

## **BAB III**

### **BAHAN DAN CARA KERJA**

#### **A. LOKASI DAN WAKTU PENELITIAN**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Molekular Kesehatan, Pusat Teknologi Farmasi dan Medika (PTFM), Laboratoria Pengembangan Teknologi Agroindustri dan Biomedika (LAPTIAB), Balai Pengkajian dan Pengembangan Teknologi (BPPT), Puspiptek, Serpong, selama 11 bulan (Januari--November 2008).

#### **B. BAHAN**

##### **1. Sampel**

Sampel yang digunakan adalah produk PCR berukuran 3.009 pb yang diamplifikasi dari cDNA gen *NS1 DEN-3 strain CH53489*. Sampel diperoleh dari kerjasama PTFM, BPPT dengan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia (dr. T. Mirawati Soediro, Ph.D.).

##### **2. Bakteri**

Bakteri yang digunakan sebagai sel inang dalam pengerjaan kloning adalah *Escherichia coli* BL21 Star™(DE3) [Invitrogen].

### 3. Vektor

Vektor yang digunakan dalam penelitian adalah vektor ekspresi plasmid pGEX-6P1 [GE Healthcare] (Gambar 5) dengan ukuran 4.984 pb.

### 4. Medium

Medium yang digunakan adalah SOB (*super optimal broth*) agar, SOB cair, serta SOC.

### 5. Larutan dan *buffer*

Larutan dan *buffer* yang digunakan dapat dilihat pada Lampiran 1.

### 6. Bahan Kimia

Bahan-bahan kimia yang digunakan dalam penelitian, antara lain: akuades; *tryptone* [BD & Biomark]; *yeast extract* [Oxoid]; natrium klorida [J.T. Baker]; *agar bacteriological* [Oxoid]; kalium klorida [Sigma]; D(+) glukosa [Sigma]; AccuPrime™ Pfx SuperMix [Invitrogen]; primer *forward* d3-2336sbam 5'-CGCGAGGATCCTCAAAAACACTTCTATGTC-3'; primer *reverse* d3-NS1-1056c 5'-TTCTCGAGGAATTCTGCTGAGGCTAGAGAC TTTA-3'; PCR Core System [Promega]; gel agarosa [Fermentas & Promega]; Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladders [Fermentas]; λ DNA/*Hind*III Markers [Fermentas]; Gene Ruler™ 1 kb Plus DNA Ladders [Fermentas]; 6x loading dye [Fermentas]; etidium bromida 10 mg/ml [Promega]; *tris base* [Promega];

asam asetat glasial [Merck]; etilen diamin tetra asetat (EDTA) [J.T. Baker]; kit Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System [Promega]; ddH<sub>2</sub>O [Gibco]; *ampicillin* [Sigma]; sodium dodesil sulfat (SDS) [Sigma]; natrium hidroksida [Sigma]; kalium asetat [Sigma]; RNase A [Sigma]; UltraPure™ fenol [Invitrogen]; kloroform [Sigma]; etanol 96% [Invitrogen]; etanol 70%; enzim *Xho*I 10 u/μl [Fermentas]; enzim *Bam*HI 10 u/μl [Fermentas]; enzim *Nco*I 10 u/μl [Fermentas]; 10x *buffer Bam*HI [Fermentas]; enzim T4 DNA ligase 3 u/μl [Promega]; 10x T4 DNA ligase *buffer* [Promega]; magnesium klorida [Sigma]; kalsium klorida [Sigma]; dimetil sulfoksida (DMSO) [MP]; gliserol [Sigma]; dan primer *sequencing* d3-2716c (5'- TTTCCCTTGCTCTAAGACCC-3').

### C. PERALATAN

Peralatan yang digunakan dalam penelitian, antara lain pipet mikro 0,2--2,0 μl, 2--20 μl, 20--200 μl, dan 100--1.000 μl [Bio-Rad]; *pipette tips* [Axygen]; timbangan digital [AND]; *hot plate* dan *magnetic stirrer* [Ika<sup>®</sup> RH-KT/C]; pH meter [Thermo]; autoklaf [Iwaki]; oven [Bicasa Termostatica]; lemari pendingin [LG & Toshiba]; *thermal cycler* [AB2400]; tabung sampel PCR 200 μl [Axygen]; *microwave oven* [General Electric]; alat catu daya [Matsunaga]; *gel electrophoresis apparatus* [Bio-Rad & Mupid 2-plus]; perangkat *gel documentation* [Vilber Lourmat]; tabung mikrosentrifugasi 1,5 ml [Axygen]; alat vorteks [K]; *deep freezer* -80° C [Angelantoni Scientifica & Thermo Revco]; *centrifuge* [Sorvall & Beckman]; *mini centrifugator* [Bio-Rad]; *laminar air flow cabinet* [ESCO]; lemari asam [ESCO]; jarum tanam bulat

(ose); pembakar Bunsen elektrik [Flamingo]; spatula Drygalski [Iwaki Pyrex]; *water-bath shaker* [Jeio Tech]; *rotary shaker* [Heidolph]; *incubator 37° C* [Sanyo]; *thermomixer* [VMR & Eppendorf]; tabung sentrifugasi polipropilen 15 dan 50 ml [Iwaki & Corning]; *concentrator* [Eppendorf]; mesin pembuat es [Hoshizaki & NordCap]; spektrofotometer [Shimadzu UV-160A & Thermo Genesys 10x]; kuvet [Bio-Rad]; *sequencer* [ABI 3130 *Genetic Analyzer*]; kamera digital [Sony DSC-W120]; *syringe* [Terumo]; *filter* bakteri 22  $\mu\text{m}$  dan 45  $\mu\text{m}$  [Corning]; kotak es [Marina Cooler]; sarung tangan karet [Sensi gloves]; kertas aluminium [Klin Pak]; kertas parafilm [Pechiney]; plastik *wrap* [Klin Pak]; kertas label [Tom and Jerry]; spidol permanen [Faber-Castell]; botol semprot alkohol; masker; tisu; plastik tahan panas; plastik *ziplock*; spatula; serta peralatan gelas yang umum digunakan di dalam laboratorium.

#### D. CARA KERJA

##### 1. Pembuatan medium

Pembuatan medium SOB cair, SOB agar, dan SOC dilakukan berdasarkan Sambrook dan Russell (2001: A2.3). Medium SOB dibuat dengan mencampurkan 20 g *tryptone*, 5 g *yeast extract*, serta 0,5 g NaCl, dalam 900 ml akuades, kemudian volumenya ditepatkan menjadi 1.000 ml. Larutan dihomogenkan, kemudian ditambahkan 5 ml larutan KCl 0,5 M. Medium diautoklaf (suhu 121° C, 15 menit, 2 atm). Sebelum digunakan, medium ditambahkan 5 ml larutan MgCl<sub>2</sub> 2 M steril.

Pembuatan medium SOB agar sama dengan pembuatan medium SOB cair, namun sebelum disterilisasi sebanyak 15 g *agar bacteriological* ditambahkan ke dalam larutan. Medium SOB agar yang masih hangat dan berbentuk cair dituangkan ke dalam cawan petri sekitar 15 ml dan dibiarkan mengeras selama kira-kira 20 menit. Medium SOC merupakan medium SOB cair yang ditambahkan 20 ml glukosa 1 M sebelum digunakan.

## 2. Pembuatan larutan dan *buffer*

Cara pembuatan dan komposisi larutan/*buffer* yang digunakan dalam penelitian dapat dilihat pada Lampiran 1.

## 3. Amplifikasi gen *NS1* dengue dengan PCR

Amplifikasi gen *NS1* dengue sebagai DNA sisipan dengan PCR dilakukan pada mesin *thermal cycler* Applied Biosystems 2400. Reaksi PCR terdiri atas 0,5 µl DNA cetakan (konsentrasi 50 ng), 0,25 µl primer *forward* dan *reverse* (0,2 µM), serta dicampurkan dengan 22,5 µl AccuPrime™ Pfx Supermix (Invitrogen 2004: 3). Kondisi PCR diprogram berdasarkan modifikasi Sambrook dan Russell (2001: 8.19--8.24), diawali dengan denaturasi awal pada suhu 94° C selama 3 menit. Siklus PCR sebanyak 30 kali dimulai dengan denaturasi pada suhu 94° C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 55° C selama 1 menit, dan polimerisasi awal pada suhu 72° C selama 1 menit 30 detik. Siklus PCR diakhiri dengan polimerisasi akhir pada suhu 72° C selama 5 menit dan penurunan suhu inkubasi menjadi 4° C.

Kontrol negatif dan kontrol positif disertakan dalam reaksi PCR.

Komposisi kontrol negatif sama dengan reaksi PCR sampel, namun tanpa penambahan DNA cetakan. Kontrol positif menggunakan kontrol positif pada kit PCR Core System, yang komposisinya terdiri atas 0,5 µl *positive control plasmid DNA* (1 ng/µl), 0,5 µl *upstream control primer*, dan 0,5 µl *downstream control primer*, dicampurkan dalam 22,5 µl AccuPrime™ Pfx Supermix. Hasil reaksi PCR dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa 0,8% (100 V, 30 menit). Pita DNA hasil reaksi PCR yang memberikan hasil positif kemudian diisolasi dari gel agarosa dan dipurifikasi.

#### 4. Elektroforesis dengan gel agarosa

Elektroforesis gel agarosa untuk memisahkan dan menganalisis fragmen DNA dilakukan berdasarkan Sambrook dan Russell (2001: 5.10--5.13). Cara pembuatan gel agarosa 0,8% (b/v) dalam *buffer* TAE 1x terdapat pada Lampiran 1. Sebanyak 3 µl penanda DNA dimasukkan ke dalam sumur gel sebagai penentu ukuran fragmen DNA. Sampel DNA dicampurkan dengan *loading buffer*, kemudian dimasukkan ke dalam sumur gel agarosa yang terendam di dalam tangki elektroforesis berisi larutan TAE 1x.

Fragmen DNA yang dimasukkan ke dalam sumur dipisahkan dengan menghubungkan tangki elektroforesis ke tegangan listrik tetap 100 V selama  $\pm$  30 menit, atau sampai pewarna bromofenol biru pada larutan *loading buffer* telah bermigrasi sampai tiga perempat bagian gel agarosa. Gel agarosa kemudian direndam di dalam larutan etidium bromida (konsentrasi 1 µg/ml)

selama 10--15 menit. Hasil elektroforesis divisualisasikan di atas sinar UV, kemudian didokumentasikan dengan perangkat *gel documentation*.

#### 5. Purifikasi DNA dengan kit Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System

Purifikasi DNA hasil elektroforesis gel agarosa menggunakan kit Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega 2005: 1--12). Kit Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System berisi *membrane binding solution* (4,5 M guanidin isotiosianat dan 0,5 M kalium asetat [pH 5,0]), serta *membrane wash solution* (10 mM kalium asetat, 16,7 µM EDTA [pH 8,0], dan 80% etanol). Gel agarosa yang mengandung fragmen DNA target dipotong, kemudian dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifugasi 1,5 ml. Berat potongan gel ditentukan dengan menghitung selisih antara berat tabung mikrosentrifugasi 1,5 ml berisi gel dan berat tabung kosong. *Membrane binding solution* ditambahkan ke dalam tabung sebanyak 10 µl untuk setiap 10 mg potongan gel. Campuran gel dilarutkan pada suhu 60--65° C.

Campuran gel yang telah larut dipindahkan ke dalam *SV minicolumn* yang telah terpasang dengan *collection tube*, diinkubasi pada suhu ruang selama 1 menit, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit. Cairan di dalam *collection tube (flowthrough)* dibuang dan *collection tube* dipasangkan kembali dengan *SV minicolumn*. *Membrane wash solution* sebanyak 700 µl ditambahkan ke dalam tabung, disentrifugasi (13.000 rpm, 1 menit), kemudian *flowthrough* dibuang. *Membrane wash solution* ditambahkan kembali ke dalam *SV minicolumn* sebanyak 500 µl,

disentrifugasi (13.000 rpm, 5 menit), kemudian *flowthrough* dibuang. Tabung disentrifugasi kembali (13.000 rpm, 1 menit) untuk mengeringkan membran dari sisa etanol, kemudian *SV minicolumn* dipindahkan ke atas tabung mikrosentrifugasi 1,5 ml yang bersih. *Nuclease-free water* (ddH<sub>2</sub>O) sebanyak 30--50 µl ditambahkan ke dalam tabung, kemudian disentrifugasi kembali (13.000 rpm, 1 menit). Hasil purifikasi disimpan pada suhu -20° C.

#### 6. Isolasi plasmid pGEX-6P1 manual dengan metode lisis alkali

Isolasi plasmid pGEX-6P1 dilakukan dengan metode minipreparasi lisis alkali berdasarkan Sambrook dan Russell (2001: 1.32--1.34). Koloni *E. coli* BL21 Star™(DE3) yang mengandung plasmid pGEX-6P1 diinokulasi ke dalam 5 ml medium SOB cair ampisilin. Kultur ditumbuhkan pada *shaker* (150 rpm, 37° C, 16 jam). Sebanyak 3--5 ml kultur *E. coli* BL21 Star™(DE3)-pGEX yang berhasil tumbuh dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifugasi 1,5 ml dan disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 2 menit. Supernatan didekantasi, kemudian pelet dilarutkan dengan penambahan 100 µl larutan alkalin lisis I dingin. Campuran dihomogenkan dengan pemipetan. Sebanyak 200 µl larutan alkalin lisis II yang baru dibuat ditambahkan ke dalam campuran, tabung dibolak-balik beberapa kali. Sejumlah 150 µl larutan alkalin lisis III dingin ditambahkan ke dalam campuran. Tabung dibolak-balik agar larutan tercampur sempurna. Selanjutnya campuran disentrifugasi (13.000 rpm, 4° C, 5 menit). Supernatan dipisahkan dari pelet dan dipindahkan ke tabung



mikrosentrifugasi baru. Larutan ditambahkan enzim RNase A (10 µg/ml) sebanyak 2 µl, kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 20--30 menit.

Larutan fenol:kloroform (1:1) sebanyak 1 volume ditambahkan ke dalam tabung, kemudian divorteks agar tercampur sempurna. Supernatan dipisahkan dari pelet setelah disentrifugasi (13.000 rpm, 4° C, 5 menit). Sebanyak 1 ml etanol 96% ke dalam supernatan. Tabung diinkubasi sekitar 30 menit di lemari pendingin pada suhu -20° C, selanjutnya disentrifugasi kembali (13.000 rpm, 4° C, 10 menit). Supernatan dibuang, kemudian pelet dicuci dengan 500 µl etanol 70%, dan disentrifugasi (13.000 rpm, 4° C, 2 menit). Pelet dikeringkan dari sisa etanol dengan *concentrator* selama 10 menit, kemudian dilarutkan dengan 30--50 µl ddH<sub>2</sub>O steril. Hasil isolasi dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa 0,8% (100 V, 30 menit).

#### 7. Digesti plasmid pGEX-6P1 dan gen *NS1* dengue

Digesti plasmid pGEX-6P1 dengan satu enzim (*single digestion*) dilakukan untuk verifikasi plasmid setelah diisolasi dari sel inang. Komposisi reaksi *single digestion* plasmid pGEX-6P1 sejumlah 10 µl terdiri atas 5 unit enzim *Bam*HI (10 unit/µl), 1x *buffer Bam*HI, 50--60 ng DNA plasmid, dan ddH<sub>2</sub>O. Reaksi kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 3 jam.

Digesti plasmid pGEX-6P1 serta produk PCR *NS1* yang telah dipurifikasi menggunakan enzim *Bam*HI dan *Xho*I (*double digestion*) dilakukan sebelum tahap ligasi (Fermentas 2008b: 1). Reaksi *double digestion* vektor dan sisipan dengan total volume 10 µl terdiri atas 120--150

ng DNA plasmid pGEX-6P1 atau gen *NS1* dengue, 1x *buffer BamHI*, 5 unit enzim *BamHI*, dan 10 unit enzim *XhoI*. Reaksi digesti diinkubasi pada suhu 37° C selama 3 jam. Hasil reaksi digesti langsung dipurifikasi dari larutan, dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa 0,8% (100 V, 30 menit), kemudian diukur konsentrasinya.

#### 8. Pengukuran konsentrasi DNA

Penentuan konsentrasi DNA pada hasil foto gel agarosa dilakukan dengan bantuan perangkat lunak BIO1D [Vilber Lourmat].

#### 9. Ligasi vektor pGEX-6P1 dengan gen *NS1* dengue

Ligasi plasmid pGEX-6P1 dengan sisipan gen *NS1* dengue menggunakan enzim T4 DNA ligase (Promega 2007: 1--2). Reaksi ligasi sejumlah 15 µl terdiri atas 1x T4 DNA ligase *buffer*, 3 µl DNA plasmid pGEX-6P1 dan 9,49 µl gen *NS1* dengue yang telah didigesti dan dipurifikasi (rasio molar vektor:sisipan (1:10)), 1,5 unit T4 DNA ligase (3 unit/µl), serta ddH<sub>2</sub>O. Reaksi ligasi diinkubasi pada suhu 16° C selama 16 jam.

Kontrol positif ligasi sejumlah 10 µl terdiri atas 1x T4 DNA ligase *buffer*, plasmid pGEX-6P1 yang telah didigesti *BamHI* (*single digestion*), 1,5 unit T4 DNA ligase (3 u/µl), serta ddH<sub>2</sub>O. Kontrol negatif ligasi tanpa T4 DNA ligase terdiri atas 1x T4 DNA ligase *buffer*, plasmid pGEX-6P1 yang telah didigesti *BamHI* dan *XhoI* (*double digestion*), serta ddH<sub>2</sub>O. Reaksi ligasi beserta kontrol-kontrolnya ditransformasi ke dalam sel kompeten.

#### 10. Pembuatan sel kompeten *Escherichia coli* BL21 Star™(DE3)

Pembuatan sel kompeten *E. coli* BL21 Star™(DE3) dilakukan dengan metode CaCl<sub>2</sub> (Sambrook & Russell 2001: 1.113--1.115). Seluruh tahap pembuatan sel kompeten harus dilakukan dalam kondisi aseptis. Koloni tunggal bakteri *E. coli* BL21 Star™(DE3) diinokulasi ke dalam 5 ml medium SOB cair. Kultur awal (*starting culture*) ditumbuhkan pada *dry shaker* (150 rpm, 37° C, 16 jam).

Kultur awal bakteri *E. coli* yang tumbuh diukur nilai absorbansinya dengan alat spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm. Spektrofotometer dikalibrasi dengan blanko larutan medium SOB. Medium SOB dituang ke dalam kuvet, kemudian kuvet dimasukkan ke dalam *cell* blanko. Tombol *measure blank* ditekan sehingga pembacaan nilai absorbansi menjadi 0,00. Sebanyak 1 ml kultur sel *E. coli* dituang ke dalam salah satu kuvet, kemudian diukur nilai absorbansinya. Jumlah kultur yang diinokulasi ke dalam medium SOB cair ditentukan dengan perbandingan antara nilai absorbansi *working culture* yang diinginkan (0,05), nilai absorbansi *starting culture*, dan jumlah *working culture* (30 ml). *Working culture* yang telah diinokulasi kultur awal, kemudian diinkubasi di *dry shaker* (150 rpm, 37° C) sampai nilai absorbansi mencapai 0,3--0,4.

Setelah mencapai nilai absorbansi tersebut, seluruh kultur sel bakteri dipindahkan ke tabung sentrifugasi 50 ml, diinkubasi dalam kotak es selama 10 menit, kemudian disentrifugasi (4.000 rpm, 4° C, 10 menit). Pelet

dipisahkan dari supernatan dengan dekantasi, kemudian disuspensikan dengan 10 ml larutan *buffer* MgCl<sub>2</sub>-CaCl<sub>2</sub> (80 mM:20mM) dingin (Lampiran 1). Tabung digoyangkan perlahan agar larutan tercampur dengan seluruh pelet. Suspensi disentrifugasi kembali (4.000 rpm, 4° C, 10 menit), kemudian didekantasi. Pelet ditambahkan 2 ml larutan CaCl<sub>2</sub> 0,1 M dan 150 µl DMSO, kemudian digoyangkan perlahan. Kultur diinkubasi dalam kotak es selama 10 menit. Kultur sel kompeten dipindahkan ke dalam beberapa tabung mikrosentrifugasi 1,5 ml, masing-masing sebanyak 100 µl. Kualitas sel kompeten ditentukan dengan transformasi plasmid kontrol dan sisanya disimpan dalam *deep freezer* pada suhu -80° C.

#### 11. Transformasi dan seleksi kandidat koloni rekombinan

Transformasi DNA plasmid ke dalam sel kompeten *E. coli* BL21 Star™(DE3) dilakukan berdasarkan Sambrook dan Russell (2001: 1.115). Sel kompeten ditambahkan 1 µl DNA plasmid pGEX-6P1 dengan konsentrasi 25--50 ng/µl, kemudian diinkubasi dalam kotak es selama 30 menit. Sekali-sekali tabung dijentikkan agar plasmid tercampur. Sel kompeten diberikan kejutan panas dengan memindahkan tabung ke *waterbath* yang telah diatur suhunya menjadi 42° C selama tepat 90 detik. Tabung langsung diinkubasi selama 10 menit dalam kotak es, kemudian ditambahkan 300 µl medium SOC. Tabung diinkubasi pada *incubator shaker* (100 rpm, 37° C, 45 menit).

Seleksi dilakukan pada medium SOB agar yang mengandung ampisilin dengan konsentrasi 100 µg/ml. Kultur sel transforman sejumlah 100 µl

disebar di atas medium dan diratakan dengan spatula Drygalski. Cawan petri didiamkan pada suhu ruang selama 15 menit agar larutan transforman meresap, kemudian diinkubasi semalam dengan posisi terbalik di dalam inkubator suhu 37° C. Kontrol positif transformasi disebar pada medium SOB agar tanpa ampisilin, sedangkan kontrol negatif disebar pada medium SOB agar dengan ampisilin. Reaksi ligasi beserta kontrol-kontrolnya disebar pada medium SOB agar dengan ampisilin. Nilai efisiensi transformasi ditentukan dengan menghitung jumlah koloni transforman yang tumbuh dan konsentrasi plasmid yang ditransformasi, kemudian dimasukkan dalam rumus efisiensi transformasi (Queen-Baker 2000: 7).

$$\text{Efisiensi transformasi} = \frac{\text{jumlah koloni transforman} \times \text{volume kultur transformasi}}{\text{konsentrasi DNA plasmid} \times \text{volume kultur yang disebar}}$$

## 12. Verifikasi hasil kloning dengan *single digestion* enzim *Bam*HI dan PCR

Verifikasi *single digestion* dengan enzim restriksi *Bam*HI dilakukan pada transforman kandidat plasmid rekombinan hasil kloning yang telah diisolasi dengan metode lisis alkali (Fermentas 2008b: 1). Reaksi *single digestion* dengan enzim *Bam*HI terdiri atas 50--100 ng DNA plasmid rekombinan, 5 unit enzim *Bam*HI, 1x *buffer Bam*HI, dan ddH<sub>2</sub>O, kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 3 jam. Kontrol verifikasi digesti berupa plasmid pGEX-6P1 yang didigesti dengan enzim *Bam*HI. Hasil digesti dianalisis dengan elektroforesis menggunakan penanda DNA 1 kb Plus DNA Ladders.

Plasmid rekombinan yang telah memberikan hasil positif pada tahap verifikasi digesti, selanjutnya diverifikasi dengan PCR. Reaksi PCR terdiri atas 0,5 µl DNA cetakan (plasmid rekombinan 1b3), 0,25 µl primer *forward* dan 0,25 µl primer *reverse* (0,2 µM), dicampurkan dalam 22,5 µl AccuPrime™ Pfx Supermix. Kondisi PCR diawali dengan denaturasi awal pada suhu 94° C selama 3 menit. Siklus PCR sebanyak 30 kali dimulai dengan denaturasi pada suhu 94° C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 55° C selama 1 menit, dan polimerisasi awal pada suhu 72° C selama 1,5 menit. Siklus PCR diakhiri dengan polimerisasi akhir pada suhu 72° C selama 5 menit dan penurunan suhu inkubasi menjadi 4° C. Produk PCR yang diperoleh dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa 0,8% (100 V, 30 menit).

### 13. *Sequencing* dan analisis sekuen

*Sequencing* dilakukan di Lembaga Biologi Molekular Eijkman, Jakarta Pusat. Proses *sequencing* mencakup tahapan *cycle sequencing*, presipitasi produk *cycle sequencing*, dan pembacaan sekuen melalui elektroforesis kapiler dengan alat *sequencer* ABI PRISM 3130 xl Genetic Analyzer [Applied Biosystems]. Reaksi *cycle sequencing* terdiri atas 250 ng DNA cetakan (DNA plasmid rekombinan), 6 µl *big dye terminator*, 200 µM primer spesifik d3-2716c, serta ddH<sub>2</sub>O steril, sehingga volume total reaksi adalah 15 µl. *Cycle sequencing* sebanyak 25 siklus dimulai dengan denaturasi pada suhu 96° C selama 10 detik, *annealing* pada suhu 50° C selama 5 detik, dan polimerisasi pada suhu 60° C selama 4 menit.

Produk *cycle sequencing* selanjutnya dipresipitasi dengan 25 µl etanol absolut, 1 µl EDTA 125 mM, dan 1 µl sodium asetat 3 M ke dalam tabung mikrosentrifugasi 1,5 ml. Campuran diinkubasi selama 10 menit pada suhu 4° C. Tabung disentrifugasi (12.000 rpm, 20 menit), kemudian supernatan dibuang. Sebanyak 250 µl etanol 70% ditambahkan ke dalam tabung dan disentrifugasi kembali (12.000 rpm, 10 menit), kemudian supernatan dibuang dan DNA dikeringkan dengan *speed vaccum* selama 7 menit.

Tabung mikrosentrifugasi berisi sampel DNA hasil presipitasi ditambahkan 12 µl HD (*high deionized*) *formamide*, kemudian divorteks selama 30 detik dan disentrifugasi selama 5 detik. Campuran selanjutnya dimasukkan ke dalam *plate* tertutup. *Plate* dipanaskan selama 3 menit pada suhu 95° C dengan mesin *thermal cycler*, kemudian diinkubasi 3 menit di atas es. *Tray* dipasang pada *plate* kemudian diletakkan di dalam alat *DNA sequencer* untuk melakukan pembacaan urutan nukleotida melalui elektroforesis kapiler. Hasil pembacaan urutan nukleotida kemudian direkam dalam komputer untuk diubah ke dalam bentuk elektroferogram.

Urutan nukleotida hasil *sequencing* yang ditunjukkan pada grafik elektroferogram diedit dengan perangkat lunak Chromas Lite. Sekuen gen *NS1* dengue hasil *sequencing* (*query*) disejajarkan dengan basis data DNA pada GenBank (*subject*) melalui program BLASTN di situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>. Hasil analisis BLASTN yang menunjukkan *subject* dengan persentase *similarity* terbesar (>90%) ditentukan sebagai sekuen yang memiliki kekerabatan terdekat dengan sekuen *query*.