedangkan konsentrasi plasmid pGEX-6P1 20,39 ng/μl (Lampiran 4).

Proses *double digestion* menggunakan enzim restriksi *Bam*HI dan *Xho*I. Situs *Bam*HI dan *Xho*I terdapat dalam MCS plasmid pGEX-6P1 pada basa ke-945 dan ke-969 (Amersham Biosciences 2002: 10). Plasmid pGEX-6P1 yang telah didigesti membentuk fragmen linier berukuran 4.960 pb karena jarak antara situs *Bam*HI dan *Xho*I adalah 24 basa. Enzim restriksi *Bam*HI-*Xho*I juga memotong tepi produk PCR gen *NS1* yang dibawa oleh primer *forward* dan *reverse* (*flanking region*) (Gambar 7).

Berdasarkan analisis restriksi dengan Genetyx7 (Lampiran 3), diketahui bahwa situs pemotongan *Bam*HI dan *Xho*I hanya terdapat pada primer, dan tidak terdapat di dalam sekuen gen *NS1* dengue sehingga tidak memengaruhi keseluruhan sekuen gen. Hasil pemotongan kedua enzim membentuk *sticky ends* pada fragmen gen *NS1* maupun plasmid pGEX-6P1 (Fairbanks & Andersen 1999: 257). Enzim *Eco*RI tidak digunakan dalam *double digestion* karena enzim tersebut memotong gen *NS1* di dalam sekuen.

Proses *double digestion* dengan *Bam*HI-*Xho*I menghasilkan fragmen DNA vektor serta sisipan dengan ujung 5' dan 3' yang tidak saling berkomplemen. Kloning dua fragmen DNA dengan ujung-ujung yang berbeda disebut *directional cloning* (Sambrook & Russell 2001: 1.84). Menurut Carson dan Robertson (2004: 20), *directional cloning* bermanfaat

mencegah terjadinya religasi vektor tanpa sisipan, serta memastikan orientasi penyisipan gen pada vektor. Kontrol disertakan pula pada reaksi *double digestion*, yaitu plasmid pGEX-6P1 yang direaksikan dengan salah satu enzim (*Bam*HI atau *Xho*I saja). Kontrol berfungsi mengetahui efektifitas kerja dari masing-masing enzim pada *double digestion* plasmid pGEX-6P1 sehingga kegagalan ligasi dapat dianalisis (Mülhardt 2007: 42--43).

Lajur 3 dan 4 pada gambar 12 merupakan kontrol digesti vektor pGEX-6P1 yang masing-masing didigesti dengan *Bam*HI dan *Xho*I. Pita DNA yang terbentuk pada kedua lajur merupakan pita tunggal, menunjukkan bahwa kedua enzim berhasil memotong vektor dengan baik pada kondisi reaksi dan *buffer* yang digunakan. Menurut Fermentas (2008b: 1), enzim *Bam*HI dan *Xho*I dapat bekerja sebagai enzim *double digestion* dalam *buffer Bam*HI dengan aktivitas maksimal (100%). Hal tersebut mengindikasikan bahwa reaksi *double digestion* berlangsung dengan sempurna.

Reaksi *double digestion* yang telah diinkubasi pada suhu 37° C selama 3 jam langsung dipurifikasi dari larutan agar jumlah DNA yang hilang pada proses elektroforesis dan purifikasi dapat diminimalisir. Purifikasi dilakukan untuk menghilangkan pengotor DNA berupa sisa enzim dan *buffer* yang dapat menghambat proses ligasi (Promega 2005: 1). Hasil purifikasi yang dielektroforesis pada gel agarosa 0,8% selama 30 menit terdapat pada Gambar 12. Pita DNA tunggal yang tampak pada lajur 1 berada di antara pita 564 pb dan 2.027 pb, merupakan fragmen gen *NS1* berukuran 1.160 pb yang

telah didigesti dengan enzim *Bam*HI dan *Xho*I. Pita DNA yang tampak pada lajur 2 berada di atas pita penanda DNA  $\lambda$ /*Hind*III berukuran 4.361 pb, merupakan plasmid pGEX-6P1 hasil digesti berukuran 4.960 pb.

Berdasarkan visualisasi elektroforesis hasil purifikasi reaksi digesti dan kontrol, dapat disimpulkan bahwa fragmen DNA plasmid pGEX-6P1 dan gen *NS1* dengue berhasil didigesti dengan *Bam*HI-*Xho*I. Visualisasi elektroforesis hasil purifikasi kedua fragmen DNA menunjukkan pita DNA yang relatif tipis dan kurang cerah, mengindikasikan bahwa konsentrasi DNA dalam larutan tidak terlalu tinggi. Menurut Promega (2005: 2), fragmen DNA berukuran 1.000 pb dapat dipurifikasi dengan persentase *recovery* sekitar 92%. Kemungkinan konsentrasi kedua fragmen DNA sebelum proses digesti tidak terlalu tinggi sehingga setelah dipurifikasi konsentrasinya semakin berkurang.

Konsentrasi DNA yang telah dipurifikasi ditentukan dari gambar hasil elektroforesis. Menurut Dale dan von Schantz (2007: 37), gel elektroforesis dapat digunakan untuk menganalisis kualitas dan kuantitas dari sampel DNA, dengan membandingkan sampel tersebut dengan penanda standar yang ukuran fragmen dan berat molekulnya telah diketahui. Konsentrasi kedua fragmen DNA dihitung berdasarkan perbandingan intensitas pita DNA hasil elektroforesis dengan pita penanda DNA  $\lambda$ /*Hind*III menggunakan perangkat lunak BIO1D. Konsentrasi DNA gen *NS1* dan plasmid pGEX-6P1 hasil proses digesti dan purifikasi tersebut merupakan konsentrasi optimal untuk

reaksi ligasi. Menurut Judelson (2006: 1), konsentrasi DNA yang baik digunakan untuk reaksi ligasi berkisar antara 10--20 ng/ $\mu$ l.

#### **D. LIGASI VEKTOR pGEX-6P1 DENGAN GEN NS1**

Fragmen gen *NS1* dengue yang telah dididigesti selanjutnya diligasikan dengan plasmid pGEX-6P1. Ujung-ujung sisipan gen *NS1* hasil pemotongan *Bam*HI-*Xho*I berlekatan dengan ujung-ujung vektor pGEX-6P1 yang berkomplemen. Plasmid rekombinan yang terbentuk berukuran 6.120 pb. Hasil ligasi tidak dianalisis dengan elektroforesis karena konsentrasi DNA rekombinan yang terbentuk relatif sedikit. Hasil ligasi dapat dianalisis setelah ditransformasikan ke dalam sel kompeten *E. coli* BL21 Star™(DE3).

Reaksi ligasi yang dilakukan pada penelitian menggunakan rasio molar vektor dan sisipan (1:10), berdasarkan perbandingan ukuran dan konsentrasi kedua fragmen DNA. Menurut Cranenburgh (2004: 200), rasio molar sisipan dan vektor penting dalam reaksi ligasi untuk mengoptimalkan pembentukan plasmid rekombinan dan meminimalisir pembentukan fragmen-fragmen DNA yang tidak diharapkan. Proses *double digestion* merupakan faktor yang penting dalam ligasi untuk mencegah terjadinya ligasi intramolekul antara dua fragmen DNA (Dale & von Schantz 2007: 54--55).

Optimasi ligasi yang dilakukan menggunakan rasio molar sisipan dan vektor (1:5), tidak memberikan hasil sebaik reaksi dengan rasio (1:10). Menurut Ausubel *dkk.* (1995: 3.16.5), hal tersebut disebabkan peluang terjadinya reaksi ligasi intermolekul antara vektor dan sisipan dengan rasio

(1:10) lebih besar daripada rasio (1:5). Konsentrasi total DNA sisipan gen *NS1* dengue yang direaksikan pada reaksi ligasi dengan rasio molar (1:10) adalah 142,35 ng, sedangkan vektor pGEX-6P1 61,17 ng (Lampiran 5).

Fragmen gen *NS1* dengue hasil digesti berukuran 1.160 pb disisipkan ke dalam vektor plasmid pGEX-6P1 berukuran 4.960 pb sehingga menghasilkan plasmid rekombinan berukuran 6.120 pb. Reaksi ligasi kedua fragmen DNA tersebut dikatalisis menggunakan T4 DNA ligase. Menurut Cranenburgh (2004: 200), T4 DNA ligase mengkatalisis reaksi pengikatan ujung-ujung molekul DNA yang saling berkomplemen.

Reaksi ligasi memerlukan kontrol untuk menganalisis terjadinya suatu kegagalan. Sebagai kontrol negatif ligasi, digunakan DNA plasmid yang telah didigesti dengan enzim *Bam*HI-*Xho*I, tanpa penambahan DNA sisipan dan enzim T4 DNA ligase. Kontrol positif merupakan DNA plasmid pGEX-6P1 hasil digesti dengan enzim *Bam*HI, direaksikan dengan T4 DNA ligase. Keberadaan kontrol negatif dapat mengindikasikan bahwa proses *double digestion* vektor berlangsung kurang sempurna sehingga masih terdapat vektor yang tidak terpotong. Hasil pertumbuhan koloni reaksi kontrol positif ligasi menunjukkan bahwa T4 DNA ligase yang digunakan berkualitas baik serta dapat bekerja secara optimal pada reaksi ligasi gen *NS1* dengue dengan plasmid pGEX-6P1 (Carson dan Robertson 2006: 41). Reaksi ligasi, kontrol positif ligasi, dan kontrol negatif ligasi langsung ditransformasi ke dalam sel kompeten.

## **E. PEMBUATAN SEL KOMPETEN *Escherichia coli* BL21 STAR™(DE3) DAN TRANSFORMASI**

Reaksi ligasi ditransformasi ke dalam sel kompeten *E. coli* BL21 Star™(DE3) yang dipreparasi dengan metode kalsium klorida ( $\text{CaCl}_2$ ). Menurut Zhiming Tu dkk. (2005: 117), parameter keberhasilan proses transformasi dapat ditentukan dengan nilai efisiensi transformasi yang tinggi. Nilai efisiensi transformasi yang diperoleh pada tahap optimasi pembuatan sel kompeten adalah  $1,64 \times 10^5$  cfu/ $\mu\text{g}$  DNA, sedangkan efisiensi transformasi pada saat kloning meningkat menjadi  $2,8 \times 10^5$  cfu/ $\mu\text{g}$  DNA (Lampiran 7). Berdasarkan nilai efisiensi transformasi, sel kompeten yang dipreparasi dengan metode  $\text{CaCl}_2$  memiliki kualitas yang cukup baik sehingga dapat digunakan untuk mentransformasi hasil reaksi ligasi.

Pembuatan sel kompeten diawali dengan inokulasi kultur awal yang telah ditumbuhkan selama 16 jam ke dalam kultur sel kompeten. Jumlah inokulasi kultur awal ke dalam kultur sel kompeten ditentukan dengan persamaan stoikiometri (Lampiran 6). Nilai absorbansi kultur awal adalah 1,326, sedangkan nilai absorbansi awal kultur sel kompeten dalam 30 ml medium SOB cair yang diinginkan adalah 0,05 sehingga jumlah kultur awal yang diinokulasi adalah 1,13 ml.

*Working culture* bakteri *E. coli* BL21 Star™(DE3) ditumbuhkan pada suhu 37° C, kemudian dipanen pada saat nilai absorbansi mencapai 0,325.

Menurut Ausubel *dkk.* (1995: 1.8.1), kultur sel kompeten ditumbuhkan pada suhu 37° C sampai sel bakteri memasuki awal fase logaritmik pertumbuhan. Kultur yang dipanen pada awal fase logaritmik memiliki kompetensi yang paling baik (Sambrook dan Russell 2001: 1.105). Sel bakteri pada fase tersebut mengalami pertumbuhan yang optimal dan aktif membelah sehingga memudahkan introduksi DNA asing (Ausubel *dkk.* 1995: 1.8.1).

Zhiming Tu *dkk.* (2005: 116--118) mengoptimasi pemaparan larutan CaCl<sub>2</sub> terhadap dinding sel sejumlah *strain E. coli* berdasarkan permulaan fase log pertumbuhan kultur (dinyatakan dalam nilai absorbansi hasil pengukuran dengan spektrofotometer). Berdasarkan optimasi Zhiming Tu *dkk.* dapat disimpulkan bahwa awal fase log kultur bakteri *strain* BL21 Star™(DE3) berkisar pada nilai absorbansi 0,2--0,4. Kultur yang telah dipanen dengan sentrifugasi kemudian diberi perlakuan larutan CaCl<sub>2</sub>. Sel kompeten yang tersimpan dalam larutan CaCl<sub>2</sub> kemudian ditambahkan DNA plasmid pGEX-6P1 hasil isolasi. Menurut Old dan Primrose (2003: 11), garam CaCl<sub>2</sub> kemungkinan dapat menyebabkan perubahan struktur dinding sel yang meningkatkan pengikatan DNA pada bagian luar sel.

Proses transformasi plasmid dari bagian luar ke dalam sel diinduksi oleh kejutan panas dari suhu 0° C ke suhu 42° C. Kejutan panas merupakan tahap krusial dalam transformasi. Kemungkinan molekul DNA asing yang telah menempel pada dinding sel kompeten terintroduksi ke dalam sitoplasma dengan pemberian kejutan panas (Brown 2006: 90--91). Sel transforman



yang telah diberikan kejutan panas dikultur pada medium pengayaan SOC tanpa ampisilin agar sel cepat pulih dan plasmid dapat mengekspresikan gen resistensi antibiotiknya (Ausubel *dkk.* 1995: 1.8.8).

Kultur *E. coli* BL21 Star™(DE3) hasil transformasi disebar di atas medium SOB agar yang mengandung ampisilin. Koloni yang dapat tumbuh pada medium ampisilin hanya sel bakteri yang berhasil mentransformasi plasmid pGEX-6P1 karena plasmid membawa sifat resistensi ampisilin bagi sel. Kontrol positif dan negatif yang berupa sel kompeten tanpa penambahan DNA disertakan dalam transformasi. Seluruh sel tumbuh pada kontrol positif, sedangkan tidak terdapat pertumbuhan pada kontrol negatif. Kontrol positif disebar di atas medium tanpa ampisilin untuk melihat kemampuan tumbuh sel kompeten pada medium SOB. Kontrol negatif disebar pada medium ampisilin untuk melihat kemungkinan terjadi kontaminasi pada sel kompeten atau pada proses transformasi (Sambrook & Russell 2001: 1.111). Hasil tersebut menunjukkan bahwa sel kompeten berhasil tumbuh dengan baik pada medium SOB, serta tidak terjadi kontaminasi (Gambar 13 F & G).

Kualitas sel kompeten dapat diketahui dengan menghitung nilai efisiensi transformasi kontrol. Sebanyak 1.356 koloni bakteri tumbuh pada tahap optimasi pembuatan sel kompeten sehingga diperoleh nilai efisiensi transformasi sebesar  $1,64 \times 10^5$  cfu/ $\mu$ g DNA. Sebanyak 3.496 koloni tumbuh pada kontrol transformasi proses kloning (Gambar 13 E), sehingga nilai efisiensi meningkat menjadi  $2,8 \times 10^5$  cfu/ $\mu$ g DNA (Lampiran 7). Menurut

Davis *dkk.* (1994: 239), metode  $\text{CaCl}_2$  memiliki nilai efisiensi transformasi optimal sekitar  $10^6$  cfu/ $\mu\text{g}$  DNA. Meskipun nilai efisiensi tidak maksimal, kualitas sel kompeten yang dipreparasi relatif baik dan dapat digunakan dalam proses transformasi hasil reaksi ligasi. Menurut Hanahan (*lihat* Sambrook & Russell 2001: 1.105), nilai efisiensi transformasi dapat dipengaruhi oleh sejumlah faktor teknis, antara lain kemurnian reagen yang digunakan, kondisi pertumbuhan sel, serta kebersihan peralatan gelas.

Meningkatnya nilai efisiensi sel kompeten pada saat kloning dari tahap optimasi dipengaruhi faktor penambahan senyawa krioprotektan dan penyimpanan. Menurut Hanahan (*lihat* Zhiming Tu *dkk.* 2005: 119), penambahan dimetil sulfoksida (DMSO) dapat meningkatkan efisiensi transformasi. Sel kompeten yang ditambahkan DMSO dapat mengalami peningkatan efisiensi setelah disimpan pada suhu  $-70^\circ \text{C}$  selama 2--7 hari.

Berdasarkan tahap optimasi pembuatan sel kompeten, diketahui bahwa sel kompeten yang dipreparasi dengan metode  $\text{CaCl}_2$  memberikan nilai efisiensi tinggi dan dapat digunakan pada tahap kloning. Hasil transformasi kontrol yang dilakukan pada tahap kloning menunjukkan bahwa kualitas sel kompeten sangat baik sehingga diharapkan dapat menghasilkan koloni transforman dari reaksi ligasi dalam jumlah yang efisien.

## F. SELEKSI DAN VERIFIKASI PLASMID REKOMBINAN pGEX-nkNS1

### a. Seleksi dan isolasi kandidat plasmid rekombinan

Bakteri *E. coli* BL21 Star™(DE3) yang telah ditransformasi dengan DNA rekombinan hasil ligasi, kemudian diseleksi dengan medium seleksi SOB ampisilin. Koloni yang tumbuh pada cawan hasil ligasi dengan rasio molar vektor:sisipan (1:10) berjumlah 162 koloni, pada cawan hasil ligasi dengan rasio (1:5) tumbuh 64 koloni, pada kontrol positif ligasi 388 koloni, sedangkan tidak terdapat koloni pada kontrol negatif ligasi (Gambar 13 A--D). Sembilan belas kandidat koloni rekombinan dipilih secara acak dari 162 koloni yang tumbuh kemudian diisolasi dengan metode lisis alkali.

Visualisasi elektroforesis gel agarosa 0,8% menunjukkan salah satu lajur yang terdapat pita DNA plasmid hasil isolasi dengan perbedaan pola migrasi sedikit lebih tinggi dibandingkan dengan pola migrasi pita DNA plasmid hasil isolasi lainnya (Gambar 14, Lajur 5). Plasmid yang diisolasi dari koloni 1b3 tersebut diduga merupakan plasmid rekombinan pGEX-nkNS1. Plasmid 1b3 diverifikasi lebih lanjut dengan *single digestion* dan PCR.

Seluruh kandidat plasmid rekombinan berhasil diisolasi dari kultur bakteri *E. coli* BL21 Star™(DE3). Visualisasi elektroforesis seluruh kandidat plasmid rekombinan menunjukkan konformasi pita DNA *supercoiled* (Gambar 14, Lajur 3--13), berbeda dengan kontrol isolasi (pGEX-6P1 *wild type*) yang memiliki konformasi pita DNA *nicked* (Gambar 14, Lajur 1--2). Perbedaan

konformasi tersebut menyebabkan pita DNA kontrol tidak dapat digunakan sebagai pembanding terhadap pita DNA pada analisis awal rekombinan.

Plasmid rekombinan perlu dianalisis lebih lanjut setelah diisolasi untuk mengetahui ukuran tepatnya. Menurut Holt (1990: 2), ukuran pita DNA plasmid hasil isolasi yang tepat belum dapat ditentukan sebelum melakukan *single digestion*. Plasmid hasil isolasi lainnya yang memiliki pita DNA dengan posisi pita utama yang lebih rendah daripada plasmid 1b3 tidak dianalisis lebih lanjut karena diduga plasmid tersebut merupakan plasmid pGEX-6P1 yang mengalami religasi. Kemungkinan sebagian vektor plasmid pGEX-6P1 mengalami religasi karena proses digesti berlangsung kurang sempurna. Vektor juga dapat mengalami ligasi dengan molekul vektor lainnya sehingga membentuk vektor dimer (Dale & von Schantz 2007: 51--52).

#### b. Verifikasi plasmid rekombinan

Verifikasi kandidat koloni yang membawa plasmid rekombinan pGEX-nkNS1 dilakukan dengan metode *single digestion* dan PCR untuk mengetahui keberadaan dan orientasi gen NS1 dengue yang tersisip pada plasmid. Hasil elektroforesis verifikasi kandidat plasmid rekombinan dengan *single digestion* BamHI menunjukkan pita DNA linier tunggal berukuran 6.120 pb (Gambar 15, Lajur 2), sedangkan verifikasi PCR menunjukkan pita DNA gen NS1 dengue berukuran 1.160 pb (Gambar 16, Lajur 3). Verifikasi menunjukkan satu koloni positif rekombinan yang membawa plasmid pGEX-nkNS1, yaitu koloni 1b3.

Proses verifikasi digesti kandidat plasmid rekombinan setelah diisolasi dari koloni ligasi yang tumbuh dilakukan dengan enzim *Bam*HI. Enzim *Bam*HI dipilih sebagai enzim verifikasi karena dapat memotong plasmid rekombinan satu tempat pada situs perlekatan (ligasi) plasmid pGEX-6P1 dan gen *NS1* dengue sehingga pita DNA yang tampak pada hasil elektroforesis adalah pita linier tunggal berukuran 6.120 pb, hasil ligasi fragmen gen *NS1* dengue (~1.160 pb) dengan vektor pGEX-6P1 (4.960 pb).

Optimasi tahapan *single digestion* yang dilakukan sebelumnya menunjukkan bahwa enzim *Bam*HI bekerja paling optimal dibandingkan dengan enzim lainnya yang juga dapat memotong plasmid rekombinan (*Xho*I, *Nco*I, dan *Eco*RI). Kontrol verifikasi (plasmid pGEX-6P1 yang didigesti dengan *Bam*HI) menunjukkan fragmen linier berukuran 4.984 pb, yaitu ukuran vektor pGEX-6P1 *wild type* (Gambar 15, Lajur 1). Terdapat *unexpected band* pada lajur digesti kontrol yang diduga merupakan produk digesti yang kurang sempurna. Perbedaan ukuran pita DNA utama antara hasil digesti plasmid rekombinan dan plasmid kontrol yang cukup signifikan mengindikasikan gen *NS1* berhasil tersisip pada vektor pGEX-6P1.

Plasmid rekombinan dari koloni 1b3 yang memberikan hasil positif pada tahap verifikasi digesti, selanjutnya diverifikasi dengan PCR untuk memastikan orientasi sisipan gen *NS1* pada plasmid rekombinan dan memperkuat hasil verifikasi digesti. Reaksi PCR menggunakan primer spesifik d3-2336sbam dan d3-NS1-1056c, dengan DNA plasmid rekombinan

pGEX-nkNS1 1b3 sebagai cetakan. Komposisi reaksi dan kondisi PCR yang diprogram sama dengan kondisi PCR sampel gen NS1 dengue. Asumsinya, apabila gen NS1 dengue telah berhasil tersisip dengan orientasi tepat pada vektor pGEX-6P1 (masing-masing ujung 5' dan 3' kedua fragmen DNA berkomplemen satu sama lain), maka muncul pita DNA gen NS1 dengue berukuran 1.160 pb pada gel agarosa hasil elektroforesis.

Hasil amplifikasi PCR yang muncul pada gel agarosa merupakan fragmen gen NS1 dengue berukuran 1.160 pb (Gambar 16, Lajur 3). Hasil produk PCR tampak kurang spesifik, terbentuk *unexpected band* selain pita DNA gen NS1 berukuran 1.160 pb. Hal tersebut disebabkan primer tidak menempel secara spesifik pada DNA cetakan sehingga perlu dilakukan optimasi suhu penempelan primer pada cetakan plasmid 1b3. Hasil kontrol positif dan negatif PCR mengindikasikan bahwa verifikasi PCR plasmid rekombinan berlangsung baik dan tidak terjadi kontaminasi reagen (Gambar 16, Lajur 1 dan 2). Berdasarkan hasil tahap verifikasi kandidat rekombinan dengan *single digestion* dan PCR, dapat disimpulkan bahwa koloni 1b3 merupakan koloni positif rekombinan yang membawa gen NS1 dengue.

## **G. SEQUENCING DAN ANALISIS SEKUEN**

Plasmid rekombinan yang diisolasi dari koloni 1b3 diverifikasi lebih lanjut dengan *sequencing* untuk menganalisis kemungkinan terjadinya perubahan basa-basa nukleotida gen NS1 dengue selama proses amplifikasi PCR atau kloning, serta untuk memastikan ketepatan orientasi penyisipan

gen *NS1* pada plasmid pGEX-6P1. Total nukleotida yang berhasil terbaca pada proses *sequencing* sejumlah 983 basa (356 pb sekuen gen *NS1* dengue dan 627 pb sekuen plasmid pGEX-6P1), direpresentasikan pada grafik elektroferogram (Gambar 17). Sekuen gen *NS1* dengue dianalisis lebih lanjut dengan program BLASTN. Hasil analisis BLASTN menunjukkan bahwa sekuen gen *NS1* hasil kloning memiliki *similarity* 96% dengan sekuen gen *NS1* DEN-3 *strain* KJ71 (345/356) (Lampiran 8 & 9).

Proses *sequencing* menggunakan primer d3-2716c karena plasmid pGEX-6P1 tidak memiliki sekuen pengenalan primer atau promoter universal (Amersham Biosciences 2002: 95). Primer d3-2716c menempel pada basa ke-373 sampai basa ke-392 gen *NS1* dan memanjang ke arah *upstream* (Gambar 7). Sebagian sekuen *glutathione S-transferase* (GST) plasmid pGEX-6P1 yang berada pada bagian *upstream* gen *NS1* ikut terbaca sehingga ketepatan orientasi sisipan gen *NS1* dapat diketahui. Berdasarkan analisis dengan perangkat lunak Genetyx7, dapat disimpulkan bahwa gen *NS1* berhasil tersisip dengan orientasi yang tepat pada plasmid pGEX-6P1.

Nukleotida hasil *sequencing* (*query*) dianalisis dengan program BLASTN pada situs [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) untuk mengetahui *similarity* dengan sekuen acuan pada basis data DNA GenBank (*subject*) (Madden 2002: 16-1). Berdasarkan analisis BLASTN (Lampiran 8), diperoleh nilai *identities* antara 356 sekuen gen *NS1* dengue hasil *sequencing* dan sekuen DEN-3 *strain* KJ71 (*accession number* AY858044.2 ) sebesar 96% (345/356).

Menurut Hall (2001: 14), nilai *similarity* dapat ditentukan dari parameter *bit score* dan *identities*. Nilai *similarity* yang tidak mencapai angka 100% disebabkan *strain* virus dengue serotipe 3 yang diisolasi dan digunakan sebagai sampel pada penelitian (CH53489) berbeda dengan *strain* virus dengue *subject* (KJ71). Persentase *similarity* 96% merupakan hasil yang baik, karena hanya sejumlah basa (11 basa) yang tidak cocok dengan sekuen *subject*. Kemungkinan terjadi mutasi pada sejumlah basa gen *NS1* saat tahap amplifikasi PCR atau pada tahap kloning. Kemungkinan lain adalah terdapat perbedaan basa yang cukup signifikan antara *strain* CH53489 dan KJ71. Sekuen virus dengue *strain* KJ71 dipublikasikan oleh Suwandono *dkk.* pada tahun 2004 setelah meneliti perubahan genetik pada sekuen gen *prM* dan *E* virus dengue serotipe 3 di Indonesia.

Hasil analisis BLASTN menunjukkan bahwa sisipan yang dibawa oleh plasmid rekombinan merupakan gen *NS1* dari virus dengue serotipe 3, sesuai dengan sumber cDNA yang digunakan dalam penelitian. Hasil *sequencing* mengindikasikan bahwa penelitian kloning gen *NS1* virus dengue berhasil dilakukan. Klona rekombinan merupakan koloni bakteri *E. coli* BL21 Star™(DE3) yang membawa vektor ekspresi pGEX-6P1 dengan sisipan gen *NS1* virus dengue. Plasmid rekombinan pGEX-nk*NS1* diharapkan dapat langsung diekspresikan pada sel untuk memperoleh protein rekombinan *NS1* spesifik yang berguna sebagai bahan dasar kit diagnostik dengue.